

制备鲐鱼鱼肉发酵液中抗氧化因子的条件优化

蒋国玲^{1,2,3}, 陈洁³, 张萌萌^{1,2}, 孙志高^{2,*}

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2.中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712;

3.浙江海洋学院食品与药学学院, 浙江 舟山 316004)

摘 要: 以食品级枯草芽孢杆菌为实验用菌, 通过发酵法制备具有抗氧化作用的鲐鱼鱼肉发酵液。在液体培养基的基础上研究装液量、葡萄糖添加量、鱼肉培养基料液比、培养转速对发酵产物的影响, 结果表明: 装液量 50mL/250mL 或 100mL/250mL、葡萄糖添加量 2%、鱼肉:水料液比(m/V)1:(1~2)、摇床转速 150r/min 条件下, 发酵液的抗氧化性较高。在加糖量、装液量及料液比试验结果影响较大的单因素试验基础上, 采用响应面分析法(Box-Behnken)对发酵鱼肉培养基制备抗氧化型发酵液的工艺参数进行优化后, 得出最佳条件为: 葡萄糖添加量 3.98%、装液量 96.02mL/250mL、鱼肉:水料液比 1:1.60, 其发酵液的 DPPH 自由基清除率可达 94.52%。

关键词: 鱼肉蛋白; 抗氧化因子; 枯草芽孢杆菌; 发酵液; 抗氧化性

Optimization of Fermentation Conditions for Preparation of Highly Antioxidant Fermented Mackerel Broth

JIANG Guo-ling^{1,2,3}, CHEN Jie³, ZHANG Meng-meng^{1,2}, SUN Zhi-gao^{2,*}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China;

3. College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China)

Abstract: The preparation of fermented fish broth with high antioxidant activity from mackerel meat with food-grade *Bacillus subtilis* was investigated in the present study. The results of one-factor-at-a-time experiments showed that highly antioxidant fermented fish broth was obtained under the fermentation conditions: medium volume of 50 mL or 100 mL in 250 mL shake flasks, glucose concentration of 2%, fish meat-to-water ratio of 1:(1~2) (m/V), and rotation speed of 150 r/min. It was also found that glucose concentration, medium volume in 250 mL shake flasks and fish meat-to-water ratio were main parameters that influence the production of antioxidant ingredients. Using response surface methodology based on a Box-Behnken experimental design, the main fermentation parameters were optimized to be 3.98%, 96.02 mL/250 mL and 1:1.60 (m/V), respectively. The fermented fish broth obtained under these conditions exhibited a DPPH radical scavenging rate of 94.52%.

Key words: fish protein; antioxidant factors; *Bacillus subtilis*; fermented broth; antioxidant activity

中图分类号: TS205.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0219-05

物质的抗氧化能力是有抗氧化因子所决定的, 抗氧化因子是指可中和机体所产生的氧“自由基”、保护机体细胞免受伤害的一类物质。抗氧化因子的来源主要是化学法合成和从天然生物中提取。但随着科技的进步和人类生活水平的提高, 以及对自身健康意识的增强, 越来越多的人认识到化学合成抗氧化因子存在对人体潜在的危害性^[1-3]。从天然生物中提取抗氧化因子, 因其天然、高效、低毒的特点日益受到国内外专家的普遍认可, 有逐步取代人工合成抗氧化剂的趋势^[4]。天然抗氧

化因子的来源主要包括植物和海洋生物, 尽管我国有丰富的植物和海洋生物资源; 但在研究和生产过程中发现从生物中提取抗氧化因子的工艺技术复杂、提取率低、成本较高, 这已成为制约天然抗氧化因子快速发展的瓶颈因素。目前国外学者在用微生物发酵的方法制备天然抗氧化因子方面进行了一些研究, 取得了一定的成果^[5-7]。研究证实, 利用微生物发酵的方法可以提高抗氧化因子的产率, 降低成本, 节约资源, 具有广泛的应用前景。

收稿日期: 2011-04-18

作者简介: 蒋国玲(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。E-mail: jgl1986123@126.com

* 通信作者: 孙志高(1964—), 男, 副研究员, 学士, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: cpro@163.com

本实验以食品级枯草芽孢杆菌为实验菌株,通过发酵低值鱼蛋白方式制备具有抗氧化活性的发酵液,为大批量、低成本制备天然抗氧化因子提供技术参考,为低值鱼的深加工利用提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种:食品级枯草芽孢杆菌由浙江海洋学院食品与药学院实验室提供,实验所用鲢鱼鱼肉购自舟山市菜场。

