

# 酶法制备高抑制 ACE 活性蜂王浆的水解肽工艺优化

陈 静, 刘 超, 涂 世, 徐丽媛, 刘 睿\*

(华中农业大学食品科学技术学院, 武汉市蜂产品质量控制工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 筛选制备高抑制血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)活性蜂王浆的酶制剂并确定其最佳酶解条件。在比较 5 种蛋白酶酶解蜂王浆产物抑制 ACE 酶活性基础上, 选定日本天野公司生产的天野蛋白酶 P 为最适酶制剂, 通过单因素试验和 Box-Behnken 二次旋转正交试验, 并采用响应面分析得到天野蛋白酶 P 最佳酶解条件为水解时间 196min、蜂王浆质量浓度 0.0653g/mL、加酶量 1503U/g。水解时间和蜂王浆质量浓度对抑制率有极显著影响( $P < 0.01$ ), 加酶量对抑制率有显著影响( $P < 0.05$ )。此条件下, 蜂王浆酶解液对 ACE 的抑制率达到 79.75%, 为理论预测值的 98.08%。蜂王浆几乎没有抗高血压活性, 而天野蛋白酶 P 酶解蜂王浆产物有显著的抗高血压活性。

**关键词:** 蜂王浆; ACE 抑制率; 蛋白酶; 水解; 响应面分析

## Optimization of Enzymatic Preparation of Royal Jelly-derived Peptides with High Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity

CHEN Jing, LIU Chao, TU Shi, XU Li-man, LIU Rui\*

(Wuhan Research Center on Quality Control Engineering of Bee Products, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Amano protease P was selected as the most suitable enzyme out of 5 proteases for preparing royal jelly-derived peptides with high angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Using one-factor-at-a-time method in combination with quadratic rotary orthogonal combination design, the optimal conditions for the hydrolysis of royal jelly by the selected enzyme for further improving ACE inhibitory rate of hydrolysates were 196 min, 0.0653 g/mL substrate concentration and 1503 U/g enzyme amount, resulting in an experimental ACE inhibitory rate of 79.75%, representing 98.08% of the theoretical value. Hydrolysis time and substrate concentration had extremely significant effect on ACE inhibitory rate of hydrolysates ( $P < 0.01$ ) and enzyme amount had significant effect ( $P < 0.05$ ). In conclusion, royal jelly almost has no ACE inhibitory activity, while royal jelly-derived peptides resulting from Amano protease P-catalyzed hydrolysis have powerful ACE inhibitory activity.

**Key words:** royal jelly; angiotensin I converting enzyme (ACE)-inhibitory rate; protease; hydrolysis; response surface analysis

中图分类号: S896.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0075-06

蜂王浆是 5~15 日龄工蜂舌腺和上颚腺的分泌物, 呈乳白色或淡黄色, 专门用于喂养蜂王及 3 日龄幼蜂的浆状物质。蜂王浆干物质含量为 30.0%~37.5%, 其中以蛋白质含量最多<sup>[1]</sup>。蜂王浆具有增强机体免疫力<sup>[2]</sup>、抗氧化延缓衰老<sup>[3-4]</sup>、降血糖、消除疲劳<sup>[5]</sup>、抑菌<sup>[6]</sup>等多种保健功能<sup>[7]</sup>, 而王浆中的蛋白质对蜂王浆的生理活性

影响很大<sup>[8-9]</sup>。但是蜂王浆蛋白质很不稳定, 在贮存过程中极易发生变化, 影响其生理活性并造成营养损失。4℃和 20℃时, 蜂王浆水溶性蛋白中相对分子质量为 88000D 在 5d 内迅速降解<sup>[10]</sup>。对常温条件下储存 5 个月的蜂王浆品质进行研究, 发现蜂王浆中两种水溶性蛋白 85.2kD 和 60.7kD 发生降解。蜂王浆褐变的程度随时间延

