

保加利亚乳杆菌水解酪蛋白能力及产物分析#

毛雪, 龚雅莉, 张国芳, 赵裕才, 刘丽波, 刘扬, 王婷婷, 王婧莹, 段春颖, 李春

(东北农业大学食品学院, 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 为了深入研究保加利亚乳杆菌酪蛋白水解情况。本试验主要以保加利亚乳杆菌 ATCC 11842 作为研究对象, 同时以保加利亚乳杆菌 KLDS 08007、KLDS 08009、KLDS 08010、KLDS 08014 和 KLDS 08018 作为对照研究, 测定不同菌株发酵液的酪蛋白水解度和多肽含量, 同时对 ATCC 11842 的酪蛋白水解产物进行 SDS-PAGE 电泳分析和 LC-MS 分析。结果表明: ATCC 11842 的水解能力最强, 水解度为 13.89%, 多肽含量为 0.63 mg/mL。测定六株保加利亚乳杆菌细胞壁蛋白酶的活性与水解能力进行比较分析发现, 该酶活性与菌株的水解能力呈正相关, ATCC 11842 的酶活力最强, 达到 15.52 U/mL, 比活力为 6.73 U/mg。通过电泳图谱发现, 随着发酵时间的延长, 酪蛋白逐渐水解, 并生成 3.4~21.0 ku 的多肽。对水解物进行 LC-MS 分析, 酪蛋白水解后共产生 77 种 6~25 肽的片段, 其中 6~7 肽占片段种类的 9%, 8~14 肽占多肽种类的 77%。

关键字: 保加利亚乳杆菌; 酪蛋白; 细胞壁蛋白酶; SDS-PAGE; LC-MS

文章编号: 1673-9078(2016)11-128-133

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.020

Study on the Ability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to Hydrolyze Casein and Analysis of the Hydrolysate

MAO Xue, GONG Ya-li, ZHANG Guo-fang, ZHAO Yu-cai, LIU Li-bo, LIU Yang, WANG Ting-ting,
WANG Jing-ying, DUAN Chun-ying, LI Chun

(The Key Laboratory of Ministry of Dairy Science, College of Food Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to carry out an in-depth study on casein hydrolysis by *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain ATCC 11842 was used, with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains KLDS 08007, KLDS 08009, KLDS 08010, KLDS 08014, and KLDS 08018 as controls. The degree of casein hydrolysis and peptide content of the fermentation broths from different strains were measured, and the casein hydrolysate of ATCC 11842 was further analyzed by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results showed that ATCC 11842 had the strongest hydrolytic ability with the degree of hydrolysis as 13.89%, and the peptide content 0.63 mg/mL. The activities of cell envelope proteinases (CEPs) of the six strains were measured and compared with their hydrolytic abilities, and the results showed that their proteinase activity was positively related to their hydrolytic ability. ATCC 11842 exhibited the highest enzyme activity (up to 15.52 U/mL), and its specific enzyme activity was 6.73 U/mg. It can be seen from the electrophoretogram that the casein was hydrolyzed gradually with a prolonged fermentation time and 3.4~21.0 ku polypeptides were produced. As shown from the LC-MS analysis of the casein hydrolysate, 77 types of peptide fragments containing 6~25 residues were produced after casein hydrolysis, and the peptides containing 6~7 residues and 8~14 residues accounted for 9% and 77% of the total types of polypeptides, respectively.

Key words: *Lactobacillus bulgaricus*; casein; cell envelope proteinases; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; liquid chromatography-mass spectrometry

酪蛋白是天然牛乳中主要的蛋白质, 作为矿物质的载体, 具有促进机体营养物质的吸收和预防相关疾病的作用。酪蛋白水解产生的小分子多肽和氨基酸,

收稿日期: 2015-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31301519)

作者简介: 毛雪 (1990-), 女, 在读硕士, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 李春 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学

