

菌酶协同发酵水解牦牛乳酪蛋白产ACE抑制肽 工艺优化与肽段鉴定及稳定性分析

王樱洁¹, 郑亮², 张诗琦¹, 宛祎豪¹, 李静¹, 陈炼红^{1*}

(1. 西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610041)

(2. 炉霍康巴圣德牦牛产业有限公司, 四川甘孜 626500)

摘要: 以牦牛乳酪蛋白为原料, 制备具有血管紧张素转移酶 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) 抑制活性的食源性多肽。采用脱脂乳平板法和福林酚法从牦牛酸乳中筛选出 1 株具有产 ACE 抑制肽潜力的菌株, 将其与五种蛋白酶联合水解牦牛乳酪蛋白, 以水解度、ACE 抑制率、肽浓度和 pH 值为指标, 确定最佳蛋白酶, 采用正交试验进行菌酶协同发酵水解工艺优化。利用超滤和葡聚糖凝胶 G-15 对牦牛乳酪蛋白 ACE 抑制肽进行分离纯化, 并用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 鉴定其氨基酸序列。测定温度、pH 值、缓冲盐体系对其稳定性影响。结果表明: 筛选出 ACE 抑制率为 43.29% 的潜力菌株发酵乳杆菌 187, 最佳蛋白酶为碱性蛋白酶, 其最佳的酶解制备工艺参数为: 酶与底物比为 767 U/g, 乳酸菌接种量为 5%, 酶解时间为 10 h, 酶解温度为 37 ℃, 底物 pH 值为 7.0; 超滤和葡聚糖凝胶 G-15 分离得到 G2 肽组分 ($IC_{50}=0.28$ mg/mL) 具有良好的降压效果; G2 肽组分还具有良好的热稳定性、酸碱稳定性和盐稳定性; 此外, 经 LC-MS/MS 共鉴定筛选出 9 条肽序列。该研究结果为菌酶协同发酵水解牦牛乳酪蛋白产降压肽的开发利用提供理论参考。

关键词: 菌酶协同发酵; ACE 抑制肽; 超滤; 葡聚糖凝胶 G-15; 液相色谱-串联质谱

文章编号: 1673-9078(2025)08-92-103

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.8.0780

ACE-Inhibitory Peptide Production Optimization from Yak Buttermilk Casein Hydrolyzed via Co-Fermentation with Bacterial Enzymes, Peptide Fragment Identification, and Stability Analysis

WANG Yingjie¹, ZHENG Liang², ZHANG Shiqi¹, WAN Yihao¹, LI Jing¹, CHEN Lianhong^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

(2. Luhuo Kangbashengde Yak Industry Co. Ltd., Ganzi 626500, China)

Abstract: The preparation of food-derived peptides with angiotensin transferase (ACE)-inhibitory activity from yak buttermilk casein hydrolyzed via co-fermentation with bacterial enzymes, peptide fragment identification, and stability analysis [J].

王樱洁, 郑亮, 张诗琦, 等. 菌酶协同发酵水解牦牛乳酪蛋白产ACE抑制肽工艺优化与肽段鉴定及稳定性分析[J]. 现代食品科技, 2025, 41(8): 92-103.

WANG Yingjie, ZHENG Liang, ZHANG Shiqi, et al. ACE-Inhibitory peptide production optimization from yak buttermilk casein hydrolyzed via co-fermentation with bacterial enzymes, peptide fragment identification, and stability analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(8): 92-103.

收稿日期: 2024-06-03

基金项目: 2023 年中央财政林业科技推广示范资金项目

作者简介: 王樱洁 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 271305633@qq.com

通信作者: 陈炼红 (1967-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 民族食品资源开发, E-mail: lianhong__chen@163.com

yak milk casein was explored. One strain with the potential to produce ACE-inhibitory peptides was screened from sour yak milk using the skimmed milk plate and Lowry methods and was combined with five proteases to hydrolyze yak milk casein. Hydrolysis degree, ACE inhibition rate, peptide concentration, and pH were used as indices to determine the optimal proteases, and the hydrolysis process was optimized via bacteria-enzyme cofermentation and hydrolysis using an orthogonal test. An ACE-inhibitory peptide from yak milk casein was isolated and purified using ultrafiltration and dextran gel G-15, and its amino acid sequence was determined using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The effect of temperature, pH, and a buffer salt system on its stability was determined. The potential strain *Lactobacillus fermentum* 187 with 43.29% ACE inhibition was screened, and the optimal protease was alkaline protease, with optimal enzyme preparation process parameters including an enzyme-to-substrate ratio of 767 U/g, 5% lactobacillus inoculation, an enzyme digestion time of 10 h, an enzyme digestion temperature of 37 °C, and a substrate pH of 7.0. The G2 peptide fraction ($IC_{50}=0.28$ mg/mL) was separated via ultrafiltration and dextran gel G-15 and exhibited a promising antihypertensive effect; the G2 peptide fraction also has good thermal, acid-base, and salt stability. In addition, a total of nine peptide sequences were identified by LC-MS/MS. The results of this study provide a theoretical reference for the development and utilization of bacterial and enzymatic co-fermentation and the hydrolysis of yak casein to produce antihypertensive peptides.

Key words: synergistic fermentation of bacterial enzymes; ACE-inhibitory peptides; ultrafiltration; dextran gel G-15; liquid chromatography tandem mass spectrometry

高血压 (Hypertension) 目前是我国及世界范围内发病率极高的慢性病, 也是各类心脑血管疾病的重要诱因^[1,2]。血管紧张素转化酶 (ACE) 是治疗高血压的理想靶标^[3]。目前用于临床治疗高血压的合成 ACE 抑制剂已有许多, 如卡托普利、培哚普利等, 然而, 长期使用这些药物可能会引起干咳和头痛等不良反应^[4]。

牦牛乳酪蛋白含量约为 34.29~45.78 g/L, 普通牛乳中酪蛋白含量约为 26.8 g/L, 牦牛乳酪蛋白含量高于普通牛乳, 是制备 ACE 抑制肽的良好来源^[5]。通过食源性蛋白获得的 ACE 抑制肽, 因天然食物来源, 其展现出卓越的可靠性、非毒性以及高度的安全性, 对人体的健康更有保障^[6,7]。近年来, 乳酸菌作为益生菌在食品、医药和相关领域获得了显著的发展和运用。它们在癌症抑制^[8]、降低血清胆固醇^[9]、糖尿病治疗^[10]和肥胖管理^[11]等领域显示出巨大的潜力。乳酸菌发酵牦牛乳的过程中, 乳酸菌细胞壁蛋白酶可分解乳蛋白产生 ACE 抑制肽^[12]。ACE 抑制肽的主要方法为酶解法和发酵法, 实际生产中, 通常将这两种方法协同使用制备生物活性肽。菌酶协同发酵是一种先进的生物技术, 它结合了微生物发酵和酶解过程的优点, 以实现更高效、更优质的发酵效果, 克服了单纯酶解所带来的功能元素缺失等问题^[13]。Jiang 等^[14]采用钙溶解环法筛选具有 ACE 抑制活性的菌株, 应用于功能性乳品中; Adams 等^[15]利用菌种对酪蛋白进行发酵, 发现

活性多肽 VPP (缬氨酸-脯氨酸-脯氨酸) 和 IPP (异亮氨酸-脯氨酸-脯氨酸)。邹俊哲等^[16]使用植物乳杆菌 2-18 和枯草芽孢杆菌 Y、枯草芽孢杆菌 Y4-2 联合蛋白酶协同发酵水解大米蛋白获得 ACE 抑制肽。

本研究以牦牛乳酪蛋白为原料, 通过蛋白酶辅助乳酸菌发酵水解牦牛乳酪蛋白制备 ACE 抑制肽, 经单因素及正交试验确定最佳菌酶协同工艺, 通过超滤膜分离制备具有较高活性的低聚肽。旨在为牦牛乳来源降血压肽的研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验室已鉴定保存的 200 株乳酸菌菌株 (源自牦牛酸乳), 由西南民族大学食品科学与技术学院实验室保藏; 牦牛乳酪蛋白 (干酪素), 炉霍康巴圣德牦牛产业有限公司; 血管紧张素转化酶 (ACE)、马尿酸-组氨酸-亮氨酸水合物 (HHL), 美国 Sigma; 碱性蛋白酶 (Alcalase, 69 000 U/g), 诺维信酶制剂有限公司; 葡聚糖凝胶 G-15, 上海源叶生物科技有限公司; 所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

