

苦荞多肽的纯化、结构与体外抗氧化活性研究

马萌,陶婷,马挺军*

北京农学院食品科学与工程学院,北京 102206

摘要:为了探究苦荞多肽粗提液抗氧化活性的主要来源,需要进一步对苦荞多肽进行分离纯化,通过结构鉴定来分析抗氧化活性与多肽结构之间的关系。该研究以苦荞功能提取物废渣为原料提取苦荞粗蛋白辅以植物乳杆菌发酵法制备苦荞多肽,采用大孔吸附树脂、葡聚糖凝胶、液相色谱对苦荞多肽粗提液进行分离纯化,并以抗氧化活性为指标,筛选抗氧化活性较强的组分,利用液相色谱-质谱联用技术鉴定抗氧化多肽结构。结果表明,纯度不同的苦荞多肽抗氧化能力也不同,经过 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶分离纯化得到的 T-3 组分 ABTS 和 DPPH 自由基清除能力最优,清除率分别为 96%、94%。纯化后苦荞多肽的抗氧化活性显著高于粗提液($P < 0.05$),但是抗氧化活性并没有完全与苦荞多肽纯度呈正相关,通过液相色谱进一步分离纯化 T-3 组分后得到的组分 T-3-1,苦荞多肽纯度虽然达到了 98%,但是对 DPPH 和 ABTS 抑制率不再增强,反而稍有下降,抑制率分别为 89% 和 90%。由质谱鉴定结果得到,主要抗氧化肽的氨基酸序列为苯丙氨酸-脯氨酸-酪氨酸 Phe-Pro-Tyr(FPY) 和酪氨酸-亮氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸 Tyr-Leu-Pro-Phe(YLPF)。研究结果以期对苦荞多肽的进一步开发利用提供一定的理论基础。

关键词:苦荞多肽;分离纯化;结构鉴定;抗氧化活性

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)12-2011-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.12.003

Study on purification, structure and *in vitro* antioxidant activity of buckwheat peptides

MA Meng, TAO Ting, MA Ting-jun*

College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract: In order to investigate the main source of antioxidant activity of tartary buckwheat polypeptide crude extract, it was necessary to further isolate and purify buckwheat peptides and analyze the relationship between antioxidant activity and peptide structure by structural identification. In this study, the buckwheat polypeptide was prepared by using the waste residue of buckwheat functional extract as raw material to extract buckwheat crude protein supplemented by lactobacillus plant fermentation method, and the coarse extract of buckwheat polypeptide was isolated and purified by macroporous adsorption resin, dextran gel and liquid chromatography, and the antioxidant activity was taken as the index, the components with strong antioxidant activity were screened, and the antioxidant polypeptide structure was identified by liquid chromatography-mass spectrometry. The results showed that tartary buckwheat polypeptides with different purities also had different antioxidant capacity. The ABTS and DPPH radical scavenging ability of T-3 components separated and purified by Sephadex G-15 dextran gel were the best, and the scavenging rates were 96% and 94%, respectively. The antioxidant activity of purified tartary buckwheat polypeptide was significantly higher than that of crude extract ($P < 0.05$), but the antioxidant activity was not positively correlated with the purity of tartary buckwheat polypeptide. After further separation and purification of T-3 components by liquid chromatography, the component T-3-1 was obtained. Although the purity of Tartary buckwheat polypeptide reached 98%, the inhibition rate of DPPH and ABTS was no longer enhanced. The inhibition rates were 89% and 90%, respectively. The amino acid sequences of the main antioxidant peptides were phenylalanine-proline-tyrosine (Phe-Pro-Tyr, FPY) and tyrosine-leucine-proline-phenylalanine (Tyr-Leu-Pro-Phe, YLPF). The results are expected to provide a theoretical basis for further development and utilization of tartary buckwheat polypeptides.

