

# 不同酶解方式下蜂王浆蛋白生物活性的比较

李珍珠, 冯毅楠, 郑文涛, 陶文丽, 黄艾祥\*  
(云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650500)

**摘要:** 蜂王浆营养丰富, 蛋白质含量高, 是挖掘生物活性肽的重要来源。为探究不同酶解方式对蜂王浆蛋白的抗氧化和降糖活性影响, 该研究以蜂王浆为原料, 采用硫酸铵沉淀法提取蜂王浆粗蛋白, 通过不同的酶解(胃蛋白酶、胰蛋白酶、胃胰蛋白酶)制备得到酶解粗提物 W-WSPs、Y-WSPs、WY-WSPs, 以未酶解的粗蛋白为对照, 羟自由基、DPPH 自由基清除率和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率为评价指标, 评估其抗氧化和降糖活性的差异, 并依据不同温度、pH 值评估其活性的热稳定性和酸碱稳定性。结果表明, 三种粗提物对细胞均无毒性, 其中蜂王浆蛋白酶解粗提物 WY-WSPs 具有更好的抗氧化活性和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性, 其对羟自由基、DPPH 自由基的清除率分别为 48.54% 和 41.59%, 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率为 50.75%, 且具有一定的热稳定性和酸碱稳定性。其中 WY-WSPs 在相同条件下具有更高的羟自由基、DPPH 自由基清除率和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率, 稳定性也更强。研究旨在为蜂王浆高值化利用及产品开发提供理论参考。

**关键词:** 蜂王浆; 酶解粗提物; 抗氧化活性; 降糖活性; 稳定性  
**文章编号:** 1673-9078(2026)07-39-47 **DOI:** 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.7.0585

## Comparison of Royal Jelly Protein Bioactivity under Different Enzymatic Hydrolysis Methods

LI Zhenzhu, FENG Yi'nan, ZHENG Wentao, TAO Wenli, HUANG Aixiang\*

(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650500, China)

**Abstract:** Royal jelly is rich in nutrients and exhibits high protein content; it serves as an important source of bioactive peptides. To explore the effects of different enzymatic hydrolysis methods on the antioxidant and hypoglycemic activities of royal jelly proteins, royal jelly was first subjected to crude protein extraction using the ammonium sulfate precipitation method, followed by different methods of enzymatic hydrolysis (pepsin, trypsin, pepsin+trypsin) to prepare water-extracted water-soluble polysaccharide (W-WSP), enzyme-assisted extracted water-soluble polysaccharide (Y-WSP), and combined water- and enzyme-assisted extracted water-soluble polysaccharide (WY-WSP) enzymatic crude extracts. Using unhydrolyzed crude protein as the control, the hydroxyl radical scavenging rate; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging rate; and  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate were used as indicators to assess differences in antioxidant and hypoglycemic activities. The thermal and acid-base stabilities of these bioactivities were evaluated under different temperatures and pH values. The results showed that the three crude extracts were non-cytotoxic. Among them, the WY-WSP enzymatic crude extract exhibited superior antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities, with hydroxyl and DPPH radical scavenging rates of 48.54% and 41.59%, respectively, and an  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate of 50.75%. The WY-WSP enzymatic crude extract also exhibited thermal and acid-base stability. Under the same

引文格式:  
李珍珠,冯毅楠,郑文涛,等.不同酶解方式下蜂王浆蛋白生物活性的比较[J].现代食品科技,2026,42(7):39-47.  
LI Zhenzhu, FENG Yi'nan, ZHENG Wentao, et al. Comparison of royal jelly protein bioactivity under different enzymatic hydrolysis methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(7): 39-47.

收稿日期: 2025-04-27 ; 修回日期: 2025-07-08 ; 接受日期: 2025-07-12  
基金项目: 云南省重大科技专项 (202102AE090027)  
作者简介: 李珍珠 (2002-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学, E-mail : 2560033747@qq.com  
通讯作者: 黄艾祥 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食物新资源开发与乳品科学, E-mail : aixianghuang@126.com

conditions, it exhibited superior hydroxyl radical and DPPH radical scavenging rates, an elevated  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate, and improved stability. These findings provide a theoretical basis for the high-value utilization and product development of royal jelly.

**Key words:** royal jelly; enzymatic crude extract; antioxidant activity; hypoglycemic activity; stability

蜂王浆(Royal Jelly, RJ)又称蜂皇浆,蜂乳,我国是世界上生产和输出蜂王浆最多的国家,中国的RJ年产量超过4 000吨,国际贸易中的蜂王浆产品有90%以上来源于中国<sup>[1]</sup>。其含有60%~70%的水分,9%~18%的蛋白质,7%~18%的碳水化合物,3%~8%的脂肪,1%~3%的矿物质,维生素以及其他一些微量元素<sup>[2]</sup>,营养十分丰富,能够满足人体所需<sup>[3]</sup>。