3 kDa 超滤管 (UFC900396)、10 kDa 超滤管 (UFC901096), 成都述而作科技有限公司; 玻璃层析

柱 (1.6×50 cm)，安徽淮永玻璃仪器有限公司；AKTA 蛋白层析系统，北京凌美思创；ThermoEASy_{nlc} 液相色谱仪色谱柱 (75 μm i.d.×150 mm、PepMap RSLC C18, 2 μm, 100Å, nanoViper)、ScientificQ Exactive™ 质谱仪，均为美国 Thermo。

1.3 实验方法

1.3.1 产蛋白酶乳酸菌的初筛

参考刘佟^[17]方法并作适当修改，采用脱脂乳平板法初筛降解蛋白能力较强的菌株，将活化两代后的乳酸菌菌种于脱脂乳固体培养基平板，37℃培养 24 h 后，采用游标卡尺测量蛋白透明圈直径 (D) 和菌落直径 (d)，计算两者比值 (D/d)。

1.3.2 蛋白酶活力测定

参考张咚咚^[18]、于豪杰^[19]的方法并作适当修改，制作 L-酪氨酸标准曲线，配制成 0、10、20、30、40、50 μg/mL 的质量浓度，曲线方程的 K 值 (K 值为当吸光度为 1 时对应的 L-酪氨酸浓度) 应在 95~100 范围之内 ($y=0.0101x+0.0057$, $R^2=0.9991$, $K=98.46$)，然后将菌株活化 2 代后，离心 (4℃, 8 000 r/min, 5 min) 取 1 mL 上清液并用 PBS 缓冲液稀释 50 倍，按照 GB/T23527-2009 中福林法测定初筛得到的菌株蛋白酶活力。酶活力按以下公式进行计算：

$$X=\frac{A\times K\times V\times n}{t}$$
(1)

式中：

- X——酶活力，U/mL；
- A——溶液吸光度；
- K——L-酪氨酸标准曲线吸光常数，μg/mL；
- V——反应试剂体积，mL；
- t——酶解反应时间，此处为 10 min；
- n——酶液稀释总倍数，此处为 50。

1.3.3 具有水解牦牛乳酪蛋白产ACE抑制肽潜力乳酸菌的复筛

参考刘璐^[20]、姚春旭^[21]的方法并稍作修改，利用 PBS 缓冲液 (pH 值 7.0, 0.05 mol/L) 配制 5% 的牦牛乳酪蛋白溶液，滴加 1 mol/L NaOH，沸水浴加热 15 min 后，高压蒸汽灭菌 (115℃, 15 min)，用 1.3.1.2 筛选得到蛋白酶活力最高的 5 株菌，在温度 37℃，接种量 5%，发酵时间 12 h 条件下发酵 5% 的酪蛋白溶液，以水解度和 ACE 抑制率为指标，探究 5 株乳酸菌分解酪蛋白产 ACE 抑制肽的潜力，

从中筛选出最适产 ACE 抑制肽的潜力菌株。

1.3.3.1 水解度 (Degree of Hydrolysis, DH) 的测定

采用甲醛滴定法^[22,23]并稍作修改，其中底物蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法^[24]。

$$D=\frac{M\times(V_1-V_0)/(P\times V_2)}{h_{tot}}\times100\%$$
(2)

式中：

- D——水解度 (DH)，%；
- M——NaOH 标准溶液浓度，此处为 0.1 mol/L；
- V₁——样品组消耗 NaOH 标准溶液体积，mL；
- V₀——空白组消耗 NaOH 标准溶液体积，mL；
- V₂——样品溶液体积，mL；
- P——底物蛋白质质量浓度，g/mL；
- h_{tot}——每克蛋白所含的肽键毫摩尔数，此处牛乳酪蛋白为 8.2 mmol/g。

1.3.3.2 ACE抑制活性的测定

表 1 牦牛乳酪蛋白酶解液ACE抑制率测定方法
Table 1 Determination of ACE inhibition in Yak cheese
proteinase solution

试剂	a 样品组 /μL	b 对照组 /μL	c 空白组 /μL
HCl 溶液 (1 mol/L)	0	0	250
HHL 溶液 (5 mmol/L)	200	200	200
样品	100	0	0
37℃水浴预热 5 min			
ACE (0.1 UN/mL)	20		20
37℃水浴反应 30 min			
HCl 溶液 (1 mol/L)	250	250	0
硼酸盐缓冲液 (0.1 mol/L pH 值 8.3)	0	100	100
乙酸乙酯	1 700	1 700	1 700

ACE 抑制活性按表 1 的反应体系进行反应，涡旋振荡混匀 15 s，静置 10 min (萃取每组反应产生的马尿酸)，取 1 mL 上清液于试管中，120℃恒温烘干 30 min 去除试剂，取出冷却后，加 3 mL 蒸馏水，涡旋振荡 15 s，最后测定复溶液在 228 nm 处的 OD 值。

$$E=\frac{B-A}{B-C}\times100\%$$
(3)

式中：

- E——ACE 抑制率，%；
- A——样品组的 OD 值；
- B——对照组的 OD 值；
- C——空白组的 OD 值。

1.4 菌酶协同发酵水解工艺优化

1.4.1 最佳蛋白酶的筛选

参照元艺洁^[25]的方法并稍作修改，将碱性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶分别依次按酶与底物比 613 U/g 的质量分数加入到 5% 无菌牦牛乳酪蛋白溶液中，接入 5% (V/V) 菌种，在 37 ℃ 条件下发酵 0、4、8、12 h 后，测量各组 ACE 抑制率、水解度、肽含量和 pH 值。综合比较各项指标，确定最佳蛋白酶。

1.4.2 单因素试验

固定条件为底物浓度 (m/V) 5%，加酶量 613 U/g，乳酸菌接种量 5%，温度 37 ℃，酶解时间 8 h。将牦牛乳酪蛋白在不同加酶量 (460、613、767、920、1 073 U/g)、接种量 (3%、4%、5%、6%、7%)、酶解时间 (4、6、8、10、12 h)、酶解温度 (35、37、39、41、43 ℃) 及底物 pH 值 (6.5、7.0、7.5、8.0、8.5) 实验条件下进行酶解，以 ACE 抑制率为指标作为考察指标。

1.4.3 正交试验及验证试验

如表 2，根据单因素实验，以加酶量、接种量、酶解时间和底物 pH 值进行 4 因素 3 水平素正交试验，以水解度和 ACE 抑制肽为指标，确定最佳酶解工艺并进行验证。

表 2 正交设计因素与水平考察表
Table 2 Orthogonal design factors and level inspection table

水平	因素			
	A 加酶量 (U/g)	B 乳酸菌接 种量/%	C 酶解 时间/h	D 底物 pH 值
1	613	5	6	6.5
2	767	6	8	7.0
3	920	7	10	7.5

1.5 牦牛乳酪蛋白ACE抑制肽的制备及超滤分离

参考高杰^[26]、陈昶宇^[27]的方法并少许修改，发酵条件按照第 1.4 获得的最佳菌酶联合发酵工艺收集发酵液，于 90 ℃ 水浴锅中放置 10 min 灭酶。将水解后的牦牛酪蛋白 pH 值调至 8.3，(4 ℃，8 000 r/min) 离心 15 min，获得上清液。将 10 mL 上清液于 10 kDa 超滤管中，依次通过分子质量为 3 kDa 和 10 kDa 的超滤膜，经冷冻干燥，测定 ACE 抑制活性和 IC₅₀ 值。

1.6 葡聚糖凝胶 (SephadexG-15) 色谱分离纯化

参考贾向飞等^[28]的方法并作少许修改。色谱条件：凝胶柱：1.6 cm×50 cm；上样量：1 mL；洗脱液为蒸馏水，上样浓度：200 mg/mL，流速：1 mL/min，AKTA 蛋白层析系统紫外检测波长：280 nm。按峰收集各组分，冷冻干燥后测定 ACE 抑制率和 IC₅₀ 值。

1.7 牦牛乳酪蛋白ACE抑制肽的稳定性分析

1.7.1 温度对牦牛乳酪蛋白ACE抑制肽的稳定性影响

将 1.6 节获得的抑制活性最强的 ACE 抑制肽组分制成 1 mg/mL 的样液，分别置于温度为 20、40、60、80、100 ℃ 的水浴中恒温 2 h，测定其 ACE 抑制活性。

1.7.2 pH对牦牛乳酪蛋白ACE抑制肽的稳定性影响

将 1.6 节获得的抑制活性最强的 ACE 抑制肽组分制成 1 mg/mL 的样液，把 pH 调为 2、4、6、8、10 后，室温放置 2 h 后，测其 ACE 抑制活性。