Key words: tartary buckwheat polypeptide; separation and purification; structural identification; antioxidant activity

收稿日期:2022-05-11

接受日期:2022-11-01

基金项目:国家现代农业产业技术体系(CARS-08-E-2-4);国家重点研发计划(2020YFD1001404-01)

* 通信作者 Tel:86-10-80799170; E-mail: mtingjun@163.com

苦荞麦又名乌麦、荞子、三角麦等,属蓼科荞麦属双子叶植物,最早起源于中国,是世界上最早种植的农作物之一,也是我国特有的粮药兼备的小宗粮食作物^[1]。《本草纲目》中记载,苦荞麦味苦、平、寒,具有降气宽肠,续精神,行气化痰等作用^[2]。已有研究证明从苦荞麦籽粒及其蛋白水解得到的多肽粗提物具有多种生物活性,如降胆固醇^[3]、防癌抗肿瘤^[4]、预防高血脂^[5]及抗氧化^[6]等作用。

生物活性肽具有多种生物功能,这与其氨基酸组成和顺序密切相关^[7],因此研究多肽功效的关键就是对多肽结构的鉴定。分离纯化是研究多肽结构和功效关系的关键一步,常用的多肽分离纯化技术主要有色谱、膜分离、电泳等,其中色谱技术应用最为普遍^[8,9]。由于蛋白水解物组成复杂,所以在分离纯化时常采用多种方法联合处理以实现多肽的分离和富集^[10-12]。以往研究表明^[13],苦荞蛋白或酶水解产物具有多种生物活性,但是其生物活性机制尚不十分清晰,关于苦荞活性肽结构解析及生物活性的研究鲜见报道。Ma等^[14]从消化后的荞麦蛋白中分离鉴定出4种抗氧化多肽(WPL、VPW、VFPW和PW),比荞麦蛋白质混合物清除ABTS自由基能力更强。Luo^[15]采用碱性蛋白酶酶解苦荞清蛋白得到了苦荞清蛋白酶解液,经过超滤分离、阴离子交换色谱、反向高效液相色谱成功分离出苦荞活性肽组分,并得到其氨基酸序列为Ala-Phe-Tyr-Arg-Trp。

本研究以苦荞功能提取物废渣为原料提取苦荞粗蛋白辅以植物乳杆菌发酵法制备苦荞多肽。得到的苦荞多肽发酵液经过大孔吸附树脂、葡聚糖凝胶、液相色谱纯化后测定抗氧化活性,对筛选出抗氧化活性强的部位进行结构鉴定,探究苦荞多肽粗提液抗氧化活性的主要来源,以期为苦荞多肽的进一步研究和在功能食品及保健品中的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

提取黄酮、酚酸等物质后的苦荞废渣,由山西农业大学(山西省农业科学院)提供,经全自动凯氏定氮仪测定蛋白含量为10.7%;ABTS自由基、DPPH自由基(Sigma公司);葡聚糖凝胶Sephadex G-15(色谱级,北京慧德易科技有限责任公司);四肽标准品(Gly-Gly-Tyr-Arg)、三氯乙酸(TCA)(色谱纯,美国Sigma公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)酶活试剂盒(南京建成生物工程研究所);三氟乙酸(TFA)、氢氧化钠(NaOH)(色谱纯,

北京化工);五水硫酸铜、氯化钠(分析纯,北京化工);95%乙醇(分析纯,天津市福晨化学试剂厂);碱性蛋白酶(生物试剂,酶活为200 U/mg,北京索宝来科技有限公司);石油醚(沸程30~60℃,分析纯,北京东方博远科技发展有限公司);植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) ATCC 14917(中国普通微生物菌种保藏中心);酒石酸钾钠($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);S-8型大孔吸附树脂(分析纯,上海源叶生物有限公司)。

1.2 仪器与设备

UV765型紫外-可见分光光度计(上海精科仪器有限公司);PHS-3C型pH计(北农雨禾北京科技发展有限公司);玻璃塑料层析柱(180 mm×500 mm、2 cm×40 cm,江阴市新辉层析设备有限公司);LC-18N-50B型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);HD-4型紫外检测仪(青岛圣瀚化工仪器设备股份公司);BSZ-100型自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂有限公司);LC-20AD型高效液相色谱仪、LCMS-8040型液相色谱质谱联用仪(日本岛津);KQ-700E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(邦西仪器科技有限公司);SW-CJ-1D型单人单面垂直净化工作台(浙江苏净净化设备有限公司);Blue Pard型生化培养箱(上海恒科技有限公司);YXQ-50SII型立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);Milli-Q型超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 苦荞粗蛋白的制备

