

引文格式: 李雪萍, 刘志东, 宁喜斌. 南极磷虾粉的发酵及体外消化抗氧化特性研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(2): 249–256. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202109035](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202109035)

南极磷虾粉的发酵及体外消化抗氧化特性研究*

李雪萍¹, 刘志东², 宁喜斌^{1,3,4**}

[1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090;
3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306;
4. 国家淡水水产品加工技术研发分中心(上海), 上海 201306]

摘要:【目的】开发以虾粉为原料的优质饲料蛋白源。【方法】利用嗜热链球菌 18748 (*Streptococcus thermophilus* 18748) 发酵南极磷虾粉, 分析影响发酵的因素, 并通过响应面法优化菌株的发酵条件以提高酶活力。经过体外模拟胃消化后利用 DPPH 自由基清除率、OH·自由基清除率、总酚含量和总抗氧化能力对抗氧化活性进行分析。【结果】影响发酵的显著因素为: 发酵温度 43 ℃, 初始 pH 6, 接种量 5%, 此时嗜热链球菌 18748 产蛋白酶活力达到最大 (6.82 U/mL)。抗氧化分析结果显示: OH·自由基和 DPPH 自由基清除能力显著降低 ($P<0.05$), 但仍然具有较高的清除水平, 总酚和总抗氧化能力显著提高 ($P<0.05$)。【结论】南极磷虾粉发酵液在模拟消化过程中, 胃蛋白酶可能促进抗氧化活性物质的释放, 且消化后仍然具有良好的抗氧化活性。本研究可为进一步工业化开发发酵虾粉及抗氧化产品提供借鉴。

关键词: 南极磷虾粉; 嗜热链球菌; 发酵; 体外模拟消化; 抗氧化活性

中图分类号: S981.210.9

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2022) 02-0249-08

Study on the Fermentation and *In Vitro* Digestion and Antioxidant Properties of Antarctic Krill Shrimp Meal

LI Xueping¹, LIU Zhidong², NING Xibin^{1,3,4}

[1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China; 3. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 4. National R & D Branch Center for Freshwater Aquatic Products Processing Technology (Shanghai), Shanghai 201306, China]

Abstract: [**Purpose**] To develop a high-quality feed protein source from shrimp meal. [**Methods**] The antarctic krill shrimp meal was fermented with *Streptococcus thermophilus* 18748, and the factors affecting fermentation were explored. The fermentation condition of the strain were optimized by response surface methodology to increase enzyme activity. After simulated gastric digestion *in vitro*, the antioxidant activity was analyzed by DPPH free radical scavenging rate, OH· free radical scavenging rate, total phenol content and total antioxidant capacity. [**Results**] The signific-

收稿日期: 2021-09-26

修回日期: 2022-03-03

网络首发日期: 2022-03-28

*基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费项目 (2020XT1201)。

作者简介: 李雪萍 (1996—), 女, 山东莱阳人, 在读硕士研究生, 主要从事食品微生物研究。

E-mail: 1229656051@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 宁喜斌 (1964—), 男, 黑龙江鹤岗人, 博士, 教授, 主要从事食品安全与质量及其微生物研究。E-mail: xbning@shou.edu.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20220325.1607.004.html>



ant factors affecting fermentation were: the temperature of fermentation was 43 °C, initial pH 6, inoculum amount 5%. At this condition, the protease activity of *S. thermophilus* 18748 reached the maximum of 6.82 U/mL. Antioxidant analysis result showed that: both OH· and DPPH free radical scavenging rate were significantly decline ($P<0.05$), and it still had a high clearance level. The total phenol content and total antioxidant capacity were significantly improved ($P<0.05$). [**Conclusion**] During the simulated digestion process of antarctic krill shrimp meal fermentation broth, pepsin may promote the release of antioxidant active substances, and still has good antioxidant activity after digestion. This study provides a reference for the further industrial development of fermented shrimp meal research and the development of antioxidant products.

Keywords: antarctic krill shrimp meal; *Streptococcus thermophilus*; fermentation; simulated digestion *in vitro*; antioxidant activity

有研究显示：全球南极磷虾资源量可达 3.79 亿 t^[1]，南极磷虾被认为是蛋白质和生物活性物质的巨大储藏库^[2]。刘志东等^[3]对南极磷虾粉营养成分分析发现其粗蛋白、灰分和水分含量分别为 61.80%、13.40% 和 9.40%，蛋白质含量非常高，是今后开发利用的重要资源。黄艳青等^[4]研究表明：饲料中添加适量南极磷虾粉能够增进点带石斑鱼的免疫功能，对其生长具有促进作用。目前，南极磷虾粉主要作为重要的氨基酸补充剂应用于水产饲料^[5]。评价蛋白质饲料利用价值的重要因素是其在动物体内的消化程度，使用生物工程技术可以使某些生物活性物质作用于蛋白质，从而提高其消化率。

