

DOI: 10.20098/j.cnki.1001-5132.2022.1208

基于神经网络模型及遗传算法的贝莱斯芽孢杆菌 发酵沙丁鱼下脚料抗氧化活性的条件优化

曹亚玲¹, 吴祖芳^{1*}, 沈 颺², 翁佩芳¹, 章潇伟³

(1. 宁波大学 食品科学与工程学院, 浙江 宁波 315832; 2. 舟山海关综合技术服务中心, 浙江 舟山 316100;

3. 合肥工业大学 计算机与信息学院, 安徽 合肥 230009)

摘要: 微生物发酵技术是提升海洋鱼产品加工副产物价值的一种重要而有效的途径, 而作为沙丁鱼加工副产物的鱼头是一种优质蛋白质和生物活性物质的绝佳来源. 本文拟利用从传统鱼露中分离筛选的具有多种蛋白酶活性的贝莱斯芽孢杆菌 SW5 发酵沙丁鱼下脚料鱼头制备抗氧化活性物质, 采用人工神经网络与遗传算法(ANN-GA)相结合方法, 以 DPPH 自由基清除率和蛋白水解度(DH)为考察指标, 确定最佳发酵条件. 结果表明, 沙丁鱼下脚料抗氧化物质最佳发酵条件为发酵时间 42 h, 发酵温度 37 ℃, 接种量 3%, 并在此条件下通过实验验证 DPPH 自由基清除率为 91.26%. 研究结果可为 SW5 菌株在海洋蛋白质资源的有效利用及功能性海洋食品生产应用上提供数据参考.

关键词: 沙丁鱼; 贝莱斯芽孢杆菌; 发酵; 神经网络; 遗传算法; 抗氧化

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2024) 01-0013-07

远东拟沙丁鱼(*Sardinops sagax*)是一种分布广、资源量大的中上层远洋鱼类, 富含蛋白质等营养物质^[1-2]. 随着鱼类深加工比重的提高, 沙丁鱼头等副产品产量也在逐年增加, 这些加工副产物通常被直接丢弃而造成资源浪费, 但也可通过加工用于饲料、胶原蛋白和肥料等, 另外还可用于海洋源生物活性肽的制备^[3-7]. 微生物发酵是一种利用鱼类加工副产物的有效途径, 通过微生物发酵技术对富含蛋白质的副产品(如鱼头、鱼皮等)发酵可产生抗氧化肽等生物活性物质^[8]. Ruthu 等^[9]通过乳酸菌发酵鱼头获得抗氧化肽. Fang 等^[10]采用米曲霉对废弃大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)鱼皮进行高价值利用, 研究发酵液抗氧化活性, 并通过分离纯化达到提高抗氧化活性的目的.

本实验室前期从发酵鱼露中筛选出一株贝莱斯芽孢杆菌(编号为 SW5), 并研究表明此菌株在分

类上属于解淀粉芽孢杆菌植物亚种, 两者属同物异名, 而解淀粉芽孢杆菌属于食品用微生物菌种. 有研究表明贝莱斯芽孢杆菌具有良好的生物安全性和益生功能, 具有用于食品领域的潜力^[11-14]. 另有研究发现贝莱斯芽孢杆菌种可以产生高活力胞外蛋白酶, 能迅速水解鱼蛋白^[15]. 本团队前期利用贝莱斯芽孢杆菌 SW5 发酵鲢鱼制备鱼露, 属于可用作海洋蛋白质源发酵精深加工的优良微生物菌株^[15]. 众多研究通过基因工程手段也发现贝莱斯芽孢杆菌 SW5 蛋白酶和半乳糖苷酶具有较强的鱼蛋白质底物特异性^[16-20], 此外, 也有研究表明贝莱斯芽孢杆菌发酵液具有较强的抗氧化活性^[21].

神经网络结合遗传算法已被广泛用于解决多目标的优化问题, 有研究报道神经网络遗传算法比其他常见拟合方法(如响应面法)更准确^[22]. 尹乐斌等^[23]利用遗传算法-神经网络及响应面法优化

收稿日期: 2022-12-08.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省公益技术应用研究项目(LGG19C200002); 舟山市市级公益项目(2022C31050).