1.7.3 缓冲盐体系对牦牛乳酪蛋白ACE抑制肽的稳定性影响

将 1.6 节获得的抑制活性最强的 ACE 抑制肽组分制成 1 mg/mL 的样液，再将 NaCl 溶液配置成浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L 后，在室温下放置 2 h，测定其 ACE 抑制率。

1.8 LC-MS/MS测定氨基酸序列

表 3 液相色谱设置参数 Table 3 Liquid chromatography setting parameters			
时间/ min	A 相: 0.1% 甲酸	B 相: 0.1% 甲酸, 80% 乙腈	流量 (μL/min)
0.00	95	5	300
5.00	90	10	300
43.00	72	28	300
51.00	62	38	300
53.00	0	100	300

参考王子秦^[29]的方法并稍作修改。将肽段用 20 μL 溶解液 (0.1% 甲酸、5% 乙腈) 溶解，充分振荡涡旋，13 500 r/min，4 ℃ 离心 20 min，上清转移到上样管中，吸取 8 μL 进行质谱鉴定。液相色谱条件：具体参数见表 3。

质谱条件为：

(1) 一级质谱参数：Resolution：120 000，AGC target：4e5，Maximum：IT50 ms，Scan range：350~1 550 *m/z*；

(2) 二级质谱参数：Resolution：30 000，AGC target：1e5，Maximum IT：100 m，TopN：20，NCE/stepped NCE：32。

1.9 数据分析

采用 Microsoft Office Excel 2022 和 SPSS 27.0 对数据进行整理分析，使用 Origin 2023 软件对数据进行作图，所有实验均重复 3 次，显著差异水平取 *P*<0.05。

2 结果与分析

2.1 高产蛋白酶菌株的筛选

2.1.1 产蛋白酶乳酸菌的初筛

D/d 值的大小可一定程度上反映出菌株产酶活力的能力。由表 4 可知，其中 D/d 值最高的三株菌为屎肠球菌 226、干酪乳杆菌 206 和发酵乳杆菌 187，分别为 1.889、1.827、1.801。

2.1.2 产蛋白酶活力的分析比较

2.1.2.1 10株乳酸菌蛋白酶活力

结果如图 1 所示，酶活最强的 5 株菌依次为菌株 206、187、221、213、238。其中以菌株 206 的酶活力最高，为 25.87 U/mL，菌株 171 的酶活最低，为 4.71 U/mL。这与刘超等^[30]对石屏臭豆腐来源的高产蛋白酶菌株筛选的研究中，与其蛋白酶活性接近，最高为 23.25 U/mL，最低为 4.91 U/mL。

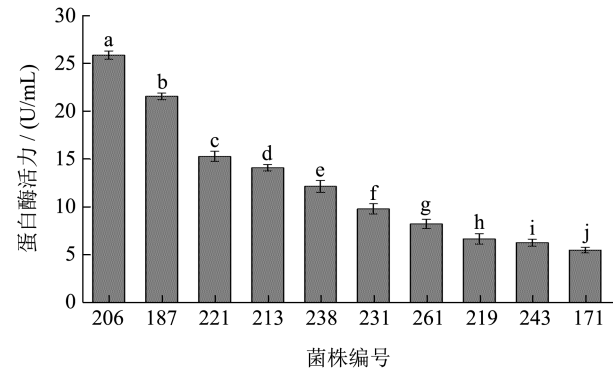


图 1 复筛出的 10 株乳酸菌的蛋白酶活力

Fig.1 Protease activity of 10 strains of lactic acid bacteria screened again

注：图中不同字母表示差异显著（*P*<0.05）。下同。

2.1.2.2 5株乳酸菌对牦牛乳酪蛋白发酵产物的水解度和ACE抑制率的影响

由图 2 可知，各菌株水解度大小差异显著（*P*<0.05），其中发酵乳杆菌 187 水解度和 ACE 抑制活性最高分别为 12.83%、43.29%。综合水解度和 ACE 抑制率，本研究选择发酵乳杆菌 187 进行后续实验。唐蓉等^[31]对酵母菌与乳酸菌发酵马乳产 ACE 抑制肽的研究中，各菌株水解度大小也差异显著。

表 4 30株菌株D/d比值

Table 4 D/d ratio of 30 strains

菌株编号	菌株名称	透明圈直径 D/cm	菌落直径 d/cm	D/d
226	屎肠球菌	8.54 ± 0.19 ^q	4.52 ± 0.18 ^l	1.89 ± 0.05 ^a
206	干酪乳杆菌	10.16 ± 0.59 ^j	5.56 ± 0.59 ^{ij}	1.83 ± 0.04 ^b
187	发酵乳杆菌	8.14 ± 0.46 ^s	4.52 ± 0.21 ^l	1.80 ± 0.38 ^c
186	发酵乳杆菌	10.58 ± 0.86 ^j	6.04 ± 0.43 ^{hg}	1.75 ± 0.44 ^d
220	德氏乳杆菌	7.08 ± 0.02 ^u	4.12 ± 0.22 ^m	1.72 ± 0.25 ^e
221	发酵乳杆菌	9.56 ± 0.59 ^m	5.58 ± 0.78 ^{ij}	1.71 ± 0.17 ^f
238	粪肠球菌	11.06 ± 1.03 ⁱ	6.58 ± 1.23 ^{ef}	1.68 ± 0.14 ^g
171	发酵乳杆菌	9.12 ± 0.89 ^o	5.58 ± 1.33 ^{ij}	1.63 ± 0.02 ^h
231	干酪乳杆菌	15.04 ± 1.32 ^b	9.22 ± 0.72 ^b	1.63 ± 0.06 ^h
285	植物乳杆菌	8.24 ± 0.76 ^r	5.06 ± 0.42 ^k	1.63 ± 0.12 ^h
237	发酵乳杆菌	11.52 ± 0.33 ^f	7.08 ± 0.15 ^{de}	1.63 ± 0.35 ^h
281	戊糖乳杆菌	9.54 ± 0.46 ^m	5.88 ± 0.24 ⁱ	1.62 ± 0.21 ⁱ
223	屎肠球菌	10.58 ± 0.79 ^j	6.56 ± 0.08 ^{ef}	1.61 ± 0.64 ^j
213	副干酪乳杆菌	10.54 ± 1.23 ^{jk}	6.58 ± 0.32 ^{ef}	1.60 ± 0.41 ^k
200	发酵乳杆菌	8.04 ± 2.11 ^t	5.02 ± 0.54 ^k	1.60 ± 0.52 ^k
157	发酵乳杆菌	12.12 ± 1.22 ^e	7.62 ± 0.63 ^d	1.59 ± 0.12 ^l
249	屎肠球菌	9.58 ± 0.42 ^m	6.08 ± 0.71 ^{gh}	1.58 ± 0.35 ^m
248	粪肠球菌	13.54 ± 0.36 ^c	8.62 ± 1.54 ^{bc}	1.57 ± 0.07 ⁿ
219	植物乳杆菌	9.52 ± 0.28 ⁿ	6.08 ± 1.12 ^{gh}	1.57 ± 0.23 ⁿ
257	植物乳杆菌	9.56 ± 0.78 ^m	6.16 ± 0.48 ^g	1.55 ± 0.20 ^o
197	发酵乳杆菌	11.26 ± 0.32 ^g	7.46 ± 0.59 ^d	1.51 ± 0.06 ^p
259	副干酪乳杆菌	11.22 ± 0.41 ^g	7.56 ± 0.44 ^d	1.48 ± 0.41 ^q
271	副干酪乳杆菌	11.16 ± 1.20 ^{gh}	7.58 ± 0.73 ^d	1.47 ± 0.14 ^r
261	干酪乳杆菌	8.22 ± 1.14 ^t	5.62 ± 0.78 ^{ij}	1.46 ± 0.24 ^s
239	短乳杆菌	6.24 ± 0.96 ^v	4.28 ± 0.56 ^{lm}	1.46 ± 0.18 ^s
278	德氏乳杆菌	8.18 ± 0.65 ^s	5.62 ± 0.78 ^{ij}	1.46 ± 0.41 ^s
222	发酵乳杆菌	10.44 ± 0.82 ^k	7.22 ± 1.31 ^d	1.45 ± 0.32 ^t
296	屎肠球菌	9.08 ± 0.86 ^p	6.32 ± 0.65 ^{fg}	1.44 ± 0.46 ^u
214	发酵乳杆菌	12.34 ± 0.37 ^d	8.66 ± 0.94 ^{bc}	1.43 ± 0.05 ^v
243	屎肠球菌	17.14 ± 1.04 ^a	12.18 ± 1.35 ^a	1.41 ± 0.04 ^w

