

苦荞凝集素的稳定性及体外消化性

李晨¹, 宁丽娜¹, 崔晓东², 李娇¹, 王转花^{1,2,*}

(1.山西大学生命科学学院,山西太原 030006;

2.山西大学生物技术研究所,化学生物学与分子工程教育部重点实验室,山西太原 030006)

摘要:目的:从苦荞种子中分离得到一种凝集素(tartary buckwheat lectin, TBL),研究其酸碱、热稳定性及体外消化性。方法:采用酸性缓冲液浸提脱脂荞麦粉及阴离子交换层析纯化凝集素, TBL 分别经沸水浴加热不同时间、不同 pH 处理、模仿胃液、模仿胰液消化后,采用 SDS-PAGE 及灰度扫描分析,研究其稳定性及体外消化性。结果表明:选用 pH4.7 浸提缓冲液可简化提取工艺,采用一步层析可得到电泳纯 TBL。沸水浴加热 60 min 时, TBL 仍可保留 50% 以上。在 pH4~12 条件处理 30 min 后, TBL 的保留率均在 80% 以上。体外消化实验表明, TBL 对人工模拟胃液有一定抗性,降解一半 TBL 所需时间为 10 min,而 TBL 在人工模拟肠液中很难消化,即使作用时间为 50 min 时, TBL 也未发生明显降解。将 TBL 沸水浴加热 30 min 后再进行体外消化实验,发现在模拟肠液及模拟胃液中,仅处理 10 min 时, SDS-PAGE 结果中 TBL 蛋白条带完全消失,表明被 TBL 被消化酶完全降解。结论:天然 TBL 具有良好的稳定性,耐热、耐酸碱、耐胰蛋白酶消化,在胃蛋白酶液中降解也较为缓慢。预加热处理可明显提高 TBL 在模拟胃液及模拟肠液中的消化率。

关键词:苦荞,凝集素,消化性,稳定性

The Stability and *in Vitro* Digestibility of Lectin from Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*)

LI Chen¹, NING Li-na¹, CUI Xiao-dong², LI Jiao¹, WANG Zhuan-hua^{1,2,*}

(1.School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2.Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Purpose: To purify lectin from tartary buckwheat (TBL) seeds and investigate the stability and digestibility of TBL *in vitro*. Methods: Acid buffer was used to extract TBL from the defatted buckwheat flour and anion exchange chromatography was applied to purify TBL. The effects of heat treatment, pH, the digestibility of TBL in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) were studied, using kinetic densitometric analysis for SDS-PAGE. Results: Extraction with acid buffer simplified the purification protocol, as TBL was separated to electrophoretic purity by only one step of chromatography. After heated in boil water for 60 min, more than half of TBL still remained. Furthermore, no obvious degradation was observed after TBL was placed in different buffers ranging from pH4 to 12 for 30 min. It was found that TBL was reasonably stable in SGF with a half-time of digestion of 10 min. In SIF it was extremely stable. Even after 50 min of digestion there was no discernible degradation. But the susceptibility of TBL to hydrolysis by proteases was markedly increased by preheating. The preheated protein was totally degraded in both SGF and SIF after being digested for only 10 min and the protein band disappeared by SDS-PAGE. Conclusion: TBL was stable when exposed to heat and over a wide pH range. Moreover, no trypsin digestion was observed and hydrolysis upon exposure to pepsin was limited. However, preheating could obviously increase the digestibility of BTI in SGF and SIF.

Key words: tartary buckwheat; lectin; digestibility; stability

中图分类号: TS210

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)24-0057-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.24.010

引文格式: 李晨, 宁丽娜, 崔晓东, 等. 苦荞凝集素的稳定性及体外消化性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 57-61.

凝集素是一类能与红细胞表面特异糖基进行可逆结合并促使细胞凝集的蛋白质, 在自然界广泛分

布^[1]。1975年 Becker 等^[2]首次解析了刀豆凝集素(Concanavalin A, Con A)分子的三级结构, 掀起了凝

收稿日期: 2018-03-27

作者简介: 李晨(1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质化学与工程, E-mail: lichen@sxu.edu.cn.