收稿日期: 2011-07-01

作者简介: 陈静(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为蜂产品加工及质量安全。E-mail: bingxuefeiyan2008@126.com

\* 通信作者: 刘睿(1969—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为功能食品及农副产品深加工。E-mail: liurui@mail.hzau.edu.cn

长而增加,而且蜂王浆的褐变与蛋白质有关,是蛋白质的糖基化结果<sup>[11]</sup>。

目前,蜂王浆产品种类很多,有蜂王浆冻干粉,胶囊,口服液等,但还没有有效的方法解决蜂王浆中蛋白质不稳定的问题。也有将蜂王浆中的蛋白质除去再添加到食品或口服液中以保证产品的稳定性,但这样会影响其保健功能。蜂王浆经过酶解后获得的酶解物不仅提高其稳定性,而且吸收好、营养高,甚至还增强了蜂王浆的某些生理活性。采用4种不同蛋白酶(蛋白酶N、蛋白酶M、蛋白酶P、复合蛋白酶)水解蜂王浆,发现不同蛋白酶对蜂王浆水解效果不同,以复合植物蛋白酶水解效果较好。所制备的酶解物的酸、热稳定性及水溶性均优于原浆<sup>[12]</sup>。Guo等<sup>[13-14]</sup>用蛋白酶水解水溶性蜂王浆蛋白并比较酶解物,蜂王浆及蛋白的抗氧化能力,水解多肽相对于蜂王浆及蛋白有很强的抗氧化作用。用胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶酶解蜂王浆获得的多肽具有显著地抑制血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)活性,而蜂王浆和蜂王浆蛋白没有表现出抑制ACE的活性<sup>[15]</sup>。许建香等<sup>[16]</sup>采用反相高效液相色谱法测定了蜂王浆水溶性蛋白及其相关产物对ACE的抑制作用。结果表明,蜂王浆水溶性蛋白本身对ACE抑制作用很弱,而它们的酶解产物对ACE的抑制作用却大大增强了。

ACE催化血管紧张素I转变为具强效升高血压作用的物质血管紧张素II;同时,ACE将具降压作用的物质舒缓激肽降解,使之失去降压作用,因此能够抑制ACE活性的物质具有明显的抗高血压的活性。本研究旨在通过实验筛选出一种新的酶制剂,使其对王浆蛋白进行适当酶解修饰后使其具有高抑制ACE活性,为开发抗高血压活性强且稳定性高的蜂王浆产品提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲜蜂王浆 武汉蜂之宝蜂业有限公司;新鲜猪肺市购;透析袋(8000~14000D) 美国Biosharp公司;硫酸铵(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;乙酸乙酯(分析纯) 上海化学试剂有限公司;天野酶A、天野酶P 日本天野酶公司;中性蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶 丹麦诺维信公司;马尿酸-组胺酰-亮氨酸(N-Hippuryl-His-Leu hydrate, HHL) 海军总医院。

### 1.2 仪器与设备

Avanti J-26xp型高速冷冻离心机、Φ-70 pH计 美国贝克曼公司;AR2410型电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH.B11.420型恒温培养箱 上海市跃进医疗器械一厂;UV-9600型紫外-可见分光光度计 北京瑞利分析仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 ACE粗酶液提取<sup>[17]</sup>

取300g新鲜猪肺,冰冷生理盐水淋洗,剁碎后加入1000mL含0.25mol/L蔗糖的0.02mol/L磷酸缓冲液(pH7.5)。匀浆,用4层纱布过滤,滤液于4℃、8500r/min离心20min,得上清液。加入164g硫酸铵,0℃冰浴2h,4℃、8500r/min离心20min。取上清液,加102g硫酸铵,然后0℃冰浴,过夜,4℃、8500r/min离心20min,得沉淀,用150mL含0.1mol/L氯化钠的磷酸盐缓冲液(pH7.5)溶解,4℃透析20h得粗酶液。粗酶液分装于小管,放入冰箱冻藏,备用。