参考Tao^[16]的实验方法并修改,将苦荞废渣干燥后磨碎,过60目筛,将苦荞渣粉按照料液比(1:15, W/V)加入石油醚中,在室温下搅拌24 h进行脱脂,过滤,重复脱脂操作处理两次。

用去离子水与脱脂后的苦荞粉按照1:1比例混合,搅拌10 min,用5% NaOH调节pH至10,放置于46℃水浴锅中。向容器中添加40 U/g碱性蛋白酶,酶解反应20 min,加热煮沸5 min。待温度降至常温,9 000 r/min离心12 min,倒出上清液,调节溶液pH至中性,得到苦荞蛋白粗提液。调节苦荞蛋白粗提液pH值至等电点4.5,5 000 r/min,4℃下离心30 min,得到沉淀,沉淀物用去离子水多次冲洗后调节其pH值为7.0,-70℃真空冷冻干燥24 h得到苦荞粗蛋白固体粉末。

1.3.2 苦荞多肽粗提液的制备

采用发酵法制备苦荞多肽发酵液,参考唐田园^[17]的方法,将植物乳杆菌培养到活菌数在 $\log 7.0$ CFU/mL 左右,按 13% (V/V) 的接种量接种到自制苦荞粗蛋白培养基中,30 °C 培养箱中发酵 2 d,在 100 °C 下灭酶 10 min,6 000 r/min 离心 22 min,去除残渣,取上清液,得到苦荞多肽发酵液。

1.3.3 S-8 型大孔吸附树脂分离纯化苦荞活性肽

将 S-8 型大孔吸附树脂置于 95% 乙醇溶液中浸泡 20 h,双重水清洗至没有乙醇味。用 5% HCl 清洗树脂 3 h,过滤保留树脂,洗涤沉淀至溶液为中性,用 3~5 倍大孔吸附树脂体积的 NaOH (体积分数 6%) 通柱 3 h,过滤保留树脂,洗涤沉淀至大孔吸附树脂 pH 值为 7 左右待用。

取 10 g 上述处理之后的树脂,加入适量双重水,使大孔吸附树脂保持湿润的状态,灌装到玻璃柱中,然后用双重水冲洗柱子 1 h,调节上样溶液(即苦荞多肽发酵液)pH 值为 5,以 1.5 mL/min 的速度开始上样,上样结束后,用双重水冲洗直至流出溶液为无色,然后使用乙醇溶液进行洗脱。

1.3.4 葡聚糖凝胶分离纯化苦荞活性肽

称取 20 g 的葡聚糖凝胶 Sephadex G-15,湿法灌装凝胶柱,柱子型号:2 cm × 40 cm。将经过大孔吸附树脂部分纯化后苦荞多肽液,用双重水溶解配制上样液(浓度为 5 mg/mL),经过 0.45 μm 微孔滤膜,取滤液 5 mL 加入凝胶层析柱,设定洗脱速度 0.5 mL/min,紫外检测波长 220 nm,用双重水进行洗脱,对洗脱液进行检测并以抗氧化活性为指标,收集合并组分。

1.3.5 液相色谱分离纯化苦荞活性肽

选取经 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶分离后的抗氧化活性能力最佳的洗脱组分,采用反相液相色谱进行分离。采用 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A:水(0.1% TFA),流动相 B:乙腈(0.1% TFA),进行线性洗脱,洗脱条件:乙腈(0% → 75%, 0 ~ 30 min),流速 0.8 mL/min,检测波长 214 nm。根据监测图谱收集多肽并测定抗氧化活性以及鉴定多肽序列。

1.3.6 上清液中多肽含量测定、脱盐处理

根据双缩脲法^[18]测定苦荞多肽粗提液、大孔树脂分离纯化后、葡聚糖凝胶分离纯化后、液相色谱分离纯化后的上清液中苦荞多肽含量。分别取 10 mg/mL 的多肽标准溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于洁净的试管中,用双重水补充至 1 mL,加入 4

mL 双缩脲试剂,震荡混合,静置 30 min,在波长 540 nm 处测定吸光值。绘制标准曲线,回归方程为 $y = 0.056 1x - 0.001 1$ ($R^2 = 0.999 4$),根据标准曲线计算出多肽的含量。

