

枯草芽孢杆菌发酵小米糠对其抗氧化肽含量与抗氧化活性的影响

郭利娜, 朱 玉, 刁明明, 陆兆新, 吕凤霞, 赵海珍*
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要:为提高小米糠的附加值, 本实验以多个枯草芽孢杆菌为起始菌株, 透明圈直径与菌落直径之比(HC值)为初筛指标, 通过酪蛋白平板培养法进行高产蛋白酶菌株的初步筛选。将初筛所获得菌株在小米糠基础培养基上进行发酵, 对其发酵上清液的总蛋白酶活力、多肽含量及总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)进行测定, 进一步筛选出最适菌株。用此菌株对小米糠进行发酵, 并对其最适发酵时间及上清液的抗氧化活性进行测定。结果表明: NattoD-3为最佳发酵菌株, 其产蛋白酶活力为90.22 IU/mL, 发酵小米糠72 h时所获得发酵上清液4种体外抗氧化活性相对最高, 分别为T-AOC值38.04 U/mL、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率75.37%、总还原力0.18及Fe²⁺螯合能力44.34%, 最终发酵上清液的多肽含量为4.28 mg/mL, 纤溶酶活力为522.64 IU/mL。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 发酵; 小米糠; 抗氧化肽

Effect of Fermentation by *Bacillus subtilis* on Antioxidant Peptide Content and Antioxidant Activity of Millet Bran

GUO Lina, ZHU Yu, DIAO Mingming, LU Zhaoxin, LÜ Fengxia, ZHAO Haizhen*
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to find the most suitable strain for the production of antioxidant peptides and plasmin from millet bran, initial screening of 27 *Bacillus subtilis* stains for the ratio of transparent circle diameter to bacterial colony diameter (HC value) was performed on casein agar plates and further screening of the selected strains based on total proteinase activity, peptide content and total antioxidant capacity (T-AOC) of fermentation supernatants was conducted using the basal medium containing millet bran. This study also investigated the optimal fermentation time for antioxidant activities of fermentation supernatants using the selected optimal strain. Results showed that NattoD-3 was found to be the optimal strain for the fermentation of millet bran, yielding a protease activity of 90.22 IU/mL. The optimal fermentation time was 72 h, and the resulting T-AOC, DPPH radical scavenging activity, reducing power and Fe²⁺ chelating ability of millet bran fermentation supernatant were 38.04 U/mL, 75.37%, 0.18 and 44.34%, respectively. The peptide content in the fermentation supernatant reached 4.28 mg/mL with plasmin activity of 522.64 IU/mL.

Key words: *Bacillus subtilis*; fermentation; millet bran; antioxidant peptide

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)13-0196-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201513036

谷子是中国传统的谷物, 每年产量约450万t。小米糠占谷子总量的6%~8%, 每年将产生小米谷糠40万t左右, 是一种产量较大的可再生利用资源^[1-2]。研究显示, 小米糠蛋白含量和消化率均高于小米蛋白。小米糠蛋白中的8种必需氨基酸的氨基酸评分和化学评分(分值都大于1, 达到全价蛋白的标准, 且小米糠中的氨基酸组成更接近联合国粮食及农业组织/世界卫生组织(Food and Agriculture Organization/World Health Organization, FAO/WHO))

联合食品标准计划推荐的标准模式, 营养价值堪比牛奶和鸡蛋^[3]。

利用微生物对食物蛋白进行发酵水解提高其营养价值, 一直是食品领域的研究热点。许多微生物具有酶的抗氧化机制, 发酵后可将蛋白水解成多肽或氨基酸, 可提高其生物活性及其抗氧化特性^[4-5]。Chung等^[6]报道, 经*Bacillus subtilis* IMR-NK1发酵过的红豆制品呈现出显著的抗氧化活性。Zhu Yunping等^[7]使用*Bacillus subtilis* B₂发

收稿日期: 2014-08-08

基金项目: 中央高校基本科研业务费重点项目(kyz201118)

作者简介: 郭利娜(1990—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: 2012108005@njau.edu.cn

*通信作者: 赵海珍(1975—), 女, 副教授, 博士, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: zhaohz@njau.edu.cn

