

降解类胡萝卜素菌株的培养基优化

杨雪鹏,汪芳芳,闫 记,叶建斌,马 科,毛多斌
(郑州轻工业学院食品与生物工程学院,河南郑州 450001)

摘 要:为了提高类胡萝卜素的降解率,对霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) A20 菌株的发酵培养基成分进行响应面优化。通过单因素实验确定了最佳碳源、氮源和无机盐分别为葡萄糖、混合氮源(酵母膏:蛋白胨=2:1)和 K_2HPO_4 ,再以这3个因素为考察因子,以类胡萝卜素降解率为响应值,设计了3因素3水平的Box-Behnken响应面分析实验,得到降解类胡萝卜素的最佳培养基组成:葡萄糖8 g/L,混合氮源(酵母膏:蛋白胨=2:1)14 g/L, K_2HPO_4 0.72 g/L。类胡萝卜素降解率从最初的45.7% 提高到77.37%,与初始的发酵培养基相比提高了69.30%。说明Box-Behnken实验设计法用于降解类胡萝卜素菌株的培养基优化是可行的,数学模型的预测值与实验观察值相符。

关键词:类胡萝卜素降解率,培养基优化,Box-Behnken设计,响应面

Optimization of medium for bacterial strain of carotenoids degradation

YANG Xue-peng, WANG Fang-fang, YAN Ji, YE Jian-bin, MA Ke, MAO Duo-bin

(Food and Bioengineering College, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to improve the degradation rate of carotenoids, optimization of the fermentation medium for *Enterobacter hormaechei* A20 strain was carried out by response surface analysis. The optimal carbon source, nitrogen source and inorganic salts source for A20 were glucose, a mixed nitrogen source (yeast extract: peptone = 2:1) and K_2HPO_4 , respectively. Then three critical factors were selected as response factors, the Box-Behnken response surface analysis test of 3 factors and 3 levels was designed with the degradation rate of carotenoid as the response value. As a result, the optimum fermentation medium was composed of glucose 8 g/L, mixed nitrogen sources (yeast extract: peptone = 2:1) 14 g/L and K_2HPO_4 0.72 g/L. Under the situation, carotenoids degradation rate increased from 45.7% to 77.37%, which increased by 69.30% compared with the original medium. The observed responses are in close agreement with the predicted values of the mathematic models, and the Box-Behnken design is suitable for optimize the culture medium of the degradation of carotenoids.

Key words: the degradation rate of carotenoids; fermentation medium optimization; Box-Behnken design; response surface

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2016)16-0210-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.16.033

类胡萝卜素是一类天然存在的脂溶性色素,具有抗氧化性,广泛存在于动物、植物和一些微生物中^[1]。自然界中发现的类胡萝卜素已经有600多种^[2]。类胡萝卜素属于四萜类化合物,其分子结构中因存在较多的类异戊二烯共轭双键,故具有较强的吸光性能,呈现出橙、黄、红色^[3]。

类胡萝卜素降解产生的香气成分阈值低,且为特征香气成分,具有生物学意义和商业价值,在香味行业一直受到较高的关注。对于植物,类胡萝卜素的降解可产生 β -紫罗兰酮等芳香物质,使花、果实、叶片具有芳香的气味,对植物花粉和种子的传播具有重要意义^[4]。在食品与果蔬加工中,类胡萝卜素的降解对产品品质、色泽的影响巨大,如面粉制品在加工中,类胡萝卜素被氧化降解成氧化异佛尔酮、二氢猕猴桃内酯等,赋予淀粉类食品特有的香气^[5]。在烤烟烘烤和燃烧过程中,类胡萝卜素可降解转化为 β -大马酮、巨豆三烯酮和二氢猕猴桃内酯等表现烟

草特征香味的物质^[6-9]。

目前关于类胡萝卜素降解的报道主要集中于物理降解和化学降解,而生物降解法尤其是利用酶和微生物来降解类胡萝卜素产生香味物质的研究还很少^[10]。国内对于类胡萝卜素降解性及香气研究近几年才有报道,且以烟草烘烤降解为主,而食物中类胡萝卜素降解及香气的研究是空白,可见意义重大^[11]。为了进一步提高类胡萝卜素降解率,促进香味物质的生成,本研究以类胡萝卜素降解菌霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) A20为实验菌株,应用响应面分析法对发酵培养基成分进行优化,以类胡萝卜素降解率为响应值,探讨了发酵培养基中影响类胡萝卜素降解率的各种关键因素及其相互作用,最终得到培养基的最佳成分。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株 由前期实验,从烟叶中筛选出了一株能