用 C₁₈ 柱对纯化后的苦荞多肽进行脱盐处理,先用 1 mL 甲醇活化色谱柱,选用双重水为洗脱液(0.1% TFA)对色谱柱进行洗脱平衡,收集样品后冻干,使用 1 mL 双重水(0.1% TFA)再次溶解样品之后进样,加入 1 mL 双重水(0.1% TFA)进行去杂,最后使用 500 μL 80% 乙腈(0.1% TFA)洗脱,收集洗脱液,冻干后待用。

1.3.7 苦荞多肽纯度测定

收集不同浓度乙醇洗脱液,按式(1)计算苦荞多肽纯度。

$$\text{纯度} = \frac{\text{洗脱液中苦荞多肽质量}}{\text{洗脱液中干膏质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.8 HPLC-MS/MS 分析鉴定苦荞麦活性肽分子量

使用质谱仪进行检测。设置一级扫描范围为 200 ~ 2 000 Da,温度为 320 °C,电喷雾电压为 2.0 kV,不设置目标肽段进行自动分析,利用 NCBI 数据库和质谱软件联合分析,结合文献报道的多肽研究,确定有效的多肽序列。

1.3.9 体外抗氧化活性的测定

1.3.9.1 清除 DPPH 自由基能力测定方法

参考 Ma 等^[19]方法。样品在 3 000 r/min 离心处理 15 min 后,取 2 mL 上清液于玻璃管中,添加 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液,充分震荡,在黑暗条件下静置 30 min,在波长 517 nm 处测其吸光度,用无水乙醇进行调零,进行三次平行实验。按式(2)计算 DPPH 自由基抑制率。

$$X = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_c} \right] \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_c 为 2 mL 无水乙醇加 2 mL DPPH 溶液的吸光值; A_i 为 2 mL 样品加 2 mL DPPH 溶液的吸光值; A_j 为 2 mL 样品加 2 mL 无水乙醇的吸光值。

1.3.9.2 清除 ABTS 自由基测定方法

参考 Marino^[20]的方法并修改。取 4 mL ABTS 溶液,加入 40 μL 苦荞多肽上清液,混匀 30 s,避光处理 30 min,在波长为 734 nm 处进行测定,重复三次平行。按式(3)计算抑制率公式。

$$X = \left[1 - \frac{(A_i - A_j)}{A_c} \right] \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_c 为 40 μL 磷酸盐缓冲液加 4.0 mL ABTS 溶液的吸光值; A_i 为 40 μL 苦荞多肽加 4.0

mL ABTS 溶液的吸光值; A_j 为 40 μ L 苦荞多肽加 4.0 mL 磷酸盐缓冲液的吸光值。

1.3.9.3 超氧化物歧化酶(SOD)酶活性的测定

参照南京建成生物公司 SOD 试剂盒说明书测定苦荞多肽液中 SOD 活性。

2 结果与分析

2.1 大孔树脂分离纯化苦荞多肽

苦荞多肽粗提液经过 S-8 型大孔吸附树脂纯化后,在上样浓度为 5 mg/mL,洗脱流速为 1.5 mL/min,乙醇浓度为 55% 条件下,苦荞多肽的纯度由粗提液的 22.18% 提高到了 70%。

2.2 葡聚糖凝胶分离纯化苦荞多肽

凝胶可以根据截留分子量的大小不同从而实现分离,葡聚糖凝胶由于分离条件温和,对样品活性影响较小并且可再生广泛应用于活性物质的分离,尤其是蛋白和多肽^[21,22]。由图 1 可知,将经过大孔吸附树脂富集、纯化处理的苦荞多肽液继续使用 Sephadex G-15 进行分离纯化,获得连续的五个峰,共分离出 5 个分子质量大小不同的组分,分子质量小在凝胶柱中保留时间长,分子质量较大,在凝胶柱中保

留时间短,五个组分均在 80 min 内洗脱出来,说明五个组分分子量差别不大。由于微生物发酵使苦荞蛋白分解成为分子量大小不等的多肽化合物,还有可能存在少数苦荞蛋白未被水解现象,故多肽分子量是连续的。