微生物发酵能够将大分子蛋白质转化为易于吸收消化的小分子蛋白多肽和氨基酸等。在微生物发酵过程中，还可以产生多种能提高虾粉适口性和饲料营养价值的有机酸和不饱和脂肪酸^[6]。南极磷虾粉中含有丰富的虾青素，具有较强的抗氧化和抗衰老活性，利用微生物发酵可以提升其抗氧化活性，释放更多的活性物质，提高产品的食用价值^[7]。然而，很多生物活性物质在消化过程中不稳定，会被胃蛋白酶消化而导致活性降低甚至失去活性，使其抗氧化活性降低。研究表明：体外消化已被广泛应用于食品、药品和饲料等方面，同时在食品营养吸收和生物可给性等方面备受关^[8]。本研究分析嗜热链球菌发酵南极磷虾粉的影响因素，结合 Plackett-Burman 试验及 Box-Behnken 中心组合试验 2 种方法优化菌株发酵条件，对发酵液进行体外模拟消化，同时分析

消化前后的抗氧化性，为发酵南极磷虾粉的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与供试菌株

南极磷虾粉由辽宁海洋渔业有限公司提供；试验药品试剂均为分析纯，购自上海生工生物工程有限公司。供试菌株包括：戊糖片球菌 192624 (*Pediococcus pentosaceus* 192624)、嗜热链球菌 18748 (*Streptococcus thermophilus* 18748)、米曲霉 40159 (*Aspergillus oryzae* 40159)、植物乳杆菌 192567 (*Lactobacillus plantarum* 192567) 和黑曲霉 16404 (*A. niger* 16404)，均为本实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化

将实验室保藏的菌株取出，分别用 MRS 和马铃薯葡萄糖培养基活化 2 次，后转接到平板上 4 °C 保存。

1.2.2 菌株筛选

不同菌株发酵南极磷虾粉的水解度不同。水解度是蛋白质在水解过程中肽键降解程度或百分比，因此，本研究通过水解度指标对菌株进行筛选，并以水解度最高的菌株作为发酵菌株。以南极磷虾粉液态发酵为材料，采用甲醛滴定法^[9]测定发酵液上清液中氨基态氮的含量 (m_1)，采用凯氏定氮法^[10]测定发酵液总氮含量 (m_2)，根据公式^[11]计算水解度：水解度 = $m_1/m_2 \times 100\%$ 。

1.2.3 蛋白酶活力的测定

参照陈安和^[12]的研究方法，以 1 min 内分解出 1 μg 酪氨酸的量定义为 1 单位蛋白酶活力。

1.3 响应面法优化产蛋白酶的条件

1.3.1 Plackett-Burman 试验设计

利用 Plackett-Burman 设计研究变量间的相互作用及其对蛋白酶活性的影响 (正效应或负效应) 有助于最小化错误概率, 筛选出最有影响的独立因素^[13]。在单因素试验的基础上, 选取 10 个自变量 (9 个因素和 1 个考查试验误差的虚拟变量), 设计进行 $n=12$ 的 Plackett-Burman 试验, 每个变量分别取低 (-1) 和高 (+1) 2 个水平, 利用 Minitab 17.0 软件进行试验设计和数据分析 (表 1)。

表 1 Plackett-Burman 试验设计
Tab. 1 Plackett-Burman experimental design

编号 number	因素 factor	水平 level	
		-1	+1
A	培养温度/℃ temperature	37	43
B	初始 pH initial pH	5	7
C	菌株接种量/% inoculation amount of strain	4	6
D	时间/h time	23	24
E	蛋白胨含量/% soluble starch content	2	4
F	葡萄糖含量/% glucose content	4	6
G	装液量/mL liquid volume	80	120
H	虾粉含量/% shrimp meal content	20	40
J	NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) NaCl mass concentration	4	6
K	虚拟因子 virtual factors	-1	1

1.3.2 Box-Behnken 试验设计

基于 Plackett-Burman 试验的结果, 利用 Box-Behnken 方法对显著影响因子进行进一步分析, 确定菌株发酵南极磷虾粉产蛋白酶的最佳条件。在设计试验时, 评估双因素相互作用的影响并获得反应优化的独立预测值至关重要。以 Plackett-Burman 试验筛选出的培养温度 (A)、初始 pH (B) 和接种量 (C) 等 3 个显著性因素设计 3 因素 3 水平试验 (表 2), 使用 Design-Expert 8.0.6 软件分析处理数据^[14], 软件默认有 5 组重复试验次数, 故共计 17 组数据进行多元回归拟合。

