刘曲, 安飞宇, 乌日娜, 等. 高产抗氧化肽芽孢杆菌的筛选及其在豆渣增值利用中的应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 206−214. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120181

LIU Qu, AN Feiyu, WU Rina, et al. Screening of High Yielding Antioxidant Peptide *Bacillus sphaericus* and Its Application in Value-added Utilization of Soybean Residue[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 206−214. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120181

·生物工程·

高产抗氧化肽芽孢杆菌的筛选及其在豆渣增值利用中的应用

刘　曲[1,2], 安飞宇[1,2], 乌日娜[1,2,3], 田　野[4], 田　震[4], 潘国杨[1,3], 姜锦惠[1,2], 陶鑫禹[1,3], 马媛媛[1,2], 武俊瑞[1,2,3,*]

（1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866;
2.辽宁省食品发酵技术工程研究中心, 辽宁沈阳 110866;
3.沈阳市微生物发酵技术创新重点实验室, 辽宁沈阳 110866;
4.辽宁帝华味精食品有限公司, 辽宁葫芦岛 125200）

摘　要: 目的：豆渣作为大豆加工主要副产物，虽有营养价值，但因消化率低、适口性差导致工业利用率低。本研究旨在以豆渣为发酵基质，利用芽孢杆菌在食品原料中生长繁殖并分泌胞外酶系的特性，借助超声波联合微生物发酵方式（UAF），探索制备抗氧化肽等小分子生物活性物的有效途径，提升豆渣的利用价值。方法：通过透明圈法初筛，从 56 株芽孢杆菌中筛选出 28 株高产蛋白酶的菌株，并通过复筛对其蛋白酶活力、超氧化物歧化酶活力、产肽能力和抗氧化能力等指标结合因子分析进行综合评价。结果：筛选出 *B. siamensis* s4、*B. amyloliquefaciens* 10、*B. subtilis* SNBS-3 和 *B. subtilis* 63 四株具有抗氧化能力的菌株。其中，*B. amyloliquefaciens* 10 的蛋白酶活性、$ABTS^{+}$自由基清除率和 DPPH 自由基清除率分别显著（$P<0.05$）提高了 12.23%±0.08%、8.69%±0.11% 和 3.38%±0.81%，而 *B. subtilis* SNBS-3 的肽含量和 DPPH 自由基清除率分别显著（$P<0.05$）提高了 7.20%±0.10%、3.41%±0.14%。结论：以豆渣为发酵基质，超声联合微生物发酵方式可作为筛选高产抗氧化肽菌株的方法；在超声胁迫条件下，*B. amyloliquefaciens* 10 和 *B. subtilis* SNBS-3 两株菌不仅表现出良好的生长能力，还显著提高了蛋白酶活性、肽含量和抗氧化能力。这两株菌具有强大的抗氧化潜力，为抗氧化肽的产业化制备提供了理论支持。

关键词: 抗氧化肽, 蛋白酶, 芽孢杆菌, 超声波处理, 微生物发酵, 豆渣

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0206−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120181　　本文网刊:

Screening of High Yielding Antioxidant Peptide *Bacillus sphaericus* and Its Application in Value-added Utilization of Soybean Residue

LIU Qu[1,2], AN Feiyu[1,2], WU Rina[1,2,3], TIAN Ye[4], TIAN Zhen[4], PAN Guoyang[1,3], JIANG Jinhui[1,2], TAO Xinyu[1,3], MA Yuanyuan[1,2], WU Junrui[1,2,3,*]

（1.College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;
2.Liaoning Engineering Research Center of Food Fermentation Technology, Shenyang 110866, China;
3.Shenyang Key Laboratory of Microbial Fermentation Technology Innovation, Shenyang 110866, China;
4.Liaoning Dihua Monosodium Glutamate Food Co., Ltd., Huludao 125200, China）

Abstract: Objective: Soybean residue, a major by-product of soybean processing, possess nutritional value but have low industrial utilization due to low digestibility and poor palatability. The aim of this study was to use soybean residue as a

收稿日期: 2024−12−16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目（32172279）; 辽宁省“兴辽英才计划”项目（XLYC2213026, XLYC2402005）; 辽宁省科学技术计划项目（2024JH2/101900005）; 沈阳农业大学高层次人才引进项目（2023YJRC002）; 沈阳市科技创新平台项目（21-103-0-14, 21-104-0-28）。

作者简介: 刘曲（1999−）（ORCID: 0009−0000−0690−0227）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 383329148@qq.com。

*** 通信作者:** 武俊瑞（1977−）（ORCID: 0000−0003−3419−0108）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: junruiwu@126.com。

fermentation substrate, take advantage of the characteristics of *Bacillus* sp. that can grow and multiply in food materials and secrete an extracellular enzyme system, and explore an effective way to prepare small molecule bioactive substances such as antioxidant peptides with the help of ultrasonic-combined microbial fermentation (UAF), thereby enhancing the utilization value of soybean residue. Methods: In this study, 28 high-protease-producing strains were screened from 56 strains of *Bacillus* sp. by initial screening using the transparent-circle method. Then, their protease activity, superoxide dismutase activity, peptide-producing capacity, and antioxidant capacity were comprehensively evaluated through re-screening in combination with factor analysis. Results: Four strains with antioxidant capacity, namely *B. siamensis* s4, *B. amyloliquefaciens* 10, *B. subtilis* SNBS-3, and *B. subtilis* 63, were finally screened out. Among them, the protease activity, $ABTS^{+}$ radical scavenging rate, and DPPH radical scavenging rate of *B. amyloliquefaciens* 10 were significantly increased (P<0.05) 12.23%±0.08%, 8.69%±0.11%, and 3.38%±0.81%, respectively. Meanwhile, the peptide content and DPPH radical scavenging rate of *B. subtilis* SNBS-3 were significantly increased (P<0.05) 7.20%±0.10%, 3.41%±0.14%, respectively. Conclusion: Using soybean residue as a fermentation substrate, ultrasonication combined with microbial fermentation could be regarded as a method to screen strains with high antioxidant peptide production. Under ultrasonication stress conditions, the two strains, *B. amyloliquefaciens* 10 and *B. subtilis* SNBS-3, not only demonstrated good growth ability but also significantly enhanced protease activity, peptide content, and antioxidant capacity. They had strong antioxidant potential and provided theoretical support for the industrialization of antioxidant peptide preparation.