经葡聚糖凝胶分离得到的 T-1、T-2、T-3、T-4、T-5 各组分冻干进行 SOD 酶活、DPPH 以及 ABTS 等自由基清除实验,测定抗氧化能力。由图 2 可知,在几种抗氧化能力测定的实验中,5 个组分表现出不同的抗氧化能力。结果发现 T-2 部分的 SOD 酶活明显高于其他 4 个组分($P < 0.05$);DPPH 自由基清除实验中,各组分存在一定的差异($P < 0.05$),清除能力依次为 T-5 > T-4 > T-3 > T-2 > T-1;ABTS 清除实验中,T-3、T-4、T-5 均有较高的清除能力,抗氧化能力较强。T-3 组分在 ABTS 和 DPPH 自由基清除实验中都表现出较强的抑制作用,且 SOD 酶活力大于 T-4、T-5 两组分,因 T-4、T-5 组分纯化获得数量极少,综合考虑,选取 T-3 组分进行之后的纯化及物质鉴定。

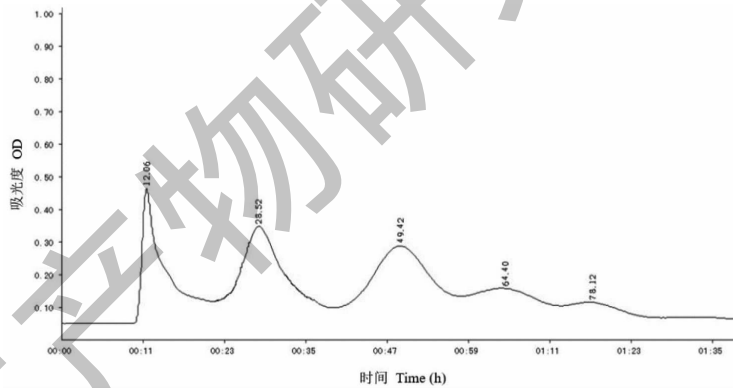


图 1 苦荞多肽紫外吸收图

Fig. 1 UV absorption of tartary buckwheat peptide

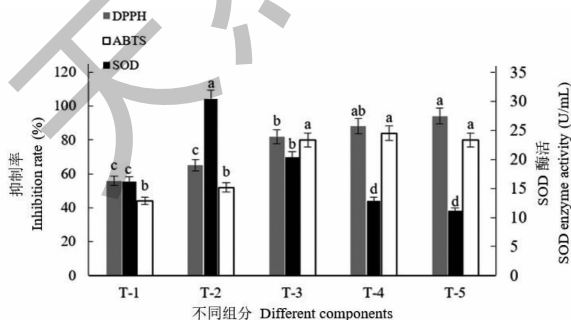


图 2 不同组分抗氧化活性比较

Fig. 2 Comparison of antioxidant activity of different components

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

2.3 液相色谱分离纯化苦荞多肽

由图 3 可知,通过液相色谱分离得到的 T-3 组分紫外吸收图中,出现了一个响应值较高的物质峰,同时还伴随着一些小杂峰,将响应值较高的组分命名为 T-3-1,收集浓缩后进行物质结构鉴定。

2.4 质谱鉴定结果

对通过液相色谱分离得到的 T-3-1 组分进行物质鉴定,结果如图 4 所示,从苦荞多肽发酵液 T-3-1 组分中共鉴定出蛋白 249 种,多肽 2 324 条,Chen 等^[23]用乳酸菌发酵制备牛乳饮料中检测到蛋白数量 110 种,多肽 1 601 条。由图 5 可知,鉴定到的多

