

油菜蜂花粉蛋白酶法破壁提取及结构表征

Enzymatic breaking-extraction and characterization of protein from rape bee pollen

王凌波^{1,2} 朱松^{1,2} 陈尚卫^{1,2}

WANG Ling-bo^{1,2} ZHU Song^{1,2} CHEN Shang-wei^{1,2}

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122;

2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:以油菜蜂花粉为原料,研究酶法破壁提取蛋白的效果,并对蜂花粉蛋白进行纯化和表征。先对蜂花粉蛋白的提取条件进行单因素及响应面优化,以蛋白提取率为指标,确定最佳提取条件为:将2.5 g蜂花粉和50 mL pH 5.96的水溶液混合后,加入体积分数0.4%的复合植物水解酶(100 FBG/g),42℃振荡酶解6.5 h,该条件下蛋白提取率为79.53%。蜂花粉提取液经Sephadex G-100凝胶柱分离后共得到4个组分,经测定其中仅一个组分中含有蛋白质,含量为66.77 g/100 g;疏水性氨基酸含量为27.52 g/100 g,氨基酸组成分析和红外光谱结果都表明蜂花粉蛋白中存在芳香族氨基酸;圆二色谱结果表明蜂花粉蛋白易被酶解。

关键词:蜂花粉;蛋白;酶法破壁;提取率;结构表征

Abstract: The bee pollen of oilseed rape was used to investigate the effect of enzymatically breaking the wall for protein extraction, and the optimal conditions of the extraction were determined by single factor test and response surface analysis. After mixing 2.5 g of peak pollen and 50 mL of pH 5.96 aqueous solution, 0.4% volume fraction compound plant invertase (100 FBG/g) was added and then stirring and extracting at 42℃ for 6.5 h. Under the control of these optimal conditions, the protein pollen extracts were separated by Sephadex G-100 gel column to obtain a total of 4 components. However, only one of them was determined to contain protein with 66.77 g/100 g, with the contain of hydrophobic amino acid of 27.52 g/100 g. The amino

acid composition analysis and infrared spectroscopy results showed that aromatic amino acids were found in bee pollen protein. Moreover, the circular dichroism chromatography results showed that the proteins in bee pollen were easily digested enzymatically for producing peptides.

Keywords: bee pollen; protein; enzymolysis breaking; extraction; structural characterization

蜂花粉是花粉与蜜蜂分泌物的混合体,含有丰富的蛋白质、多肽、氨基酸、酚类物质、活性多糖、不饱和脂肪酸和微量活性元素^[1-2],有“完全营养食品”之称^[3]。中国每年蜂群采集的花粉量可达20万t,但实际利用的花粉只有6000t左右,且以简单杀菌的粗制品为主^[4]。

高血压是一种常见的心血管疾病,是危害中老年人健康的头号杀手^[5],目前治疗高血压的药物基本为化学合成药物,均存在一定的副作用^[6]。随着生活水平的提高,人们更注重药物和保健品的安全性,食源性产品受到愈来愈多的关注。近年来,有研究者^[7-10]发现以蜂花粉为原料开发所得的ACE抑制肽具有降低血压作用。

蜂花粉的细胞壁由内壁和外壁两部分组成。外壁厚而硬,具有特殊的雕刻型花纹图案,主要成分为孢粉素,此外还含有纤维素、生物类黄酮、脂类物质及蛋白质等物质。由于孢粉素是极其稳定的生物聚合物,因此外壁具有耐酸、耐碱、耐腐蚀的特点。内壁的主要成分为纤维素、果胶质、半纤维素及蛋白质,其上有萌发孔,是物质交换的通道,一般条件下萌发孔呈闭锁状态。细胞壁的外壁和内壁会阻碍胞内营养物质的溶出,因此采用破壁处理来提高蛋白的提取率。常见破壁方式有温差—超声复合法^[11]、酶解法、超声酶解法^[12]、超临界二氧化碳破壁法^[13]等。酶法或复合超声酶解法相比其他常见破壁方

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31871794)

作者简介:王凌波,女,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:朱松(1979—),男,江南大学副研究员,博士。