收稿日期:2016-01-25

作者简介:杨雪鹏(1973-),男,博士,副教授,研究方向:烟草工程与酶工程,E-mail:yangxuepeng@zzuli.edu.cn。

高效降解类胡萝卜素的菌株,通过形态观察、生理生化实验和分子鉴定等手段,鉴定该菌株为霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) A20;葡萄糖、蔗糖、乳糖、 β -环糊精、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 FeSO_4 、 K_2HPO_4 、 CuSO_4 等 天津市凯通化学试剂有限公司;麦芽糖、酵母膏、蛋白胨等 北京奥博星生物技术责任有限公司;天门冬酰胺、吐温 80 Beijing Solarbio science & Technology Co.Ltd;以上试剂 均为分析纯。

恒温振荡器 上海福玛实验设备有限公司;1260 infinity 液相色谱 美国安捷伦科技公司;NANODROP2000 微显分光光度计 美国赛默飞世尔公司;GR85DA 高压灭菌锅 致微仪器有限公司;高速冷冻离心机 德国 Herolab 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法 种子培养基为蛋白胨 10 g、酵母膏 5 g、 NaCl 1 g、蒸馏水 1 L、 $\text{pH} = 7.0$;初始培养基为葡萄糖 10 g、蛋白胨 10 g、酵母膏 5 g、 MgSO_4 0.2 g、蒸馏水 1 L、 $\text{pH} = 7.0$,121 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min 灭菌后,补充类胡萝卜素溶液(使其终浓度为 2 g/L),并无菌过滤。类胡萝卜素的溶液用 200 mg 的类胡萝卜素分散在 2 g 吐温 80 中,溶解在 400 mL 二氯甲烷中,将溶剂减压蒸出,溶解在 10 mL 乙醇中,此时类胡萝卜素溶液的浓度为 20 g/L^[12]。

将筛选得到的降解类胡萝卜素的 A20 菌株接种于种子培养基活化 24 h,将培养好的种子液按 1% 的接种量接入装液量为 100 mL 的 250 mL 三角瓶中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下,避光培养。

1.2.2 蛋白质含量的测定 取 5 mL 发酵液离心(4 $^{\circ}\text{C}$,3000 r/min,5 min),去掉上清液后用 pH 为 7.0 的 PB 缓冲液洗涤 2 次,再离心(4 $^{\circ}\text{C}$,3000 r/min,5 min),去掉上清液后再加入 PB 缓冲液 5 mL,在冰上进行超声破碎(5 min,振幅 40%),离心(4 $^{\circ}\text{C}$,6500 r/min,10 min),取其上清液,用微显紫外分光光度计测量蛋白质含量。

1.2.3 类胡萝卜素降解率测定方法

1.2.3.1 发酵液预处理方法 发酵液在避光条件下,高速离心(4 $^{\circ}\text{C}$,6500 r/min,15 min),将分离出的上清取出来,加入等体积二氯甲烷反复萃取 3 次,得类胡萝卜素提取物,加无水 Na_2SO_4 干燥过夜,真空浓缩,蒸干溶剂,再加 2 mL 甲醇,过 0.45 μm 的有机系膜,待 HPLC 分析,并有等体积不接菌培养基作为对照。

1.2.3.2 HPLC 分析的条件 色谱柱选择 C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,粒径为 5 μm),柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相为甲醇(1:99 体积比),流速为 0.6 mL/min,波长为 460 nm,进样量为 5 μL 。

1.2.3.3 类胡萝卜素标准曲线的绘制 分别以甲醇配制 20、40、80、120、160、200 mg/L 的类胡萝卜素标准溶液,根据建立的色谱条件进行 HPLC 分析后,以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),制作出标准曲线。

1.2.3.4 类胡萝卜素降解率计算公式

$$\text{类胡萝卜素降解率}(\%) = \left(1 - \frac{C_{\text{实验}}}{C_{\text{对照}}}\right) \times 100$$

1.2.4 类胡萝卜素降解时间的确定 按照表 1 所示将种子液接种到液体发酵培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$,150 r/min 进行发酵。分别定时取样,对样品中类胡萝卜素含

量、蛋白质浓度进行检测。

表 1 类胡萝卜素降解动力学实验设计

Table 1 The design of carotenoids degradation kinetics

编号	类胡萝卜素添加量(g/L)	种子液接种量(%)
实验组	2	1
对照组一	0	1
对照组二	2	0

1.2.5 单因素实验

1.2.5.1 碳源实验 在初始培养基的基础上,氮源为蛋白胨 10 g/L、酵母膏 5 g/L,无机盐为 MgSO_4 0.2 g/L,分别以 10 g/L 的葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、 β -环糊精作为碳源,发酵培养 42 h,通过 HPLC 测定类胡萝卜素含量,计算得到类胡萝卜素降解率。再对碳源的添加量进行优化,其添加量分别为:5、10、15、20、25 g/L,发酵条件及测定方法同上。