可以有效维持乳酸菌的生长代谢。同时在乳制品发酵过程中酪蛋白的水解产物影响着发酵乳的凝乳和风味的形成。Liu^[1]研究了 6 株乳酸菌的蛋白水解系统, 并预测了多种乳酸菌菌株的蛋白水解潜力; Matar^[2]研究表明乳酸菌 CEPs 能水解酪蛋白, 形成不同结构和功能的寡肽, 同时酶的活性与菌株的水解能力有密切关系; Bayjanov^[3]等利用比较基因杂交分析 39 株乳酸乳

球菌,展示了同种菌株间蛋白质水解系统的差异性。以上研究让我们明晰了多种乳酸菌蛋白水解系统和潜在水解能力。

乳酸菌具有较强的水解能力,不同菌株间差异较大。Sasaki^[4]研究表明乳杆菌显现了较其它乳酸菌更高的蛋白水解活力,发酵24 h,瑞士乳杆菌水解度达到10.71%,多肽含量为0.18 mg/mL。Bai^[5]等研究了4株瑞士乳杆菌的水解度均大于4%,KLDS 1.9207不仅产肽能力强而且产肽速率快,在发酵18 h后水解度可达4.32%,水解液中肽含量为522 mg/L。Jasna^[6]对比研究了多株乳酸菌,发酵4 h后仅瑞士乳杆菌M92和植物乳杆菌L4酪蛋白开始降解,其它菌株24 h后才开始产生短肽,菌株间差异显著。Savijoki^[7]研究发现随发酵时间延长,发酵液中的蛋白谱带逐渐减弱,酪蛋白逐渐被水解为小肽,在保加利亚乳杆菌水解酪蛋白18 h时,电泳图中几乎看不到酪蛋白条带。但是,由于乳酸菌水解酶和水解过程的复杂性,分解产物结构的多样性,对于水解产物中各种基质的图谱构建方面很是匮乏^[8]。

本试验主要是对几株保加利亚乳杆菌水解能力进行对比分析,并对水解能力较强的ATCC 11842的CEPs活性进行测定,进一步阐明其活性与水解能力之间的关系,并对其水解产物进行初步鉴定分析,为后面深入研究提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试菌为德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842),对照组KLDS 08007、KLDS 08009、KLDS 08010、KLDS 08014、KLDS 08018(东北农业大学,乳品科学教育部重点实验室);MRS培养基;BCA蛋白浓度测定试剂盒;干酪素;溶壁酶(酶活>200 U/mg);以上均为分析纯。

UV-2401PC紫外分光光度计(日本岛津);酶标仪(美国Bio-Rad公司);DYY-10C型电泳仪(北京市六一仪器厂);GL-21M高速冷冻离心机(上海市离心机械研究所);SPX-150B生化培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司);UltiMate 3000 RSLCnano Liquid Chromatography-maXis impact UHR-TOF MS液质联用仪(德国Bruker Daltonics公司;美国ThermoFisher公司)

1.2 实验方法

1.2.1 培养条件

使用前将已纯化的冻存菌按2% (V/V)的接种量接种到10 mL MRS培养基中,振匀,37 °C恒温培养16 h,传代活化2次。将活化好的菌株培养至生长稳定期按2% (V/V)接种量接种到pH 6.5、浓度为2.0% (m/V)的酪蛋白培养基中用于试验。

1.2.2 水解度的测定

水解度测定参考李晓东等人^[9]研究方法。将活化好的6株保加利亚乳杆菌乳杆菌ATCC 11842、KLDS 08007、KLDS 08009、KLDS 08010、KLDS 08014、KLDS 08018按2%接种于pH 6.5、浓度为2% (m/V)酪蛋白培养基中,于37 °C发酵48 h,取发酵液冷冻离心7741 r/min、10 min,取上清液,测定不同菌株酪蛋白的水解液。比较不同菌株对酪蛋白的水解能力,并计算平均链长(平均链长 $ku=1/\text{水解度}(\text{DH})\times 100\%$)。