注：表中小写字母表示差异显著性，相同字母表示差异不显著（*P*>0.05），不同字母表示差异显著（*P*<0.05），下同。

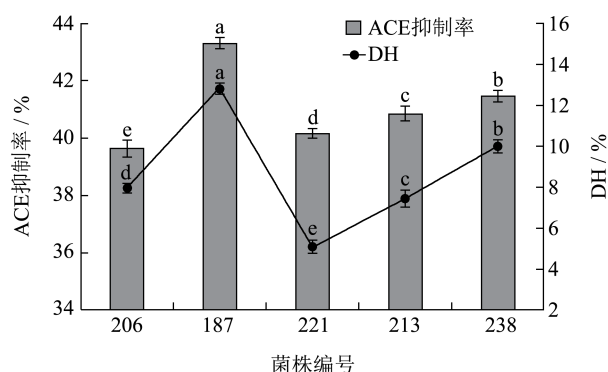


图2 5株乳酸菌对牦牛乳酪蛋白发酵产物的DH和ACE抑制率的影响

Fig.2 Effects of 5 strains of lactic acid bacteria on DH and ACE inhibition rate of yak cheese protein fermentation products

2.2 菌酶协同发酵水解工艺优化

2.2.1 不同蛋白酶辅助菌株187发酵酪蛋白的产肽性能比较分析

由图3a可知, 4 h时, 与对照组相比添加蛋白酶的实验组达到了较高的肽浓度, 可能是由于发酵前期, 蛋白酶起主导作用将大分子蛋白质降解为肽段, 使得肽浓度快速上升。图3b可知, 除了风味蛋白酶组, 其余组ACE抑制率较对照组均有提高。图3c所示, 0~8 h内, 各组水解度均上升, 其中碱性蛋白酶组水解度上升速率最高; 蛋白酶与底物酪蛋白质量分数降低, 使得与其特异性结合的酶切位点发生变化, 促使DH趋势发生变化; DH上升的原因可能是碱性蛋白酶与木瓜蛋白酶酶解产物有利于乳酸菌的生长繁殖。由图3d可知, 随着发酵时间的增长, 各组发酵液的pH值均下降。碱性蛋白酶与发酵乳杆菌187联合发酵牦牛乳酪蛋白对pH值影响更大, 这可能是乳酸菌利用乳糖产生乳酸, 碱性蛋白酶和乳酸菌的协同作用产生了更多的酸性氨基酸。沈嘉森等^[32]碱性蛋白酶酶解龙须菜蛋白其ACE抑制率最高为91.12%; 王扬铎等^[33]利用酶解法水解刺参不同部位, 也确定碱性蛋白酶为最佳水解酶酶解羊乳酪蛋白。

2.2.2 发酵水解工艺优化单因素试验

由图4a可知, ACE抑制率先上升后下降且差异显著 ($P < 0.05$), 当酶与底物比767 U/g时, ACE抑制率最高, 为64.02%。由于酶与底物比的差异, 牦牛乳酪蛋白的水解程度会出现变化, 进而产生不同数量的ACE抑制肽。这种变化使得ACE抑制率呈现出一个先上升后下降的趋势。邵燕秋等^[34]研究鳗鱼骨胶原蛋白ACE抑制肽的制备及性

质研究中, 酶与底物比对ACE抑制肽的变化也呈先上升后下降的趋势。因此, 选择767 U/g为最佳酶与底物比。

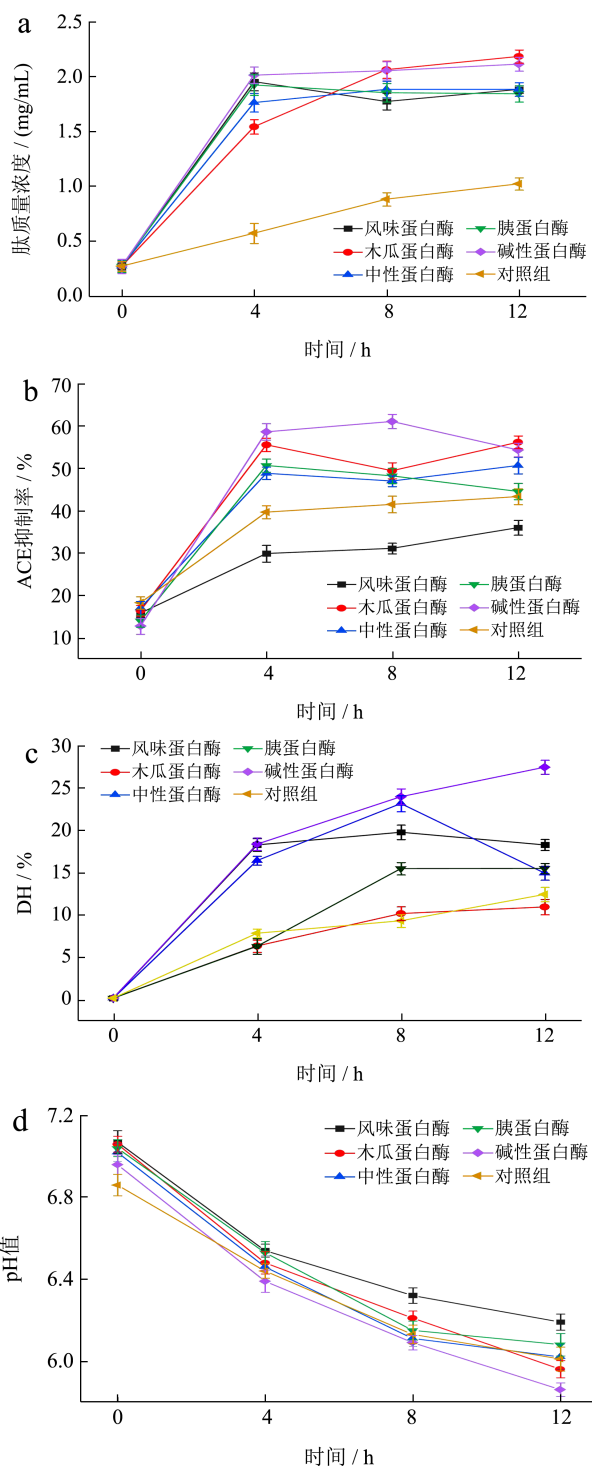


图3 蛋白酶对不同发酵时间发酵液肽质量浓度 (a)、ACE抑制率 (b)、水解度 (c) 和pH值 (d) 的影响

Fig.3 Effects of protease on peptide concentration (a), ACE inhibition (b), degree of hydrolysis (c) and pH value (d) of fermentation broth at different fermentation time

注: 对照组为只添加菌株187。

由图 4b 可知,随着菌株 187 接种量的增加,DH 和 ACE 抑制率均呈先上升后下降的趋势。这与王家翔^[35]在高产 ACE 抑制肽发酵乳的工艺优化及其肽谱研究中菌株接种量对 ACE 抑制率的变化趋势相同。在接种量达到 6% 时,均达到最大值,分别为 27.47% 和 60.37%。因此选择 6% 为最适接种量。