E-mail: zhusong@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2019-12-10

法,操作更简便快速,能更好保留蜂花粉的活性成分^[14]。目前所报道的文獻^[15-17]多以破壁率、蛋白分散指数来评价破壁效果,此外可溶性糖含量、粒度分析^[18]等也可作为评价指标。由于试验的目的是为了促进蜂花粉蛋白的溶出,相比其他破壁指标,以蛋白提取率为评价指标更直观可靠。因此试验拟以蛋白提取率为指标对蜂花粉水溶性蛋白的酶法破壁提取工艺进行优化,并对蜂花粉蛋白进行纯化表征,以期为后续蜂花粉 ACE 抑制肽的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

油菜蜂花粉:江苏日高峰产品有限公司;

Viscozyme L 复合植物水解酶:100 FBG/g,诺维信生物技术有限公司;

其余试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

冷冻干燥机:SCIENTZ-10N 型,宁波新芝生物科技有限公司;

定氮仪:KDN103F 型,上海纤检仪器有限公司;

扫描电镜:QUANTA 200 型,荷兰 FEI 公司;

台式低速离心机:TD6 型,湖南赫西仪器装备有限公司;

傅里叶变换红外光谱仪:NEXUS 670 型,美国尼高力公司。

1.2 方法

1.2.1 蜂花粉蛋白酶解提取方法的选择 取 2.5 g 研磨后的蜂花粉,加入 50 mL pH 6.5 的水溶液。振荡酶解法是在混合液中加入体积分数 2% 100 FBG/g 的复合植物水解酶后,40 ℃下振荡 8 h;振荡酶解超声法是在混合液中加入体积分数 2% 100 FBG/g 复合植物水解酶后,先于 40 ℃下振荡 4 h,再在频率 40 kHz,功率 250 W 条件下超声处理 4 h。每个试验组在 8 h 后以 4 000 r/min 的转速离心 20 min,取 5 mL 上清液,测定其蛋白质含量,按式(1)计算蛋白提取率。各组离心后所得沉淀用 3 500 Da 透析袋除糖后,浓缩冻干,进行电镜表征及氨基酸组成、红外光谱、圆二色谱分析。

$$c = \frac{m_1 V}{5 m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——蛋白提取率,%;

m_1 ——所取上清液中蛋白含量,mg;

m_2 ——蜂花粉蛋白含量,mg;

V ——上清液总体积,mL。

1.2.2 蜂花粉蛋白酶解提取单因素试验 根据 1.2.1 结

果确定提取方法后,以蛋白提取率为评价指标,进行单因素优化试验。固定水溶液 pH 值为 6.5、酶解温度 42 ℃、酶解时间 6 h,考察加酶量(体积分数 0.04%,0.10%,0.20%,0.40%,1.00%)对蛋白提取率的影响;固定加酶量为体积分数 0.40%、酶解温度 42 ℃、酶解时间 6 h,考察提取液 pH(3,4,5,6,7,8)对蛋白提取率的影响;固定加酶量为体积分数 0.40%、水溶液 pH 值为 6.5、酶解时间 6 h,考察酶解温度(30,40,50,60,70 ℃)对蛋白提取率的影响;固定加酶量为体积分数 0.40%、水溶液 pH 值为 6.5、酶解温度 42 ℃,考察酶解时间(3.0,4.5,6.0,8.0,10.0 h)对蛋白提取率的影响。

1.2.3 响应面优化蜂花粉蛋白提取条件 根据单因素试验结果,选择对蛋白提取率影响较大的 3 个因素,以蛋白提取率为响应值,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理进行三因素三水平的响应面分析试验。

1.2.4 蜂花粉基本成分分析

(1) 水分的测定:参照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中的直接干燥法。

(2) 灰分的测定:参照 GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》中的第一法。

(3) 蛋白质的测定:参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法。

(4) 脂肪的测定:参照 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》中的索氏抽提法。

1.2.5 蜂花粉水溶性蛋白的纯化和表征 将 15 g 蜂花粉原料经优化酶解破壁、冷冻干燥后,加入至 5 mL pH 6 的 PBS 缓冲液中溶解,吸取 2 mL 上述溶液加入至已填充平衡完毕的 Sephadex G-100 凝胶柱中。用 pH 6 的 PBS 缓冲液洗脱,流速为 1 mL/min,用部分收集器收集。将所得峰组分置于 3 000 Da 透析袋中透析 48 h。透析完成后对各组分分别进行冷冻干燥,最后用凯氏定氮法测定样品中蛋白质量,用 OPA 衍生化—高效液相法^[19]测定水解氨基酸含量,并对蛋白进行圆二色谱^[20]和傅里叶红外光谱分析^[21]。