Key words: antioxidant peptides; proteases; *Bacillus*; ultrasonic treatment; microbial fermentation; soybean residue

豆渣是大豆加工过程中主要的副产物，每加工 1 kg 大豆就会产生约 1.2 kg 湿豆渣[1]。我国作为大豆主要消费国之一，每年可产生数亿吨豆渣[2]，且预测未来豆渣产量仍会呈逐年递增趋势[3]，豆渣的累积已然成为豆制品行业所面临的挑战之一。Chatterjee 等[4] 研究虽已表明，利用豆渣蛋白质制备生物活性物具有可行性，但残留蛋白质经高温蒸煮、挤压后难以溶出、利用率不佳[5−6]。为此，亟需利用物性修饰、生物转化、功能化重组等副产物综合利用技术以解决上述问题。

生物活性肽是指具有生物活性的小分子肽段。它们通常由 2 到 50 个氨基酸残基组成，具有特定的生物功能，如调节免疫系统、细胞增殖、细胞凋亡、细胞信号传导等。生物活性肽的制备方法主要包括微生物发酵、酶解、化学合成与 DNA 重组技术[7]。其中抗氧化肽是一种具有抗氧化能力的生物活性肽，是一种小分子天然活性物质[8−9]。利用微生物发酵法制备生物活性肽具有安全可靠、多样性、高产量、易于改造、经济性和可持续性等优点，使其成为制备生物活性肽的重要来源之一[10]。目前，已开展多项利用微生物发酵法制备抗氧化肽的研究，如 Shu 等[11] 以羊奶为发酵基质，利用解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliquefaciens*）制备抗氧化肽；Li 等[12] 以鹰嘴豆为发酵基质，利用枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）发酵制备抗氧化肽；Sanjukta 等[13] 利用枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）、地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）发酵 Kinema，制备的生物活性肽 SEDDVFVIPAAYPF 显示出高抗氧化活性。同时，环保型低强度短时超声波近年来已广泛应用于发酵工业，超声波联合微生物发酵方式（Ultrasonic-combined microbial fermentation, UAF），不仅能促使发酵基质蛋白质结构的舒展，其声空化作用所形成的微射流[14−15]，可以提升细胞膜的流动性及渗透性[16]，刺激微生物生长、提高蛋白酶产率，还可增强传质速率，提高酶与底物的结合速率及活性成分的溶出率，具有提取效率高、溶剂使用少等优点[17−18]，已在食品工业中广泛研究。如 Hashemi 等[19] 利用超声联合发酵，以酸奶为发酵基质，证实通过超声诱导微生物蛋白酶表达可以提高肽的产量；Bian 等[20] 通过多频逆流超声处理提高了桑籽蛋白提取率，提高了甜味肽的生物活性。因此，微生物发酵法在制备生物活性肽方面优势突出，且超声波联合微生物发酵方式能进一步提升发酵效果，在食品等领域展现出良好的应用潜力。目前，利用豆渣蛋白制备抗氧化肽等小分子活性物的研究较为鲜见，已开展的研究也多采用酶解法、微生物发酵法等单一制备方式；其中，通过超声等辅助处理优化微生物多种代谢途径以发酵制备抗氧化肽的研究，仍处于起步阶段，因此采用超声联合微生物发酵技术制备豆渣抗氧化肽，对实现活性肽的安全高效制备具有重要意义。研究发现，芽孢杆菌（*Bacillus*）不仅产酶能力较强，是发酵过程中的酶系主导功能菌[21]，且菌株活性高，可在豆渣等食品原料上良好生长繁殖[22]，但当前针对该菌产抗氧化肽的筛选体系仍存在不完善之处。

因此，本研究通过透明圈法初筛，蛋白酶活力、超氧化物歧化酶活力、多肽含量和抗氧化能力复筛，综合筛选出具有高产抗氧化肽能力的特异性菌株。进一步选用超声波联合微生物发酵法制备抗氧化肽，在提高豆渣利用率的同时赋予经济价值，对提升豆制品副产物利用率，低成本、高安全、高效率制备活性肽具有重要意义，后期为活性肽产业化制备提供理论支持[23]。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

菌株　均分离自东北传统发酵食品，菌株 16S rDNA 序列同源性对比见表 1；新鲜豆渣　辽宁豆华天宝食品科技股份有限公司提供；β-巯基乙醇、邻苯

表 1 菌株 16S rDNA 序列同源性对比

Table 1 Comparison of 16S rDNA sequence homology among strains

菌株来源	菌株编号	鉴定结果	同源性(%)
	5-3	*B. subtilis*	99.8
	s19	*B. velezensis*	99.8
	SN-14	*B. subtilis*	99.7
	5-2	*B. amyloliquefaciens*	98.9
	31	*B. amyloliquefaciens*	99.9
	71	*B. velezensis*	98.8
	J19	*B. subtilis*	98.4
沈阳发酵豆酱	63	*B. subtilis*	100
	17-1	*B. amyloliquefaciens*	99.5
	21	*B. velezensis*	98.8
	s16	*B. subtilis*	98.4
	101	*B. velezensis*	99.8
	15	*B. amyloliquefaciens*	99.8
	25	*B. amyloliquefaciens*	99.7
	26	*B. amyloliquefaciens*	99.8
	104	*B. amyloliquefaciens*	98.8
	100	*B. subtilis*	98.4
	j10	*B. velezensis*	99.2
	116	*B. amyloliquefaciens*	99.8
锦州发酵小菜	117	*B. amyloliquefaciens*	99.8
	105	*B. amyloliquefaciens*	99.7
	103	*B. subtilis*	99.8
	6-2	*B. velezensis*	99.8
	SNBS-3	*B. subtilis*	100
	j21	*B. subtilis*	98.4
	j11	*B. subtilis*	99.2
	j14	*B. velezensis*	98.4
	8"	*B. subtilis*	99.2
辽阳发酵豆豉	73	*B. velezensis*	99.5
	111	*B. subtilis*	98.8
	10	*B. amyloliquefaciens*	100
	24"	*B. amyloliquefaciens*	99.5
	s9	*B. amyloliquefaciens*	98.8
	23	*B. subtilis*	98.4
	j20	*B. pseudomycoide*	99.8
	24	*B. velezensis*	99.2
朝阳发酵豆酱	j12	*B. velezensis*	99.5
	s4	*B. siamensis*	98.8
	7	*B. velezensis*	98.4
	29	*B. amyloliquefaciens*	99.8
	s1	*B. subtilis*	99.8
	s14	*B. amyloliquefaciens*	99.7
阜新发酵豆豉	s3	*B. subtilis*	99.8
	43	*B. subtilis*	99.5
	TS	*B. subtilis*	98.8
	J20	*B. velezensis*	98.4
	113	*B. amyloliquefaciens*	99.8
	114	*B. subtilis*	99.5
	112	*B. amyloliquefaciens*	98.8
	J8	*B. velezensis*	100
	S29	*B. amyloliquefaciens*	100
葫芦岛发酵小菜	43	*B. amyloliquefaciens*	99.5
	J40	*B. amyloliquefaciens*	98.8
	44	*B. subtilis*	98.4
	J32	*B. pseudomycoide*	99.8
	8-3	*B. velezensis*	99.2
	24	*B. velezensis*	99.2
	j12	*B. velezensis*	99.5