第一作者: 曹亚玲, 硕士研究生, 主要研究方向: 食品工程. E-mail: 2575287832@qq.com

*通信作者: 吴祖芳, 博士/教授, 主要研究方向: 食品生物技术研究. E-mail: wzfwf@163.com

龙牙百合总黄酮提取工艺. 薛宏坤等^[24]采用响应面法和神经网络-遗传算法模型两种方式对微波萃取蓝莓中花青素的工艺进行优化, 验证发现神经网络-遗传算法模型比响应面法具有更强的预测和优化能力.

本文以远东拟沙丁鱼鱼头为原料, 应用贝莱斯芽孢杆菌 SW5 进行发酵, 计算 DPPH 自由基清除率和水解度, 通过神经网络与遗传算法对发酵时间、发酵温度、接种量进行优化, 期望获得最佳发酵条件, 确保将沙丁鱼下脚料(鱼头)有效地转化为具有生物活性的蛋白质水解物, 通过工业水平生产的抗氧化活性物质为鱼类加工提供增值产品, 有助于实现资源的可持续性发展.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种: 贝莱斯芽孢杆菌 SW5, 宁波大学食品生物技术实验室分离筛选并保藏; 沙丁鱼头, 宁波佳必可食品有限公司提供, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用; 胰蛋白胨、酵母粉, 赛默飞世尔科技公司; 琼脂、十二烷基硫酸钠, 阿达玛斯试剂有限公司; 丝氨酸标准品、双缩脲试剂盒、二硫苏糖醇, 北京索莱宝生物科技有限公司; 邻苯二甲醛、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼, 上海麦克林生化科技有限公司.

LB 培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 蛋白胨、NaCl、酵母粉、琼脂于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌 15 min.

Spectramax 190 全波长酶标仪, 美国美谷分子仪器有限公司; ALC210.3 电子天平, 赛多利斯公司; 5804R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; QYC-2012C 恒温培养摇床、HWS-280 恒温培养箱、LDZX-40B 高压蒸汽灭菌锅, 宁波江南仪器厂; HH-4 恒温水浴锅, 江苏国华电器有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化

将贝莱斯芽孢杆菌 SW5 从试管斜面处接种至 $400\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LB 培养基中(培养基已经 15 min 的 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌, 并冷却至室温), 接着在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床中培养 12 h, 备用.

1.2.2 原料预处理

将冷冻沙丁鱼鱼头流水解冻, 沥干水分后去除鱼鳃部分. 将鱼头用绞肉机打成鱼糜, 并将鱼糜

与蒸馏水按 $1\text{ g}:1.25\text{ mL}$ 在 100 mL 瓶中混合, 每瓶 20 g 鱼糜, 放入 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中, 待鱼糜样品中心温度达到 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后保温 30 min, 以达到巴氏消毒的目的, 最后冷却至室温, 备用.

1.2.3 沙丁鱼头营养成分测定

蛋白质含量根据凯式定氮法测定; 脂肪含量根据索式抽提法测定; 水分含量根据直接干燥法测定; 灰分含量根据灼烧称重法测定.

1.2.4 单因素实验设计

沙丁鱼头作为蛋白底物, 采用贝莱斯芽孢杆菌 SW5 作为发酵菌株, $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床发酵. 制备种子液, 取一定比例种子液离心, $8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min, 得到菌体细胞, 用 0.9% 生理盐水洗涤 3 次, 用生理盐水重悬至菌液浓度约为 $10^7\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$. 接种于 20 g 鱼肉中, 鱼肉与水添加量为 $1:1.25$. 选取接种量(1% 、 3% 、 5% 、 7% 、 9%)、发酵温度($27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $47\text{ }^{\circ}\text{C}$)、发酵时间(6 h 、 12 h 、 18 h 、 24 h 、 30 h 、 36 h 、 42 h 、 48 h)等作为单因素实验的影响因素, 以水解度和 DPPH 自由基清除率为指标, 研究各条件对发酵产物抗氧化活性的影响. 当研究某个变量时, 其他因素的条件为发酵温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 发酵时间 36 h , 接种量 5% .