表 2 响应面试验因素与水平
Tab. 2 Response surface test factors and levels

编号 number	因素 factor	水平 level		
		-1	0	1
A	培养温度/℃ temperature	35	40	45
B	初始 pH initial pH	5	6	7
C	接种量/% inoculation amount	4	5	6

1.3.3 响应面曲线及等高线考察和验证

以响应面法分析各个因素之间的交互作用, 考察交互作用对蛋白酶的影响, 三维响应面轮廓的倾斜度和其形状方向能够直接反映各个因素之间交互作用的强弱。曲线的趋势越陡, 各因素之间的影响越显著; 曲线趋势越平滑, 影响越小^[15]。若等高线呈现圆形的程度越强, 表明两者之间交互作用越不显著, 反之则越显著。在响应面法优化的最佳条件下培养菌株并发酵南极磷虾粉, 制成液体培养基后与模型预测值进行比较和验证。

1.4 体外模拟消化试验

取发酵液样品 2 mL 与 0.85% NaCl 溶液 8 mL 混合均匀, 制备发酵稀释液。设立 3 个平行试验组。胃液消化组: 胃蛋白酶 0.2 g 溶于 5 mL 0.01 mol/L 的 HCl 溶液中, 用于制备模拟胃液, 取 5 mL 稀释液于试管中, 加入 1 mL 模拟胃液, 调节 pH 至 2.0; 胃酸对照组: 取 5 mL 稀释液于试管中, 加入 1 mL 0.01 mol/L 的 HCl 溶液, 调节 pH 至 2.0; 空白对照组: 取 5 mL 稀释液于试管中并加入 1 mL 生理盐水代替模拟胃液^[16]。

1.5 抗氧化性研究

1.5.1 总酚含量和总抗氧化能力分析

称取 0.1 g 没食子酸溶解于 50 mL 蒸馏水中, 分别配制 0、1.5、5.0、50.0、100.0、200.0 和 400.0 mg/L 的标准溶液, 765 nm 处测得吸光度, 绘制标准曲线并得回归方程^[17], 计算总酚含量。发酵液样品中的抗氧化剂能够将 Fe³⁺还原为 Fe²⁺, Fe²⁺又可与菲林类物质生成稳定络合物, 故可通过比色法检测抗氧化能力。测定方法按照试剂盒说明书进行。

1.5.2 DPPH 自由基和 OH·自由基清除能力测定

经最优条件培养后的虾粉液体置于平板冻干 48 h, 后用去离子水分别稀释为 1、2、4、6、8、10、15 和 20 mg/mL 的样品。分别取不同质量浓度的样品 1 mL, 加入 DPPH—无水乙醇溶液等体积混匀, 充分振荡, 室温避光 30 min, 于 517 nm 下测得吸光度记为 A₁; 1 mL 无水乙醇代替样品溶液于 517 nm 处测得的吸光度记为 A₂; 1 mL 无水乙醇代替 DPPH 溶液于 517 nm 处吸光度记为 A₀^[18]; 试验设置 3 组平行。分别取不同质量浓度的样品 1 mL 于试管中, 按体积比 2:2:1 加入 5 mmol/L 水杨酸—无水乙醇溶液、5 mmol/L FeSO₄ 溶液和 5 mmol/L H₂O₂ 溶液, 37 ℃ 水浴 1 h 后于 510 nm 处测定吸光度记为 A₁; 用去离子水

代替样品于 510 nm 处测定吸光度记为 A_2 ；用去离子水代替 H_2O_2 溶液于 510 nm 处测定吸光度记为 A_0 ；试验设置 3 组平行。用以下公式计算 DPPH 自由基和 $OH\cdot$ 自由基的清除率 (W):

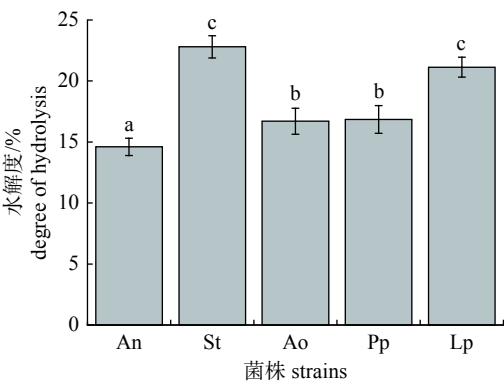
$$W = \left(1 - \frac{A_1 - A_0}{A_2}\right) \times 100\%。$$

建立样品质量浓度和清除率的线性关系求得 IC_{50} 值 (半抑制质量浓度) 以评价样品的抗氧化性。 IC_{50} 是自由基清除率达到 50% 时消化处理前或消化处理后样品的质量浓度, IC_{50} 越小, 样品的抗氧化效果越好, 反之越大。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

由图 1 可知: 嗜热链球菌 18748 的水解度显著高于除植物乳杆菌 192567 外的菌株 ($P<0.05$), 故选择嗜热链球菌 18748 为最佳发酵菌株。



注: An. 黑曲霉 16404; St. 嗜热链球菌 18748; Ao. 米曲霉 40159; Pp. 戊糖片球菌 192624; Lp. 植物乳杆菌 192567。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 下同。
Note: An. *Aspergillus niger* 16404; St. *Streptococcus thermophilus* 18748; Ao. *A. oryzae* 40159; Pp. *Pediococcus pentosaceus* 192624; Lp. *Lactobacillus plantarum* 192567. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$); the same as below.