二甲醛(OPA)、2,2-联氨-双(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、乙醇、过硫酸钾、甲醇、十水合四硼酸钠($Na_2B_4O_7·10H_2O$)、十二烷基硫酸钠(SDS) 分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;微生物蛋白酶活性检测试剂盒(ELISA)、SOD 活性检测试剂盒(ELISA) 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

QYC-200 恒温培养摇床 上海福玛试验设备有限公司;UV-2100 紫外可见分光光度计 龙尼柯(上海)仪器有限公司;KQ-300VDE 超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司;DHG-9023S 鼓风干燥箱 宁波乐电仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂与培养基配制 LB(Luria-Bertani)液体培养基、酪蛋白固体培养基:参考 Kasana 等[24] 配制,121 ℃ 灭菌 20 min 待用。

豆渣培养基:鲜豆渣于 60 ℃ 鼓风干燥箱中烘干至恒重,10 g 干豆渣,水 150 mL,121 ℃ 灭菌 20 min 待用。

OPA 溶液:25 mL 蒸馏水溶解 0.96 g $Na_2B_4O_7·10H_2O$,2.5 mL 蒸馏水溶解 0.5 g SDS,1 mL 甲醇溶解 0.04 g OPA 后加 0.1 mL β-巯基乙醇,定容至 50 mL。

DPPH 溶液:100 mL 甲醇溶解 6.3 mg DPPH。

ABTS 溶液:2 mL 蒸馏水溶解 7.68 mg ABTS、4 mL 蒸馏水溶解 2.65 mg $K_2S_2O_8$,混匀后于室温(25±1 ℃)下避光 12~16 h 后再溶于无水乙醇,734 nm 处调整至吸光度为 0.7±0.02 待用。

1.2.2 高产抗氧化肽潜力菌株初筛 采用透明圈法,将保藏的芽孢杆菌活化后接至 LB 液体培养基,37 ℃、170 r/min 培养 16 h 后 5000 r/min 离心 10 min 弃去上清,0.9% 无菌生理盐水调至 OD_{600} 为 0.5±0.02 的菌悬液待用。参考 Kasana 等[24] 方法并稍作修改,100 μL 菌悬液点种至酪蛋白固体培养基,37 ℃ 静置培养 12 h 后用游标卡尺测量透明圈直径(D)及菌落直径(d)。

1.2.3 高产蛋白酶潜力菌株复筛选

1.2.3.1 多肽液制备 取 1.2.2 菌悬液,按 1%(v/v)接种至无菌豆渣培养基,37 ℃、170 r/min 下培养 36 h,取发酵液 10000 r/min 离心 25 min 后取上清液过 0.45 μm 滤膜置于−80 ℃ 备用。

1.2.3.2 菌株发酵豆渣多肽液蛋白酶活力测定 取多肽液在频率 45 kHz、功率 120 W/L 下超声 15 min,使用微生物蛋白酶活性检测试剂盒(ELISA),测定 450 nm 处吸光度。同时以未超声处理的发酵液为空白组,超声后菌株蛋白酶活力增率根据公式(1)计算。

$$蛋白酶活力增率(\%)=\frac{P_{超声}-P_{未超声}}{P_{未超声}}\times 100 \quad 式(1)$$

式中:$P_{超声}$为超声后菌株发酵豆渣多肽液吸光度

值；$P_{未超声}$为未超声菌株发酵豆渣多肽液吸光度值。

1.2.3.3　菌株发酵豆渣多肽液的肽含量测定　参考 Tuly 等[25]的方法并稍作修改，75 μL 10 mg/mL 多肽液与 3 mL OPA 溶液混匀，室温孵育 2 min，测定 340 nm 处吸光度；配制 0、0.2、0.4、0.6、0.8 及 1.0 mg/mL 的 Gly-Gly-Tyr-Arg 溶液制作标准曲线（Y=11.175X−0.0075，R^2=0.9996）。未超声组为空白，超声后菌株肽含量增率根据公式(2)计算。

$$肽含量增率(\%)=\frac{C_{超声}-C_{未超声}}{C_{未超声}}\times 100 \qquad 式（2）$$

式中：$C_{超声}$为超声后菌株肽含量（mg/mL）；$C_{未超声}$为未超声菌株肽含量(mg/mL)。

1.2.3.4　菌株发酵豆渣多肽液超氧化物歧化酶活力测定　取多肽液使用 SOD 活性检测试剂盒(ELISA)，测定波长 450 nm 处吸光度，按细菌数量计，每 1 万个细菌每分钟催化产生 1 μmol 超氧阴离子自由基定义为一个酶活性单位计算样品活性。

1.2.3.5　菌株发酵豆渣多肽液 DPPH 自由基清除率测定　参照 Rai 等[26]的方法并稍作修改。200 μL 多肽液与 2 mL DPPH 溶液混匀，室温下避光孵育 30 min，0.2 mg/mL V_C 为阳性对照，测定 517 nm 处吸光度，根据公式(3)计算 DPPH 自由基清除率。

$$DPPH自由基清除率(\%)=\left(1-\frac{A_2-A_1}{A_0}\right)\times 100 \qquad 式（3）$$

式中：A_2 为样品吸光度值；A_1 为甲醇溶液代替 DPPH 溶液吸光度值；A_0 为去离子水代替样品吸光度值。

此外，未超声组为空白，超声后菌株 DPPH 自由基清除率增率根据公式(4)计算。

$$DPPH自由基清除率增率(\%)=\frac{D_1-D_0}{D_0}\times 100 \qquad 式（4）$$

式中：D_1 为超声后菌株 DPPH 自由基清除率；D_0 为未超声时菌株 DPPH 自由基清除率。

1.2.3.6　发酵豆渣多肽液 $ABTS^+$自由基清除率测定　参照 Fang 等[27]的方法并稍作修改。1 mL 多肽液与 4 mL 新制 ABTS 溶液充分混匀，室温下避光孵育 6 min，0.2 mg/mL V_C 为阳性对照，测定波长 734 nm 处吸光度，根据公式(5)计算 $ABTS^+$自由基清除率。

$$ABTS^+自由基清除率(\%)=\left(1-\frac{A_s}{A_c}\right)\times 100 \qquad 式（5）$$

式中：A_s 为多肽样品吸光度值；A_c 为 ABTS 溶液空白吸光度值。

此外，未超声组为空白，超声后菌株 $ABTS^+$自由基清除率增率根据公式(6)计算。

$$ABTS^+自由基清除率增率(\%)=\frac{A_a-A_b}{A_b}\times 100 \qquad 式（6）$$

式中：A_a 为超声后菌株 $ABTS^+$自由基清除率；A_b 为未超声时菌株 $ABTS^+$自由基清除率。

1.2.3.7　因子分析　参考赵自阳等[28]的方法。以 28 株芽孢杆菌的蛋白酶活性、超氧化物歧化酶活性、肽含量、$ABTS^+$自由基清除率、DPPH 自由基清除率为变量，综合评价不同芽孢杆菌的抗氧化能力，计算芽孢杆菌抗氧化能力相关系数矩阵以及相关系数矩阵的特征值和贡献率等，并对因子载荷矩阵进行旋转处理；最终计算芽孢杆菌抗氧化能力的因子综合得分。

