

# 荞麦清蛋白水解理化性质及抗氧化性研究

邵云, 唐传核

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本试验研究了木瓜蛋白酶作用下, 不同酶解时间对荞麦清蛋白物化及抗氧化能力的影响, 包括了对酶解产物多酚含量、表面疏水性的测定以及 DPPH 自由基清除能力和羟自由基清除能力。结果表明, 酶解做用后, 荞麦清蛋白的多酚含量及表面疏水性有很大程度的改变, 另外, 荞麦清蛋白具有良好的抗氧化能力, 其 DPPH 自由基和羟自由基清除能力在蛋白浓度为 1 mg/mL 时分别可达到为 60% 及 80%, 接近抗氧化剂 2,6-二叔丁基对苯酚 (BHT) 的抗氧化能力, 而酶解产物的抗氧化能力有所降低。

**关键词:** 荞麦清蛋白; 木瓜蛋白酶; 抗氧化性质

文章篇号: 1673-9078(2013)1-47-50

## Physicochemical and Antioxidant Properties of Buckwheat Albumin Hydrolysates

SHAO Yun, TANG Chuan-He

(College of Light Industry & Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Buckwheat was used as raw material. The physicochemical and antioxidant properties of the hydrolysates, obtained by hydrolysis with papain from buckwheat albumin (BA) were characterized, including polyphenol contents, surface hydrophobicity(Ho), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging ability and hydroxyl radical scavenging ability. The results showed that the polyphenol contents and surface hydrophobicity of buckwheat albumin changed after hydrolysis. In addition, buckwheat albumin exhibited good antioxidant properties. The DPPH radical scavenging ability and hydroxyl radical scavenging ability of buckwheat albumin achieved to 60% and 80% respectively, its close to the antioxidant properties of butylatedhydroxytoluene (BHT). However, these properties of hydrolysates decreased more or less.

**Key words:** buckwheat albumin; papain; hydrolysates; antioxidant property

荞麦蛋白是荞麦的主要生物活性成分。荞麦蛋白不同于禾谷类作物蛋白, 而有其独特的特点。荞麦蛋白具有较高的生物效价, 其氨基酸组成合理, 富含 8 种人体必需氨基酸, 尤其是精氨酸、赖氨酸、色氨酸和组氨酸的含量较高, 与其他谷类粮食有很好的互补性<sup>[1]</sup>, 目前国内外对荞麦蛋白质的利用主要是将其作为产品的配料, 以改善食品的组织结构和增加营养保健价值<sup>[2]</sup>。

荞麦清蛋白约占荞麦蛋白 18.2%, 易溶于水和稀的缓冲溶液, 主要有一条分子量为 8~16 kDa 的单链多肽链组成的 2S 蛋白构成, 对于双子叶植物 2S 清蛋白来说, 荞麦清蛋白单一的多肽链极为特殊, 与葵花籽清蛋白性质相类似。目前国内外对荞麦蛋白的研究不胜枚举<sup>[3-4]</sup>, 而对荞麦清蛋白的研究较少, 且多集

收稿日期: 2012-07-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30972049)

作者简介: 邵云 (1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物蛋白研究

通讯作者: 唐传核 (1973-), 男, 副教授, 主要从事植物蛋白研究

中在提取方法及理化性质上<sup>[5]</sup>。本文以荞麦清蛋白为原料, 研究了荞麦清蛋白经木瓜蛋白酶酶解后, 其物化性质及抗氧化性能的变化, 为植物蛋白理化功能性质的改善提供数据支持, 对植物蛋白的深加工和相关的保健品开发都有积极的意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

荞麦, 产于河北, 购于广州华润万家超市; 荞麦清蛋白, 冷冻干燥制取; 木瓜蛋白酶制剂, 诺维信生物技术有限公司; DPPH, Sigma 公司; 所有化学试剂均为分析纯。

CR22G 高速冷冻离心机, 日本日立公司; S20 Seven Easy pH 酸度计, 法国 METTLER TOLEDO 公司; DYCA-24D 双垂直电泳槽, DY CZ-24D 三恒电泳仪, 北京六一仪器厂; 紫外-可见分光光度计 2501PC, 日本岛津公司; F-4500 荧光光谱仪, 日本 HITACHI Koli 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 荞麦清蛋白(BA)的制备

荞麦清蛋白的分离提取参考 Osborne<sup>[6]</sup>的方法并做适当调整,具体方法如下:

荞麦粉与去离子水以 1:5 (*m/V*) 的比例搅拌 1 h 后,离心(8000 g, 15 min, 20 °C),上清液透析 24 h 后再次以相同条件离心(目的是除去溶于低浓度盐溶液的球蛋白),所得上清液经冷冻干燥即得 BA 样品。

### 1.2.2 酶解及酶解产物的制备

荞麦清蛋白溶于去离子水配制 2% (*m/V*) 蛋白溶液,于 55 °C 水浴中保温 10 min,调至最适 pH 值 6.8,加入木瓜蛋白酶(底物蛋白与酶的比例为 100:2, *m/V*) 后于 55 °C 摇床反应,酶解过程中,每隔 5~10 min 通过滴加 0.5 M NaOH 使反应体系的 pH 值保持在 6.8,并记录消耗的 NaOH 体积,并于水解时间为 15、30、60、90、120、150、180 min 时取样,立即于冰水浴中迅速冷却并放于 -20 °C 冷冻保存,即得荞麦清蛋白不同酶解时间下的酶解产物,记作 HT-15、HT-30、HT-60、HT-90、HT-120、HT-150、HT-180,并计算其酶解度(DH)。

酶解度由 pH-stat 法计算,见式(1)。

$$DH(\%) = \frac{B \cdot N_b}{\alpha \cdot M_p \cdot h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

其中, B-碱的消耗体积, mL; N<sub>b</sub>-碱的当量浓度; M<sub>p</sub>-水解蛋白质量, g; h<sub>tot</sub>-底物蛋白质肽键总数(毫克当量/g 蛋白质), h<sub>tot</sub>由底物蛋白的氨基酸组成计算得到,荞麦清蛋白的 h<sub>tot</sub> 值为 7.11<sup>[7]</sup>; α-底物蛋白 α-氨基的平均解离度。

由公式(2)计算,若 55 °C 时, pK 值为 7.1,

$$\alpha = \frac{10^{(pH-pK)}}{1+10^{(pH-pK)}} \quad (2)$$

### 1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

根据 Laemmli<sup>[8]</sup>的方法,在不连续缓冲液系统上分别进行非还原性 SDS-PAGE 电泳分析,分离胶和浓缩胶质量分数分别为 14% 和 4%。用非还原性样品缓冲液配制 4% 样品溶液(2 mg 蛋白样品/0.5 mL 缓冲液),充分震荡混合均匀,电泳前沸水加热处理 5 min,离心(10000 g, 10 min),进样量 10 μL。凝胶电泳于恒定电流下进行,在浓缩胶处电流保持 40 mA,分离胶处增至 80 mA。凝胶染色及脱色后,于凝胶成像系统进行成像处理。

### 1.2.4 多酚(黄酮)含量测定

测定方法参考 Carbonaro 等<sup>[9]</sup>的方法:将冷冻样品于冰浴条件下解冻后立即用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液稀释为 0.5 mg/mL 的样品溶液,充分振荡混匀,离心(10000 g, 15 min),于 328 nm 处测定吸光度 A<sub>1</sub>(总

多酚),之后加入 5% 质量分数的三氯乙酸(TCA),沉淀蛋白质,再以相同条件下离心,于 328 nm 处测定吸光度 A<sub>2</sub>(游离多酚),A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>即为结合多酚对应的吸光度值。多酚含量以“g 芦丁当量/100 g 样品”为单位,通过以芦丁为标样的标准曲线计算。

### 1.2.5 表面疏水性(Ho)

Ho 测定参考 Haskard 等<sup>[10]</sup>的方法。用 0.01 M 磷酸缓冲液将冰浴条件下解冻的 2% (*m/V*) 蛋白酶解液稀释到指定的浓度梯度(0.004~0.02%, *m/V*),即取 4 mL 磷酸缓冲液,加入 8、16、24、32、40 μL 的 2% 的蛋白原液,并配制 8.0 mM ANS(荧光探针)溶液。测定前,在测试前添加 20 μL of ANS 溶液,充分震荡后反应 8 min,于 F4500 荧光光谱仪测定荧光强度(Hitachi Co., Japan),激发波长 390 nm,发射波长 470 nm,激发和发射夹缝宽均为 5 mm。以最大荧光强度为纵坐标,蛋白浓度(mg/mL)为横坐标,通过线性回归分析得到的斜率即为 Ho。

