

酶法水解荞麦球蛋白制备抗氧化活性肽的研究

侯文娟¹, 张美莉^{1,*}, 付媛², 段艳¹

(1. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学理学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘 要: 分别采用3种蛋白酶水解荞麦球蛋白, 以酶解液水解度和对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率为指标, 研究酶解荞麦球蛋白的最佳工艺。并进一步对酶解产物进行Sephadex G-25凝胶柱层析分离, 然后对其各分离组分清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和DPPH \cdot 的能力及分子量分布进行研究。结果显示: 采用碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白效果优于胰蛋白酶和木瓜蛋白酶, 最佳酶解工艺条件为: 加酶量20000U/g, 温度55℃, pH9, 底物浓度5%, 反应时间2h; 经柱层析分离得到的分子量小于1000D的组分III显示了较强的抗氧化能力。其清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 与DPPH \cdot 的 IC_{50} 分别为0.75、0.897、0.38mg/ml, 高于分子量较大的组分I和未经分离的荞麦球蛋白酶解液。

关键词: 荞麦; 球蛋白; 酶解; 活性肽; 抗氧化

Preparation of Antioxidant Peptides from Buckwheat Globulin by Enzyme Hydrolysis

HOU Wen-juan¹, ZHANG Mei-li^{1,*}, FU Yuan², DUAN Yan¹

(1. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

2. College of Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: The antioxidant peptides was prepared by hydrolysis of enzymolysis of buckwheat globuli by the alkaline protease, the papaya protease and the pancreatin. The operation condition for hydrolysis was optimized by analyzing the degree of hydrolysis and scavenging activity of $O_2^{\cdot-}$. The hydrolyzate was separated by Sephadex G-25 gel filtration Chromatography and further subjected to the antioxidant activity assay the study of molecular weight distribution. The result showed that the alkaline protease hydrolyzing presented higher hydrolysis efficiency than the papaya protease and the pancreatin and the optimum conditions were as follows: enzyme concentration of 20000 U/g, 55 °C, pH 9.0, substrate concentration 5% and 2 h of reaction time. The fraction with molecular weight less than 1000 D displayed higher antioxidant activity and the IC_{50} values for $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ and DPPH \cdot were 0.75, 0.897 mg/ml and 0.38 mg/ml.

Key words: buckwheat; globulin; enzymatic hydrolysis; biological active peptides; antioxidant

中图分类号: TS 201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)23-0274-07

多肽是分子结构介于氨基酸和蛋白质之间的一类化合物。近年来, 生物活性肽的结构和功能引起了食品学界的广泛重视, 国内外利用动植物蛋白已成功开发出降血压肽、免疫调节肽、抗氧化肽、促微量元素吸收肽等。

作为一种新型的、安全的植物蛋白资源, 近年来荞麦蛋白的生理功能逐渐引起许多学者的关注。Kayashita等^[1]研究发现荞麦蛋白能显著降低血液胆固醇。2001年, Tomotake等^[2]证实了荞麦蛋白降低血液胆固醇的效果优于大豆蛋白质。张政等^[3]研究指出, 从苦荞麦中提取的蛋白复合物对生物体有一定的抗衰老作

用, 但其作用机理尚未明了。张美莉等^[4]对荞麦蛋白提取物进行了清除自由基的研究, 结果表明, 荞麦蛋白提取物具有显著的清除超氧自由基和羟基自由基的作用, 并且呈一定的量效关系, 提示荞麦蛋白提取物中可能存在某种比较强的抗氧化成分。但关于荞麦蛋白提取物中究竟何种蛋白组分具有活性, 其清除自由基、抗氧化作用机理尚不清楚, 急待深入研究。

盐溶性球蛋白代表了荞麦种子蛋白的主要成分, 被列为类豆球蛋白, 是一种极具潜力的营养食品成分资源^[5]。但目前对荞麦球蛋白的研究仅局限于分离提取及其基本性质, 对荞麦球蛋白酶解及其酶解产物性质还未见报

收稿日期: 2008-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760151)

作者简介: 侯文娟(1981—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物活性物质的分离提取。E-mail: houwenjuan_hwj@163.com

