

响应面法优化地衣芽孢杆菌发酵鸡骨粉产抗氧化肽的工艺

李朋泰, 张家培, 赵腾腾, 孙少康, 刘亚慧, 牛占占, 赵祯, 王志新*

(河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018)

摘要: 为了鸡骨资源的高效利用及新型抗氧化剂的开发, 该文以地衣芽孢杆菌为发酵菌株, 发酵鸡骨生产抗氧化肽。首先研究添加葡萄糖对地衣芽孢杆菌生长的影响, 然后通过单因素试验和响应面法优化发酵条件, 同时对鸡骨发酵液进行 Tricine-SDS-PAGE 鉴定, 最后对发酵液中的鸡骨肽进行有机膜分离, 并测定不同组分抗氧化活性。结果表明, 添加葡萄糖抑制地衣芽孢杆菌生长, 优化最佳发酵条件为: 添加鸡骨粉的质量分数 4.2%, 发酵 pH 值 6.0, 菌的体积分数 4.0%, 装液量 50 mL/250 mL, 发酵时间 24 h。在此条件下, 发酵液水解度为 56.29%, DPPH· 清除率为 57.11%。Tricine-SDS-PAGE 证实鸡骨粉已被水解。有机膜分离得到的抗氧化肽组分中, 组分 V (分子量 3~5 kDa 的肽段) 抗氧化活性最好, DPPH· 清除率为 59.08%, 超氧阴离子清除率在 20.21% 以上, ABTS⁺ 清除率为 85%。该文为提高鸡骨的综合利用价值奠定基础, 拓宽了功能性产品的研发范围。

关键词: 鸡骨粉; 地衣芽孢杆菌; 条件优化; 抗氧化肽

文章编号: 1673-9078(2025)06-119-128

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0904

Response Surface Methodology-based Optimization of Antioxidant Peptide Production from Chicken Bone Meal Fermented with *Bacillus licheniformis*

LI Pengtai, ZHANG Jiawei, ZHAO Tengting, SUN Shaokang, LIU Yahui, NIU Zhazhan, ZHAO Zhen, WANG Zhixin*

(College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: To promote efficient utilization of chicken bones and development of novel antioxidants, antioxidant peptides were generated from chicken bone meal fermented with *Bacillus licheniformis*. First, the effect of glucose addition on *Bacillus licheniformis* growth was examined. Next, fermentation conditions were optimized using single-factor experiments and response surface methodology. Tricine-SDS-PAGE was simultaneously performed on the chicken bone fermentation broth. Finally, the chicken bone peptides in the fermentation broth were separated using an organic membrane, and their antioxidant activities were determined. The addition of glucose inhibited *B. licheniformis* growth. The optimal fermentation

引文格式:

李朋泰, 张家培, 赵腾腾, 等. 响应面法优化地衣芽孢杆菌发酵鸡骨粉产抗氧化肽的工艺[J]. 现代食品科技, 2025, 41(6): 119-128.

LI Pengtai, ZHANG Jiawei, ZHAO Tengting, et al. Response surface methodology-based optimization of antioxidant peptide production from chicken bone meal fermented with *Bacillus licheniformis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 119-128.

收稿日期: 2024-06-26

基金项目: 河北省省级科技计划资助项目 (22327107D)

作者简介: 李朋泰 (2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物工程, E-mail: lipengtai21@163.com

通讯作者: 王志新 (1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物工程, E-mail: zhixwang0311@163.com

conditions were as follows: 4.2% (*m/m*) of chicken bone meal, initial pH of 6.0, 4.0% (*V/V*) of bacterial inoculum, working volume of 50 mL in a 250 mL flask, and fermentation time of 24 h. These conditions yielded 56.29% hydrolysis in the fermentation broth, and the DPPH[·] scavenging rate reached 57.11%. Tricine-SDS-PAGE results verified that the chicken bone meal was hydrolyzed. Among the antioxidant peptide fractions obtained by organic membrane separation, fraction V (with a molecular weight of 3~5 kDa) exhibited the highest antioxidant activity. Its respective DPPH[·], superoxide anion, and ABTS⁺ scavenging activities were 59.08%, >20.21%, and 85%, respectively. This study lays a foundation for increasing the overall utilization value of chicken bones and expands the scope of research and development of functional products.

Key words: chicken bone meal; *Bacillus licheniformis*; condition optimization; antioxidant peptides

生物活性肽是两个及以上氨基酸以不同排列顺序并通过肽键连接而成的化合物总称, 具备各种生物活性, 如抗氧化性、抗菌性、免疫调节性等^[1]。抗氧化肽作为一种抗氧化性能稳定的生物活性肽^[2], 能有效清除体内自由基^[3], 抑制脂质过氧化, 保护细胞避免氧化应激带来的损害^[4], 在维护人体健康、延缓衰老和防治慢性疾病等方面展现出了广阔的应用前景。Fernado 等^[5]分离出一种抗氧化肽, 可有效降低 H₂O₂ 诱导的氧化应激和脂质过氧化, 具有潜在护肝作用。目前国内外对抗氧化肽的研究逐渐成熟, 在抗氧化肽来源、分离纯化和鉴定、检测方法三个方面都有不少研究, 并得到了良好的应用^[6]。

我国肉鸡生产量丰富, 据美国农业部 (USDA) 公布, 在 2023 年达到 1 430 万 t^[7]。在肉鸡加工过程中会产生大量鸡骨, 但其通常利用不充分或被加工成骨粉、骨泥、骨胶和骨油等低价值的产品, 导致鸡骨利用率较低^[8], 造成了严重的资源浪费。目前有研究表明, 鸡骨能够被用于研发新型的功能多肽产品, 提升其开发价值^[9]。鸡骨抗氧化肽一般通过酶解法^[10]和微生物发酵法^[11]制备。曹昌伟^[12]用木瓜蛋白酶酶解鸡骨胶原蛋白, 证明鸡骨胶原肽具有良好的体外清除自由基的能力。Nie 等^[13]提取的鸡骨蛋白水解物及其肽组分对 DPPH 自由基具有较强的清除活性及还原力, 并提出多肽组分的抗氧化活性与其分子大小密切相关。

