

草鱼鳞酶解物的制备及其促嗜热链球菌生长作用

李路瑶, 曾丽芳, 宋益善, 陈建康

Preparation of grass fish scale hydrolysate and its proliferation effect on *Streptococcus thermophilus* growth

LI Luyao, ZENG Lifang, SONG Yishan, CHEN Jiankang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200703094>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

罗非鱼无乳链球菌微胶囊口服疫苗的研制及其免疫效果

Preparation of the oral microencapsulated vaccine of *Streptococcus agalactiae* from tilapia and its immunological effect
水产学报. 2016, 40(8): 1258 <https://doi.org/10.11964/jfc.20160110264>

枯草芽孢杆菌BA015对无乳链球菌的拮抗作用及其物质分析

Antagonism and mechanism of *Bacillus subtilis* BA015 against *Streptococcus agalactiae*
大连海洋大学学报. 2021, 36(1): 103 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-317>

鱼鳞蛋白酶解物为基料的涂膜剂对鲫的保鲜效果

Effect of fish-scale protein hydrolysates-based films on preservation of crucian carp (*Carassius auratus*)
水产学报. 2011, 35(7): 1113 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2011.17339>

五倍子分离组分抑制无乳链球菌的热动力学研究

Thermodynamics of Inhibition of Extract from *Galla Chinensis* on *Streptococcus agalactiae*
水产科学. 2020, 39(6): 947 <https://doi.org/10.16378/j.cnki.1003-1111.2020.06.022>

斑点叉尾源海豚链球菌Srr蛋白海藻酸钠-壳聚糖口服疫苗的制备及其免疫效果研究

STUDY ON THE PREPARATION AND IMMUNE EFFICACY OF A ALGINATE-CHITOSAN ORAL VACCINE OF SRR-PROTEIN FROM *STREPTOCOCCUS INIAE*
水生生物学报. 2018, 42(1): 39 <https://doi.org/10.7541/2018.006>

罗非鱼无乳链球菌Sip-Pgk融合蛋白乳酸菌口服疫苗制备及其免疫效果的研究

Preparation and immunogenicity of *Lactococcus lactis* vaccine expressing Sip-Pgk fusion protein of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia
南方水产科学. 2019, 15(6): 9 <https://doi.org/10.12131/20190092>

文章编号: 1674-5566(2021)06-1132-10

DOI:10.12024/jsou.20200703094

草鱼鳞酶解物的制备及其促嗜热链球菌生长作用

李路瑶¹, 曾丽芳¹, 宋益善^{1,2}, 陈建康¹

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 国家淡水水产品加工技术研发中心, 上海 201306)

摘要: 为提高水产品综合利用率和开发新型益生菌功能性食品, 以鱼类加工副产物草鱼鳞为研究对象, 利用风味蛋白酶对其进行酶解, 并以酶解物促嗜热链球菌增殖作用为评价指标, 结合单因素试验与响应面 Box-Behnken 中心组合试验优化酶解工艺, 得到最优酶解条件: 酶解时间 3.8 h, 料液比 (w/v) 1:3.2 g/mL, 加酶量 6.2%。在此条件下, 嗜热链球菌增殖量 $\Delta OD_{600} = 1.1734 \pm 0.0150$ 。同时, 将最优酶解条件下得到的酶解物进行膜过滤分离, 得到分子量 <1 ku、1~<3 ku、3~<5 ku、5~<10 ku、 ≥ 10 ku 的 5 个组分, 并进一步就各组分对嗜热链球菌的生长曲线和产酸能力的影响进行研究。结果表明, 在嗜热链球菌 24 h 的生长曲线中, 分子量 <1 ku 的组分促嗜热链球菌生产和产酸效果最好: 嗜热链球菌增殖量 ΔOD_{600} 为 1.050, 培养基的 pH 比初始值降低了 1.06。

关键词: 草鱼鳞; 酶解; 嗜热链球菌; 增殖

中图分类号: TS 254.1 **文献标志码:** A

随着人们越来越重视自身的健康, 益生菌功能性食品市场也在不断扩大^[1-2]。对于益生菌类的食品来说, 一个重要的质量指标为足够多的菌体数量。因此, 为益生菌寻找高安全性和生物相容性的营养元素, 特别是天然产物中提取或降解得到的有机分子, 对开发新型的益生菌功能性食品具有极其重要的科学意义。

多糖和多肽为常见的天然有机分子, 分别是益生菌生长所需的重要碳源和氮源, 是促益生菌增殖的重要因子^[3]。目前, 国内外学者^[4-8]对多糖促益生菌增殖作用的研究较为广泛和深入, 证实多糖可以有效促进益生菌生长, 并且能够有效调节肠道菌群。相比多糖, 多肽促益生菌生长的报道相对较少, 相关研究也不够深入和细致。目前, 已报道的研究^[9-12]仅有大豆蛋白和乳蛋白酶解物等植物蛋白源的多肽促进益生菌生长。相较于植物蛋白, 动物蛋白的氨基酸种类更加齐全, 各氨基酸的组成比例更合理, 更利于人体吸收, 但动物蛋白源的多肽促益生菌生长的研究则鲜有报道^[13-17]。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 是我国淡水养殖鱼类的一种, 其年产量达到淡水鱼年总产量的五分之一左右, 每年会产生大量的加工副产物^[18]。如何更好地利用这些副产物, 对于减少环境污染、提高水产资源的综合利用率具有重要意义^[19]。

现阶段, 以水产品副产物为原料制备具有生物活性的肽分子, 已逐渐成为热门研究领域。其中, 鱼鳞作为加工副产物之一, 由于没有血管所以不会产生病变, 同时又含有大量的胶原蛋白, 是理想的天然肽来源^[20-21]。基于以上现状, 以草鱼鳞为研究对象, 利用风味蛋白酶酶解草鱼鳞, 优化制备工艺, 并研究不同分子量的酶解物对嗜热链球菌的增殖和产酸的影响。研究结果可以为鱼加工副产物的综合利用、新型益生菌功能性食品的开发提供理论基础^[22-23]。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