*通讯作者: 张美莉(1966—), 女, 教授, 博士, 研究方向为优质植物资源的开发利用。E-mail: zhangmeili22@sina.com

道。本实验以荞麦球蛋白为原料,探索制备荞麦球蛋白酶解液的酶解条件,并进一步对酶解产物进行分离纯化,从而筛选出具有较强抗氧化活性的组分,以期为进一步开发利用荞麦球蛋白资源提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

甜荞产于内蒙古库伦旗,2007年秋季收获,贮藏于0~4℃。

碱性蛋白酶 英国BDH公司;胰蛋白酶 新疆化学研究所;Sephadex G-25 美国GE公司;木瓜蛋白酶、Folin-酚试剂、VB₁₂、氧化型谷胱甘肽、二苯代苦味肼基自由基(DPPH·)、L-酪氨酸、牛血清白蛋白 美国Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。

H2500R-2 高速冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;PB-10 pH计 赛多利斯科学仪器有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;FD-2 冷冻干燥机、YC-1 型层析冷柜 北京博医康实验仪器公司;HL-2 恒流泵、HD-21-1 核酸蛋白检测仪、BSZ-100 自动部分收集器 上海青浦沪西仪器厂;XWT-S 小型台式记录仪 上海自动化仪表三厂;层析柱(1.6cm×50cm) 上海锦华层析设备厂。

1.2 方法

1.2.1 荞麦球蛋白的制备

荞麦球蛋白的提取主要采用Osborne法^[6]。具体工艺参数采用前期研究报道的方法^[7]。

1.2.2 酶解荞麦球蛋白的实验设计

一定浓度荞麦球蛋白悬浮液→预温→调pH值,加蛋白酶→恒温酶解(反应过程中不断加入0.5mol/L的NaOH溶液稳定体系pH值)→灭酶(100℃,5min)→调节pH 7.0→4000r/min离心15min→取上清液并定容(即为荞麦球蛋白酶解液)

欲获得高抗氧化活性的荞麦球蛋白酶解液,本实验取酶解液1.0ml,测定其对超氧自由基(O₂·)的清除率。以水解物对O₂·的清除率,水解度为指标,优化酶解条件。

1.2.3 荞麦球蛋白水解酶筛选

选取碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶3种酶,分别在各自最适条件下对荞麦球蛋白进行水解。

碱性蛋白酶:底物浓度5%、酶用量5000U/g、温度55℃、pH8.0、水解时间4h;木瓜蛋白酶:底物浓度5%、酶用量5000U/g、温度45℃、pH6.0、水解时间4h;胰蛋白酶:底物浓度5%、酶用量5000U/g、温度50℃、pH8.0、水解时间4h。

1.2.4 碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白的单因素试验

研究碱性蛋白酶的加酶量、底物浓度、温度、pH值、水解时间对荞麦球蛋白的酶解效果。

酶用量:3%的荞麦球蛋白在水解温度55℃、pH8.5、酶用量分别为5000、10000、15000、20000、25000U/g的条件下,水解2h。

底物浓度:在酶用量为15000U/g、水解温度为55℃、pH8.5的条件下,分别对底物浓度为1%、3%、5%、7%和10%的荞麦球蛋白水解2h。

水解温度:3%的荞麦球蛋白在酶用量15000U/g、pH8.5、水解温度分别为40、50、55、60、70℃的条件下,水解2h。

pH值:3%的荞麦球蛋白在酶用量15000U/g、55℃、pH值分别为7、8、8.5、9、9.5的条件下,水解2h。

水解时间:3%的荞麦球蛋白在酶用量15000U/g、55℃、pH8.5的条件下,分别水解1、2、3、4、5、6h。

1.2.5 碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白的正交试验

根据单因素试验结果,进行四因素三水平L₉(3⁴)的正交试验,具体的试验方案见表1。

表1 碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白的试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test design for hydrolysis of buckwheat globulin by the alkaline

水平	A 加酶量(U/g)	B 温度(℃)	C pH	D 底物浓度(%)
1	10000	50	8	3
2	15000	55	8.5	4
3	20000	60	9	5

