



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116515931 A

(43) 申请公布日 2023.08.01

(21) 申请号 202310194876.3

(22) 申请日 2023.03.03

(71) 申请人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市拱墅区潮王路
18号

(72) 发明人 梅建凤 王雪 王旭东 易喻
应国清

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

专利代理师 李世玉

(51) Int. Cl.

C12P 21/00 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12R 1/43 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

一种微生物发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种微生物发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的方法,所述方法是将草鱼肉泥加水,调节pH为7.2-7.6,经巴氏杀菌;接入粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),于30℃、100-150r/min振荡培养26-30h;于63-65℃水浴保温20-30min杀菌灭酶,离心,收集上清液;上清液经超滤膜过滤,收集滤液,得多肽液;减压浓缩,浓缩液冷冻干燥,得抗氧化多肽。本发明用粘质沙雷氏菌为发酵菌种,以草鱼蛋白为原料制备抗氧化多肽,具有较强的抗氧化活性。本发明方法与蛋白酶水解法相比,节省了酶的使用成本,且具有方法简单、多肽得率高、环境友好、易于实现工业化应用的优点。

1. 一种微生物发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的方法,其特征在于,所述方法按如下步骤进行:

(1) 草鱼肉泥中加入去离子水,调节pH为7.2-7.6,经巴氏杀菌,得巴氏杀菌的草鱼肉浆;

(2) 步骤(1)制备的草鱼肉浆中接入粘质沙雷氏菌,于30℃、100-150r/min振荡培养26-30h,得草鱼蛋白发酵物;

(3) 步骤(2)制备的草鱼蛋白发酵物,于63-65℃水浴保温20-30min杀菌灭酶,离心,收集上清液;上清液经超滤膜过滤,收集滤液,得多肽液;

(4) 步骤(3)制备的多肽液减压浓缩,得多肽浓缩液;浓缩液经冷冻干燥,得草鱼蛋白来源的抗氧化多肽。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)草鱼肉泥是将鲜活或冷冻保存的草鱼解冻,切去头部和尾鳍,除去内脏、鱼皮、鱼鳍和脊椎骨,清洗干净,用高速组织捣碎机将鱼肉搅成肉泥,得草鱼肉泥。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)去离子水体积用量以草鱼肉泥质量计为4-6mL/g。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(2)中所述的粘质沙雷氏菌为粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)GDMCC No:60315。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(2)中所述的粘质沙雷氏菌以种子液形式加入,所述种子液按如下步骤制备:

①粘质沙雷氏菌菌体接种于新鲜斜面培养基,于35℃培养24-36h,得到活化后的斜面菌体;所述斜面培养基终浓度组成为:蛋白胨8-10g/L,牛肉膏3-5g/L,NaCl 3-5g/L,琼脂15-20g/L,溶剂为自来水,pH为7.0-7.2;

②用接种环挑取步骤①活化后的斜面菌体2-3环,接种至种子培养基中,然后于30℃、160-200r/min振荡培养20-24h,得 $OD_{600}=5.5-6.0$ 种子液;所述种子培养基终浓度组成为:麦芽浸粉10-12g/L,酵母浸粉5-10g/L,牛肉膏5-6g/L,NaCl 3-5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5-1g/L,溶剂为自来水,pH为7.2-7.6。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述种子液体积接种量为3%-4%。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(3)超滤膜的截留分子量为10kDa。

8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(3)离心是在8000-10000r/min转速下离心5-10min。

9. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(4)多肽液经减压浓缩至体积为原料草鱼肉泥重量计的1-2mL/g。

10. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(4)所述多肽液减压浓缩的条件是50℃、真空度-0.1mPa;所述浓缩液冷冻干燥的条件是-60℃、真空度10Pa。

一种微生物发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的方法

(一) 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体地说,是一种利用微生物发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的方法。