图 1 不同菌株发酵水解度

Fig. 1 Fermentation hydrolysis degree of different strains

2.2 Plackett-Burman 试验与显著性因素筛选结果

通过单因素试验对影响菌株产酶活性的 9 个因素进行分析 (表 3), 并进一步进行主效应分析 (表 4), 可筛选出的显著因素分别为培养温度、初始 pH 和接种量, P 值分别为 0.021、0.030 和 0.044。

2.3 响应面设计结果分析

2.3.1 Box-Behnken 试验结果与回归模型方差分析

Box-Behnken 试验结果见 表 5。对试验结果进行多元回归拟合, 得到模型的二次回归方程: $Y=6.49+0.098A+0.022B+0.025C-0.50AB+0.070AC-$

表 3 Plackett-Burman 试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of Plackett-Burman experiments

试验号 test number	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	酶活/(U·mL ⁻¹) enzyme activity
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	3.91
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	6.67
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	4.70
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	5.93
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	6.22
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	5.01
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	3.81
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	5.62
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	5.09
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	6.03
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	5.66
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5.42

表 4 Plackett-Burman 设计的主效应分析

Tab. 4 Analysis of main effects of Plackett-Burman design

编号 number	因素 factor	t 值 t-value	P 值 P-value	显著性排序 significance ranking
A	培养温度/℃ temperature	29.96	0.021	1
B	初始 pH initial pH	21.35	0.030	2
C	菌株接种量/% inoculation amount of strain	-14.30	0.044	3
D	时间/h time	11.70	0.054	4
E	蛋白胨含量/% soluble starch content	0.04	0.972	9
F	葡萄糖含量/% glucose content	-6.30	0.100	7
G	装液量/mL liquid volume	1.52	0.370	8
H	虾粉含量/% shrimp meal content	11.78	0.054	5
J	NaCl 质量浓度/(g·L ⁻¹) NaCl mass concentration	7.52	0.084	6
K	虚拟因子 virtual factors	-0.22	0.864	10

$0.005BC-1.79A^2-1.64B^2-0.78C^2$ 。式中: Y 为嗜热链球菌的预测酶活力; A 、 B 、 C 分别为温度、初始 pH 和菌株接种量。

由表 6 可知: AB 、 A^2 、 B^2 和 C^2 对 Y 的影响极显著。根据模型 $F=48.980$, $P<0.0001$, 表明该模型有显著性; 模拟失拟项 $F=0.051$, $P>0.05$, 失拟项不显著, 模型合理, 可用该模型拟合试验结果。 $R^2=0.984$, 只有 1.6% 的变异不能解释; 校正确定系数 $R^2_{adj}=0.964$, 可直接运用该回归方程对本次试验处理结果拟合进行数值分析和综合预测。

2.3.2 响应面曲线及等高线分析

由图 2 可知: 当培养温度为 43.14 ℃、初始

表 5 Box-Behnken 试验设计表及结果
Tab. 5 Design and results of Box-Behnken

编号 number	温度/℃ (A) temperature	初始 pH (B) initial pH	菌株接种量/% (C) inoculation amount	酶活/(U·mL ⁻¹) enzyme activity
1	35	5	5	2.46
2	45	5	5	3.71
3	35	7	5	3.42
4	45	7	5	2.68
5	35	6	4	3.91
6	45	6	4	3.91
7	35	6	6	3.81
8	45	6	6	4.09
9	40	5	4	3.98
10	40	7	4	4.11
11	40	5	6	4.05
12	40	7	6	4.16
13	40	6	5	6.56
14	40	6	5	6.79
15	40	6	5	6.85
16	40	6	5	6.12
17	40	6	5	6.15

pH 为 5.91、接种量为 5.05% 时, 测得酶活最大值为 6.90 U/mL; 等高线和三维立体图显示: 温度 (A) 和 pH (B) 交互作用显著, 温度 (A) 和接种量 (C) 以及 pH (B) 和接种量 (C) 的交互作用均不显著。为验证优化模型的合理性, 结合实际操作可行性, 将试验条件调整为: 培养温度 43 ℃, 初始 pH 6, 接种量 5.00%。结果显示: 在最佳发酵条件下, 酶活达到最大值 (6.82 U/mL), 未优化前菌株产蛋白酶酶活为 5.09 U/mL, 优化后的酶活为优化前的 1.34 倍, 证明该模型优化成功且可靠。