1.2.6 荞麦球蛋白酶解液的分离纯化

取上述经正交试验优化得到的荞麦球蛋白酶解液上Sephadex G-25层析柱(1.5cm×60cm),上样量为0.5ml,以蒸馏水为洗脱液进行洗脱,洗脱条件为:泵速(3.5ml/10min)、检测波长(280nm)、走纸速度(3cm/h),利用自动部分收集器收集(10min/管)。收集各峰处的洗脱液,浓缩,分别测定各分离组分的多肽含量和抗氧化活性。

1.2.7 测定方法

1.2.7.1 蛋白酶活力测定

参照文献[8]的方法进行。

1.2.7.2 水解度测定

水解后生成的氨基氮由甲醛滴定法^[9]测得,样品总氮采用微量凯氏定氮法。

$$\text{水解度}(\%) = \frac{\text{氨基氮含量}}{\text{总氮含量}} \times 100$$

1.2.7.3 多肽含量测定

采用Lowry法^[10]。

1.2.7.4 清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力测定

方法参照文献[11-12], 略作改动。取 5ml pH8.2 的 Tris-HCl-EDTA 缓冲溶液, 加入 3ml 蒸馏水, 混匀后在 25℃ 恒温水浴中保温 20min, 取出后迅速加入 25℃ 预热的 5mmol/L 邻苯三酚溶液 0.2ml, 25℃ 预热的蒸馏水补至 10ml, 立即混匀, 置于石英比色杯中, 以 5ml 蒸馏水加 5ml 的 Tris-HCl-EDTA 缓冲溶液作空白, 在 325nm 波长下, 每间隔 0.5min 记录一次 A, 连续记录 4min, 计算自氧化速率, 记为 ΔA_0 。待测样品所取试剂同前, 只在加入邻苯三酚前加一定量待测样品液, 蒸馏水减少相应体积, 于 325nm 波长处, 每隔 0.5min 测一次 A, 计算自氧化速率, 记为 ΔA 。

$$\text{清除率(\%)} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A}{\Delta A_0} \times 100$$

1.2.7.5 清除 $\cdot OH$ 能力测定

参照金铭等^[13]方法, 略作改动。终体积为 10ml 的反应体系中含邻二氮菲 0.75mmol/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.75mmol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)150mmol/L 和不同浓度的待测样品, 最后加入 H_2O_2 , 使其终浓度为 0.01%, 混匀后于 37℃ 水浴恒温 1h, 立即在波长 536nm 波长处测吸光度。按下式计算羟自由基清除率。

$$\text{清除率(\%)} = \frac{(A_{\text{样}} - A_{\text{样参}}) - A_{\text{损}}}{A_{\text{未损}} - A_{\text{损}}} \times 100$$

式中: $A_{\text{样参}}$ 为不加 H_2O_2 而添加有样品的反应管; $A_{\text{样}}$ 为添加样品和 H_2O_2 的反应管; $A_{\text{未损}}$ 为不加样品也不加 H_2O_2 的反应管; $A_{\text{损}}$ 为不加样品而添加 H_2O_2 的反应管。

1.2.7.6 清除 DPPH \cdot 能力的测定

采用许申鸿等^[14]的方法, 向 2.5ml 65 μ mol/L DPPH \cdot 的乙醇溶液中加入 0.5ml 试样(空白对照用等量蒸馏水代替), 总体积 3ml。用力摇匀, 于室温下放置 30min 后测定混合溶液在 517nm 波长处的吸光度, 乙醇与 0.5ml 试样混合以扣除试样本身颜色的影响。清除率按下式计算:

$$\text{清除率(\%)} = \frac{1 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为未加样品液的 DPPH \cdot 溶液的吸光度; A_i 为加入样品液后 DPPH \cdot 溶液的吸光度; A_j 为乙醇与样品液混合后的吸光度。

1.2.7.7 荞麦球蛋白酶解液各组分子分子量范围的确定^[15]

分别取一定浓度的牛血清白蛋白($M_w=67000$)、VB₁₂($M_w=1355.37$)、氧化型谷胱甘肽($M_w=612.63$)、L-酪氨酸($M_w=181.19$)标准品溶液, 采用同酶解液分离相同的柱条件, 上样分析并确定各种物质出现最大吸收峰时的洗脱

体积 V_e (ml)。以 V_e 为纵坐标, 标准物分子量的对数 ($\lg M_w$) 为横坐标作标准曲线, 根据标准曲线即可求出荞麦球蛋白酶解液中各分离组分的分子量范围。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的酶活力测定结果