(二) 背景技术

[0002] 抗氧化剂对人体健康具有积极的作用,它能够保护人体免受活性氧自由基的伤害。近些年来,人们逐渐认识到人工合成的抗氧化剂存在潜在的健康风险,其在食品中的应用已受到越来越严格的限制,人们也更加青睐抗氧化能力强、无毒副作用、易于消化吸收的天然抗氧化物质。

[0003] 抗氧化多肽是生物活性肽的一种,是一类具有清除自由基和抑制脂质过氧化,维持自由基平衡和提高机体抗衰老功能生物活性肽的统称,一般是由10-50个氨基酸组成,分子量在10kD以下。多肽的抗氧化活性主要由肽链的结构特性、氨基酸序列、分子量、氨基酸侧链基团等多种因素决定,由氨基酸组成的短肽链在蛋白质的序列内无活性,但可以通过在胃肠道中消化、食品加工、酶解或发酵得到释放。天然蛋白水解形成的抗氧化多肽具有安全性高、抗氧化性强和易吸收等特点。目前,已有较多研究以植物或者动物蛋白为原料,水解获得了具有抗氧化活性的多肽,如大豆多肽、乳蛋白肽、胶原多肽、麸皮多肽、鱼骨多肽、罗非鱼多肽、核桃多肽、蚕蛹多肽等。

[0004] 抗氧化多肽的制备方法主要是以天然蛋白为原料,采用直接分离法、酸碱水解法、蛋白酶水解法和微生物发酵法获得。蛋白酶水解法的反应条件比较温和、过程易控制,而且蛋白酶水解专一性较强,反应后副产物较少,所以它是目前制备多肽最常使用的方法,不足之处在于酶的使用成本较高。微生物发酵法是利用微生物在生长过程中产生的蛋白酶水解蛋白,所用的微生物菌种往往蛋白酶表达能力比较强的菌株,菌体生长过程中将蛋白水解为氨基酸和多肽,部分氨基酸被彻底分解,作为菌体生长的营养来源。微生物发酵法的常用菌种包括芽孢杆菌、乳杆菌、嗜热链球菌、曲霉和根霉等。

[0005] 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*),属于鲤科(Cyprinidae)草鱼属,是我国四大家鱼之一,也是我国内陆水域主养的优质鱼类。草鱼生长快,产量高,而且肉厚刺少味鲜,是我国人民喜爱食用的鱼种之一。随着人们生活水平的提高,水产品中营养更丰富的鲈鱼、桂鱼以及海水鱼等日渐走俏,草鱼出现在餐桌的频率逐渐减少,已经成为鱼类市场上价格较低鱼种。浙江省湖州市等地养殖的草鱼,个体较大的往往用来晒制鱼干,价值提升空间有限,所以对草鱼进行深加工以提高草鱼养殖业的经济效益具有重要意义。

[0006] 目前已有不少利用蛋白酶水解草鱼蛋白制备抗氧化多肽的报道,如丁利君等利用枯草杆菌蛋白酶水解草鱼蛋白,含多肽的酶解液具有较高的羟基自由基和超氧自由基清除活性[丁利君,钟洁琼.草鱼蛋白控制酶解及其抗氧化研究.食品科学,2010,31(z1):62-66];蓝灿华用7种蛋白酶水解草鱼蛋白,制备的多肽都表现出良好的DPPH抗氧化活性[蓝灿华,林小文,黄薇,等.酶解法制备草鱼抗氧化多肽工艺的建立.生物技术,2012,22(6):71-74]。

[0007] 使用商品蛋白酶水解草鱼蛋白制备抗氧化多肽,虽然具有操作方便的优点,但无疑酶的使用增加了生产成本。如果用产蛋白酶能力较强的微生物直接发酵草鱼蛋白来制备抗氧化多肽,则可以节省酶的使用成本。

(三)发明内容

[0008] 本发明目的是克服蛋白酶水解草鱼蛋白制备抗氧化多肽方法中酶的使用成本高、水解效低的不足,提供一种微生物发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的方法。利用产蛋白酶能力较强的粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)发酵草鱼蛋白制备的抗氧化多肽,具有效力高,节省酶成本的优点,所述方法具有操作简单、多肽得率高、抗氧化活性好的特点。