1.2.6 数据分析 采用 Origin 2016 软件处理数据并绘图,采用 Design Expert 8.0 软件进行响应面优化分析,采用 SPSS 19.0 进行方差与显著性分析($P < 0.05$),采用 Chirscan 软件对圆二色谱图进行数据处理。所有试验重复 3 次,取其平均值,并计算标准偏差。

2 结果与分析

2.1 蜂花粉基本成分分析

蜂花粉的组成成分受植物来源、气候、环境等多种因素的影响^[22]。试验所用蜂花粉原料的水分、灰分、脂肪、蛋白含量如表 1 所示。结果与 Ares 等^[23]和 Yang 等^[24]的报道基本相符。

表 1 蜂花粉基础指标含量
Table 1 Basic index content of bee pollen

g/100 g			
水分	灰分	脂肪	蛋白
6.30±0.23	2.92±0.18	6.80±0.45	22.73±0.98

2.2 蜂花粉蛋白酶解提取方法的选择

蜂花粉的细胞壁由内壁和外壁两部分组成。外壁较为坚硬,主要由孢粉素、纤维素和蛋白质等物质组成,呈特殊雕纹,其中孢粉素耐压、耐酸碱,不易被分解。内壁的主要成分为纤维素、果胶质、半纤维素及蛋白质,其上有萌发孔,是物质交换的通道,一般条件下萌发孔呈闭锁状态。

如图 1(a)所示,酶解处理后的雕纹状的蜂花粉细胞外壁几乎已经完全脱落,细胞内壁被破坏,产生细胞碎片。如图 1(b)所示,经振荡酶解超声处理后,蜂花粉的细胞外壁和内壁也被破坏,但破坏程度弱于振荡酶解。振荡酶解的蛋白质提取率为(51.80±1.01)%,振荡酶解后超声法的蛋白提取率为(48.60±0.67)%,与图 1 所示的试验结果相吻合。这可能是由于频率 40 kHz,功率 250 W,时间 4 h 的超声条件影响了复合植物水解酶的活性。一般低强度的超声能使酶活增强,超声效应会导致媒介局部压力和温度的急剧升高,蛋白质发生折叠化的可能性增强,折叠化的蛋白质会暴露更多的基团,从而其和酶的亲和力增强^[25]。比如 Nguyen 等^[26]发现,纤维素酶在经过频率 20 kHz,密度 6 W/L,时间 60 s 的超声处理后,其酶活提高了 18.7%。但是当超声强度过大、超声时间过长时,酶的构象会因超声处理而改变,从而影响酶的活性。试验所用的超声条件可能降低了复合植物水解酶的活性,因此蛋白质提取率低于振荡酶解。

2.3 蜂花粉蛋白提取条件的优化

2.3.1 建立回归模型及方差分析 根据单因素结果,确定如表 2 所示的因素水平表,试验设计及结果见表 3。

采用 Design Expert 8.0 软件对表 3 试验数据进行回

表 2 响应面试验因素水平设计

Table 2 Response surface test factor levels

水平	A 水溶液 pH	B 温度/℃	C 酶解时间/h
-1	5	40	4.5
0	6	50	5.5
1	7	60	6.5

表 3 试验设计与结果

Table 3 Response surface methodology design and results

试验号	A	B	C	蛋白提取率/%
1	0	0	0	77.54
2	1	1	0	73.24
3	0	-1	-1	74.12
4	0	0	0	77.17
5	-1	0	-1	72.88
6	1	0	-1	72.93
7	1	-1	0	74.06
8	-1	1	0	73.67
9	0	0	0	76.87
10	0	0	0	78.12
11	-1	-1	0	74.87
12	0	1	-1	73.41
13	0	-1	1	79.11
14	-1	0	1	75.01
15	0	0	0	77.66
16	1	0	1	75.12
17	0	1	1	75.38