#### 1.3.2 蜂王浆酶解液和蜂王浆水溶液制备<sup>[12,16,18]</sup>

蜂王浆酶解液制备:称取2.5g新鲜蜂王浆,加蒸馏水溶解,定容到50mL,用0.1mol/L的NaOH溶液调节至各酶最佳pH值。加入蛋白酶1500U/g,在各酶最佳温度下温浴4h,然后在沸水浴中加热15min灭酶活,4℃、8500r/min离心15min,得到的上清液用滤纸过滤,滤液于冰箱中冷藏。

蜂王浆水溶液制备:除不加酶外,其余处理同上。

#### 1.3.3 蜂王浆酶解液和蜂王浆水溶液对ACE粗酶液抑制活性的测定<sup>[19]</sup>

取ACE粗酶液0.10mL、王浆酶解液0.10mL、HHL 0.05mL,混匀后在37℃水浴中保温1h,立即加0.25mL 1mol/L的HCl终止反应。静置5min,加乙酸乙酯1.50mL萃取,强烈振摇1min之后,3000r/min离心5min。取酯层0.5mL,沸水浴中蒸干,再加5mL 1mol/L NaCl溶解残渣。于波长228nm处,以1mol/L NaCl溶液作参比,测吸光度记为S;用蒸馏水代替王浆酶解液,步骤同上,测吸光度记为A;用蒸馏水代替粗酶液和王浆酶解液测吸光度记为C。上述A值做3个平行,S值做3个平行,按表2加样。计算ACE抑制率。

$$\text{ACE抑制率}/\% = \frac{A-S}{A-C} \times 100$$

#### 1.3.4 单因素试验与正交试验设计方案

称取2.5g新鲜蜂王浆,按照表1相应的单因素水平加蒸馏水和蛋白酶,其余步骤同1.3.2节。

表1 单因素试验设计表  
Table 1 One-factor-at-a-time design

试验号	1	2	3	4	5
水解时间/h	1.0	2.5	4.0	5.5	7.0
蜂王浆质量浓度/(g/mL)	0.01	0.03	0.05	0.07	0.09
蛋白酶添加量/(U/g)	700	1100	1500	1900	2300

根据单因素试验的结果, 确定正交试验各因素应选取的水平。以对 ACE 粗酶液的抑制率为响应值, 通过响应面分析对酶解条件进行优化<sup>[20]</sup>。Box-Behnke 试验因素与水平设计如表 2 所示。

表 2 三因素三水平二次旋转正交试验因素和水平表

Table 2 Coded levels and corresponding actual levels of the optimization parameters used in quadratic rotary orthogonal combination design

规范编码	水解时间/h	蜂王浆质量浓度/(g/mL)	蛋白酶添加量/(U/g)
-1	1.0	0.05	1100
0	2.5	0.07	1500
1	4.0	0.09	1900

## 2 结果与分析

### 2.1 蜂王浆溶液和蜂王浆 5 种蛋白酶的酶解液对 ACE 粗酶液的抑制效果

用 5 种蛋白酶对蜂王浆进行酶解以制备蜂王浆酶解液, 各蜂王浆酶解液以及蜂王浆溶液对 ACE 粗酶液的抑制效果见图 1。

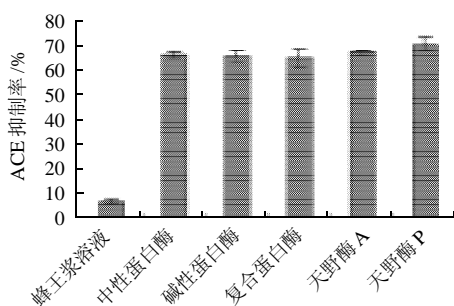


图 1 蜂王浆酶解液以及蜂王浆溶液对 ACE 粗酶液的抑制率

Fig.1 Effect of different proteases on ACE inhibitory rate of royal jelly hydrolysates

