

枯草芽孢杆菌发酵牦牛血制备抗氧化肽工艺优化

Optimization of fermentation conditions for preparation of antioxidant peptides from Yak blood antioxidant peptides with *Bacillus subtilis*

杜 昕¹ 肖 岚^{1,2} 李 诚¹ 温 馨¹ 田 甜¹

DU Xin¹ XIAO Lan^{1,2} LI Cheng¹ WEN Xin¹ TIAN Tian¹

周恒量¹ 宋丽坤¹ 刘 静¹ 范尹译²

ZHOU Heng-liang¹ SONG Li-kun¹ LIU Jing¹ FAN Yin-yi²

(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川旅游学院食品科学系, 四川 成都 610100)

(1. College of Food, Sichuan Agriculture University, Ya'an, Sichuan 625014, China;

2. Department of Food Science, Sichuan Tourism University, Chengdu, Sichuan 610100, China)

摘要:为优化枯草芽孢杆菌液态发酵制备牦牛血抗氧化肽工艺,以酵解液的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除率为主要指标,研究发酵时间、接种量、底物浓度对酵解液抗氧化效果的影响,在该基础上进行响应面优化试验。确定最佳发酵条件为:底物浓度 75 g/L,接种量 2.5%(V/V),发酵时间 69.5 h。在该条件下制备出 $\cdot\text{OH}$ 清除率为 74.48%的牦牛血抗氧化肽, $\cdot\text{OH}$ 清除率理论值为 75.78%,最终发酵上清液多肽含量为 2.31 mg/mL。

关键词:牦牛血;抗氧化肽;发酵;枯草芽孢杆菌

Abstract: In order to optimize fermentation conditions for production preparation of Yak blood antioxidant peptides with *Bacillus subtilis*, $\cdot\text{OH}$ scavenging rate was taken as index to analyze the effects of fermentation time, inoculum concentration, substrate concentration on the antioxidant result with response surface methodology. The optimum fermentation conditions were determined as follows: 75 g/L of substrate concentration, 69.5 h of fermentation time, 2.5% (V/V) of inoculum concentration. Under such conditions, the $\cdot\text{OH}$ scavenging rate was 74.48%, which was close to the theoretical value of 75.77%. Eventually, the content of peptides in fermented supernatant was 2.31 mg/mL.

Keywords: yak blood; antioxidant peptide; fermentation; *Bacillus subtilis*

中国牦牛资源丰富,饲养量占世界牦牛总数的 90% 以上,具有明显的数量优势^[1-2]。鉴于其生存环境的特殊性——几乎无任何污染,故牦牛原料产品属于真正的绿色产品。牦牛血作为主要的屠宰废弃物,蛋白含量明显高于其他畜禽血^[3],具有更广阔的开发利用前景。

随着生物技术发展,蛋白质中的生物活性多肽功能逐渐被发现。抗氧化肽可以有效清除体内活性氧和自由基,其通常由 5~12 个氨基酸组成,分子量小于 6 kD,具有易吸收、安全、无毒等特点,成为国内外研究的重点^[4-8]。将抗氧化肽作为抗氧化剂添加到食品体系中,不仅可以减少储存过程中的氧化变化^[9],其保水性、起泡性及乳化性等特性还可为食品体系带来特殊的功效^[10]。此外,抗氧化肽可直接作为功能食品,通过保护肌肉免受氧化损伤来抑制其老化,并为健康老龄化提供多功能营养支持^[11-13]。目前抗氧化肽制备方法多集中在酶解法^[14-15],但其商业酶选择少,成本较高,蛋白利用率低不适合大规模生产。发酵法制备生物活性肽具有成本低,得率高等优点,近年来成为研究热点。目前已有研究者利用枯草芽孢杆菌发酵花生粕^[16]、菜籽粕^[17]、小米糠^[18]、猪血^[19-20]等原料抗氧化肽,但利用牦牛血制备抗氧化肽的研究迄今为止未见报道。