经测定碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶活力分别为 200000、68000、79000U/g。

2.2 荞麦球蛋白水解酶筛选

比较了 3 种蛋白酶对荞麦球蛋白水解度的影响(图 1)及水解物清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力(图 2)。

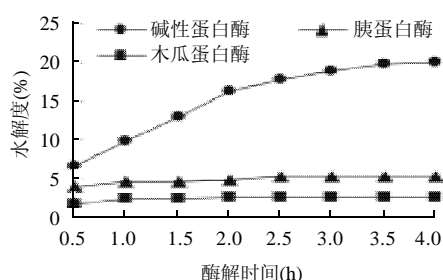


图 1 不同蛋白酶对荞麦球蛋白水解度的影响
Fig.1 Relationship between different protein enzyme and the degree of hydrolyzate

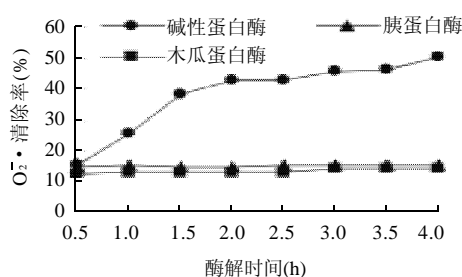


图 2 不同蛋白酶对荞麦球蛋白水解物清除 $O_2^{\cdot-}$ 的影响
Fig.2 Relationship between different protein enzyme and radical scavenging activities against $O_2^{\cdot-}$

由图 1、2 可以看出, 选用碱性蛋白酶明显优于胰蛋白酶和木瓜蛋白酶。随着水解时间的增加, 采用碱性蛋白酶时水解度的变化趋势是先快后慢, 最高可达到 20.03%, 清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力也可达到 50.1%。

2.3 碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白的单因素试验

2.3.1 加酶量的确定

在底物浓度 3%、温度 55℃、pH8.5、酶解时间 2h 的条件下试验不同的加酶量对荞麦球蛋白的水解效果。由图 3 可知, 随着酶用量的增加, 荞麦球蛋白的水解度逐渐增加, 当酶用量达到 20000U/g 以后, 水解度不再增加, 且与 15000U/g 时无明显差异。其清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能

力在酶用量为 15000U/g 时最高, 而后呈现下降趋势, 这可能与荞麦球蛋白过度水解, 使得多肽得率下降有关。故综合考虑, 确定最佳酶量为 15000U/g。

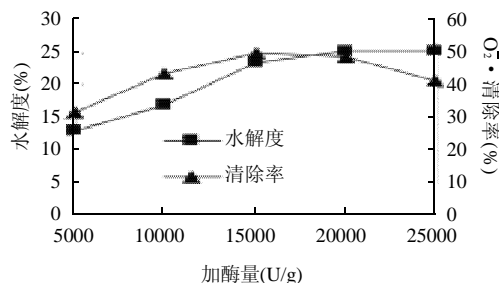


图3 加酶量对荞麦球蛋白水解效果的影响

Fig.3 Effect of enzyme dosage on hydrolysis of buckwheat Globulin

2.3.2 底物浓度的确定

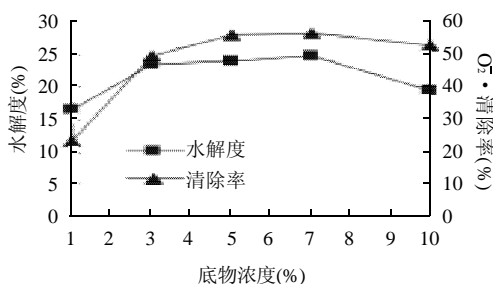


图4 底物浓度对荞麦球蛋白水解效果的影响

Fig.4 Effect of substrate concentration on hydrolysis of buckwheat Globulin

由图4可知, 随着底物浓度的增加, 其清除 $O_2\cdot^-$ 的能力和水解度都是先上升后下降, 且在 5% 和 7% 时并无太大差异, 所以综合考虑经济成本及实验效率, 选用 5% 为酶解反应的最适底物浓度。

