

李捧, 刘晓兰. 乳酸菌发酵对米糠蛋白抗氧化活性和溶解性的影响 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(7): 207–216. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050317

LI Peng, LIU Xiaolan. Effects of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Antioxidant Activity and Solubility of Rice Bran Protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(7): 207–216. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050317

· 工艺技术 ·

乳酸菌发酵对米糠蛋白抗氧化活性和溶解性的影响

李 捧¹, 刘晓兰^{1,2,*}

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006;
2. 黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘 要: 为了改善米糠蛋白的水溶性差的缺点, 使其具有的生物活性能够充分表现出来, 扩大其在食品等行业的应用。本文以米糠蛋白粉为原料, 先用蛋白酶水解米糠蛋白, 然后用乳酸菌发酵米糠蛋白水解物制备具有较高抗氧化活性的产物。结果表明, 最佳酶水解条件为碱性蛋白酶加酶量 700 U/g、底物浓度 13% (w/v, 按蛋白基计)、水解时间 3 h、水解 pH 8.5、水解温度 60 °C; 最佳发酵条件为植物乳杆菌 13110 接种量 2% (v/v, 接种液菌体浓度 10^8 CFU/mL)、发酵培养基初始 pH 5.5、发酵温度 31 °C、发酵时间 36 h。与米糠蛋白的酶水解液相比, 经乳酸菌发酵后, 发酵液 DPPH 自由基清除率由 36.12% 升高至 57.42% (样品蛋白浓度 1 mg/mL), ABTS⁺ 自由基清除率由 76.27% 升高至 90.35% (样品蛋白浓度 0.5 mg/mL), 小于 1.0 kDa 分子量的肽组分由 0.67% 提高至 6.84%。在 pH 为 7 时, 未经酶解和发酵的米糠蛋白溶解性仅为 13.43%, 酶解和发酵后其溶解性分别为 72.12% 和 85.38%。综上所述, 酶菌协同发酵可有效提高米糠蛋白的抗氧化活性和溶解性, 为米糠蛋白作为功能食品基料的应用提供技术支持。

关键词: 米糠蛋白, 米糠肽, 乳酸菌, 发酵, 抗氧化活性

中图分类号: TS210.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2025)07-0207-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050317

本文网刊:



Effects of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Antioxidant Activity and Solubility of Rice Bran Protein

LI Peng¹, LIU Xiaolan^{1,2,*}

(1. College of Food and Bioengineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

2. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, Qiqihar 161006, China)

Abstract: In order to improve the poor water solubility of rice bran protein, fully demonstrate its biological activity, and expand its application in industries such as food, this article used rice bran protein powder as a raw material, first hydrolyzing rice bran protein with protease, and then fermented the rice bran protein hydrolysate with lactic acid bacteria to prepare products with high antioxidant activity. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis conditions were alcalase addition of 700 U/g, substrate concentration of 13% (w/v, calculated by protein), hydrolysis time of 3 h, hydrolysis pH of 8.5, and hydrolysis temperature of 60 °C. The optimal fermentation condition was 2% (v/v, inoculation dose of 10^8 CFU/mL) of *Lactobacillus plantarum* 13110, initial pH of fermentation medium 5.5, fermentation temperature of 31 °C, and fermentation time of 36 h. Compared with the enzymatic hydrolysate of rice bran protein, after fermentation by *Lactobacillus plantarum* 13110, the DPPH free radical scavenging rate of the fermentation broth increased from 36.12% to

收稿日期: 2024-05-27

基金项目: 十四五国家重点研发计划任务 (2021YFD2100904); 黑龙江省“双一流”建设学科协同创新成果建设项目 (LJGXCG2023-104); 中央引导地方科技发展专项 (ZY23QY06)。

作者简介: 李捧 (1997-), 男, 硕士, 研究方向: 食品科学, E-mail: 3142664418@qq.com。

* 通信作者: 刘晓兰 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: liuxiaolan001@126.com。

57.42% (sample protein concentration of 1 mg/mL), the ABTS⁺ free radical scavenging rate increased from 76.27% to 90.35% (sample protein concentration of 0.5 mg/mL), and the peptide components with molecular weight less than 1.0 kDa increased from 0.67% to 6.84%. The solubility of rice bran protein was only 13.43% at pH7, while its solubility after enzymatic hydrolysis and fermentation was 72.12% and 85.38%, respectively. In summary, the synergistic fermentation of enzymes and bacteria can effectively improve the antioxidant activity and solubility of rice bran protein, providing technical support for the application of rice bran protein as a functional food substrate.

Key words: rice bran protein; rice bran peptide; lactic acid bacteria; fermentation; antioxidant activity

米糠是稻谷加工过程中的主要副产物,其主要由碎米、米胚还有稻米皮层等成分组成。米糠中蛋白质含量约占米糠的 15%~17%,主要包括清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白^[1]。与其他谷物蛋白相比,米糠蛋白是一种更为优质的植物蛋白,具有氨基酸组成合理、低致敏性和价格低廉的特点^[2],同时,在其一级结构中存在抗氧化、降血压、降血糖等生理活性功能序列^[3-7]。但是,米糠蛋白含二硫键多,二硫键相互作用导致米糠蛋白的聚集性强、水溶性差,使得米糠蛋白在食品工业的应用受到限制,因此,采用有效的策略破坏米糠蛋白的结构,是释放其生物活性,以及提高其在食品工业利用率的有效途径。

目前,获得米糠蛋白活性肽的方法主要包括蛋白酶水解法、微生物发酵法和菌酶协同水解法三种。蛋白酶水解是利用蛋白酶催化水解时,米糠蛋白会被水解成不同链长的小分子多肽,其溶解性得到提高,部分活性序列被释放。周梅等^[8]利用碱性蛋白酶水解米糠蛋白,制备具有抗氧化活性的水解物,其 DPPH 清除率为 71.77%(样品浓度 9.6 mg/mL)。微生物发酵是利用微生物生长繁殖和代谢过程中分泌的蛋白酶水解蛋白,获得蛋白活性肽,魏明等^[9]利用米曲霉发酵米糠制备米糠多肽,发现米糠多肽浓度为 2.5 mg/mL 时 DPPH 的清除率达到 69.8%。菌酶协同水解可以使多肽中大分子物质降解得更为彻底,进而获得更多且易吸收的小分子多肽,降低多肽的生产成本提高其利用率^[10]。且采用菌酶协同水解米糠蛋白制备具有高抗氧化活性米糠蛋白水解物还未见相关报道。

因此,本文以米糠蛋白粉为原料,先采用蛋白酶对其进行水解,然后用植物乳杆菌发酵米糠蛋白水解液,以 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率为指标,研究酶水解和发酵条件,分析水解物和发酵物的分子量分布、氨基酸组成以及溶解性,为米糠蛋白在食品工业的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

米糠蛋白粉(蛋白质含量 86%) 陕西帕尼尔生物科技有限公司;碱性蛋白酶(24000 U/g)、中性蛋白酶(21000 U/g)、复合蛋白酶(37000 U/g)、风味蛋白酶(21000 U/g)、蛋白酶 N(47000 U/g) 丹麦诺维信生物技术科技有限公司;植物乳杆菌 13110 保藏于国家普通微生物菌种保藏中心 CGMCC No.24693;

植物乳杆菌 09002、植物乳杆菌 02002、副干酪乳杆菌、保加利亚乳杆菌 保藏于齐齐哈尔大学食品与生物工程学院;DPPH 北京博奥拓达科技有限公司;ABTS BBI 生命科学有限公司。