氢氧化钠、氯化钠、盐酸、无水乙醇、葡萄糖国药集团化学试剂有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 美国Sigma公司;蛋白胨、纯化琼脂粉(细菌级) 杭州天和微生物试剂有限公司;酵母浸膏 中国医药集团上海化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平、电子分析天平 北京赛多利斯天平有限公司;低速离心机 上海安亭科学仪器厂;水浴恒温振荡器 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;旋转蒸发器 上海爱朗仪器有限公司;电热恒温鼓风干燥箱 上海森实验仪器有限公司;电子调温电热套 天津泰斯特仪器有限公司;精密pH计、可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;立式电热压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;恒温恒湿培养箱 宁波东北仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基的配制

LB培养基:酵母浸粉 5.0g、蛋白胨 10.0g、NaCl 10.0g、蒸馏水 1000mL, pH7.0。LB葡萄糖培养基:酵母浸粉 5.0g、蛋白胨 10.0g、NaCl 10.0g、葡萄糖 10g、蒸馏水 1000mL, pH7.0。鱼肉发酵培养基:按照鱼肉:水,料液比为1:2(m/V)的比例打成匀浆、自然pH值、高压灭菌30min^[8]。

1.3.2 菌种的活化与保存

配制LB液体培养基100mL,调pH值至7.0,经121℃灭菌20min且冷却后,在超净台上接种,每100mL LB液体培养基内接入原始菌种100μL,在37℃恒温摇床培养箱中,在150r/min条件下培养10~12h^[9]。

采用甘油保存方式:在已灭菌的1.5mL EP管中分别加入500μL的活化菌液和60%甘油500μL,充分混合后即为30%的甘油保存菌种^[10]。

1.3.3 生长曲线的测定

1.3.3.1 种子液的制备

用接种环挑取LB固体培养基上的单菌落,接种于

已灭菌的LB培养基(50mL/150mL三角瓶)中,在37℃、150r/min振荡培养24h后,使菌液含量达到10⁷CFU/mL作种子液备用^[11]。

1.3.3.2 生长曲线的绘制

准确吸取1mL种子液,加入已编号的LB(50mL/250mL)锥形瓶中,在37℃、150r/min振荡培养。每隔4h取出一些培养液注入已灭菌的试管中,暂放4℃冰箱中保存,待培养结束后,以未接种的LB液体培养基做空白,统一测定不同培养时间段的OD_{570nm}值。对浓度大的菌悬液用空白LB液体培养基适当稀释使其OD_{570nm}值在0.10~1.00之间,稀释后所得的OD_{570nm}值乘以相应稀释倍数,以得到培养液实际的OD_{570nm}值。然后以时间为横坐标,以OD_{570nm}值为纵坐标,绘制枯草芽孢杆菌的生长曲线^[9]。

1.3.4 抗氧化性的检测^[12-14]

通过测定发酵液对DPPH自由基的清除能力,来判断发酵液的抗氧化性能,方法如下:样品在8000r/min离心10min,取上清液备用。然后再准确称取0.0200g DPPH溶解在无水乙醇中,用100mL棕色容量瓶定容,放入冰箱中备用。

样品混合物组:1mL样品+1mL 99.5%乙醇溶液+250μL质量浓度为0.02g/100mL DPPH乙醇溶液;对照组:1mL蒸馏水+1mL 99.5%乙醇溶液+250μL质量浓度为0.02g/100mL DPPH乙醇溶液;空白组:1mL样品+1mL 99.5%乙醇溶液+250μL乙醇溶液。

将混合物放在室温暗室中存放60min后,以99.5%的乙醇调零,测定517nm波长处测吸光度。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_1 - (A_x - A_2)}{A_1} \times 100$$

式中:A₁为对照组吸光度;A₂为空白组吸光度;A_x为样品混合物组的吸光度。

1.3.5 培养时间对抗氧化性的影响

基于枯草芽孢杆菌在20~72h均处于稳定生长期,用DPPH法在20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、62、68、72h培养时间段,分别测定其抗氧化性。