1.2.5 Box-Behnken 实验设计

根据 Box-Behnken 实验设计, 以水解物 DPPH 自由基清除率($\%$)为响应值, 选取发酵温度($32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$)、发酵时间(30 h 、 36 h 、 42 h)、接种量(1% 、 3% 、 5%)为自变量, 具体见表 1.

表 1 Box-Behnken 实验设计因素与水平

水平	因素		
	A(发酵温度)/ $^{\circ}\text{C}$	B(发酵时间)/h	C(接种量)/ $\%$
-1	32	30	1
0	37	36	3
1	42	42	5

1.2.6 神经网络遗传算法优化发酵条件

(1)神经网络(Artificial Neural Network, ANN)的建立. 神经网络结构设置为三层结构: 输入层、隐含层和输出层, 隐含层神经元个数设计利用 MATLAB 2016b 软件进行模型训练实验, 选取不同隐含层神经元个数进行拟合比较并最终确定. 本文将发酵温度($32\sim 42\text{ }^{\circ}\text{C}$)、发酵时间($30\sim 42\text{ h}$)、接种量($1\%\sim 5\%$) 3 个因素和 DPPH 自由基清除率响

应变变量分别作为输入和输出变量. 采用均方误差(MSE)和回归相关系数(R)对模型性能进行评价, 以最小 MSE 和最大 R 作为所建神经网络模型的最佳训练性能指标. 将所建模型与遗传算法相结合, 对输入参数进行优化, 以获得最大输出值(图 1).

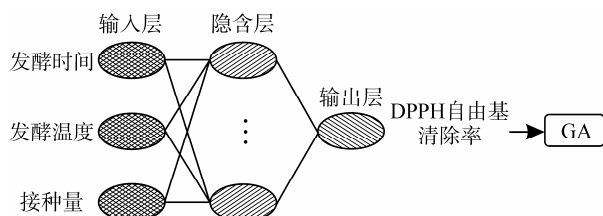


图1 神经网络基本结构

(2)遗传算法(Genetic Algorithm, GA)优化. 利用个体种群探索和解析空间内所有区域, 个体种群随机生成, 用适应度函数评估个体适应度. 建立神经网络模型后, 利用 MATLAB 工具箱中的遗传算法算出神经网络模型最优解, 包括从初始种群中筛选出高级个体, 进行交叉、变异和选择, 反复循环, 直到输出满足最佳优化标准的响应值和对响应参数(图 2). 种群大小、交叉概率、变异概率和最大进化代数分别设置为 20、0.8、0.05 和 100.

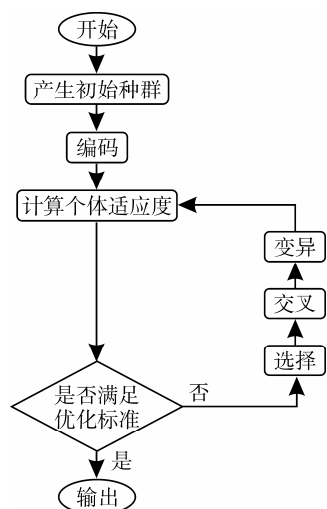


图2 遗传算法流程

1.2.7 指标测定方法

(1)水解度测定. 水解度测定参考 OPA 法^[25], 该分析方法用游离氨基与邻苯二甲醛反应来量化蛋白质水解物可溶部分中游离氨基相对于原材料总蛋白质的比例. 将 400 μL 样品溶液添加到含 3 mL OPA 试剂的试管中, 混合 5 s, 静置 2 min, 用酶标仪在 340 nm 处读数. 标准组为丝氨酸, 空白组由去

离子水代替. 计算公式如下:

$$\text{NH}_{2,\text{serine}} = (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}) - (\text{OD}_{\text{standard}} - \text{OD}_{\text{blank}}) \times 0.9516 \times 0.1 \times 100 / X \times P \quad (1)$$

$$h = (\text{NH}_{2,\text{serine}} - \beta) / \alpha, \quad (2)$$

$$\text{DH} = h / h_{\text{total}} \times 100\%. \quad (3)$$

式中: X 为样品质量; P 为样品中的蛋白质含量; h 为丝氨酸氨基物质的量的函数; α 、 β 和 h_{total} 值分别为 1.00、0.40 和 8.6.