酵豆腐渣蛋白,发现发酵产物中的多肽含量有了很大的提高,并且发酵产物的自由基清除活力和抗氧化活性比原来的豆腐渣蛋白有了显著的提高。祁红兵等^[8]利用微生物对米糠进行发酵,发现其上清液的抗氧化能力有显著提高。Amadou等^[9]利用乳酸菌发酵小米,并对其发酵物进行分析,发现分子质量为600 D左右的多肽的抗氧化能力较好。枯草芽孢杆菌是一种产蛋白酶、 α -淀粉酶活力较高的菌种,如果能用于小米糠发酵,将有利于小米糠资源的可再生利用,同时提高其附加价值。

本实验以多个枯草芽孢杆菌为出发菌株,以透明圈直径与菌落直径之比(HC值)为指标,初步筛选出产蛋白酶活力高的菌株。然后以多肽含量、蛋白酶活力及总抗氧化能力(total antioxidative capacity, T-AOC)为复筛指标,对初筛得到的菌株进行复筛,从而获得对小米糠发酵产蛋白酶活力、多肽含量及T-AOC较高的菌株。国内外至今尚未有关于使用*Bacillus subtilis*对小米糠进行液态发酵并研究其多肽和抗氧化活性变化的报道。本研究是目前深度开发利用小米糠蛋白的一个新的发展方向,对于提高小米糠的利用价值具有一定的理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料、菌株与培养基

小米糠 山西沁水县,蛋白质、脂肪、淀粉、水分、灰分、纤维素、多酚、植酸含量分别为10.02%、6.15%、10.02%、9.11%、6.71%、54.16%、0.89%、2.04%。

27株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)由南京农业大学酶工程实验室筛选并保存。

NA培养基:牛肉浸膏3.0 g/L、蛋白胨10.0 g/L、NaCl 5.0 g/L、琼脂18.0 g/L、pH 7.0。斜面培养基:蛋白胨10 g/L、牛肉膏5 g/L、NaCl 5 g/L、琼脂15 g/L。酪蛋白平板:蛋白胨1%、牛肉膏0.5%、NaCl 0.5%, pH 7.0~7.2,脱脂奶粉1.5%。基础培养基:脱脂小米糠6 g、葡萄糖0.1 g、NaCl 0.5 g、蒸馏水100 mL置于250 mL的三角瓶,自然pH值,115℃条件下灭菌20 min。

Gly-Gly-Tyr-Arg、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、菲洛嗪 美国Sigma公司;T-AOC 南京建成科技有限公司;培养基成分均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

AY120电子天平、UV-2450紫外-可见分光光度计日本Shimadzu公司;SW-CJ-1FD型单人单面净化工作台苏州净化设备有限公司;Anke DL-5-B离心机 上海安亭科学仪器厂;HYG-G型三层摇床 太仓实验设备厂。

1.3 方法

1.3.1 菌株发酵培养

将安瓿管中的菌种接入装有100 mL NA培养基的三角瓶中,棉塞封口,置于空气摇床中进行扩大培养,在37℃、180 r/min条件下培养24 h,使菌种转接活化。

1.3.2 菌种初筛

分批取活化好的菌株进行酪蛋白平板涂布,在37℃恒温培养箱内培养24 h。通过测量透明圈直径和菌落直径,计算HC值(透明圈直径与菌落直径之比)。选出HC值较高的菌株进行复筛。接种至斜面培养基上保存,数据测3次取平均值。

1.3.3 发酵培养

将初筛得到的菌种在NA培养基中进行活化,然后接入基础培养基,置于空气摇床中,在180 r/min、30℃条件下恒温培养48 h,进行液体发酵,结束后取发酵液进行处理分析。

1.3.4 发酵上清液制备

发酵培养到48 h后,将各菌株发酵液在100℃条件下灭菌10 min,于4 000 r/min离心20 min,取上清液,用0.45 μ m滤膜过滤,滤过液即为发酵上清液。

1.3.5 发酵液蛋白酶活力测定

不同菌株接入基础培养基,在180 r/min、30℃条件下培养48 h,离心取上清液。上清液中酶活力的测定以2%酪蛋白为底物,采用Folin-酚法进行测定^[10]。酶活力单位定义为40℃条件下,pH值为7.5,以每分钟1 mL酶溶液水解酪蛋白产生1 μ g酪氨酸为一个酶活力单位(IU)。