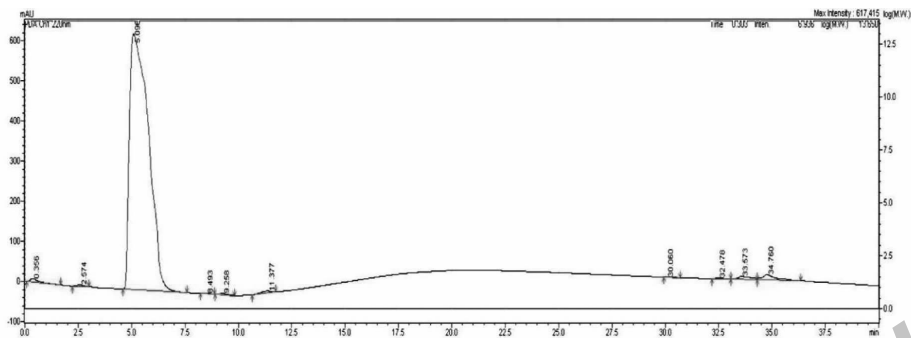


图 3 T-3 液相色谱图

Fig. 3 Liquid chromatogram of T-3

肽长度大多由 10 ~ 15 个氨基酸组成,属于生物活性肽的长度范围内。

大多数植物动物蛋白中分离得到抗氧化活性肽,并且多肽序列以 PYY、RWY、WY、RW、PWY、VYPF 等结尾或开头的,一般都具有抗氧化活性^[24]。通过对液相色谱分离得到组分 T-3-1 进行质谱鉴定,从图 6 结果中筛选得到氨基酸序列为酪氨酸-亮氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸 (Tyr-Leu-Pro-Phe, YLPF) 和

苯丙氨酸-脯氨酸-酪氨酸 (Phe-Pro-Tyr, FPY), 由此可以得出以苯丙氨酸和酪氨酸结尾的小段氨基酸序列抗氧化活性较显著,这与 Xie^[25] 研究得到的结论一致。