为高效利用牦牛血蛋白资源,制备天然抗氧化肽,本研究拟采用枯草芽孢杆菌液态发酵方式,分别采用单因素试验和响应面试验优化制备牦牛血抗氧化肽的最佳液态发酵工艺,旨在牦牛血多肽的抗氧化活性研究、分离纯化以及进一步生产利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牦牛血:雅安汉源大渡河牦牛厂;

基金项目:四川省教育厅重点项目(编号:15ZA0316)

作者简介:杜昕,女,四川农业大学在读硕士研究生。

通讯作者:李诚(1964—),男,四川农业大学教授,博士生导师。

E-mail:lichenglp@163.com

肖岚(1982—),女,四川旅游学院讲师,博士。

E-mail:30430664@qq.com

收稿日期:2015-09-25

枯草芽孢杆菌: SICC1.197, 四川省微生物资源平台菌种保藏中心;

其他化学试剂: 均为分析纯。

1.2 仪器与设备

酸度计: PHS-3C⁺ 型, 成都世纪方舟科技有限公司;
移液枪: freshman 型, 美国 Thermo 公司;
高速冷冻离心机: D37520 型, 美国 Thermo Fisher 公司;
恒温振荡器: THZ-98AB 型, 上海一恒科学仪器有限公司;
数显恒温水浴锅: HH-6 型, 国华电器有限公司;
紫外分光光度计: UV-3200 型, 上海 Mapada 公司;
手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器: DSX-280A 型, 上海申安医疗器械厂;
超纯水装置: ULUP-IV-10T 型, 西安优普仪器设备有限公司。

1.3 培养基

基础培养基: 10 g/L 葡萄糖, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 牛肉膏, 5 g/L 氯化钠, 20 g/L 琼脂, pH 7.0;
种子培养基: 10 g/L 葡萄糖, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 牛肉膏, 5 g/L 氯化钠, pH 7.0;
试验发酵培养基: 以牦牛血为底物的培养基。

1.4 试验方法

1.4.1 菌株的活化与种子液制备 将实验室保存的菌种接到基础培养基上于 35 ℃ 条件下静置培养 24 h, 使菌种活化。挑取活化后的枯草芽孢杆菌, 接入装有 50 mL 种子培养基的锥形瓶中, 置于恒温振荡器中扩大培养, 温度 35 ℃, 转速 135 r/min, 培养 12 h, 得到试验用种子液(10⁹ 个/mL)。
1.4.2 发酵培养 将装有 50 mL 发酵培养基的 150 mL 锥形瓶进行高压灭菌(121 ℃、15 min), 冷却后接入一定体积活化后的枯草芽孢杆菌, 置于恒温振荡器中液体发酵。发酵结束后取样分析。

1.4.3 酵解液处理 将发酵一定时间的发酵产物取出, 于 6 000 r/min 条件下离心 15 min, 取上清液保存备用。

1.4.4 牦牛血抗氧化肽制备工艺单因素试验

(1) 发酵底物浓度对酵解液 · OH 清除率的影响: 分别配制不同底物浓度牦牛血(30, 50, 70, 90, 110, 130 g/L) 作为发酵培养基, 121 ℃、15 min 高压灭菌, 接种量为 3%(V/V), 发酵 72 h, 考察发酵上清液 · OH 清除率的变化。
(2) 接种量对酵解液 · OH 清除率的影响: 配制底物浓度为 70 g/L 的牦牛血培养基, 121 ℃、15 min 高压灭菌, 分别接种 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%(V/V) 种子液, 发酵 72 h, 考察发酵上清液 · OH 清除率的变化。
(3) 发酵时间对酵解液 · OH 清除率的影响: 配制底物浓度为 70 g/L 的牦牛血培养基, 121 ℃、15 min 高压灭菌, 接种量为 3%(V/V), 分别发酵 36, 38, 60, 72, 84, 96 h, 考察发酵上清液 · OH 清除率的变化。