2.4 体外消化模拟对发酵液抗氧化能力的影响
2.4.1 DPPH 自由基清除率

由表 7 可知: DPPH 自由基清除率随虾粉培养基质量浓度的升高而逐渐升高; 消化处理后, D-PPH 自由基清除率显著降低 ($P<0.05$)。当虾粉培养基质量浓度为 20 mg/mL 时, 清除率仍可高达 90.23%, 仍具有较高的 DPPH 自由基清除活性。消化处理前、后 IC₅₀ 值分别为 1.241 和 1.499 mg/mL。

表 6 回归模型的方差分析
Tab. 6 Analysis of variance in regression model

项目 item	平方和 sum of square	自由度 degree of freedom	均方 mean square	F值 F-value	P值 P-value	显著性 significance
模型 model	31.200	9	3.470	48.980	<0.000 1	
A	0.078	1	0.078	1.100	0.330	
B	0.004	1	0.004	0.053	0.824	
C	0.005	1	0.005	0.071	0.798	
AB	0.990	1	0.990	14.020	0.007	**
AC	0.020	1	0.020	0.280	0.615	
BC	0.000 1	1	0.000 1	0.001	0.971	
A ²	113.400	1	13.400	190	<0.000 1	**
B ²	11.300	1	11.300	160	<0.000 1	**
C ²	2.550	1	2.550	36.100	0.000 5	**
残差 residual	0.500	7	0.071			
失拟项 lack of fit	0.018	3	0.006	0.051	0.983	ns
净误差 net error	0.480	4	0.120			
总和 sum	31.700	16				

注: “**”表示影响极显著, $P<0.01$; ns. 无显著影响。
Note: “**” indicates extremely significant effect, $P<0.01$; ns. no significant effect.

2.4.2 OH·自由基清除率

由表 8 可知: 当虾粉培养基质量浓度为 1 mg/mL 时, 消化处理前、后的 OH·自由基清除率无显著差异; 随着虾粉培养基质量浓度的升高, OH·自由基清除率也逐渐升高; 当虾粉培养基质量浓度为 20 mg/mL 时, OH·自由基清除率仍可高达 91.04%。消化处理前、后 IC₅₀ 值分别为 0.967 和 1.108 mg/mL。

2.4.3 总酚含量分析

由图 3 可知: 经过胃液消化后, 发酵液的总酚含量显著高于未消化组 ($P<0.05$), 而胃酸可能会抑制活性物质的抗氧化能力, 使得胃酸对照组的总酚含量降低并显著低于未消化组 ($P<0.05$)。