酶活力标准曲线绘制:取质量浓度为0、10、20、30、40、50 μ g/mL的酪氨酸标准溶液各1.00 mL,各加入0.4 mol/L碳酸钠溶液5.00 mL,Folin-酚试剂使用液1.00 mL,然后置于(40 $\pm$ 2)℃水浴中显色20 min,取出,用分光光度计于680 nm波长处分别测定其吸光度(A)值。以吸光度 $A_{680\text{ nm}}$ 为纵坐标,酪氨酸的质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得到标准曲线方程为 $y=0.0118x$ ($R^2=0.9991$)。

1.3.6 小米糠发酵上清液中多肽含量的测定

取发酵上清液3 mL,加入3 mL 10 g/100 mL三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)水溶液,于漩涡混合仪上混合均匀,静置30 min,5 000 r/min离心20 min,取1 mL上述溶液置于试管中,加入双缩脲试剂4 mL,于漩涡混合仪上混合均匀,静置30 min,取上清液于540 nm波长处测定 $A_{540\text{ nm}}$ 值,与标准曲线对照得出样品溶液中的多肽质量浓度,计算出发酵上清液中的多肽含量^[11]。

多肽标准曲线绘制:取不同体积的Gly-Gly-Tyr-Arg标准溶液其单位为mg/mL,按照上述方法测定吸光度,以吸光度为纵坐标,多肽质量浓度为横坐标绘制标准曲线,得到回归方程为 $y=0.0459x+0.0080$ ($R^2=0.9999$)。

1.3.7 总抗氧化活力测定

根据文献[12]采用总抗氧化活性试剂盒对小米糠发酵上清液的总抗氧化活力进行测定, 平行测定3次。抗氧化物质能将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 而 Fe^{2+} 能使菲啉类物质形成稳固的络合物, 在520 nm波长处通过比色测出其抗氧化能力的高低。总抗氧化活力定义为在37 °C条件下, 每分钟每毫升抗氧化物质使反应体系的 $A_{520\text{ nm}}$ 值每增加0.01, 为一个总抗氧化活力单位(U)。

$$X = \frac{A_1 - A_0}{0.01 \times 30} \times \frac{V}{V_0} \times n \quad (1)$$

式中: X 为总抗氧化活力/(U/mL); A_1 为测定样的 $A_{520\text{ nm}}$ 值; A_0 为对照样的 $A_{520\text{ nm}}$ 值; V 为反应液总体积/mL; V_0 为取样量/mL; n 为稀释倍数。

1.3.8 DPPH自由基清除能力测定

参考Saiga等[13]的方法。样品组是小米糠发酵上清液用蒸馏水稀释6倍后, 与等体积的0.2 mmol/L DPPH溶液(用95%的乙醇溶解)混合; 对照组是稀释6倍后的发酵液与95%乙醇等体积混合; 空白组是95%乙醇与等体积的0.2 mmol/L DPPH溶液(用95%的乙醇溶解)混合。各组混合物摇匀, 在遮光和室温条件下反应30 min, 在517 nm波长处测定 $A_{517\text{ nm}}$ 值。小米糠发酵上清液对DPPH自由基清除能力计算公式如下。

$$X/\% = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_b - A_c}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: X 为小米糠发酵上清液的DPPH自由基清除率/%; A_s 是稀释后发酵液的 $A_{517\text{ nm}}$ 值; A_c 是对照组的 $A_{517\text{ nm}}$ 值; A_b 是空白组的 $A_{517\text{ nm}}$ 值。

1.3.9 Fe^{2+} 螯合能力测定

参考文献[14]方法并进行一定的改进。3 mL发酵上清液和50 μL 2 mmol/L FeCl_2 溶液混合, 加入750 μL 的蒸馏水, 再加入200 μL 5 mmol/L的菲洛嗉溶液。充分混合后, 在室温下反应10 min, 之后在562 nm波长处测定 $A_{562\text{ nm}}$ 值。空白组是以3 mL蒸馏水代替发酵上清液与上述反应液混合, 以蒸馏水调零。发酵上清液 Fe^{2+} 螯合能力的计算公式如下。

$$X/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: X 为发酵上清液的 Fe^{2+} 螯合能力/%; A_0 为空白组 $A_{562\text{ nm}}$ 值; A_1 为发酵上清液 $A_{562\text{ nm}}$ 值。