1.3.6 接种量对抗氧化性的影响

基于枯草芽孢杆菌抗氧化性最佳的发酵菌液,分别按2%、3%、5%、8%、10%的接种量将活化24h的食用枯草芽孢杆菌菌液转接入50mL的LB葡萄糖培养基中,其他条件相同。在37℃、150r/min发酵培养24h后,用DPPH法检测代谢产物的抗氧化性,以确定出最佳的接种量。

1.3.7 制备鱼肉发酵中抗氧化因子工艺参数的研究^[15-17]

1.3.7.1 鱼肉培养基料液比的确定

按照鱼肉:水为 1:1、1:2、1:3、1:4(*m/V*)的比例打成匀浆制备发酵培养基,在培养基中添加 1.0% 的葡萄糖,经 121℃ 高压灭菌 30min 后,按最适宜接菌量将活化 24h 的食用枯草芽孢杆菌菌液接入其中,在 37℃、150r/min 发酵培养 24h 后,用 DPPH 法测定抗氧化性,以确定出最佳的料液比。

1.3.7.2 葡萄糖添加量的确定

以鱼肉:水为 1:1(*m/V*)配制培养基,在培养基中葡萄糖加入量分别为 1.0%、1.5%、2.0%、3.0%,经 121℃ 高压灭菌 30min 后,按最适宜接菌量将活化 24h 的食用枯草芽孢杆菌菌液接入其中,在 37℃、150r/min 发酵培养 24h 后,用 DPPH 法测定抗氧化性,以确定葡萄糖添加量对代谢产物抗氧化性的影响。

1.3.7.3 鱼肉培养基装液量的确定

以鱼肉:水为 1:1(*m/V*)和葡萄糖添加量 2.0% 配制培养基,在 250mL 的三角瓶中分别装入 25、50、75、100mL 鱼肉培养基,其他条件相同,在 121℃ 高压灭菌 30min 后,按最适宜接菌量将活化 24h 的食用枯草芽孢杆菌菌液接入,在 37℃、150r/min 条件下发酵培养 24h 后用 DPPH 法检测代谢产物的抗氧化性,以确定最适的培养装液量。

1.3.7.4 摇床转速的确定

以鱼肉:水为 1:1(*m/V*)、葡萄糖添加量 2.0% 配制培养基,按最适接种量将活化 24h 的食用枯草芽孢杆菌菌液接种,在分别以 120、150、180r/min 的转速、37℃ 培养 24h 后,用 DPPH 法检测代谢产物的抗氧化性,以确定摇床最佳转速。

1.3.8 提高鱼肉发酵液抗氧化性的工艺参数优化

在单因素试验基础上,以培养基装液量、葡萄糖添加量、鱼肉培养基料液比对应的独立变量 X_1 、 X_2 、 X_3 ,以发酵液对 DPPH 自由基清除提高率 Y 为响应值。根据 Box-Behnken 的中心原理组合设计试验方案,利用 SAS(9.0)软件对实验数据进行分析,以获得最适工艺参数,实验水平因素^[18-20]见表 1。

表 1 响应面分析试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

编码值	X_1 装液量/(mL/250mL)	X_2 葡萄糖添加量/%	X_3 鱼肉:水(<i>m/V</i>)
-1	50	1.0	1:1
0	75	1.5	1:2
1	100	2.0	1:3

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌的生长曲线

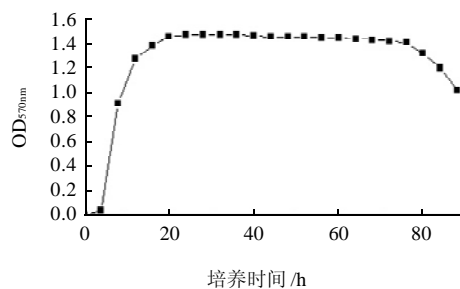


图 1 枯草芽孢杆菌的生长曲线图

Fig.1 Growth curve of *Bacillus subtilis*

由图 1 可知,枯草芽孢杆菌在 0~4h 时处于调整生长期,在 4~20h 处于对数增长期,20~72h 处于稳定生长期。故在进行接种时可选用活化培养 20~24h 的菌液进行接种,此时菌体处于对数生长后刚进入稳定初期,菌种的数量和质量可以满足发酵接种的要求。