2.5 不同纯度苦荞多肽抗氧化活性测定

抗氧化基团的暴露决定了抗氧化活性的大小^[26,27],由图 7 可得,不同纯度苦荞多肽表现出不同的抗氧化活性,其中,苦荞多肽粗提液中可以检测

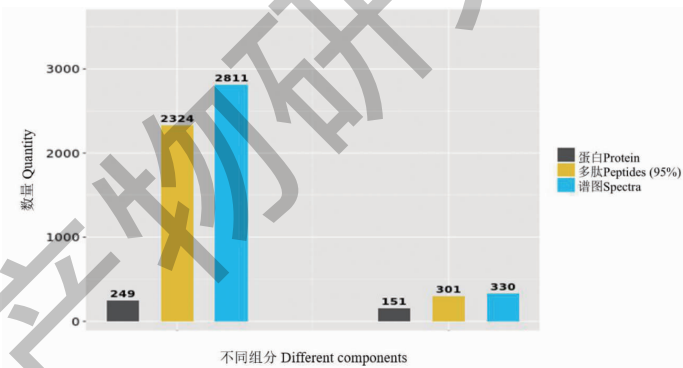


图 4 T-3-1 的鉴定信息

Fig. 4 Identification of T-3-1

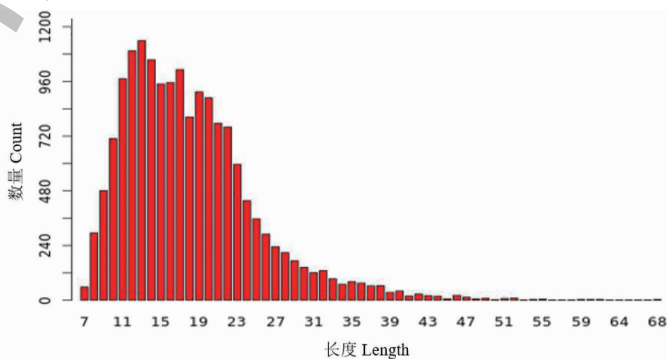


图 5 多肽长度统计图

Fig. 5 Peptide length chart

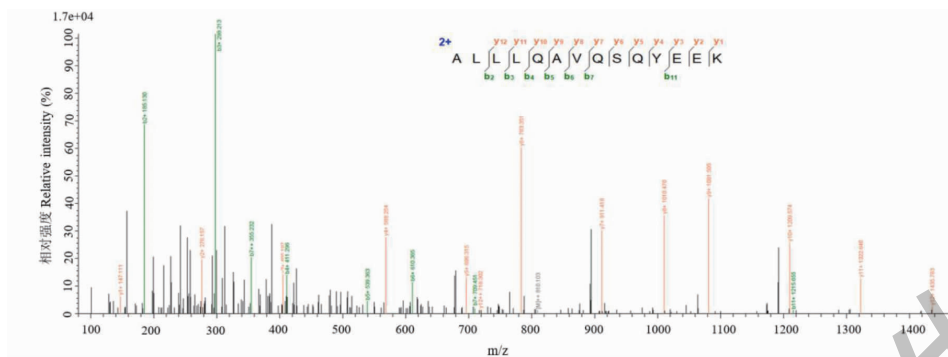


图6 二级质谱图

Fig. 6 Secondary MS spectrum

到少量的苦荞多肽,可能是在酶提法提取苦荞蛋白的过程中产生,由于苦荞蛋白和多肽的共同存在,表现出一定的抗氧化作用;相对于苦荞多肽粗提液和发酵液,经大孔吸附树脂纯化后的苦荞多肽液对DPPH和ABTS抑制率显著提高,分别为95%和82%;而经过葡聚糖凝胶分离纯化后的多肽组分T-3的DPPH抑制率稍有提高但幅度不大,达到了96%,其中ABTS抑制率升高到94%。

有趣的是,通过液相色谱进一步分离纯化后得到的组分T-3-1多肽纯度虽然达到了98%,但是对DPPH和ABTS抑制率不再增强,反而稍有下降,抑制率分别为89%和90%,这可能是由于苦荞蛋白自身具有抗氧化活性,当苦荞蛋白与多肽混合物聚集在一起,表现出比更高纯度苦荞的多肽更强的抗氧化作用。

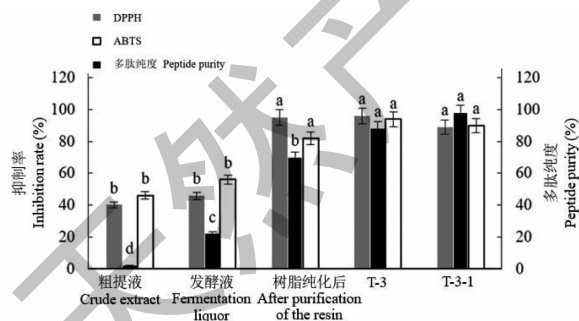


图7 苦荞多肽纯度及抗氧化活性大小

Fig. 7 Purity and antioxidant of peptide at separation positions

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

3 结论

经过Sephadex G-15葡聚糖凝胶分离纯化,T-3组分的ABTS和DPPH自由基清除能力最优,清除率分别为96%、94%。经大孔吸附树脂纯化后的苦

荞多肽对DPPH和ABTS抑制作用较强,与凝胶分离纯化得到的T-3组分相近,均表现出显著的抗氧化活性。

对通过液相色谱分离得到的T-3-1组分进行物质鉴定,从T-3-1组分中共鉴定出蛋白249种,多肽2324条,鉴定到的多肽长度大多由10~15个氨基酸组成,属于生物活性肽的长度范围内。由T-3-1组分质谱鉴定结果分析得到,主要抗氧化肽的氨基酸序列为苯丙氨酸-脯氨酸-酪氨酸(Phe-Pro-Tyr, FPY)和酪氨酸-亮氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸(Tyr-Leu-Pro-Phe, YLPF)。

纯度不同的苦荞多肽抗氧化能力也不同,通过液相色谱进一步分离纯化T-3组分后得到的组分T-3-1,苦荞多肽纯度虽然达到了98%,但是对DPPH和ABTS抑制率不再增强,反而稍有下降,抑制率分别为89%和90%。说明发酵法制备得到的苦荞多肽可能抗氧化活性并没有完全与多肽纯度呈正相关,当纯度提高到一定程度后,多肽抗氧化活性反而下降。

参考文献

- Shen LZ, Sheng YH, Lu QF, et al. Progress in functional research and food development of tartary buckwheat [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2021, 42: 192-199.
- Liu BT, Wang Y, Zhao CJ, et al. Effects of total flavonoids of tartary buckwheat on the expression of APP and GSK-3 β of hippocampus in T2 diabetes mellitus rats [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 15-19.
- Zhang CN, Zhang R, Li YM, et al. Cholesterol-lowering activity of tartary buckwheat protein [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65: 1900-1906.
- Guo XN, Zhu KX, Zhang H, et al. Purification and character-