* 通讯作者: 王转花(1956-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质工程与生物活性物质, E-mail: zhwang@sxu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31600631); 山西省自然科学基金项目(2015021047); 山西省高校科技创新项目(2016116)。

集素研究的热潮。人们对凝集素的结构、分类、糖结合特性、生物活性等进行了深入研究^[3],发现凝集素在信号识别、胚胎发育、免疫应答、植物防御等多方面均有重要作用^[4]。由于其特异性结合能力,凝集素已广泛应用于分离纯化、结构分析及免疫细胞化学技术,是研究细胞膜结构的有利工具,有望开发为二代生物粘附药物传输系统^[5]。同时,凝集素具有抗真菌、抑制 HIV-1 逆转录酶、诱导肿瘤细胞凋亡等多种能力,在全胃肠外营养期可以用于预防胃肠粘膜萎缩,还可用于开发新型减肥药物^[6]。因此,凝集素在生物、医学及农业等多个领域应用前景广阔^[7]。然而,1988 年首次发现的蓖麻凝集素具有极强的细胞毒性,大豆凝集素是大豆主要的抗营养因子,凝集素的安全性也一直是人们关注的焦点问题^[8]。

苦荞为蓼科杂粮作物,药食同源,有“五谷之王”的美称,含有丰富的矿物质、类黄酮、抗菌肽等生物活性物质,已开发出一系列相关保健品和辅助药物^[9-10]。本课题组从苦荞中分离纯化得到一种凝集素(tartary buckwheat lectin, TBL),对其理化性质进行了初步研究^[11]。TBL 是一种糖结合蛋白,分子质量约为 62 kDa,特异性凝集人的 O 型血红细胞,凝血活性可被 D-甘露糖和 D-葡萄糖抑制,具有磷酸酯酶活性和类似核糖体失活蛋白的功能。然而,作为一种抗营养因子,TBL 的稳定性、消化特性等与食品安全关系密切,目前尚未有对 TBL 稳定性和消化性的报道。体外消化模型成本低、周期短、重复性好,是代替体内研究食品蛋白消化的一种重要手段。

本实验采用人工胃液和肠液模拟消化模型,联合十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析消化后 TBL 蛋白条带的变化,研究 TBL 的消化特性,并进一步探索 TBL 的 pH 稳定性和热稳定性,以及热处理对 TBL 消化性的影响,将为深入研究凝集素的开发应用奠定一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦荞种子 云荞一号,由云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所馈赠;胃蛋白酶、胰蛋白酶 美国 Sigma 公司;其他试剂 均为国产分析纯;实验用水 为去离子水。