2.2 培养时间对抗氧化性的影响

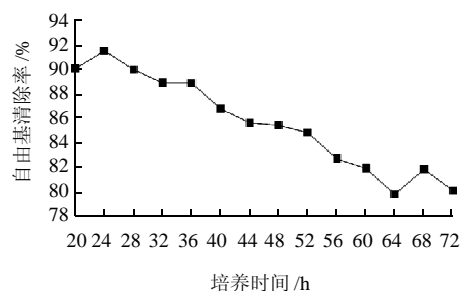


图 2 培养时间对抗氧化性的影响

Fig.2 Effect of incubation time on the antioxidant activity of fermented fish broth

由图 2 可知,培养 24h 时菌液的抗氧化性最高,而随着培养时间的延长对 DPPH 自由基的清除率呈下降趋势,随着发酵的进行,次级代谢产物越来越多,会影响抗氧化性,故 DPPH 法进行抗氧化性测定的时间选定为发酵 24h 的菌液。

2.3 接种量对抗氧化性的影响

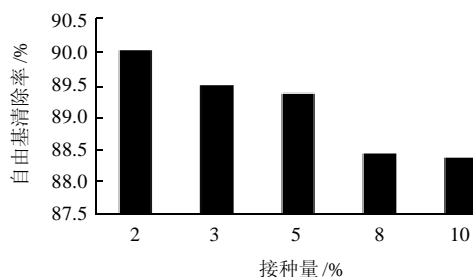


图 3 接种量对抗氧化性的影响

Fig.3 Effect of inoculum size on the antioxidant activity of fermented fish broth

由图3可知,随着接种量的增加,对DPPH自由基清除率呈下降趋势。一般认为,接种量大有利于缩短延迟期,但如果接种量过大,随着种子培养基引入的抑制性次生代谢产物等有害物质也相应增多,不利于抗氧化物的合成。实验结果证实,当接种量为2%时,对DPPH自由基清除率最高,清除率达90.14%,故选择2%为最佳接种量。

2.4 对制备鱼肉发酵液的最佳工艺参数的单因素试验

2.4.1 料液比对抗氧化性的影响

以鱼肉培养基(50mL/250mL)进行发酵培养,研究料液比(鱼肉:水)对抗氧化性的影响,结果如图4所示。随着培养基中加水量的增加,发酵液的抗氧化能力逐渐降低。原因可能是随着发酵的进行,培养基中营养物质不断减少,菌体产生的次级代谢产物增多,可能会干扰对抗氧化性物质的检测。由结果可知,当鱼肉:水料液比为1:(1~2)时,发酵液的抗氧化能力较高。

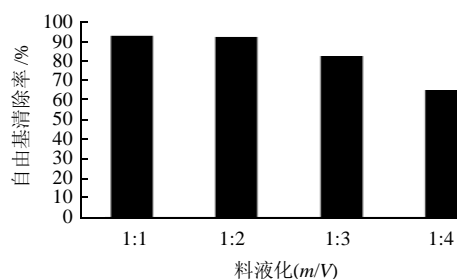


图4 鱼肉培养基料液比对抗氧化性的影响

Fig.4 Effect of fish meat-to-water ratio on the antioxidant activity of fermented fish broth

2.4.2 葡萄糖添加量对抗氧化性的影响

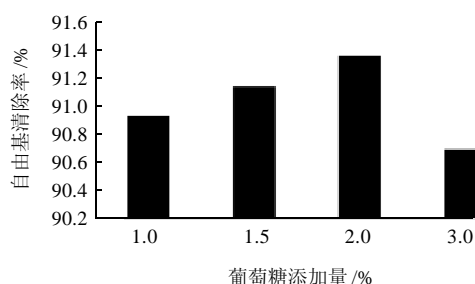


图5 葡萄糖添加量对抗氧化性的影响

Fig.5 Effect of glucose on the antioxidant activity of fermented fish broth

以鱼肉培养基(50mL/250mL)进行发酵培养,研究葡萄糖添加量对抗氧化性的影响,结果如图5所示。随着葡萄糖添加量的增加发酵产物的抗氧化性增强,当葡萄糖添加量2.0%时DPPH自由基清除率最高。因含糖量增