Fan 等^[14]通过发酵和酶解鸡骨粉, 并结合不同干燥方式研究其多肽的抗氧化特性、物理性质和风味。由于不同的菌种对于不同的畜禽骨骼有不同的降解能力, 其中选择出高产、稳定的菌株并优化发酵条件是关键。而地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 作为一类重要的益生菌资源^[15], 其代谢产物安全可靠, 不仅在食品发酵、饲料添加剂开发、环境保护等诸多领域发挥着重要作用, 而且其具有产蛋白酶的能力^[16], 因其特有的酶系, 能够有

效地降解复杂的鸡骨蛋白质产生肽段。

该研究运用地衣芽孢杆菌对鸡骨进行发酵, 旨在生产出具有抗氧化活性的多肽。以发酵液的水解度和抗氧化性为指标, 对鸡骨抗氧化肽的发酵工艺进行优化, 以 Tricine-SDS-PAGE (三羟甲基甲基甘氨酸 - 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 进行鸡骨抗氧化肽分析, 对获得的鸡骨抗氧化肽发酵液进一步通过有机膜分离技术获取不同分子量的抗氧化肽组分, 可为鸡骨的高附加值利用拓宽范围, 为功能性肽的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与材料

地衣芽孢杆菌 BL-1: 该实验室保藏; 鸡骨 (蛋白质含量为 30.02%): 河北某养殖场提供。

1.1.2 试剂

胰蛋白胨、酪蛋白、酵母浸粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 琼脂粉、DPPH (2,2-联苯基-1-苦基肼基), 北京索莱宝有限公司; 甲醛 (40%), 天津市百世化工有限公司; ABTS (2,2-联氮 - 二 (3-乙基 - 苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐), 上海碧云天生物技术有限公司; 三氯乙酸, 上海麦克林生化科技有限公司; 该实验药品均为分析纯。

1.1.3 培养基

Luria-Bertani (LB) 液体培养基 (g/L): 酵母浸粉 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10, pH 值 7.0; 鸡骨粉基础培养基 (g/L): 鸡骨粉 10, pH 值自然。上述所需培养基均在 121 °C 灭菌 15 min 后备用。

1.2 仪器与设备

TAISITE 高速万能粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; SKD-1100 全自动凯氏定氮仪, 上海沛

欧分析仪器有限公司；3-18K 高速冷冻离心机，德国 SIGMA 公司；ZWY-2102 恒温培养振荡器，上海智城分析仪器制造有限公司；Plus384 酶标仪，美谷分子仪器有限公司；CX 31 pH 计，梅特勒托利多仪器上海有限公司；170-4405EDU 凝胶电泳仪，美国 Bio-rad 公司；Gel DocTM XR+ 凝胶成像仪，美国 Bio-rad 公司；BIOTECH-5BG 发酵罐，上海保兴生物设备工程有限公司；BONA-GM-18H 有机膜分离实验机，山东博纳生物科技集团有限公司；ALPHA1-4LD plus 冻干机，德国 CHRIST 冻干机有限公司。

1.3 方法

1.3.1 鸡骨粉的制备

活鸡屠宰后蒸煮 1 h，剔肉去筋膜取骨，然后将鸡骨置于 55 ℃烘箱内烘干 24 h，待烘干完成后，用转速 32 000 r/min 的粉碎机粉碎 2 min，最终制得鸡骨粉，将得到的鸡骨粉过 50 目筛子，密封袋保藏放置 4 ℃冰箱。

1.3.2 菌种活化与培养

菌株活化：移液器取 100 μL 地衣芽孢杆菌保藏液，添加至 LB 液体培养基内，37 ℃，220 r/min 培养 24 h。

菌株分析与培养：在 LB 固体平板上划线接种活化的菌液，37 ℃恒温培养 12 h，取单菌落革兰氏染色^[17]，镜检无异常后接种至 LB 液体培养基中，摇瓶培养获得种子液^[18]。

1.3.3 培养基添加碳源的研究

于鸡骨粉基础培养基中加入 15 g/L 葡萄糖作为实验组，另以不添加葡萄糖的作为对照组，接种 2% (*m/V*) 的地衣芽孢杆菌，于振荡器中 37 ℃，220 r/min 培养 24 h，培养结束后，测定各组发酵液菌体浓度，评估碳源对菌体生长的影响。

1.3.4 单因素优化

基于鸡骨粉培养基，采用水解度和 DPPH·清除率为考核指标，优化其培养条件。

鸡骨粉的质量分数：2%、3%、4%、5%，培养基初始 pH 值：3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0，菌种体积分数：1%、2%、3%、4%、5%，装液量 30 mL/250 mL、40 mL/250 mL、50 mL/250 mL、60 mL/250 mL 和培养时间：2、4、8、12、16、20、24、28 h，37 ℃，220 r/min 下发酵，8 000 r/min 离心 10 min^[19]，收集上清液检测分析。

1.3.5 响应面优化

1.3.5.1 Plackett-Burman试验

首先通过单因素实验，确定添加鸡骨粉的质量分数 (*A*)、培养基初始 pH 值 (*B*)、菌种体积分数 (*C*)、装液量 (*D*)、培养时间 (*E*) 的初步范围，利用 Design Expert 11.1.2.0 统计分析软件设计了五因素三水平的筛选试验，试验因素水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman试验因素水平表
Table 1 Plackett-Burman test factor level table