由图 1 可以看出, 新鲜蜂王浆溶液几乎没有 ACE 抑制活性, 而蜂王浆酶解液具有显著的 ACE 抑制活性; 各蜂王浆酶解液对 ACE 抑制活性相差不大, 天野酶 P 酶解液抑制活性最高。有研究表明<sup>[15]</sup>, 蜂王浆酶解液中的二肽和三肽组分具有 ACE 抑制活性, 而蜂王浆水溶性蛋白液则几乎没有 ACE 抑制活性, 这与本次研究结果一致。

### 2.2 不同因素对蜂王浆酶解液 ACE 抑制率的影响

#### 2.2.1 水解时间对蜂王浆酶解液 ACE 抑制率的影响

取 2.5g 蜂王浆, 加蒸馏水溶解使质量浓度为 0.05g/mL、天野酶 P 添加量 1500U/g, 处理时间依次为 1.0、2.5、4.0、5.5、7.0h 制备 5 个蜂王浆酶解液样品, 各个样品对 ACE 粗酶液的抑制率如图 2 所示。

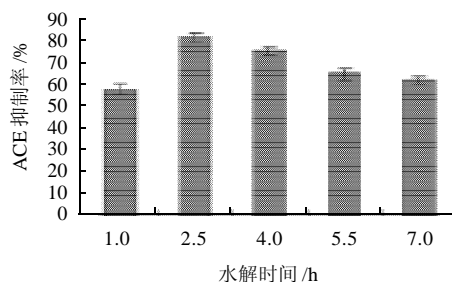


图 2 水解时间对蜂王浆酶解液 ACE 抑制率的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis time on ACE inhibitory rate of royal jelly hydrolysates

由图 2 看出, 当酶解时间为 2.5h 时, 所得蜂王浆酶解液具有最大 ACE 抑制率; 酶解时间为 1.0h 时, 所得蜂王浆酶解液 ACE 抑制率最低; 酶解时间高于 2.5h 则所得蜂王浆酶解液 ACE 抑制率随水解时间增大而下降。ACE 抑制肽的活性与其氨基酸结构和组成密切相关, 不同的氨基酸结构和组成的短肽的抑制活性差别很大。总体说来, ACE 抑制肽的抑制机制是十分复杂的, ACE 抑制肽的结构与其抑制作用模式的关系尚不清楚。从目前报道的文献可知, 具有 ACE 酶抑制活性的肽为 2~15 肽<sup>[21]</sup>, 只有特定氨基酸组成和分子质量大小的肽才具有较高的 ACE 酶抑制活性。因此如果酶解时间过短, 蛋白酶与蜂王浆蛋白质不能充分作用; 水解时间较长, 蛋白质链被充分打开后, 具有 ACE 酶抑制活性的部分特定位点可能被水解, 导致抑制活性降低。张丰香<sup>[21]</sup>研究指出, 在 ACE 抑制肽的 C 端的 3 个氨基酸中, 如有一个是疏水性氨基酸, 则该肽具有较高的 ACE 抑制率, N 端含侧链脂肪族氨基酸如缬氨酸和异亮氨酸等可以提高肽的活性。因此只有适宜的水解时间才能得到抑制率较高的蜂王浆酶解液。

#### 2.2.2 蜂王浆质量浓度对蜂王浆酶解液 ACE 抑制率的影响

取 2.5g 蜂王浆, 加蒸馏水溶解使得蜂王浆质量浓度依次为 0.01、0.03、0.05、0.07、0.09g/mL, 水解时间 4h, 天野酶 P 添加量 1500U/g, 制备 5 个蜂王浆酶解液样品。各个样品对 ACE 粗酶液的抑制率如图 3 所示。