草鱼鳞, 购自上海市昶友渔业专业合作社海鲜批发部; 风味蛋白酶 (1.24×10^3 U/g), 购自日

收稿日期: 2020-07-02 修回日期: 2020-09-05

基金项目: 上海海洋大学科技发展专项基金 (A2-2006-00-200209); 上海市大学生创新基金 (2020)

作者简介: 李路瑶 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品。E-mail: 907185432@qq.com

通信作者: 宋益善, E-mail: yssong@shou.edu.cn

本天野酶制品株式会社;嗜热链球菌(CICC-20174),购自中国工业微生物菌种保藏管理中心;其余所有试剂购自上海麦克林生化科技有限公司,均为AR级。

1.2 仪器与设备

超滤杯,上海摩速科学器材有限公司生产;721G可见光分光光度计,上海精密科学仪器有限公司生产;ZQLY-300恒温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司生产;冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司生产;Agilent1260高效液相色谱仪,美国Agilent科技公司生产;Agilent SB-C18色谱柱,4.6 mm × 250 mm,5 μm,上海安捷伦科技有限公司生产;滤膜,上海摩速科学器材有限公司生产;pH计,上海精密科学仪器有限公司生产;移液枪,生工生物工程(上海)股份有限公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 草鱼鳞样品预处理

将草鱼鳞用蒸馏水洗至无悬浮杂质,准确称取10.00 g加入150 mL蒸馏水中,微波中火处理2 min后,磁力搅拌30 min,用蒸馏水洗至无悬浮杂质。10% (w/v)柠檬酸溶液浸泡24 h,蒸馏水洗至中性,自然风干后,-20 °C冻存备用^[24]。

1.3.2 草鱼鳞酶解的方法

草鱼鳞的酶解工艺优化参照李春美等^[25]的实验方法,并稍作修改。冻存的草鱼鳞经流水解

冻后通过分析天平精确称取(5.000 ± 0.002) g,转移至烧杯中,加入定量的蒸馏水,置于沸水浴中加热30 min,使蛋白变性。冷却至室温,使用0.1 mol/L HCl溶液和0.1 mol/L NaOH溶液调节pH = 7.00 ± 0.02。随后加入一定量的蛋白酶,50 °C反应一定时间后,立即放入100 °C水浴中加热10 min使蛋白酶失活,冷却至室温后在4 °C的条件下过滤。滤液冷冻干燥,得草鱼鳞酶解物(grass fish scale hydrolysate, GFSH)。

1.3.3 草鱼鳞酶解的单因素试验

以嗜热链球菌增殖量(ΔOD₆₀₀)为评价标准,选择因素分别为酶解时间、料液比(w/v)和加酶量。

酶解时间试验:料液比(w/v)1:3 g/mL,加酶量(w/w)5%,酶解时间分别为1、2、3、4、5、6 h。料液比(w/v)试验:加酶量(w/w)5%、酶解时间3 h,料液比(w/v)分别为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 g/mL。加酶量(w/w)试验:料液比(w/v)1:3 g/mL,酶解时间3 h,加酶量(w/w)分别为4%、5%、6%、7%、8%。以上试验均重复3次。

1.3.4 草鱼鳞酶解的响应面 Box-Behnken 中心组合试验

基于单因素试验结果,建立三因素三水平的Box-Behnken中心组合试验,以嗜热链球菌增殖量(ΔOD₆₀₀)作为响应值,因素水平和编码如表1所示。

表1 响应面设计试验因素水平和编码

Tab.1 Independent variables and their levels used in the response surface design

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
A 酶解时间 Time /h	2	3	4
B 料液比(w/v) Ratio of material to water /(g/mL)	1:2	1:3	1:4
C 加酶量 Enzyme concentration /%	5	6	7

1.3.5 酶解物对嗜热链球菌增殖的作用

通过MRS培养基和琼脂粉制备固体斜面培养基,将嗜热链球菌接种斜面后,37 °C下恒温培养24 h。用1.000 mL的无菌生理盐水反复淋洗固体斜面培养基的表面,将固体斜面培养基表面的菌落冲洗至无菌生理盐水中,振荡混匀作为种子液。将一定量冻干的草鱼鳞酶解物加入到合成培养液中^[26],准确量取100.0 μL的种子液加入到5.000 mL的含有草鱼鳞酶解物的合成培养液中。在温度37 °C、振荡速度为160 r/min的恒

温振荡培养箱中培养18 h。测定培养液在紫外可见600 nm(OD₆₀₀)处的吸光值。嗜热链球菌的增殖量的计算如下:

$$\Delta OD_{600} = OD_{600a} - OD_{600b} \quad (1)$$

式中:ΔOD₆₀₀为嗜热链球菌的增殖量;OD_{600a}为嗜热链球菌在含有草鱼鳞酶解物的合成培养液中的吸光值;OD_{600b}为嗜热链球菌在合成培养液(不添加草鱼鳞酶解物)中的吸光值。

1.3.6 最佳增殖效果 GFSH 浓度评价

制备一定质量浓度的草鱼鳞酶解物的水溶

液,移取一定体积的草鱼鳞酶解物水溶液到合成培养液中,使得草鱼鳞酶解物在合成培养液中的质量浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0 g/L。分别准确量取 100.0 μ L 的种子液加入到 5.000 mL 20 种不同质量浓度的 GFSH 合成培养液中,37 $^{\circ}$ C、160 r/min 的条件下,培养嗜热链球菌 18 h,分别计算 ΔOD_{600} 值,确定促嗜热链球菌增殖效果最佳的草鱼鳞酶解物质量浓度。以上试验均重复 3 次。