因素	水平		
<i>A</i> : 添加鸡骨粉的质量分数/%	3	4	5
<i>B</i> : 培养基初始 pH 值	5	6	7
<i>C</i> : 菌种体积分数/%	3	4	5
<i>D</i> : 装液量/(mL/250 mL)	40	50	60
<i>E</i> : 培养时间/h	20	24	28

1.3.5.2 Box-Behken试验

通过 Plackett-Burman 试验，确定三个显著因素，以 DPPH·清除率作为响应变量，利用 Design Expert 11.1.2.0 统计分析软件设计 Box-Behken 试验，构建二次回归模型，实验设计见表 2。

表 2 Box-Behken试验实验因素水平
Table 2 Box-Behken experimental factor level

因素	水平		
<i>A</i> : 添加鸡骨粉的质量分数/%	3	4	5
<i>B</i> : 培养基初始 pH 值	5	6	7
<i>C</i> : 菌种体积分数/%	3	4	5

1.3.6 Tricine-SDS-PAGE的测定

参考陈振家等^[20]的方法进行适当改进，发酵前后的上清液稀释 2 倍，加入上样缓冲液，浓缩胶质量浓度为 5 g/100 mL，分离胶质量浓度为 12 g/100 mL，加样量为 10 μL，进行恒压电泳，其中浓缩胶的电压设置为 80 V，分离胶的电压设置为 120 V，电泳结束后，取胶染色液中染色 0.5 h，脱色液中脱色 1 h，换去离子水脱色 12 h，凝胶成像仪成像并分析。

1.3.7 有机膜分离及抗氧化性分析

在 5 L 发酵罐中用优化后的培养基制备鸡骨抗氧化肽，离心得上清液，依次经过 0.05 μm 微滤膜和 10、8、5、3、1 kDa 超滤膜，得到六个组分，冷冻干燥处理后，将各组分溶于 PBS 缓冲液中，质量浓度为 5 mg/mL，测定组分的 DPPH·清除率，超氧阴离子清除率和 ABTS⁺清除率。

1.3.8 指标测定

1.3.8.1 菌体浓度的测定

OD_{600 nm} 作为衡量液体培养基内微生物生长状况的公认标准,被广泛应用,采用细胞密度 OD 值的方法测定菌体的浓度^[21],选取鸡骨粉基础培养基作为对照组,对培养后的菌体浓度进行定量测定。

1.3.8.2 水解度的测定

采用甲醛滴定法测蛋白质水解度,参照 Nikolaeva 等^[22]的方法并进行了适当调整。首先取 8 mL 的发酵液,加入 60 mL 的蒸馏水,确保充分混合均匀,调整 pH 值至 8.20,加入 10 mL 中性甲醛,再用 0.5 mol/L NaOH 标定至 pH 值 9.20,记录消耗体积 V_1 (实验组)和 V_0 (空白组)。

按照公式(1)计算水解度:

$$D = \frac{c \times (V_1 - V_0) \times 0.014 \times V}{4 \times m \times N} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D ——水解度, %;

c ——NaOH 标准溶液的浓度, mol/L;

V ——发酵液的总体积, mL;

m ——发酵底物的质量, g;

N ——发酵底物的总氮含量;

0.014——氮的含克当量。

1.3.8.3 DPPH·清除率的测定

参照 GB/T 39100-2020 标准^[23]进行测定。

1.3.8.4 ABTS⁺清除率的测定

参照 GB/T 39100-2020 标准^[23]进行测定。

1.3.8.5 超氧阴离子清除率的测定

参照 Li^[24]的方法测定邻苯三酚自氧化速率,取 0.1 mL 的发酵液和 4.5 mL 的 Tris-HCl(50 mmol/L),混合均匀,25 °C 保温 25 min,然后立刻加入 0.1 mL 的邻苯三酚溶液(3 mmol/L),混合均匀,25 °C 保温 5 min,测定 325 nm 下的吸光值。

按照公式(2)计算超氧阴离子清除率:

$$O = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

O ——超氧阴离子清除率, %;

A_1 ——样品的吸光度;

A_2 ——蒸馏水替代邻苯三酚溶液作为对照组测定的吸光度;

A_0 ——蒸馏水替代发酵液作空白组测定的吸光度。

1.3.8.6 蛋白酶活力测定

采用福林法^[25]测定发酵液的蛋白酶活力,先绘制酪氨酸标准曲线(加碳酸钠、福林试剂,40 °C 显色 20 min,680 nm 测定吸光度),然后取 1 mL 发酵液与酪蛋白反应,加三氯乙酸沉淀后过滤,再用福林法显色测定吸光度,从标准曲线上读出酶活力。

1.3.9 数据分析

所有实验均至少重复三次,利用 Origin 2022 和 SPSS 22.0 软件对所得数据进行了统计分析,并以平均值作为结果表示。经单因素方差分析及配对 t 检验, $P < 0.05$ 表明存在统计学显著差异。

2 结果与分析

2.1 鸡骨粉培养基添加碳源的研究

经过地衣芽孢杆菌发酵后,添加葡萄糖的发酵液 OD_{600 nm} 为 1.498,不添加葡萄糖的发酵液 OD_{600 nm} 为 1.724,菌体浓度表现出明显差异($P < 0.05$)。说明鸡骨粉培养基不需要添加葡萄糖就可以满足菌体的生长繁殖,周航先等^[26]的研究显示不添加葡萄糖可有效提高菌体丰度和维持细菌群落的稳定性。在后续的研究中,该研究所用培养基不添加葡萄糖。