### 1.2.6 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基清除能力的测定参考 Shimada 等<sup>[11]</sup>的方法:将冷冻样品于冰浴条件下解冻,并稀释成浓度为 0、0.1、0.2、0.4、1.0 mg/mL 的样品溶液各 2 mL,加入 0.2 mmol/mL 的 DPPH 乙醇溶液(现配) 2 mL,振荡摇匀,在室温下放置 30 min 后,以无水乙醇为空白,于 517 nm 处测定吸光值,计算公式见式(3),式中, A<sub>s</sub> 为样品溶液对应吸光度值; A<sub>b</sub> 为蒸馏水(0 mg/mL)对应吸光值。以抗氧化剂 2,6-二叔丁基对苯酚为参照。

$$DPPH \text{ 清除率}(\%) = [1 - (A_s/A_b)] \times 100 \quad (3)$$

### 1.2.7 羟自由基清除能力

羟自由基清除能力的测定方法参考 Avellar<sup>[12]</sup>的方法,具体如下:用 50 mM 磷酸缓冲液配制含有 0.75 mM 邻二氮杂菲(1,10-phenanthroline)和 0.75 mM FeSO<sub>4</sub> 的溶液(pH 7.4),用其将冰浴下解冻的 2% (*m/V*) 酶解液稀释成不同浓度梯度的样品溶液(0~1.0 mg/mL) 4 mL,分别加入 2 μL 双氧水(30%, *m/v*),37 °C 水浴中反应 60 min 后,于 536 nm 波长下测定吸光度值。清除能力由公式(4)计算,式中, A<sub>s</sub> 为样品的吸光度值; A<sub>1</sub> 为对照样吸光值(含邻二氮杂菲、FeSO<sub>4</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 但不含样品); A<sub>0</sub> 为空白样的吸光度值(仅含邻二氮杂菲和 FeSO<sub>4</sub>)。

$$OH \text{ 自由基清除力}(\%) = [(A_s - A_1)/(A_0 - A_1)] \times 100 \quad (4)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 荞麦清蛋白酶解过程

#### 2.1.1 酶解度(DH)

水解度(DH)变化曲线如图1所示。由图1看出,木瓜蛋白酶酶解荞麦清蛋白时,在0~30 min内酶解速度较快,随着酶解时间的推移,酶解速度急速减小,特别是60 min以后酶解速度以很小的速度增长,酶解几乎不在进行。与碱性蛋白酶酶解荞麦清蛋白的实验<sup>[13]</sup>相比,酶解程度偏低。

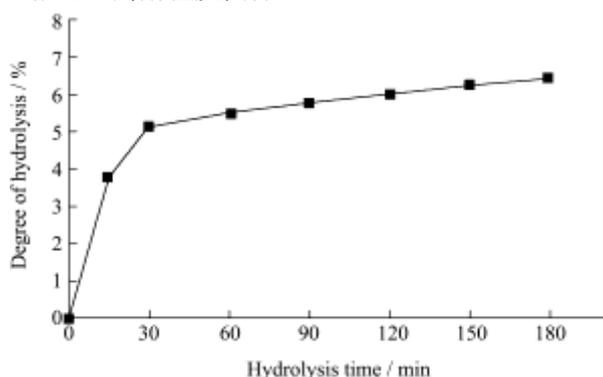


图1 荞麦清蛋白及木瓜蛋白酶作用下酶解产物对应酶解度

Fig.1 DH changes of BA during hydrolysis with papain

### 2.1.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

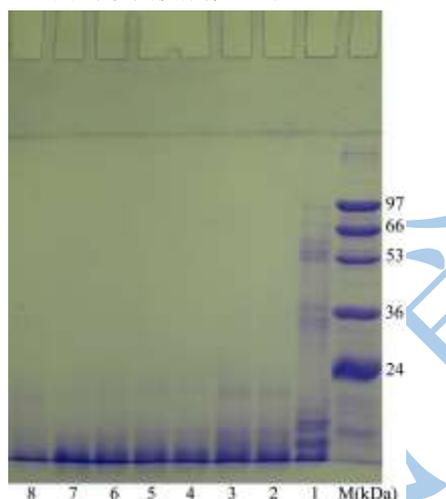


图2 荞麦清蛋白及其酶解产物的 SDS-PAGE 图

Fig.2 SDS-PAGE patterns of buckwheat albumin and its hydrolysates

注: 非还原性电泳带 1~8 依次是: BA、HT-15、HT-30、HT-60、HT-90、HT-120、HT-150、HT-180; M 为标准蛋白。

图2显示非还原性电泳条件下,未处理荞麦清蛋白分子量集中在24 kDa以下,即一条组成2S蛋白的8~20 kDa的单链多肽链,而36 kDa和55 kDa处为组成13S的两条多肽链的杂带,说明BA制备过程中有部分低盐溶性球蛋白被提出。随着木瓜蛋白酶的处理,蛋白分子量不断减小,但60 min以后变化不是很明显,说明酶解60 min后,酶解几乎不再进行,这与前面的酶解曲线相吻合。