由图 3 可知, 蜂王浆质量浓度 0.07g/mL 时, 所得到的蜂王浆酶解液对 ACE 粗酶液具有最大抑制率; 当蜂王浆质量浓度小于 0.07g/mL 时, 所得到的蜂王浆酶解液对 ACE 粗酶液的抑制率随蜂王浆质量浓度增加而增加; 当蜂王浆质量浓度大于 0.07g/mL 时, 所得到的蜂王浆酶解液对 ACE 粗酶液的抑制率有下降趋势。底物浓度对酶水解有重要影响, 底物浓度低时, 并非所有的酶与底物结合, 随着底物浓度的增加, 酶与底物充分结合, 产生适宜的水解产物, 如果底物浓度过高还可能产生底

物浓度抑制效应。因此在一定的水解时间内只有适量的蜂王浆质量浓度的酶解液才具有较大的 ACE 抑制率, 这与张丰香<sup>[22]</sup>的研究结果相吻合。

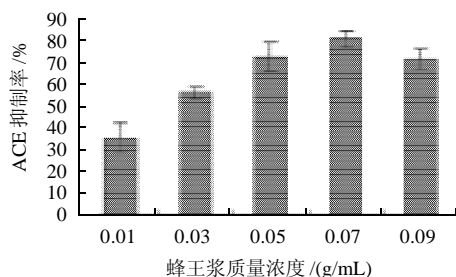


图3 蜂王浆质量浓度对蜂王浆酶解液 ACE 抑制率的影响

Fig.3 Effect of substrate concentration on ACE inhibitory rate of royal jelly hydrolysates

### 2.2.3 加酶量对蜂王浆酶解液 ACE 抑制率的影响

取 2.5g 蜂王浆, 蜂王浆质量浓度 0.07g/mL, 水解时间 4h, 天野酶 P 添加量依次为 700、1100、1500、1900、2300U/g, 制备 5 个蜂王浆酶解液样品。各样品对 ACE 粗酶液的抑制率如图 4 所示。

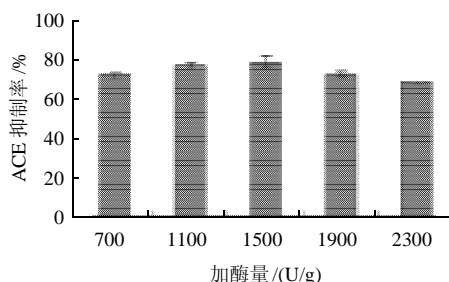


图4 加酶量对蜂王浆酶解液 ACE 抑制率的影响

Fig.4 Effect of Amano protease P amount on ACE inhibitory rate of royal jelly hydrolysate

由图 4 可以看出, 当加酶量为 1500U/g 时, 所得到的蜂王浆水解液具有最大 ACE 抑制率; 当加酶量小于 1500U/g 时, 所得到的蜂王浆水解液 ACE 抑制率随加酶量增加而增加; 当加酶量大于 1500U/g 时, 所得到的蜂王浆水解液 ACE 抑制率随加酶量增加而降低。可见, 在一定的酶解条件下, 水解产物的分子质量大小和结构是与加酶量密切相关, 也导致酶解产物的活性产生差异, 因此, 只有当加酶量适宜时所得到的蜂王浆水解液才具有较大的 ACE 抑制率。

### 2.3 天野蛋白酶 P 酶解蜂王浆条件优化

#### 2.3.1 二次回归正交旋转 Box-Behnken 试验设计

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 试验设计原理, 设计了三因素三水平二次旋转正交试验。共