2.2 单因素优化

2.2.1 添加鸡骨粉的质量分数的优化

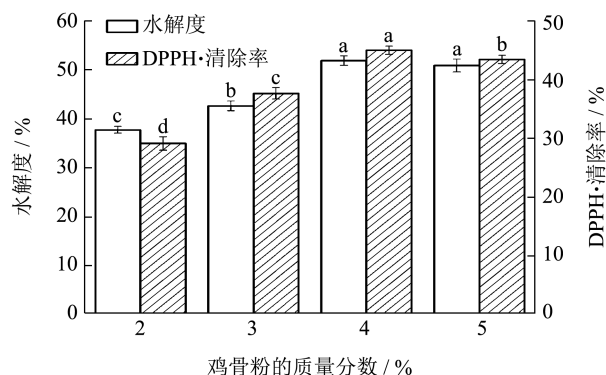


图1 添加鸡骨粉的质量分数对地衣芽孢杆菌发酵的影响

Fig.1 Effect of the addition amount of chicken bone meal on the fermentation of *Bacillus licheniformis*

注:不同字母表示同一指标差异显著($P < 0.05$)。下同。

如图1所示,当培养基中添加鸡骨粉的质量分数为4%,其蛋白水解度以及 DPPH·清除率最高,水解度为 51.89%,DPPH·清除率为 45.00%。随着鸡骨粉质量分数的增加,水解度以及 DPPH·清除率上升,而当添加鸡骨粉的质量分数在 5% 时,水解

度和 DPPH·清除率出现下降。分析原因,添加鸡骨粉的质量分数较低时,培养基的营养成分也相应的减少,不足以使地衣芽孢杆菌生长至理想状态和较高的代谢活动,限制对鸡骨粉的有效分解和抗氧化肽的生成;伴随着添加鸡骨粉的质量分数上升时,相应的营养成分也同步上升,使菌体可以充分的吸收营养成分并促进发酵产物的生成,其对应的水解度及 DPPH·清除率同步上升。鸡骨粉添加至某一阈值时,虽然营养成分十分充裕,但营养物质含量过高可能会抑制地衣芽孢杆菌的生长及其发酵过程,导致其水解度和抗氧化能力出现下降。

2.2.2 培养基初始pH值的优化

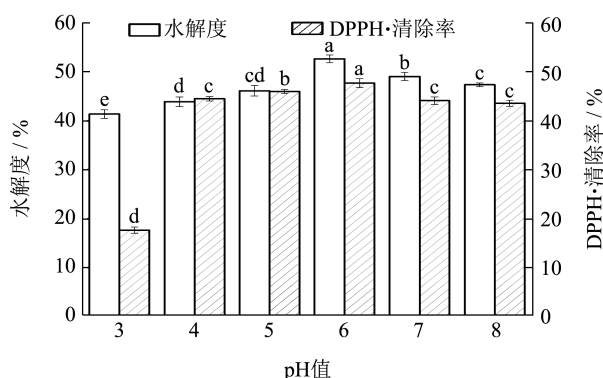


图2 培养基初始 pH 值对地衣芽孢杆菌发酵的影响

Fig.2 Effect of initial pH of medium on the fermentation of *Bacillus licheniformis*

从图2可以看出,当培养基的初始pH值不同时,水解度以及DPPH·清除率的结果也不同,初始pH值在6时发酵液的水解度及DPPH·清除率为最高值,水解度为52.64%,DPPH·清除率为47.68%。初始pH值过低或过高时,会影响酶的活性^[27],阻碍地衣芽孢杆菌的生长和发酵。pH值还决定着微生物细胞膜的电荷特性,关系到微生物对营养物质的吸收利用,导致不同的代谢过程。

2.2.3 菌种体积分数的优化

从图3可以看出,当接种地衣芽孢杆菌菌种体积分数3%时水解度最高为54.82%,4%时对应的DPPH·清除率是最高的为50.47%。分析原因可能是地衣芽孢杆菌的菌种体积分数太少,导致地衣芽孢杆菌生长总量较少,生长和发酵不充分,抗氧化物质的产生不足。而当菌种体积分数太多时,发酵前期快速代谢,提前进入衰亡期,以致后期抗氧化物质的生成变慢。综合考虑,选取菌种体积分数4%为最优接种量,既可以保证发酵过程中菌体保持一

定的生长速率和代谢能力,又可有效生成抗氧化肽,平衡水解度和抗氧化性能。

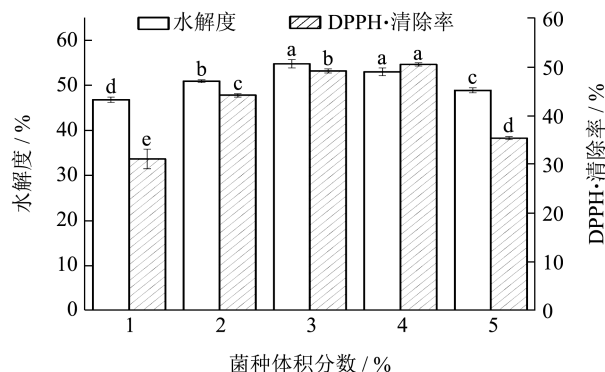


图3 菌种体积分数对地衣芽孢杆菌发酵的影响

Fig.3 Effect of the volume of bacterial strains on the fermentation of *Bacillus licheniformis*

2.2.4 装液量的优化

对于好氧微生物溶氧常是其发酵控制的主要因素之一,但氧是不易溶于水的气体,所以发酵液中氧的溶解度很低,因此在摇瓶发酵过程中采用振荡的方式强化供氧,此时摇瓶装液量就成为控制溶氧量的重要因素。装液量的结果如图4所示。