2.3.3 水解温度的确定

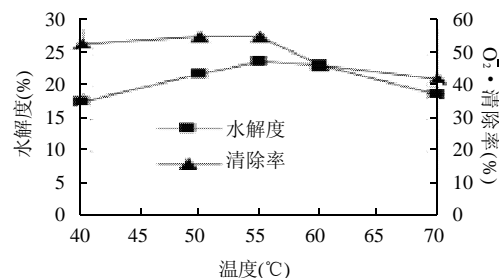


图5 温度对荞麦球蛋白水解效果的影响

Fig.5 Effect of temperature on hydrolysis of buckwheat globulin

由图5可知, 碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白的适宜温度为 50~60℃, 在 55℃ 时得到的水解物对 $O_2\cdot^-$ 清除效

果最好。因此, 55℃ 为该试验中最适温度。

2.3.4 pH 值的确定

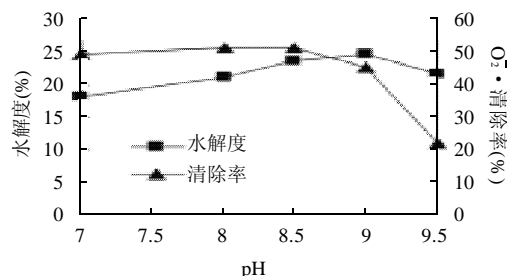


图6 pH 值对荞麦球蛋白水解效果的影响

Fig.6 Effect of pH value on hydrolysis of buckwheat globulin

由图6可知, 随着 pH 值的增加, 荞麦球蛋白的水解度呈现先增大后降低的趋势, 对 $O_2\cdot^-$ 的清除效果在 pH7~8.5 时变化较为平缓, 在 pH8.5 时达到最高, 而后急剧下降, 因此, 选用 pH 值为 8.5。

2.3.5 水解时间的确定

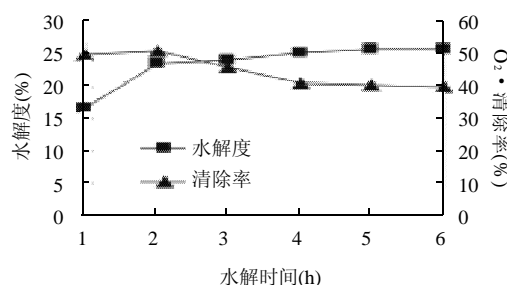


图7 水解时间对荞麦球蛋白水解效果的影响

Fig.7 Effect of reaction time on hydrolysis of buckwheat globulin

由图7可知, 可以看出水解 1~2h 之间水解度增加趋势明显, 2h 后趋于平缓, 而 $O_2\cdot^-$ 清除率在 2h 时达到最大, 所以水解时间宜选择 2h。

2.4 碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白的正交试验

由表2可以看出, 对于水解度而言, 最优水平组合是 $A_3B_2C_3D_3$, 即加酶量 20000U/g、温度 55℃、pH9、底物浓度 5%。各因素主次顺序为: 加酶量 > pH 值 > 底物浓度 > 温度。对于 $O_2\cdot^-$ 清除率而言, 最优水平组合是 $A_3B_2C_1D_3$, 即加酶量 20000U/g、温度 55℃、pH8、底物浓度 5%。各因素主次顺序为: 底物浓度 > 加酶量 > pH 值 > 温度。考虑 pH 值对水解度的影响大于清除率, 因此, 综合各因素影响大小, 确定碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白的最佳工艺为加酶量 20000U/g、温度 55℃、pH9、底物浓度 5%。

对最适试验条件 $A_3B_2C_3D_3$ 进行验证, 经多次重复实验, 结果表明该水解条件稳定, 重现性好, 水解度

达 20% 以上, 对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率达 58% 以上。

表 2 碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白的正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test on hydrolysis of buckwheat Globulin by alkaline