有 15 个试验点, 其中 12 个试验点为分析因子, 零点试验进行 3 次, 以估计误差。试验设计及结果见表 3。

表3 二次回归旋转 Box-Behnken 设计及结果

Table 3 Box-Behnken experimental design and experimental results

试验号	$X_1$ 水解时间	$X_2$ 蜂王浆质量浓度	$X_3$ 加酶量	ACE 抑制率 / %
1	-1	-1	0	61.23 ± 2.64
2	-1	0	-1	57.37 ± 3.30
3	-1	0	1	59.55 ± 4.77
4	-1	1	0	53.82 ± 1.35
5	0	-1	-1	76.33 ± 1.56
6	0	-1	1	72.71 ± 1.17
7	0	1	-1	68.30 ± 1.02
8	0	1	1	70.58 ± 1.37
9	1	-1	0	75.86 ± 0.60
10	1	0	-1	76.24 ± 2.56
11	1	0	1	78.39 ± 1.97
12	1	1	0	72.64 ± 1.72
13	0	0	0	79.37 ± 0.98
14	0	0	0	78.63 ± 1.35
15	0	0	0	78.17 ± 1.90

采用 SAS 软件对实验数据进行拟合, 得到的回归方程为:

$$Y = 0.787333 + 0.089X_1 - 0.026X_2 + 0.00375X_3 - 0.084792X_1^2 + 0.01025X_1X_2 - 0.043792X_2^2 + 0.00025X_1X_3 + 0.01475X_2X_3 - 0.023792X_3^2$$

表4 回归方程的方差分析

Table 4 Variance analysis for the fitted regression model

方差来源	自由度	平方和	F 值	P 值	显著性
总回归	9	0.102681	82.47	< 0.0001	**
一次项	3	0.068889	166.00	< 0.0001	**
二次项	3	0.032502	78.32	0.0001	**
交互项	3	0.001291	3.11	0.1268	
失拟项	3	0.000617	5.51	0.1575	
纯误差	2	0.000075			
总误差	5	0.000692			

注: \*\*.  $P < 0.01$ , 差异极显著。

回归方程的方差分析见表 4, 其决定系数  $R^2 = 0.9933$ , 说明该模型拟合度很好, 可以用于对蜂王浆酶解液 ACE 抑制率的预测。由表 4 可以看出, 失拟性检验结果不显著,  $P = 0.1575 > 0.05$ , 因此可以采用此模型对回归方程进行检验。回归方程总回归  $F$  检验达到极显著水平,  $P < 0.0001$ 。回归系数一次项达到极显著水平 ( $P < 0.0001$ ), 二次项达到极显著水 ( $P = 0.0001 < 0.01$ ), 但是交互项不显著。

各因素方差分析见表 5, 可以看出,  $X_1$ (水解时间)

和 $X_2$ (蜂王浆质量浓度)达到极显著水平( $P < 0.001$ ),  $X_3$ (加酶量)达到显著水平( $P < 0.05$ )。且各个因素的影响大小依次为:  $X_1 > X_2 > X_3$ 。即: 水解时间>蜂王浆质量浓度>加酶量。

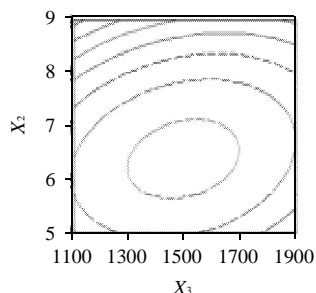
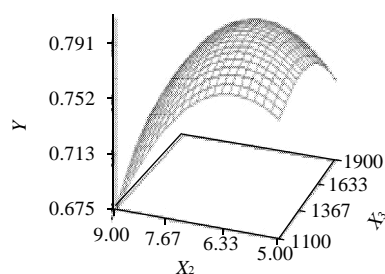
表5 各因素方差分析

Table 5 Variance analysis for ACE inhibitory rate with various hydrolysis conditions

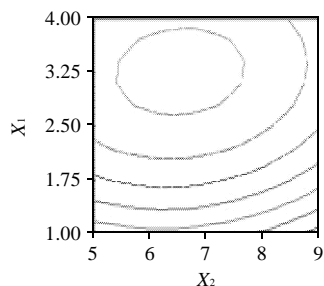
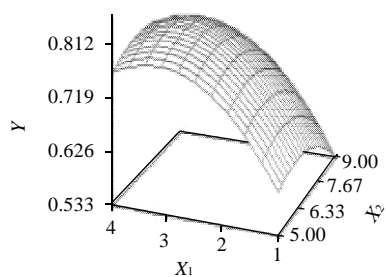
因素	自由度	平方和	F值	P值	显著性
$X_1$	4	0.090335	163.26	< 0.0001	**
$X_2$	4	0.013779	24.90	0.0017	**
$X_3$	4	0.003073	5.55	0.0440	*