(2)DPPH 自由基清除率测定. 根据文献[26-27]稍作修改. 样品: 在离心管中加入 1.0 mL DPPH 溶液(0.1 mmol·L⁻¹), 再加入酶水解产物 1.0 mL, 摇动混合在 30.0 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境下反应 30 min, 于 515 nm 处测定其吸光值 A_s . 对照: 在离心管中加入 1.0 mL 乙醇及 1.0 mL DPPH 溶液, 摇动混合在 30 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境下反应 30 min, 于样品相同波长处测定其吸光值 A_0 . 空白: 在离心管中加入 1.0 mL 酶解产物和 1.0 mL 乙醇, 摇动混合在 30 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境下反应 30 min, 于样品相同波长处测定其吸光值 A_1 . 产物对 DPPH 清除能力(S)的计算公式如下:

$$S = (1 - (A_s - A_1) / A_0) \times 100\%, \quad (4)$$

式中: A_s 为样品对 DPPH 作用后的吸光度; A_1 为样品吸光度; A_0 为 DPPH 吸光度.

(3)统计分析. 采用 Origin 2017 软件进行单因素实验图的制作; 采用 Design-Expert 软件进行 Box-Behnken 实验设计; 采用 MATLAB 2016b 软件构建神经网络和 GA 模型. 所有数据均采用 3 次平行实验的平均值.

2 结果与分析

2.1 沙丁鱼头基本营养成分分析

沙丁鱼下脚料鱼头主要成分比例见表 2, 由表数据可见, 鱼头中水分含量最高, 达到 61.72%; 蛋白质含量丰富, 占总质量的 17.60%. 由此可见, 利用沙丁鱼的鱼头资源开发抗氧化活性物质(例如抗氧化肽)具有较好的原料基础.

表2 沙丁鱼下脚料鱼头基本营养成分 %

成分	营养成分净含量
蛋白质	17.60±0.26
脂肪	7.19±0.19
水分	61.72±0.07
灰分	12.05±0.71

2.2 单因素实验结果及分析

2.2.1 发酵温度对水解产物 DPPH 自由基清除率和水解度的影响

如图 3 所示, 在 27~37 ℃ 范围内, 随着温度的升高, 水解产物的抗氧化活性和水解度也随之增加. 原因是随着温度的升高, 发酵体系中活菌数不断增加, 菌株的生长和代谢活性增强, 且蛋白酶酶解速率增大, 鱼蛋白被不断利用, 从而产生较多具有抗氧化活性的多肽^[26]. 当反应温度达到 37 ℃ 时, 发酵液的 DPPH 自由基清除率和水解度达到最高 ($82.39\% \pm 2.39\%$ 和 $31.16\% \pm 1.82\%$), 说明该温度更有利于菌株利用鱼肉蛋白产生抗氧化肽. 而当反应温度继续升高时, 水解度和抗氧化活性显著降低, 可能是因为温度过高会抑制菌株生长, 不利于发酵情况下产生多肽^[9]. 因此, 确定最佳发酵温度为 37 ℃.