BA124S 电子天平 赛多利斯科学仪器有限责任公司;ZNCL-GS 磁力加热搅拌器 荣华仪器制造有限公司;PC/PLC-LD-53 冷冻干燥机 美国 MILLROCK;TD 离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;PB-10 pH 计 上海精密科学仪器有限公司;EnSpire 多功能酶标仪 珀金埃尔默股份有限公司;ZQLY-180S 立式全温振荡培养、L-8900 全自动氨基酸分析仪 日本日立公司;RF5301PC 荧光分光光度计 日本岛津公司;AKTA avant 智能蛋白质纯化色谱仪 GE 生命科学有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 米糠蛋白酶解最适蛋白酶的筛选 选用碱性蛋白酶(pH8.5、60 ℃)、中性蛋白酶(pH7.0、45 ℃)、复合蛋白酶(pH7.0、55 ℃)、风味蛋白酶(pH7.0、50 ℃)和蛋白酶 N(pH7.0、50℃),按照每种酶的最适酶解 pH 和温度进行酶解,酶解时间为 2 h。酶解结束后,100 ℃ 灭酶 15 min,4000 r/min 离心 15 min,取上清液冷冻干燥,备用。以米糠蛋白水解物的 ABTS⁺ 自由基清除率、DPPH 自由基清除率、蛋白回收率、可溶性蛋白含量和水解度为指标,筛选出米糠蛋白用最适宜的蛋白酶。

1.2.2 米糠蛋白的酶解 采用实验室前期研究方法制备具有较高抗氧化活性的米糠蛋白水解物。称取一定量的米糠蛋白粉,在碱性蛋白酶加酶量 700 U/g、底物浓度 13%(w/v,按蛋白基计)、水解 pH8.5、水解温度 60 ℃ 条件下水解 3 h,水解完成后沸水浴中灭酶 10 min,4000 r/min 离心 15 min 后取上清液,冷冻干燥即得米糠蛋白水解物。

1.2.3 乳酸菌发酵水解物的制备 按照 1.2.2 制备米糠蛋白水解液,在 121 ℃、0.1 MPa 条件下灭菌 20 min,降至室温后,分别接入植物乳杆菌 13110、植物乳杆菌 09002、植物乳杆菌 02002、副干酪乳杆菌和保加利亚乳杆菌,按照发酵培养基初始 pH 为 5.5、接种量 3% 接种于灭菌后的水解液中,摇匀 37 ℃ 下恒温培养 24 h。培养结束后,发酵液在 4000 r/min 离心 15 min,取上清液冷冻干燥即得乳酸菌发酵水解物。

1.2.4 单因素实验设计 设定初始发酵条件为:发酵温度 37 ℃,发酵时间 24 h,发酵培养基初始 pH5.5,

接种量 3%(v/v, 接种液菌体浓度 10^8 CFU/mL)。在初始发酵条件基础上, 分别优化接种量(0、1%、2%、3%、4%、5%)、发酵培养基初始 pH(4.5、5、5.5、6、6.5)、发酵温度(31、34、37、40、43 ℃)和发酵时间(12、24、36、48、60 h)等因素, 考察各因素对乳酸菌发酵水解物可溶性蛋白含量、蛋白回收率、DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率的影响。

1.2.5 正交试验设计 基于 1.2.4 实验结果, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 以 ABTS⁺ 自由基清除率和 DPPH 自由基清除率为指标, 综合加权分析法进行正交试验分析, ABTS⁺ 自由基清除率和 DPPH 自由基清除率权重系数分别设定为 50%, 综合评分 = (ABTS⁺ 自由基清除率) × 50% + (DPPH 自由基清除率) × 50%, 对 ABTS⁺ 和 DPPH 自由基清除率影响较大的 3 个因素(接种量、发酵培养基初始 pH 和发酵温度)进行优化, 正交试验因素水平如表 1 所示。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素与水平
Table 1 Orthogonal $L_9(3^4)$ factor and level

水平	因素		
	A 接种量(%)	B 发酵培养基初始 pH	C 发酵温度(℃)
1	1	5	31
2	2	5.5	34
3	3	6	37

1.2.6 DPPH 自由基清除率的测定 DPPH 自由基清除能力的测定参照刘羽婷等^[11]的方法, 并加以修改。将米糠蛋白水解物和菌酶协同产物的浓度稀释至 1 mg/mL, 采用微量法测定 DPPH 自由基清除率。取 100 μ L 上述样品于 96 孔板中, 再加入 100 μ L 浓度为 0.1 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液, 混合均匀, 避光反应 30 min 后, 在 517 nm 波长下测其吸光度记为 A_i ; 另取 100 μ L 上述已配制的米糠蛋白水解物和菌酶协同产物样品, 加 100 μ L 无水乙醇, 测定吸光度记为 A_j ; 以 100 μ L 0.1 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液和 100 μ L 无水乙醇反应作为参比, 其吸光度记为 A_0 。所有的测定都需要平行 3 次。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100$$

1.2.7 ABTS⁺ 自由基清除率的测定 ABTS⁺ 自由基清除能力的测定参照何远清等^[12]的方法, 并加以修改。将米糠蛋白水解物和酶菌协同产物的浓度稀释至 0.5 mg/mL, 用于 ABTS⁺ 自由基清除能力测定。将配好的 ABTS 储备液, 用 PBS 稀释到在 734 nm 波长下吸光度值在 0.7 ± 0.02 , 作为 ABTS 工作液。在 96 孔板的每孔中加入各样品溶液 100 μ L, 再加入 100 μ L 的 ABTS 工作液, 用 PBS 代替样品作为对照 A_0 , 每个样品设 3 个重复, 摇匀, 室温静置 10 min 后, 在 734 nm 波长下测定吸光度。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_{\text{测定}}}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 : PBS 代替样品的吸光度值; $A_{\text{测定}}$: 样品吸光度值。

1.2.8 可溶性蛋白含量测定 采用 Folin-酚法^[13] 测定米糠蛋白酶水解液和乳酸菌发酵液的可溶性蛋白含量, 以标准蛋白相对浓度为横坐标, 标准蛋白相对吸光度为纵坐标, 计算可溶性蛋白含量。得到标准曲线为 $y = 0.0023x + 0.0114$, $R^2 = 0.999$ 。

1.2.9 蛋白回收率测定 根据测得的水解液可溶性蛋白含量, 按照以下公式计算蛋白回收率。

$$\text{蛋白回收率}(\%) = \frac{\text{水解液的总可溶性蛋白含量}}{\text{原料的总蛋白含量}} \times 100$$

1.2.10 水解度的测定 采用 pH-stat 法^[14] 测定米糠蛋白水解物水解度。准确称量米糠蛋白 23.26 g 置于烧杯中, 加入 200 mL 蒸馏水, 用玻璃棒搅拌均匀, 调节溶液的 pH, 加入蛋白酶, 水浴加热, 每隔半小时测定一次溶液的 pH, 并用氢氧化钠溶液调节到之前的 pH。记录消耗的氢氧化钠的体积, 米糠蛋白的水解度的计算公式如下。

$$\text{水解度}(\%) = B \times \frac{N_b}{M_p} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{\text{htot}} \times 100$$

式中: B: NaOH 添加量, mL; N_b : NaOH 的摩尔浓度, mol/L; α : 校准系数 = $10\text{pH} - \text{pK} / (1 + 10\text{pH} - \text{pK})$, pH 为实验采用的 pH, pK 为氨基酸的解离常数, 取 7.0 进行计算; M_p : 底物中米糠蛋白质量, g; htot: 蛋白质中肽键的总数, mmol/g, 经过计算米糠蛋白的 htot 为 7.348 mmol/g。