[0009] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0010] 本发明提供一种微生物发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的方法,所述方法按如下步骤进行:

[0011] (1) 草鱼肉泥中加入去离子水,调节pH为7.2-7.6(优选用浓度2mol/L的NaOH水溶液调节),经巴氏杀菌(优选于63-65℃水浴保温20-30min),得巴氏杀菌的草鱼肉浆;优选草鱼肉泥和去离子水加入三角烧瓶中,调节pH后用8层纱布扎口;所述去离子水体积用量以草鱼肉泥质量计为4-6mL/g;

[0012] (2) 步骤(1)制备的草鱼肉浆中接入粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),于30℃、100-150r/min振荡培养26-30h(优选三角烧瓶8层纱布扎口),得草鱼蛋白发酵物;

[0013] (3) 步骤(2)制备的草鱼蛋白发酵物,于63-65℃水浴保温20-30min杀菌灭酶,然后离心(优选于8000-10000r/min转速下离心5-10min),收集上清液;上清液经超滤膜(优选截留分子量为10kDa)过滤,收集滤液,得多肽液;

[0014] (4) 步骤(3)制备的多肽液减压浓缩,得多肽浓缩液;浓缩液经冷冻干燥,得草鱼蛋白来源的抗氧化多肽。

[0015] 进一步,步骤(1)草鱼肉泥是将鲜活或冷冻保存的草鱼解冻,切去头部和尾鳍,除去内脏、鱼皮、鱼鳍和脊椎骨,清洗干净,用高速组织捣碎机将鱼肉搅成肉泥,得草鱼肉泥。

[0016] 进一步,步骤(1)所述的草鱼,是鲤科(Cyprinidae)的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*),优选的单条鲜活草鱼重量大于0.5kg。

[0017] 进一步,步骤(2)中所述的粘质沙雷氏菌为粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*) GDMCC No:60315,保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号:GDMCC No:60315,保藏日期2018年1月18日,地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼,邮编:510075。(已经在专利申请CN108148781A中公开)

[0018] 进一步,步骤(2)中所述的粘质沙雷氏菌以种子液形式加入,所述种子液体积接种量为3%-4%;所述种子液按如下步骤制备:

[0019] ①粘质沙雷氏菌(优选GDMCC No:60315菌株)菌体接种于新鲜斜面培养基,于35℃培养24-36h,得到活化后的斜面菌体;所述斜面培养基终浓度组成为:蛋白胨8-10g/L,牛肉膏3-5g/L,NaCl 3-5g/L,琼脂15-20g/L,溶剂为自来水,pH为7.0-7.2;优选的斜面培养基终浓度组成为:蛋白胨10g/L,牛肉膏5g/L,NaCl 5g/L,琼脂20g/L,溶剂为自来水,pH为7.2;

[0020] ②用接种环挑取步骤①活化后的斜面菌体2-3环,接种至种子培养基中,然后于30℃、160-200r/min振荡培养20-24h,得 $OD_{600}=5.5-6.0$ 种子液;所述种子培养基终浓度组成

为:麦芽浸粉10-12g/L,酵母浸粉5-10g/L,牛肉膏5-6g/L,NaCl 3-5g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5-1g/L,溶剂为自来水,pH为7.2-7.6;优选种子培养基终浓度组成为:麦芽浸粉12g/L,酵母浸粉10g/L,牛肉膏6g/L,NaCl 5g/L,MgSO₄·7H₂O 1g/L,溶剂为自来水,pH为7.4。