1.2.3 细胞壁蛋白酶活性测定

细胞壁蛋白酶CEPs活性测定参考潘道东等人^[10]的方法,分析蛋白水解差异与酶活之间关联。

1.2.3.1 蛋白酶提取

取50 mL发酵液,以7741 r/min、4 °C冷冻离心10 min,收集菌体,用50 mmol/L Tris-HCl缓冲液洗涤三次。取5 mL细胞裂解液(pH 8.5~9.0、50 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、0.5% TritonX-100,调pH至7.5~8.0,加入100 μg/mL溶菌酶,1 μL/mL的蛋白酶抑制剂PMSF)制成细胞悬浮,在冰浴中进行超声波破壁(130 W下工作4 s,间歇6 s,循环90次),于4 °C,6451 r/min冷冻离心10 min除去细胞碎片,上清液即为粗酶液,立即用于酶活的测定。

1.2.3.2 酶活的测定

取0.02 mL底物溶液MeOsuc-Arg-Pro-Tyr-pNA (MS-Arg)配制成16.4 mmol/L、0.04 mL酶液、与2.85 mL Tris-HCl缓冲液(50 mmol/L, pH 7.8)混合,在37 °C保温60 min。结束后,加入500 μL的30%乙酸溶液,终止酶解反应,测定410 nm OD值。

酶活力单位定义:37 °C,每小时 $A_{410\text{nm}}$ 增加0.10定义为一个酶活力单位(U)。

1.2.3.3 蛋白酶的比活力

$$\text{酶比活力}(\text{U}/\text{mg}) = \frac{\text{酶活力}(\text{U}/\text{mL})}{\text{蛋白质的浓度}(\text{mg}/\text{mL})}$$

提取粗酶液并严格按照BCA试剂盒的说明书要求测定蛋白浓度。

1.2.3.4 细胞壁蛋白酶作用位点的测定

取3.0 mL菌液于7741 r/min冷冻离心10 min,收

集菌体并用 Tris-HCl (pH 7.8) 缓冲液冲液洗涤菌体 2 次, 加入 0.4 mL、2% 的溶壁酶, 在 35 °C 下酶解 3 h, 冷冻离心 16451 r/min、10 min, 分别收集上清液和沉淀 (原生质体) 按照酶活的测定方法进行测定。

1.2.4 水解产物电泳分析

本实验参考 Schagger 等人^[11]的方法, 应用 SDS-PAGE 电泳对水解产物进行分析, 通过观察蛋白谱带来确定水解的发生及小分子多肽的产生。

1.2.5 水解产物液质分析

本实验参考姚建国等人^[12]的方法, 采用液相色谱和质谱联用 (LC-MS) 的方法对保加利亚乳杆菌 ATCC11842 酪蛋白水解物进行水解后多肽成分分析。

(1) 样品预处理: 取 37 °C 发酵 48 h 的蛋白水解液, 于 7741 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取上清液, 用 NH_4HCO_3 溶液定容至 100 μL 。定容后进行超滤, 收集滤液, 并用 100 μL NH_4HCO_3 洗涤一次, 合并滤液。向滤液加入甲酸调节 pH 至 3 左右, 进行离心浓缩干燥。样品用 0.1% 甲酸- H_2O 重溶后, ziptip 脱盐, 离心浓缩干燥后, 上样缓冲液重溶后进行 LC-MS 分析。

(2) 样品采用纳升流速 HPLC 液相系统 Dionex ultimate 3000 (Dionex, USA) 进行分离, 经多肽富集柱 Dionex Trap column (100 $\mu\text{m} \times 2 \text{ cm} \times 5 \mu\text{m}$), 再经 C18 反相分析柱 (75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm} \times 3 \mu\text{m}$) 分离, 流动相 A 为甲酸水溶液 (0.1:99.9, V/V), 流动相 B 为甲酸乙腈溶液 (0.1:99.9, V/V), 流速为 300 nL/min。多肽洗脱梯度为: 0~65 min、2~20%B, 65~80 min、20~30%B, 80.1~95 min 与 80%B。