1.2.11 分子量分布测定 使用凝胶色谱柱 Superdex Peptide10/300GL, 在 AKTA avant 智能蛋白质纯化色谱仪上对米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物进行分子量分布的测定。将米糠蛋白水解物和菌酶协同产物样品溶解于 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 含有 0.15 mol/L NaCl) 中, 配制成 2 mg/mL (蛋白浓度) 溶液, 在 4 ℃、10000 r/min 的条件下离心 10 min, 取上清液过 0.22 μ m 滤膜后上样。标准蛋白检测方法同上, 分别称取下述五种标准蛋白 2 mg 放于同一试管中, 用 1 mL 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 含有 0.15 mol/L NaCl) 溶解后, 在 4 ℃、10000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液过 0.22 μ m 滤膜后上样。色谱柱用蓝色葡聚糖 2000 测定外水体积, 其余标准蛋白为抑肽酶(6511 Da)、杆菌肽(1422 Da)、氧化型谷胱甘肽(612 Da)和还原型谷胱甘肽(307 Da), 以有效分配系数(K_{aw})为横坐标, 标准蛋白相对分子质量对数($\lg Mr$)为纵坐标的标准曲线, 计算蛋白的相对分子质量。得到标准曲线为 $y = -3.4524x + 4.6936$, $R^2 = 0.9878$ 。

1.2.12 氨基酸组成测定 按照样品蛋白含量, 称取 0.06 g 左右装入安瓿管中, 加入 9 mL 6.67 mol/L 盐酸溶液, 氮吹处理 10 min 后用酒精喷灯火焰灼烧、封管。在 110 ℃ 的烘箱中进行酸水解 24 h。水解后

冷却,加入 6 mol/L 氢氧化钠溶液 8.5 mL, pH 调至 2.2,滤纸过滤,然后用 pH2.2 的柠檬酸钠缓冲溶液定容至 100 mL。针头式过滤器(0.22 μm)过滤两次,用 L-8900 全自动氨基酸分析仪进行分析。

1.2.13 溶解性 参照张相伦^[15]方法,分别称取 0.4 g(蛋白含量)样品,分别溶于 100 mL 蒸馏水中,调节成一定 pH(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12)的溶液。充分混匀后,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,10000 r/min 离心 10 min,采用 Folin 酚法测定上清液蛋白质含量。

$$\text{溶解性}(\%) = \frac{\text{样品中上清液蛋白含量}}{\text{样品中总蛋白含量}} \times 100$$

1.3 数据处理

本实验的所有数据均通过 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计学分析,用 Duncan 法进行数据间的差异显著性分析,显著性水平为 $P < 0.05$,每个试验重复三次,结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。数据通过 Origin 2022 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 米糠蛋白的酶种类的筛选

碱性蛋白酶和复合蛋白酶都是内切蛋白酶,主要作用位点是疏水性氨基酸和芳香族氨基酸的羧基端肽键,如 Ala、Leu 和 Phe 等。蛋白酶 N 主要剪切于肽链中疏水性氨基酸和羟基类氨基酸的羧基端肽键,如 Thr、Ser 和 Pro 等。中性蛋白酶也是一种内切酶,主要水解 Tyr、Trp 和 Phe 等芳香族氨基酸的羧基端肽键。风味蛋白酶是特异性外切酶,可催化水解肽链末端的疏水性氨基酸。本文考虑各蛋白酶的特异性酶切位点,通过分析这五种蛋白酶对米糠蛋白的作用效果,以期获得具有较高抗氧化活性的米糠蛋白水解物。蛋白酶种类对米糠蛋白水解物 ABTS⁺自由基清除率、DPPH 自由基清除率、可溶性蛋白含量、蛋白回收率和水解度的影响结果如图 1 和表 2 所示。

从图 1 可以看出,采用 5 种蛋白酶酶解米糠蛋白制备米糠蛋白水解物,不同蛋白酶米糠蛋白水解物的抗氧化活性存在显著差异($P < 0.05$),表明蛋白酶种类对米糠蛋白水解物的抗氧化活性有显著影响。中性蛋白酶、风味蛋白酶和碱性蛋白酶三种米糠蛋白水解物均具有较好的 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除活性,这可能与其酶切作用位点有关。有研究表明,疏

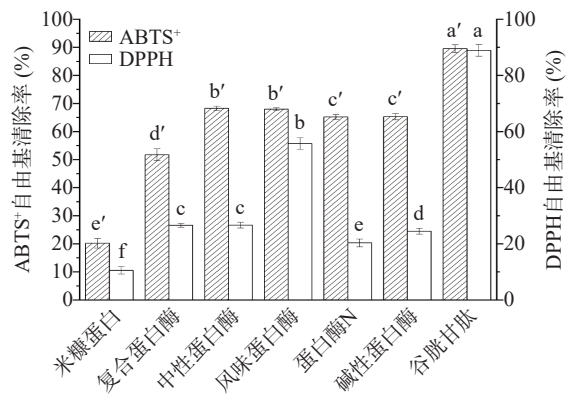


图 1 不同蛋白酶水解对米糠蛋白水解物 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.1 Effects of different proteases hydrolysis on the ABTS⁺ and DPPH free radical scavenging rates of rice bran protein hydrolysate

注:测定 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率的蛋白浓度分别为 0.5 mg/mL 和 1 mg/mL,还原型谷胱甘肽为对照,浓度为 0.5 mg/mL; a~f 不同代表 DPPH 自由基清除率间具有显著性差异 ($P < 0.05$); a'~f' 不同代表 ABTS⁺自由基清除率间具有显著性差异 ($P < 0.05$); 图 2~图 6 同。

水性氨基酸具有较高的抗氧化活性^[16],这可能也是水解物的 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除活性较强的原因。由表 2 可知,碱性蛋白酶米糠蛋白水解物的可溶性蛋白含量、蛋白回收率和水解度均显著高于其他蛋白酶制备的米糠蛋白水解物($P < 0.05$),在食品加工过程中能显著降低生产成本,综合考虑分析选择碱性蛋白酶进行后续试验。

在确定碱性蛋白酶为最佳蛋白酶基础上,以米糠蛋白粉为底物,ABTS⁺自由基清除率、DPPH 自由基清除率、可溶性蛋白含量、蛋白回收率和水解度为指标进行反应条件优化,确定了米糠蛋白最佳水解条件为底物浓度 13%(w/v,按蛋白基计)、加酶量 700 U/g、水解时间 3 h、水解 pH8.5、水解温度 60 $^{\circ}\text{C}$,在此条件下,米糠蛋白水解物的 DPPH 和 ABTS⁺自由基清除率分别为 36.12%(蛋白浓度 1 mg/mL)和 76.27%(蛋白浓度 0.5 mg/mL),可溶性蛋白含量和蛋白回收率分别为 50.2 $\pm$ 0.73 mg/mL、52.23 $\pm$ 0.61%,水解度为 32.45%。

2.2 乳酸菌发酵水解物的制备

2.2.1 乳酸菌的选择 不同乳酸菌菌株代谢产生的蛋白酶特异性也会不同,从而导致产生不同活性的肽段,进而影响产物的抗氧化活性^[17]。以 2.1 中最优条

表 2 不同蛋白酶水解对米糠蛋白水解物可溶性蛋白含量、蛋白回收率和水解度的影响

Table 2 Effects of different proteases hydrolysis on soluble protein content, protein recovery rate, and hydrolysis degree of rice bran protein hydrolysate

酶种类	碱性蛋白酶	复合蛋白酶	中性蛋白酶	风味蛋白酶	蛋白酶N
可溶性蛋白含量(mg/mL)	53.33 $\pm$ 0.53 ^a	28.18 $\pm$ 0.41 ^c	34.97 $\pm$ 0.30 ^b	7.41 $\pm$ 0.27 ^d	34.08 $\pm$ 0.62 ^b
蛋白回收率(%)	46.10 $\pm$ 0.45 ^a	21.83 $\pm$ 0.31 ^c	27.45 $\pm$ 0.28 ^b	5.59 $\pm$ 0.10 ^d	27.61 $\pm$ 0.54 ^b
水解度(%)	26.81 $\pm$ 0.02 ^a	5.44 $\pm$ 0.05 ^b	4.22 $\pm$ 0.03 ^c	1.22 $\pm$ 0.02 ^d	7.62 $\pm$ 0.02 ^b