[0021] 进一步,步骤(4)多肽液经减压浓缩至体积为原料草鱼肉泥重量计的1-2mL/g。

[0022] 进一步,步骤(4)所述多肽液减压浓缩的条件是50℃、真空度-0.1mPa;所述浓缩液冷冻干燥的条件是-60℃、真空度10Pa。

[0023] 与现有技术相比,本发明的有益效果体现在:本发明用粘质沙雷氏菌为发酵菌种,以草鱼蛋白为原料制备抗氧化多肽,与蛋白酶水解法相比,节省了酶的使用成本,且具有方法简单、多肽得率高、环境友好、易于实现工业化应用的优点。本发明制备的草鱼蛋白来源的抗氧化多肽具有较强的抗氧化活性,经体外抗氧化性测定结果显示,在浓度≥10mg/mL时,其DPPH自由基清除率大于80%,羟基自由基清除率大于50%。

(四) 具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此。

[0025] 本发明实施例所用的草鱼是鲤科(Cyprinidae)的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*),单条鲜活草鱼重量1kg左右。

[0026] 实施例1:不同微生物菌株发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的比较

[0027] 目前的研究报道中,用于发酵动物或植物蛋白制备活性多肽的菌种,使用较多的有芽孢杆菌、乳杆菌、曲霉或根霉,本实施例用粘质沙雷氏菌、枯草芽孢杆菌、保加利亚乳杆菌、黑曲霉和米根霉作为发酵菌株(菌株编号和来源见表1),比较不同菌株发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的得率和抗氧化活性。

[0028] 表1不同菌株的编号和来源

菌株中文学名	菌株拉丁学名	菌株编号	来源
粘质沙雷氏菌	<i>Serratia marcescens</i>	GDMCC 60315	广东省微生物菌种保藏中心
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	GDMCC 1.286	广东省微生物菌种保藏中心
[0029] 保加利亚乳杆菌	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	IFFI06042	浙江省微生物研究所
黑曲霉	<i>Aspergillus niger</i>	GDMCC 60793	广东省微生物菌种保藏中心
米根霉	<i>Rhizopus oryzae</i>	GDMCC 60145	广东省微生物菌种保藏中心

[0030] 1、不同菌株的种子液或孢子液制备

[0031] (1)粘质沙雷氏菌和枯草芽孢杆菌的种子液,按以下步骤制备:

[0032] ①冷冻干燥保存的粘质沙雷氏菌或枯草芽孢杆菌的菌体,分别接种于新鲜斜面培养基,于35℃培养36h,得到活化后的斜面菌体;所述斜面培养基终浓度组成为:蛋白胨10g/L,牛肉膏5g/L,NaCl 5g/L,琼脂20g/L,溶剂为自来水,pH为7.2;

[0033] ②用接种环挑取步骤①活化后的斜面菌体2环接种至种子培养基中,于30℃、160r/min振荡培养24h,得粘质沙雷氏菌OD₆₀₀=5.87、枯草芽孢杆菌OD₆₀₀=6.24的种子液;

所述种子培养基终浓度组成为:麦芽浸粉12g/L,酵母浸粉10g/L,牛肉膏5g/L,NaCl5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L,溶剂为自来水,pH为7.4;150-mL三角烧瓶装30mL种子培养基,8层纱布扎口,高压蒸汽121℃灭菌15min。所述的种子液 OD_{600} ,是种子液稀释10倍后,用稀释10倍的种子培养基为参比,于分光光度计测定波长600nm处的吸光度,再乘以稀释倍数。

[0034] (2)保加利亚乳杆菌的种子液,按以下步骤制备:

[0035] I.冷冻干燥保存的保加利亚乳杆菌的菌体接种于新鲜斜面培养基,于35℃培养36h,得到活化后的斜面菌体;所述斜面培养基终浓度组成为:酪蛋白胨10g/L,牛肉膏10g/L, K_2HPO_4 2g/L,酵母浸粉5g/L,葡萄糖5g/L,乙酸钠5g/L,柠檬酸氢二胺2g/L,吐温80 1g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/L, $CaCO_3$ 20g/L,琼脂20g/L,溶剂为自来水,pH 6.8;