1.2.5.2 氮源实验 在初始培养基的基础上,碳源为葡萄糖 10 g/L,无机盐为 MgSO_4 0.2 g/L,分别以 10 g/L 的 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酵母膏、天门冬酰胺、蛋白胨、混合氮源(酵母膏:蛋白胨 = 1:1,2:1,1:2)作为氮源,发酵条件及测定方法同上。再对氮源的添加量进行优化,其添加量分别为:5、10、15、20、25 g/L,发酵条件及测定方法同上。

1.2.5.3 无机盐实验 在以上条件确定的情况下,碳源为葡萄糖 10 g/L、氮源为蛋白胨 5 g/L、酵母膏 10 g/L,分别以 0.2 g/L 的 MgSO_4 、 CaCl_2 、 FeSO_4 、 K_2HPO_4 、 CuSO_4 为无机盐,发酵条件及测定方法同上。再对其添加量进行优化,其添加量分别为:0.1、0.25、0.5、0.75、1 g/L,发酵条件及测定方法同上。

1.2.6 响应面实验 采用 Design Expert 软件进行 Box-Behnken 响应面实验设计,在单因素实验的基础上,选择对类胡萝卜素降解率有显著影响的三个因素(葡萄糖、酵母膏:蛋白胨 = 2:1、 K_2HPO_4)作为 Box-Behnken 设计要考察的变量,各因素设三个水平,各因素的各个水平设计见表 2^[13]。

表 2 Box-Behnken 实验设计因素水平

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design for response surface methodology(RSM)

因素	水平		
	-1	0	1
A 葡萄糖(g/L)	5	10	15
B 混合氮源(g/L)	10	15	20
C K_2HPO_4 (g/L)	0.25	0.5	0.75

1.3 数据处理

所有数据均用 3 次平行实验的平均值表示,应用 Design-Expert 软件中的 RSREG(Response Surface Regression)程序进行回归计算,并对回归方程进行方差分析和系数显著性检验。

2 结果与分析

2.1 类胡萝卜素标准曲线的绘制

按照色谱条件测定,结果如图 1 所示。峰面积

(Y)与浓度(X)的回归方程为 $Y = 43.135X + 57.84$, 相关系数 $R^2 = 0.9976$, 表明在 0~200 mg/L 浓度范围内, 类胡萝卜素浓度与峰面积线性关系良好。

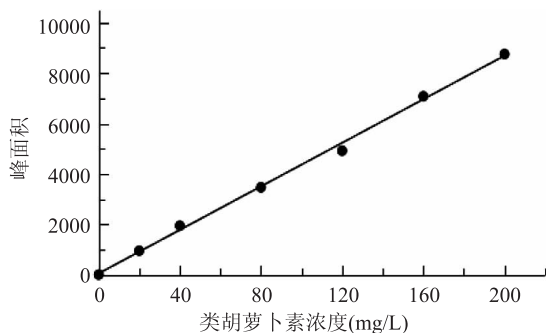


图1 类胡萝卜素的标准曲线

Fig.1 Carotenoids standard curve

2.2 类胡萝卜素降解时间的确定

在类胡萝卜素发酵过程中选择合适的降解时间至关重要, 过早或过晚都会对发酵产生不利影响。由图2可知, A20 菌种在 12 h 后开始迅速繁殖; 至 36 h 时, 菌种进入对数生长期; 到了 42 h 时, 菌种对类胡萝卜素的降解基本已经结束, 因此本实验确定最佳降解时间为 42 h。

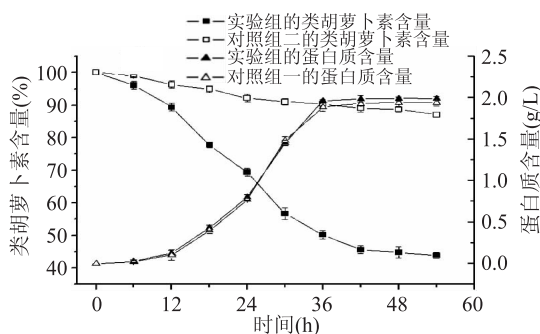


图2 A20 菌株的生长和降解动力学曲线

Fig.2 Growth and carotenoids degradation kinetics by strain A20

2.3 单因素实验

2.3.1 碳源单因素实验

2.3.1.1 碳源种类优化 碳源在微生物生长代谢过程中, 不仅是构成微生物细胞结构的主要成分, 而且为细胞生命活动提供能量。在初始培养基的基础上, 实验选择了 5 种不同的碳源, 考察它们对 A20 菌株降解类胡萝卜素能力的影响。结果如图3所示, 以葡萄糖为碳源时, 类胡萝卜素降解率最高, 为 45.7%, 蛋白质含量为 1.997 g/L; 其次是蔗糖, β -环糊精最低。由于葡萄糖作为单糖, 微生物能直接利用; 而麦芽糖、蔗糖和乳糖作为二糖, β -环糊精作为多糖, 微生物都不能直接利用, 需要水解为单糖后才能被微生物利用。故选择葡萄糖作为最佳碳源。