1.3.7 不同分子量的草鱼鳞酶解物对嗜热链球菌生长曲线及产酸的影响

用 1.3.4 节得到的最优条件对草鱼鳞进行酶解,将其中一部分草鱼鳞酶解液进行冷冻干燥,得到草鱼鳞酶解物的粉末,参照殷娟娟等^[27]的方法进行分子量分布的测定。将另一部分的草鱼鳞酶解液分别装入 1、3、5、10 ku 超滤杯中,在冰浴环境下进行超滤,获得 5 种不同分子量段的草鱼鳞酶解物溶液,分别冷冻干燥后,得到相应的草鱼鳞酶解物 (<1 ku:GFSH1;1 ~ <3

ku:GFSH2;3 ~ <5 ku:GFSH3;5 ~ <10 ku:GFSH4; \geq 10 ku:GFSH5)。

分别用 5 种不同分子量草鱼鳞酶解物 GFSH1 ~ 5 制备嗜热链球菌的合成培养液,其中,各酶解物在培养液中的质量浓度均为 1.5 g/L。量取 100.0 μ L 种子液分别加入 5.000 mL 5 种不同分子量草鱼鳞酶解物的合成培养液中,37 $^{\circ}$ C、160 r/min 的条件下,每间隔 2 h 测定 1 次 ΔOD_{600} 值和 pH。以上试验均重复 3 次。

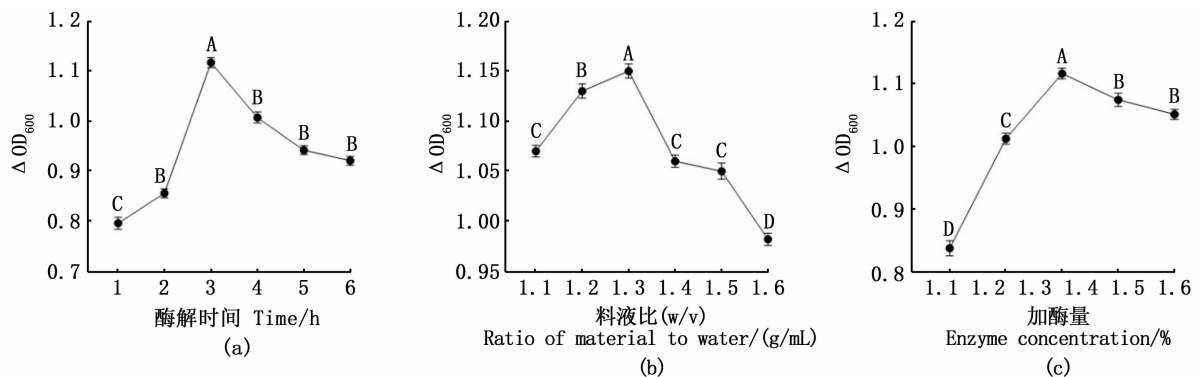
1.4 数据分析

使用 Excel 2016 和 Design-Expert 8.0.6 分析软件设计响应面试验并分析。

2 结果与分析

2.1 酶解单因素试验

图 1 呈现了酶解时间、料液比(w/v)和加酶量(w/w)3 个因素对嗜热链球菌增殖效果的影响。可以看出,3 条曲线呈现相似的趋势,都是酶解物促益生菌增殖效果先上升后有所下降。



不同大写字母表示多重比较显著差异($P < 0.05$)。

Different capital letters show significant difference ($P < 0.05$).

图 1 酶解单因素试验

Fig. 1 Single factor experiments of hydrolysis

对于酶解时间来说,其原因可能是反应初期草鱼鳞蛋白被酶解为多肽,随着时间的延长,蛋白质已基本反应完毕,酶开始作用于初期生成的多肽使其分解,从而影响到嗜热链球菌的增殖^[28-29];对于料液比来说,其原因可能是料液比较低时反应物很难分散,料液比太高时反应物浓

度太低,两者情况都不利于草鱼鳞和蛋白酶之间的接触,肽生成量小^[30];对于加酶量来说,出现该趋势的原因可能是酶用量较低时作用于草鱼鳞的酶量不足以使其充分酶解,而酶用量较高时酶解物中前期得到的肽被进一步分解,使嗜热链球菌增殖量有所降低^[31]。

2.2 草鱼鳞酶解的响应面 Box-Behnken 中心组合试验

2.2.1 响应面 Box-Behnken 中心组合试验方案及结果

基于单因素试验所得结果,采用 Design-

Expert 8.0.6 分析软件中 Box-Behnken 实验设计原理,选取酶解时间(A)、料液比(B)和加酶量(C)为自变量,以嗜热链球菌增殖量(ΔOD_{600})为响应值,设计了3因素3水平的响应面分析试验。见表2。

表2 响应面试验设计与嗜热链球菌增殖作用

Tab.2 RSM design and the proliferation of *Streptococcus thermophilus*

序号 Number	A	B	C	ΔOD_{600}
1	-1	-1	0	0.941
2	1	-1	0	1.014
3	-1	1	0	1.009
4	1	1	0	1.072
5	-1	0	-1	0.998
6	1	0	-1	1.064
7	-1	0	1	1.008
8	1	0	1	1.113
9	0	-1	-1	1.015
10	0	1	-1	1.057
11	0	-1	1	1.042
12	0	1	1	1.116
13	0	0	0	1.179
14	0	0	0	1.183
15	0	0	0	1.171
16	0	0	0	1.169
17	0	0	0	1.170