### 2.2 多酚含量以及表面疏水性 (Ho)

表1 荞麦清蛋白及其水解物的多酚含量及表面疏水性 (Ho)

Table 1 Polyphenol contents and surface hydrophobicity (Ho)

	Polyphenol contents (% rutin equivalent)			Ho
	Total	free	protein-bound	
BA	1.71±0.06a	1.54±0.01	0.17±0.01	386.0±19.1a
HT-15	1.87±0.08ab	1.64±0.05	0.23±0.02	242.8±25.8b
HT-30	1.96±0.12bc	1.90±0.16	0.07±0.03	262.4±12.2b
HT-60	2.10±0.26cd	1.79±0.05	0.32±0.16	239.0±19.8b
HT-90	1.86±0.06ab	1.67±0.09	0.20±0.10	212.2±47.7b
HT-120	2.23±0.12d	2.12±0.08	0.11±0.01	229.8±12.4b
HT-150	1.91±0.09abc	1.85±0.03	0.06±0.07	235.2±7.4b
HT-180	1.92±0.06abc	1.70±0.07	0.21±0.07	217.6±14.0b

注: a~d 表示同一列数值间显著性差异 (p<0.05)。

在未处理荞麦清蛋白中,总酚含量达到1.71%芦丁当量,且大部分处于游离状态。酶处理后,在酶解60 min内,清蛋白总酚含量随酶解程度的增加而增加,而后有所减小,直至180 min时多酚含量处于1.92%芦丁当量,含量仍高于未处理荞麦清蛋白。同时,荞麦清蛋白中游离酚含量与总酚含量的变化趋势基本相同。

BA及其水解物的表面疏水性Ho在中性条件下使用荧光探针测定得出。如表1所示,蛋白经酶处理后其表面疏水性急剧下降,变化趋势与鸡蛋清蛋白的相似<sup>[14]</sup>,但随着酶解时间的进行,表面疏水性变化不大,正如表1显示,酶解后的表面疏水性比未处理蛋白的显著降低,而不同酶解度之间无显著性差异,该结果与2009年Tang等对荞麦蛋白水解物的研究结果<sup>[15]</sup>相类似。酶解导致Ho的剧烈下降的原因一方面归因于酶诱导蛋白质表面疏水性区域的断裂;另一方面由于在酶解之后,一些疏水性多肽或片段在离心过程中被去除。

### 2.3 抗氧化能力

#### 2.3.1 DPPH 自由基清除能力

图3比较了BA及其酶解产物在清除DPPH自由基方面的活性,检测浓度为0~1.0 mg/mL,以常见抗氧化剂BHT(2,6-二叔丁基对甲酚)为参比。所有检测样的DPPH清除力均与样品浓度呈现出较好的线性关系,当浓度达到1 mg/mL时,抑制率达到60%左右,但在0~1.0 mg/mL 溶度范围下,检测样的抗氧化能力始终低于抗氧化剂BHT。然而,在浓度大于0.2 mg/mL时,BHT抗氧化能力不再改变,即是说,当荞麦清蛋白的浓度足够大时,其抗氧化能力完全可以与BHT相比拟。另一方面,与未处理蛋白相比,酶解产物的