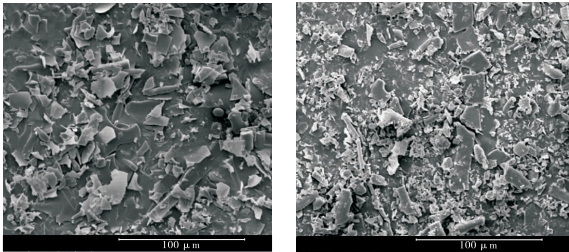
归分析,得到蛋白提取率与振荡酶解各因素变量的二次模拟方程:

$$Y=77.47-0.13A-0.81B+1.41C+0.095AB+0.015AC-0.75BC-2.52A^2-1.00B^2-0.97C^2。$$
 (2)

对表 3 中的试验结果进行统计分析,方差分析结果如表 4 所示。

由表 4 可知,该模型 $P=0.000\ 5<0.01$ (极显著),失拟项 $P=0.180\ 9>0.05$ (不显著),表明该回归模型与试验数据很吻合,试验误差较小,模型选择正确。B、C 的一次项均达到极显著水平,表明酶解温度、酶解时间对蛋白提取率有显著影响,影响效果为酶解时间>酶解温度。A 的一次项未达到显著水平,表明当水溶液的 pH 值为 5~7 时,对蛋白提取率的影响不显著。交互项中 BC 项 P 值 <0.05 ,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对蛋白提取的曲面效应显著,表明各因素对蛋白提取的影响不是简单的线性关系。

2.3.2 响应面分析 作出响应面图,分析水溶液 pH 值、酶解温度、酶解时间对蛋白提取率的影响情况,结果如图 2 所示。



(a) 振荡酶解 (b) 振荡酶解后超声

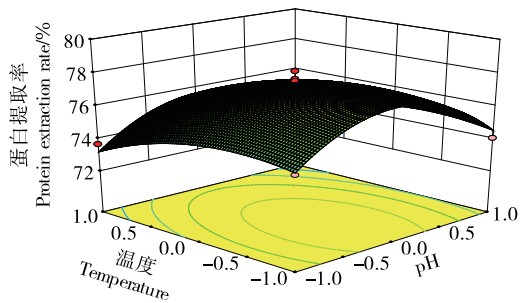
图 1 不同提取方法的电镜表征

Figure 1 The results of scanning electron microscopy analysis

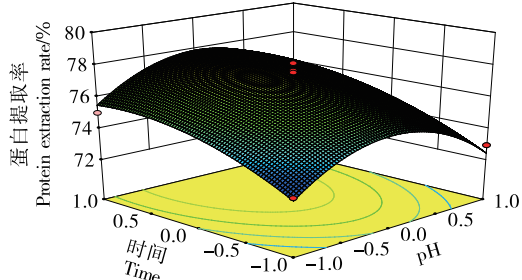
表 4 方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

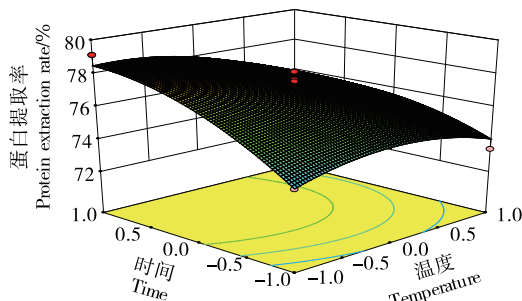
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	61.37	9	6.82	17.28	0.000 5
A	0.15	1	0.15	0.37	0.562 4
B	5.22	1	5.22	13.22	0.008 3
C	15.90	1	15.90	40.31	0.000 4
AB	0.04	1	0.04	0.09	0.771 1
AC	9.00E-004	1	9.00E-004	2.28E-003	0.963 2
BC	2.28	1	2.28	5.78	0.047 2
A ²	26.65	1	26.65	67.56	<0.000 1
B ²	4.18	1	4.18	10.59	0.014 0
C ²	3.97	1	3.97	10.06	0.015 7
残差	2.76	7	0.39		
失拟项	1.85	3	0.62	2.70	0.180 9
净误差	0.91	4	0.23		
总离差	64.14	16			