试验号	A	B	C	D	水解度(%)	$O_2^{\cdot-}$ 清除率(%)
1	1	1	1	1	10.31	49.29
2	1	2	2	2	15.36	54.14
3	1	3	3	3	16.13	50.30
4	2	1	2	3	22.60	56.60
5	2	2	3	1	23.20	48.82
6	2	3	1	2	18.95	57.99
7	3	1	3	2	24.23	56.07
8	3	2	1	3	22.70	61.54
9	3	3	2	1	20.92	50.70
水解度	K_1	13.93	19.05	17.32	18.14	
	K_2	21.58	20.42	19.63	19.51	
	K_3	22.61	18.67	21.19	20.48	
	R	8.68	1.75	3.87	2.34	
$O_2^{\cdot-}$ 清除率	K_1	51.23	53.98	56.26	49.59	
	K_2	54.47	54.83	53.81	56.07	
	K_3	56.10	53.0	51.73	56.15	
	R	4.87	1.83	4.53	6.56	

2.5 荞麦球蛋白酶解液的分离纯化

荞麦球蛋白的酶解产物经过 Sephadex G-25 凝胶过滤色谱分析, 分离得到 3 个主要组分(图 8)。

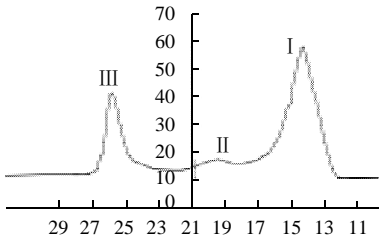


图 8 荞麦球蛋白酶解液 Sephadex G-25 分离色谱图

Fig.8 Column chromatogram of hydrolyzate on Sephadex G-25

2.6 荞麦球蛋白酶解液及各分离组分的抗氧化能力

经过 Sephadex G-25 凝胶过滤色谱分析, 分离得到 3 个主要组分, 分别测定各分离组分清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 与 DPPH \cdot 的能力, 结果表明只有 I、III 具有活性。荞麦球蛋白酶解液清除 3 种自由基的能力具体实验结果如下。

2.6.1 清除 $O_2^{\cdot-}$ 能力

由图 9~11 可知, 荞麦球蛋白酶解液及其分离组分 I、II 对 $O_2^{\cdot-}$ 均有一定的清除作用, 且随加入量的增加, 清除率上升, 量效关系明显。符合二次曲线方程, 经计算其 IC_{50} (清除率达到 50% 时的样品浓度)分别

为: 2.54、1.01、0.75mg/ml。组分 III 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力明显高于组分 I 和未经分离的荞麦球蛋白酶解液。