(3) 串联质谱检测采用的是数据依赖扫描 (Data Dependent Acquisition, DDA) 模式。质谱电喷雾毛细管电压为 1900 V; 气体流速为 2.0 L/min; 柱温为 55 °C; 离子源温度为 120 °C; 选择母离子质荷比范围为 m/z 350~1500 的进行二级碎裂。

1.2.6 统计学分析

数据采用 Microsoft excel 2003 软件统计分析, 每个试验重复 3 次, 结果用 3 次独立试验的均值 \pm 标准差 ($\pm\text{SD}$) 形式表示, 用 t 检验进行差异性分析。试验采用 Microsoft excel 2003 软件制图。

2 结果与分析

2.1 保加利亚乳杆菌水解度的测定

测定六株保加利亚乳杆菌 ATCC 11842、KLDS 08007、KLDS 08009、KLDS 08010、KLDS 08014 和 KLDS 08018 对酪蛋白的水解度。发酵 6 h 后酪蛋白逐渐被水解成小分子的肽和氨基酸, 溶液中酪蛋白的含

量减少, 其平均链长缩短。由图 1 可以明显的看出发酵 48 h, ATCC 11842 对酪蛋白的水解能力较强, 其水解度为 13.89%。其他菌株对酪蛋白的水解度由低到高分别为 3.35%、5.42%、5.97%、6.17% 和 8.77%。

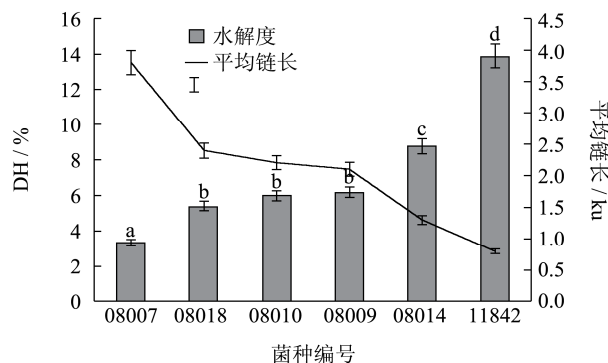


图 1 不同菌株蛋白水解度和水解后酪蛋白平均链长

Fig.1 Degree of casein hydrolysis and the average chain length of casein after hydrolysis by different strains

注: 不同字母表示平均值存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.2 保加利亚乳杆菌细胞壁蛋白酶活性与水解度的相关性

2.2.1 CEPs 作用位点的确定

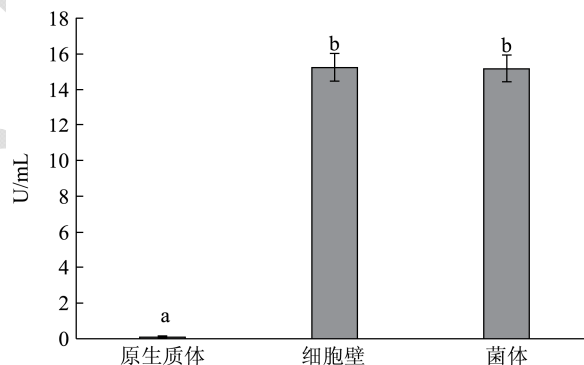


图 2 不同位置 CEPs 的活力

Fig.2 Activity of CEPs at different sites

注: 不同字母表示平均值存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

由图 2 的实验结果可知, 溶解细胞壁处理后所得的原生质体所制备的粗酶液, 其 CEPs 的活力很低为 0.04 U/mL。对菌体进行溶解细胞壁处理后所得上清液, 与菌体直接进行破壁后的粗酶液, 两者测得的 CEPs 的活力相近, 分别为 15.27 U/mL 和 15.19 U/mL。这意味着本实验选择的 CEPs 的测定方法, 可以有效的反映保加利亚乳杆菌的 CEPs 的酶活力, 同时也证明该酶的作用位点位于细胞壁上, 是保加利亚乳杆菌在胞外唯一能够水解酪蛋白的酶。