[0036] II.用接种环挑取步骤I活化后的斜面菌体2环接种至种子培养基中,于30℃、静置培养24h,得保加利亚乳杆菌 $OD_{600}=4.65$ 的种子液;所述种子培养基终浓度组成除不含琼脂,其他成分同步骤I中斜面培养基,150-mL三角烧瓶装30mL种子培养基,8层纱布扎口,高压蒸汽121℃灭菌15min。

[0037] (3)黑曲霉和米根霉的孢子液的制备方法为:

[0038] 冷冻干燥保存的黑曲霉或米根霉孢子,分别接种于新鲜马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板培养基,于30℃培养48h,获得平板培养物;平板培养物中加入10mL无菌生理盐水,用接种环搅动使孢子悬浮,再用无菌生理盐水,分别将黑曲霉和米根霉的孢子浓度稀释为 4.68×10^7 个/mL和 4.26×10^7 个/mL,获得黑曲霉和米根霉的孢子液;所述的PDA平板培养基是成品马铃薯葡萄糖琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司生产,用自来水按46g/L的浓度配制,pH自然,高压蒸汽121℃灭菌15min。

[0039] 2、不同菌株发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的步骤如下:

[0040] (1)鲜活草鱼(单条鲜活草鱼重量约1kg),切去头部和尾鳍,除去内脏、鱼皮、鱼鳍和脊椎骨(不剔除鱼刺),清洗干净,用高速组织捣碎机将鱼肉搅成肉泥,得草鱼肉泥;

[0041] (2)步骤(1)制备的草鱼肉泥5g于150-mL三角烧瓶中,再加入20mL去离子水(按肉泥湿重计的4mL/g,总体积为25mL),用2mol/L的NaOH水溶液调节pH为7.2;三角烧瓶用8层纱布扎口,于63℃水浴保温30min进行巴氏杀菌,得巴氏杀菌的草鱼肉浆;

[0042] (3)步骤(2)制备的草鱼肉浆中,分别接入表1中粘质沙雷氏菌、枯草芽孢杆菌或保加利亚乳杆菌的种子液各0.75mL,或黑曲霉、米根霉的孢子液各0.75mL(接种量为3%的体积分数),三角烧瓶8层纱布扎口。接种粘质沙雷氏菌或枯草芽孢杆菌的草鱼肉浆于30℃、100r/min振荡培养30h;接种保加利亚乳杆菌的草鱼肉浆于30℃静置培养30h,接种黑曲霉或米根霉的草鱼肉浆于30℃、100r/min振荡培养48h,得不同菌株的草鱼蛋白发酵物;

[0043] (4)步骤(3)制备的全部草鱼蛋白发酵物,于63℃水浴保温30min杀菌灭酶,再于8000r/min转速下离心10min,收集上清液;上清液经截留分子量为10kDa超滤膜过滤,收集滤液,得多肽液;

[0044] (5)步骤(4)制备的全部多肽液在50℃、真空度-0.1mPa条件下,浓缩至10mL(原料草鱼肉泥重量计的2mL/g)。浓缩液于一只洁净的培养皿中,于-60℃、真空度10Pa冷冻干燥,得到各菌株发酵草鱼蛋白来源的抗氧化多肽粉。由5g草鱼肉泥制备的多肽质量及得率见表2。

[0045] 表2不同菌株发酵草鱼蛋白制备的多肽得率

序号	菌株名称	多肽粉质量 (g)	多肽得率 (%)
1	粘质沙雷氏菌	0.598	41.7
2	枯草芽孢杆菌	0.433	30.2
3	保加利亚乳杆菌	0.277	19.3
4	黑曲霉	0.316	22.0
5	米根霉	0.352	24.5

[0047] 由表2结果可以看出,在5个菌株中,粘质沙雷氏发酵草鱼蛋白制备的多肽得率最高,说明该菌株在生长中产蛋白酶水解蛋白为多肽的效率高于其他菌株。

[0048] 所述的多肽得率按公式(1)计算:

$$[0049] \quad \text{多肽得率}(\%) = \frac{\text{多肽粉质量}(\text{g})}{(1-71.3\%) \times \text{草鱼肉湿重}(\text{g})} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