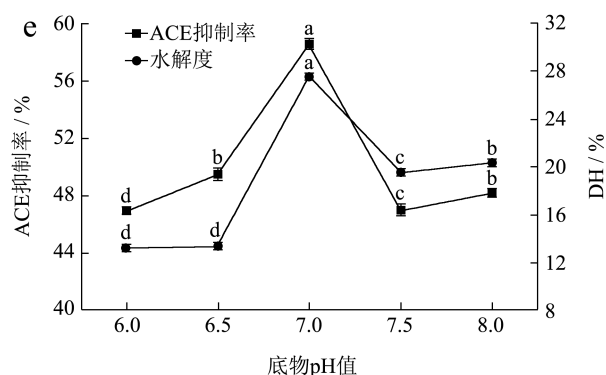
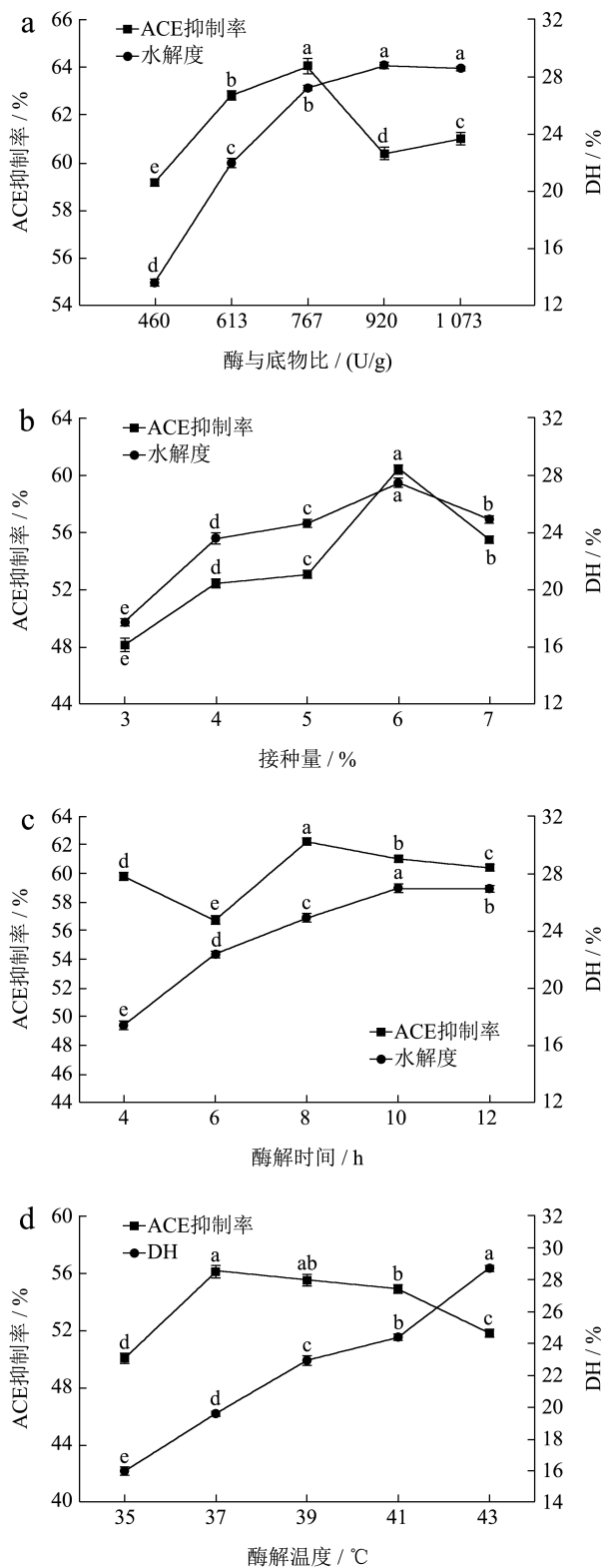


图 4 酶与底物比、乳酸菌接种量、酶解时间、酶解温度、底物 pH 对酪蛋白酶解液 ACE 抑制率和 DH 的影响

Fig.4 Effect of enzyme addition, lactic acid bacteria inoculation, time, temperature, and substrate pH on ACE inhibition of casease lysate and DH

由图 4c 可知,随着酶解时间的增加,水解度先上升后趋于平缓。10 h 时,酶活达到最高,水解度达到最高值,为 26.95%;此后趋于平缓,可能是底物无法满足菌体生长所需要的营养物质,进入衰亡期,蛋白酶活性降低;随着酶解时间延长,ACE 抑制活性先下降后上升最后又下降且差异显著,酶解 8 h 时,抑制活性最强为 62.2%,这是由于在菌酶协同作用的催化过程中,牦牛乳酪蛋白经历了高效的水解反应,显著增加了 ACE 抑制多肽的产量。然而,随着酶解时间的逐步延长,这些生成的 ACE 抑制肽逐渐被分解为较小的、不具备生物活性的肽片段,这种结构上的变化直接降低了 ACE 抑制肽的抑制效果^[36]。所以,综合 ACE 抑制率和水解度,确认 8 h 为最佳酶解时间。

乳酸菌最适生长温度为 37 °C,碱性蛋白酶的最适温度为 55 °C。由图 4d 可知,随着酶解温度的上升 ACE 抑制率呈先上升后下降的趋势,在 37 °C 时抑制活性最高,为 56.10%;而 DH 不断上升,差异显著 ($P < 0.05$),这可能是由于酪蛋白升温体系还未使碱性蛋白酶和乳酸菌蛋白酶失活,持续降解底物蛋白质。因此,选择 37 °C 的发酵温度为最佳酶解温度。

pH 值是影响酶活性的关键因素,它通过调节底物与酶的亲和力以及酶分子侧链基团的电荷状态来影响酶催化底物水解的活性^[37]。由图 4e 可知,随着底物 pH 值升高,水解度和 ACE 抑制率均呈先升高后降低的趋势;在 pH 值 7.0 时达到最大值,分别为 27.52% 和 58.54%,因此 7.0 为最佳 pH 值。

2.3 正交试验结果与分析

2.3.1 正交试验分析

表 5 正交实验设计与结果						
Table 5 Orthogonal experiment design and results						
实验组	A	B	C	D	DH/%	ACE 抑制率/%
1	1	1	1	1	8.81 ^f	51.83 ^d
2	1	2	2	2	9.96 ^{ef}	49.39 ^e
3	1	3	3	3	26.72 ^a	46.34 ^f
4	2	1	2	3	24.55 ^{bc}	48.78 ^e
5	2	2	3	1	10.54 ^e	59.15 ^b
6	2	3	1	2	12.46 ^d	56.71 ^c
7	3	1	3	2	25.35 ^b	65.24 ^a
8	3	2	1	3	23.48 ^c	37.80 ^j
9	3	3	2	1	9.04 ^f	48.78 ^e
K ₁	49.19	55.28	48.78	53.25		
K ₂	54.88	48.98	48.98	57.11		
K ₃	50.61	50.61	56.91	44.31		
R	1.42	6.30	7.93	12.81		

由表 5 可知，通过极差分析，可知影响降血压活性的强弱顺序为：底物 pH 值（D）> 酶解时间（C）> 乳酸菌接种量（B）> 蛋白酶与底物比（A），由 K₁、K₂、K₃ 值大小得出，理论最优组合是 A₂B₁C₃D₂。实际最优组合为 A₃B₁C₃D₂，即酶与底物比 920 U/g，菌接种量 5%，酶解时间 10 h，底物 pH 值 7.0，此条件下 ACE 抑制率最高，为 65.24%，差异显著（P<0.05）。

表 6 正交试验ACE抑制率方差分析结果					
Table 6 Variance analysis results of ACE inhibition rate					
in orthogonal test					
因素	平方和	均方	自由度	F	显著性(P)
酶与底物比	158.08	79.038	2	177.37	0.00**
接种量	202.45	101.223	2	227.16	0.00**
酶解时间	386.91	193.455	2	434.15	0.00**
底物 pH 值	776.86	388.43	2	871.7	0.00**
误差	8.02	0.446	18		

注：** 为极显著（P<0.01）。

由表 6 可知，在本试验设定的 4 个酶解因素中，酶与底物比、接种量、酶解时间和底物 pH 值对酶解工艺条件影响均极显著。

2.3.2 验证实验结果

通过 2.4.1 正交试验分析，实际最优组合与理论

最优组合不一致，因此，需对理论最优（A₂B₁C₃D₂）进行验证试验。结果表明：理论最优条件下发酵液 ACE 抑制率为 66.46%，该结果高于正交实验中任一水平组合的 ACE 抑制率。因此，最佳工艺为：酶与底物比为 767 U/g，接种量为 5%，酶解时间为 10 h，底物 pH 值为 7.0。

2.4 超滤分离牦牛乳酪蛋白ACE抑制肽结果

表 7 超滤各组分ACE抑制率及IC ₅₀		
Table 7 ACE inhibition rate and IC ₅₀ of ultrafiltration		
components		
组分	ACE 抑制率/%	IC ₅₀ /(mg/mL)
粗酶解液	66.46 ^d	0.61 ^c
M3>10 kDa	49.39 ^c	1.01 ^a
3 kDa<M2<10 kDa	58.54 ^b	0.66 ^b
M1<3 kDa	70.12 ^a	0.55 ^d

将得到的发酵液依次经 10 kDa 和 3 kDa 的超滤管进行超滤分离。实验结果如表 7 所示，ACE 抑制肽被超滤分离后分成三个不同分子量的组分，各组分 ACE 抑制率与 IC₅₀ 差异均显著。随着分子量的减小，ACE 抑制活性增大，IC₅₀ 减小。当酶解液质量浓度为 1.0 mg/mL 时，M1 的 ACE 抑制率最高为 70.12%，IC₅₀ 值最小为 0.55 mg/mL，说明牦牛乳酪蛋白 ACE 抑制肽主要由分子量小于 3 kDa 的肽段组成，有较好的研究价值，选择 M1 组进行下一步分离纯化研究。