2.2.2 不同菌株 CEPs 酶活测定

2.2.2.1 酶活力测定

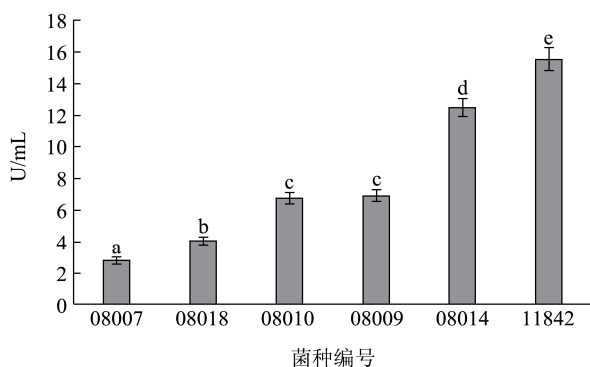


图3 不同菌株的 CEPs 酶活力

Fig.3 Activity of CEPs of different strains

注: 不同字母表示平均值存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

由图 3 实验结果表明, 实验菌株的 CEPs 的活性差异显著, 其中实验菌株 ATCC 11842 的细胞壁蛋白活力最强为 15.52 U/mL, 其他菌株酶活力由低到高依次为 2.87 U/mL、4.12 U/mL、6.77 U/mL、6.95 U/mL 和 12.45 U/mL。

2.2.2.2 蛋白浓度测定

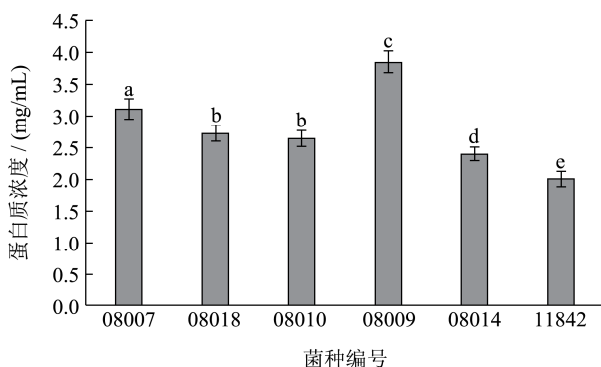


图4 不同菌株的蛋白浓度

Fig.4 Protein concentration of different strains

注: 不同字母表示平均值存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

由于不同菌株的生长能力不同, 所以单位体积中菌量不同, 对菌株进行蛋白浓度的测定, 可以更好的反应其细胞壁蛋白酶的活性。进行粗酶液蛋白含量的测定不同菌株粗酶液的蛋白含量如图 4 所示, 实验结果表明: 不同菌株的蛋白含量之间的差异也会影响不同菌株蛋白酶的活性。

2.2.3 不同菌株 CEPs 的比活力

由图 2~5 对实验结果进行分析。可知 ATCC 11842 细胞壁蛋白酶的活力最好, 其酶活力为 15.52 U/mL, 比活力为 6.73 U/mg。对比 2.1 的实验结果, 可以表明 CEPs 的活性影响着保加利亚乳杆菌对酪蛋白的水解, CEPs 活性强的菌株对酪蛋白的水解能力越强, 同时水解液中多肽的含量也会相应增加。作为唯一水解酪蛋白的酶, ATCC 11842 的 CEPs 的活性明显强于其他菌种, 从而侧面也进一步的验证了六株菌在对酪蛋白水

解能力上存在的显著差异, 这种差异与其酶活之间存在正相关性。

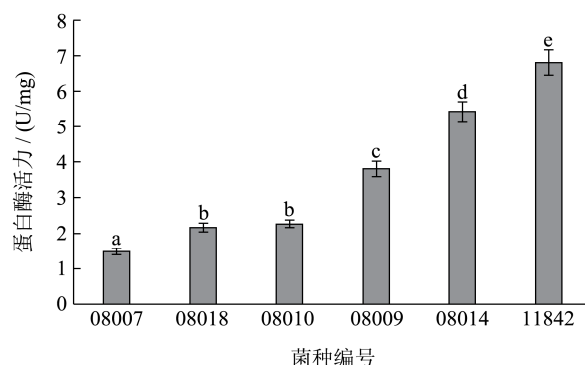


图5 不同菌株的蛋白酶比活力

Fig.5 Protease specific activity of different strains

注: 不同字母表示平均值存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.3 保加利亚乳杆菌水解产物电泳分析