2.4.4 总抗氧化能力分析

由图 4 可知: 经过胃蛋白酶消化后, 发酵液的总抗氧化能力显著高于未消化组 ($P<0.05$), 而

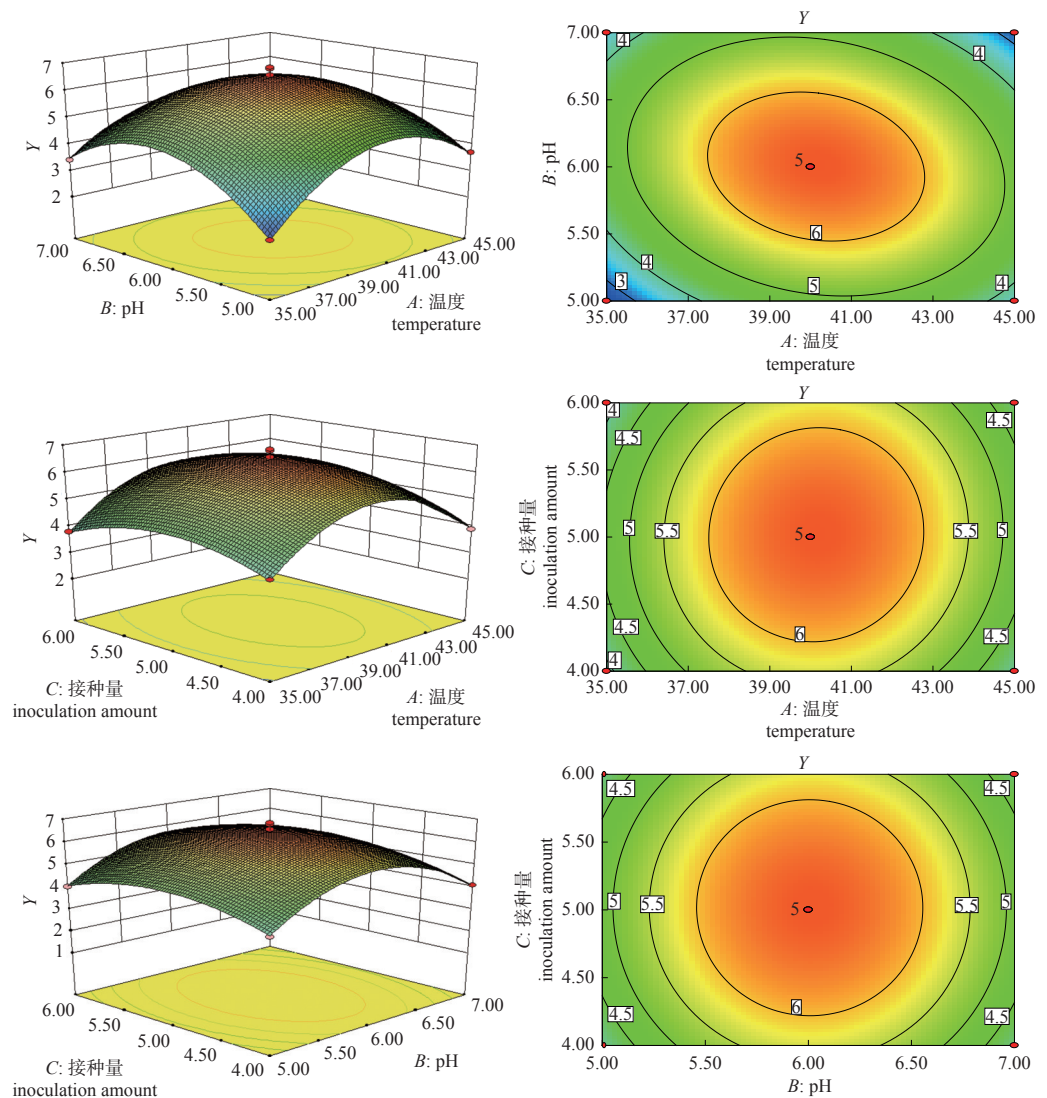


图 2 酶活性的 3D 响应面曲线图和等高线图

Fig. 2 3D response surface graphs and contour plots of enzyme activity

表 7 消化处理前后 DPPH 自由基清除率

Tab. 7 DPPH free radical scavenging rate before and after digestion %

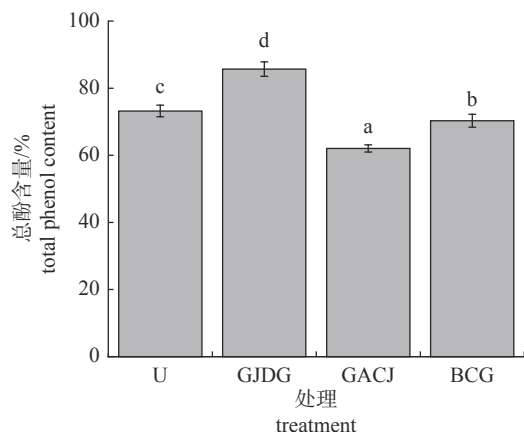
虾粉培养基质量浓度/ (mg·mL ⁻¹) mass concentration of shrimp powder medium	消化处理前 before digestion	消化处理后 after digestion
1	40.09±0.30 b	32.81±0.24 a
2	46.55±0.13 b	45.93±0.13 a
4	55.04±0.06 b	51.42±0.19 a
6	60.62±0.03 b	58.67±0.22 a
8	72.66±0.34 b	61.38±0.82 a
10	78.14±0.16 b	73.01±0.93 a
15	83.33±0.10 b	80.44±0.28 a
20	94.68±0.08 b	90.23±0.37 a

注：不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)；下同。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$); the same as below.

表 8 消化处理前后 OH·自由基清除率

Tab. 8 Comparison of hydroxyl free radical scavenging rate before and after digestion %

虾粉培养基质量浓度/ (mg·mL ⁻¹) mass concentration of shrimp powder medium	消化处理前 before digestion	消化处理后 after digestion
1	50.22±0.22 a	49.51±0.43 a
2	53.24±0.39 b	51.26±0.02 a
4	59.37±0.18 b	55.27±0.35 a
6	63.62±0.15 b	62.92±0.06 a
8	77.44±0.26 b	71.36±0.39 a
10	87.67±0.18 b	83.57±0.19 a
15	92.00±0.14 b	90.11±0.08 a
20	94.17±0.25 b	91.04±0.05 a



注: U. 未消化处理; GJDG. 胃液消化组; GACJ. 胃酸对照组; BCG. 空白对照组; 下同。

Note: U. undigested group; GJDG. gastric juice digestion group; GACJ. gastric acid control group; BCG. blank control group; the same as below.