2.2.2 回归方程拟合及方差分析

用 Design-Expert 8.0.6 分析软件得到回归方程:

$$\Delta OD_{600} = -0.1A^2 - 0.093B^2 - 0.056C^2 +$$

$$0.038A + 0.030B + 0.018C + 1.21, R^2 = 0.9689, R^2_{adj} = 0.9289$$

另外,从方差分析结果(表3)可以得到回归方程模型具有显著性($P < 0.0001$)。失拟项不具

表3 回归模型与方差分析

Tab.3 Analysis of variance of regression equation

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	Pr > P	显著性 Significance
模型 Model	0.13	9	0.014	29.15	<0.0001	**
A	0.012	1	0.012	24.18	0.0017	**
B	7.321×10^{-3}	1	7.321×10^{-3}	15.02	0.0061	**
C	2.628×10^{-3}	1	2.628×10^{-3}	5.39	0.0532	
AB	2.5×10^{-5}	1	2.5×10^{-5}	0.051	0.8273	
AC	3.802×10^{-4}	1	3.802×10^{-4}	0.78	0.4063	
BC	2.56×10^{-4}	1	2.56×10^{-4}	0.53	0.4921	
A ²	0.046	1	0.046	94.14	<0.0001	**
B ²	0.036	1	0.036	74.14	<0.0001	**
C ²	0.013	1	0.013	26.98	0.0013	**
残差 Residual	3.411×10^{-3}	7	4.872×10^{-4}			
失拟 Lack of fit	2.567×10^{-4}	3	8.558×10^{-5}	0.11	0.9507	
失误 Pure error	3.154×10^{-3}	4	7.885×10^{-4}			
总和 Total variance	0.13	16				

注: ** $P < 0.01$ 为极显著。

Notes: The “**” shows highly significant difference ($P < 0.01$).

有显著性($P > 0.05$),说明未知因素对试验的干扰较小,且模型拟合度较好^[32]。酶解时间(A)和料液比(B)对响应值(ΔOD_{600})影响极显著,加酶量(C)对响应值(ΔOD_{600})的影响不显著,说明选取的水平比较符合试验要求。酶解时间二次项(A^2)、料液比二次项(B^2)、加酶量二次项(C^2)都是极显著。各因素对于嗜热链球菌增殖的影响(ΔOD_{600})程度依次为 A(酶解时间) > B(料液比) > C(加酶量)。而交互项 AB、AC 和 BC 之间交互作用的影响不显著。

2.2.3 响应曲面图分析

图2直观地给出了各个因素交互作用的响应面3D和等高线分析图。可以看出,3个曲面的陡峭程度相似,嗜热链球菌增殖量随两个变量的增加均呈现先上升后下降的趋势,难以直接判断各因素之间的交互作用。不过,通过上述方差分析可知,3个因素间两两均不显著。

2.2.4 确证实验

为了验证响应面方法的可行性,进行了确证实验。首先,对得到的回归方程求解,可得当嗜热链球菌增殖作用达到最大值 $\Delta OD_{600} = 1.1741$ 时, (A, B, C) = (0.81, 0.16, 0.24), 即酶解时间 3.81 h, 料液比(w/v) 1:3.16 g/mL, 加酶量 6.24%。为了实际操作的便利性,将实验条件调整为酶解时间 3.8 h, 料液比(w/v) 1:3.2 g/mL, 加酶量 6.2%。

取草鱼鳞酶解物进行5次平行验证实验,实验结果为 $\Delta OD_{600} = 1.1734 \pm 0.015$ 。确证实验结果表明,实际实验操作与响应面拟合曲线得到的结果基本一致,表明此酶解工艺得到的酶解物能够有效地促进嗜热链球菌增殖。

2.3 GFSH 质量浓度对益生菌增殖效果的影响

按响应面分析得到的最优条件对草鱼鳞进行酶解,进一步研究培养基中酶解物的浓度对嗜热链球菌增殖效果的影响。从图3可以看出:在酶解物质量浓度较低时,随着其质量浓度的增加,嗜热链球菌增殖效果上升趋势较快;至 0.5 g/L 时,增殖效果上升变缓,至 1.5 g/L 时,嗜热链球菌增殖效果几乎不再变化。其原因是 GFSH 质量浓度偏低时,嗜热链球菌得不到充足的氮源,故生长缓慢,而随着 GFSH 质量浓度的不断增加,嗜热链球菌生长环境所需要的氮源达到饱和和状态,因此嗜热链球菌增长趋于稳定。

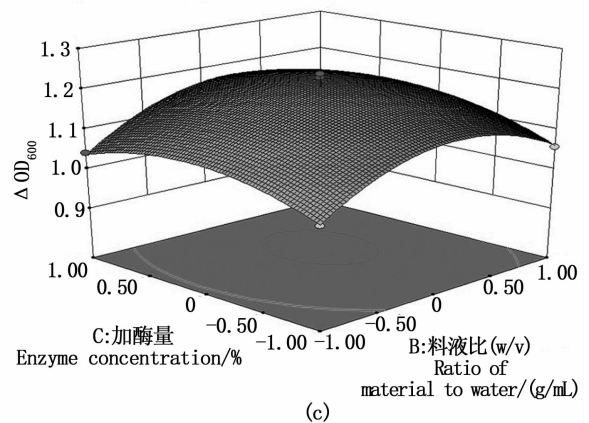
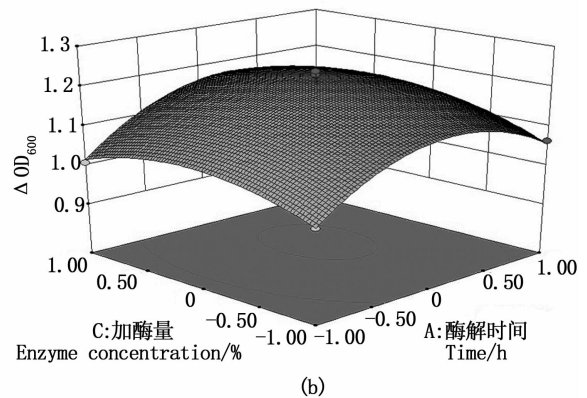
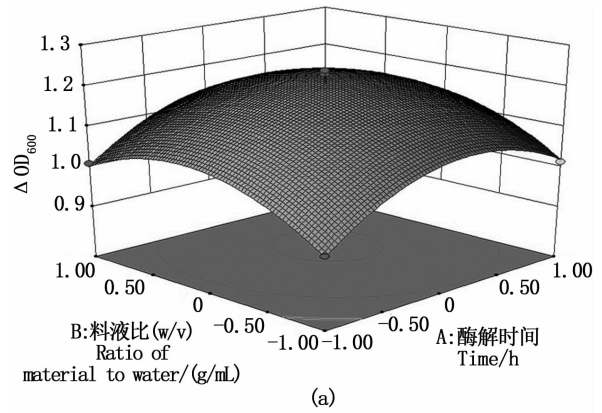