1.2.3.8　超声胁迫对菌株发酵豆渣抗氧化性的影响　将具有发酵潜力的芽孢杆菌，接种 1%(v/v)至豆渣培养基，在 37 ℃、170 r/min 条件下培养 4 h 后在频率 45 kHz、功率 120 W/L 下超声 10 min，再培养 36 h，同时以未超声处理的发酵液为空白组，考察超声胁迫对菌株产肽能力、蛋白酶活力、DPPH 自由基清除率和 $ABTS^+$自由基清除率的影响。

1.3　数据处理

每组实验数据均各测定 3 次，结果表示为平均值±标准差，采用 SPSS 软件进行因子分析及样品间显著性差异分析，以 P<0.05 为差异显著，用 Origin 2021、Design-Expert.V8.0.6.1 软件绘图。

2　结果与分析

2.1　高产抗氧化肽潜力菌株筛选

2.1.1　菌株产蛋白酶能力初筛　通过透明圈法对分离自东北传统发酵小菜、发酵豆酱、发酵豆豉的 56 株芽孢杆菌进行初筛，以优选具有产蛋白酶能力的菌株。结果如表 2 所示，56 株芽孢杆菌均具有产蛋白酶潜力，透明圈的大小直观反映了菌落对蛋白酶的分解能力，透明圈比值（$D\cdot d^{-1}$）越大产蛋白酶能力

表 2　菌株产蛋白酶能力初筛

Table 2　Preliminary screening test on strain protease production

菌株编号	比值($D\cdot d^{-1}$)	菌株编号	比值($D\cdot d^{-1}$)	菌株编号	比值($D\cdot d^{-1}$)
10	8.44 ± 0.06^{a}	J32	3.67 ± 0.03^{ijklmn}	j21	2.33 ± 0.03^{p}
SNBS-3	8.32 ± 0.01^{a}	43	3.6 ± 0.06^{ijklmn}	8"	2.3 ± 0.12^{pq}
63	7.22 ± 0.14^{b}	s16	3.6 ± 0.01^{ijklmn}	6-2	2.26 ± 0.04^{pq}
s4	6.00 ± 0.12^{c}	j10	3.57 ± 0.03^{ijklmn}	J20	1.84 ± 0.01^{qr}
s3	5.73 ± 0.27^{c}	104	3.49 ± 0.01^{ijklmn}	112	1.66 ± 0.01^{rs}
J19	5.08 ± 0.04^{d}	117	3.47 ± 0.03^{jklmn}	s19	1.58 ± 0.04^{rs}
5-2	4.83 ± 0.14^{de}	111	3.4 ± 0.06^{klmn}	103	1.52 ± 0.03^{rs}
44	4.47 ± 0.08^{ef}	S29	3.33 ± 0.07^{lmn}	31	1.45 ± 0.05^{rs}
24	4.47 ± 0.08^{ef}	s9	3.33 ± 0.07^{lmn}	j14	1.43 ± 0.03^{rs}
25	4.46 ± 0.08^{ef}	100	3.21 ± 0.09^{mn}	43"	1.4 ± 0.06^{rs}
5-3	4.32 ± 0.03^{fg}	26	3.08 ± 0.03^{no}	23	1.4 ± 0.06^{rs}
8-3	4.32 ± 0.03^{fg}	73	2.77 ± 0.03^{op}	105	1.35 ± 0.06^{rs}
SN-14	4.13 ± 0.04^{fgh}	17-1	2.57 ± 0.07^{p}	114	1.34 ± 0.01^{rs}
21	4.02 ± 0.07^{fghi}	15	2.47 ± 0.09^{p}	101	1.27 ± 0.07^{s}
s14	3.96 ± 0.07^{fghij}	116	2.47 ± 0.03^{p}	j20	1.2 ± 0.03^{s}
s1	3.93 ± 0.05^{ghijk}	71	2.38 ± 0.54^{p}	J40	1.2 ± 0.03^{s}
TS	3.84 ± 0.01^{ghijkl}	J8	2.38 ± 0.06^{p}	24"	1.19 ± 0.02^{s}
7	3.84 ± 0.01^{ghijkl}	j11	2.37 ± 0.03^{p}	29	1.16 ± 0.01^{t}
j12	3.67 ± 0.03^{ijklmn}	113	2.36 ± 0.03^{p}		

注：同列不同字母表示差异显著（P<0.05），表3~表5同。

越强，56 株菌的 $D \cdot d^{-1}$ 值在 1.16±0.01~8.44±0.06 之间，平均值为 3.22±0.04，通过显著性分析可知，不同菌株间产蛋白酶能力存在显著差异（P<0.05）。其中有 28 株菌透明圈比值高于平均值，选取前 28 株具有产蛋白酶潜力的芽孢杆菌进行后续实验。其中 *B. siamensis* s4、*B. amyloliquefaciens* 10、*B. subtilis* SNBS-3、*B. subtilis* 63、*B. subtilis* s3 比值均高于 5.50，在产蛋白酶能力方面显著强于其他菌株（P<0.05），表明它们具有较强产蛋白酶潜力。

2.1.2 高产抗氧化肽菌株复筛选

2.1.2.1 菌株发酵豆渣多肽液蛋白酶活力 通过对 28 株菌的蛋白酶活力进行测定，筛选出具有高产抗氧化肽潜力的菌株。结果如表 3 所示，28 株芽孢杆菌均表现出较强的产酶能力，实验菌株间蛋白酶活力存在显著差异（P<0.05）。其中，*B. siamensis* s4、*B. amyloliquefaciens* 10、*B. subtilis* 63 的蛋白酶活力分别为 566.29±1.59、566.05±0.57、565.92±1.50 U/mL，且在蛋白酶活力方面处于同一显著水平，表明产蛋白酶能力显著强于其他大部分菌株（P<0.05），产蛋白酶能力较强；*B. subtilis* s16、*B. subtilis* 5-3 产蛋白酶能力适中，分别为 412.20±0.81、408.46±0.52 U/mL，这两株菌的蛋白酶活力水平无显著差异；*B. amyloliquefaciens* 104、*B. amyloliquefaciens* 25 蛋白酶活力分别为 247.04±0.44、243.94±1.10 U/mL，二者蛋白酶活力无显著差异，产酶能力较弱，与前述的透明圈初筛结果相似，可验证上述实验结果。