图3 不同处理的总酚含量

Fig. 3 Total phenol content of different treatments

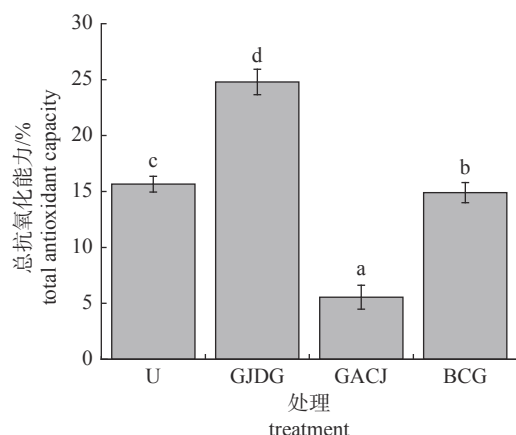


图4 不同处理总抗氧化能力

Fig. 4 Total antioxidant capacity of different treatments

胃酸对照组发酵液总抗氧化能力也显著低于未消化组 ($P<0.05$)。可见,胃蛋白酶消化可使发酵液中的抗氧化物质释放,使抗氧化能力提高;而胃酸可能会使得发酵液中抗氧化物质的活性和结构改变导致总抗氧化能力下降。

3 讨论

研究显示:南极磷虾粉作为水产饲料100%替代鱼粉对大西洋鲑生长性能和养分消化率的影响与高质量鱼粉相当或更优^[19],对银鲳^[20]、小龙虾^[21]和石斑鱼^[22]的研究也得到类似结果;同时,南极磷虾粉还可提高机体抗氧化能力,修复氧化应激反应引起的机体损伤,但是虾粉体外消化的

相关研究报道甚少。而通过体外消化可以研究消化过程中虾粉成分以及抗氧化活性的变化,探究其作为水产饲料的本质^[23]。

经过体外模拟胃消化试验后,DPPH自由基清除率降低为90.23%,这可能是由于消化后疏水性氨基酸含量降低,其与脂溶性的DPPH结合能力降低^[24],这与马勇等^[25]的结果相似。而OH·自由基清除率降至91.04%,这可能是由于消化后产生对OH·自由基清除率产生作用的小肽和氨基酸^[26]。SHU等^[27]在研究茶粉多酚的体外消化特性时发现:未消化样品的抗氧化活性更高,与本研究结果相似。经消化后,DPPH自由基清除率和OH·自由基清除率仍有较好的体外抗氧化活性,可作为潜在的抗氧化剂应用于食品行业。后续可对发酵虾粉酶解产物及消化物在细胞试验中的抗氧化作用进行研究,并通过凝胶色谱等技术对发酵虾粉酶解产物及消化物进行分离纯化,以期得到高抗氧化活性的肽段。

4 结论

培养温度43℃、初始pH6、接种量5%、培养时间22h、NaCl5%、葡萄糖5%和虾粉含量30%是嗜热链球菌发酵虾粉的最优条件;经模拟体外消化后,南极磷虾粉发酵液仍然具有较好的抗氧化活性。本研究可为南极磷虾粉天然功能性保健食品的工业化生产应用提供理论基础。

[参考文献]

- [1] ATKINSON A, SIEGEL V, PAKHOMOV E A, et al. A re-appraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill[J]. Deep-Sea Research Part I, 2009, 56(5): 727. DOI: 10.1016/j.dsr.2008.12.007.
- [2] TOU J C, JACZYNSKI J, CHEN Y C. Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits[J]. Nutrition Reviews, 2010, 65(2): 63. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00283.x.
- [3] 刘志东,陈雪忠,黄洪亮,等.南极磷虾粉的营养成分分析及评价[J].中国海洋药物,2012,31(2):43.
- [4] 黄艳青,高露姣,陆建学,等.饲料中添加南极大磷虾粉对点带石斑鱼幼鱼生长与肌肉营养成分的影响[J].海洋渔业,2010,32(4):440. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2490.2010.04.015.
- [5] 龚洋洋,黄艳青,陆建学,等.南极磷虾粉作为鲟鱼饲料蛋白源的营养和氟含量的分析[J].海洋渔业,2013,35(3):349. DOI: 10.3969/j.issn.1004-2490.2013.03.014.
- [6] 阙翡翠.微生物发酵南极磷虾及其副产物综合利用的研究[D].青岛:中国海洋大学,2013.