图2 两个影响因素交互作用对嗜热链球菌增殖的响应面图

Tab.2 Response surface plots of variable parameters on the proliferation of *Streptococcus thermophilus*

2.4 不同分子量 GFSH 对嗜热链球菌生长曲线及产酸的影响

肽的生物活性和其分子量有着较大的联系,因为分子量小的肽一般更容易被生物体吸收利用。因此,就不同分子量的草鱼鳞酶解物对嗜热链球菌的生长和产酸影响进行研究。实验中,各分子量酶解物在培养液中的质量浓度均为 2.3 节中得到的最佳质量浓度 1.5 g/L。

2.4.1 分子量分布

对最优条件下得到的草鱼鳞酶解物进行分子量分布测定,得到不同分子量草鱼鳞酶解物所占的比例。从表 4 可以看出分子量 <1 ku 所占的比例较大,达到 $71.48\% \pm 0.06\%$;其次是 ≥ 10 ku,达到 $13.96\% \pm 0.02\%$;分子量分布在 $1 \sim <3$ ku、 $3 \sim <5$ ku 和 $5 \sim <10$ ku 这 3 个区间的草鱼鳞酶解物所占比例较低。刘唤明等^[33]在关于响应面优化罗非鱼下脚料发酵制备蛋白肽的工艺的研究结果表明,罗非鱼蛋白肽的分子量大部分小于 5 000 u,分子量在 231 ~ 637 u 的罗非鱼蛋白肽占比达到 74.058%。与本研究的结果相近。

2.4.2 对嗜热链球菌生长曲线的影响

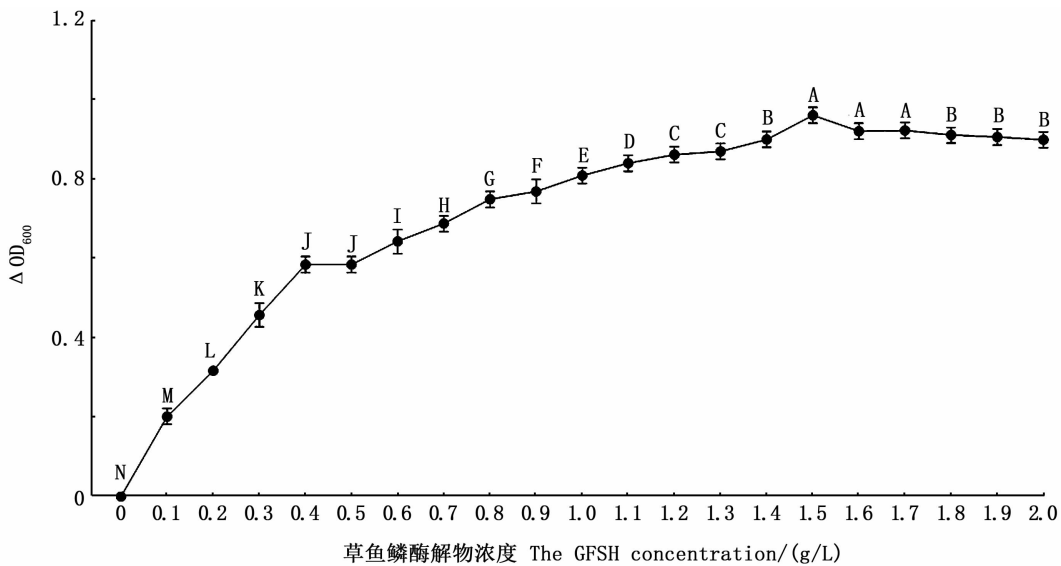
如图 4a 所示,7 个不同种类的氮源均能促进嗜热链球菌的生长。同时,各生长曲线相似,嗜热链球菌均是在 2 h 左右进入对数期,10 h 左右达到稳定期。进入稳定期后,嗜热链球菌的增长量不再呈现显著性差异($P > 0.05$)。需要指出的是,GFSH 培养液的初始吸光度值略低于 MRS 培

养基,这可能是由于 MRS 培养基中存在一些有较高吸光值的物质^[34]。

表 4 不同分子量草鱼鳞酶解物所占比例

Tab.4 Percentage of GFSH with different molecular weights	
不同分子量区间 GFSH with different molecular weights	占比 Percentage /%
<1 ku	71.48 ± 0.06
$1 \sim <3$ ku	5.94 ± 0.03
$3 \sim <5$ ku	4.73 ± 0.01
$5 \sim <10$ ku	3.89 ± 0.01
≥ 10 ku	13.96 ± 0.02

另外,各生长曲线对数期的斜率有所不同,不同分子量酶解物作比较,GFSH1 的斜率为 0.0656 ± 0.0012 ($P < 0.05$) 最高,说明相较于其他 4 个不同分子量段的酶解物,小分子量的 GFSH1 更容易被嗜热链球菌利用,使其在对数期产生更高的增长速度。