2.3.1.2 碳源浓度优化 研究不同葡萄糖浓度对 A20 菌株降解类胡萝卜素的影响, 结果如图4所示, 当葡萄糖浓度为 10 g/L 时, 类胡萝卜素降解率最高, 为 48.3%, 蛋白质含量为 2.23 g/L。随着葡萄糖添加量的继续增加, 反而不利于类胡萝卜素降解, 其原因有: 培养基中糖含量过高, 引起培养基渗透压过高,

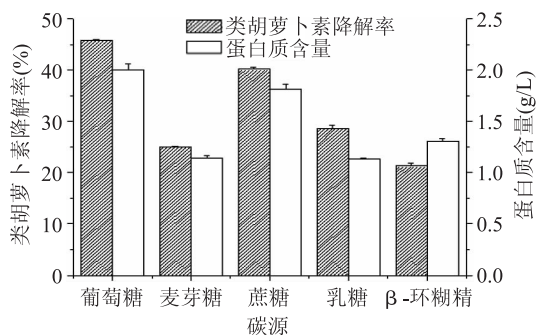


图3 不同碳源对蛋白质含量和类胡萝卜素降解率的影响

Fig.3 Effects of different carbon sources

on the protein content and degradation of carotenoids

抑制菌体细胞的生长及类胡萝卜素降解酶的合成, 使类胡萝卜素降解率降低; 高浓度葡萄糖的快速利用, 容易造成糖代谢过程中丙酮酸的积累及无氧酵解产物醋酸、乳酸等的产生, 使发酵液 pH 降低, 不利于细胞的生长及类胡萝卜素降解酶的合成^[14]。

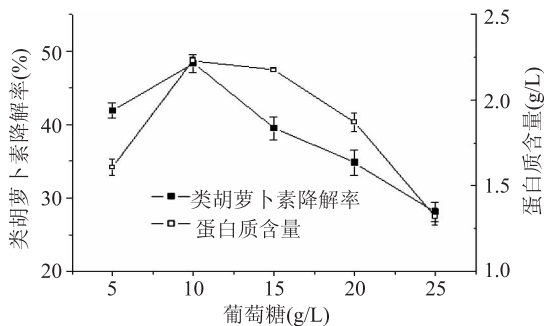


图4 葡萄糖浓度对蛋白质含量和类胡萝卜素降解率的影响

Fig.4 Effects of different glucose concentration

on the protein content and degradation of carotenoids

2.3.2 氮源单因素实验

2.3.2.1 氮源种类优化 氮源是组成菌体细胞和代谢产物的必需营养物质, 培养基中使用的氮源一般分为无机和有机两种氮源。以 10 g/L 的葡萄糖为碳源, 选取了 2 种无机氮、3 种有机氮和 3 种混合氮作为氮源, 考察它们对 A20 菌株降解类胡萝卜素能力的影响。结果如图5所示, 以酵母膏: 蛋白胨 = 2:1 为氮源时, 类胡萝卜素降解率最高, 为 51.5%, 蛋白质含量为 2.32 g/L; 其次是酵母膏: 蛋白胨 = 1:2; 2 种无机氮 (KNO_3 和 $(NH_4)_2SO_4$) 最低, 这说明细胞不能利用无机氮。故选择混合氮源 (酵母膏: 蛋白胨 = 2:1) 为最佳氮源。

2.3.2.2 氮源浓度优化 以酵母膏: 蛋白胨 = 2:1 为氮源, 考察不同浓度氮源对 A20 菌株降解类胡萝卜素能力的影响, 结果如图6所示, 当氮源浓度为 15 g/L 时, 类胡萝卜素降解率最高, 为 56.2%, 蛋白质含量为 2.48 g/L。从图6可以看出, 当氮源浓度低于 15 g/L 时, 由于营养物质不充分而未能给细胞提供有利的生长条件, 从而影响类胡萝卜素的降解; 氮源浓度高于 15 g/L 时, 导致氮源过剩, 容易造成培养基中氮的过分积累, 使发酵液的 pH 升高, 抑制菌体的生长繁殖, 最终导致类胡萝卜素的降解率降低^[15]。