- ization of the antitumor protein from Chinese tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) water-soluble extracts. [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55:6958-6961.
- 5 Zhou XL, Yan BB, Xiao Y, et al. Tartary buckwheat protein prevented dyslipidemia in high-fat diet-fed mice associated with gut microbiota changes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 119:296-301.
 - 6 Zhou YM, Jiang Y, Shi RH, et al. Structural and antioxidant analysis of tartary buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaertn.) 13S globulin. [J]. *J Sci Food Agric*, 2020, 100:1220-1229.
 - 7 Li N, Shi AM, Liu HZ, et al. Research progress of bioactive peptides anticancer function and its mechanism of action [J]. *J Chin Inst(中国食品学报)*, 2019, 19:261-269.
 - 8 Yang YM, Xu JP, Liu WY, et al. Research progress of plant polypeptide separation technology and function [J]. *Food Sci Technol(食品科技)*, 2021, 46:194-200.
 - 9 Yang M, Wu ZM, Li JJ, et al. Advances in biological activity and application of fish skin collagen-derived oligopeptides [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2018, 39:304-310.
 - 10 Fang JM, Liu SQ, Zhuang CZ, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for preparation of functional oligopeptide from silkworm pupa protein [J]. *Mod Food Sci Technol. (现代食品科技)*, 2012, 28:323-328.
 - 11 Zhang XD, Dai ZY. Progress in bioactive properties and applications of fish by-product protein hydrolysates [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2021, 42:335-343.
 - 12 Wang X, Huang ZM, Wang L, et al. Study on antioxidant activity and composition of tartary buckwheat protein simulated digestion products [J]. *J Chin Inst(中国食品学报)*, 2009, 9:10-15.
 - 13 Lu HC, Wu P, Chen DX, et al. Research on hydrolysis of double-enzyme complex process of defatted honeybee pupae protein [J]. *Food Ind(食品工业)*, 2015, 36:24-28.
 - 14 Ma Y, Xiong YL, Zhai J, et al. Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from *in vitro* digests of buckwheat protein [J]. *Food Chem*, 2010, 118:582-588.
 - 15 Luo XY, Fei Y, Xu QZ, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from tartary buckwheat albumin (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) and their antioxidant activities [J]. *J Food Sci*, 2020, 85:611-617.
 - 16 Tao T, Pan D, Zheng YY, et al. Optimization of hydrolyzed crude extract from tartary buckwheat protein and analysis of its hypoglycemic activity *in vitro* [M]//IOP. IOP Conference Series-Earth and Environmental Science. England: IOP Publishing Ltd, 2019, 295:032065.
 - 17 Tang TY, Chen X, Song FX, et al. Screening of strains producing peptides from tartary buckwheat by solid-state fermentation [J]. *Microbiol China(微生物学通报)*, 2017, 44:655-663.
 - 18 Liu Y, Zhang ZX. Comparison of methods for determination of polypeptide content [J]. *Inner Mongolia Petrochem Ind(内蒙古石油化工)*, 2008:65.
 - 19 Ma TJ, Ren GX. Study on antioxidant activity of golden rice [J]. *J Chin Inst(中国食品学报)*, 2011, 11:96-101.
 - 20 Marino BA, Antonio C, Manuel A. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity [J]. *Food Chem*, 2001, 73:239-244.
 - 21 Ji N, Sun CX, Zhao YX, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer [J]. *Food Chem*, 2014, 161:148-154.
 - 22 Ali M, Leticia M, Maria CA, et al. Peptidomic analysis of antioxidant and ACE-inhibitory peptides obtained from tomato waste proteins fermented using *Bacillus subtilis* [J]. *Food Chem*, 2018, 250:180-187.
 - 23 Chen S. Study on activity and sequence structure of antioxidant peptides in lactobacillus fermented milk [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology (天津科技大学), 2018.
 - 24 Montoya RA, Mejía EG, Dia VP, et al. Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF- κ B signaling [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58:1028-1041.
 - 25 Xie LP. Screening, separation and purification, structure identification of peptides with antioxidant and anti-aging effects [D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2019.
 - 26 Ketnawa S, Wickramathilaka M, Liceaga AM. Changes on antioxidant activity of microwave treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: purification and identification [J]. *Food Chem*, 2018, 254:36-46.
 - 27 Setti K, Kachouri F, Hamdi M. Improvement of the antioxidant activity of fenugreek protein isolates by *Lactococcus lactis* fermentation [J]. *Int J Pept Res Ther*, 2018, 24:499-509.