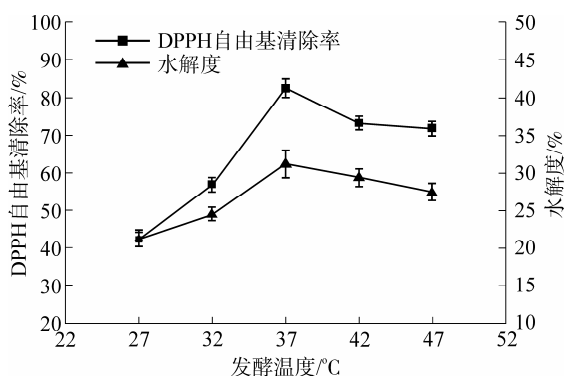


图 3 发酵温度对水解产物 DPPH 自由基清除率和水解度的影响

2.2.2 发酵时间对水解产物 DPPH 自由基清除率和水解度的影响

由图 4 可知, 在 6~30 h 范围内, 水解产物的抗

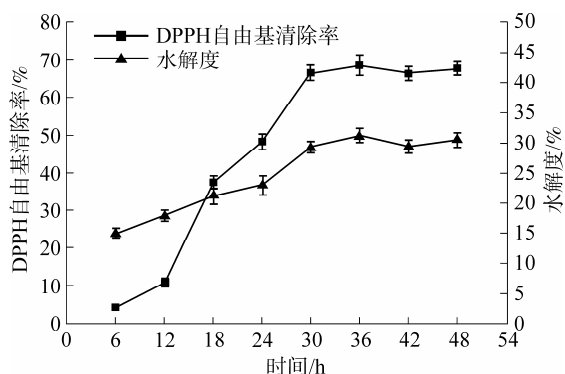


图 4 发酵时间对水解产物 DPPH 自由基清除率和水解度的影响

氧化活性和水解度随时间显著增加, 可能是贝莱斯芽孢杆菌 SW5 在此时间段处于对数生长期^[15], 菌株活性较强, 其生长对蛋白质的利用率提高, 同时产生具有抗氧化活性的肽段. 当在 36 h 时, 产物水解度和 DPPH 自由基清除率达到最高 ($68.82\% \pm 2.61\%$ 和 $31.33\% \pm 1.26\%$), 之后发酵液中抗氧化活性趋于平稳, 可能是因为菌株生长达到平稳期^[15]. 因此, 发酵时间 36 h 最合适.

2.2.3 接种量对水解产物 DPPH 自由基清除率和水解度的影响

由图 5 可知, 当接种量在 1%~3% 时, DPPH 自由基清除率随接种量的增加而提高, 原因可能是接种量较少时, 菌体生长缓慢, 此时密度较低, 鱼蛋白没有被完全利用. 在 3% 接种量下, 发酵液的 DPPH 自由基清除率和水解度最高 ($61.29\% \pm 1.58\%$ 和 $36.46\% \pm 1.09\%$). 当接种量 > 3% 时, DPPH 自由基清除率呈下降趋势, 可能是因为当接种量持续增加时, 菌体生长速度过快, 同时菌体因正常新陈代谢消耗的营养物质过多, 此时的底物难以满足微生物更多生长的需要, 导致代谢产物减少, 可能对产生的抗氧化肽进行分解利用, 降低抗氧化活性. 因此, 接种量 3% 最合适.

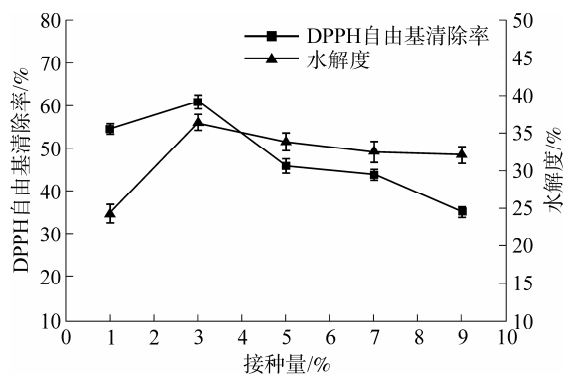


图 5 接种量对水解产物 DPPH 自由基清除率和水解度的影响

2.3 神经网络的建立

根据上文 1.2.5 节实验设计方案, 采用 Design-Expert 10.0 软件进行三因素三水平的 Box-Behnken 实验设计, 实验设计结果见表 3. 神经网络学习过程建立在可用数据集分为训练、验证和测试三部分基础上. 利用均方误差对神经网络进行评价, 均方误差值越小, 表明构建的神经网络模型预测实验数据的精确度越高^[22]. 神经网络学习及训练过程

表3 Box-Behnken 实验设计及结果

样本 编号	接种 量/%	发酵 温度/℃	发酵 时间/h	DPPH 自由基 清除率/%
1	3	37	36	86.84
2	1	42	36	82.96
3	3	37	36	92.26
4	3	32	42	93.43
5	1	32	36	93.95
6	3	32	30	95.00
7	1	37	30	84.03
8	3	42	42	83.87
9	3	37	36	90.65
10	1	37	42	83.81
11	5	32	36	84.73
12	3	37	30	91.94
13	3	42	30	89.25
14	5	37	42	86.02
15	5	42	36	84.95

如图6所示. 可见当神经网络通过3180次训练后, MSE最小化达到 10^{-5} , MSE值逐渐趋近于误差的最优值, 此时神经网络停止训练.