1.3.10 发酵上清液总还原能力的测定

参照Kaur等[15]的方法。将2 mL的发酵上清液和5 mL磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 6.6)混合, 然后加入5 mL 1%铁氰化钾溶液, 混合物在50 °C保温20 min。加入5 mL 10 g/100 mL TCA溶液, 混匀, 3 000 r/min离心10 min。取2 mL上清液和1 mL蒸馏水混合, 再加入

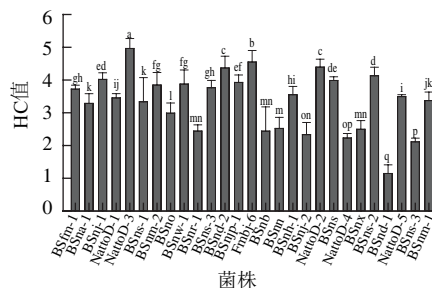
0.5 mL 0.1 g/100 mL FeCl_3 溶液, 在700 nm波长处测定 $A_{700\text{ nm}}$ 值, 吸光度越高说明样品的还原能力越强。

1.3.11 纤溶酶活力测定

利用所筛选菌株对小米糠进行液态发酵后, 5 000 r/min离心25 min, 取上清液, 测定纤溶酶活力。纤溶酶的活力测定采用琼脂糖-纤维平板法[16]。将10 μL 样品液点样在琼脂糖纤维平板表面, 置于37 °C培养箱中保温18 h, 用游标卡尺测定溶解圈的直径, 根据标准曲线计算小米糠发酵上清液中纤溶酶的活力。

2 结果与分析

2.1 菌株初筛



小写字母不同表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下同。

图1 不同菌株产蛋白水解透明圈HC值

Fig.1 HC values of protein hydrolysis transparent circles produced with different strains

由于枯草芽孢杆菌能够分泌蛋白酶, 在酪蛋白平板上可产生透明的蛋白水解圈, 可通过HC值初步确定菌株产蛋白酶活力的强弱, 从而获得目的菌株。根据图1中各菌株之间HC值的差异显著性分析, 选取HC值较大的10种菌株进行下一步复筛实验, 分别为NattoD-3、fmbj-6、BSns、BSnd-2、NattoD-2、BSnj-1、BSnpj-1、BSnw-1、BSnm-2和BSns-3, 其水解圈HC值达到4.3左右。

2.2 菌株复筛

2.2.1 不同菌株在基础培养基上的发酵酶活力

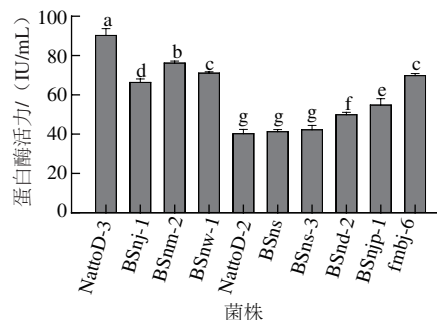


图2 不同菌株发酵上清液中蛋白酶活力

Fig.2 Protease activity of fermentation supernatant with different strains

枯草芽孢杆菌具有产蛋白酶和淀粉酶能力^[17],而蛋白酶可以水解蛋白产生具有活性的短肽物质或游离氨基酸。因此,蛋白酶活力可作为复筛的一种指标。由图2可知,NattoD-3在以上发酵菌种中产蛋白酶活力最高,与其他菌株相比差异显著($P<0.05$),酶活力达到90.22 IU/mL。纳豆芽孢杆菌本身可产纳豆激酶,是蛋白酶一种,这可能是此菌株蛋白酶活高的主要原因^[18]。

2.2.2 不同菌株发酵产T-AOC能力及多肽含量比较

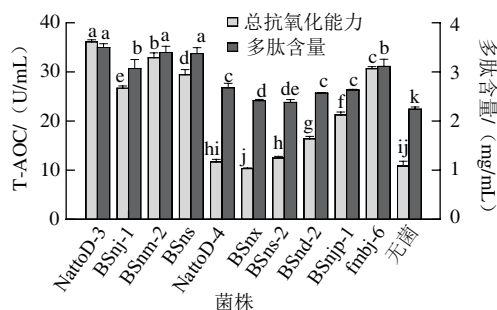


图3 不同菌株发酵上清液中的T-AOC值和肽含量

Fig.3 T-AOC values and polypeptide contents of fermentation products with different strains