2.5 葡聚糖凝胶（SephadexG-15）分离ACE抑制肽结果

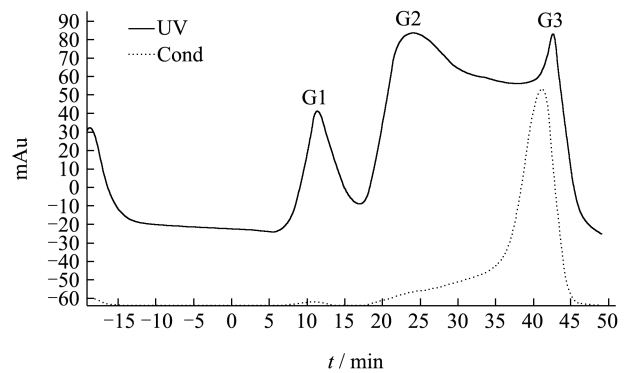


图 5 葡聚糖凝胶 SephedaxG-15 色谱分离图

Fig.5 Chromatographic separation of Dextran gel SephedaxG-15

由图 5 可知，M1 组分经过 Sephedax G-15 色谱柱进行凝胶层析分离后，被分为了三个峰，分别

命名为 G1、G2 和 G3。在凝胶层析中，分离是基于组分的分子量大小进行的，分子量较小的组分会较晚地被洗脱出来。因此，3 个组分分子量大小为 $G1 > G2 > G3$ 。分别收集各峰的洗脱液，冷冻干燥后配成 1.0 mg/mL 的溶液测定其 ACE 抑制率及 IC_{50} 的测定，结果如表 8。

表 8 SephadexG-15凝胶分离各组分ACE抑制率和 IC_{50} 的测定结果

Table 8 ACE inhibition rate and IC_{50} determination results of each component separated by SephadexG-15

组分	ACE 抑制率 / %	IC_{50} /(mg/mL)
G1	51.83 ^b	0.70 ^b
G2	76.22 ^a	0.28 ^c
G3	47.56 ^c	1.12 ^a

由表 8 可知，经 G-15 分离的各组分具有不同程度 ACE 抑制率，G2 组分 ACE 抑制活性 76.22% (IC_{50} =0.28 mg/mL) > G1 组分 ACE 抑制活性 51.83% (IC_{50} =0.70 mg/mL) > G3 组分 ACE 抑制活性 47.56% (IC_{50} =1.12 mg/mL)，且差异显著 ($P < 0.05$)。

2.6 牦牛乳酪蛋白ACE抑制肽G2组分的稳定性分析

2.6.1 不同温度对G2组分的稳定性影响

ACE 抑制肽的热稳定性非常重要，食品在进入市场之前要经过多次热处理，热处理会导致蛋白质变性、缔合和聚集。由图 6 可知，当温度为 20~80 ℃时，G2 组分的 ACE 抑制肽降压活性差异不显著，基本保持在 74% 左右。当温度为 80~100 ℃时，其降压活性显著降低，但仍保持较高的抑制活性。

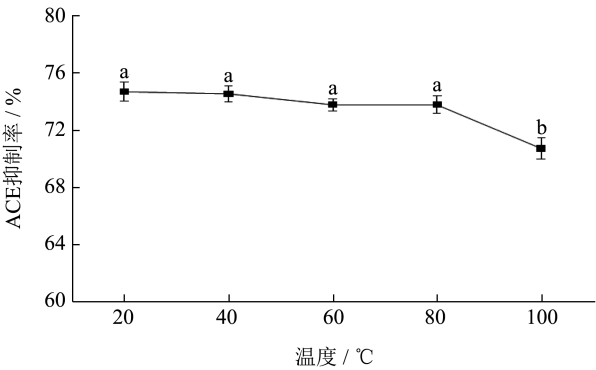


图 6 温度对 G2 组分的 ACE 抑制率的影响

Fig.6 Effect of temperature on the ACE inhibition rate of G2 fractions

2.6.2 不同pH对G2组分的稳定性影响

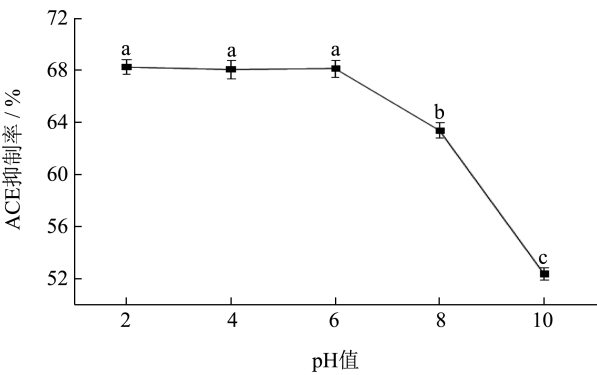


图 7 pH 对 G2 组分的 ACE 抑制率的影响

Fig.7 Effect of pH on the ACE inhibition rate of G2 fractions

由图 7 可知，当 pH 值从 2 升至 6 时，G2 组分的 ACE 抑制活性基本不变，并保持较高的活性，说明将此 ACE 抑制肽加工食品可耐受正常人体胃酸环境；当其 pH 值上升至 pH 值 10，抑制率为 52.44%，其抑制活性显著降低。这可能是由于在强碱条件下，肽发生了消旋作用而使肽链的构象发生变化，从而导致活性显著下降。综上，牦牛乳酪蛋白降压肽在酸性条件下具有较好的稳性性。

2.6.3 不同缓冲盐体系对G2组分的稳定性影响

由图 8 可知，NaCl 浓度为 0.2~0.6 mol/L 时，G2 组分的 ACE 抑制肽活性基本一致，保持在 67% 左右，当 NaCl 浓度为 0.6~1.0 mol/L 时，其抑制活性直线下降，在 1.0 mol/L 时，ACE 抑制率仅为 35.98%。因此，确定 NaCl 浓度为 0.6 mol/L。

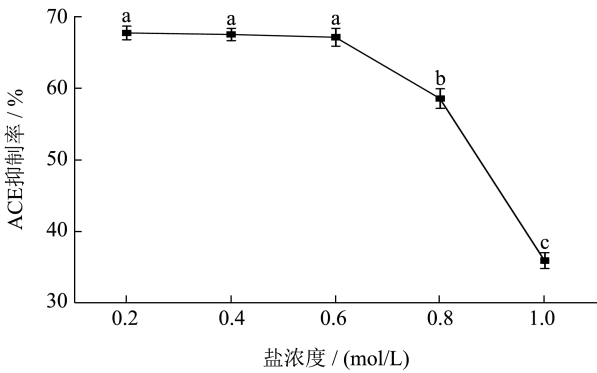


图 8 盐浓度对 G2 组分的 ACE 抑制率的影响

Fig.8 Effect of salt concentration on the rate of ACE inhibition in G2 fractions

2.7 ACE抑制肽氨基酸序列分析

为了获取更多具有降压活性的多肽序列，将 G-15 色谱分离纯化得到的 G2 组分经 LC-MS/MS 进行多肽一级结构的测定，得到的数据用从头测

序法 (De novo) 进行氨基酸序列鉴定, 其结果与 Uniprot-proteome-UP000011080-20220208.fasta 数据库中进行比对, 共鉴定出 4 154 条肽段, 图 9 为其总离子流色谱图。

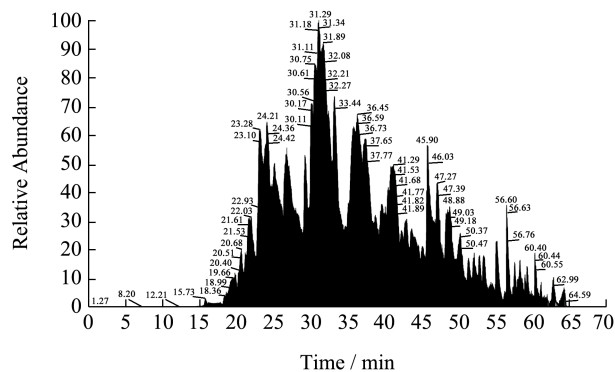


图 9 总离子流色谱图

Fig.9 Total ion flow chromatogram

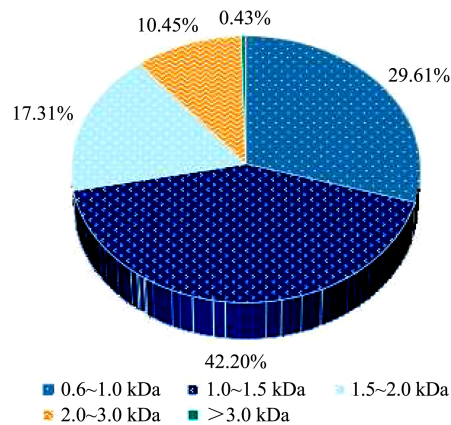


图 10 肽段的分子量分布

Fig.10 Molecular weight distribution of the peptide

对 G2 组分鉴定出的 4 155 条肽分子量分布进行分析, 结果如图 10 所示。分子量位于小于 3 kDa 的肽段含量占总肽段的 99.57%。因此, 综合分子量分布及牦牛乳酪蛋白酶解液显著的 ACE 抑制活性, 牦牛乳酪蛋白水解液中含有潜在的降血压肽。