[0050] 公式(1)中,71.3%为实验测定的草鱼肉含水量。

[0051] 3、不同菌株发酵草鱼蛋白制备的多肽抗氧化活性

[0052] (1) DPPH自由基清除活性

[0053] 抗氧化多肽的DPPH自由基清除活性测定方法为:多肽粉用蒸馏水配制成5-25mg/mL的溶液,1mL不同浓度的多肽水溶液于试管中,加入3mL浓度为0.1mmol/L的DPPH溶液(2,2-联苯基-1-苦基肼基,95%乙醇配制,现配现用),摇匀,室温避光反应20min后,以95%乙醇做参比,于波长517nm处测定吸光值(A_s);以1mL蒸馏水代替多肽水溶液,按如上操作,测定空白组的517nm吸光值(A_b);1mL待测多肽水溶液于试管中,加入3mL的95%乙醇摇匀,按如上操作,测定对照组的517nm吸光值(A_c),按公式(2)计算DPPH自由基清除率。

$$[0054] \quad \text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_b}\right) \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

[0055] 按本实施例方法,由不同菌株发酵草鱼蛋白制备的多肽DPPH自由基清除活性见表3。

[0056] 表3不同菌株发酵草鱼蛋白制备的多肽DPPH自由基清除率

菌株名称	不同浓度多肽 (mg/mL) 的 DPPH 自由基清除率 (%)				
	5	10	15	20	25
粘质沙雷氏菌	76.3	83.6	88.7	91.8	92.5
枯草芽孢杆菌	61.6	70.7	78.3	84.6	87.5
保加利亚乳杆菌	31.7	46.8	54.4	60.3	63.4
黑曲霉	22.5	37.6	45.0	50.7	54.1
米根霉	56.2	64.4	70.9	75.1	78.7

[0058] 由表3结果可以看出,不同菌株发酵草鱼蛋白制备的多肽,在相同的浓度下,DPPH自由基清除活性存在显著差异,由粘质沙雷氏菌发酵草鱼蛋白制备的多肽,其DPPH自由基清除活性显著高于其他菌株。

[0059] (2) 羟基自由基清除活性

[0060] 抗氧化多肽的羟基自由基清除活性测定方法为：多肽粉用蒸馏水配制成5-25mg/mL的溶液，1mL多肽水溶液于试管中，再加入1mL浓度为1.865mmol/L邻二氮菲溶液（无水乙醇配制，现配现用），再加入2mL的磷酸盐缓冲液（0.2mol/L，pH7.4），振荡充分混匀，再加入1mL浓度为1.865mmol/L的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水溶液，最后缓慢加入1mL体积分数为0.03%的 H_2O_2 水溶液，试管于35℃水浴下保温1h后，用蒸馏水为参比，于分光光度计测定536nm处吸光度（ A_s ）；以1mL蒸馏水代替多肽水溶液，按如上操作，测定空白组536nm的吸光值（ A_b ）；以1mL蒸馏水代替 H_2O_2 水溶液，按如上操作，测定对照组536nm的吸光值（ A_n ），按公式（3）计算羟基自由基清除率。

$$[0061] \quad \text{羟基自由基清除率} = \frac{A_s - A_n}{A_b - A_n} \times 100\% \quad \text{公式（3）}$$

[0062] 按本实施例方法，由不同菌株发酵草鱼蛋白制备的多肽羟基自由基清除活性见表4。

[0063] 表4不同菌株发酵草鱼蛋白制备的多肽羟基自由基清除活性

菌株名称	不同浓度多肽（mg/mL）的羟基自由基清除率（%）				
	5	10	15	20	25
粘质沙雷氏菌	33.5	54.4	65.9	70.3	72.2
[0064] 枯草芽孢杆菌	22.4	32.9	42.4	47.9	52.2
保加利亚乳杆菌	18.6	32.1	37.7	40.8	44.1
黑曲霉	15.8	26.5	33.9	37.7	41.3
米根霉	31.3	43.0	49.4	54.2	58.6