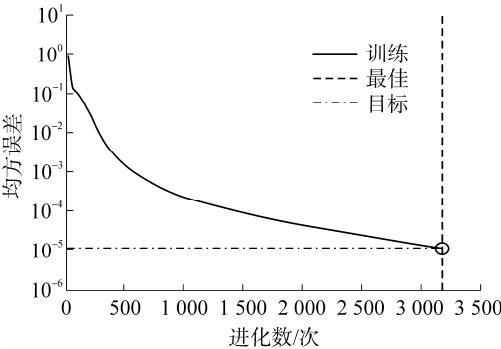


图6 神经网络学习及训练过程

当MSE接近于0, R 值接近于1时, 说明预测值和目标值密切相关. 如图7所示, 训练样本、验证样本、测试样本和全部样本的 R 值分别为1、0.99664、0.99840和0.96545, 均大于0.9, 表明经过训练的神经网络模型性能良好. 由于模型不存在欠拟合状态, 因此能很好地预测输入端的3个变量(发酵时间、发酵温度、接种量)与输出端(DPPH自由基清除率)之间的关系, 可为此后的遗传算法程序提供可靠的结果. 其中, 70%数据点用于训练, 15%数据点用于测试, 15%数据用于验证, 因此, 也为抗氧化肽的发酵条件优化提供了基础.

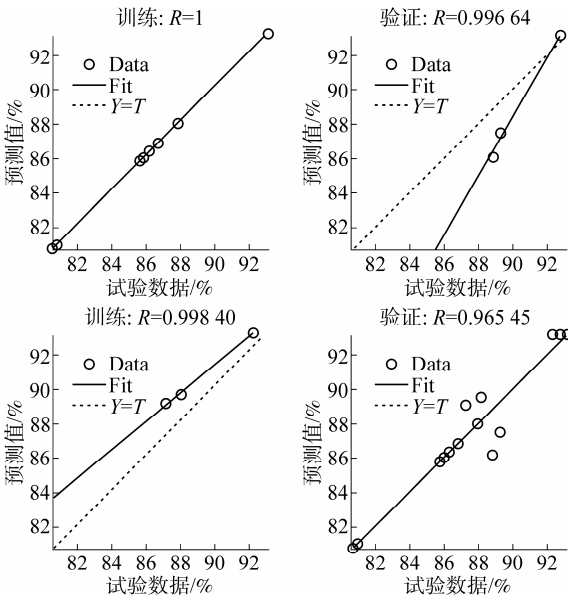


图7 人工神经网络拟合图

2.4 遗传算法寻优

在神经网络模型建立完成后, 利用遗传算法优化输入参数(发酵温度、发酵时间和接种量), 得到最大输出参数(DPPH自由基清除率), 其适应度曲线如图8所示. 每个算法大约在2~3 min的计算时间内完成, 并且需要60代左右才能达到父代和子代之间不再发生变化的条件. 从图8结果可见, 种群迭代进化51代后, 种群适应度达到最大值, 种群适应度总体呈现下降趋势, 之后趋于稳定. 通过MATLAB软件的GA工具箱程序显示, 输出值为93.28%, 对应参数值为发酵时间41.45 h, 发酵温度38.60℃, 接种量3.81%. 考虑到实际实验操作的便利性, 发酵时间可以调整为42 h, 而发酵温度调整仍为37℃, 接种量为3%.