2.3.3 无机盐单因素实验

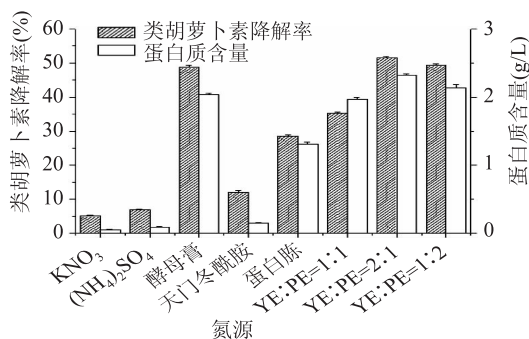


图5 不同氮源对蛋白质含量和类胡萝卜素降解率的影响

Fig.5 Effects of different nitrogen sources

on the protein content and degradation of carotenoids

注:YE表示酵母膏;PE表示蛋白胨。

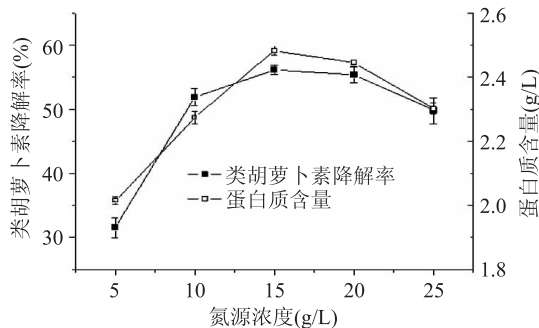


图6 氮源浓度对蛋白质含量和类胡萝卜素降解率的影响

Fig.6 Effects of nitrogen concentration

on the protein content and degradation of carotenoids

2.3.3.1 无机盐种类优化 无机盐在细胞中的含量虽然不多,但是生命活动所必需的,其主要功能是参与构成菌体成分、作为酶的组成部分、维持酶的活性或调解渗透压等。分别以 10 g/L 的葡萄糖和 15 g/L 的酵母膏:蛋白胨 = 2:1 为碳源和氮源,选择了 5 种不同的无机盐,研究它们对 A20 菌株降解类胡萝卜素能力的影响。结果如图 7 所示,培养基中添加 K₂HPO₄ 时,类胡萝卜素降解率最高,为 61.7%,蛋白质含量为 2.39 g/L;它们对类胡萝卜素降解的贡献大小依次为:K₂HPO₄ > MgSO₄ > CaCl₂ > FeSO₄ > CuSO₄。由于 K₂HPO₄ 具有 pH 缓冲能力,能够调节发酵液 pH 的稳定,所以更加有利于菌株的生长和类胡萝卜素的降解。故选择 K₂HPO₄ 为最适无机盐。

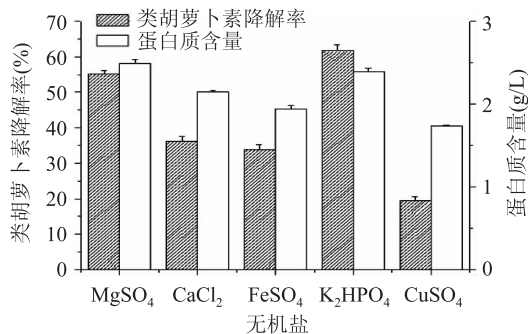


图7 无机盐对蛋白质含量和类胡萝卜素降解率的影响

Fig.7 Effects of different inorganic salts

on the protein content and degradation of carotenoids

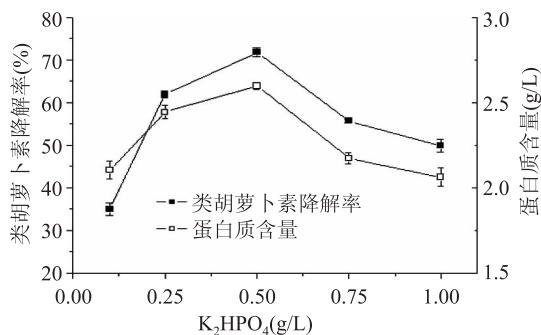


图8 无机盐浓度对蛋白质含量

和类胡萝卜素降解率的影响

Fig.8 Effects of inorganic salt concentration

on the protein content and degradation of carotenoids

2.3.3.2 无机盐浓度优化 考察不同浓度的 K₂HPO₄ 对 A20 菌株降解类胡萝卜素能力的影响。结果如图 8 所示,当 K₂HPO₄ 的浓度为 0.5 g/L 时,类胡萝卜素降解率最高,为 71.8%,蛋白质含量为 2.60 g/L。当 K₂HPO₄ 的浓度低于 0.5 g/L 时,因为不能为菌体的生长提供足够的无机盐,而导致菌株降解类胡萝卜素的能力降低;当 K₂HPO₄ 的浓度高于 0.5 g/L 时,高浓度的 K₂HPO₄ 对菌体生长有一定抑制作用,从而影响了类胡萝卜素的降解。