近年来,蜂王浆的保健功效已被大量研究证实,其具有抗衰老<sup>[4]</sup>、增强机体免疫<sup>[5]</sup>、降血压<sup>[6]</sup>、降血糖<sup>[7]</sup>、抗炎<sup>[8]</sup>、抗菌<sup>[9]</sup>、抗肿瘤<sup>[10]</sup>等多种生理功能,除此之外,还有抗疲劳、改善睡眠和保护肝脏等保健功效,被称为“液体黄金”<sup>[3]</sup>,广泛应用于食品、生物和医疗领域。然而,蜂王浆因其具有辛辣、粘稠、溶解性差等特点,限制了其应用价值,在产品深加工方面还有待加强。此外,从蜂王浆中提取分离出的成分,大部分是大分子量的蛋白质,无法被人体直接吸收,生物利用度有限<sup>[11]</sup>。蜂王浆作为食品<sup>[12]</sup>,从入口就会经过各种各样酶的消化,例如唾液淀粉酶,胃蛋白酶、胰蛋白酶等,经过酶水解后的小分子蛋白部分结构展开,肽序列中的疏水基团增加<sup>[13]</sup>,感官,理化特性以及功能活性都比未经酶解的大分子好,显著提高了蛋白质的消化率和安全性<sup>[14]</sup>。目前针对蜂王浆蛋白酶解研究主要是酸性蛋白酶,碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶等风味蛋白酶酶解后酶解产物的结构组成和生物活性,例如, Li等<sup>[15]</sup>使用碱性蛋白酶酶解蜂王浆蛋白并研究其酶解后的蛋白结构变化以及抗氧化活性; Ge等<sup>[16]</sup>通过酸性蛋白酶水解蜂王浆蛋白并对其中酪氨酸酶抑制肽的生产、分离、鉴定和对接进行深入的分析;刘佳霖等<sup>[17]</sup>则以水溶性蛋白质的提取率为主要指标,采用木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、中性蛋白酶、菠萝蛋白酶制备水溶性蜂王浆,结果显示,4种酶的水溶性蛋白质提取率分别为14.10%、13.97%、24.91%、7.20%,中性蛋白酶具有最好的酶解效果。这些研究不仅成功优化了蜂王浆蛋白的酶解条件,还对其酶解产物蜂王浆蛋白肽的生物活性展开了系统性探究,然而,当前基于人体内源性消化酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶)酶解蜂王浆蛋白的研究较为有限,而采用这类天然存在于消化道的酶进行蛋白水解,能更精准模拟人体消化过程,使产物的生物活性(如抗氧化、免疫调节等)

更贴近生理条件下的实际效应,对食品生物活性研究及功能食品开发更有参考价值。

该研究旨在通过应用胃蛋白酶、胰蛋白酶以及两者分步酶解法酶解蜂王浆蛋白,分别模拟蜂王浆蛋白体外胃消化、肠消化和胃肠消化。因此未进行酶解条件优化,pH值、温度、时间等都是模拟人体胃-肠消化道的生理环境(胃pH值:1.5~2.5,2h;小肠pH值:7~8,2~4h;体温37℃)。以羟自由基、DPPH自由基清除率和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率为评价指标,评估其抗氧化和降糖活性,并在不同温度和pH值条件下探究其热稳定性和酸碱稳定性,以期为制备蜂王浆蛋白来源的抗氧化肽和降糖肽的筛选鉴定及蜂王浆蛋白高值化利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

新鲜蜂王浆,由云南天卉蜂业科技有限公司提供;硫酸铵,天津市风船化学试剂科技有限公司;HCl,天津市风船化学试剂科技有限公司;NaOH,天津市风船化学试剂科技有限公司;胃蛋白酶(695 U·mg<sup>-1</sup>),美国sigma公司;胰蛋白酶(8×USP),美国sigma公司;硫酸亚铁,天津市风船化学试剂科技有限公司;水杨酸,天津市风船化学试剂科技有限公司;过氧化氢,天津市风船化学试剂科技有限公司;无水乙醇,天津市风船化学试剂科技有限公司;2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH),上海晶纯生化科技股份有限公司; $\alpha$ -葡萄糖苷酶(700 000 U·mL<sup>-1</sup>),美国sigma公司;对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酶(PNPG),美国Sigma公司;

JY2002电子天平,上海精密科学仪器有限公司;Avanti J-15/15R高速离心机,苏州贝克曼库尔特公司;SHZ-82恒温振荡器,常州国华电器有限公司;Y2-712-4磁选搅拌器,永嘉县瓯北远进电机厂;DKZW-S-6电热恒温水浴锅,北京市永光明医疗仪器有限公司;SCIENTZ-18N真空冷冻干燥机,上海比朗仪器制造有限公司;Synergy H1酶标仪,美国Biotek公司;60110-206 96孔板,检硕科学器材(上海)有限公司。

表 1 AS的终浓度：在0 ℃时的百分饱和度  
Table 1 Final concentration of As: percentage saturation at 0 ℃

| AS 的初始浓度（0 ℃时的百分饱和度） | 1 L 溶液加入固体 As 的量 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                      | 20               | 25  | 30  | 35  | 40  | 45  | 50  | 55  | 60  | 65  | 70  | 75  | 80  | 85  | 90  | 95  | 100 |
| 0                    | 106              | 134 | 164 | 194 | 226 | 258 | 291 | 326 | 361 | 398 | 436 | 476 | 516 | 559 | 603 | 650 | 697 |
| 5                    | 79               | 108 | 137 | 166 | 197 | 229 | 262 | 296 | 331 | 368 | 405 | 444 | 484 | 526 | 570 | 615 | 662 |
| 10                   | 53               | 81  | 109 | 139 | 169 | 200 | 233 | 266 | 301 | 337 | 374 | 412 | 452 | 493 | 536 | 581 | 627 |
| 15                   | 26               | 54  | 82  | 111 | 141 | 172 | 204 | 237 | 271 | 306 | 343 | 381 | 420 | 460 | 503 | 547 | 592 |
| 20                   | 0                | 27  | 55  | 83  | 113 | 143 | 175 | 207 | 241 | 276 | 312 | 349 | 387 | 427 | 469 | 512 | 557 |
| 25                   |                  | 0   | 27  | 56  | 84  | 115 | 146 | 179 | 211 | 245 | 280 | 317 | 355 | 395 | 436 | 478 | 522 |
| 30                   |                  |     | 0   | 28  | 56  | 86  | 117 | 148 | 181 | 214 | 249 | 285 | 323 | 362 | 402 | 445 | 488 |
| 35                   |                  |     |     | 0   | 28  | 57  | 87  | 118 | 151 | 184 | 218 | 254 | 291 | 329 | 369 | 410 | 453 |
| 40                   |                  |     |     |     | 0   | 29  | 58  | 89  | 120 | 153 | 187 | 222 | 258 | 296 | 335 | 376 | 418 |
| 45                   |                  |     |     |     |     | 0   | 29  | 59  | 90  | 123 | 156 | 190 | 226 | 263 | 302 | 342 | 383 |
| 50                   |                  |     |     |     |     |     | 0   | 30  | 60  | 92  | 125 | 159 | 194 | 230 | 268 | 308 | 348 |
| 55                   |                  |     |     |     |     |     |     | 0   | 30  | 61  | 93  | 127 | 161 | 197 | 235 | 273 | 313 |
| 60                   |                  |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 31  | 62  | 95  | 129 | 164 | 201 | 239 | 279 |
| 65                   |                  |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 31  | 63  | 97  | 132 | 168 | 205 | 244 |
| 70                   |                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 32  | 65  | 99  | 134 | 171 | 209 |
| 75                   |                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 32  | 66  | 101 | 137 | 174 |
| 80                   |                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 33  | 67  | 103 | 139 |
| 85                   |                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 34  | 68  | 105 |
| 90                   |                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 34  | 70  |
| 95                   |                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   | 35  |
| 100                  |                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 0   |