表 3 菌株发酵豆渣多肽液蛋白酶活力
Table 3 Protease activity in fermented soybean residue peptide solution

菌株编号	蛋白酶活力（$U \cdot mL^{-1}$）	菌株编号	蛋白酶活力（$U \cdot mL^{-1}$）
s4	566.29±1.59^{a}	117	275.30±0.86^{q}
J19	498.60±2.90^{d}	104	247.04±0.44^{r}
SN-14	332.69±1.57^{n}	111	405.15±0.90^{j}
5-2	482.88±3.25^{e}	5-3	408.46±0.52^{i}
S29	306.84±0.35^{p}	s9	354.98±1.14^{m}
10	566.05±0.57^{a}	24	350.59±0.13^{m}
63	565.92±1.50^{a}	j12	438.90±0.94^{h}
21	469.71±1.72^{f}	8-3	392.52±0.90^{k}
SNBS-3	556.61±4.67^{b}	7	388.57±0.65^{k}
25	243.94±1.10^{r}	s1	486.87±0.91^{e}
44	508.83±1.00^{c}	s14	456.31±2.04^{g}
s16	412.20±0.81^{i}	s3	469.02±0.64^{f}
J32	322.32±0.78^{o}	43	434.19±0.70^{h}
j10	380.79±0.79^{l}	TS	272.46±1.21^{q}

2.1.2.2 菌株发酵豆渣多肽液多肽含量测定 通过对 28 株菌的产肽能力进行测定，筛选出产多肽能力强的菌株。结果如表 4 所示，28 株芽孢杆菌均具有产肽的能力，实验菌株间产肽能力存在显著差异（P<0.05）。其中 *B. subtilis* 63 肽含量为 9.06±0.13 mg/mL，表明产肽能力显著强于其他大部分菌株（P<0.05）；*B. subtilis* 111、*B. subtilis* 5-3 肽含量为 6.57±0.04、6.57±0.07 mg/mL，二者蛋白酶活力无显著差异，产肽能力适中，与产肽能力较强的 *B. subtilis* 63 相比，具有显著差异（P<0.05）；*B. amyloliquefaciens* 104 产肽能力较差，仅为 4.14±0.10 mg/mL。通过对 28 株菌株的蛋白酶活力以及多肽含量测定可以验证，蛋白酶活力可以对多肽含量产生一定影响。大多数菌株蛋白酶活力高，其菌株的产肽能力强。

表 4 菌株发酵豆渣多肽液多肽含量
Table 4 Peptide content in fermented soybean residue peptide solution

菌株编号	肽含量（$mg \cdot mL^{-1}$）	菌株编号	肽含量（$mg \cdot mL^{-1}$）
s4	8.74±0.05^{b}	117	4.79±0.01^{q}
J19	7.73±0.04^{e}	104	4.14±0.10^{r}
SN-14	5.65±0.04^{n}	111	6.57±0.04^{k}
5-2	7.43±0.09^{fg}	5-3	6.57±0.07^{k}
S29	5.03±0.03^{p}	s9	5.99±0.01^{m}
10	8.50±0.07^{c}	24	5.86±0.04^{m}
63	9.06±0.13^{a}	j12	6.74±0.02^{j}
21	7.30±0.10^{gh}	8-3	6.34±0.06^{l}
SNBS-3	8.76±0.09^{b}	7	6.26±0.02^{l}
25	3.96±0.03^{s}	s1	7.49±0.11^{fg}
44	8.10±0.04^{d}	s14	6.96±0.03^{i}
s16	6.58±0.02^{k}	s3	7.24±0.03^{h}
J32	5.37±0.03^{o}	43	6.70±0.03^{jk}
j10	6.27±0.02^{l}	TS	4.68±0.02^{q}

2.1.2.3 菌株发酵豆渣多肽液抗氧化能力测定 SOD 是一种抗氧化金属酶，在抗氧化平衡中起到至关重要的作用，是生物体系中抗氧化酶系的重要成员之一[29]。抗氧化肽可避免或减轻底物与自由基结合造成的氧化损伤，从而达到抗氧化作用[30]。

已有研究表明，*B. amyloliquefaciens*、*B. subtilis* 等芽孢杆菌可提升发酵液抗氧化活性，在制备抗氧化生物活性物方面具有一定应用潜力[31]。为此，针对上述 28 株优产蛋白酶的芽孢杆菌，进一步筛选具有高产 SOD 酶特性的特异性菌株，结果如表 5 所示。28 株芽孢杆菌均可产 SOD 酶，实验菌株间酶活力存在显著差异（P<0.05）。其中 *B. amyloliquefaciens* 10、*B. subtilis* 63 SOD 酶活力较强，分别为 368.00±1.4、371.53±0.96 U/mL，产酶能力略高于丁学知等[32] 筛选出的高产 SOD 酶的芽孢杆菌 C328（358 U/mL）。*B. subtilis* 43、*B. velezensis* j12 SOD 酶活力分别为 265.05±0.69、267.68±0.20 U/mL，二者无显著差异，产酶能力适中，与产酶能力较强的菌株存在显著差异（P<0.05），但又显著高于产酶能力较弱的菌株（P<0.05）；*B. amyloliquefaciens* 25 SOD 酶活力为 166.74±0.30 U/mL，产酶能力较弱。28 株芽孢杆菌的多肽液均具有抗氧化活性，且存在显著差异（P<0.05）。其中 *B. subtilis* SNBS-3 多肽液的 $ABTS^{+}$ 自由基清除率、DPPH 自由基清除率分别为 68.94%±0.45%、45.62%±0.28%，处于最高水平，表明该菌株的多肽液抗氧化能力显著强于其他大部分菌株（P<0.05）；*B.*