2.4 响应面实验

2.4.1 响应面实验设计与结果 通过单因素实验确定了最佳碳源、氮源和无机盐分别为葡萄糖、混合氮源(酵母膏:蛋白胨 = 2:1)和 K₂HPO₄,本实验再以这 3 个因素为考察因子,以类胡萝卜素降解率为响应值,设计了 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 响应面分析实验,来进一步优化培养基组成。实验共有 17 个实验点,其中 12 个为析因点,5 个为中心点,实验结果见表 3。

利用 Design Expert 软件,对表 3 数据进行多元二次回归拟合,得到回归模型方程为:类胡萝卜素降解率 = -37.055 + 5.86775A + 7.76775B + 98.59C + 0.0313AB + 1.88AC - 2.948BC - 0.46775A² - 0.20635B² - 50.02C²。

对该回归方程进行方差分析和显著性检验,结果见表 4。当“Prob > F”值小于 0.01 时,说明这一项指标是极显著的,当“Prob > F”值小于 0.05 时,说明这一项指标是比较显著的。在实验设计范围内,回归模型极显著 ($p < 0.0001$),模型失拟项影响不显著 ($p = 0.09 > 0.05$),决定系数 $R^2 = 0.9843$,说明回归方程的拟合度较好,能够正确反应类胡萝卜素降解率与葡萄糖、混合氮源和 K₂HPO₄ 之间的关系。回归方程各项的方差分析表明,一次项 A(葡萄糖)、C(K₂HPO₄) 对类胡萝卜素降解率的影响极显著,二次项 A²、B² 的影响极显著,BC 的交互作用影响显著。说明各具体实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系;由 F 值判断,在选择范围内,3 个因素对类胡萝卜素降解率的影响顺序为 A > C > B。综上所述,使用该模型可以较好地对响应值(类胡萝卜素降解率)进行分析和预测。

表3 Box-Behnken 实验设计与结果

Table 3 Box-Behnken experimental design and results

实验号	A	B	C	类胡萝卜素降解率(%)
1	0	0	0	73.94
2	1	0	-1	42.71
3	0	1	1	70.99
4	0	0	0	72.35
5	0	1	-1	64.97
6	-1	0	1	70.37
7	1	1	0	47.42
8	0	-1	1	73.25
9	-1	0	-1	65.31
10	0	0	0	75.86
11	1	-1	0	42.64
12	1	0	1	57.17
13	0	0	0	73.61
14	0	-1	-1	52.49
15	0	0	0	72.79
16	-1	1	0	69.51
17	-1	-1	0	67.86

表4 回归模型方差分析

Table 4 ANOVA for regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F
模型	2031.32	9	225.7	48.88	<0.0001
A	863.41	1	863.41	186.97	<0.0001
B	34.65	1	34.65	7.5	0.0289
C	267.96	1	267.96	58.03	0.0001
AB	2.45	1	2.45	0.53	0.4901
AC	22.09	1	22.09	4.78	0.065
BC	54.32	1	54.32	11.76	0.011
A ²	575.76	1	575.76	124.68	<0.0001
B ²	112.05	1	112.05	24.26	0.0017
C ²	41.15	1	41.15	8.91	0.0204
残差	32.33	7	4.62		
失拟项	24.94	3	8.31	4.51	0.09
纯误差	7.38	4	1.85		
总变异	2063.64	16			

2.4.2 响应曲面图分析 通过 Design Expert 软件对三个实验因素分别两两交互,做出响应曲面图,如图9所示。从图9中可以看出,混合氮源与 K₂HPO₄ 对类胡萝卜素降解的交互作用最强,其次是葡萄糖与 K₂HPO₄,而葡萄糖与混合氮源对类胡萝卜素降解的交互作用最弱。同时,影响类胡萝卜素降解最显著的因素为葡萄糖,表现为其响应面变化弧度最大;K₂HPO₄ 对类胡萝卜素降解的影响比较显著,曲线较陡;而混合氮源对类胡萝卜素降解的影响相对较小,曲线较平缓,其含量的增加或减少,对响应值的变化影响较小。

应用 Design Expert 软件得到类胡萝卜素降解最优培养基组成为葡萄糖 8 g/L,混合氮源(酵母膏:蛋白胨=2:1)14 g/L,K₂HPO₄0.72 g/L,类胡萝卜素降解率的预测值为 77.96%。对优化后的最佳培养基