BioLogic LP 低压层析系统 美国 Bio-Rad 公司;5804R 高速冷冻离心机 德国艾本德公司;FE28-Standard 精密 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;AR124CN 精密电子天平 奥豪斯仪器(上海)有限公司;TU-1810 紫外可见分光光度计 北京普析通用公司;DYCZ-24D 垂直板电泳槽和电泳仪 北京六一生物科技有限公司;HH SY21-Ni 恒温水浴锅 北京市长风仪器仪表公司;HP-02 无油真空泵 天津市恒奥科技发展有限公司;DEAE FF 离子交换层析柱(1 mL) 美国 Bio-Rad 公司;透析袋(10 kDa) 生工生物工程(上海)股份有限公司;超滤浓缩管(30 kDa) 美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 苦荞凝集素的制备 参考申剑等^[11]方法,略作改动。称取 150 g 苦荞麦种子,粉碎,用 40 目筛筛选粉末,加入 500 mL 乙醚搅拌脱脂 1 h,抽滤得到脱脂粉。称取 100 g 粉末于烧杯中,加入 1.5 L 浸提缓冲液(0.02 mol/L 乙酸钠-乙酸缓冲液, pH4.7), 4 °C 搅拌提取 8 h,于 4 °C, 11 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。往上清液中边搅拌边加入硫酸铵,使其饱和度达到 80%,使用磁力搅拌器继续搅拌 8 h, 11000 r/min 离心 30 min 收集沉淀。用少量平衡缓冲液(0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 PBS, pH7.0)溶解沉淀,并以相同缓冲液作为外液,使用截留分子量为 10 kDa 的透析袋于 4 °C 进行透析,每隔 30 min 更换外液,并用 BaCl₂ 检测透析外液,至无法检测到硫酸钡沉淀,透析结束,得到蛋白粗品。继续使用阴离子交换层析柱 DEAE FF 在蛋白纯化系统上进行纯化,即得到苦荞凝集素。平衡缓冲液中加入 0.5 mol/L NaCl 为洗脱缓冲液,流速为 2 mL/min,收集洗脱峰并进行 SDS-PAGE 及凝血实验鉴定。将纯化的目的蛋白用超滤浓缩管(30 kDa)浓缩后,分装于 2 mL 离心管中,于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 苦荞凝集素热稳定性研究 向 1.5 mL 离心管中分别加入 20 μL 1 mg/mL 苦荞凝集素(溶剂为 20 mmol/L PBS, pH7.0),于沸水浴中分别加热 0、10、20、30、40、50、60 min 后,迅速置于冰浴中冷却,加入 SDS-PAGE 样品缓冲液(pH6.8 0.25 mol/L Tris-HCl、10% SDS、0.5% 溴酚蓝、50% 甘油、5% β-巯基乙醇),继续用沸水浴加热 5 min,使蛋白充分变性,与 SDS 结合,进一步进行 SDS-PAGE 分析,并按照以下公式计算保留率。

$$\text{保留率}(\%) = \frac{A_{\#}}{A_0} \times 100$$

其中, A_# 为不同加热处理时间后样品的灰度值, A₀ 为 TBL 的灰度值。

1.2.3 苦荞凝集素 pH 稳定性研究 将苦荞凝集素分别于 37 °C, pH 为 2、4、6、8、10、12 的缓冲液中处理 30 min 后,加入 SDS-PAGE 样品缓冲液,立即沸水浴中加热 5 min,进行 SDS-PAGE 分析,以灰度值最大组的灰度值为 100%,按照上式计算保留率。

1.2.4 苦荞凝集素体外消化实验 人工模拟胃液(simulated gastric fluid, SGF)根据美国药典配制,成分为胃蛋白酶(3.2 mg/mL, 1000 U/mg)和 NaCl(2.0 mg/mL)的水溶液,用盐酸调至 pH1.2^[13]。实验主要按照 Thomas 等^[14]的方法进行,并做了适当修改。在 1.5 mL 离心管中加入 15 μL SGF,于 37 °C 预热 10 min,分别加入 10 μL 1 mg/mL 的苦荞凝集素,混匀,开始模拟消化,反应不同时间(0、10、20、30、40 min)后,加入 5 μL 终止液(20 mmol/L Na₂CO₃ 水溶液, pH11.0)终止反应。对照组的加样顺序为先向 SGF 中加入终止液,再加入 10 μL 苦荞凝集素,以保证消化反应不会进行。向各管样品中分别加入 5 μL 6 × SDS-PAGE 样品缓冲液,在沸水浴加热 5 min,进行 SDS-PAGE 分析。实验分为两组,即未经加热的苦荞凝集素组和预加热组,预加热组中样品为沸水

浴加热处理 30 min 后的 TBL。

人工模拟肠液 (simulated intestinal fluid, SIF) 为 10 mg/mL 胰蛋白酶溶液 (pH6.8 ± 0.1, 含 6.8 mg/mL KH_2PO_4)。分别将 10 μL 凝集素样品 (1 mg/mL) 加入到 15 μL 37 $^\circ\text{C}$ 预热的模拟肠液中, 反应不同时间 (0、10、20、30、40、50 min) 后, 立即煮沸 5 min 终止反应。对照组 (即反应 0 min) 的处理是先向 15 μL 胰蛋白酶中加入样品缓冲液, 煮沸 3 min 后再加入 10 μL 苦荞凝集素。终止反应后分别加入 5 μL 样品缓冲液, 沸水浴加热 5 min 后进行 SDS-PAGE 分析。同样, 本实验中的样品分为未经过加热的 TBL 组和预加热组, 预加热组中样品为沸水浴加热处理 30 min 后的 TBL。