[0065] 由表4结果可以看出，不同菌株发酵草鱼蛋白制备的多肽，在相同的浓度下，羟基自由基清除率存在显著差异，由粘质沙雷氏菌发酵草鱼蛋白制备的多肽，其羟基自由基清除率显著高于其他菌株。

[0066] 本实施例的结果说明，用粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315发酵草鱼蛋白制备的抗氧化肽，其得率和抗氧化活性均优于其他测试菌株，所以本发明选用由粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315发酵草鱼蛋白制备的抗氧化多肽。

[0067] 实施例2：粘质沙雷氏菌发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的应用

[0068] 用粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽，按如下步骤操作：

[0069] (1) 冷冻保存的草鱼，切去头部和尾鳍，除去内脏、鱼皮、鱼鳍和脊椎骨（不除鱼刺），清洗干净，用高速组织捣碎机将鱼肉搅成肉泥，得草鱼肉泥；

[0070] (2) 步骤(1)制备的草鱼肉泥10g于250-mL三角烧瓶中，再加入50mL去离子水（按肉泥湿重计的5mL/g，总体积为60mL），用2mol/L的NaOH水溶液调节pH为7.4；三角烧瓶用8层纱布扎口，于64℃水浴保温25min，得巴氏杀菌的草鱼肉浆；

[0071] (3) 步骤(2)制备的草鱼肉浆中，接入粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315种子液2.1mL（接种量为3.5%的体积分数）。三角烧瓶8层纱布扎口，于30℃、125r/min振荡培养28h，得草

鱼蛋白发酵物；

[0072] (4) 步骤(3)制备的全部草鱼蛋白发酵物,于64℃水浴保温25min杀菌灭酶,再于9000r/min转速下离心8min,收集上清液;上清液经截留分子量为10kDa超滤膜过滤,收集滤液,得多肽液;

[0073] (5) 步骤(4)制备的全部多肽液在50℃、真空度-0.1mPa条件下,浓缩至15mL(原料草鱼肉泥重量计的1.5mL/g)。浓缩液于一只洁净的培养皿中,于-60℃、真空度10Pa冷冻干燥,得到草鱼蛋白来源的抗氧化多肽粉。

[0074] 步骤(3)中所述的粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315种子液,按如下步骤制备:

[0075] ①4℃保存的粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315斜面菌体接种于新鲜斜面培养基,于35℃培养30h,得到活化后的斜面菌体;所述斜面培养基终浓度组成为:蛋白胨10g/L,牛肉膏5g/L,NaCl 5g/L,琼脂20g/L,溶剂为自来水,pH为7.2;

[0076] ②用接种环挑取步骤①活化后的斜面菌体3环接种至种子培养基中,于30℃、180r/min振荡培养22h,得 $OD_{600} = 5.61$ 种子液;所述种子培养基终浓度组成为:麦芽浸粉12g/L,酵母浸粉10g/L,牛肉膏5g/L,NaCl 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L,溶剂为自来水,pH为7.4;150-mL三角烧瓶装30mL种子培养基,8层纱布扎口,高压蒸汽121℃灭菌15min。所述的种子液 OD_{600} ,是种子液稀释10倍后,用稀释10倍的种子培养基为参比,于分光光度计测定波长600处的吸光度,再乘以稀释倍数。

[0077] 按本实施例方法,制备得抗氧化多肽粉1.21g,相对于草鱼肉干重的得率为42.2%,不同浓度多肽的抗氧化活性见表5。

[0078] 表5实施例2制备的多肽抗氧化活性

	多肽浓度 (mg/mL)	DPPH 自由基清除率 (%)	羟基自由基清除率 (%)
	5	78.5	35.8
[0079]	10	84.1	56.6
	15	89.4	67.3
	20	92.7	71.2
	25	93.2	74.4

[0080] 由表5数据可以看出,本实施例以草鱼蛋白为原料,用粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315发酵制备的多肽具有较好的抗氧化活性,在浓度为10mg/mL时,DPPH自由基清除率达到84.1%,羟基自由基的清除率达到56.6%。