表 5　菌株发酵豆渣多肽液抗氧化能力

Table 5　Antioxidant capacity of peptide solution from fermented soybean residue

菌株编号	ABTS⁺自由基清除率(%)	DPPH自由基清除率(%)	SOD酶活力（U·mL⁻¹）	菌株编号	ABTS⁺自由基清除率(%)	DPPH自由基清除率(%)	SOD酶活力（U·mL⁻¹）
s4	64.34±0.8^{b}	44.46±0.52^{b}	365.93±2.34^{b}	117	32.94±0.32^{m}	21.49±0.23^{o}	200.42±0.14^{p}
J19	56.41±0.77^{c}	38.43±0.59^{d}	307.01±0.60^{d}	104	29.14±0.31^{n}	21.58±0.26^{o}	172.76±2.02^{q}
SN-14	40.67±0.22^{j}	23.97±0.14^{m}	229.50±0.81^{n}	111	50.44±0.53^{ef}	30.28±0.34^{i}	249.43±0.71^{jk}
5-2	52.91±1.09^{d}	37.06±0.70^{e}	298.76±1.65^{e}	5-3	50.88±0.29^{e}	30.57±0.19^{i}	251.81±0.45^{ij}
S29	37.19±0.12^{l}	21.71±0.08^{o}	217.03±0.51^{o}	s9	43.67±0.16^{i}	25.91±0.10^{l}	236.72±0.39^{m}
10	64.72±0.52^{b}	44.70±0.33^{b}	368.00±1.4^{bc}	24	43.09±0.2^{i}	25.53±0.12^{l}	234.07±0.71^{mn}
63	63.4±1.28^{b}	43.84±0.83^{b}	371.53±0.96^{a}	j12	54.98±0.51^{c}	33.22±0.33^{h}	267.86±0.20^{h}
21	51.13±0.34^{e}	35.91±0.22^{f}	288.93±1.40^{f}	8-3	48.74±0.35^{g}	29.18±0.23^{j}	249.46±1.24^{jk}
SNBS-3	68.94±0.45^{a}	45.62±0.28^{a}	368.31±2.39^{b}	7	48.2±0.36^{gh}	28.84±0.24^{jk}	245.23±0.69^{kl}
25	28.72±0.24^{n}	21.23±0.20^{o}	166.74±0.30^{r}	s1	53.45±0.84^{d}	37.41±0.55^{e}	305.40±0.97^{d}
44	55.03±0.91^{c}	39.32±0.50^{c}	312.25±0.08^{c}	s14	49.33±0.7^{fg}	34.74±0.45^{g}	277.14±1.25^{g}
s16	43.39±0.31^{i}	30.90±0.20^{i}	255.58±0.23^{i}	s3	51.05±0.7^{e}	35.85±0.45^{f}	289.60±0.98^{f}
J32	39.28±0.29^{k}	23.07±0.19^{n}	221.00±0.80^{o}	43	46.35±0.42^{h}	32.82±0.27^{h}	265.05±0.69^{h}
j10	47.16±0.33^{h}	28.16±0.22^{k}	242.47±0.27^{l}	TS	32.56±0.13^{m}	21.21±0.10^{o}	201.21±1.36^{p}

amyloliquefaciens 25、*B. amyloliquefaciens* 104 多肽液 ABTS⁺自由基清除率较差，为 28.72%±0.24%、29.14%±0.31%；*B. amyloliquefaciens* 117、*B. amyloliquefaciens* 104、*B. amyloliquefaciens* S29、*B. subtilis* TS、*B. amyloliquefaciens* 25 DPPH 自由基清除率较低，分别为 21.49%±0.23%、21.58%±0.26%、21.71%±0.08%、21.21%±0.10%、21.23%±0.20%。

2.2　因子分析

基于上述实验结果，28 株芽孢杆菌均有产酶、产肽及抗氧化能力，利用因子分析法对 28 株芽孢杆菌进行综合评价。

2.2.1　KMO 和 Bartlett 球形检验　为了确定不同芽孢杆菌抗氧化能力指标数据是否适合进行因子分析，首先进行了 KMO 和 Bartlett 球形检验和分析，由表 6 可知，KMO 值、Bartlett 球形检验分别为 0.844、0.0001，变量间相关性较大，数据满足总体正态分布，可以进行因子分析。

表 6　KMO 和 Bartlett 球形检验

Table 6　Results of KMO and Bartlett test

指标		结果
取样足够度的KMO度量		0.844
Bartlett的球形度检验	均卡方	1173.241
	df	10
	Sig.	0.0001

2.2.2　不同芽孢杆菌抗氧化能力综合评价　用 SPSS 软件进行因子分析，由表 7 可知，提取 1 个公因子时，累计贡献率为 97.99%，提取 2 个公因子时，累计贡献率为 99.07%，可综合大部分信息，提取 2 个公因子即可。

各因子权重如表 8 所示，得分模型 F_1=0.462×蛋白酶活力+0.854×超氧化物歧化酶活力+0.025×肽含量−2.227×ABTS⁺自由基清除率+1.612×DPPH 自由基清除率；F_2=−0.206×蛋白酶活力−0.639×超氧化物歧化酶活力+0.274×肽含量+2.747×ABTS⁺自由基清除率−1.474×DPPH 自由基清除率。

表 7　特征值和方差贡献率

Table 7　Eigenvalues and variance contributions

成份	初始特征值			提取载荷平方和			旋转载荷平方和		
	总计	方差百分比(%)	累积(%)	总计	方差百分比(%)	累积(%)	总计	方差百分比(%)	累积(%)
1	4.900	97.994	97.994	4.900	97.994	97.994	2.707	54.149	54.149
2	0.054	1.078	99.073	0.054	1.078	99.073	2.246	44.924	99.073
3	0.024	0.489	99.562						
4	0.018	0.357	99.919						
5	0.004	0.081	100.000						

表 8　得分系数矩阵

Table 8　Score coefficient matrix

因子	1	2
X_1蛋白酶活性	0.462	−0.206
X_2超氧化物歧化酶活性	0.854	−0.639
X_3肽含量	0.025	0.274
X_4 ABTS⁺自由基清除率	−2.227	2.747
X_5 DPPH自由基清除率	1.612	−1.474

按各公因子对应的方差贡献率计算 F 值并进行排序，如表 9 所示，28 株芽孢杆菌中，*B. siamensis* s4、*B. amyloliquefaciens* 10、*B. subtilis* 63、*B. subtilis* SNBS-3 评分较高，分别为 1.55、1.53、1.53、1.52，具有高产抗氧化肽潜力；*B. amyloliquefaciens* 104、*B. amyloliquefaciens* 25 评分较低，分别为−2.01、−2.06，制备抗氧化肽的能力较弱。因此选定 *B. siamensis* s4、*B. amyloliquefaciens* 10、*B. subtilis* 63、*B. subtilis* SNBS-3 进行后续超声胁迫。