- [7] CAGNO R D, SURICO R F, MINERVINI G, et al. Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria[J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 900. DOI: [10.1016/j.fm.2010.12.008](https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.008).
- [8] MINH A T P, BUCKNALL M P, ARCOT J. Co-ingestion of red cabbage with cherry tomato enhances digestive biological accessibility of anthocyanins but decreases carotenoid biological accessibility after simulated *in vitro* gastro-intestinal digestion[J]. Food Chemistry, 2019, 298: 125040. DOI: [10.1016/j.foodchem.2019.125040](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125040).
- [9] GB 5009.235—2016. 食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定[S].
- [10] GB/T 6432—2018. 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法[S].
- [11] DURTHI C P, POLA M, RAJULAPATI S B, et al. Screening, optimization of culture conditions and scale-up for production of the L-glutaminase by novel isolated *Bacillus* sps. mutant endophyte using response surface methodology[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 18: 101077. DOI: [10.1016/j.bcab.2019.101077](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101077).
- [12] 陈安和. 几种蛋白酶活力测定新方法[J]. 生命的化学, 1997, 17(6): 43.
- [13] 陶大炜, 张小丹, 宁喜斌, 等. 复合诱变选育高产 α -环糊精葡萄糖基转移酶的菌株及产酶条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 8. DOI: [10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026400](https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026400).
- [14] 陈成, 宁喜斌. 响应面法优化产 β -内酰胺酶菌 *Bacillus cereus* B03 的发酵条件[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 138. DOI: [10.13386/j.issn1002-0306.2020.10.023](https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.10.023).
- [15] 薛勇, 赵明明, 王超, 等. 响应面法优化南极磷虾蛋白自溶工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 346.
- [16] TAGLIAZUCCHI D, VERZELLONI E, BERTOLINI D, et al. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols[J]. Food Chemistry, 2010, 120(2): 599. DOI: [10.1016/j.foodchem.2009.10.030](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.030).
- [17] IBRAHIM M H, JAAFAR H Z E, RAHMAT A, et al. The relationship between phenolics and flavonoids production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. under high CO₂ and nitrogen fertilization[J]. Molecules, 2011, 16: 162. DOI: [10.3390/molecules16010162](https://doi.org/10.3390/molecules16010162).
- [18] BLOIS M S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical[J]. Nature, 1958, 181: 1199. DOI: [10.1038/1811199a0](https://doi.org/10.1038/1811199a0).
- [19] HANSEN J, PENN M, VERLAND M, et al. High inclusion of partially deshelled and whole krill meals in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Aquaculture, 2010, 310(1/2): 164. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2010.10.003](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.003).
- [20] 杨程, 高权新, 张晨捷. 饲料中添加南极磷虾粉对银鲑幼鱼生长、非特异性免疫及抗氧化功能的影响[J]. 海洋渔业, 2019, 41(2): 224. DOI: [10.13233/j.cnki.mar.fish.2019.02.011](https://doi.org/10.13233/j.cnki.mar.fish.2019.02.011).
- [21] GAO R J, CHEN L, ZHANG W, et al. Effect of dietary Antarctic krill *Euphausia superba* on the growth performance and nonspecific immunity of red swamp crayfish *Procambarus clarkia* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 96: 122. DOI: [10.1016/j.fsi.2019.12.004](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.004).
- [22] 魏佳丽, 王际英, 宋志东. 酶解磷虾粉替代鱼粉对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能、体组成及血清生化的影响[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(1): 100. DOI: [10.11758/yykxjz.20141211002](https://doi.org/10.11758/yykxjz.20141211002).
- [23] TARKO T, DUDA-CHODAK A, ZAJAC N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by *in vitro* simulation methods. A review[J]. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 2013, 64(2): 79.
- [24] 韩荣欣, 张红印, 周光鑫, 等. 体外模拟消化对酸枣仁蛋白酶解产物抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2021, 37(7): 171. DOI: [10.13652/j.issn.1003-5788.2021.07.028](https://doi.org/10.13652/j.issn.1003-5788.2021.07.028).
- [25] 马勇, 高丽辉, 冯晓文, 等. 模拟胃肠消化对牡蛎低聚肽抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(11): 133. DOI: [10.13652/j.issn.1003-5788.2020.11.026](https://doi.org/10.13652/j.issn.1003-5788.2020.11.026).
- [26] TEIXEIRA, BARBARA, PIRES C, et al. Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from Cape hake by-products[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(12): 2528. DOI: [10.1111/ijfs.13233](https://doi.org/10.1111/ijfs.13233).
- [27] SHU Y, LI J, YANG X P, et al. Effect of particle size on the bioaccessibility of polyphenols and polysaccharides in green tea powder and its antioxidant activity after simulated human digestion[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56: 1127. DOI: [10.1007/s13197-019-03573-4](https://doi.org/10.1007/s13197-019-03573-4).

责任编辑: 何馨成