(a) 水溶液pH和酶解温度对蛋白提取率的影响



(b) 水溶液pH和酶解时间对蛋白提取率的影响



(c) 酶解温度和酶解时间对蛋白提取率的影响

图 2 蛋白提取率响应曲面图

Figure 2 Response surface plot of protein extraction rate

由图 2 可知,水溶液的 pH 和酶解温度、酶解时间的交互作用显著,而酶解温度和酶解时间的交互作用较小。

2.3.3 最优工艺组合的确定及验证 通过 Design Expert 8.0 软件分析对回归方程进行优化拟合得,振荡酶解提取蜂花粉蛋白的最佳条件为:水溶液 pH 5.96,酶解温度 42.14 ℃,酶解时间 6.50 h,该条件下蛋白提取率的预测值为 78.53%。为检验该结果的可靠性,进行 3 次重复验证实验,因试验设备条件限制,设置条件为:水溶液 pH 5.96,酶解温度 42.0 ℃,酶解时间 6.5 h,得到蜂花粉蛋白提取率平均值为 79.53%。

2.4 蜂花粉蛋白的纯化和表征

2.4.1 蜂花粉蛋白的纯化 试验选择的 Sephadex G-100 凝胶柱可用来分离 4~150 kDa 范围内的蛋白质。蜂花粉提取液通过 Sephadex G-100 后共得到如图 3 所示的 4 个不同的组分峰,经凯氏定氮法测定只有峰 1 中含有蛋白

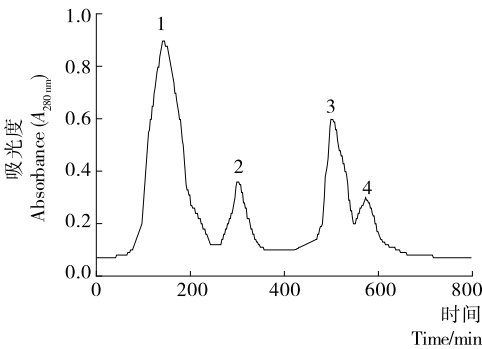


图 3 蜂花粉蛋白 Sephadex G-100 凝胶层析分离图

Figure 3 The separation of bee pollen protein with Sephadex G-100

质,其蛋白含量为 $(66.77\pm2.11)\%$ 。

2.4.2 蜂花粉蛋白的表征 如表 5 所示,蜂花粉蛋白的水解总氨基酸含量为 63.49 g/100 g,其中疏水性氨基酸含量为 27.52 g/100 g,占总氨基酸含量的 43.35%;芳香族氨基酸 Tyr、Trp 和 Phe 三者的总含量为 8.98 g/100 g。

Sarmadi 等^[27]研究表明疏水性氨基酸可以增强肽和脂类物质的相互作用,使活性肽更易进入靶器官或目标位点,从而增强肽的生物活性。芳香族氨基酸能通过提供多余电子来提高肽的生物活性。此外根据文献^[28]可知,C 末端连有疏水性氨基酸和芳香族氨基酸的肽结合 ACE 的活性强。因此,具有较高疏水性氨基酸含量和芳香族氨基酸含量的蜂花粉蛋白是制备功能性低聚肽的良好材料^[29]。

如图 4 所示,蜂花粉蛋白在 $3\ 500\text{ cm}^{-1}$ 附近出现吸收峰,是由 N—H 的振动引起的,吸收峰的个数只有一个,因此可能为仲胺、仲酰胺或酰亚胺,考虑到蛋白质的肽键是一种酰胺键,并且此峰为尖锐强吸收峰,所以此蜂花粉蛋白可能含有较多的仲酰胺。 $1\ 450,1\ 600\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为芳环特征峰,与表 5 所得结果相同,说明此蛋白中存在芳香族氨基酸。