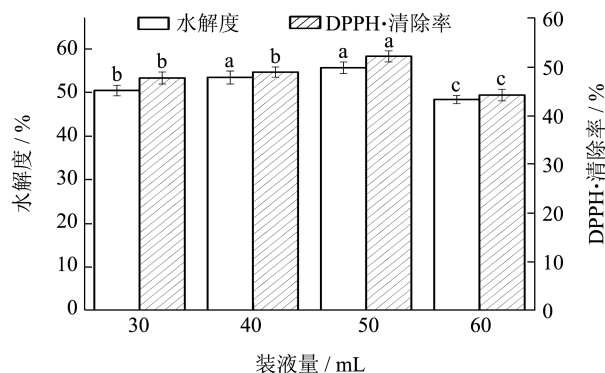


图4 装液量对地衣芽孢杆菌发酵的影响

Fig.4 Effect of loading volume on the fermentation of *Bacillus licheniformis*

在装液量较少和过多时,发酵液的水解度和DPPH·清除率都偏低,而在装液量为50 mL/250 mL时,发酵液的水解度和DPPH·清除率为最高水平,水解度为55.66%,DPPH·清除率为52.16%。分析原因可能是在摇瓶发酵过程中,装液量过少,伴随蒸发,会影响发酵液组分,而当装液量过多时,会影响发酵瓶中的通气条件,导致传氧及传质速率降低,氧的供应不足引发菌体异常的代谢路径,可能导致代谢转向其它化合物的合成^[28]。基于此,该文选择最优的装液量为50 mL/250 mL。

2.2.5 发酵时间的优化

发酵时间是影响发酵产品品质、产量和生产成本的因素之一。发酵时间过短会导致产量不足，质量不佳，而发酵时间过长则会增加生产成本，降低产量和品质。发酵时间对鸡骨抗氧化肽制备的影响结果见图 5。

如图 5 所示，随着发酵进程的推进，发酵液的 OD_{600 nm}、水解度、DPPH·清除率和酶活力均呈上升趋势。前期，菌体利用鸡骨粉中的营养成分迅速繁殖，发酵液的 OD_{600 nm} 增长，并不断产生蛋白酶，鸡骨蛋白水解为多肽，水解度和 DPPH·清除率随之增长。后期，地衣芽孢杆菌自溶^[29]，蛋白酶活性降低，水解度和 DPPH·清除率也不再增长。综合考虑，确定最佳发酵时间为 24 h，既可保证较高的水解活性，同时充分降解蛋白生成抗氧化肽。

综合上述结果，优化的发酵条件为：添加鸡骨粉的质量分数为 4%，培养基初始 pH 值为 6.0，菌种体积分数为 4%，装瓶量 50 mL/250 mL，发酵时间为 24 h；在此条件下，发酵液的 OD_{600 nm} 为 2.28，酶活力为 218.68 U/mL，鸡骨蛋白水解度为 56.29%，鸡骨抗氧化肽的 DPPH·清除率为 53.29%。马俊霞等^[30]优化的鹿骨胶原蛋白肽的最佳发酵工艺条件为发酵时间 34.5 h，料液比 1:26，接种量 12%，对 DPPH·清除率为 55.84%。该研究所得鸡骨肽抗氧化性高于已有相似研究，说明地衣芽孢杆菌发酵制备的鸡骨肽抗氧化性优良，具有一定的研究价值，并通过响应面进一步优化发酵条件。

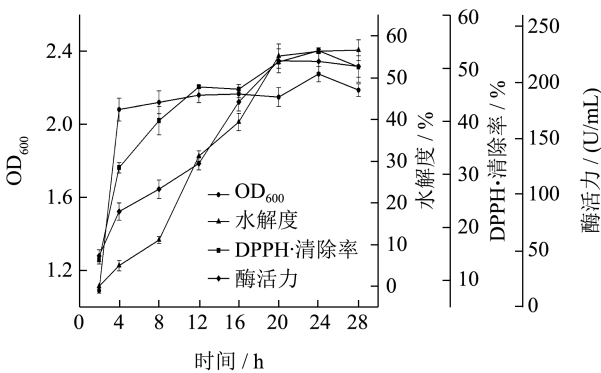


图 5 发酵时间对地衣芽孢杆菌发酵的影响
Fig.5 Effect of culture time on the fermentation of *Bacillus licheniformis*

2.3 响应面优化

2.3.1 Plackett-Burman试验

地衣芽孢杆菌发酵鸡骨粉产抗氧化肽的 Plackett-Burman 试验设计与结果分析见表 3 和表 4。

由表 4 可知，回归模型 $P<0.05$ ，说明该模型显著。5 个影响因素中，鸡骨粉的质量分数 (A)、培养基初始 pH 值 (B) 和菌种体积分数 (C) 的影响显著，而装液量 (D) 和培养时间 (E) 不显著。 $R^2=0.8316$ ，回归方程具有较高的拟合程度，证明了模型的可靠性。

2.3.2 Box-Behken试验设计结果

鸡骨粉发酵条件响应面设计与结果分析如表 5 所示。

表 3 Plackett-Burman试验设计与结果
Table 3 Plackett-Burman experimental design and results

组别	添加鸡骨粉的质量分数/%	培养基初始 pH 值	菌种体积分数/%	装液量/(mL/250 mL)	培养时间/h	DPPH·清除率/%	DPPH·清除率预测值/%
1	5	7	3	50	28	29.02	30.65
2	3	7	5	30	28	30.02	35.82
3	5	5	5	50	20	28.52	28.86
4	3	7	3	50	28	50.66	43.49
5	3	5	5	30	28	47.93	44.12
6	3	5	3	50	20	50.24	51.12
7	5	5	3	30	28	36.19	40.70
8	5	7	3	30	20	30.65	31.73
9	5	7	5	30	20	28.94	22.31
10	3	7	5	50	20	28.14	33.40
11	5	5	5	50	28	30.47	29.53
12	3	5	3	30	20	53.83	52.87

表 4 Plackett-Burman试验DPPH·清除率方差分析
Table 4 Analysis of variance of DPPH· scavenging rate in Plackett-Burman test