根据串联质谱数据进行的 De novo 是蛋白质组学中进行蛋白质特性分析的关键技术, 通过算法从谱图离子峰推断出肽的氨基酸序列, 并对序列结果的准确性进行打分评估。ALC 作为 De novo 结果的置信度, ALC>80% 则表示结果可信。通过 De novo 测序, 获得 ALC>80% 的红毛藻肽 25 条。

将 ALC 为 80% 的序列用网站 PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 对肽段进行打分, 得到 9 条分值>0.8 的肽段, 分别为 YLRFF (0.97)、LLYRFF (0.95)、YLKFF (0.91)、HLPLPLKF (0.89)、SVLRFF (0.89)、EDLLRFF

(0.84)、LNEDLLRFF (0.83)、NEDLLRFF (0.82)、LLFRQF (0.81)。

将上诉 9 条肽序列与表 9 各数据库搜索对比, 并未发现与之相匹配的肽段, 说明: 采用蛋白酶辅助乳酸菌发酵水解牦牛乳酪蛋白, 得到了 9 条新型潜在的 ACE 抑制肽, 为 YLRFF (Tyr-Leu-Arg-Phe-Phe)、LLYRFF (Leu-Leu-Tyr-Arg-Phe-Phe)、YLKFF (Tyr-Leu-Lys--Phe-Phe)、HLPLPLKF (His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Lys-Phe)、SVLRFF (Ser-Val-Leu-Arg-Phe-Phe)、EDLLRFF (Glu-Asp-Leu-Leu-Arg-Phe-Phe)、LNEDLLRFF (Leu-Asn-Glu-Asp-Leu-Leu-Arg-Phe-Phe)、NEDLLRFF (Leu-Asn-Glu-Asp-Leu-Leu-Arg-Phe-Phe)、LLFRQF (Leu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe)。其中多肽 YLRFF、LLYRFF、YLKFF 的二级结构质谱图如图 17 分别为 YLRFF(A)、LLYRFF(B)、YLKFF(C)。

表 9 各数据库检索网址

Table 9 Search url of each database

名称	网址
ACE 抑制肽数据库 (AHTPDB)	http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpdb/pepsearch.php
活性肽数据库 EROP-Moscow	http://erop.inbi.ras.ru/
BIOPEP	http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep
PepBank	http://pepbank.mgh.harvard.edu/

由图 11 可知, 肽 YLRFF 氨基酸组成为 (Tyr-Leu-Arg-Phe-Phe)、LLYRFF (Leu-Leu-Tyr-Arg-Phe-Phe)、YLKFF (Tyr-Leu-Lys--Phe-Phe)。有研究表明、当 C 末端氨基酸是芳香族氨基酸 (Trp、Tyr 和 Phe) 或脂肪族氨基酸 (Ile、Ala、Leu 和 Met) 和脯氨酸 (Pro) 时, 多肽的抑制活性更高^[38]。本研究肽 LLYRFF 的 C 端检出脂肪族氨基酸亮氨酸 (Phe) 同 Wei 等^[39]从乳山干酪副产物乳清水解物中提取的两种肽段 FDRPFL 和 KWEKPF (IC₅₀=0.75 mg/mL、IC₅₀=0.67 mg/mL) 均具有较高的抑制活性。N-端为疏水性氨基酸 (Val、Ile、Leu) 或碱性氨基酸 (Lys、Arg、His) 时, ACE 抑制率较高^[40]; 唐蓉^[31]利用乳酸菌与酵母菌协同发酵驼乳得到 N-端均为 Val 的两条肽段 (VFGK、VYPYYG), 本实验得到一条 N-端为 Leu 的肽段 ((LLYRFF) 表明含有这种结构的氨基酸序列有较强的抑制活性; 当氨基酸序列倒数第二位为脂肪族 (Val、Ile、Ala), 碱性 (Arg) 和芳香族 (Tyr、Phe) 氨基酸残基时, 抑制活性较强^[41],

本研究肽段 YLRFF、LLYRFF、YLKFF 倒数第二位均为 Phe，与 Zu 等^[42]从金枪鱼暗肌血管中提取出来的肽 FPPDVA 倒数第二位为 Val 均具有较强的抑制活性，其抑制活性在体外为 $IC_{50}=87.11\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。此外其他 6 条肽段也基本符合上述规律。

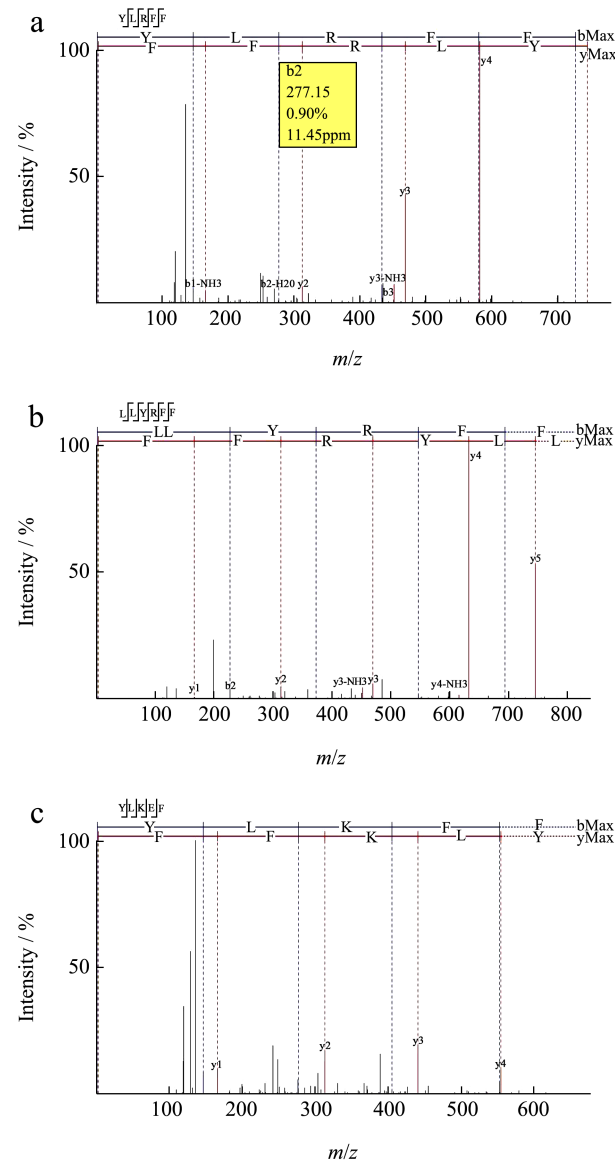


图 11 肽 YLRFF (a) 、LLYRFF (b) 、YLKFF (c) 二级质谱图

Fig.11 Secondary mass spectra and structures of peptides YLRFF (a), LLYRFF (b) and YLKFF (c)

3 结论

筛选出 ACE 抑制率为 43.29% 的潜力菌株发酵乳杆菌 187，碱性蛋白酶水解牦牛乳酪蛋白具有更好的 ACE 抑制活性为 59.76%。通过单因素和正交试验确定最佳水解条件为酶与底物比 767 U/g，接种量为 5%，酶解时间为 10 h，底物 pH 值为 7.0，

在此条件下碱性蛋白酶辅助菌株 187 发酵液的 ACE 抑制率为 66.46%，表现出极佳的降血压潜力。采用超滤和葡聚糖凝胶 SephadexG-15 分离得到的 G2 肽组分具有较好的降压效果，其 ACE 抑制率 (%) 为 $IC_{50}=0.28\text{ mg/mL}$ 。经液相色谱 - 串联质谱 (LC-MS/MS) 分离鉴定到 9 条肽序列，其中 YLRFF、LLYRFF、YLKFF 均具有较好的水溶性和 ACE 抑制活性，是潜在的 ACE 抑制肽，此外 G2 肽组分具有良好的热稳定性、酸碱稳定性和盐稳定性。本研究建立了菌酶协同制备高 ACE 抑制活性的牦牛乳酪蛋白肽工艺，为牦牛乳 ACE 抑制肽的工业化生产和商业化开发提供了理论依据。

参考文献

[1] KEPPELER K, PESI A, LANGE S, et al. Vascular dysfunction and arterial hypertension in experimental celiac disease are mediated by gut-derived inflammation and oxidative stress [J]. Redox Biology, 2024, 70: 103071.