表 5 水解氨基酸含量

Table 5 Hydrolyzed amino acids content

g/100 g			
氨基酸	含量	氨基酸	含量
Asp	7.17	Gln	1.02
Glu	4.75	Leu *	4.63
Thr	3.73	Val *	4.64
Ser	3.93	Ala *	4.09
Lys	2.92	Gly *	2.91
Tyr	5.12	Ile *	2.78
Arg	2.39	Phe *	2.52
Cys	1.52	Pro *	2.39
His	1.36	Met *	2.22
Asn	2.06	Trp *	1.34

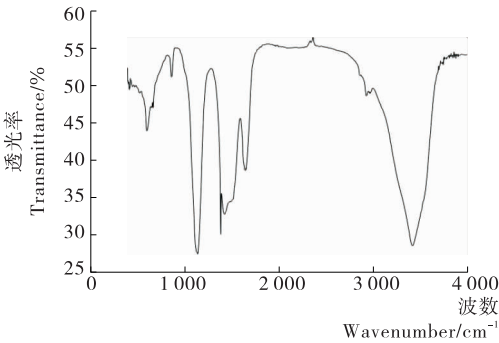


图 4 蜂花粉蛋白的红外光谱图

Figure 4 Infrared spectrogram of bee pollen protein

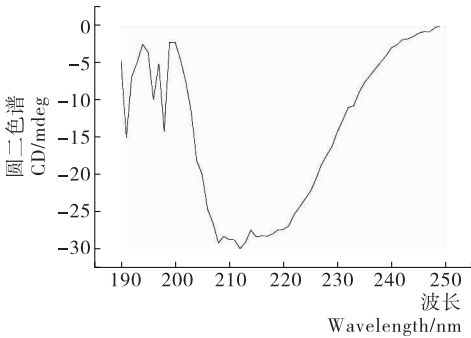


图 5 蜂花粉蛋白的圆二色谱图

Figure 5 Circular dichroism spectra of bee pollen protein

表 6 蜂花粉蛋白的圆二色谱数据处理结果

Table 6 Result of circular dichroism spectrum

α 螺旋	β 折叠	β 转角	无规则卷曲
34.5	11.3	23.4	30.8

利用 Chirscan 软件对圆二色谱图(图 5)进行数据分析结果(表 6)表明, α 螺旋、 β 折叠结构具有一定的刚性,是二级结构中的有序结构。 β 转角和无规则卷曲结构没有刚性,其两者含量越高,代表蛋白分子的有序性越弱^[30],蛋白更易被水解。此蜂花粉蛋白中 β 转角和无规则卷曲结构占到 54.2%,说明其有序性较弱,易被蛋白酶酶解。

3 结论

通过单因素试验和响应面优化试验,确定油菜蜂花粉提取的最佳条件为:将 2.5 g 蜂花粉和 50 mL pH 5.96 的水溶液混合后,加入体积分数 0.4% 的复合植物水解酶(100 FBG/g),42 ℃ 振荡酶解 6.5 h,此条件下蛋白提取率为 79.53%。通过 Sephadex G-100 凝胶层析法对蜂花粉水溶性蛋白进行纯化,其氨基酸组成、红外谱图和圆二谱图结果表明油菜蜂花粉蛋白的有序性较弱,易被酶解,并且含有较高含量的疏水性氨基酸和芳香族氨基酸,是制备 ACE 抑制肽的良好原料。后续将对 ACE 抑制肽的制备及分离纯化进行研究,以获得来源于油菜蜂花粉蛋白的高活性 ACE 抑制肽。

参考文献

[1] CLAUDIO G, CRISTIAN D, MARTA C, et al. Nutrients, phytochemicals and botanical origin of commercial bee pollen from different geographical areas[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2019, 73(1): 29-38.

[2] DENISOW B, DENISOW P M. Biological and therapeutic properties of bee pollen; A review[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(13): 3-9.