根据上述实验, 可知保加利亚乳杆菌 ATCC 11842 具有较高的水解度, 其水解液中多肽含量最多, 因此选择 ATCC 11842 对其水解产物进行进一步研究。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对酪蛋白的水解产物进行分析。

2.3.1 发酵液蛋白浓度的测定

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的最佳的蛋白浓度为 2~4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 因此对发酵液进行蛋白的测定并将蛋白浓度稀释至最佳浓度, 进行上样。其测定方法严格按照 BCA 试剂盒的测定方法测定发酵液的蛋白浓度。

2.3.2 电泳图谱分析

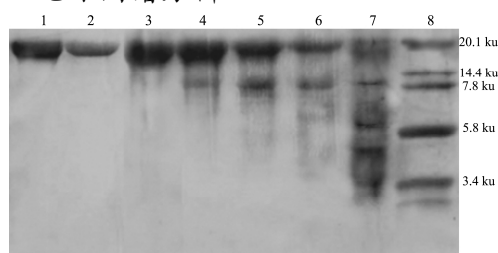


图6 在不同发酵时间下的酪蛋白水解液电泳图

Fig.6 SDS-PAGE profiles of casein hydrolysates at different fermentation times

注: 1, α -酪蛋白, 2, β -酪蛋白, 3, 0 h 酪蛋白水解液, 4, 12 h 酪蛋白水解液, 5, 24 h 酪蛋白水解液, 6, 36 h 酪蛋白水解液, 7, 48 h 酪蛋白水解液, 8, Marker。

由图 6 所示的实验结果表明, 酪蛋白溶液, 随着保加利亚乳杆菌发酵时间的延长, 其水解逐渐增加, 在不同发酵时间下, 酪蛋白水解液中酪蛋白的电泳谱带逐渐变宽并有前移趋势, 随着水解时间的延长有新的谱带产生。酪蛋白谱带被逐渐弱化, 表明酪蛋白被

菌体蛋白水解系统水解为小分子多肽。电泳图谱谱带的变化进一步证实了,在以酪蛋白为培养基进行发酵培养过程中,随着培养时间的延长,酪蛋白被保加利亚乳杆菌 ATCC 11842 的蛋白水解系统中的蛋白酶水解,多肽含量增加。

2.4 保加利亚乳杆菌水解产物液质分析

上述实验结果中可以看出,ATCC 11842 具有相对较高的水解能力,对其酪蛋白水解前后的成分进行 LC-MS 比较分析。其多肽种类分布如图 7 所示。酪蛋白在 ATCC11842 的发酵作用下,将酪蛋白分子水解成 77 个多肽片段,这些片段的长度从 6~25 肽不等。水解液中多肽片段主要集中在 8~14 肽,占多肽片段种类的 77%,其中 12 肽的片段有 12 种,10 肽有 11 种,9 肽有 10 种,8 肽、11 肽和 14 肽各有 8 种。6~7 肽占片段种类的 9%,15~25 肽占 13%。

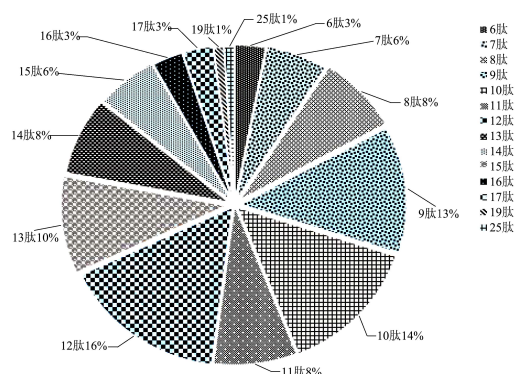


图 7 多肽种类分布图

Fig.7 Distribution map of the polypeptide species

3 结论

3.1 根据本实验结果看出,同菌种的保加利亚乳杆菌的不同菌株之间对酪蛋白的水解也存在很大差异 ($p < 0.05$)。根据研究表明,不同菌株之间存在个体差异,水解系统的复杂性会最终表现为对酪蛋白水解能力的不同^[13]。