[2] YIN W J, LI F J, TAN X, et al. Plasma ceramides and cardiovascular events in hypertensive patients at high cardiovascular risk [J]. American Journal of Hypertension, 2021, 34(11): 1209-1216.

[3] XUE L, YIN R X, HOWELL K, et al. Activity and bioavailability of food protein-derived angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(2): 1150-1187.

[4] TURNER M J, KODALI R. Should angiotensin-converting enzyme inhibitors ever be used for the management of hypertension? [J]. Current Cardiology Reports, 2020, 22(9): 95.

[5] 殷欣.高原缺氧环境下凝固型牦牛酸奶中乳酸菌的复配及微波杀菌长效工艺的研究[D].兰州:兰州理工大学,2019.

[6] DAROIT D J, BRANDELLI A. In vivo bioactivities of food protein-derived peptides-a current review [J]. Current Opinion in Food Science, 2021, 39(6): 120-129.

[7] 钟玉旺,徐万莉,范尧珠,等.辣木籽ACE抑制肽的分离纯化、结构鉴定及其体外活性评价[J].食品科学,2023, 44(24):118-126.

[8] DEHGANI N, TAFVIZI F, JAFARI P. Cell cycle arrest and anti-cancer potential of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* against HT-29 cancer cells [J]. Bioimpacts, 2021, 11(4): 245-252.

[9] AZIZ M, HEMEDA S A, AIBADRANI G M. et al. Ameliorating effect of probiotic on nonalcoholic fatty liver disease and lipolytic gene expression in rabbits [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 6312.

[10] ZHANG C C, SHENG Y Y, JIANG J C, et al. Probiotics

- supplementation for management of type II diabetes risk factors in adults with polycystic ovarian syndrome: a meta-analysis of randomized clinical trial [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(4): 1053-1063.
- [11] PU M X, WANG Q, HUI Y Y, et al. Untargeted metabolomics analysis of probiotic jujube juice and its anti-obesity effects on the high-fat diet-induced obese mice [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2024, 104(9): 4989-5000.
- [12] MAZORRA-MI A M, ROBLES-P R G, GONZALEZ-V A D, et al. Cheese whey fermentation by Its native microbiota: proteolysis and bioactive peptides release with ACE-Inhibitory activity [J]. Fermentation, 2020, 6(1): 19.
- [13] 马慧,梅洁,袁新超,等.菌酶协同固态发酵核桃谷蛋白制备抑菌肽[J].食品工业科技,2024,45(12):112-120.
- [14] JIANG Y H, WU J, TIAN L, et al. The therapeutic effects of fermented milk with lactic acid bacteria from traditional Daqu on hypertensive mice [J]. Journal of Dairy Science, 2024, 107(2): 742-758.
- [15] ADAMS C, SAH F, GREEN-J J M, et al. Characterization of casein-derived peptide bioactivity: differential effects on angiotensin-converting enzyme inhibition, cytokine and nitric oxide production [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(7): 5805-5815.
- [16] 邹俊哲,林凯,譙飞,等.菌酶协同发酵水解大米蛋白ACE抑制肽及其活性的研究[J].食品研究与开发,2019, 40(9):1-7.
- [17] 刘佟.乳酸杆菌产蛋白酶的凝乳特性及酶性质研究[D].威海:哈尔滨工业大学,2012
- [18] 张咚咚.高产蛋白酶乳酸菌的筛选及其在水解牛乳酪蛋白上的应用[D].大连:大连工业大学,2013.
- [19] 于豪杰.产蛋白酶乳酸菌的筛选及其应用于豆粕发酵初探[D].郑州:郑州大学,2020.
- [20] 刘璐.益生菌对干酪活性肽生成机制的影响及其结构特征的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2018.
- [21] 姚春旭.生物活性肽益生菌羊奶粉的制备及稳定性研究[D].西安:陕西科技大学,2020.
- [22] 周慧江.核桃蛋白源ACE抑制剂的酶法制备及分离,纯化[D].西安:陕西科技大学,2013.
- [23] ISLSM M S, WANG H G, ADMASSU H, et al. Degree of hydrolysis, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates from grass turtle (*Chinemys reevesii*) as influenced by enzymatic hydrolysis conditions [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 8: 4031-4047.
- [24] 聂昌宏,郑欣,阿依居来克·卡得尔,等.考马斯亮蓝法检测不同乳中乳清蛋白含量[J].食品安全质量检测学报, 2019,10(5):1138-1142.
- [25] 亓艺洁.蛋白酶辅助乳酸菌发酵水解酪蛋白制备抗氧化肽的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2020.
- [26] 高杰.发酵与酶解法处理马乳酪蛋白制备ACE抑制肽[D].昆明:昆明理工大学,2021.
- [27] 陈昶宇,陈博睿,赵卿宇,等.小米多肽酶解工艺及其抗氧化和ACE抑制活性[J].中国食品学报,2023,23(12):125-133.
- [28] 贾向飞,郑远荣,刘振民,等.红曲霉奶酪的生物活性研究及ACE抑制肽的筛选[J].食品科学,2024,45(5):40-48.
- [29] 王子秦.大豆源生物活性肽生产工艺优化及ACE抑制活性确证[D].长春:吉林大学,2020.
- [30] 刘超,赵良忠,王瑶琼,等.石屏臭豆腐来源的高产蛋白酶菌株筛选及酶学特性研究[J].食品与机械,2024, 40(3):33-43.
- [31] 唐蓉,王康,郭元晟,等.酵母菌与乳酸菌发酵马乳产ACE抑制肽[J].食品科学,2022,43(6):236-245.
- [32] 沈嘉森,苏永昌,陈晓婷,等.龙须菜蛋白的提取工艺优化及降血压组分制备[J].食品安全质量检测学报,2022, 13(4):1232-1239.
- [33] 王扬铎,苏永昌,王晓燕,等.仿刺参不同部位ACE抑制活性分析及活性肽制备工艺优化[J].食品工业科技,2024, 45(10):187-197.
- [34] 邵燕秋,黄卉,李来好,等.鳗鱼骨胶原蛋白ACE抑制肽的制备及性质研究[J].南方水产科学,2022,18(6):137-145.
- [35] 王家栩.高产ACE抑制肽发酵乳的工艺优化及其肽谱研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2024.
- [36] 马凤,叶灏铎,夏珍,等.英红九号茶蛋白ACE抑制肽的制备、氨基酸组成及不同超滤组分的活性评价[J].现代食品科技,2023,39(7):237-245.
- [37] SETH A, AYOTTE, VITALI J. Enzyme Kinetics of Recombinant dihydroorotase from *Methanococcus jannaschii* [J]. The Ohio Journal of Science, 2022, 122(2): 47-51.
- [38] ALI M Y, ZAIB S, JANNAT S, et al. Inhibition of angiotensin-I converting enzyme by ginsenosides: Structure-activity relationships and inhibitory mechanism [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(21): 6073-6086.
- [39] WEI G Q, WANG T, LI Y Y, et al. Identification, structural characterization, and molecular dynamic simulation of ACE inhibitory peptides in whey hydrolysates from Chinese Rushan cheese by-product [J]. Food Chemistry: X, 2024, 21: 101211.
- [40] 王宝贝,张慧,刘宇松,等.食源性多肽的降血压作用及其机制研究进展[J].食品与机械,2024,40(3):217-224.
- [41] SUNDE H, RYDER K, BEKHIT A E-D A, et al. Analysis of peptides in a sheep beta lactoglobulin hydrolysate as a model to evaluate the effect of peptide amino acid sequence on bioactivity [J]. Food Chemistry, 2021, 36(5): 130346.
- [42] ZU X Y, ZHAO Y N, LIANG Y, et al. Research on the screening and inhibition mechanism of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from tuna dark muscle [J]. Food Bioscience, 2024, 59: 103956.