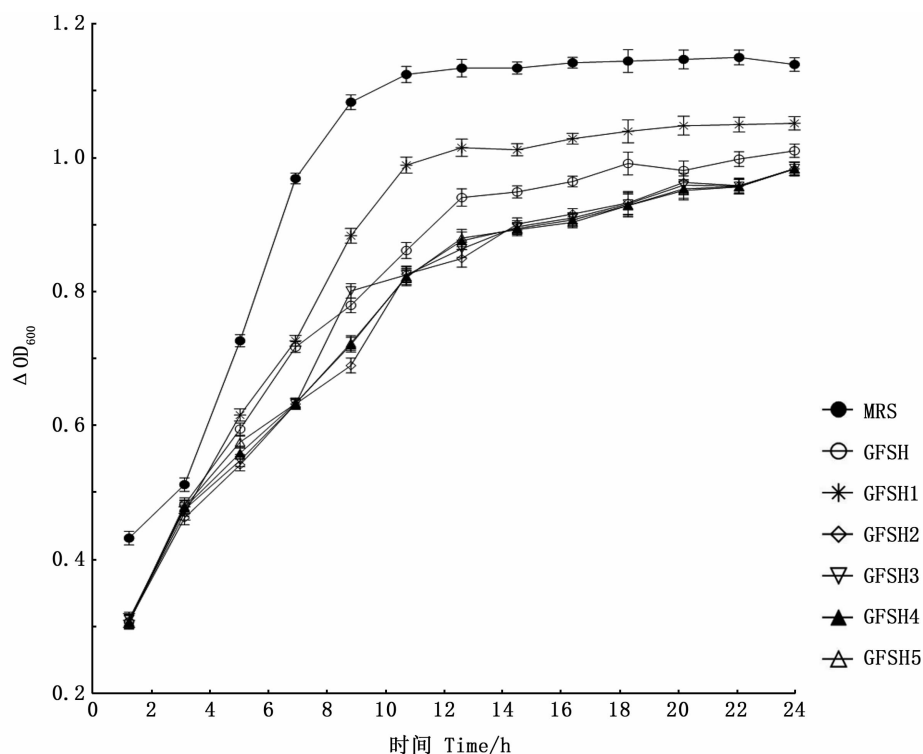


不同大写字母表示多重比较显著差异($P < 0.05$)。

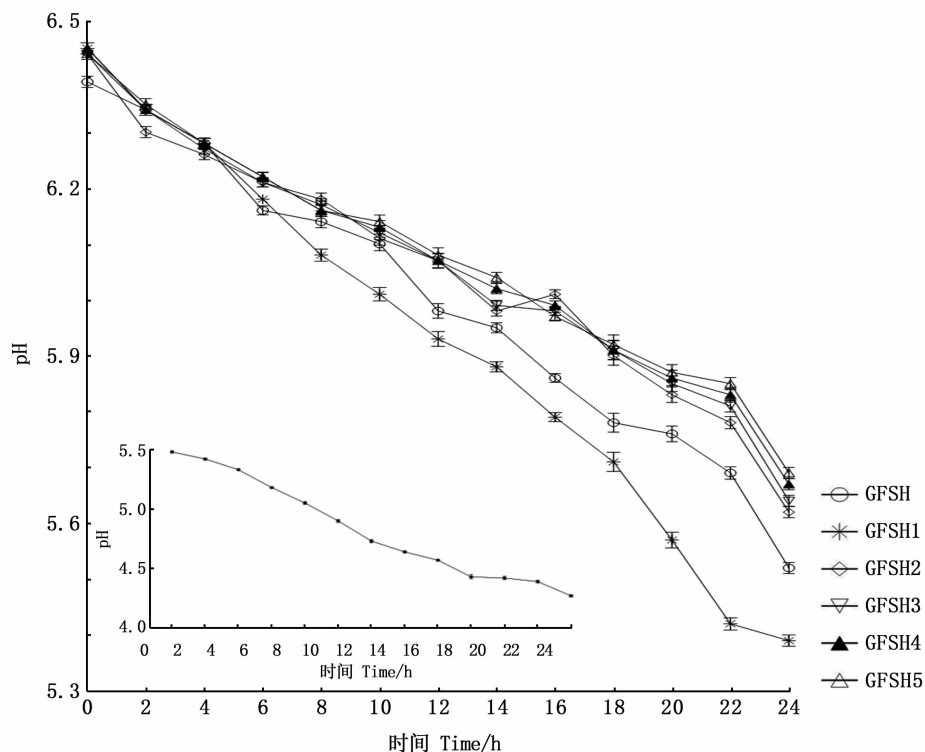
The different capital letters show significant difference($P < 0.05$).

图 3 最优酶解工艺条件下 GFSH 浓度对嗜热链球菌增殖的影响

Fig.3 Effect on *Streptococcus thermophilus* proliferated by growth media with different compositions of GFSH



(a) 不同分子量GFSH对嗜热链球菌生长曲线的影响
Effect on *Streptococcus thermophiles* growth by GFSH with different molecular weights



(b) 不同分子量GFSH对嗜热链球菌产酸的影响 (内图: MRS对嗜热链球菌生长代谢的影响)
Effect on *Streptococcus thermophiles* acidogenicity by GFSH with different molecular weights
(Inner Fig.: effect on *Streptococcus thermophiles* growth and acidogenicity by MRS)

图 4 不同分子量 GFSH 对嗜热链球菌生长代谢的影响

Fig. 4 Effect on *Streptococcus thermophiles* growth and acidogenicity by fragments with different molecular weights

2.4.3 对嗜热链球菌产酸的影响

由图 4b 可以看到,经过 24 h 后,含有 GFSH1 的培养液 pH 变化最大,由 6.45 降为 5.39,降低了 1.06 ± 0.05 ($P < 0.05$),这说明草鱼鳞酶解物中分子量小于 1 000 u 的部分能够促进嗜热链球菌在生长的过程中产生更多的酸性物质,从而降低了培养基的 pH。产生这种现象的原因可能是嗜热链球菌增殖越多,其生长过程中代谢产生的酸就可能越多^[35]。另外,与 MRS 对照相比,GFSH 培养液的起始 pH 较高,这是因为 GFSH 培养液组成中含有大量无机物质,与 MRS 成分有很大不同^[34]。

3 结论

本工作采用单因素试验和响应面法优化了风味蛋白酶酶解草鱼鳞的酶解工艺,优化后的酶解工艺为:酶解时间 3.8 h,料液比(w/v) 1:3.2 g/mL,加酶量 6.2%。在最优酶解条件下得到的酶解物促嗜热链球菌增殖量为 $\Delta OD_{600} = 1.1734 \pm 0.0150$ 。这与促嗜热链球菌增殖的回归模型预测结果相近,说明回归模型具有一定的可靠性。不同分子量对嗜热链球菌生长曲线和产酸能力的实验结果表明,分子量 <1 ku 的酶解物能够更好地促进嗜热链球菌生长,使得嗜热链球菌产酸也最多。