注: \*\*.  $P < 0.01$ , 差异极显著; \*.  $P < 0.05$ , 差异显著。

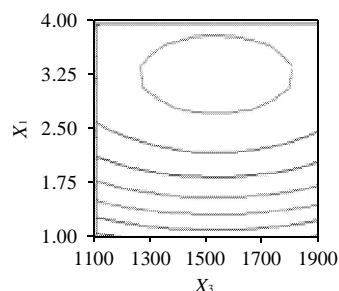
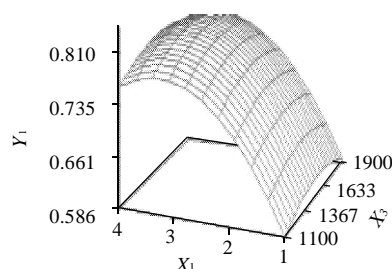
### 2.3.2 响应面分析



a. 蜂王浆质量浓度与加酶量



b. 水解时间与蜂王浆质量浓度



c. 水解时间与加酶量

固定水平: 水解时间 2.5h、蜂王浆质量浓度 0.07g/mL、加酶量 1500U/g。

图5 各两因素交互作用的响应面和等高线图

Fig.5 Response surfaces and contour plots showing the interactive effects of hydrolysis time, substrate concentration and Amano protease P amount of protease on ACE inhibitory rate of royal jelly hydrolysates

使用 SAS 软件作各两因素交互作用的响应面和等高线图, 见图 5。

由图 5a 可知, 当水解时间为 2.5h 时, 固定蜂王浆质量浓度, 随着加酶量的增加, ACE 酶的抑制率变化曲线较平缓, 影响较小。当固定加酶量时, ACE 酶的抑制率随着蜂王浆质量浓度呈抛物线变化。等高线揭示了交互作用的规律, 图中等值线密的方向, 对应的坐标所表示的因素为交互作用的主要方面。等高线表明交互作用  $X_2X_3$  中影响优化值的主要方面是加酶量。由图 5b 可知, 当加酶量为 1500U/g 时, 固定水解时间, 随着蜂王浆质量浓度的增加, ACE 酶的抑制率变化曲线较平缓, 影响较小。当固定蜂王浆质量浓度时, ACE 酶的抑制率随着水解时间呈抛物线变化。等高线表明交互作用  $X_1X_2$  中影响优化值的主要方面是蜂王浆质量浓度。由图 5c 可知, 当蜂王浆质量浓度为 0.07g/mL 时, 固定水解时间, 随着加酶量的增加, ACE 酶的抑制率变化曲线较平缓, 影响较小。当固定加酶量时, ACE 酶的抑制率随着水解时间呈抛物线变化。等高线表明交互作用  $X_1X_3$  中影响优化值的主要方面是加酶量。

由 SAS RSREG 程序分析结果, 得到最佳的因素水平组合为  $X_1$  取 0.510583 水平、 $X_2$  取 -0.235686 水平、 $X_3$  取 0.008433 水平时,  $Y$  值最大, 达到 81.31%。即水解时间 196min、蜂王浆质量浓度 0.0653g/mL、加酶量 1503U/g 时, 所得蜂王浆酶解液具有最大 ACE 抑制活性, 达到 81.31%。

### 2.3.3 验证实验

以上述最佳条件水解蜂王浆得到蜂王浆水解液对ACE酶的抑制率达到 $(79.75 \pm 1.90)\%$ ，达到了理论预测值的98.08%。说明本研究优化得到酶解工艺适用于酶解制备高抑制ACE活性王浆产品。