由图3可知,NattoD-3菌株发酵上清液的T-AOC值及多肽含量显著高于其他9株菌株的及无菌基础培养基($P<0.05$),其中NattoD-3发酵上清液的T-AOC值为36.13 U/mL,多肽含量为3.50 mg/mL。说明利用NattoD-3发酵的方式来提高小米谷糠中的总抗氧化活力及多肽是有意义的。所以选用此菌株进行下一步研究。

2.2.3 NattoD-3发酵产蛋白酶活力、T-AOC及多肽含量之间的关系

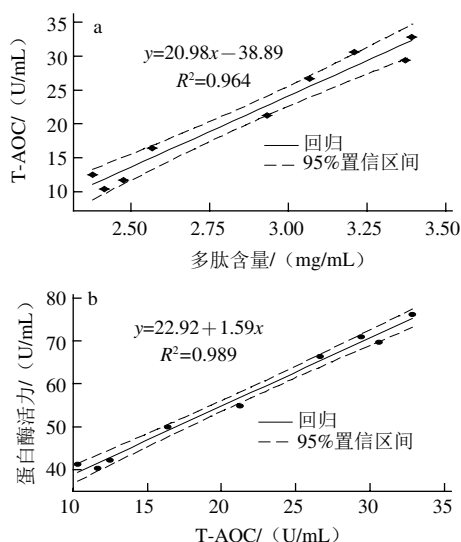


图4 T-AOC值与多肽含量拟合图(a)和蛋白酶活力与T-AOC值拟合图(b)

Fig.4 Fitting curves of T-AOC value against polypeptide content (a) and protease activity against T-AOC value (b)

在复筛的过程中,测定发酵上清液中的蛋白酶活力、多肽含量以及T-AOC值,通过线性拟合分析3个指数之间的关系。由图4可知,多肽含量与T-AOC成显著线性相关($R^2=0.964$),相关系数为0.982,成正相关($P<0.05$);蛋白酶活力与T-AOC也成显著线性相关($R^2=0.989$),相关系数为0.995,成正相关($P<0.05$)。综合分析说明,蛋白酶活力、多肽含量和T-AOC之间密切相关。

2.3 NattoD-3发酵小米糠产上清液4种体外抗氧化指标评价及发酵时间的确定

2.3.1 不同发酵时间发酵上清液T-AOC能力及多肽含量的变化

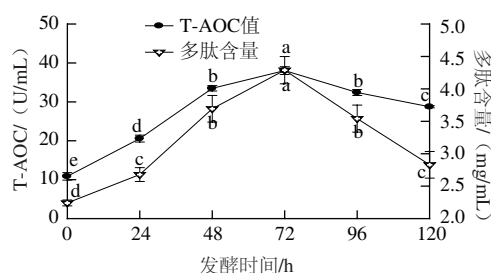


图5 不同发酵时间下发酵上清液T-AOC值及多肽含量

Fig.5 T-AOC values and polypeptide contents of fermentation supernatants with different fermentation time

由图5可知,随着发酵时间的延长,多肽含量和总还原能力不断增高,在72 h达到最大值,与其他发酵时间下上清液的多肽含量和T-AOC相比,差异显著($P<0.05$),其值分别是4.28 mg/mL和38.04 U/mL,之后呈现下降趋势。原因可能是随着发酵时间的延长,菌株分泌蛋白酶的量不断增加,使大的蛋白质水解成有活性的多肽物,但在72 h后一些有活性的多肽继续被酶水解成游离氨基酸^[19],使多肽含量下降,同时T-AOC值也呈下降趋势。

2.3.2 不同发酵时间发酵上清液DPPH自由基清除能力的变化

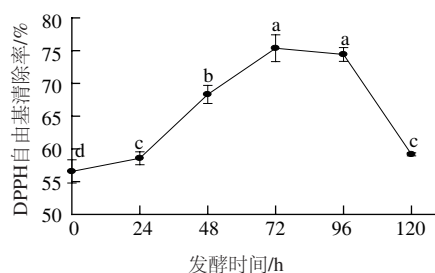


图6 不同发酵时间下发酵上清液DPPH自由基的清除能力

Fig.6 DPPH radical scavenging capacity of fermentation supernatants at different fermentation times