参考文献:

- [1] ADHIKARI P A, KIM W K. Overview of prebiotics and probiotics; focus on performance, gut health and immunity; a review[J]. *Annals of Animal Science*, 2017, 17(4): 949-966.
- [2] SAIER JR M H, MANSOUR N M. Probiotics and prebiotics in human health[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2006, 10(1): 22-25.
- [3] PREETHA R, JAYAPRAKASH N S, PHILIP R, et al. Optimization of carbon and nitrogen sources and growth factors for the production of an aquaculture probiotic (*Pseudomonas* MCCB 103) using response surface methodology[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(4): 1043-1051.
- [4] 李勇超,刘瑞雪,李亚琦,等.添加魔芋低聚糖对益生菌增殖和酸奶品质的影响[J]. *中国乳品工业*, 2016, 44(5): 62-64.
- [5] LI Y C, LIU R X, LI Y Q, et al. Effect of konjac coligosaccharide on the growth of probiotics and quality in yoghurt[J]. *China Dairy Industry*, 2016, 44(5): 62-64.
- [5] 刘丽莎,王锐,旭日花,等.白术多糖对益生菌的促生长作用及结构分析[J]. *食品科学*, 2010, 31(19): 124-128.
- [6] LIU L S, WANG R, XU R H, et al. Promoting effect of polysaccharides isolated from *Rhizoma atractylodis macrocephalae* on the growth of probiotics and structure analysis[J]. *Food Science*, 2010, 31(19): 124-128.
- [6] 张桂兰,程薇莉,毕洪玲,等.褐藻硫酸多糖促进双歧杆菌增殖的研究[J]. *临床军医杂志*, 2000, 28(2): 24-26.
- [7] ZHANG G L, CHENG W L, BI H L, et al. Study on the action of sulfated polysaccharide (SPC) on bifidobacterium proliferation[J]. *Clinical Journal of Medical Officer*, 2000, 28(2): 24-26.
- [7] RAMNANI P, CHITARRARI R, TUOHY K, et al. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds[J]. *Anaerobe*, 2012, 18(1): 1-6.
- [8] AZMI A F M N, MUSTAFA S, HASHIM D, et al. Prebiotic activity of polysaccharides extracted from *Gigantochloa levis* (buluh beting) shoots[J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 1635-1651.
- [9] 白凤翎,曲玲童,张柏林,等.大豆蛋白水解物促乳酸菌增殖发酵的研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(16): 209-212.
- [10] BAI F L, QU L T, ZHANG B L, et al. Study on soy protein promoting proliferation fermentation of lactic acid bacteria[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(16): 209-212.
- [10] ZHAO H F, BAI F L, ZHOU F, et al. Characterization of soybean protein hydrolysates able to promote the proliferation of *Streptococcus thermophilus* ST [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(4): M575-M581.
- [11] ZHANG Q L, REN J Y, ZHAO H F, et al. Influence of casein hydrolysates on the growth and lactic acid production of *Lactobacillus delbrueckii* sub sp. bulgaricus and *Streptococcus thermophilus*[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2011, 46(5): 1014-1020.
- [12] 张晶晶,郑惠娜,章超桦,等.牡蛎蛋白分离及其基本组成分析[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(9): 195-199.
- [13] ZHANG J J, ZHENG H N, ZHANG C H, et al. The separation and composition of oyster protein [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(9): 195-199.
- [13] ALVES A C, TAVARES G M. Mixing animal and plant proteins; is this a way to improve protein techno-functionalities? [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 97: 105171.
- [14] 汪海波,梁艳萍,汪海婴,等.草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取及其部分生物学性能[J]. *水产学报*, 2012, 36(4): 553-561.
- [14] WANG H B, LIANG Y P, WANG H Y, et al. Isolation and partial biological properties of scale collagens from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Journal of Fisheries of*