1.2 实验方法

1.2.1 蜂王浆蛋白提取

参考钱家乐<sup>[18]</sup>和刘家维等<sup>[19]</sup>的方法，将冷冻的蜂王浆于 45 ℃条件下水浴加热溶解后称取 100 g 于烧杯中，溶解后纯水定容至 1 000 mL，离心（5 000×g, 4 ℃）15 min 取上清液，随后用纯水将上清液重新定容至 1 000 mL，倒入烧杯中，参照表 1，在磁力搅拌器（600 r·min<sup>-1</sup>）搅拌下分次缓慢加入硫酸铵（Ammonium Sulfate, AS）粉末 516 g 使其达到 80%（质量分数）饱和度，静置 30 min 后加 1 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 调 pH 值至 7.38，于 4 ℃冰箱静置 30 min 后离心（5 000×g, 4 ℃）20 min，然后分离取沉淀，在磁选搅拌器转速为 600 r·min<sup>-1</sup> 条件下使用 30 kDa 透析袋透析 24 h，收集透析好的粗蛋白放入 -80 ℃冷冻 12 h，在真空冷阱温度≤-50 ℃，真空度≤10 Pa，升华干燥 72 h 获得蜂王浆蛋白冻干粉备用。

1.2.2 蜂王浆蛋白酶解粗提物的制备

按照表 2 进行酶解反应，反应 1 和 2 直接进行反应，

分别模拟蜂王浆蛋白在胃和小肠的消化，反应 3 分步进行，先用胃蛋白酶酶解 2 h，调节 pH 值后再用胰蛋白酶酶解 2 h，体外进行动态模拟蜂王浆蛋白在胃肠道的消化，结束后将样品置于 85 ℃恒温水浴锅中进行 10 min 的灭酶处理，灭酶完成后使其自然冷却，随后将 pH 值调节至 7，离心（8 000×g, 4 ℃）5 min 取上清液进行 24 h 的超滤后放入 -80 ℃冷冻，真空冷冻干燥得到酶解粗提物<sup>[20-22]</sup>，依次命名为 W-WSPs、Y-WSPs、WY-WSPs。

表 2 酶解条件表  
Table 2 Enzymatic hydrolysis condition list

| 编号 | 名称      | 酶（溶液总体积的 0.65%） | 料液比 | 温度 /℃ | pH 值 | 时间 /h |
|----|---------|-----------------|-----|-------|------|-------|
| 1  | W-WSPs  | 胃蛋白酶            | 1:6 | 37    | 2    | 2     |
| 2  | Y-WSPs  | 胰蛋白酶            | 1:6 | 37    | 8    | 2     |
| 3  | WY-WSPs | 胃蛋白酶            | 1:6 | 37    | 2    | 2     |
|    |         | 胰蛋白酶            | 1:6 | 37    | 8    | 2     |

1.2.3 肽含量测定

根据王道滇等<sup>[23]</sup>的方法，采用邻苯二甲醛分光光

度法测定质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  粗提物的肽含量。采用胰酪蛋白胨（质量浓度为  $0 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）作为标准品，测定其吸光度，绘制标准曲线（ $y = 0.71x + 0.14$ ,  $R^2 = 0.99$ ,  $y$  为吸光值,  $x$  为胰酪蛋白胨浓度）；按式（1）计算测定样品的肽含量：

$$T = \frac{A_1}{A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

$T$ ——待测样品的肽含量，%；

$A_1$ ——经标准曲线计算得出的样品中肽的质量浓度， $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；

$A_2$ ——测定样品的质量浓度， $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 1.2.4 抗氧化活性测定

### 1.2.4.1 羟自由基清除能力测定

羟自由基清除能力参照文献<sup>[24]</sup>测定。取  $1 \text{ mL}$  待测样品液（质量浓度  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）依次加入  $2 \text{ mL}$   $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{FeSO}_4$ ,  $1.5 \text{ mL}$   $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的水杨酸-乙醇溶液和  $0.1 \text{ mL}$   $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液，水浴锅设置温度  $37^\circ\text{C}$  反应  $30 \text{ min}$ 。反应结束后取  $200 \mu\text{L}$  混合液于  $96$  孔酶标板，并在波长  $510 \text{ nm}$  下测定吸光值  $A_1$ ，用去离子水代替待测样品液作为对照，对照组吸光值为  $A_2$ 。按式（2）计算清除率：

$$Q = \frac{A_2 - A_1}{A_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中

$Q$ ——待测样品的羟自由基清除率，%；

$A_1$ ——样品组的吸光度；

$A_2$ ——对照组的吸光度。

### 1.2.4.2 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH 自由基清除率测定参照文献<sup>[25]</sup>：在  $96$  孔板中加入  $100 \mu\text{L}$  的待测样品液（质量浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）与  $100 \mu\text{L}$   $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DPPH（95% 无水乙醇），在常温下避光放置  $30 \text{ min}$ ，测定  $517 \text{ nm}$  波长下的吸收度  $A_1$ 。 $100 \mu\text{L}$  DPPH 与  $100 \mu\text{L}$  的去离子水作为对照组，对照组吸光值为  $A_2$ ， $100 \mu\text{L}$  的 95% 无水乙醇与  $100 \mu\text{L}$  的去离子水作为空白组，空白组吸光值为  $A_0$ 。按式（3）计算清除率：

$$D = \frac{A_2 - A_1}{A_2 - A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