由图6可知,发酵上清液对DPPH自由基的清除能力随着发酵时间的延长呈现上升的趋势,当发酵时间达到

72 h时, 小米糠发酵上清液对DPPH自由基的清除能力为75.37%, 达到最高值, 之后开始下降。DPPH自由基的清除能力降低的原因可能是多肽类物质包含电子供体和能使自由基链式反应终止的氨基酸如Cys、Met、Trp、Tyr和Phe暴露于反应环境中。如含有含硫氨基酸(Cys和Met)残基的多肽具有亲核作用; 侧链基团有Trp、Tyr和Phe的多肽具有供氢能力^[20]。发酵时间过长使有活性的多肽物质被水解, 所以发酵时间过长或者过短都会降低发酵产物的供氢和供电子能力, 影响发酵产物对DPPH自由基的清除效果, 进而使发酵上清液的抗氧化活性呈现较低状态^[21]。

2.3.3 不同发酵时间发酵上清液总还原能力的变化

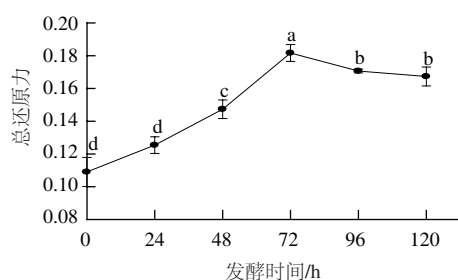


图7 不同发酵时间下发酵上清液总还原力

Fig.7 Reducing power of fermentation supernatants at different fermentation times

研究发现生物活性物质的抗氧化性能与它们的还原能力有着直接的关系。还原力的分析通常被用来评价天然抗氧化物提供氢原子或者提供电子的能力^[22]。如图7所示, 随着发酵时间的延长, 发酵上清液的总还原力先上升后下降, 且在72 h后达到最高(0.18), 说明发酵上清液是一种较好的电子供体, 通过自身的氧化使氧化物质得到还原, 且与DPPH自由基的清除能力趋势相符。

2.3.4 不同发酵时间下发酵上清液Fe²⁺的螯合能力变化

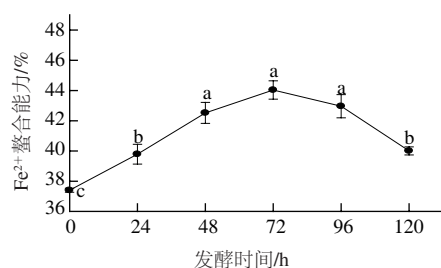


图8 不同发酵时间下发酵上清液Fe²⁺的螯合力

Fig.8 Fe²⁺ chelating capacity of fermentation supernatanta at different fermentation times

由图8可知, 在0~120 h范围内, 发酵上清液对Fe²⁺的螯合能力随着时间的增加呈现上升趋势, 72 h达到最高(44.34%), 之后随着时间的延长呈下降趋势。可能由于随着发酵时间的增加, 一些大的蛋白被酶水解, 使一

些酸性和碱性氨基酸暴露, 其在侧链部位的羧基与氨基能与Fe²⁺螯合。Saiga等^[13]报道酸性和碱性氨基酸对Fe²⁺和Cu²⁺的螯合能力有重要作用。酸性氨基酸(Glu和Asp)和碱性氨基酸(Lys和Arg)大量暴露于环境中对Fe²⁺的螯合能力增加有重要作用。Chen等^[23]在研究中分离到含组氨酸残基的抗氧化活性肽, 并指出其抗氧化活性与肽链中组氨酸残基中的咪唑基螯合金属离子的能力有关。

2.3.5 筛选到的纳豆芽孢杆菌的纤溶酶活力

纳豆芽孢杆菌是可食用菌, 此菌种在发酵过程中高产纤溶酶, 有溶血栓等作用^[24]。由于筛选到的高产蛋白酶菌株是一种纳豆菌NattoD-3, 应具有产纤溶酶活性。因此, 本研究中对所筛选菌株发酵小米糠上清液中的纤溶酶活力进行测定。根据抗氧化实验结果, 最佳发酵时间为72 h, 此时发酵上清液中的纤溶酶活力为522.64 IU/mL, 与李妍等^[24]报道的利用纳豆芽孢杆菌产纤溶酶的酶活力(511 IU/mL)相当。