- China, 2012, 36(4): 553-561.
- [15] 樊世芳, 王利强, 游柳青, 等. 鱼鳞胶原蛋白的研究进展[J]. 包装工程, 2014, 35(23): 6-12.
FAN S F, WANG L Q, YOU L Q, et al. Research progress in fish scale collagen[J]. Packaging Engineering, 2014, 35(23): 6-12.
- [16] KHAZAEI H, SUBEDI M, NICKERSON M, et al. Seed protein of lentils: current status, progress, and food applications[J]. Foods, 2019, 8(9): 391.
- [17] 唐传核, 彭志英. 功能性食品基料蛋白质及多肽类开发现状[J]. 粮食与油脂, 2001(1): 39-41.
TANG C H, PENG Z Y. Recent development of functional food ingredients-proteins and peptides[J]. Cereals & Oils, 2001(1): 39-41.
- [18] KARAYANAKIDIS P D, ZOTOS A. Fish processing by-products as a potential source of gelatin: a review [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2016, 25(1): 65-92.
- [19] 张春华, 包斌, 陈山乔, 等. 响应面优化超临界 CO₂ 萃取罗非鱼头油的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(2): 293-302.
ZHANG C H, BAO B, CHEN S Q, et al. Optimization for supercritical CO₂ extraction of tilapia fish head oil by response surface method[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(2): 293-302.
- [20] 帅方敏, 李新辉, 黄艳飞, 等. 珠江水系四大家鱼资源现状及空间分布特征研究[J]. 水生生物学报, 2017, 41(6): 1336-1344.
SHUAI F M, LI X H, HUANG Y F, et al. Resource status and spatial distribution characteristics of four major Chinese carps in the pearl river[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(6): 1336-1344.
- [21] 涂丹, 张益奇, 叶繁, 等. 酶解制备鱼鳞蛋白降血压肽的工艺优化[J]. 核农学报, 2019, 33(1): 120-128.
TU D, ZHANG Y Q, YE F, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis preparation of antihypertensive peptide from fish scale protein by response surface method [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(1): 120-128.
- [22] 张勇, 吕嘉桢, 常若毅, 等. 市售益生菌乳制品的质量分析[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(3): 25-28.
ZHANG Y, LYU J L, CHANG R Y, et al. Quality analysis of commercial probiotics dairy products [J]. China Dairy Industry, 2018, 46(3): 25-28.
- [23] 杨敏, 吴兆明, 李晶晶, 等. 鱼皮胶原蛋白寡肽的生物活性及应用研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(5): 304-310.
YANG M, WU Z M, LI J J, et al. Advances in biological activity and application of fish skin collagen-derived oligopeptides[J]. Food Science, 2018, 39(5): 304-310.
- [24] 钟朝辉, 李春美, 梁晋鄂, 等. 鱼鳞胶原蛋白提取工艺的优化[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 162-166.
ZHONG Z H, LI C M, LIANG J E, et al. Optimization of extracting technology of collagen from fish scale [J]. Food Science, 2006, 27(7): 162-166.
- [25] 李春美, 彭光华, 钟朝辉, 等. 2709 碱性蛋白酶解鱼鳞工艺及其产物的功能特性[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 19-22.
LI C M, PENG G H, ZHONG Z H, et al. The hydrolysis of fish scale and its properties [J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(1): 19-22.
- [26] WANG X N, QIN M, FENG Y Y, et al. Enzymatic hydrolysis of grass carp fish skin hydrolysates able to promote the proliferation of *Streptococcus thermophilus* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(12): 4235-4241.
- [27] 殷娟娟, 曾少葵, 章超桦, 等. 罗非鱼鳞胶原多肽抗疲劳活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(11): 1587-1590, 1599.
YIN J J, ZENG S K, ZHANG C H, et al. Anti-fatigue activity of collagen peptide from scale of tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Natural Product Research and Development, 2013, 25(11): 1587-1590, 1599.
- [28] MACEDO M G, LACROIX C, GARDNER N J, et al. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate [J]. International Dairy Journal, 2002, 12(5): 419-426.
- [29] FAID M, ZOUTEN A, ELMARRAKCHI A, et al. Biotransformation of fish waste into a stable feed ingredient [J]. Food Chemistry, 1997, 60(1): 13-18.
- [30] 施永清, 王巧巧, 吴丹丽, 等. 响应面优化双酶解法制备鱼鳞抗菌肽工艺及其抑菌性能分析[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 155-161.
SHI Y Q, WANG Q Q, WU D L, et al. Optimization of preparation of antimicrobial peptides by two-step enzymatic hydrolysis of fish scales using response surface methodology and antimicrobial activity of purified antimicrobial peptide [J]. Food Science, 2018, 39(6): 155-161.
- [31] 杜云建, 赵玉巧, 李念念. 酶解法制备草鱼鱼鳞多肽及其清除羟自由基的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 168-172.
DU Y J, ZHAO Y Q, LI N N. Enzymatic preparation and hydroxyl free radical scavenging activity of polypeptides from grass carp scales [J]. Food Science, 2010, 31(7): 168-172.
- [32] 曾健辉, 朱宝君, 王娟, 等. 响应面法优化酶解鱼鳞制备 ACE 抑制肽的研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2016, 48(4): 57-61.
ZENG J H, ZHU B J, WANG J, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis preparation of ACE inhibitory peptides from fish scale by response surface method [J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition), 2016, 48(4): 57-61.
- [33] 刘唤明, 洪鹏志, 周春霞, 等. 响应面优化罗非鱼下脚料发酵制备蛋白肽的工艺[J]. 食品工业科技, 2018, 39

- (14): 126-130.
- LIU H M, HONG P Z, ZHOU C X, et al. Response surface optimization of fermentation conditions of producing peptide with tilapia scraps [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(14): 126-130.
- [34] 宋艳, 李岳飞, 王智鼎, 等. 嗜酸乳杆菌高密度培养工艺条件的优化及其评价[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2013, 39(5): 1036-1040.
- SONG Y, LI Y F, WANG Z D, et al. Optimization and evaluation of process condition of high density culture of *Lactobacillus acidophilus* [J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2013, 39(5): 1036-1040.
- [35] 赵春雨. 嗜热链球菌分离鉴定、生产特性及双组分系统差异研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- ZHAO C Y. Research on the isolation, identification, production characteristics and difference of two-component signal transduction system of *Streptococcus thermophilus* [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016.

Preparation of grass fish scale hydrolysate and its proliferation effect on *Streptococcus thermophiles* growth

LI Luyao¹, ZENG Lifang¹, SONG Yishan^{1,2}, CHEN Jiankang¹

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National R&D Branch Center for Freshwater Aquatic Products Processing Technology, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to improve the comprehensive utilization of aquatic products and develop new functional foods containing probiotic bacteria, by-product of fish processing-the grass fish scales was studied. The grass fish scales were hydrolyzed by flavourzyme, and the enzymatic hydrolysis process was optimized by the single factor experiments and the response surface methodology (RSM) using the proliferation of *Streptococcus thermophilus* as the evaluation index. The results showed that the optimum conditions were the reaction time 3.8 h, the ratio of material to water 1:3.2 g/mL and the concentration of enzyme 6.2%. Under these conditions, the ΔOD_{600} of proliferated *Streptococcus thermophilus* was 1.1734 ± 0.0150 . Meantime, the GFSH under the optimum conditions was further separated into 5 segments by membrane filtration, which were: <1 ku, 1 - <3 ku, 3 - <5 ku, 5 - <10 ku, ≥ 10 ku. The effects of five segments on the growth curve and production of acid of *Streptococcus thermophilus* were studied. The results showed that in the 24-hour growth period of *Streptococcus thermophilus*, the fragments with molecular weights of less than 1 000 u significantly promoted the growth and acid production of *Streptococcus thermophilus*, and the ΔOD_{600} of proliferated *Streptococcus thermophilus* was 1.050, and the pH of the medium was reduced by 1.06.

Key words: grass fish scale; enzymatic hydrolysis; *Streptococcus thermophilus*; proliferation