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	978.06	5	195.61	5.93	0.025 6	*
A	494.45	1	494.45	14.98	0.008 3	
B	206.33	1	206.33	6.25	0.046 5	
C	266.74	1	266.74	8.08	0.029 5	
D	9.22	1	9.22	0.279 3	0.616 1	
E	1.32	1	1.32	0.04	0.848 1	
残差	198.03	6	33.00			
总差	1 176.09	11				

注：* 差异显著（ $P<0.05$ ）。

表 5 响应面试验设计与结果
Table 5 Response surface test design and results

组别	添加鸡骨粉的质量分数/%	培养基初始 pH 值	菌种体积分数 /%	DPPH·清除率 /%	DPPH·清除率预测值 /%
1	3	5	4	49.30	48.54
2	5	5	4	52.47	51.42
3	3	7	4	48.76	49.80
4	5	7	4	50.21	50.96
5	3	6	3	44.27	43.72
6	5	6	3	45.00	44.74
7	3	6	5	41.96	42.22
8	5	6	5	44.69	45.24
9	4	5	3	40.04	41.34
10	4	7	3	43.33	42.83
11	4	5	5	41.44	41.94
12	4	7	5	42.55	41.25
13	4	6	4	56.42	57.00
14	4	6	4	57.00	57.00
15	4	6	4	57.45	57.00
16	4	6	4	56.14	57.00
17	4	6	4	57.98	57.00

2.3.3 回归模型建立与方差分析

由表 5 中响应面实验设计数据获得 DPPH·清除率（Y）与添加鸡骨粉的质量分数（A）、培养基初始 pH 值（B）和菌种体积分数（C）的二次多项回归方程：

$$Y=57+1.01A+0.200\ 2B-0.248\ 1C-0.432AB+0.497\ 8AC-0.544\ 4BC-2.34A^2-4.48B^2-10.68C^2。$$

由二次多项回归方程计算出 DPPH·清除率预测

值与实际值相近，由表 6 可知，回归模型 $P<0.01$ ，说明该模型极显著；交互作用均为不显著，失拟项 $P=0.084\ 2>0.05$ ，失拟项不显著， $R^2=0.984\ 4$ ，回归方程拟合度好，证明了模型的可靠性^[31]。

表 6 回归方程方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	642.07	9	71.34	48.93	< 0.000 1	**
A	8.16	1	8.16	5.6	0.049 9	
B	0.32	1	0.32	0.219 9	0.653 4	
C	0.49	1	0.49	0.337 7	0.579 4	
AB	0.75	1	0.75	0.512	0.497 5	
AC	0.99	1	0.99	0.679 7	0.436 9	
BC	1.19	1	1.19	0.813	0.397 2	
A ²	22.96	1	22.96	15.75	0.005 4	
B ²	84.32	1	84.32	57.83	0.000 1	
C ²	480.29	1	480.29	329.39	< 0.000 1	
残差	10.21	7	1.46			
失拟项	7.96	3	2.65	4.71	0.084 2	不显著
纯误差	2.25	4	0.56			
总差	652.28	16				

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

2.3.4 响应面交互作用分析结果

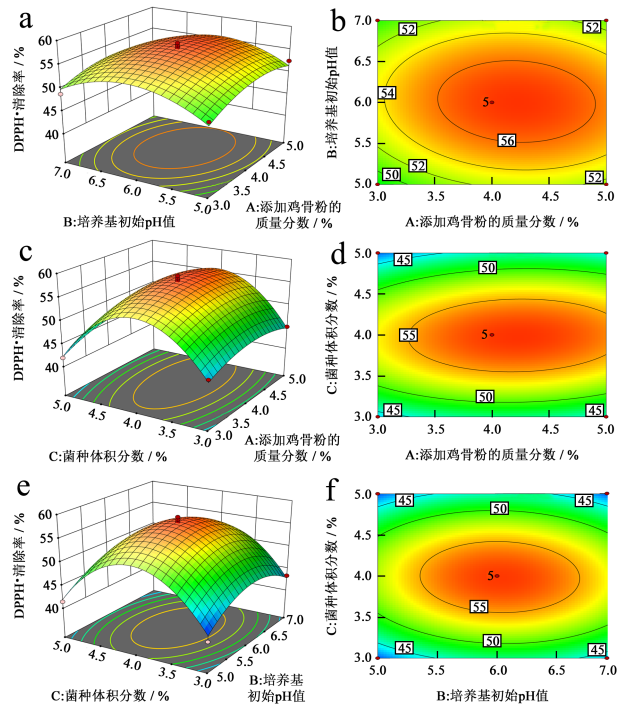


图 6 响应面三维结构图和等高线图

Fig.6 Response surface 3D structure diagram and contour diagram

通过利用 Deign-Expert 软件进行处理,对试验数据进行二次多元回归拟合分析,得到各因素间交互作用的响应曲面三维结构图和等高线图。

图 6 通过曲面图和投影的综合分析,可以观察到各个因素间的等高线都是椭圆形状,这表明这些因素之间存在很强的相关性。

2.3.5 培养条件优化及验证

利用 Design-Expert 11.1.2.0 软件,优化最佳发酵条件:添加鸡骨粉的质量分数为 4.21%,培养基初始 pH 值为 6.02、菌种体积分数为 3.98%,根据实际操作的可性,矫正鸡骨粉添加量为 4.2%,培养基初始 pH 值为 6,菌种体积分数为 4%。在此条件下,鸡骨抗氧化肽的 DPPH·清除率为 57.11%,比优化前 DPPH·清除率提高了 3.82%。

经过验证试验,鸡骨抗氧化肽的 DPPH·清除率为 56.98%,与预期预测值基本一致,而 Zhu 等^[32]用酶解处理鸡骨残渣得到的产物, DPPH·清除率高达 81.57%,试验结果表明,鸡骨残渣的水解产物在一定程度上具有生物抗氧化活性,也进一步说明优化的地衣芽孢杆菌发酵制备鸡骨抗氧化肽的工艺参数是准确可靠的。