3 结论

以多个枯草芽孢杆菌为出发菌株, 酪蛋白平板蛋白酶圈(HC值)为初筛指标, 筛选出10种具有较高产蛋白酶活力的菌株; 以T-AOC、蛋白酶活力及多肽含量为复筛指标, 在小米糠基础培养基上筛选出一种高产蛋白酶活力的菌株NattoD-3; 利用NattoD-3对小米糠基础培养基进行发酵, 对其发酵上清液的4种体外抗氧化能力随发酵时间的变化进行测定, 发现最佳发酵时间为72 h, 此时小米糠发酵上清液的T-AOC值、DPPH自由基清除率、总还原力和Fe²⁺螯合能力分别为38.04 U/mL、75.37%、0.18和44.34%, 多肽含量为4.28 mg/mL。纤溶酶活力测定发现发酵上清液中具有较高的纤溶酶活力(522.64 IU/mL)。此研究结果表明, 利用本实验中所筛选的菌株对小米糠进行发酵, 不仅可获得具有抗氧化活性的多肽, 还可以获得具有溶血栓作用的纤溶酶, 这对于提高小米糠的附加值具有重要的理论和实际应用价值。

参考文献:

- [1] DEVITTORI C, GUMY D, KUSY A, et al. Supercritical fluid extraction of oil from millet bran[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, 77(6): 573-579.
- [2] 恩和, 庞之洪, 熊本海. 粟谷糠类饲料成分及营养价值比较分析[J]. 中国饲料, 2008, 18(2): 39-41.
- [3] 许洁. 小米糠谷糠蛋白的提取及其保健功能的研究[D]. 太原: 山西大学, 2012.
- [4] MARCZAK E D, USUI H, FUJITA H, et al. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed[J]. Peptides, 2003, 24(6): 791-798.
- [5] CUMBY N, ZHONG Ying, NACZK M, et al. Anti-oxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 144-148.
- [6] CHUNG Y C, CHANG C T, CHAO W W, et al. Antioxidative

- activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(8): 2454-2458.
- [7] ZHU Yunping, FAN Junfeng, CHENG Yongqiang, et al. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B₂[J]. Food Control, 2008, 19(7): 654-661.
- [8] 祁红兵, 陈均, 何佳, 等. 纳豆芽孢杆菌发酵米糠上清液的抗氧化功能研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 293-297.
- [9] AMADOU I, LE Guowei, AMZA T, et al. Purification and characterization of foxtail millet-derived peptides with antioxidant and antimicrobial activities[J]. Food Research International, 2013, 51(1): 422-428.
- [10] QB/T 1803—1993 工业酶制剂通用试验方法[S].
- [11] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.
- [12] NIU Liya, JIANG Shaotong, PAN Lijun. Preparation and evaluation of antioxidant activities of peptides obtained from defatted wheat germ by fermentation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2013, 50(1): 53-61.
- [13] SAIGA A, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(12): 3661-3667.
- [14] DINIS T C, MADEIRA V M, ALMERIDA L M. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavenges[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1994, 315(1): 161-169.
- [15] KAUR R, ARORA S, SINGH B. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(16): 7692-7698.
- [16] 吕凤霞, 陆兆新, 别小妹, 等. *Bacillus subtilis* C-DES36纤溶酶发酵条件的优化研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(12): 175-178.
- [17] WONNOP V, SOOTTAWAT B, WANCHERN P, et al. Accelerated proteolysis of soy proteins during fermentation of Thua-nao inoculated with *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29: 349-366.
- [18] 潘进权. 纳豆芽孢杆菌发酵产蛋白酶工艺优化[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(9): 33-37.
- [19] 余勃, 陆兆新. 发酵豆粕生产大豆多肽的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 189-192.
- [20] ZHU Lijuan, CHEN Jie, TANG Xueyan, et al. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of *in vitro* digests of alcalase-treated zein hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(8): 2714-2721.
- [21] 何荣海, 刘磊, 蒋边, 等. 枯草芽孢杆菌液态发酵菜籽粕制备抗氧化肽[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12): 12-19.
- [22] THANA P, MACHMUDAH S, GOTO M, et al. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 3110-3115.
- [23] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(3): 574-578.
- [24] 李妍, 吴庆红, 陈义伦, 等. 一株纳豆芽孢杆菌的产酶条件优化[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 179-183.