## 3 结 论

新鲜蜂王浆几乎没有抗高血压活性；而蜂王浆的蛋白酶水解液尤其是天野蛋白酶P水解液具有很好的抗高血压活性。水解时间和蜂王浆质量浓度对抑制率有极显著影响( $P < 0.01$ )、加酶量对抑制率有显著影响( $P < 0.05$ )；天野蛋白酶P水解蜂王浆的最佳条件为水解时间196min、蜂王浆质量浓度0.0653g/mL、加酶量1503U/g，此条件下，蜂王浆水解液对ACE粗酶液的抑制率达到79.75%，达到了理论预测值的98.08%。

### 参考文献：

- [1] 苏晔, 敬璞, 丁晓雯, 等. 蜂王浆的化学成分生理活性及应用[J]. 农牧产品开发, 2000(7): 11-12.
- [2] OKAMOTO I, TANIGUCHI Y, KUNIKATA T, et al. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses *in vitro* and *in vivo*[J]. Life Sciences, 2003, 73(16): 2029-2045.
- [3] NAGAI T, INOUE R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly[J]. Food Chemistry, 2004, 84(2): 181-186.
- [4] 侯春生, 骆浩文. 蜂王浆主要功能、有效化学成分及在食品工业中的应用[J]. 广东农业科学, 2008(12): 121-123.
- [5] 蔡柳, 林亲录. 蜂王浆的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2007(8): 20-22.
- [6] FONTANA R, MENDES M A, SOUZA B M, et al. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*) [J]. Peptides, 2004, 25(6): 919-928.
- [7] 陆莉, 林志彬. 蜂王浆的药理作用及相关活性成分的研究进展[J]. 医药导报, 2004, 23(12): 887-889.
- [8] 杨远帆, 陈靖刚, 倪辉. 蜂王浆中蛋白质及肽类物质的研究进展[J]. 中国养蜂, 2004, 55(4): 27-28.
- [9] 张智武, 单斌, 彭文君, 等. 蜂王浆中水溶性蛋白质和活性肽的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(10): 32-34.
- [10] 张娟, 赵利, 魏丽, 等. 贮藏温度和时间对蜂王浆水溶性蛋白质的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4): 59-61.
- [11] 张红城, 孙丽萍, 董捷, 等. 蜂王浆在常温储存条件下品质变化的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 159-161.
- [12] 戚向阳. 水溶性蜂王浆酶法制备条件的优化及其特性的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 155-159.
- [13] GUO Hang, KOUZUMA Y, YONEKURA M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 238-245.
- [14] GUO Hang, KOUZUMA Y, YONEKURA M. Isolation and properties of antioxidative peptides from water-soluble royal jelly protein hydrolysate [J]. Food Science and Technology Research, 2005, 11(2): 222-230.
- [15] MATSUI T, YUKIYOSHI A, DOI S, et al. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(2): 80-86.
- [16] 许建香, 张智武, 刘永东, 等. RP-HPLC法测定蜂王浆水溶性蛋白及其相关产物对ACE的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(9): 124-127.
- [17] 何慧, 郭会侠, 孔林, 等. 用玉米大豆复配蛋白制备降血压肽水解酶筛选研究[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(6): 25-29.
- [18] 季文静, 胡福良, 李英华, 等. 蜂王浆的酶解工艺及其吸湿保湿性能的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 35-39.
- [19] 王进, 何慧, 隋玉杰, 等. 玉米肽、大豆肽及其复配肽的降血压活性比较[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(1): 45-47.
- [20] 丁希泉. 农业应用回归设计[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1986: 101-116.
- [21] 张丰香. 酶法制备草鱼鱼鳞明胶及ACE抑制肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [22] LI Guanhong, LE Guowei, SHI Ronghui, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. Nutrition Research, 2004, 24(7): 469-486.