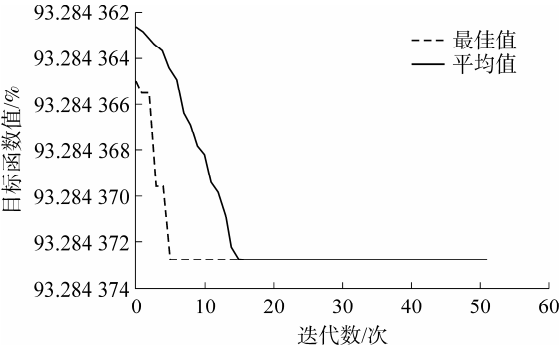


图8 迭代曲线

2.5 验证实验

为进一步确定最佳的发酵条件, 通过3组平行

实验来验证。最终结果表明,在此发酵条件下实际测得沙丁鱼下脚料发酵液 DPPH 自由基清除率为 91.26%,与预测值 93.28%相比,预测的相对误差仅为 2.17%。此结果也表明,利用神经网络遗传算法优化发酵条件的参数准确可靠,条件稳定,同时证明神经网络模型建立的合理性及实用价值。

3 结论

通过贝莱斯芽孢杆菌 SW5 发酵产物的 DPPH 自由基清除率评价远东拟沙丁鱼头发酵产物的抗氧化能力,实验结果表明了利用贝莱斯芽孢杆菌 SW5 发酵制备沙丁鱼抗氧化活性发酵液的可行性。基于实验数据建立的人工神经网络模型具有较高的 R 值和较低的 MSE 值,使预测值与实际值间有较好一致性,确保了模型的适当泛化。通过影响抗氧化活性物质产生发酵条件的单因素实验,再根据神经网络与遗传算法结合结果,得到最佳发酵条件为发酵温度 37℃,发酵时间 42 h,接种量 3%。经验证在此条件下,沙丁鱼鱼头发酵液 DPPH 自由基清除率达到 91.26%,说明贝莱斯芽孢杆菌 SW5 发酵沙丁鱼下脚料产物具有较高的抗氧化活性。

参考文献:

- [1] 袁学文,王炎冰. 远东拟沙丁鱼低聚肽化学组成及其增强免疫力功能评价[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(4): 104-110.
- [2] GUEDES M, COSTA-PINTO A R, GONÇALVES V M F, et al. Sardine roe as a source of lipids to produce liposomes[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2020, 6(2):1017-1029.
- [3] SIEWE F B, KUDRE T G, NARAYAN B. Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction conditions of umami compounds from fish by-products using the combination of fractional factorial design and central composite design[J]. Food Chemistry, 2021, 334:127498.
- [4] VÁZQUEZ J A, MEDUÍÑA A, DURÁN A I, et al. Production of valuable compounds and bioactive metabolites from by-products of fish discards using chemical processing, enzymatic hydrolysis, and bacterial fermentation[J]. Marine Drugs, 2019, 17(3):139-153.
- [5] MO W Y, MAN Y B, WONG M H. Use of food waste, fish waste and food processing waste for China's aquaculture industry: needs and challenge[J]. Science of the Total Environment, 2018, 613/614:635-643.
- [6] DE MEDEIROS E F, VIEIRA B M, DE PEREIRA C M P, et al. Production of biodiesel using oil obtained from fish processing residue by conventional methods assisted by ultrasonic waves: heating and stirring[J]. Renewable Energy, 2019, 143:1357-1365.
- [7] DEROUICHE B M H, GUADIX E M, GUADIX A, et al. Valorisation of tuna viscera by endogenous enzymatic treatment[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(4):1100-1108.
- [8] KANG N J, JIN H S, LEE S E, et al. New approaches towards the discovery and evaluation of bioactive peptides from natural resources[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2020, 50(1):72-103.
- [9] RUTHU, MURTHY P S, RAI A K, et al. Fermentative recovery of lipids and proteins from freshwater fish head waste with reference to antimicrobial and antioxidant properties of protein hydrolysate[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(9):1884-1892.
- [10] FANG B H, SUN J N, DONG P, et al. Conversion of turbot skin wastes into valuable functional substances with an eco-friendly fermentation technology[J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 156:367-377.
- [11] DUNLAP C A, KIM S J, KWON S W, et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3):1212-1217.
- [12] 郭艺伟, 吕兰, 刘依山, 等. 贝莱斯芽孢杆菌发酵蚯蚓浆对猪抗氧化功能和免疫功能的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2022, 41(3):13-16.
- [13] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 等. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11):3634-3649.
- [14] 黄芷珊, 任红, 黄炜健, 等. 糯米酒源贝莱斯芽孢杆菌的体外安全性评价[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(18): 95-100.
- [15] 杨海宁, 宁豫昌, 王昌毓, 等. 接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株对发酵鳃鱼鱼露品质的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(10):2013-2022.
- [16] YANG H N, LIU Y, NING Y C, et al. Characterization of an intracellular alkaline serine protease from *Bacillus velezensis* SW5 with fibrinolytic activity[J]. Current Microbiology, 2020, 77(8):1610-1621.