注:同行不同字母代表组间具有显著性差异($P < 0.05$);表 3~表 7 同。

表 3 不同乳酸菌发酵对米糠蛋白水解物可溶性蛋白含量和蛋白回收率的影响

Table 3 Effects of different lactic acid bacteria fermentation on soluble protein content and protein recovery rate of rice bran protein hydrolysate

乳酸菌种类	未发酵	植物乳杆菌13110	植物乳杆菌09002	植物乳杆菌02002	副干酪乳杆菌	保加利亚乳杆菌
可溶性蛋白含量(mg/mL)	50.02±0.72 ^d	56.86±0.59 ^a	54.51±0.41 ^b	50.03±0.32 ^d	54.34±0.24 ^b	52.90±0.67 ^c
蛋白回收率(%)	52.03±0.61 ^b	53.74±0.43 ^a	51.52±0.34 ^{bc}	48.03±0.21 ^d	52.98±0.11 ^{ab}	51.32±0.58 ^{bc}

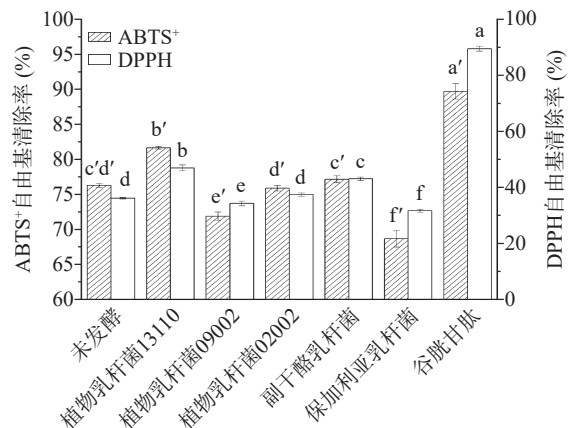


图 2 不同乳酸菌发酵对米糠蛋白水解物 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.2 Effects of different lactic acid bacteria fermentation on the ABTS⁺ and DPPH free radical scavenging rates of rice bran protein hydrolysate

件下得到的米糠蛋白水解液为底物,进行乳酸菌发酵,从而获得乳酸菌发酵水解物,测定 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率、可溶性蛋白含量和蛋白回收率,结果如图 2 和表 3 所示。

由图 2 和表 3 可以看出,与未发酵相比,添加植物乳杆菌 13110 和副干酪乳酸菌均可显著增加产物的 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率。并且不同菌种发酵得到的乳酸菌发酵水解物 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率存在显著差异($P<0.05$)。其中以添加植物乳杆菌 13110 的效果最佳。植物乳杆菌 13110 发酵得到的乳酸菌发酵水解物的 ABTS⁺自由基清除率、DPPH 自由基清除率、可溶性蛋白含量和蛋白回收率均显著高于其他乳酸菌($P<0.05$)。这是可能与植物乳杆菌的内肽酶 PepE/PepG 和脯氨酸酶 PepI/PepR/PepL 的存在有助于蛋白质的分解有关,内肽酶 PepE/PepG 是一种丝氨酸蛋白酶,能专一性水解多肽中疏水性氨基酸(Pro)残基的羧基端肽键;脯氨酸酶 PepI 对 Pro 残基的三肽具有特异性,而脯氨酸酶 PepR 对 Pro 残基的二肽具有广泛的特异性;PepL 对疏水性氨基酸(Leu)残基的二肽/三肽表现出高度特异性,可以释放出更多具有 ABTS⁺和 DPPH 自由

基清除活性的肽段^[18-19]。因此,为进一步提高米糠蛋白水解物的抗氧化活性,采用植物乳杆菌 13110 进行发酵条件优化。

2.2.2 接种量的确定 接种量过低或过高时,均不利于蛋白酶的产生,进而影响具有抗氧化能力的肽段产生^[20]。接种量对乳酸菌发酵水解物 ABTS⁺自由基清除率、DPPH 自由基清除率、可溶性蛋白含量和蛋白回收率的影响,结果如图 3 和表 4 所示。

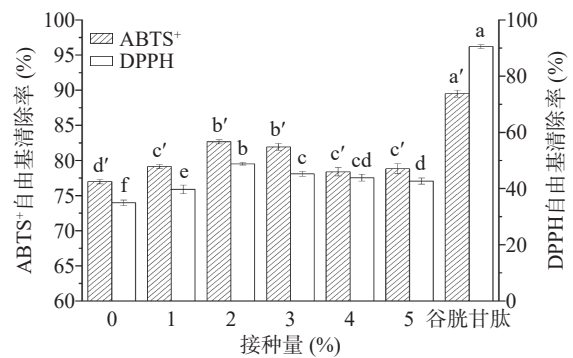


图 3 不同接种量对乳酸菌发酵水解物 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.3 Effects of different inoculation amounts on the ABTS⁺ and DPPH free radical scavenging rates of lactic acid bacteria fermentation hydrolysate

由图 3 和表 4 可以看出,随着接种量的增加,乳酸菌发酵水解物的 ABTS⁺自由基清除率、DPPH 自由基清除率大体呈现先上升后下降的趋势,可溶性蛋白含量和蛋白回收率呈现先升高后下降,最后趋于稳定,这是因为当接种量过低或过高时,均不利于植物乳杆菌 13110 代谢过程中产生的蛋白酶的含量和活性,导致可溶性蛋白含量以及蛋白回收率较低,使具有 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除能力肽段的含量较少,进而其 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率较低。这与龙久铃等^[21]利用米曲霉固态发酵苏麻饼粕制备抗氧化肽粗提物时,发酵温度对 DPPH 的自由基清除率的结果相似。因此确定植物乳杆菌 13110 接种量为 2%。

表 4 不同接种量对乳酸菌发酵水解物可溶性蛋白含量和蛋白回收率的影响

Table 4 Effects of different inoculation amounts on soluble protein content and protein recovery rate of lactic acid bacteria fermentation hydrolysate

接种量(%)	0	1	2	3	4	5
可溶性蛋白含量(mg/mL)	59.42±0.32 ^a	53.86±0.51 ^d	56.73±0.53 ^b	57.34±0.31 ^b	55.03±0.78 ^{cd}	54.08±0.56 ^d
蛋白回收率(%)	55.86±0.36 ^a	49.28±0.57 ^d	55.59±0.52 ^a	53.89±0.29 ^b	51.73±0.73 ^c	51.92±0.42 ^c

2.2.3 发酵培养基初始 pH 的确定 发酵培养基初始 pH 会影响发酵过程中的菌种生长环境和代谢过程中酶的活性,进而影响发酵过程中蛋白酶解产生的具有抗氧化活性的肽段数量^[22]。确定接种量 2% 的条件下,按照发酵培养基初始 pH 分别为 4.5、5、5.5、6 和 6.5,制备得到不同发酵培养基初始 pH 下的乳酸菌发酵水解物。发酵培养基初始 pH 对乳酸菌发酵水解物 ABTS⁺自由基清除率、DPPH 自由基清除率、可溶性蛋白含量和蛋白回收率的影响结果如图 4 和表 5 所示。

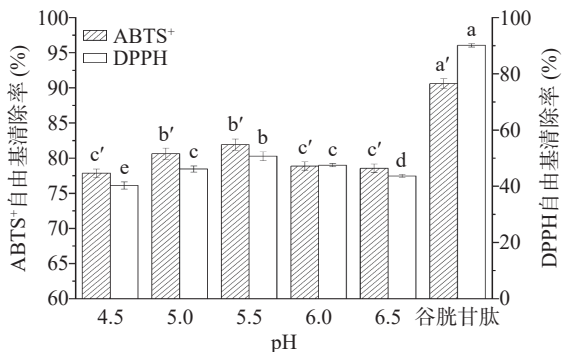


图 4 发酵培养基初始 pH 对乳酸菌发酵水解物 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.4 Effects of initial pH of fermentation medium on the ABTS⁺ and DPPH free radical scavenging rates of lactic acid bacteria fermentation hydrolysate