高,会导致微生物生长的环境渗透压增高,从而抑制微生物的生长,会直接导致发酵液的抗氧化性能降低,故选2.0%为最适葡萄糖添加量。

2.4.3 装液量对抗氧化性的影响

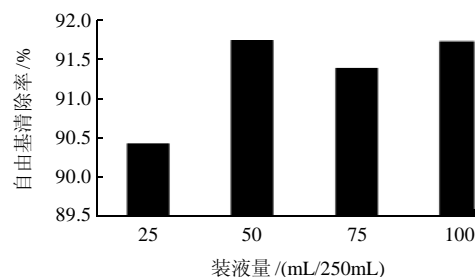


图6 鱼肉培养基装液量对抗氧化性的影响

Fig.6 Effect of medium volume on the antioxidant activity of fermented fish broth

由图6可知,装液量在50mL/250mL和100mL/250mL时发酵产物的抗氧化性较高。当营养物质充分,而通气量又能提供有氧呼吸时,菌体的长势最好,发酵液抗氧化也增强。

2.4.4 摇床转速对抗氧化性的影响

以鱼肉培养基(50mL/250mL)进行发酵培养,研究了转速对抗氧化性的影响,结果如图7所示。随着摇床转速的增加,通气量加大,溶氧量增加,菌体活力增强,发酵液的抗氧化能力也随之增强,但当振荡过于激烈时,可能是造成了菌丝破裂,细胞内容物外渗,使菌体发酵产物的抗氧化性下降,故当摇床转速为150r/min时菌体发酵液抗氧化性最强。

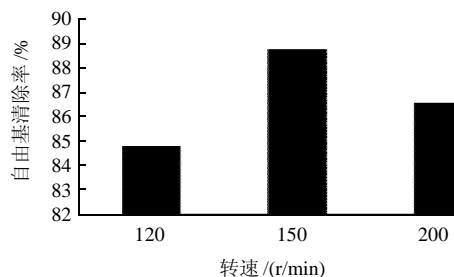


图7 鱼肉培养基摇床转速对抗氧化性的影响

Fig.7 Effect of rotation speed on the antioxidant activity of fermented fish broth

2.5 鱼肉发酵液最佳工艺参数的优化

利用RSA统计软件通过响应回归程序对表3试验数据进行分析,得到的发酵液DPPH自由基清除率对3个因素的二次多项回归模型为:

$Y = 41.294 - 8.624X_1 + 0.093X_2 + 1.658X_3 + 0.016X_1X_2 - 0.500X_1X_3 + 1.900 \times 10^{-3}X_2X_3 + 3.193X_1^2 - 7.428 \times 10^{-4}X_2^2 - 0.429X_3^2$, 模拟的可靠性通过方差分析和相关参数来考察, 见表 3。

表 3 响应面分析方案及结果
Table 3 Box-Behnken design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	Y 发酵液 DPPH 自由基清除率 /%
1	-1	-1	0	90.90
2	-1	1	0	91.41
3	1	-1	0	90.76
4	1	1	0	92.09
5	0	-1	-1	90.99
6	0	-1	1	90.21
7	0	1	-1	92.94
8	0	1	1	91.16
9	0	0	-1	90.44
10	1	0	-1	91.07
11	-1	0	0	88.96
12	1	0	0	89.78
13	0	0	0	90.93
14	0	0	0	90.95
15	0	0	0	90.95
16	0	0	0	91.47
17	0	0	0	90.48

表 4 方差分析结果
Table 4 Results of variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	11.43	9	1.27	12.00	0.0018	*
X_1	2.81	1	2.81	26.53	0.0013	**
X_2	0.50	1	0.50	4.68	0.0674	
X_3	3.55	1	3.55	33.55	0.0007	**
X_1X_2	0.17	1	0.17	1.59	0.2480	
X_1X_3	0.25	1	0.25	2.36	0.1682	
X_2X_3	9.025×10^{-3}	1	9.025×10^{-3}	0.085	0.7788	
X_1^2	2.68	1	2.68	25.35	0.0015	**
X_2^2	0.91	1	0.91	8.57	0.0221	*
X_3^2	0.78	1	0.78	7.33	0.0303	*
残差值	0.74	7	0.11			
失拟项	0.25	3	0.083	0.68	0.6103	
纯差	0.49	4	0.12			
总和	12.17	16				