$D$ ——待测样品的 DPPH 自由基清除率，%；

$A_0$ ——空白组的吸光度；

$A_1$ ——样品组的吸光度；

$A_2$ ——对照组的吸光度。

## 1.2.5 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的测定

分别配制质量浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的三种蜂王浆蛋白酶解粗提物的溶液和未经过酶解处理的蜂王浆蛋白溶液，用于降糖活性的测定。

参考 Zhao 等<sup>[26]</sup>的办法。将  $100 \mu\text{L}$  样品溶液移至  $96$  孔板中，随后加入  $50 \mu\text{L}$  质量浓度为  $700 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液，充分混合均匀后，置于  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中孵育  $20 \text{ min}$ 。待反应结束，向各孔内添加  $50 \mu\text{L}$  浓度为  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷（PNPG）溶液，振荡摇匀，再次放入  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中继续反应  $30 \text{ min}$ 。随后迅速加入  $50 \mu\text{L}$  质量浓度为  $0.67 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{NaCO}_3$  溶液以终止反应。在该研究中：用  $50 \mu\text{L}$  的  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液（PBS：pH 值 6.8）代替  $\alpha$ -葡萄糖苷酶作为样品空白组， $100 \mu\text{L}$  的  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液（PBS：pH 值 6.8）代替样品作为对照组； $150 \mu\text{L}$   $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PBS 作为空白对照组。在  $405 \text{ nm}$  下用酶标仪测量溶液的吸光度，各试样重复 3 遍。按式（4）计算  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率：

$$Y = \frac{A_s - A_n}{A_c - A_b} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

$Y$ ——待测样品的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率，%；

$A_b$ ——对照组的吸光度；

$A_c$ ——空白对照组的吸光度；

$A_s$ ——样品组的吸光度；

$A_n$ ——样品空白组的吸光度。

## 1.2.6 蜂王浆蛋白酶解粗提物的抗氧化和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性稳定性研究

参考付中民等<sup>[24]</sup>的方法测定羟自由基清除能力；参考姜建辉等<sup>[25]</sup>的方法测定 DPPH 自由基清除能力；参考 Zhao 等<sup>[26]</sup>的方法测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力。

### 1.2.6.1 温度对蜂王浆蛋白酶解粗提物抗氧化和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性活性的影响

配制质量浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的三种蜂王浆蛋白酶解粗提物的溶液和未经过酶解处理的蜂王浆蛋白溶液，分别在  $25$ （室温）、 $40$ 、 $60$ 、 $80$  和  $100^\circ\text{C}$  下保温  $2 \text{ h}$ ，然后迅速冷却至室温，以评估其抗氧化活性和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的变化。

### 1.2.6.2 pH 值对蜂王浆蛋白酶解粗提物抗氧化和降糖活性的影响

配制质量浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的三种蜂王浆蛋白酶解粗提物的溶液和未经过酶解处理的蜂王浆蛋白溶液，用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{HCl}$  和  $\text{NaOH}$  调整溶液 pH 值至  $3.0$ 、 $5.0$ 、 $7.0$ 、 $9.0$  和  $11.0$ ，并在室温下反应  $2 \text{ h}$ ，结束后调

节 pH 值为 7.0，以评估蜂王浆蛋白酶解粗提物抗氧化活性和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的变化。

1.2.7 细胞活力测定

采用 MTT 法<sup>[27]</sup>评价蜂王浆蛋白溶液及其不同酶解条件下的的酶解液（质量浓度为 0.25、0.5、1、2、4 mg·mL<sup>-1</sup>）的细胞毒性。

参考文献<sup>[28]</sup>，将 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔板（每孔 1×10<sup>4</sup> 个），每孔 100  $\mu$ L，设 5 个复孔，放 37  $^{\circ}$ C 培养箱孵育 12 h。待细胞密度大于 70% ( $\varphi$ ) 时弃培养基加药，用无血清培养基设置对照组，无细胞，只含无血清培养基设为空白组，恒温培养箱培养 24 h。处理结束后，每孔添加 20  $\mu$ L 质量浓度为 5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 MTT 检测液，置于细胞培养箱避光孵育 4 h，随后弃孔内液体，加入 150  $\mu$ L DMSO 溶解紫色沉淀，在 490 nm 波长条件下测定 OD 值。按式（5）计算细胞活力：

$$H = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\%$$
 (5)

式中：  
H——待测样品的细胞存活率，%；  
A<sub>0</sub>——空白组的吸光度；  
A<sub>1</sub>——样品组的吸光度；  
A<sub>2</sub>——对照组的吸光度。

1.2.8 数据分析

所有指标测定至少进行三次重复实验，用 SPSS 2022 进行方差分析（Analysis of Variance, ANOVA），在  $P < 0.05$  的显著性水平分析数据之间的统计学差异，用 Origin 2019 绘图。

2 结果与分析

2.1 蜂王浆蛋白酶解粗提物的肽含量分析

由表 3 可知，三种不同酶解方式得到的粗提物中肽含量存在显著差异（ $P < 0.05$ ），其中 WY-WSPs 样品的肽含量最高，为 51.65%（质量分数），未酶解蛋白有一定肽含量是因为有游离肽的存在，这些游离肽也具有一定的生物活性<sup>[29]</sup>。现有研究表明较高的肽含量往往表现出更高的生物活性<sup>[15]</sup>，说明 WY-WSPs 相比 W-WSPs、Y-WSPs 以及未酶解蛋白中的游离肽可能表现出更好的生物活性。

| 表3 肽含量                      |                           |                           |                           |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Table 3 Peptide content (%) |                           |                           |                           |
| W-WSPs                      | Y-WSPs                    | WY-WSPs                   | 未酶解蛋白                     |
| 31.17 ± 0.90 <sup>c</sup>   | 47.74 ± 1.04 <sup>b</sup> | 51.65 ± 0.65 <sup>a</sup> | 25.95 ± 0.70 <sup>d</sup> |