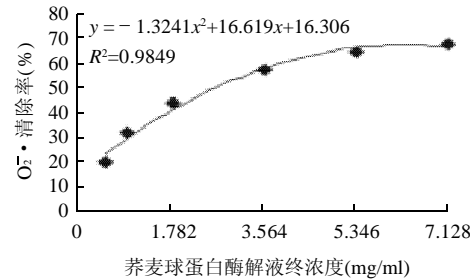


图 9 荞麦球蛋白酶解液对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果

Fig.9 Scavenging effects of hydrolyzate on superoxide radical anion

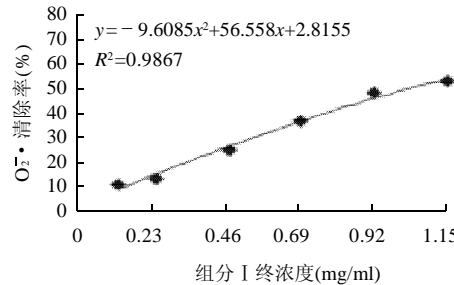


图 10 组分 I 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果

Fig.10 Scavenging effects of fraction I on superoxide radical anion

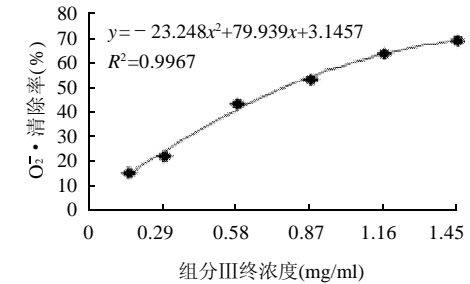


图 11 组分 III 对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除效果

Fig.11 Scavenging effects of fraction III on superoxide radical anion

2.6.2 清除 $\cdot OH$ 能力

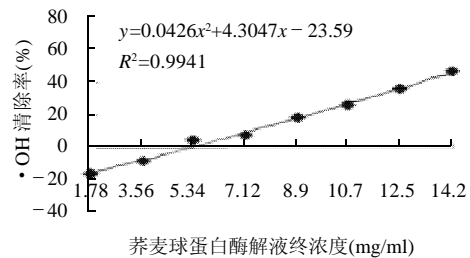


图 12 荞麦球蛋白酶解液对 $\cdot OH$ 的清除效果

Fig.12 Scavenging effects of hydrolyzate on hydroxyl free radical

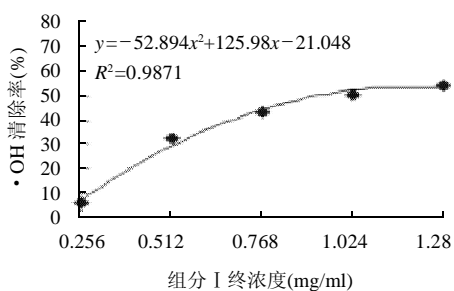
图 13 组分 I 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果

Fig.13 Scavenging effects of fraction I on hydroxyl free radical

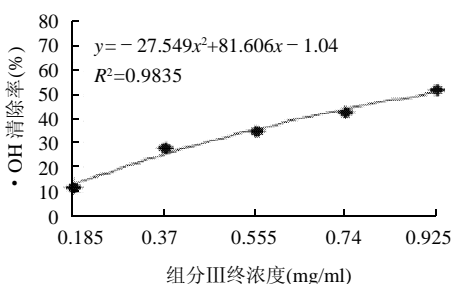
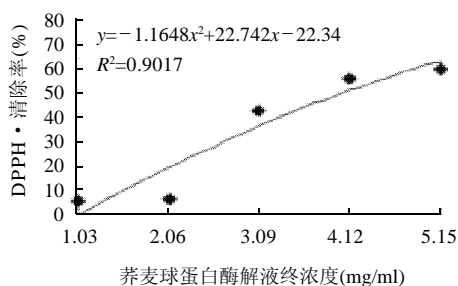
图 14 组分 III 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果

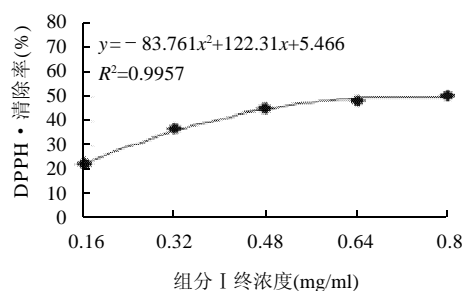
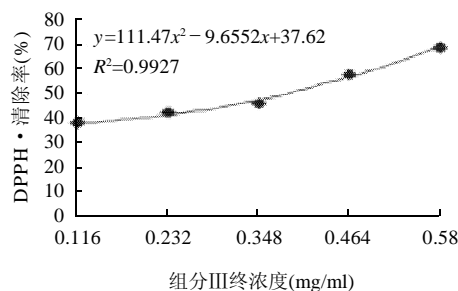
Fig.14 Scavenging effects of fraction III on hydroxyl free radical

由图 12~14 可见, 荞麦球蛋白酶解液在浓度小于 5 mg/ml 时, 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率呈现负值, 说明其在低浓度时存在促进反应的因素, 但经过凝胶柱层析分离后得到的组分 I 和组分 III 并没有显示出助氧化的作用。各样品浓度与羟自由基清除率之间符合二次曲线方程, 经计算其 IC_{50} 分别为荞麦球蛋白酶解液 14.91 mg/ml, 组分 I 0.917 mg/ml, 组分 III 0.897 mg/ml。组分 III 显示了较强的清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力。

2.6.3 清除 DPPH \cdot 的能力

图 15 荞麦球蛋白酶解液对 DPPH \cdot 的清除效果Fig.15 Scavenging effects of hydrolyzate on DPPH \cdot

从图 15~17 可以看出, 3 种物质对 DPPH \cdot 均有一定的清除作用, 经计算其 IC_{50} 分别为荞麦球蛋白酶解液 4.00 mg/ml, 组分 I 0.71 mg/ml, 组分 III 0.38 mg/ml。各种物质对 DPPH \cdot 的清除活性依次为: 组分 III > 组分 I > 酶解液。同样组分 III 显示出了较强的清除 DPPH \cdot 的能力。