由图 4 和表 5 可以看出,随着发酵培养基初始 pH 增大,乳酸菌发酵水解物的 ABTS⁺自由基清除率、DPPH 自由基清除率、可溶性蛋白含量和蛋白回收率均呈现先上升后下降的趋势。这可能是因为发酵培养基初始 pH 的过低或过高均不利于植物乳杆菌 13110 发酵过程中代谢产生的蛋白酶活性,抑制了酶促反应的进行,导致可溶性蛋白含量和蛋白回收率较低,使具有 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除能力的肽链数量减少,进而乳酸菌发酵水解物的 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除能力下降。这与谢晓阳等^[23]选取产朊假丝酵母和扣囊复膜孢酵母作为灵芝混合多糖发酵菌种,来提高灵芝子实体多糖的抗氧化活性的研究中,发酵培养基初始 pH 对其抗氧化活性的影响结

表 5 发酵培养基初始 pH 对乳酸菌发酵水解物可溶性蛋白含量和蛋白回收率的影响

Table 5 Effects of initial pH of fermentation medium on the soluble protein content and protein recovery rate of lactic acid bacteria fermentation hydrolysate

发酵培养基初始 pH	4.5	5	5.5	6	6.5
可溶性蛋白含量(mg/mL)	52.42±0.94 ^{bc}	53.38±0.96 ^b	55.74±0.92 ^a	51.94±0.71 ^{cd}	50.90±1.22 ^d
蛋白回收率(%)	50.58±0.81 ^c	51.51±0.88 ^{bc}	53.78±0.93 ^a	49.08±0.65 ^c	49.88±1.28 ^c

表 6 发酵温度对乳酸菌发酵水解物可溶性蛋白含量和蛋白回收率的影响

Table 6 Effects of fermentation temperature on soluble protein content and protein recovery rate of lactic acid bacteria fermentation hydrolysate

发酵温度(℃)	31	34	37	40	43
可溶性蛋白含量(mg/mL)	50.94±0.21 ^c	53.02±0.60 ^{ab}	54.62±1.13 ^a	52.82±0.51 ^b	51.70±0.42 ^c
蛋白回收率(%)	47.37±0.20 ^c	52.22±0.64 ^a	52.16±0.62 ^a	49.91±0.58 ^{ab}	47.56±0.49 ^c

果相似。因此,确定发酵培养基初始 pH 为 5.5。

2.2.4 发酵温度的确定 发酵温度过高或者过低都会影响微生物产生的蛋白酶活力,进而影响发酵过程中得到的抗氧化肽活性^[24]。在接种量 2%、发酵 pH 5.5 的条件下,按照发酵温度分别为 31、34、37、40 和 43 ℃,制备得到不同发酵温度下的乳酸菌发酵水解物。发酵温度对乳酸菌发酵水解物 ABTS⁺自由基清除率、DPPH 自由基清除率、可溶性蛋白含量和蛋白回收率的影响结果如图 5 和表 6 所示。

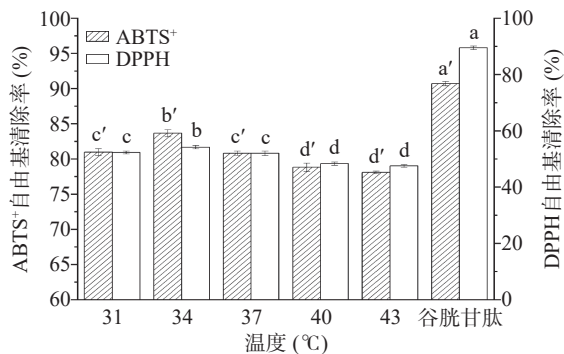


图 5 发酵温度对乳酸菌发酵水解物 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.5 Effects of fermentation temperature on the ABTS⁺ and DPPH free radical scavenging rates of lactic acid bacteria fermentation hydrolysate

由图 5 和表 6 可以看出,随着发酵温度的升高,乳酸菌发酵水解物的 ABTS⁺自由基清除率、DPPH 自由基清除率、可溶性蛋白含量和蛋白回收率呈现先增加后减少的趋势,这可能是因为当温度低于或者高于 34 ℃ 时,不利于植物乳杆菌的生长代谢产生的蛋白酶的活性,导致具有 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除能力的肽段含量降低,因而其可溶性蛋白含量和蛋白回收率下降。这与朱立斌等^[25]研究毛酸浆的最适乳酸发酵条件及其体外抗氧化活性时,发酵温度对抗氧化活性的影响结果一致。因此,确定发酵温度为 34 ℃。

2.2.5 发酵时间的确定 发酵时间也是影响产物抗氧化活性的重要因素,如果发酵时间较短,乳酸菌分泌的蛋白酶对底物的分解作用较小,具有抗氧化功能

表 7 发酵时间对乳酸菌发酵水解物可溶性蛋白含量和蛋白回收率的影响

Table 7 Effects of fermentation time on the soluble protein content and protein recovery rate of lactic acid bacteria fermentation hydrolysate

发酵时间(h)	12	24	36	48	60
可溶性蛋白含量(mg/mL)	50.74±0.58 ^d	52.70±0.92 ^c	54.50±0.67 ^b	55.30±0.41 ^{ab}	56.38±0.22 ^a
蛋白回收率(%)	50.23±0.45 ^b	52.17±0.91 ^a	52.05±0.64 ^a	50.32±0.47 ^b	51.59±0.23 ^{ab}

的多肽释放率低;而过长的发酵时间会使抗氧化作用较强的肽段被进一步水解,从而使产物的抗氧化活性降低^[26]。在接种量 2%、发酵培养基初始 pH5.5 和发酵温度 34 ℃ 的条件下,发酵时间分别为 12、24、36、48 和 60 h,制备得到不同发酵时间的乳酸菌发酵水解物。发酵时间对乳酸菌发酵水解物 ABTS⁺ 自由基清除率、DPPH 自由基清除率、可溶性蛋白含量和蛋白回收率的影响结果如图 6 和表 7 所示。

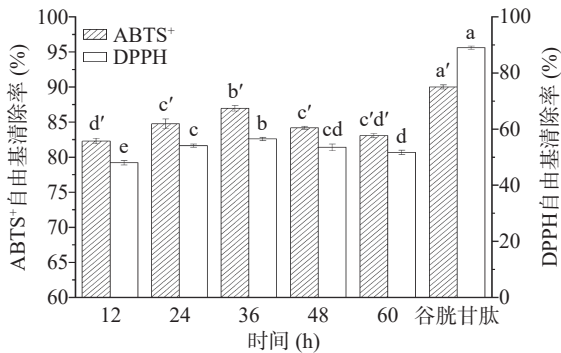


图 6 发酵时间对乳酸菌发酵水解物 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.6 Effects of fermentation time on the ABTS⁺ and DPPH free radical scavenging rates of lactic acid bacteria fermentation hydrolysate

由图 6 和表 7 可以看出,乳酸菌发酵水解物的 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率大体呈现先上升后下降的趋势。这可能是因为植物乳杆菌 13110 的生长需要足够的生长周期,发酵时间过短时,植物乳杆菌 13110 的生长未达到最好的状态,其产生的蛋白酶较少,底物水解不完全,影响具有 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除能力的肽段释放,因此,其可溶性蛋白含量和蛋白回收率较低;当发酵时间过长时,随着酶促反应的进行,能够释放出更多的肽段,但乳酸菌发酵水解物中的具有 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除能力的肽段也会被进一步水解,导致乳酸菌发酵水解物中的 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率下降,宋茹等^[27]采用枯草芽孢杆菌转化鲑鱼墨制备抗氧化型发酵液实验时,也得到相似结果。因此,确定发酵时间为 36 h。