3.2 根据实验结果可以看出,完整细胞的粗酶液和细胞壁提取液的 CEPs 活性测定结果基本相同。本实验确定了保加利亚乳杆菌的 CEPs 活性的测定体系和作用位点,同时,也验证了保加利亚乳杆菌的 CEPs 是与其细胞壁相连接的酶,也是水解系统中唯一的酪蛋白水解酶。李敏^[14]研究证明细胞壁蛋白酶主要是以 MS-Arg 为底物,该底物还可以与其他蛋白酶进行反应。但是,乳酸菌的蛋白水解系统中,只有 CEPs 是蛋白酶,它可以切下 MS-Arg 末端的对硝基苯胺 (pNA),产生黄色的对硝基苯胺。

3.3 本研究结果显示,实验中 6 株保加利亚乳杆菌之

间的 CEPs 的活性存在很大差异 ($p < 0.05$), ATCC 11842 的活性在试验中表现最佳,其比活力最高达到 6.73 U/mg。同时 6 株菌的 CEPs 的活性与其对酪蛋白的水解度之间呈正相关性,即菌株的 CEPs 活性越强其酪蛋白的水解度越大,这主要是因为 CEPs 是保加利亚乳杆菌蛋白水解系统中唯一能够水解酪蛋白的酶。由此进一步证明,在这 6 株菌种,CEPs 对其蛋白水解系统的重要性,尤其是水解还可以产生菌株继续生长所必需的营养物质。

3.4 选用水解能力最强 ATCC11842 进行后续试验,通过对不同时间的水解液进行小分子的 SDS-PAGE 分析,参考实验结果图谱显示,随着时间的增加,图谱中酪蛋白条带颜色逐渐变浅,并有新的条带生成。Luo^[15]研究了利用木瓜蛋白酶,胰蛋白酶和胰酶对酪蛋白进行水解,实验结果表明不同酶对酪蛋白的水解能力不同,SDS-PAGE 电泳谱带可以清晰的表明不同水解蛋白酶之间的差异,因此可以通过对 SDS-PAGE 谱带的分析,可以验证酪蛋白的水解程度和多肽的产生。Holder^[16]研究证明了在酪蛋白水解的过程中,酪蛋白的含量逐渐减少,同时有小分子的多肽产生。

3.5 本试验通过对酪蛋白水解液进行 LC-MS 分析,可以看出 ATCC 11842 对酪蛋白进行水解后得到 77 种 6~25 肽的多肽片段,部分多肽可以进一步水解生成具有生物活性的多肽成分。如韩飞等^[17]研究证明了 L-SQSKVLPVPQ-K 可以进一步水解生成 ACE 抑制活性多肽 KVLVPV, V-VPPFLQPEVM-G 和 N-IPPLTQTPVVVPP-F 也可以降解生成具有 ACE 抑制活性的多肽 VPP 和 IPP, L-INNQFLPYPYAKPA-A 和 A-LINNQFLPYPYAKPA-A 可以进一步水解生成具有阿片拮抗活性的多肽 YPY。同时 Leszek^[18]也研究了 E-NSEKTTMPLW-可以水解生成免疫活性多肽 TTMLW。

3.6 综上所述,供试菌中 ATCC 11842 水解能力最强,CEPs 的活性活性最好,同时通过对 SDS-PAGE 和 LC-MS 分析,明确了酪蛋白水解的产物,为后续研究提供基础理论依据。

参考文献

- [1] Liu M, Siezen R J, Nauta A. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 36
- [2] Matar C, Amiot J, Savoie L. The effect of milk fermentation by Lactobacillus Helveticus on the release of peptides during *in vitro* digestion [J]. Journal of Dairy Science, 1996, 79: 971-979