2.4 Tricine-SDS-PAGE 分析

Tricine-SDS-PAGE 是一种用于分离小分子量蛋白质或肽的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,通过 Tricine-SDS-PAGE 观察地衣芽孢杆菌发酵前后鸡骨蛋白液,结果如图 7 所示。

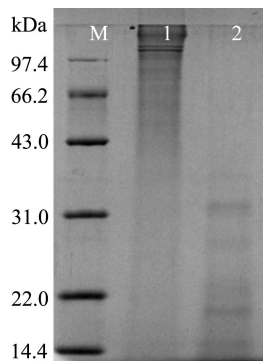


图 7 发酵前后鸡骨蛋白溶液的 Tricine-SDS-PAGE

Fig.7 Tricine-SDS-PAGE analysis of chicken bone proteins before and after fermentation

注:泳道 M:低分子量蛋白质 Marker;泳道 1:发酵前的鸡骨蛋白液;泳道 2:发酵后的鸡骨发酵液。

图 7 可知,发酵前的鸡骨蛋白液在电泳进样口处有明显的聚集,大部分蛋白分子量在 97.4 kDa 之

上,推测未发酵的鸡骨蛋白是较大分子的蛋白;而发酵后的鸡骨蛋白,分子量在 31.0、22.0 和 14.4 kDa 左右,并且在 14.4 kDa 之下有明显的条带,推测发酵后的鸡骨蛋白已经被水解成多肽,证明了地衣芽孢杆菌发酵法制备抗氧化肽是可行的。

2.5 鸡骨抗氧化肽的膜分离及抗氧化性研究

采用最佳发酵条件,在 5 L 发酵罐中进行鸡骨抗氧化肽的发酵生产,然后对发酵液进行有机膜分离,分离出六个不同截留分子量范围的组分,具体包括:组分 I (分子量>100 kDa)、II (分子量 10~100 kDa)、III (分子量 8~10 kDa)、IV (分子量 5~8 kDa)、V (分子量 3~5 kDa) 和 VI (分子量 1~3 kDa),但组分 I 和 II 的分子量大,不属于多肽分子量范围,因此,检测其余 4 个组分的 DPPH·清除率、超氧阴离子清除率和 ABTS⁺清除率,结果如图 8 所示。

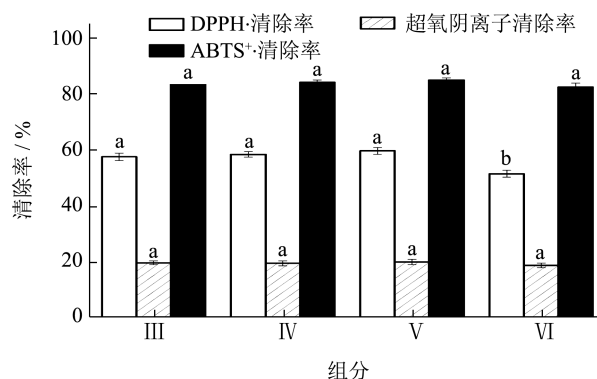


图 8 不同组分抗氧化肽的抗氧化性能测定

Fig.8 Determination of antioxidant properties of different components

注:不同字母表示同一指标差异显著 ($P < 0.05$)。

从图 8 可知,4 个组分的 DPPH·清除率均超过了 50%,其中组分 V 的最高,为 59.08%;超氧阴离子清除率都在 19% 以上;4 个组分的 ABTS⁺清除率均高于 80%,而组分 V 的最高,达到了 85%;综上所述,组分 V,即分子量 3~5 kDa 的鸡骨抗氧化肽抗氧化活性最好。

Xu 等^[33]综述了抗氧化肽的活性评价、作用机制及构效关系等方面的研究进展,为新型抗氧化剂、营养保健品和化妆品的开发奠定了理论基础。该研究所制备的鸡骨抗氧化肽具备显著的抗氧化能力,可保护机体抵御氧化应激损伤,既可独立开发为产品,亦可作为功能性添加剂应用于食品或饲料中提升其营养价值,拓宽了功能性产品的研发范围,为

消费者提供更多元化、个性化的健康产品的选择。

3 结论

该文研究了地衣芽孢杆菌发酵制备抗氧化肽的工艺,包括发酵条件的优化、抗氧化肽的分离纯化以及抗氧化活性评价等,旨在为鸡骨资源的高效利用及新型抗氧化剂的开发提供技术支持。利用地衣芽孢杆菌进行鸡骨发酵时,无需额外添加其他物质,仅加水配制成鸡骨粉培养基。通过单因素与响应面法优化地衣芽孢杆菌发酵制备鸡骨抗氧化肽的工艺,确定最佳工艺参数为:添加鸡骨粉的质量分数为4.2%,发酵pH值为6.0,菌种体积分数为4%,装液量为50 mL/250 mL,时间为24 h,在此条件下,水解度为56.29%,DPPH·清除率为57.11%。鸡骨粉经过发酵后,发酵液经过有机膜分离与干燥制备得到鸡骨抗氧化肽,其中组分V抗氧化活性最强,DPPH·清除率为59.08%,超氧阴离子清除率在20.21%以上,ABTS⁺清除率为85%。综上所述,分离得到的鸡骨肽具备很好的抗氧化性。