清除能力略有下降, 整体看来, 变化不是很大, 这可能与荞麦清蛋白较低的酶解度有关。

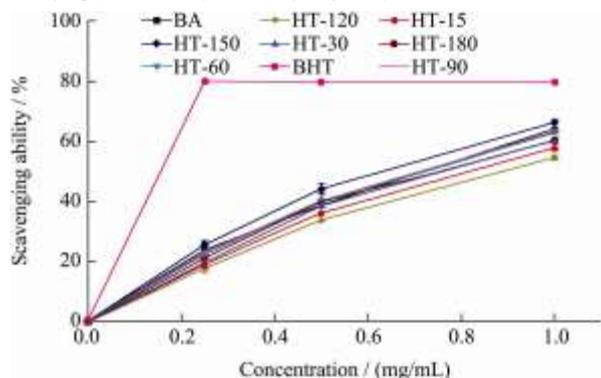


图3 BA 及其酶解产物 DPPH 自由基清除能力

Fig.3 DPPH radical scavenging ability of BA and its hydrolysates

注: 竖直误差线为三次测定的标准偏差。

### 2.3.2 羟自由基清除能力

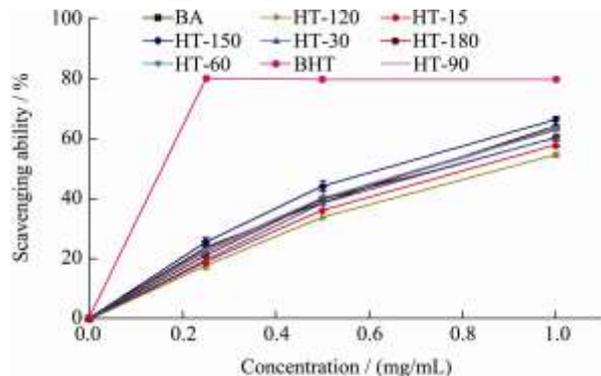


图4 BA 及其酶解产物羟基自由基清除能力

Fig.4 Hydroxyl radical scavenging ability of BA and its hydrolysates

注: 竖直误差线为三次测定的标准偏差。

荞麦清蛋白及其酶解产物的羟自由基清除能力如图4所示, 其中以常见抗氧化剂 BHT (2,6-二叔丁基对甲酚) 为参比, 所有被测样的清除率均与样品浓度 (0~1.0 mg/mL) 呈现出良好的线性相关性, 与 DPPH 清除能力的测定相同, 酶解后的荞麦蛋白的羟自由基清除能力有所下降, 且下降程度比 DPPH 自由基清除率要大。

### 3 结论

本实验研究了木瓜蛋白酶对荞麦清蛋白物化性质及抗氧化性能的影响, 对比了不同酶解时间下酶解产物与未处理荞麦清蛋白在物化性质及抗氧化性上的差异。研究发现, 随着酶解的进行, 荞麦清蛋白酶解产物的表面疏水性明显降低, 其多酚含量呈现先增加后减少的趋势, 酶解 3 h 后, 多酚含量停留在比未处理清蛋白稍高的位置, 而荞麦清蛋白的高抗氧化性则

随着酶解的作用呈降低趋势, 此种现象有可能是由于酶作用改变了荞麦清蛋白的微观结构, 这方面有待我们对其进一步研究。

### 参考文献

- [1] 宋金翠. 荞麦产业具有良好的发展前景[J]. 食品科学, 2004, 25(10):415-419
- [2] 田斌, 董文宾, 朱振宝. 中性蛋白酶水解荞麦蛋白的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(1):67-68
- [3] Siu-Mei Choi, Ching-Yung Ma. Extraction, purification and characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds [J]. Food Research International, 2006, 39: 974-981
- [4] 阮景军, 陈惠. 荞麦蛋白的研究进展与展望[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(3):199-212
- [5] Tang CH, Wang XY. Physicochemical and structural characterisation of globulin and albumin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds [J]. Food Chemistry, 2010, 121: 119-126
- [6] Osborne T.B. The vegetable proteins[M]. New York: Longmanns, Green, 1924, 2nd ed:71-81
- [7] Renzetti S, Behr J, Vogel R F, et al. Transglutaminase polymerisation of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) proteins [J]. Journal of Cereal Science, 2008, 48: 747-754
- [8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685
- [9] Carbonaro M, Grant G, Cappelloni M, et al. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 742-749
- [10] Haskard C A, Li-Chan. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (Prodan) and anionic (ANS) fluorescent probes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46:2671-2677
- [11] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40: 945-948
- [12] de Avellar IG, Magalhaes MM, Silva AB, et al. Reevaluating the role of 1, 10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1675: 46-53
- [13] 付媛, 张美莉, 侯文娟. 酶法水解荞麦清蛋白制备抗氧化活

- 性肽的研究[J].食品科学,2009,30(15):142-147
- [14] 杨瑾,唐传核.鸡蛋清蛋白水解物的抗氧化性研究[J].现代食品科技,2011,27(12): 1446-1450
- [15] Tang C H, Peng J, Zhen D W, Chen Z. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2009, 2: 1-7

现代食品科技