- [3] Bayjanov J R, Wels M, Starrenburg M. PanCGH: A genotype-calling algorithm for pangenome CGH data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(3): 309-314
- [4] Sasaki M, Bosman B W, Tan P S. Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli [J]. *Journal of Dairy Research*, 1995, 62: 601-610
- [5] 白雪,李丹凤,王婷婷,等.发酵法制备生物活性肽及其产物的初步分析[J].*食品工业技术*,2013,32(23):201-210
BAI Xue, LI Dan-feng, WANG Ting-ting, et al. The preparation of bioactive peptides by fermentation and the hydrolyzates determination [J]. *Food Industry Technology*, 2013, 32(23): 201-210
- [6] Jasna B, Blazenka K, Andreja L P. Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M 92 [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2013, 20: 58-64
- [7] Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P. Proteolytic systems of *Lactic acid bacteria* [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2006, 71(4): 394-406
- [8] Vander Ven C, Gruppen H, Bont A, et al. Reversed phase and size exclusion chromatography of milk protein hydrolysates: Relation between elution from reversed phase column and apparent molecular weight distribution [J]. *International Dairy Journal*, 2011, 11(1): 83-92
- [9] 李晓东,牛治霞,张柏林.乳清蛋白水解物水解度3种测定方法的比较[J].*中国乳品工业*,2006,34(10):59-62
LI Xiao-dong, NIU Zhi-xia, ZHANG Bo-lin. Various methods available for the determination of hydrolyzed degree of whey protein [J]. *China Dairy Industry*, 2006, 34(10): 59-62
- [10] 潘道东,童敏,吴振.干酪乳杆菌胞壁蛋白酶提取条件优化及其水解特性研究[J].*中国食品学报*,2011,11(7):102-109
PAN Dao-dong, TONG Min, WU Zhen. Optimization of CEP extraction conditions from *Lactobacillus casei* and its hydrolysis characterization [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2011, 11(7): 102-109
- [11] Schägger H, Von Jagow G. Tricine-sodium Dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 ku [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166(2): 368-379
- [12] 姚建国,李月琪,潘峰云,等.用 2D Micro-HPLC/MS 分析六种蛋白质混合物的胰蛋白酶解多肽产物[J].*分析科学学报*,2006,22(1):99-101
YAO Jian-guo, LI Yue-qi, PAN Feng-yun, et al. Analysis of six protein mixture digested by trypsin using 2D Micro-HPLC system with MS [J]. *Analytical Science*, 2006, 22(1): 99-101
- [13] Thomas T D, Mills O E. Proteolytic enzymes of starter bacteria in dairying [J]. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 1991, 35(3): 255-273
- [14] 李敏,潘道东.嗜酸乳杆菌细胞壁蛋白酶的提取优化[J].*食品科学*,2011,32(23):260-265
LI Min, PAN Dao-dong. Optimization of extraction of cell-envelope proteinase from *Lactobacillus acidophilus* [J]. *Food Science*, 2011, 32(23): 260-265
- [15] Luo Y, Pan K, Zhong Q. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: partial characterizations [J]. *Food Chemistry*, 2014, 155(11): 146-154
- [16] Holder A, Thienel K, Klaiber I, et al. Quantification of bio-and techno-functional peptides in tryptic bovine micellar casein and γ -casein hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2014, 158: 118-124
- [17] 韩飞,乐国伟,施用晖,等.牛乳酪蛋白中的生物活性肽及其生理功能[J].*畜牧与兽医*,2005,37(5):51-53
HAN Fei, LE Guo-wei, SHI Yong-hui, et al. Bioactive peptides casein and its physiological function [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2005, 37(5): 51-53
- [18] Leszek Stepaniak, Marco Gobetti, Terje Sørhaug, et al. Peptides inhibitory to endopeptidase and aminopeptidase from *Lactococcus Lactis* ssp. *Lactis* MG1363 released from bovine β -casein by chymosin, trypsin or chymotrypsin [J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1996, 202(4): 329-333