注：不同小写字母表示不同组间差异显著（ $P < 0.05$ ）。

2.2 蜂王浆蛋白酶解粗提物的抗氧化活性

2.2.1 蜂王浆蛋白酶解粗提物的羟自由基清除能力

由图 1 可知，在质量浓度为 10 mg·mL<sup>-1</sup> 时，蜂王浆蛋白酶解粗提物与未酶解蛋白的羟自由基清除能力具有显著性差异（ $P < 0.05$ ）；其中 WY-WSPs 的羟自由基清除率最高，为 48.54%，这可能由于酶的充分水解使其具有最高的肽含量，从而具有最佳清除自由基的能力<sup>[30]</sup>。之前的研究表明蜂王浆蛋白肽对羟基自由基的抑制率在 48.00%~68.00% 之间<sup>[1]</sup>，说明胃蛋白酶和胰蛋白酶分步联合可以更好的酶解蛋白，提高其生物活性。此外，在同样的条件下，未经酶解的蛋白质清除率为 29.01%，这可能由于酶将肽段水解成小片段，使内部疏水性基团暴露。这些基团可增强抗氧化肽与不饱和脂肪酸的反应，从而提升抗氧化肽活性<sup>[30]</sup>。

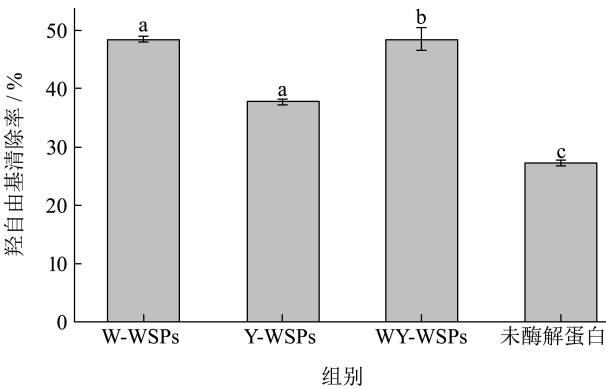


图 1 蜂王浆蛋白酶解粗提物及未酶解蛋白羟自由基清除率

Fig.1 The crude extract and hydroxyl radical scavenging rate of royal jelly protease hydrolysis

注：不同小写字母表示不同组间差异显著（ $P < 0.05$ ）。下同。

2.2.2 蜂王浆蛋白酶解粗提物的二苯基-2-苦肟自由基（DPPH·）自由基清除能力

由图 2 可知，在质量浓度为 10 mg·mL<sup>-1</sup> 时，蜂王浆蛋白酶解粗提物与未酶解蛋白的自由基清除能力具有显著差异（ $P < 0.05$ ）；其中 WY-WSPs 的 DPPH 自由基清除率达 41.59%，为三者最高。已有研究显示，蜂王浆蛋白酶解物的 DPPH 自由基清除率范围在 43.00%~62.80%<sup>[1]</sup>，该研究得到的酶解粗提物相比较低，可能是由于蜂王浆材料不同，或幼虫的年龄和采集时间不同造成的。其次，在同样的条件下，未经酶解的蛋白质清除率只有 15.86%。说明酶解后的蜂王浆蛋白的 DPPH 自由基清除能力显著提高，与羟自由基清除率结果相同<sup>[30]</sup>，Yan 等<sup>[22]</sup>也得出了相同的结果，揭示了经酶解的 RJP 比未水解的蜂王浆蛋白表现出更优越的抗氧化活性。

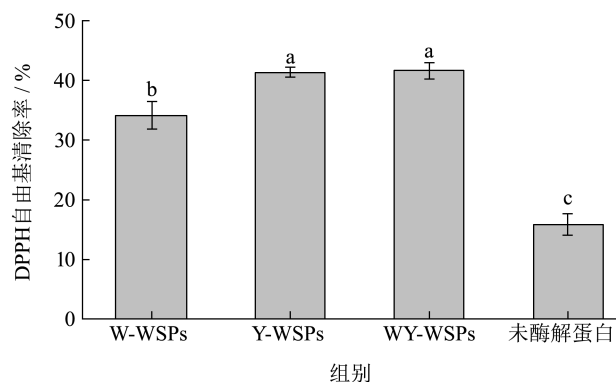
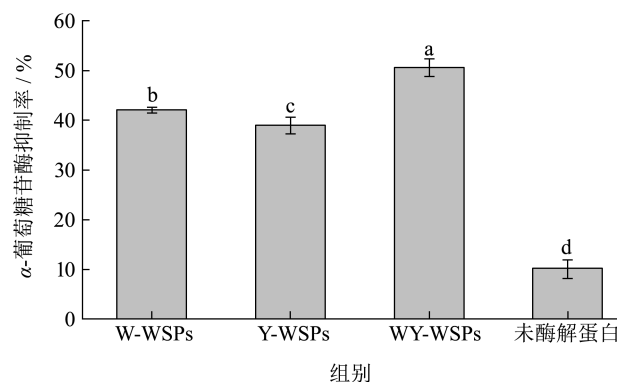


图2 蜂王浆蛋白酶解粗提物及未酶解蛋白 DPPH 自由基清除率

Fig.2 The crude extract and DPPH free radical scavenging rate of royal jelly protease hydrolysis

### 2.3 蜂王浆蛋白酶解粗提物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制能力

由图3可知,在 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下,三种方案制备的样品具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性,且差异显著( $P<0.05$ )。相比于未酶解的蜂王浆蛋白,酶解可以提高蜂王浆蛋白 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性,酶解后的三种粗提物活性提高20%以上,且活性与酶解条件也有密切关系,WY-WSPs $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性最高,其对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率为50.75%,这可能由于分部联合酶解产物因肽段多样性,形成更多 $\beta$ -折叠与无规则卷曲结构,这类结构比单一酶解产生的 $\alpha$ -螺旋结构更易与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的催化位点形成氢键或疏水相互作用,从而增强抑制活性<sup>[31]</sup>。朱作艺等<sup>[3]</sup>的研究也表明在 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下蜂王浆蛋白肽的抑制率在50%左右,与该研究结果相似。说明蜂王浆蛋白酶解粗提物也具有潜在的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性,其中同时使用胃蛋白和胰蛋白酶解得到的粗提物活性更好,这可能与酶解程度有关。

图3 蜂王浆蛋白酶解粗提物及未酶解蛋白对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制能力Fig.3 The crude extract of royal jelly hydrolyzed by protease and the effect of raw jelly on  $\alpha$ -The inhibitory ability of glucosidase