1.4.5 · OH 清除率测定 根据张凤英^[21]测定方法修改如下: 各试管中加入 1 mL 待测样品溶液, 分别加入 1 mL

9 mmol/L 水杨酸—乙醇溶液与 1 mL 9 mmol/L FeSO₄ 混合均匀, 最后加入 1 mL 8.8 mmol/L H₂O₂ 混匀, 静置于 37 ℃ 水浴锅保温 30 min, 采用紫外—可见分光光度计测 OD_{510 nm}。空白组以超纯水代替样品溶液, 对照组以超纯水代替除样品以外 3 种溶液。样品对羟基自由基的清除率按式(1)计算:

$$c = \frac{1 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:
c——·OH 清除率, %;
A₀——空白组的吸光值;
A₁——试验组的吸光值;
A₂——对照组的吸光值。

1.4.6 多肽含量及肽得率的测定 根据陈昌琳等^[22]测定方法修改如下: 取 4 mL 待测样品加入等体积 15%(m/V) 的三氯乙酸(TCA), 混合均匀后静置, 待大分子蛋白沉淀, 6 000 r/min 离心 15 min, 采用 Lowry 法测定上清液蛋白质含量, 计为上清液中多肽含量。牦牛血中粗蛋白含量测定采用凯氏定氮法(GB/T 5009.5—2010)。样品肽得率按式(2)计算:

$$c = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%, \tag{2}$$

式中:
c——多肽得率, %;
N₁——上清液中多肽含量, g;
N₂——原料粗蛋白含量, g。

1.4.7 牦牛血化学成分的测定

- (1) 水分含量: 按照 GB 9695.15—2008 执行。
- (2) 灰分含量: 按照 GB 5009.4—2010 执行。
- (3) 粗蛋白质含量: 按照 GB 5009.5—2010 执行。
- (4) 粗脂肪含量: 按照 GB 9695.7—2008 执行。
- (5) 总糖含量: 参照文献[23]。

2 结果与分析

2.1 牦牛血化学成分

牦牛血中化学成分分析见表 1。

表 1 牦牛血中化学成分				
Table 1	Chemical components in yak blood			
	g/100 g			
水分	粗蛋白	粗脂肪	总糖	灰分
78.61	14.76	0.02	0.05	1.01

2.2 单因素试验结果

2.2.1 发酵底物浓度对酵解液 · OH 清除率的影响 由图 1 可知, 发酵上清液 · OH 清除率随底物浓度的增加呈上升趋势, 且在底物浓度为 30~70 g/L 时显著增长(P<0.05), 之后, · OH 清除率趋于平缓。当底物浓度过低时, 蛋白浓度过低导致多肽产量低; 当底物浓度达到饱和后, 使水分活度降低, 不利于底物水解充分, 导致抗氧化能力趋于平稳^[24]。因此选取 70 g/L 为最佳底物浓度。

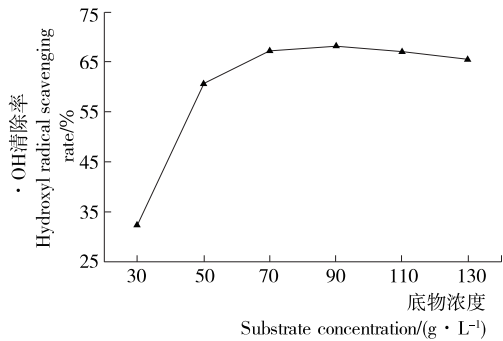


图 1 底物浓度对 ·OH 清除率的影响

Figure 1 The effect of substrate concentration on ·OH scavenging rate

2.2.2 发酵时间对酵解液 ·OH 清除率的影响 由图 2 可知,发酵上清液 ·OH 清除率随发酵时间加长而逐渐提高,当发酵时间为 72 h 时达到最高值(68.79%),之后再延长发酵时间,·OH 清除率下降。发酵时间对 ·OH 清除率影响显著($P<0.05$),可能是发酵初期随着时间的延长,产生的蛋白酶不断增加,水解得到目的肽段多使抗氧化能力提高,而后随发酵的进行,已获得的目的肽段被进一步水解成不具有活性的小肽或氨基酸,导致发酵上清液整体抗氧化能力降低^[16, 25]。因此选取 72 h 为最佳发酵时间。