2.3 正交试验优化米糠蛋白水解物的发酵条件

基于 2.2 实验结果,采用 L₉(3⁴)正交试验设计,优化植物乳杆菌 13110 发酵米糠蛋白水解液的发酵条件。正交试验结果如表 8 所示,方差分析结果如表 9 所示。

由表 8 可知,可以得出影响 DPPH 和 ABTS⁺自由基清除率综合评分的各因素先后顺序为: B>A>C,

表 8 正交试验结果

Table 8 Results of orthogonal experiments

试验号	A	B	C	ABTS ⁺ 自由基清除率(%)	DPPH自由基清除率(%)	综合评分
1	1	1	1	88.31	55.17	71.75
2	1	2	2	90.09	56.88	73.49
3	1	3	3	86.71	54.37	70.55
4	2	1	2	88.15	55.01	71.59
5	2	2	3	90.06	56.44	73.25
6	2	3	1	87.45	54.47	70.97
7	3	1	3	86.89	53.24	70.07
8	3	2	1	88.58	55.58	72.08
9	3	3	2	85.24	52.37	68.81
k ₁	71.930	71.140	71.600			
k ₂	71.937	72.940	71.297			
k ₃	70.323	70.110	71.293			
R	1.614	2.830	0.307			

表 9 方差分析表

Table 9 Analysis of variance table

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A接种量	5.184	2	58.247	19.000	*
B发酵培养基初始pH	12.310	2	138.315	19.000	*
C发酵温度	0.186	2	2.090	19.000	
误差	0.09	2			

注: *代表具有显著差异性(P<0.05)。

即发酵 pH>接种量>发酵温度,最优组合是 A₂B₂C₁,即接种量 2%,发酵培养基初始 pH5.5,发酵温度 31 ℃。

由表 9 可以看出,发酵培养基初始 pH 和接种量对乳酸菌发酵水解物的 DPPH 和 ABTS⁺自由基清除率影响具有显著性差异(P<0.05)。对所得最优组合进行验证,按照最优组合条件制备乳酸菌发酵水解物的 DPPH 和 ABTS⁺自由基清除率分别为 57.42%±2.0%(蛋白浓度 1 mg/mL)、90.35%±0.1%(蛋白浓度 0.5 mg/mL),均优于米糠蛋白水解物和正交表中所有组别。因此确定植物乳杆菌 13110 发酵米糠蛋白水解物的最佳工艺条件为:接种量 2%,发酵培养基初始 pH5.5,发酵温度 31 ℃,发酵时间 36 h。

2.4 分子量分布结果

通过凝胶色谱对米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物的分子量分布进行测定,米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物的分子量分布结果如图 7 和表 10 所示。

由表 10 可知,米糠蛋白水解物中分子量小于 1.0 kDa 的组分有 0.67%,分子量在 1.0~6.5 kDa 的组分有 90.11%,分子量大于 6.5 kDa 的组分有 9.22%。

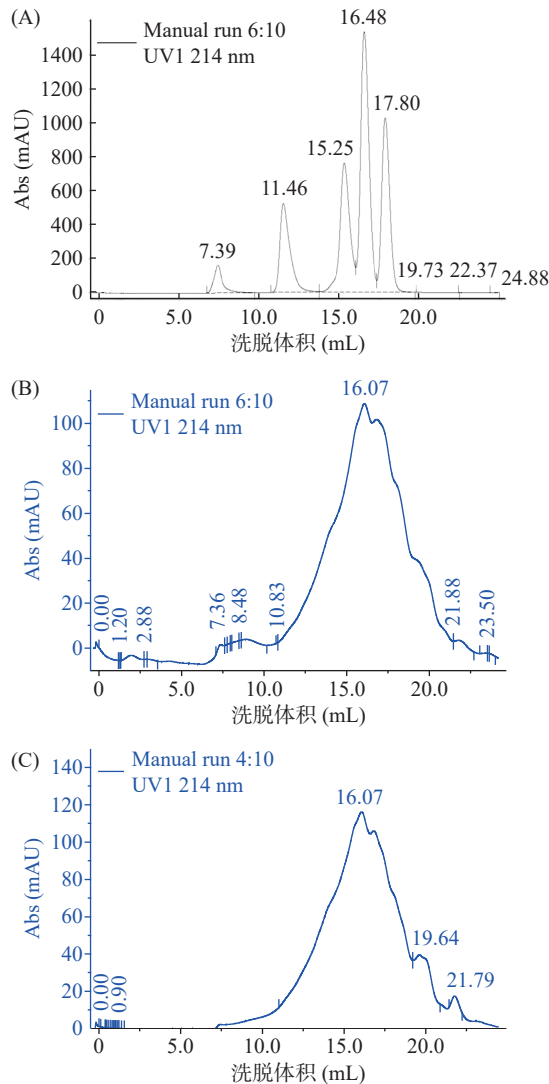


图 7 分子量分布图

Fig.7 Molecular weight distribution map

注: A.标准蛋白质洗脱图谱; B.米糠蛋白水解物分子量分布洗脱图谱; C.乳酸菌发酵水解物分子量分布洗脱图谱。

表 10 米糠蛋白水解物和乳酸菌 13110 发酵水解物的分子量分布范围

Table 10 Molecular weight distribution range of rice bran protein hydrolysates and fermented hydrolysates by *Lactobacillus plantarum* 13110

水解物	<1.0 kDa(%)	1.0~6.5 kDa(%)	>6.5 kDa(%)
米糠蛋白水解物	0.67	90.11	9.22
乳酸菌发酵水解物	6.84	87.02	6.14

乳酸菌发酵水解物中分子量小于 1.0 kDa 的组分有 6.84%, 分子量在 1.0~6.5 kDa 的组分有 87.02%, 分子量大于 6.5 kDa 的组分有 6.14%。可能是发酵过程中植物乳杆菌 13110 产生的蛋白酶与米糠蛋白水解物中大分子肽段的酶切位点作用, 使得部分大分子蛋白组分降解为小分子蛋白组分。杨玉蓉等^[28]研究发现小于 1.0 kDa 的活性肽具有更好的生物活性。与米糠蛋白水解物相比, 乳酸菌发酵水解物中小于 1.0 kDa 组分含量显著增加($P<0.05$), 推测其可能是乳酸菌发酵水解物抗氧化活性较高的原因。

2.5 氨基酸组成分析

采用全自动氨基酸分析仪对米糠蛋白、米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物进行氨基酸组成分析, 结果如表 11 所示。

表 11 米糠蛋白、米糠蛋白水解物和乳酸菌 13110 发酵水解物的氨基酸组成(g/100 g)

Table 11 Amino acid composition of rice bran protein, rice bran protein hydrolysate, and fermented hydrolysates by *Lactobacillus plantarum* 13110 (g/100 g)

氨基酸种类	米糠蛋白	米糠蛋白水解物	乳酸菌发酵水解物
Asp(天冬氨酸)	7.76±0.64	6.01±0.08	6.61±0.37
Thr*(苏氨酸)	3.28±0.12	2.55±0.06	2.85±0.02
Ser(丝氨酸)	4.51±0.29	4.00±0.17	4.03±0.28
Glu(谷氨酸)	16.24±1.57	11.10±0.37	11.06±1.02
Gly(甘氨酸)	3.87±0.19	6.29±0.39	6.03±0.15
Ala(丙氨酸)	5.13±0.21	3.67±0.13	6.20±0.25
Cys(半胱氨酸)	0.13±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00
Val*(缬氨酸)	5.42±0.15	4.07±0.25	4.57±0.18
Met*(甲硫氨酸)	1.75±0.09	1.13±0.03	1.24±0.16
Ile*(异亮氨酸)	3.96±0.16	2.43±0.17	2.71±0.04
Leu*(亮氨酸)	8.09±0.48	5.05±0.15	5.51±0.09
Tyr*(酪氨酸)	4.54±0.32	2.30±0.09	2.47±0.05
Phe*(苯丙氨酸)	5.23±0.19	1.99±0.03	2.10±0.07
Lys*(赖氨酸)	3.24±0.16	1.33±0.06	1.61±0.05
His(组氨酸)	2.35±0.22	0.99±0.08	1.09±0.03
Arg(精氨酸)	7.61±0.59	5.23±0.26	4.81±0.35
Pro(脯氨酸)	3.48±0.12	3.14±0.11	3.68±0.17
总氨基酸TAA	85.58	60.28	66.57
必需氨基酸EAA	34.55	15.23	21.68
非必需氨基酸NEAA	52.04	45.05	44.89
EAA/TAA(%)	39.90	25.27	32.57
EAA/NEAA(%)	66.39	33.81	48.30
疏水性氨基酸占比(%)	38.18	35.95	39.07
非疏水性氨基酸占比(%)	61.82	64.05	60.93