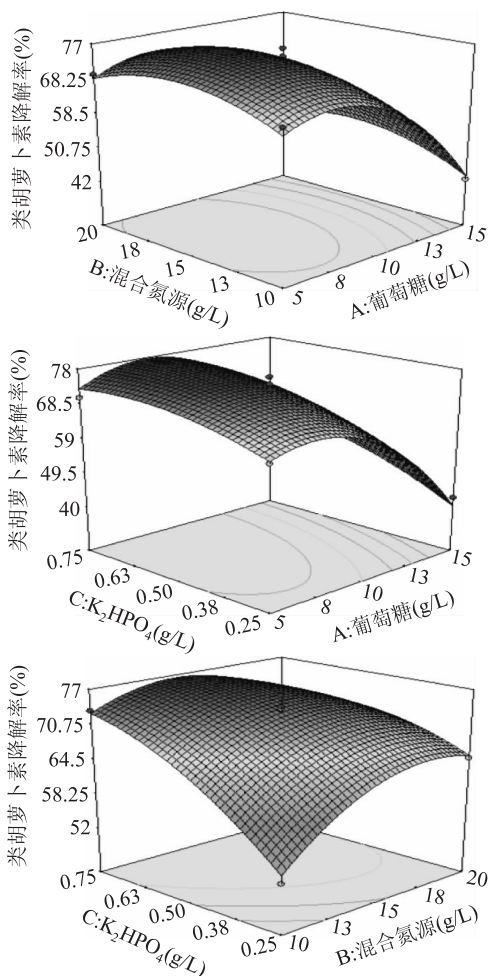


图9 各因素交互作用对类胡萝卜素降解影响的响应曲面图
Fig.9 Response surface plots showing the cross effects of factors on degradation of carotenoids

进行验证实验,平行实验 3 次,得到的类胡萝卜素降解率平均为 77.37%,与理论预测值基本吻合,说明该回归方程能比较真实地反应各因素对类胡萝卜素降解率的影响,因此,使用该回归模型优化 A20 菌株降解类胡萝卜素的培养基是可行的。对初始培养基进行 3 次平行实验,得到降解率平均为 45.7%,说明优化后的类胡萝卜素降解率提高了 69.30%。

3 结论

通过单因素实验和响应面分析对 A20 菌株降解类胡萝卜素的培养基各成分含量进行优化,得到最佳培养基组成为:葡萄糖 8 g/L,混合氮源(酵母膏:蛋白胨=2:1)14 g/L,K₂HPO₄0.72 g/L。类胡萝卜素降解率从最初的 45.7% 提高到 77.37%,与初始的发酵培养基相比提高了 69.30%。

参考文献

- [1] Phadwal K. Carotenoid biosynthetic pathway: molecular phylogenies and evolutionary behavior of crt genes in eubacteria [J]. Gene, 2005, 345: 35-43.
- [2] Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1740 (2): 101-107.

(下转第 219 页)

表4 酶解液冻干粉氨基酸测定结果(mg/100 g 干基)

Table 4 Analysis of total amino acid of hydrolysate composition(mg/100 g dry weight)

氨基酸种类	氨基酸含量	氨基酸种类	氨基酸含量
天冬氨酸	7399.59	甲硫氨酸	121.22
谷氨酸	10832.73	半胱氨酸	1248.14
丝氨酸	3867.31	异亮氨酸	3617.68
精氨酸	4671.52	亮氨酸	2890.51
甘氨酸	11809.66	色氨酸	946.56
苏氨酸	4094.96	苯丙氨酸	11262.69
脯氨酸	4955.65	组氨酸	3385.56
丙氨酸	2346.13	赖氨酸	2036.65
缬氨酸	1336.56	酪氨酸	2036.65
必需氨基酸	16505.13	总计	78859.77

3 结论

研究以澳洲秃参为原料,通过酶的筛选实验选定了中性蛋白酶和风味蛋白酶组成的复合酶以3:1为最佳酶比例,通过单因素及正交实验优化确定海参最佳酶解工艺为酶解温度55℃、pH7.5、料液比1:5、酶解时间3h、酶加量1500U/g蛋白。其酶解液中多肽得率达18.6%。该海参酶解液中含有丰富的氨基酸,其中呈味氨基酸的比例也较高,可作为保健食品或调味品原料进一步开发。

参考文献

- [1] 廖玉麟.我国的海参[J].生物学通报,2001,36(9):1-3.
- [2] Wen J, Hu C. Elemental composition of commercial sea cucumbers(holothurians) [J]. Food Additives and Contaminants: Part B, 2010, 4(3): 246-252.
- [3] 刘程惠,朱蓓薇,董秀萍,等.海参酶解产物的分离及其体外抗氧化作用的研究[J].食品与发酵工业,2007,33(9):50-53.
- [4] 赵兴坤.海参肽的功能特性及其应用[J].中国食物与营养,2003(12):31-33.