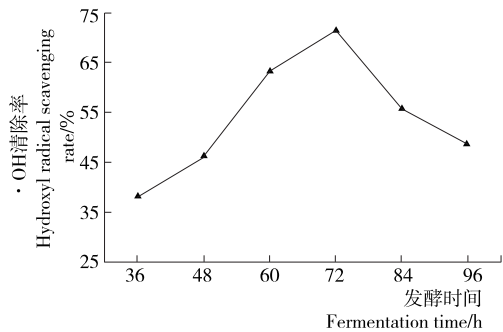


图 2 发酵时间对 ·OH 清除率的影响

Figure 2 The effect of fermentation time on ·OH scavenging rate

2.2.3 发酵接种量对酵解液 ·OH 清除率的影响 由图 3 可知,发酵上清液 ·OH 清除率随接种量增加显著提高($P<0.05$),在接种量为 2%(V/V)时达到最高值(72.48%),之后再增加接种量,·OH 清除率下降。可能是接种量过小时,发酵过程中活菌数少,代谢蛋白酶不足,不能充分利用底物蛋白产生目的肽,使发酵效率低下;接种量达到一定量值后,受到培养基营养物质限制,大量菌体生长引起供氧不足,代谢废物过多,且对底物蛋白的消耗高于酶解生成多肽物质,使抗氧化能力逐渐降低。因此选取 2%(V/V)为最佳接种量。

2.3 牦牛血抗氧化肽制备工艺响应面试验

根据单因素试验结果,以发酵底物浓度、发酵时间、接种量为相应变量,·OH 清除率作为响应值,进行 3 因素 3 水平的响应面优化试验,得出制备牦牛血抗氧化肽的最佳工艺。试验因素水平编码见表 2。

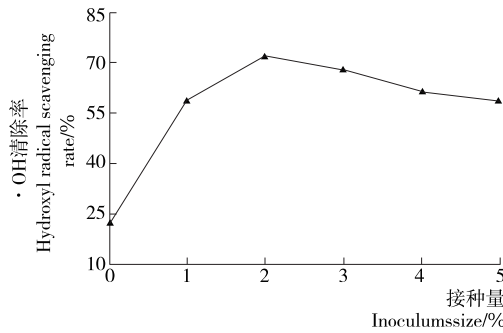


图 3 接种量对 ·OH 清除率的影响

Figure 3 The effect of inoculum size on ·OH scavenging rate

表 2 Box-Behnken 设计试验因素水平及编码

Table 2 Variables and their coded values used in the Box-Behnken design

水平	A 底物浓度/(g · L ⁻¹)	B 发酵时间/h	C 接种量/(V/V)
1	50	60	1
0	70	72	2
-1	90	84	3

2.3.1 模型建立与显著性检验 利用 Design Expert 软件中的 Box-Behnken 试验设计对试验数据进行多元回归拟合分析,因素编码表及结果见表 3。对该模型进行方差分析,结果见表 4。

对表 3 中数据进行回归拟合分析,以上清液 ·OH 清除率为响应值(Y),得到各因素对响应值的二次多项回归方程为:

$$Y = 73.99 + 4.25A - 5.68B + 4.19C + 2.31AB - 0.74AC + 0.44BC - 6.84A^2 - 12.6B^2 - 6.09C^2. \quad (3)$$

表 3 响应面试验设计方案及分析结果

Table 3 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A	B	C	·OH 清除率/%
1	0	1	1	55.90
2	0	0	0	73.94
3	0	0	0	74.56
4	-1	0	1	60.76
5	0	1	-1	45.49
6	1	0	-1	62.84
7	-1	1	0	41.64
8	1	-1	0	62.84
9	0	-1	-1	55.60
10	0	-1	1	64.24
11	1	1	0	53.97
12	-1	-1	0	59.76
13	-1	0	-1	52.05
14	0	0	0	73.48
15	1	0	1	68.59