### 2.4 蜂王浆蛋白酶解粗提物的抗氧化和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的热稳定性分析

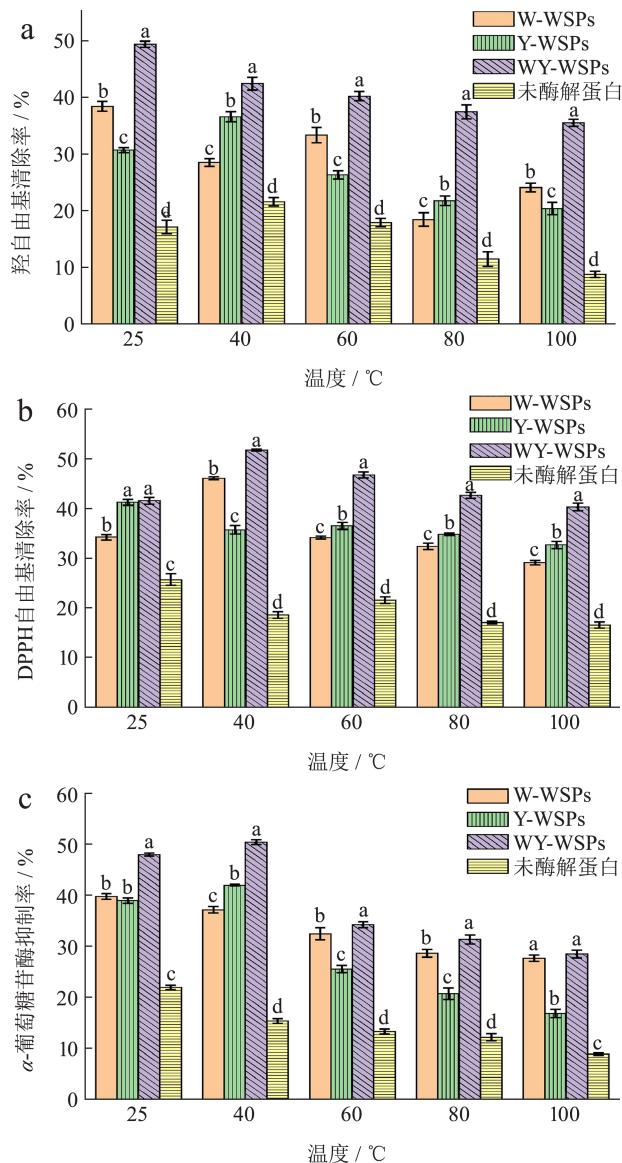


图4 温度对蜂王浆蛋白酶解粗提物活性的影响

Fig.4 Effect of temperature on the activity of crude extract from royal jelly protease hydrolysis

如图4a和4b所示,蜂王浆蛋白酶解粗提物的羟自由基清除率和DPPH自由基清除率随温度上升而发生显著变化( $P<0.05$ )。在不同的温度条件下,经过酶解后的粗提物对羟自由基清除率和DPPH自由基清除率显著高于未酶解蛋白,其中WY-WSPs的清除率显著强于Y-WSPs和W-WSPs处理的样品,其中羟自由基清除率最高在25℃可达48.09%,DPPH自由基清除率在40℃达最高(51.82%),这与此前研究MRJP特定的生物功能在温度为20~35℃范围内保持稳定相同<sup>[32]</sup>,说明由WY-WSPs制备得到的酶解粗提物在抗氧化活性方面热稳定性相对较好。

如图 4c 所示, 不同酶解方式以及未酶解蛋白的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性随着温度升高也发生了显著变化 ( $P < 0.05$ ), 呈现出随着温度升高活性降低的趋势, 其中 WY-WSPs 处理得到的样品热稳定性相对较好, 抑制率均高于 30%。在 100 °C 条件下, 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用达到最低, 抑制率为 28.91%, 而此时未酶解蛋白的抑制率不及 10%。综上所述, 热处理条件过高会影响其稳定性。先前的研究表明高温会使蛋白降解的多肽二级结构发生改变, 使其活性降低<sup>[33]</sup>。综上所述, 将胃蛋白酶和胰蛋白酶联合酶解制备的蜂王浆蛋白粗提物在羟自由基、DPPH 自由基清除率和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率方面具有较好的热稳定性。

## 2.5 蜂王浆蛋白酶解粗提物的抗氧化和 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的酸碱稳定性分析

如图 5a 和图 5b 所示, 蜂王浆蛋白酶解粗提物的羟自由基清除率和 DPPH 自由基清除率随 pH 值上升而发生显著变化 ( $P < 0.05$ )。在不同的酸碱条件下, 经过酶解后的粗提物对羟自由基清除率和 DPPH 自由基清除率显著高于未酶解蛋白, 其中在中性 (pH 值 7) 条件下清除效果最佳, 前人研究显示大多数蛋白质在 pH 值为 7.0 或 7.5 时确实具有最佳稳定性, MRJP 特定的生物功能在 4.0 至 7.0 的宽 pH 值范围内保持稳定<sup>[34]</sup>, 姚轶俊等<sup>[30]</sup>研究表明, 在极端的强酸、强碱条件下, 肽链中的活性片段极易发生外水解反应与脱酰胺作用, 这些化学变化会破坏肽链内部的氢键、疏水相互作用等非共价键, 进而导致其二级结构发生重排与改变, 最终致使肽的生物活性显著降低。其中 WY-WSPs 的清除率显著强于 Y-WSPs 和 W-WSPs 处理的样品, 两种自由基的清除率最高为 48.54%、42.50%, 说明由 WY-WSPs 制备得到的酶解粗提物在抗氧化活性方面具有较好的酸碱稳定性。