注: *代表必需氨基酸。

从表 11 可知, 米糠蛋白、米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物中均检测出 17 种氨基酸, 其组成合理, 含有人体所需的多种氨基酸, 其中米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物的 EAA/TAA 和 EAA/NEAA 比值均符合 FAO/WHO 推荐的参考蛋白模式^[29], 保留了米糠蛋白的营养价值。此外, 乳酸菌发酵水解物的总氨基酸含量为 66.57% 高于米糠蛋白水解物 (60.28%), 且富含 Leu(亮氨酸)、Pro(脯氨酸)和 Ala(丙氨酸)等疏水性氨基酸, 疏水性氨基酸占比为 39.07% 高于米糠蛋白水解物 (35.95%), 这可能是因为非疏水性氨基酸 Arg(精氨酸)被植物乳杆菌 13110 吸收利用, 最终可能转化为其他氨基酸, 因此乳酸菌发酵水解物的总氨基酸含量升高, 疏水性氨基酸占比增加。一般来说, 肽的抗氧化活性与其氨基酸序列相关, 而且它们通常包含疏水性氨基酸, 例如序列中包含脯氨酸、组氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸的肽^[30]。含有疏水性氨基酸的肽能够与氧结合或者减少体系中氢的释放来阻断氧化进程, 进而发挥抗氧化

功能。缬氨酸或亮氨酸等疏水氨基酸可以增加肽在脂质界面的含量,从而促进清除脂质阶段产生的自由基^[31]。综上所述,乳酸菌发酵水解物的高抗氧化活性可能与疏水性氨基酸的含量较高有关。虽然米糠蛋白中也同样具有较高含量的疏水性氨基酸,但是由于米糠蛋白溶解性较差,导致其抗氧化活性较差。

2.6 溶解性

大量的研究发现蛋白质的功能性与溶解性有密切的联系,通过蛋白质的溶解性来体现其他的功能性^[32]。因此提高蛋白质的溶解性具有重要的意义。由于蛋白质的溶解性受 pH 影响较大,因此比较了在不同 pH 条件下米糠蛋白、米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物的溶解性,结果如图 8 所示。

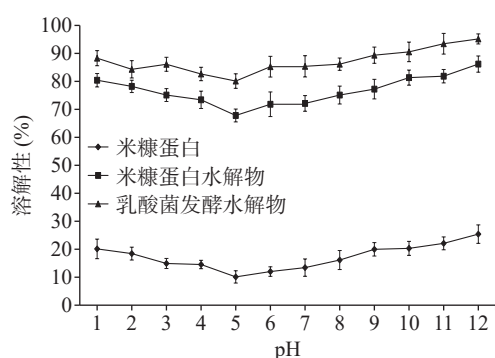


图 8 pH 对米糠蛋白、米糠蛋白水解物和乳酸菌 13110 发酵水解物溶解性的影响

Fig.8 Effects of pH on the solubility of rice bran protein, rice bran protein hydrolysate, and fermented hydrolysates by *Lactobacillus plantarum* 13110

由图 8 可知, pH4~6 为米糠蛋白等电点(4.6)附近,米糠蛋白溶解性较低,而在远离等电点,米糠蛋白的溶解性增加,原因是增加或减小 pH,偏离等电点时,蛋白质的表面静电荷增加,与水分子的相互作用增强,蛋白质结构展开,米糠蛋白在水溶液的分散能力得到提升,表现为溶解度增加。与米糠蛋白相比,在 pH4~6 范围内,米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物的溶解性得到明显改善。在 pH 为 7 时,米糠蛋白溶解性为 13.43%,米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物的溶解性分别为 72.12% 和 85.38%。在 pH1~12 范围内,整体来看,乳酸菌发酵水解物的溶解性最高,米糠蛋白水解物次之。这是因为米糠蛋白经碱性蛋白酶水解和乳酸菌发酵后,肽链断裂,大分子蛋白质转变成多肽和小分子短肽类物质,蛋白结构被破坏,暴露出更多亲水性基团,从而使亲水性增强^[33],米糠蛋白水解物和乳酸菌发酵水解物的溶解度得到提高。在 pH1~12 范围内,乳酸菌发酵水解物均具有较强的溶解性,提高了其在食品工业上的利用率。

3 结论

本文以米糠蛋白粉为原料,优化了酶菌协同反应条件,得到的最佳发酵条件为接种量 2%(v/v, 接种液菌体浓度 10^8 CFU/mL)、发酵培养基初始 pH5.5、发酵温度 31 °C、发酵时间 36 h,在此条件下,乳酸菌

发酵水解物蛋白浓度为 1 mg/mL 时 DPPH 自由基清除率 $57.42\% \pm 2.0\%$,蛋白浓度为 0.5 mg/mL 时 ABTS⁺ 自由基清除率为 $90.35\% \pm 0.1\%$ 。通过分子量分布和氨基酸组成进行分析,结果表明乳酸菌发酵水解物含有较多的小于 1.0 kDa 的肽组分和疏水性氨基酸, EAA/TAA 和 EAA/NEAA 比值仍符合 FAO/WHO 推荐的参考蛋白模式,保留了米糠蛋白的营养价值,且具有较好的溶解性,为米糠蛋白在食品工业应用提供了理论依据。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] RODRIGUEZ-RESTREPO Y A, FERREIRA-SANTOS P, ORREGO C E, et al. Valorization of rice by products: Protein phenolic based fractions with bioactive potential[J]. *Journal of Cereal Science*, 2020, 95: 103039.
- [2] CHO S J. Changes in the antioxidant properties of rice bran protein isolate upon simulated gastrointestinal digestion[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 126(4): 109206.
- [3] PHONGTHAI S, HOMTHAWORNCHOO W, RAWDKUEN S. Preparation, properties and application of rice bran protein: A review[J]. *International Food Research Journal*, 2017, 24(1): 25-34.
- [4] 藏小丹,董良伟,李凤玉,等.酶种类对米糠蛋白酶解物抗氧化及加工特性的影响[J]. *粮食与油脂*, 2018, 31(6): 80-83. [ZANG X D, DONG L W, LI F Y, et al. Effects of enzyme types on antioxidant and processing properties of rice bran protein hydrolysate[J]. *Grain and Oils*, 2018, 31(6): 80-83.]
- [5] OLUTAYO T O, ADETOKUNBO A O, SEUN B O, et al. Correction: Antihypertensive effect of polyphenol-rich fraction of *Azadirachta indica* on Nω-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension and cardiorenal dysfunction[J]. *Drug Research*, 2019, 69(1): 12-22.
- [6] 邹智鹏,王明洁,刘梦婷,等.小米米糠蛋白水解物及其膜分离组分的降血压相关活性研究[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(6): 31-38. [ZOU Z P, WANG M J, LIU M T, et al. Study on the anti-hypertensive activity of millet bran protein hydrolysate and its membrane separation fractions[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2020, 35(6): 31-38.]
- [7] 文伟,张名位,刘磊,等.乳酸菌发酵对脱脂米糠中糖和酚类物质含量的影响[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(2): 137-141. [WEN W, ZHANG M W, LIU L, et al. Effects of lactic acid bacteria fermentation on the content of sugars and polyphenols of defatted rice bran[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(2): 137-141.]
- [8] 周梅,张敏.米糠蛋白抗氧化活性肽的制备[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(6): 793-799. [ZHOU M, ZHANG M. Preparation of antioxidant peptides from rice bran protein[J]. *Natural Product Research and Development*, 2012, 24(6): 793-799.]
- [9] 魏明,薛正莲,赵世光,等.米曲霉发酵米糠制取米糠多肽及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(19): 114-118. [WEI M, XUE Z L, ZHAO S G, et al. Study on the preparation of peptides from rice bran and antioxidant activity by *Aspergillus oryzae* fermentation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(19): 114-118.]
- [10] RIVERO-PINO F, LEON M J, MILLAN-LINARES M C, et