2.3　超声胁迫对菌株发酵豆渣蛋白酶活力、肽含量及抗氧化能力的影响

图 1 所示为 *B. subtilis* SNBS3、*B. amyloliquefaciens* 10 在 UAF 方式下（菌株比例 1:1、接种量

表 9 综合评分表

Table 9 Component composite scores

菌株编号	F_1	F_2	因子综合评分F	排序	菌株编号	F_1	F_2	因子综合评分F	排序
s4	1.35	0.97	1.55	1	s14	0.71	−0.36	0.09	15
10	1.35	0.95	1.53	2	7	−1.09	0.82	0.09	16
63	1.52	0.83	1.53	3	j10	−1.08	0.72	0.01	17
SNBS-3	1.53	0.81	1.52	4	43	0.67	−0.67	−0.19	18
J19	0.60	0.58	0.81	5	s9	−1.00	0.27	−0.32	19
j12	−1.07	1.56	0.71	6	24	−1.01	0.19	−0.39	20
44	1.22	0.02	0.7	7	s16	0.67	−0.97	−0.44	21
s1	0.95	−0.03	0.5	8	SN-14	−0.96	−0.11	−0.62	22
52	0.87	−0.04	0.45	9	J32	−1.03	−0.25	−0.78	23
53	−1.11	1.16	0.36	10	S29	−0.99	−0.55	−1.01	24
111	−1.13	1.13	0.33	11	117	−0.51	−1.45	−1.49	25
21	0.81	−0.19	0.29	12	TS	−0.61	−1.33	−1.57	26
s3	0.82	−0.22	0.27	13	104	−0.60	−1.39	−2.01	27
8-3	−1.05	0.86	0.14	14	25	−0.32	−2.26	−2.06	28

1%、接种 4 h 后在超声功率 120 W/L、超声频率 45 kHz)超声 10 min 后再发酵 36 h 的蛋白酶活力、肽含量及抗氧化能力变化。

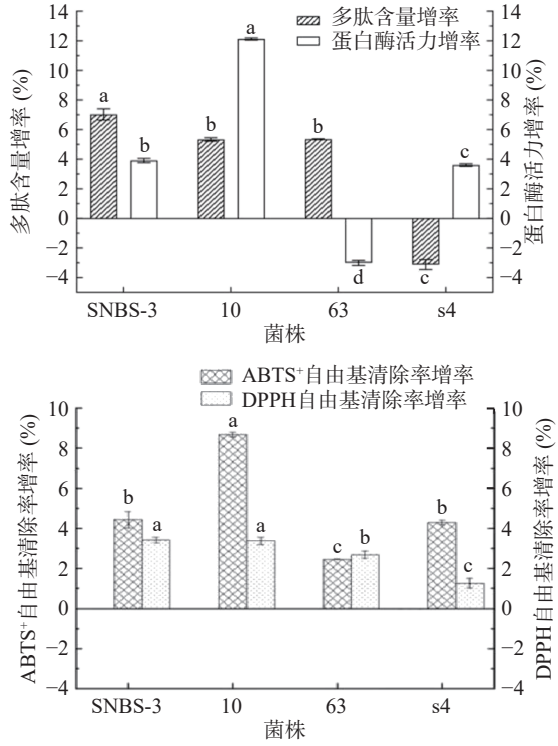


图 1 超声胁迫对菌株蛋白酶活力、肽含量及抗氧化能力增率影响

Fig.1 Effects of ultrasonic stress on protease activity, peptide content and antioxidant capacity increase rate

注: 不同小写字母表示同一指标测定下不同菌株之间差异显著(P<0.05)。

结果表明超声后 *B. subtilis* SNBS-3、*B. amyloliquefaciens* 10、*B. subtilis* 63、*B. siamensis* s4 抗氧化能力均有显著提高(P<0.05),其中 *B. amyloliquefaciens* 10 的 $ABTS^+$自由基清除率及 DPPH 自由基清除率提高幅度最大,分别为 8.69%±0.11%、3.38%±0.81%,但是对于多肽含量和蛋白酶活力并不是具有一定正相关性,不同菌株或菌种对超声的耐受性不同。例如,*B. subtilis* s4 蛋白酶含量增加,但多肽含量下降,表明超声处理可能影响了菌株的基因表达调控网络,激活了与蛋白酶合成相关的基因,使蛋白酶合成增加,活力上升。而蛋白酶在该菌代谢网络中处于关键节点,其活力上升导致多肽作为下游产物被大量消耗,从而含量下降[33]。而在 UAF 处理后,*B. subtilis* 63 的多肽含量上升,蛋白酶活力下降,其原因可能是超声的机械效应和热效应改变了蛋白酶的高级结构,使其活性位点扭曲或遭到破坏,进而导致酶活力降低。然而,该菌内多肽的生成并非完全依赖于这种蛋白酶的作用。细胞内一些储存多肽的结构因超声作用而被打开,使得原本存在于细胞特定部位的多肽释放出来,从而导致检测到的多肽含量上升,与 Ruan 等[34] 的研究结果一致。综上所述,筛选出超声前后蛋白酶活力、肽含量及抗氧化能力均呈正增长的菌株 *B. subtilis* SNBS-3、*B. amyloliquefaciens* 10。

3 结论

本研究以豆渣为发酵基质,筛选出 4 株具有产抗氧化肽能力的芽孢杆菌。并对 UAF 过程中的蛋白酶活力、肽含量、抗氧化能力间的关系进行系统研究。最终结果表明,在超声胁迫下 *B. subtilis* SNBS-3 和 *B. amyloliquefaciens* 10 两株菌的蛋白酶活力、肽含量及抗氧化能力均有显著提高(P<0.05),两株菌具有较强生产抗氧化肽的潜力,本研究对提升豆制品副产物利用率,低成本、高安全、高效率制备活性肽具有重要的意义,可为产业化制备抗氧化肽提供一定的理论支持。但目前对抗氧化肽的研究尚处于起步阶段,多数成果仅停留在实验室阶段,未来针对抗氧化肽的作用机制,仍需深入探究,同时进一步优化生产工艺,提高抗氧化肽生产的效率和稳定性,扩大其应用范围。将有助于将实验室的抗氧化肽研究转化为实际的工业应用,推动食品、化妆品和制药等相关行业的发展。

© The Author(s) 2026. 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］ dos SANTOS D C, de OLIVEIRA FILHO J G, de SANTANA SILVA J, et al. Okara flour: Its physicochemical, microscopical and functional properties[J]. Nutrition & Food Science, 2019, 49(6): 1252−1264.

［2］ LEE D P S, GAN A X, KIM J E. Incorporation of biovalorised okara in biscuits: Improvements of nutritional, antioxidant, physical, and sensory properties[J]. LWT, 2020, 134: 109902.

［3］ MOK W K, TAN Yong xing, LYU Xiao mei, et al. Effects of submerged liquid fermentation of *Bacillus subtilis* WX-17 using okara as sole nutrient source on the composition of a potential probiotic beverage[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(7): 3119−3127.

［4］ CHATTERJEE C, GLEDDIE S, XIAO C W. Soybean bioactive peptides and their functional properties[J]. Nutrients, 2018, 10(9): 1211.

［5］ CHAN W M, MA C Y. Acid modification of proteins from soymilk residue (okara)[J]. Food Research International, 1999, 32(2): 119−127.

［6］ STANOJEVIC S P, BARAC M B, PESIC M B, et al. Composition of proteins in okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36): 9221−9228.