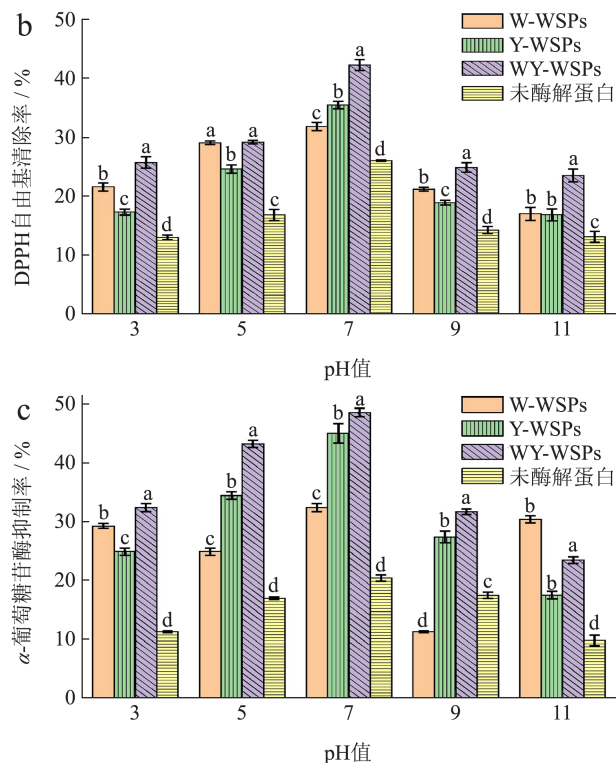
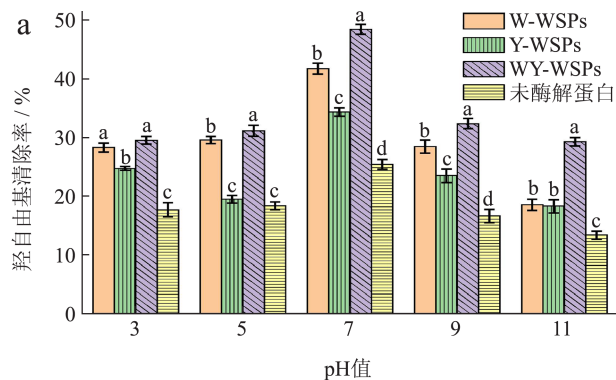


图 5 pH 值对蜂王浆蛋白酶解粗提物活性的影响

Fig.5 Effect of pH value on activity of crude extract from royal jelly protease hydrolysis

如图 5c 所示, 不同酶解方式以及未酶解蛋白的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性随着 pH 值的升高而发生了显著变化 ( $P < 0.05$ ), 随着 pH 值的升高, 各样品的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力呈现出先增强后减弱的趋势, 其中 WY-WSPs 处理的样品的酸碱稳定性显著强于 Y-WSPs 和 W-WSPs 处理的样品, 抑制率为 48.91%。综上所述, 在强酸碱条件下, 蜂王浆蛋白酶解粗提物的稳定性会受到影响。在强酸强碱条件下  $\alpha$ -葡萄糖苷酶可以通过抑制氨基酸残基中的相互作用, 从而改变其二级结构及荷电性, 降低其生物活性<sup>[35]</sup>。综上所述, 将胃蛋白酶和胰蛋白酶联合酶解制备的蜂王浆蛋白粗提物在羟自由基、DPPH 自由基清除率和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率方面也具有较好的酸碱稳定性。

## 2.6 蜂王浆蛋白酶解粗提物的细胞毒性判定

几种样品在不同浓度下对 RAW 264.7 细胞的毒性影响如图 6 所示。在 0.25~4 mg·mL<sup>-1</sup> 质量浓度内, 细胞活力均维持在 100% 以上, 表明蜂王浆蛋白酶解粗提物以及未酶解的蛋白均无毒性且具有一定的促细胞生长作用, 其中 WY-WSPs 的在 4 mg·mL<sup>-1</sup> 质量浓度下有最好效果, 细胞存活率达 135.38%, 随着浓度的增加,

促进细胞增殖能力逐渐增加<sup>[28]</sup>。与未酶解的对照组相比,酶解样品的细胞活力显著提高( $P<0.05$ ),在细胞存活率最强的质量浓度( $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )下,酶解样品的细胞活力较未酶解的对照组分别提高了12.47%、9.11%和18.49%,说明酶解得到的粗提物中可能存在促进细胞生长的活性物质。

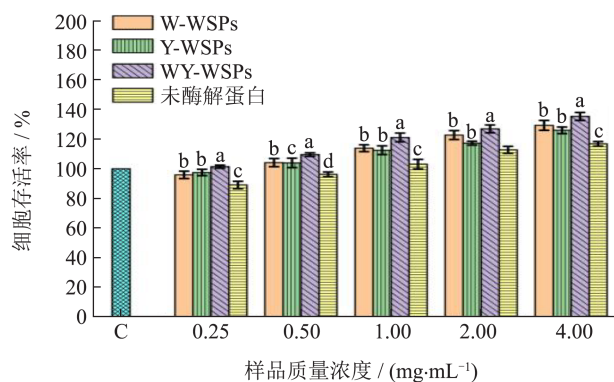


图6 细胞毒性测试结果

Fig.6 Cell toxicity test results

注:图中C表示未加样品的空白对照。

### 3 结论

该研究探讨不同酶解方式对蜂王浆蛋白抗氧化及 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的影响,以及产物在不同条件下的稳定性。结果显示,胃蛋白酶与胰蛋白酶分步联合酶解制备的粗提物生物活性最优,具有较高的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制能力及DPPH、羟基自由基清除能力,且在室温和中性环境中稳定性良好。此外,三种酶解粗提物对RAW 264.7细胞无毒性,还能促进细胞增殖。上述研究结果表明该方法所制备的粗提物富含生物活性物质,具备开发潜力。后续可针对高活性组分WY-WSPs开展分离纯化与结构鉴定,为蜂王浆蛋白深加工及功能食品开发提供理论支撑,推动其高值化利用。

### 参考文献

- [1] ORSOLIC N, JAZVINSKAK JEMBREK M. Royal Jelly: biological action and health benefits [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25: 6023.
- [2] FAN P, HAN B, HU H, et al. Proteome of thymus and spleen reveals that 10-hydroxydec-2-enoic acid could enhance immunity in mice [J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2020, 24(3): 267-279.
- [3] 朱作艺,张玉,王君虹,等.蜂王浆蛋白肽的制备及其降血糖和抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2020,41(17):45-50,57.
- [4] BOUAMAMA S, MERZOUK H, LATRECH H, et al. Royal jelly alleviates the detrimental effects of aging on immune functions by enhancing the *in vitro* cellular proliferation, cytokines, and nitric oxide release in aged human PBMCs [J]. Journal of Food