表 4 方差与显著性分析[†]

Table 4 Analysis of varlance and significance test						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 364.16	9	151.57	55.62	0.000 2	**
A	144.76	1	144.76	53.12	0.000 8	**
B	258.10	1	258.10	94.71	0.000 2	**
C	140.37	1	140.37	51.51	0.000 8	**
AB	21.39	1	21.39	7.85	0.037 9	*
AC	2.19	1	2.19	0.80	0.411 0	
BC	0.78	1	0.78	0.29	0.614 9	
A ²	172.96	1	172.96	63.47	0.000 5	**
B ²	585.88	1	585.88	215.00	<0.000 1	**
C ²	136.90	1	136.90	50.24	0.000 9	**
残差	13.63	5	2.73			
失拟	13.04	3	4.35	14.80	0.064 0	不显著
纯误差	0.59	2	0.29			
总和	1 377.79	14				

[†] ** . 极显著差异(P<0.01); * . 显著差异(P<0.05)。

由表 4 可知,该模型中,A、B、C、AB、A²、B²、C²对上清液·OH 清除率影响显著,即底物浓度、发酵时间、接种量以及底物浓度与发酵时间的交互作用对发酵上清液的·OH 清除率有显著影响。在该模型中,响应面回归模型极显著(P<0.01),失拟项不显著;且该模型 $R^2 = 0.990\ 1$, $R^2_{Adj} = 0.972\ 3$,说明该模型能解释 97.23%的相应变化值,即使用该回归方程模拟实际试验点对·OH 清除率影响是可行的。

通过回归方程所作出响应面图见图 4,可直观反映底物浓度与发酵时间(AB)交互作用对发酵上清液·OH 清除率的影响,且响应面曲面坡度较陡,说明交互作用对响应值影响较显著,与表 4 结果一致。

2.3.2 最佳工艺条件的验证 由方程(3)预测得到最佳发酵条件为:底物浓度 75.20 g/L,发酵时间 69.64 h,接种量 2.32%(V/V),此时·OH 清除率理论值为 75.78%。为方便验证,将参数修正为底物浓度 75.0 g/L、发酵时间 69.5 h、接种量 2.5%(V/V),经重复实验 3 次,测得牦牛血抗氧化肽平均·OH 清除率为 74.48%,接近于理论值。

2.4 多肽含量及肽得率的测定

根据响应面试验优化结果,最终发酵上清液的多肽含量为 2.31 mg/mL,未发酵牦牛血中多肽含量为 0.09 mg/mL,显著提高了多肽含量,且肽得率为 20.87%。

3 结论

通过单因素试验考察了底物浓度、发酵时间、接种量对发酵液上清液·OH 清除率的影响,并通过响应面分析法研究牦牛血抗氧化肽制备工艺,得出牦牛血抗氧化肽最佳制备工艺为:底物浓度 75 g/L、发酵时间 69.5 h、接种量 2.5%(V/V),此时多肽含量为 2.31 mg/mL,·OH 清除率为 74.48%。