［7］ 王姗姗, 左阮靖, 张玉红. 生物活性肽制备方法的研究进展[J]. 食品科技, 2024, 49(2): 255−262. ［WANG Shanshan, ZUO Ruanjing, ZHANG Yuhong. Recent advances in the production of bioactive peptides[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(2): 255−262.］

［8］ ASHAOLU T J. Antioxidative peptides derived from plants for human nutrition: Their production, mechanisms and applications[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(5): 853−865.

［9］ RANI S, POOJA K, PAL G K. Exploration of rice protein hydrolysates and peptides with special reference to antioxidant potential: Computational derived approaches for bio-activity determination[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 80: 61−70.

［10］ FAN Mengzhu, GUO Tingting, LI Wanru, et al. Isolation and identification of novel casein-derived bioactive peptides and potential functions in fermented casein with *Lactobacillus helveticus*[J]. Food Science and Human Wellness, 2019, 8(2): 156−176.

［11］ SHU Guowei, SHI Xiaoyu, CHEN Li, et al. Antioxidant peptides from goat milk fermented by *Lactobacillus casei* L61: Preparation, optimization, and stability evaluation in simulated gastrointestinal fluid[J]. Nutrients, 2018, 10(6): 797.

［12］ LI Wen, WANG Tao. Effect of solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* lwo on the proteolysis and the antioxidative properties of chickpeas[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 338: 108988.

［13］ SANJUKTA S, PADHI S, SARKAR P, et al. Production, characterization and molecular docking of antioxidant peptides from peptidome of *kinema* fermented with proteolytic *Bacillus* spp[J]. Food Research International, 2021, 141: 110161.

［14］ CHEMAT F, ZILL-E-HUMA, KHAN M K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(4): 813−835.

［15］ ESCLAPEZ M D, GARCÍA-PÉREZ J V, MULET A, et al. Ultrasound-assisted extraction of natural products[J]. Food Engineering Reviews, 2011, 3(2): 108−120.

［16］ 王昌陵, 李盛有. 豆渣膳食纤维改性及在食品中应用研究进展[J]. 农产品加工, 2023(4): 87−90. ［WANG Changling, LI Shengyou. Research progress on the modification of dietary fiber from soybean residue and its application in food[J]. Farm Products Processing, 2023(4): 87−90.］

［17］ KAUR N, AGGARWAL P, KUMAR V, et al. Ultrasound-assisted extraction of phytochemicals from Java plum (*Syzygium cumini* L.) pomace: Process optimization, phytochemical characterization using HPLC, FTIR, SEM and mineral profiling[J]. Waste and Biomass Valorization, 2023, 14(3): 949−961.

［18］ SUN Jin, ZHOU Changyu, CAO Jinxuan, et al. Purification and characterization of novel antioxidative peptides from duck liver protein hydrolysate as well as their cytoprotection against oxidative stress in HepG2 cells[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 848289.

［19］ HASHEMI S M B, GHOLAMHOSSEINPOUR A. Fermentation of Chortan (heated strained yoghurt) by *Lactobacillus helveticus*: Sonication treatment and biological activities[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(2): 908−915.

［20］ BIAN Yurong, LI Wenjing, PAN Lianhan, et al. Sweet-flavored peptides with biological activities from mulberry seed protein treated by multifrequency countercurrent ultrasonic technology[J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130647.

［21］ MOKTAN B, SAHA J, SARKAR P K. Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema[J]. Food Research International, 2008, 41(6): 586−593.

［22］ DUAN Manli, ZHANG Yuhua, ZHOU Beibei, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on carbon components and microbial functional metabolism during cow manure-straw composting[J]. Bioresource Technology, 2020, 303: 122868.

［23］ 屠大伟, 田仕艳, 牟韦, 等. 豆渣的微生物发酵及应用研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2025, 42(2): 1−8. ［TU Dawei, TIAN Shiyan, MU Wei, et al. Research progress on microbial fermentation and application of soybean residue[J]. Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2025, 42(2): 1−8.］

［24］ KASANA R C, SALWAN R, YADAV S K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2011, 37(3): 262−276.

［25］ TULY J A, ZABED H M, NIZAMI A S, et al. Bioconversion of agro-food industrial wastes into value-added peptides by a *Bacillus* sp. Mutant through solid-state fermentation[J]. Bioresource Technology, 2022, 346: 126513.

［26］ RAI A K, SANJUKTA S, CHOURASIA R, et al. Production of bioactive hydrolysate using protease, *β*-glucosidase and *α*-amylase of *Bacillus* spp. isolated from kinema[J]. Bioresource Technology, 2017, 235: 358−365.

［27］ FANG Jiaqi, LU Jiahong, ZHANG Ying, et al. Structural properties, antioxidant and immune activities of low molecular weight peptides from soybean dregs (Okara)[J]. Food Chemistry: X, 2021, 12: 100175.

［28］ 赵自阳, 李王成, 王霞, 等. 基于主成分分析和因子分析的宁夏水资源承载力研究[J]. 水文, 2017, 37(2): 64−72. ［ZHAO Ziyang, LI Wangcheng, WANG Xia, et al. Study on water resources carrying capacity in Ningxia based on principal component analysis and factor analysis[J]. Journal of China Hydrology, 2017, 37(2): 64−72.］

［29］ XIA Zhen, MIAO Jianyin, CHEN Bingbing, et al. Purifica-

tion, identification, and antioxidative mechanism of three novel selenium-enriched oyster antioxidant peptides[J]. Food Research International, 2022, 157: 111359.

[30] 张强, 李伟华. 抗氧化肽的研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 298−304. [ZHANG Qiang, LI Weihua. Research progress of antioxidant peptides[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(2): 298−304.]

[31] PEI Xiaodong, LI Fan, ZHANG Yanmei, et al. Preparation, purification, and identification of novel feather keratin-derived peptides with antioxidative and xanthine oxidase inhibitory activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(21): 8061−8070.

[32] 丁学知, 高必达. 高产超氧化物歧化酶芽孢杆菌 C328 菌株产酶培养基的研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2003, 26(4): 65−69. [DING Xuezhi, GAO Bida. Study on medium of highly producing superoxide dismutase from *Bacillus cereus* strain C328[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2003, 26(4): 65−69.]

[33] JINGYA L, HITOMI I, KENSAKU F, et al. Role of ATP-binding cassette transporter A1 in suppressing lipid accumulation by glucagon-like peptide-1 agonist in hepatocytes[J]. Molecular Metabolism, 2020, 34: 16−26.

[34] RUAN Siyu, LUO Juan, LI Yunliang, et al. Ultrasound-assisted liquid-state fermentation of soybean meal with *Bacillus subtilis*: Effects on peptides content, ACE inhibitory activity and biomass[J]. Process Biochemistry, 2020, 91: 73−82.