(上接第214页)

- [3] 惠伯棣.类胡萝卜素化学及生物化学[M].北京:中国轻工业出版社,2005:98-149.
- [4] 宫长荣.不同烘烤条件下烟叶色素降解规律的研究[J].烟草科技,1997(2):33-34.
- [5] 王兰.面包的风味和营养与米拉德反应[J].食品科学,1982,3(8):44-50.
- [6] Wahlberg I, Kerstin K, Austin D J. Effects of flue-curing and ageing on the volatile, neutral and acidic constituents of Virginia tobacco [J]. Phytochemistry, 1977, 16(8): 1217-1231.
- [7] 侯英,徐济仓,王保兴,等.叶黄素的热解产物分析[J].烟草科技,2007(12):27-32.
- [8] Gopalam A, Gopalaehari N C. Biochemical changes in leaf pigments and chemical constituents during flue-curing of tobacco [J]. Nicotine Tob Res, 1979(5): 113-117.
- [9] Matsubara S, Morosinotto T, Osmond C B, et al. Short- and Long-term operation of the lutein-epoxide cycle in light-harvesting antenna complexes [J]. Plant Physiology, 2007, 144

- [5] 李艳菊,刘辉,郭月秋.海参免疫调节作用的实验研究[J].中国海洋药物,2006,25(6):49-50.
- [6] 杨涛,万端极,吴正奇,等.海参内脏制备海参多肽工艺优化及其抗氧化测定[J].食品科技,2014,39(3):218-222.
- [7] M RosariiSchmeer. Grow the inhibiting agents from mercenariaextracts chemical andbiologicalproperties [J]. Science, 1964(144):413-414.
- [8] 李志英,许喜林,陈健.虎纹海参多肽酶解制备工艺及抗氧化性研究[J].食品研究与开发,2012,33(6):159-162.
- [9] 付学军,朴亮均.酶解法综合制备海参多肽、多糖工艺研究[J].食品科技,2007(9):116-118.
- [10] Clare D A, Swaisgood H E. Bioactive milk peptides: A prospectus [J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83(6): 1187-1195.
- [11] Elias R, Kellerby S, Decker E. Antioxidant activity of proteins and peptides [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, 48(5): 430-441.
- [12] Yuanhui Zhao, Bafang Li, Shiyuan Dong, et al. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate [J]. Peptides, 2009, 30(6): 1028-1033.
- [13] Shinichi Kato, Saori Tsurumaru, Makoto Taga, et al. Neuronal peptides induce oocyte maturation and gamete spawning of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. Developmental Biology, 2009, 326(1): 169-176.
- [14] GB/T 11896-1989, 水质氯化物的测定[S].
- [15] 李理,张静.蛋白水解产物中多肽得率的测定方法研究[J].现代食品科技,2010,26(8):884-888.
- [16] 邹东恢,梁敏,江成英,等.大豆多肽复合酶解及脱色工艺条件优化的研究[J].粮油加工,2007(11):89-92.
- [17] 隋华嵩,赵倩辉,薛龙,等.金丝梅花粉可溶性多肽提取工艺研究[J].食品与发酵科技,2012,48(2):40-43.
- [18] 杨颖,汪秋宽,谷越,等.加拿大红参(*Parastichopus californicus*)基本成分分析及其酶解工艺研究[J].食品工业科技,2016,37(1):190-200.
- [19] 苏永昌,刘淑集,吴成业.海参多肽的制备工艺优化及其抗氧化测定[J].福建水产,2009,2(6):6-10.

(2):926-941.

- [10] 张永涛,刘惠芳,张东豫,等.类胡萝卜素的热裂解研究[C].中国烟草学会工业专业委员会烟草化学学术研讨会论文集,海南:中国烟草学会,2005:335-339.
- [11] 袁磊,刘晓庚.基于文献计量看类胡萝卜素的研究现状与发展趋势[J].粮食科技与经济,2014,39(1):55-58.
- [12] Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, et al. Cleavage of β , β -carotene to flavor compounds by fungi [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62: 331.
- [13] 潘森,付雅欣,洪枫,等.薛氏丙酸杆菌产抑菌性代谢物发酵培养基优化[J].食品工业科技,2015,36(13):166-170.
- [14] Zeng Xiaobo, Darcy P S, Wankei W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(3): 506-513.
- [15] 孙军涛,王洪新,吕文平.耐热 β -葡聚糖酶发酵培养基的优化[J].食品工业科技,2015(5):218-222.