注: *.差异显著($P < 0.05$); **.差异极显著($P < 0.01$)。

由表 4 可知, 模型具有显著性($P < 0.05$), 失拟项($P > 0.05$)不显著, 从回归方程各项方差的进一步检验可知, X_2^2 、 X_3^2 显著, X_1 、 X_3 、 X_1^2 极显著, 表明各项试验因素对应的响应值不是简单的线性关系; $R^2 = 0.9391$, 表明回归方程可以较好的描述各因素与响应值的真实关系^[21], 可以利用该回归方程确定最佳的工艺参数: 装液量 96.02mL/250mL、葡萄糖添加量 3.98%、鱼肉:水料液比 1:1.60 时, 在此工艺条件下, 发酵液的 DPPH 自由基清除率可达到 94.52%。

3 结 论

本实验对生物发酵方法制备抗氧化因子条件进行了研究, 结果表明: 种子液的培养时间为 22~24h, 培养 24h 时, 清除 DPPH 自由基的能力最强, 在对接种量、装液量、发酵培养摇床转速、葡萄糖添加量、料液比等单因素的研究表明当接种量 2%、装液量 50mL/250mL 或 100mL/250mL、摇床转速 150r/min、葡萄糖添加量 2%、鱼肉:水料液比为 1:(1~2)时, 发酵液的抗氧化性较强。各因素改变对发酵液抗氧化性均有影响, 但影响程度不同, 通过对发酵液抗氧化性影响较大的葡萄糖添加量、装液量及料液比做响应面分析得到的最佳发酵鱼肉制备抗氧化因子工艺参数为: 葡萄糖添加量 3.98%、装液量 96.02mL/250mL、鱼肉:水料液比为 1:1.60, 发酵液 DPPH 自由基清除率达到 94.52%。

参考文献:

- [1] 吕丽爽. 天然抗氧化剂低聚原花青素的研究进展[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 147-149.
- [2] 乔风云, 陈欣. 抗氧化因子与天然抗氧化剂研究综述[J]. 科学通报, 2006, 22(3): 331-335.
- [3] 杨洋, 韦小英. 国内外天然食品抗氧化剂的研究进展[J]. 食品科学, 2002, 23(10): 137-139.
- [4] 左玉, 谢文磊. 生物抗氧化剂抗氧化作用的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 62-64.
- [5] 房耀维, 余勃, 王淑军, 等. 发酵法制备沙光鱼多肽及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 298-301.
- [6] 刘妹, 余勃. 发酵法制备鱼鳞多肽及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 332-334.
- [7] MELDRUM J B, EVANS R D, ROBERTSON J L, et al. Alterations in levels of various host antioxidant factors in turkey knockdown syndrome[J]. Avian Diseases, 2000, 44: 891-895.
- [8] 郝记明, 张静, 谌素华, 等. 酶法水解珍珠贝肉蛋白质的工艺探讨[J]. 食品科学, 2002, 23(4): 51-53.
- [9] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 64-108.
- [10] 何国庆, 贾英民. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 199-207.
- [11] 郭宇星. 微生物发酵法制备水解乳清蛋白粉制备生物活性的研究[D]. 天津: 天津商学院, 2003.
- [12] SZABO M R, IDITION C, CHMBRE D, et al. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay[J]. Chemical and Materials Science, 2007, 61(3): 214-216.
- [13] DU Guorong, LI Mingjun, MA Fengwang, et al. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits[J]. Food Chemistry, 2009, 11(3): 557-562.
- [14] 王和才, 胡秋辉. DPPH 法测定紫红薯提取物清除自由基的能力[J]. 食品研究与开发, 2001, 31(1): 132-135.
- [15] 王永宏. 京尼平的微生物制备及其作为交联剂的应用研究[D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [16] 韩乐鹭, 麓舞, 羚静, 等. 纳豆枯草杆菌的筛选和纳豆激酶发酵条件优化[J]. 浙江大学学报, 2004, 38(10): 208-215.
- [17] GURARD F, GUIMAS L, BINET A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 20(2): 489-498.
- [18] PATEL N V, PATEL J K, SHAH S H. Box-behnken experimental design in the development of pectin-compritol ATO 888 compression coated colon targeted drug delivery of mesalamine[J]. Acta Pharmaceutica, 2010, 60(1): 39-54.
- [19] 李亚萍, 程卫东, 詹萍, 等. 响应曲面法微波辅助提取 β -胡萝卜素工艺[J]. 食品生物技术学报, 2009, 28(4): 487-491.
- [20] 王钦德, 杨坚. 食品设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 384-416.
- [21] 徐子竟, 黎贵卿, 黄丽, 等. 响应面发优化微波辅助提取滇桂艾纳香多糖工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(1): 220-223.