- Biochemistry, 2021, 45: e13619.
- [5] NATARAJAN O, ANGELONI J T, BILODEAU M F, et al. The immunomodulatory effects of royal jelly on defending against bacterial infections in the *Caenorhabditis elegans* model [J]. Journal of Medicinal Food, 2021, 24: 358-369.
- [6] PAN Y, RONG Y, YOU M, et al. Royal jelly causes hypotension and vasodilation induced by increasing nitric oxide production [J]. Food Science and Nutrition, 2019, 7: 1361-1370.
- [7] OMER K, GELKOPF MJ, NEWTON G. Effectiveness of royal jelly supplementation in glycemic regulation: A systematic review [J]. World Journal of Diabetes, 2019, 10(2): 96-113.
- [8] BAGAMERI L, BOTEZAN S, BOBIS O, et al. Molecular insights into royal jelly anti-inflammatory properties and related diseases [J]. Life, 2023, 13(7): 1573.
- [9] FILIPPO F, GIOVANNI C, SIMONE M, et al. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties [J]. Microbiological Research, 2016, 192: 130-141.
- [10] 刘合生.蜂王浆活性蛋白的分离、纯化、生物活性及结构初步表征[D].武汉:华中农业大学,2013.
- [11] ZHOU Y J, JIANG Y F, ZHANG Y, et al. Unveiling a new chapter for collagen peptides: Comprehensive insights into oral bioavailability and the enhancement via encapsulation systems [J]. Trends in Food Science & Technology, 2025, 156(2): 104849.
- [12] KURTH T, KRETSCHMAR S, BUTTSTEDT A. Royal jelly in focus [J]. Insectes Sociaux, 2019, 66: 81-89.
- [13] KARAMI Z, AKBARI A B. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties [J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56: 535-547.
- [14] GHARIBZAHEDI S M T, SMITH B, ALTINTAS Z. Bioactive and health-promoting properties of enzymatic hydrolysates of legume proteins: a review [J]. Food Science and Nutrition, 2022, 64(9): 2548-2578.
- [15] LI SHANSHAN, TAO LINGCHEN, PENG SHIQIN, et al. Structural and antioxidative properties of royal jelly protein by partial enzymatic hydrolysis [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(5): 1820-1827.
- [16] GE Z, LIU J C, SUN J N, et al. Tyrosinase inhibitory peptides from enzyme hydrolyzed royal jelly: Production, separation, identification and docking analysis [J]. Foods, 2023, 12(11): 2240.
- [17] 刘佳霖,梁明荣,高丽娇,等.4种蛋白酶制备水溶性蜂王浆[J].蜜蜂杂志,2014,34(5):8-10.
- [18] 钱家乐.蜂王浆及其酶解产物的抗光老化活性研究[D].杭州:浙江大学,2022.
- [19] 刘家维,黄昆仑,梁志宏.降解大豆胰蛋白酶抑制剂的短小芽孢杆菌菌株及其胞外蛋白的鉴定[J].现代食品科技,2020,36(2):129-136,84.
- [20] 叶瑾珠,付莉.响应面法优化蜂王浆抗氧化肽的制取工艺[J].现代食品,2019,3,76-78.
- [21] 程尚,殷素会,刘佳霖,等.蛋白酶K水解蜂王浆蛋白的研究[C]//中国畜牧兽医学会.第七届中国畜牧科技论坛论文集.中国农业出版社,2016:1.
- [22] YAN C Y, ZHU Q Q, GUAN C X, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of hydrolyzed royal jelly peptide in

- human dermal fibroblasts: implications for skin health and care applications [J]. *Bioengineering*, 2024, 11: 496.
- [23] 王道滇,魏光强,陶继芳,等.大河乌猪火腿中新型 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的分离、鉴定及活性研究[J].*食品科学技术学报*,2024, 42(1):114-125.
- [24] 付中民,李益武,缪晓青.不同水解度蜂王浆蛋白体外抗氧化活性的分析[J].*食品科技*,2012,37(9):54-57.
- [25] 姜建辉,张静,赵俭波,等.新疆黑蜂蜂王浆水溶性蛋白酶解产物的抗氧化活性[J].*食品工业*,2019,40(11):133-137.
- [26] ZHAO Q, WEI G Q, LI K L, et al. Identification and molecular docking of novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from hydrolysates of Binglangjiang buffalo casein [J]. *LWT*, 2022, 156: 113062.
- [27] 王迪.西洋参稀有人参皂苷抗炎抗氧化活性研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2022.
- [28] GU H, SONG I B, HAN H J, et al. Anti-inflammatory and immune-enhancing effects of enzyme-treated royal jelly [J]. *Applied Biological Chemistry*, 2018, 61: 227-233.
- [29] LIU S T, LIU Z F. Free extracellular enzymes dominate initial peptide hydrolysis in coastal seawater [J]. *Marine Chemistry*, 2018, 199(2): 37-43.
- [30] 姚轶俊,张晶,鞠兴荣,等.莱籽抗氧化肽WDHHAPQLR的环境稳定性研究.[J].*中国粮油学报*,2019,34(8):54-60.
- [31] LI Q, YANG Z C, LU H J, et al. Astragalin exerted hypoglycemic effect by both inhibiting  $\alpha$ -Glucosidase and modulating AMPK signaling pathway [J]. *Nutrients*, 2025, 17(3): 406.
- [32] GATES B N. The temperature of the bee colony [J]. *Bulletin of the United States Department of Agriculture*, 1914, 96: 1-29.
- [33] 张越,付莉.水提酸沉法提取蜂王浆水溶性蛋白的工艺优化[J].*食品工业科技*,2017,22(36):184-188,194.
- [34] TALLEY K, ALEXOV E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins [J]. *Proteins*, 2010, 78: 2699-2706.
- [35] 张晓晨.王浆主蛋白的分离提取及其对非酒精性脂肪肝预防效果研究[D].上海:华东理工大学,2021.