[0081] 所述的抗氧化多肽DPPH自由基清除活性和羟基自由基清除活性测定方法同实施例1。

[0082] 实施例3:粘质沙雷氏菌发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽的应用

[0083] 用粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315发酵草鱼蛋白制备抗氧化多肽,按如下步骤操作:

[0084] (1) 冷冻保存的草鱼,切去头部和尾鳍,除去内脏、鱼皮、鱼鳍和脊椎骨(不剔除鱼刺),清洗干净,用高速组织捣碎机将鱼肉搅成肉泥,得草鱼肉泥;

[0085] (2) 步骤(1)制备的草鱼肉泥25g于500-mL三角烧瓶中,再加入150mL去离子水(按肉泥湿重计的6mL/g,总体积为175mL),用2mol/L的NaOH水溶液调节pH为7.6;三角烧瓶用8

层纱布扎口,于65℃水浴保温20min,得巴氏杀菌的草鱼肉浆;

[0086] (3)步骤(2)制备的草鱼肉浆中,接入粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315种子液7mL(接种量为4%的体积分数)。三角烧瓶8层纱布扎口,于30℃、150r/min振荡培养26h,得草鱼蛋白发酵物;

[0087] (4)步骤(3)制备的全部草鱼蛋白发酵物,于65℃水浴保温20min杀菌灭酶,再于10000r/min转速下离心5min,收集上清液;上清液经截留分子量为10kDa超滤膜过滤,收集滤液,得多肽液;

[0088] (5)步骤(4)制备的全部多肽液在50℃、真空度-0.1mPa条件下,浓缩至25mL(原料草鱼肉泥重量计的1mL/g)。浓缩液于一只洁净的培养皿中,于-60℃、真空度10Pa冷冻干燥,得到草鱼蛋白来源的抗氧化多肽粉。

[0089] 步骤(3)中所述的粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315种子液,按如下步骤制备:

[0090] ①4℃保存的粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315斜面菌体接种于新鲜斜面培养基,于35℃培养24h,得到活化后的斜面菌体;所述斜面培养基终浓度组成为:蛋白胨10g/L,牛肉膏5g/L,NaCl 5g/L,琼脂20g/L,溶剂为自来水,pH为7.2;

[0091] ②用接种环挑取步骤①活化后的斜面菌体3环接种至种子培养基中,于30℃、200r/min振荡培养20h,得 $OD_{600}=5.53$ 种子液;所述种子培养基终浓度组成为:麦芽浸粉12g/L,酵母浸粉10g/L,牛肉膏5g/L,NaCl 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L,溶剂为自来水,pH为7.4;150-mL三角烧瓶装30mL种子培养基,8层纱布扎口,高压蒸汽121℃灭菌15min。所述的种子液 OD_{600} ,是种子液稀释10倍后,用稀释10倍的种子培养基为参比,于分光光度计测定波长600处的吸光度,再乘以稀释倍数。

[0092] 按本实施例方法,制备得抗氧化多肽粉3.04g,相对于草鱼肉干重的得率为42.4%,不同浓度多肽的抗氧化活性见表6。

[0093] 表6实施例3制备的多肽抗氧化活性

	多肽浓度 (mg/mL)	DPPH 自由基清除率 (%)	羟基自由基清除率 (%)
	5	77.2	32.2
[0094]	10	83.7	55.3
	15	90.9	66.0
	20	93.4	71.7
	25	94.8	73.8

[0095] 由表6数据可以看出,本实施例以草鱼蛋白为原料,用粘质沙雷氏菌GDMCC No:60315发酵制备的多肽具有较好的抗氧化活性,在浓度为10mg/mL时,DPPH自由基清除率达到83.7%,羟基自由基的清除率达到55.3%。

[0096] 所述的抗氧化多肽DPPH自由基清除活性和羟基自由基清除活性测定方法同实施例1。