参考文献

- [1] 汪少芸,杨倩,蔡茜茜,等.食源性功能肽的研究进展[J].食品与机械,2020,36(6):1-10.
- [2] XIANG ZEDONG, XUE QING, GAO PENG, et al. Antioxidant peptides from edible aquatic animals: Preparation method, mechanism of action, and structure-activity relationships [J]. Food Chemistry, 2022, 404(Pt B): 134701.
- [3] YANG QIAN, CAI XIXI, YAN ANA, et al. A specific antioxidant peptide: Its properties in controlling oxidation and possible action mechanism [J]. Food Chemistry, 2020, 327: 126984.
- [4] TAO LIANG, GU FAN, LIU YAN, et al. Preparation of antioxidant peptides from *Moringa oleifera* leaves and their protection against oxidative damage in HepG2 cells [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1062671.
- [5] FERNANDO I P S, PARK S Y, Han E J, et al. Isolation of an antioxidant peptide from krill protein hydrolysates as a novel agent with potential hepatoprotective effects [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 67: 103889.
- [6] 张丰文,董超,周丽亚,等.抗氧化多肽来源、提取及检测的研究进展[J].生物技术,2021,31(1):96-103,64.
- [7] 张怡,吴辰,黄亚州,等.2023年全球肉鸡生产、贸易及产业经济发展研究[J].中国畜牧杂志,2024,60(3):328-334.
- [8] 韩春元,姚建楠,陈娅,等.我国肉鸡加工业研究[J].畜禽业,2022,33(8):45-47.
- [9] 韩春元,姚建楠,张琳璐,等.我国肉鸡加工业的现状与发展建议[J].家禽科学,2022,7:64-70.
- [10] CONG N B, CHAN K T, NAM N K H, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of collagen from yellowfin tuna skin (*Thunnus albacares*) by response surface methodology and properties of hydrolyzed collagen [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(4): 15319.
- [11] 马莹,田玉潭,刘军,等.混合菌种发酵鸡骨泥香精基料工艺条件优化[J].中国调味品,2023,48(12):103-110.
- [12] 曹昌伟.淘汰蛋鸡鸡骨胶原蛋白特征及胶原肽抗小鼠皮肤老化机制的研究[D].雅安:四川农业大学,2022.
- [13] NIE X, XU D, ZHAO L, et al. Antioxidant activities of chicken bone peptide fractions and their Maillard reaction products: Effects of different molecular weight distributions [J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(sup1): S457-S466.
- [14] FAN HANZHI, ZHANG MIN, MUJUMDAR A S, et al. Effect of different drying methods combined with fermentation and enzymolysis on nutritional composition and flavor of chicken bone powder [J]. Drying Technology, 2021, 39(9): 1240-1250.
- [15] SARBANI B, H K M, HEON B D, et al. Probiotic mixture (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) a potential in-feed additive to improve broiler production efficiency, nutrient digestibility, caecal microflora, meat quality and to diminish hazardous odour emission [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2022, 107(4): 1065-1072.
- [16] 王颖,高翔,周君,等.以泔水为碳源的地衣芽孢杆菌发酵产蛋白酶条件优化[J].食品科学,2016,37(7):117-122.
- [17] TRIPATHI N, SAPRA A. Gram Staining [M]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023.
- [18] 安攀宇,肖岚,何佩芸,等.菌酶联合制备猪血抗氧化低聚肽[J].食品研究与开发,2018,39(19):162-169.
- [19] BORRAJO P, LÓPEZ-PEDROUSO M, FRANCO D, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of porcine liver hydrolysates using flavourzyme [J]. Applied Sciences, 2020, 10(11): 3950.
- [20] 陈振家,杨雅婧,陈琼玲,等.不同品种高粱醇溶蛋白理化性质的研究[J/OL].中国粮油学报,1-18[2025-01-07].
- [21] MARISSA K, RYAN W, JOHANNA H, et al. P22-030-23 establishing growth curve assays for bacterial glucosinolate metabolism: A study protocol [J]. Current Developments in Nutrition, 2023, 7: 101733.
- [22] NIKOLAEVA T I, BARSUK D A, MOLCHANOV M, et al. Comparative analysis of the degree of hydrolysis of biopolymers in hyaline cartilage homogenates in the presence of proteolytic enzymes [J]. Biophysics, 2024, 68(6): 1021-1027.

- [23] GB/T 39100-2020多肽抗氧化性测定DPPH和ABTS法[Z].北京:中国标准出版社,2020.
- [24] LI X C. Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(25): 6418-6424.
- [25] GB/T 23527.1-2023,酶制剂质量要求第1部分:蛋白酶制剂[S].
- [26] 周航先,陶明伟,魏杰,等.大豆低聚糖替代葡萄糖对生物絮团系统菌群结构的影响[J].水产学报,2024,48(11):142-156.
- [27] GOSWAMI R, VEERANKI V D, MISHRA V K. Optimization of process conditions and evaluation of pH & thermal stability of recombinant L-asparaginase II of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI 1043 in *E. coli* [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 22(C): 101377.
- [28] 韦革宏,史鹏.发酵工程(第二版)[M].北京.科学出版社: 2021.
- [29] REN K X, WANG Q, HU M K, et al. Research progress on the effect of autolysis to *Bacillus subtilis* fermentation bioprocess [J]. Fermentation, 2022, 8(12): 685.
- [30] 马俊霞,姜璎珊,张可,等.鹿骨胶原蛋白肽的制备工艺优化及其体外抗氧化活性[J].经济动物学报,2024,28(3): 239-248.
- [31] SUN C Z, SHAN Y W, TANG X, et al. Effects of enzymatic hydrolysis on physicochemical property and antioxidant activity of mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf protein [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(10): 5379-5390.
- [32] ZHU Y, ZHAO G M, LIU Y X, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of chicken bone protein for production of antioxidant peptides using nutrase [J]. Editorial Office of Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(12): 309-314.
- [33] XU B T, DONG Q, YU C X, et al. Advances in research on the activity evaluation, mechanism and structure-activity relationships of natural antioxidant peptides [J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2024, 13(4): 479.