- [3] JIN Tie-yan, SARA K. *In vitro*, and, *in vivo*, antioxidant properties of water and methanol extracts of linden bee pollen[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 13(1): 186-189.
- [4] 刘佳霖. 酶解与包合技术对破壁与未破壁蜂花粉水溶性蛋白质含量的影响[J]. 蜜蜂杂志, 2018, 38(8): 9-12.
- [5] 孙宁玲. 高血压领域的热点及思考[J]. 中华高血压杂志, 2015(3): 203-205.
- [6] BOUGATEF A, NAIMA N, ROZEN R, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases [J]. Food Chemistry, 2008, 111 (2): 350-356.
- [7] MUNE M A M, SAMUEL R M, HENLE T. Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of bambara bean protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2018, 250(1): 162-169.
- [8] SANGSAWAD P, ROYTRAKUL S, CHOOWONGKOMON K, et al. Transepithelial transport across Caco-2 cell monolayers of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from simulated, *in vitro*, gastrointestinal digestion of cooked chicken muscles[J]. Food Chemistry, 2018, 251(1): 77-85.
- [9] LISETTE P, ELISABETE L, ANA N, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, antioxidant properties, phenolic content and amino acid profiles of *Fucus spiralis* L. protein hydrolysate fractions[J]. Marine Drugs, 2017, 15(10): 311.
- [10] XIE Jian-hua, DU Meng-xia, SHEN Meng-yun, et al. Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*) [J]. Food Chemistry, 2019, 270(1): 243-250.
- [11] 刘功良, 马磊, 唐汉良, 等. 温差一超声波复合破壁山茶蜂花粉的研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 16(2): 5 233-5 235.
- [12] 任向楠. 超声波辅助酶法破壁油菜花粉的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010: 13-14.
- [13] 李天娇. 油菜蜂花粉 ACE 抑制物的制备及分离[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011: 10-11.
- [14] PASCOAL A, RODRIGUES S, TEIXEIRA A, et al. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory[J]. Food & Chemical Toxicology, 2014, 63(1): 233-239.
- [15] 褚珊珊, 左绍远. 蜂花粉破壁技术研究进展[J]. 蜜蜂杂志, 2018(9): 12-14.
- [16] 熊夏宇, 杨晶, 戴求仲, 等. 破壁油菜蜂花粉的制备及其形态表征[J]. 中国食品学报, 2018, 18(10): 137-143.
- [17] DONG Jie, GAO Kun, WANG Kai, et al. Cell wall disruption of rape bee pollen treated with combination of protamex hydrolysis and ultrasonication[J]. Food Research International, 2015, 75: 123-130.
- [18] 王凯, 任向楠, 董捷, 等. 多指标评价果胶酶对油菜蜂花粉的破壁作用[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 164-168.
- [19] 张欣. 甘草提取物与水解豌豆蛋白在乳化体系中的协同抗氧化性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 15-17.
- [20] 余圆圆. 纤维素酶修饰及其对纤维素纤维作用的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 11-12.
- [21] 王小林, 孔祥珍, 华欲飞, 等. 大豆分离蛋白肽钙螯合物的制备及表征[J]. 中国油脂, 2017, 42(7): 50-54.
- [22] TAHA E K A, AIKAHTANI S, TAHA R. Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(2): 232-237.
- [23] ARES A M, VALVERDE S, BERNAL J L, et al. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 147(1): 110-124.
- [24] YANG Kai, WU Dan, YE Xing-qian, et al. Characterization of chemical composition of bee pollen in China[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(3): 708-718.
- [25] SHIRSATH S R, SONAWANE S H, GOGATE P R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonication: A review of current status[J]. Chemical Engineering & Processing Process Intensification, 2010, 49(3): 10-23.
- [26] NGUYEN TT T, LE V V M. Effects of ultrasound on cellulolytic activity of cellulase complex[J]. International Food Research Journal, 2013, 20(2): 557-563.
- [27] SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: A review[J]. Peptides, 2010, 31 (10): 1 949-1 956.
- [28] 倪贺. 酵母来源血管紧张素转移酶抑制多肽的制备及其抑制机理的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012: 29-30.
- [29] HANAFI M A, HASHIM S N, CHAY S Y, et al. High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates[J]. Food Research International, 2018, 106 (7): 589-597.
- [30] 涂宗财, 王辉, 刘光宪, 等. 动态超高压微射流对卵清蛋白微观结构的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(2): 495-498.