本试验确定的牦牛血抗氧化肽制备工艺可为牦牛血的综合利用提供一定的参考数据,但其分离纯化工艺还有待进一步研究。

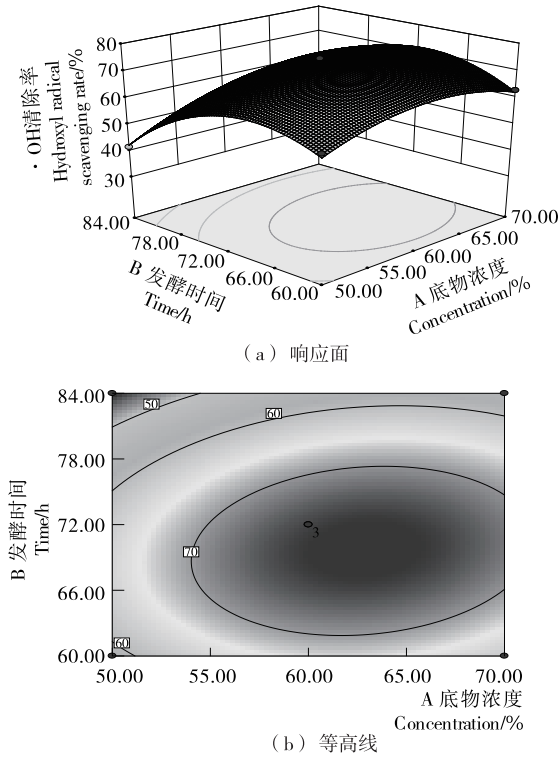


图 4 底物浓度与发酵时间交互作用对发酵上清液·OH 清除率的影响
Figure 4 Response surface plot and contour plot for effects of substrate concentration and fermentation time on ·OH scavenging rate

参考文献

[1] 杨斌,陈峰,魏彦杰,等. 牦牛肉加工与发展现状[J]. 肉类工业, 2010(5): 51-53.

[2] 阎萍,潘和平. 中国牦牛遗传资源多样性保护及利用[C]// 河北省畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会养牛学分会第六届会员代表大会论文集. 石家庄:[出版者不详], 2005: 18-21.

[3] 邱翔,张磊,文勇立,等. 四川牦牛、黄牛主要品种肉的营养成分分析[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 112-116.

[4] 武万兴,陈朝银,赵声兰,等. 固态发酵核桃粕制备活性肽及其抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2013(16): 266-271.

[5] Wasan K M. The role of lymphatic transport in enhancing oral protein and peptide drug delivery[J]. Drug Dev. Ind. Pharm. , 2002, 28(9): 1 047-1 058.

[6] Xie Zheng-jun, Huang Jun-rong, Xu Xue-ming, et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 370-376.

[7] Manso M A, Miguel M, Even J, et al. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2008, 109(2): 361-367.

[8] Hartmann R, Wal J M, Bernard H, et al. Cytotoxic and allergenic potential of bioactive proteins and peptides [J]. Curr. Pharm. Des. , 2007, 13(9): 897-920.

(下转第 205 页)

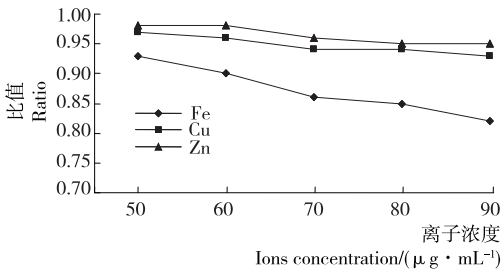


图 3 不同金属离子对红曲色素色价的影响
Figure 3 The influence of different metal ions on monascus pigment

3 结论

作为食用色素要求稳定性要好,这样在使用过程中其化学结构及色泽均不易发生变化。红曲色素稳定性虽不及合成色素,但作为天然色素安全性高。从试验数据来看,红曲色素在常温下比较稳定,其相关产品能够满足食品饮料加工过程中的中、高温消毒要求,为了保证米粒的完整和色素的稳定,在红曲米酒的生产中建议用巴氏杀菌工艺。光照能够引发红曲色素光解,不同光照条件下红曲色素色价都有下降的趋势,所以为了更好地保持红曲色素稳定性,红曲米酒应避光保存。不同金属离子对红曲色素的影响各不相同,离子的氧化性越强,对红曲色素的影响越大;李浩然等^[8]在红曲色素稳定性研究中提到,红曲色素对 pH 是稳定的,不像其他因素那样因 pH 改变而颜色变化显著。虽然现在食用色素仍以合成色素为主,但随着经济的发展,人们生活品质的提高及功能食品的开发,以及对红曲霉研究的深入,更多的红曲发酵产品或双向发酵药品^[13]在食品乃至药品生产中将有更广泛的应用价值。

参考文献

[1] 甘纯玑, 彭时尧. 红曲色素资源的利用现状与开发展望[J]. 自然资源学报, 1998(7): 273-275.