- al. Anti-microbial plant-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis and fermentation as components to improve current food systems[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2023, 135: 32-42.
- [11] 刘羽婷, 宫春宇, 廉雅雯, 等. 不同预处理方式对玉米须多糖提取及抗氧化活性的影响[J]. *食品科技*, 2022, 47(4): 209-215. [LIU Y T, GONG C Y, LIAN Y W, et al. Effects of different pretreatment methods on the extraction and antioxidant activity of corn silk polysaccharides[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(4): 209-215.]
- [12] 何远清, 郭蕊, 陈敏. 一种燕麦抗氧化肽的制备及纯化鉴定方法[P]. 江苏省: CN202210307008.7, 2022-08-30. [HE Y Q, GUO R, CHEN M. Preparation, purification and identification method of oat antioxidant peptide[P]. Jiangsu Province: CN202210307008.7, 2022-08-30.]
- [13] URAIPONG C, ZHAO J. *In vitro* digestion of rice bran proteins produces peptides with potent inhibitory effects on α -glucosidase and angiotensin I converting enzyme[J]. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 2018, 98(2): 758-766.
- [14] 刘容旭, 李春雨, 王语聪, 等. 超高压辅助酶解法改性汉麻分离蛋白及其理化性质的研究[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(19): 99-107. [LIU R X, LI C Y, WANG Y C, et al. Study on the modification of hemp protein isolate by ultrahigh pressure assisted enzymatic hydrolysis and its physicochemical properties[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2023, 44(19): 99-107.]
- [15] 张相伦. 氧化大豆蛋白对肉鸡的损伤及不同类型维生素E的缓解作用及相关机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016. [ZHANG X L. Study on the damage of oxidized soy protein to broilers and the mitigating effects of different types of vitamin E and related mechanisms[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.]
- [16] 吴琛, 刘俊峰, 孔祥峰, 等. 饲粮精氨酸与丙氨酸对环江香猪肉质、氨基酸组成及抗氧化功能的影响[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(3): 528-533. [WU C, LIU J F, KONG X F, et al. Effects of dietary arginine and alanine on meat quality, amino acid composition and antioxidant function of Huanjiang Xiang pigs[J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(3): 528-533.]
- [17] 杨旭洲, 陈佩瑶, 张富新. 抗氧化乳酸菌的筛选及其益生特性评价[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(10): 17-23. [YANG X Z, CHEN P Y, ZHANG F X. Screening of antioxidant lactic acid bacteria and evaluation of their probiotic properties[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(10): 17-23.]
- [18] LIU M J, JUMAMURAT B, BERNADET R, et al. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 36.
- [19] EDMUND R S K, ANJA H, DE VRIES C J, et al. Transport of β -casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(4): 1569-1574.
- [20] 张倩芳, 李敏, 栗红瑜, 等. 燕麦麸皮枯草芽孢杆菌固态发酵工艺优化[J]. *农产品加工*, 2023(14): 39-41, 45. [ZHANG Q F, LI M, LI H Y, et al. Optimization of solid-state fermentation process of oat bran with *Bacillus subtilis*[J]. *Agricultural Products Processing*, 2023(14): 39-41, 45.]
- [21] 龙久铃, 朱秋劲, 白晶, 等. 米曲霉固态发酵苏麻饼粕产抗氧化肽工艺优化[J]. *轻工学报*, 2021, 36(4): 18-28. [LONG J L, ZHU Q J, BAI J, et al. Optimization of the process for producing antioxidant peptides from *Aspergillus oryzae* solid-state fermentation of hemp cake[J]. *Journal of Light Industry*, 2021, 36(4): 18-28.]
- [22] 周笑犁, 卢颖, 朱坤琬, 等. 刺梨果渣多糖的发酵制备工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(14): 24-29. [ZHOU X L, LU Y, ZHU K L, et al. Optimization of fermentation preparation process of polysaccharide from *Roxburghii* pomace and its antioxidant activity[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(14): 24-29.]
- [23] 谢晓阳, 李晓, 王伟, 等. 灵芝子实体多糖发酵工艺条件优化及抗氧化活性[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(10): 107-115. [XIE X Y, LI X, WANG W, et al. Optimization of fermentation conditions and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies[J]. *Food Research and Development*, 2023, 44(10): 107-115.]
- [24] 陈惠敏, 吴晓平, 汪少芸. 黑豆粕饮料发酵工艺的优化及其抗氧化活性评价[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(5): 129-138. [CHEN H M, WU X P, WANG S Y. Optimization of fermentation process of black soybean meal beverage and evaluation of its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(5): 129-138.]
- [25] 朱立斌, 朱丹, 牛广财, 等. 毛酸浆乳酸发酵工艺优化及其抗氧化活性[J]. *食品科技*, 2020, 45(7): 50-56. [ZHU L B, ZHU D, NIU G C, et al. Optimization of lactic acid fermentation process of *Physalis pubescens* and its antioxidant activity[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(7): 50-56.]
- [26] 张微漾, 陈毅保, 王怡雯, 等. 花生粕固态发酵产物的抗氧化活性研究[J]. *粮食与油脂*, 2023, 36(9): 123-127. [ZHANG W Y, CHEN Y B, WANG Y W, et al. Study on the antioxidant activity of solid-state fermentation products of peanut meal[J]. *Grain and Oils*, 2023, 36(9): 123-127.]
- [27] 宋茹, 夏宇, 韦荣编, 等. 枯草芽孢杆菌转化鱿鱼墨制备抗氧化型发酵液[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(3): 78-85. [SONG R, XIA Y, WEI R B, et al. Preparation of antioxidant fermentation broth from squid ink transformed by *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(3): 78-85.]
- [28] 杨玉蓉, 李安平, 钟政昌, 等. 桃仁多肽螯合亚铁的结构表征及体外模拟消化[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(2): 61-69. [YANG Y R, LI A P, ZHONG Z C, et al. Structural characterization and *in vitro* simulated digestion of peach kernel polypeptide chelated ferrous iron[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(2): 61-69.]
- [29] Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee[R]. Rome: World Health Organization Technical Report Series, 1973(522): 1-118.
- [30] 李平, 杨婷, 周辉, 等. 干腌火腿中生物活性肽功能特性研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(11): 278-283. [LI P, YANG T, ZHOU H, et al. Research progress on functional properties of bioactive peptides in dry-cured ham[J]. *Food Science*, 2021, 42(11): 278-283.]
- [31] RANATHUNGA S, RAJAPAKSE N, KIM S. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*)[J]. *European Food Research & Technology*, 2006, 222(3-4): 310-315.
- [32] CAO X H, WEN H B, LI C J, et al. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins[J]. *Journal of Cereal Science*, 2009, 50(2): 184-189.
- [33] 谭力铭, 曹妍, 裴海生, 等. 酶法制备酸枣仁 ACE 抑制肽理化性质研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(2): 84-92. [TAN L M, CAO Y, PEI H S, et al. Study on the physicochemical properties of ACE inhibitory peptides from jujube seeds prepared by enzymatic method[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2022, 43(2): 84-92.]