图 16 组分 I 对 DPPH \cdot 的清除效果Fig.16 Scavenging effects of fraction I on DPPH \cdot 图 17 组分 III 对 DPPH \cdot 的清除效果Fig.17 Scavenging effects of fraction III on DPPH \cdot

2.7 荞麦球蛋白酶解液各组分分子量范围的确定

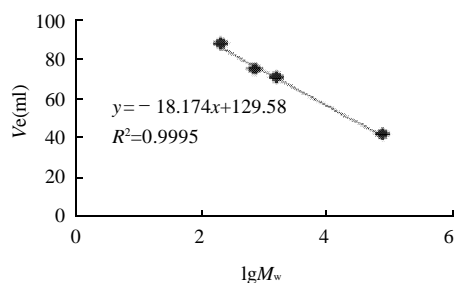


图 18 分子量对数与洗脱体积的关系曲线

Fig.18 Elution volume vs lg molecular weight

根据回归方程结合图 7 荞麦球蛋白酶解液的洗脱曲线可以计算得出, 组分 I 为大分子量的物质, 分子量在 11185~86005D 之间, 组分 II 分子量居中, 集中在 1905~5495D 之间, 而组分 III 为分子量小于 1000D 的寡肽, 推测其基本上是由一些小肽或氨基酸组成。

3 结 论

采用碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白效果优于胰蛋白酶和木瓜蛋白酶。碱性蛋白酶水解荞麦球蛋白的最佳工艺条件为: 加酶量 20000U/g、温度 55℃、pH9、底物浓度 5%、反应时间 2h。

采用 Sephadex G-25 凝胶过滤色谱对荞麦球蛋白酶解液进行分离, 收集得到 3 个组分, 确定了组分 I 为大分子量的物质, 分子量在 11185~86005D 之间, 组分 II 分子量集中在 1905~5495D 之间, 组分 III 为分子量小于 1000D 的寡肽。

对各组分进行抗氧化活性测定发现: 分子量在 1000D 以下的组分 III 具有较强的抗氧化能力。其清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 与 DPPH \cdot 的 IC_{50} 分别为 0.75、0.897、0.38mg/ml。对该肽片段的进一步分离、纯化及鉴定工作有待完善。

参考文献:

- [1] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility[J]. J Nutr, 1997, 127: 1395-1400.
- [2] TOMOTAKE H, SHIMAOKA I, KAYASHITA J, et al. Stronger suppression of plasma cholesterol and enhancement of the fecal excretion of steroids by a buckwheat protein product than by a soy protein isolate in rats fed on a cholesterol-free diet[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65 (6): 1412-1414.
- [3] 张政, 王转花, 刘凤艳, 等. 苦荞蛋白复合物的营养成分及其抗衰老作用的研究[J]. 营养学报, 1999, 21(2): 159-162.
- [4] 张茉莉, 赵广华, 胡小松. 荞麦蛋白和类黄酮提取物清除自由基的 ESR 研究[J]. 营养学报, 2005, 27(1): 21-24.
- [5] SIU-MEI C, CHING-YUNG M. Extraction, purification and characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds[J]. Food Research International, 2006, 39(9): 974-981.
- [6] OSBORNE T B, MENDEL L B. Nutritional properties of proteins of maize kernel[J]. Journal of Biological Chemistry, 1914, 18:1-6.
- [7] 杨海霞, 赵丽芹, 付媛, 等. 甜荞主要贮藏蛋白的分离纯化及功能特性研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 72-76.
- [8] 陈曾燮, 刘兢, 罗丹. 生物化学实验[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1994: 180-183.
- [9] 黄晓钰, 刘邻渭. 食品化学综合实验[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 131-132.
- [10] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 生物化学实验方法和技术科学出版社, 2002: 165-166.
- [11] 张英. 竹叶提取物类SOD活性的邻苯三酚法测定[J]. 食品科学, 1997, 18(5): 47-49.
- [12] 张宏, 谭竹钧. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2002, 33(6): 677-681.
- [13] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2/Fe^{2+} 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 533-555.
- [14] 许申鸿, 杭瑚. 29 种鲜花提取液对羟自由基的清除作用[J]. 植物资源与环境, 1999, 8(3): 59-60.
- [15] 张莉莉, 严群芳, 王恬. 大豆生物活性肽的分离及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 208-211.