[2] 李浩然, 冯雅丽, 伍军. 降脂红曲研究进展[J]. 北京农学院学报, 2001, 16(3): 80-85.

[3] 许杨, 李燕萍, 赖卫华, 等. 不同培养条件对红曲霉产桔霉素影响的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(10): 33-35.

[4] Treiber L R, Reamer R A, Rooney C S, et al. Origin of monacolin from *Aspergillus Terreus* cultures[J]. Jantibiot, 1989, 42(1): 30-36.

[5] 沈珺珺, 曾柏全, 王卫, 等. 红曲米的代谢功能及其应用研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 294-298.

[6] Silvana T S. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design[J]. Swiss Society of Food Science and Technology, 2008(41): 170-174.

[7] 嵇豪, 蒋冬花, 叶砚, 等. 红曲色素的提取工艺及其稳定性研究[J]. 中国调味品, 2010, 35(7): 86-89.

[8] 李浩然, 杜竹玮, 张剑锐. 红曲色素稳定性研究[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 59-62.

[9] 陈义光, 彭德娇, 张晓蓉, 等. pH 对红曲霉产红曲色素的影响[J]. 湖北农学院学报, 2002, 22(2): 147-149.

[10] 杨成龙, 杨晓君, 邓思珊, 等. 几种维生素对红曲霉 S 产色素的影响[J]. 福建农业学报, 2014, 29(3): 266-27.

[11] 杨建, 胡川, 王伟平. pH 对红曲霉固态发酵代谢产物的影响[J]. 中国调味品, 2015, 40(3): 55-59.

[12] 李永波, 宋丽莎, 肖国学, 等. 高产红曲色素菌株筛选[J]. 黔南民族师范学院学报, 2010, 30(6): 43-47.

[13] 谢炎福, 杜苗苗. 红曲霉和虎杖共发酵体系的研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 272-275.

(上接第 168 页)

[9] Fan Jian, He Jin-tang, Zhuang Yong-liang, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) frame protein[J]. Molecules, 2012, 17(11): 12 836-12 850.

[10] Chalamaiah M, Dinesh K B, Hemalatha R, et al. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review [J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 3 020-3 038.

[11] Marzani B, Balage M, Venien A, et al. Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats[J]. J. Nutr., 2008, 138(11): 2 205-2 211.

[12] Power O, Jakeman P, Fitz Gerald R J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides [J]. Amino Acids, 2013, 44(3): 797-820.

[13] Takenaka A, Annaka H, Kimura Y, et al. Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2003, 67(2): 278-283.

[14] 顾明广, 苏芳, 刘艳霞. 酶解鱼皮胶原蛋白制备抗氧化肽工艺研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 149-151.

[15] 金杜欣, 刘晓兰, 郑喜群. Alcalase 和 Flavourzyme 协同修饰玉

米蛋白制备抗氧化活性蛋白水解物[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 25-31.

[16] 张友维, 张晖, 王立, 等. 枯草芽孢杆菌发酵制备花生多肽及其自由基清除活力的研究[J]. 中国油脂, 2011(10): 25-29.

[17] 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(12): 12-20.

[18] 郭利娜, 朱玉, 刁明明, 等. 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[J]. 食品科学, 2014, 36(13): 197-201.

[19] 方俊. 猪血多肽的制备及其生物活性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006: 58-61.

[20] 万佳蓉, 马美湖, 周传云. 多菌种混合发酵猪血的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 50-53.

[21] 张凤英. 猪血红蛋白的酶解及其产物抗氧化活性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009: 18-19.

[22] 陈昌琳, 李诚, 付刚, 等. 超声波辅助酶解制备猪肩胛骨降血压肽的工艺及酶解效果比较[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 217-226.

[23] 郭善广. 猪血血红蛋白酶解及其酶解产物抗氧化活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2007: 27.

[24] 刘显儒. 复合菌液态发酵米糠制备 ACE 抑制肽[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2013: 30-36.

[25] 余勃, 陆兆新. 发酵豆粕生产大豆多肽研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 189-192.