- [17] NING Y C, YANG H N, LI N, et al. Cloning, expression and characterization of a novel fibrinolytic serine metalloproteinase from *Bacillus velezensis* SW5[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2021, 57(1):48-56.
- [18] NING Y C, YANG H N, WENG P F, et al. Zymogram analysis and identification of the extracellular proteases from *Bacillus velezensis* SW5[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2021, 57(1):S27-S37.
- [19] LIU Y, WU Z F, ZENG X X, et al. A novel cold-adapted phospho-beta-galactosidase from *Bacillus velezensis* and its potential application for lactose hydrolysis in milk[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166:760-770.
- [20] LI N, LIU Y, WANG C Y, et al. Overexpression and characterization of a novel GH4 galactosidase with β -galactosidase activity from *Bacillus velezensis* SW5[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(9):9465-9477.
- [21] 刘宏, 骆坤, 江正强, 等. 贝莱斯芽孢杆菌固体发酵瓜尔豆粕的活性成分、溶栓及抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(13):126-132.
- [22] KUMAR A, PATHAK A K, GURIA C. NPK-10:26:26 complex fertilizer assisted optimal cultivation of *Dunaliella tertiolecta* using response surface methodology and genetic algorithm[J]. Bioresource Technology, 2015, 194:117-129.
- [23] 尹乐斌, 邓鹏, 何平, 等. 基于遗传算法-神经网络及响应面法优化龙牙百合总黄酮提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(7):105-113.
- [24] 薛宏坤, 刘成海, 刘钊, 等. 响应面法和遗传算法-神经网络模型优化微波萃取蓝莓中花青素工艺[J]. 食品科学, 2018, 39(16):280-288.
- [25] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5):642-646.
- [26] WANG L Y, MA M T, YU Z P, et al. Preparation and identification of antioxidant peptides from cottonseed proteins[J]. Food Chemistry, 2021, 352:129399.
- [27] LIU J, WANG C N, WANG Z Z, et al. The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides[J]. Food Chemistry, 2011, 126(1):261-269.

Optimization of antioxidant activity of sardine discards fermented by *Bacillus velezensis* based on neural network model and genetic algorithm

CAO Yaling¹, WU Zufang¹, SHEN Biao², WENG Peifang¹, ZHANG Xiaowei³

(1.College of Food Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2.Comprehensive Technical Service Center of Zhoushan Customs, Zhoushan 316100, China;

3.School of Computer Science and Information Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Microbial fermentation technology is an important and effective way to enhance the value of marine fish processing by-products. Fish head, a by-product of sardine processing, is an excellent source of high-quality protein and bioactive compounds. Antioxidant components were prepared from *Bacillus velezensis* SW5 fermented sardine discards and fish heads with various protease activities isolated and screened from traditional fish sauce. The combination of artificial neural network and genetic algorithm (ANN-GA) was used to optimize the fermentation condition of antioxidant peptides production. The free radical scavenging rate and the degree of proteolysis were used as the indicators to determine the optimal fermentation conditions. The results showed that the optimal fermentation conditions for antioxidant components from sardine discards were fermentation time of 42 h, fermentation temperature of 37 °C, and inoculum volume of 3%. Under these conditions, the DPPH free radical scavenging rate was 91.26% through the verification experiment. The research results can provide data reference for SW5 strain in effective utilization of marine protein resources and functional marine food production.

Key words: sardines; *Bacillus velezensis*; fermentation; neural network; genetic algorithm; antioxidative

(责任编辑 章践立)