1.2.5 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE 参考 Laemmli 等的方法^[12], 采用 12% 分离胶和 4% 浓缩胶, 考马斯亮蓝 R250 染色脱色后拍照, 进行分析。

1.3 数据处理

所有实验进行 3 次重复, 绘图用 Origin 8.6 进行, 灰度分析用 Image J 进行。

2 结果与分析

2.1 苦荞凝集素的纯化及鉴定

苦荞粉过脱脂、浸提、硫酸铵沉淀、透析脱盐后, 得到蛋白质粗提物, 上样于 DEAE FF 阴离子交换层析柱, 结果如图 1 所示。在洗脱时间 5~15 min 时出现穿透峰 1。充分洗去未结合蛋白后, 提高盐离子浓度, 换用含 0.5 mol/L NaCl 的缓冲液进行洗脱, 在 33~40 min 出现蛋白峰, 收集洗脱峰 2。对峰 2 组分进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 2A。泳道 1 为苦荞粗品蛋白, 条带相对较少, 说明苦荞粉经过浸提后, 便有效去除了较多的杂蛋白, 有利于后续纯化。本研究在前期工作的基础上, 利用苦荞凝集素较好的稳定性, 对提取工艺进行了优化, 采用偏酸性缓冲液进行浸提, 简化了纯化方法。泳道 2 为纯化后的蛋白样品, 电泳结果显示为一条带, 蛋白表观纯度达到了 95% 以上, 根据相对迁移率和分子质量对数的回归方程, 计算出蛋白的相对分子质量为 62 kDa, 与预期结果一致, 并经凝血实验证明, 纯化的蛋白即为苦荞凝集素^[11]。

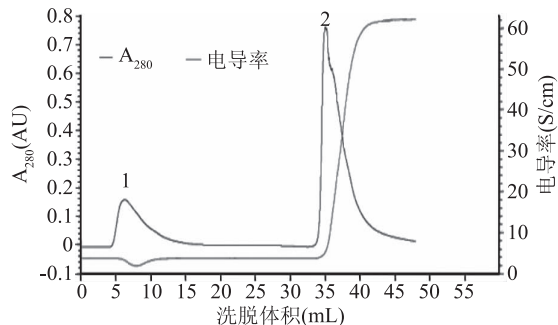


图1 苦荞凝集素的离子交换层析图谱

Fig.1 Ion exchange chromatography of TBL

2.2 热处理对苦荞凝集素的影响

将苦荞凝集素在沸水浴中分别加热 0、10、20、30、40、50、60 min 后进行 SDS-PAGE, 结果见图 3。加热不同时间后, TBL 的条带仍清晰可见, 但相比未

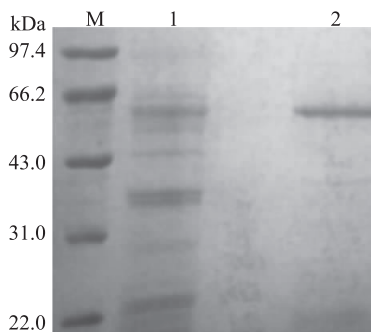


图2 苦荞凝集素的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis result of TBL

注: 1 为苦荞粗品蛋白; 2 为纯化后蛋白。

加热组 (泳道 1), 加热后的蛋白条带亮度有所降低, 尤其加热 50、60 min (泳道 6、泳道 7) 后, 目的条带的变化肉眼可见。灰度扫描分析结果表明, TBL 的降解与加热时间呈线性关系, 随着加热时间延长, 降解程度升高。日常生活中, 对食物的蒸煮时间为 60 min 左右。在本研究中, 当加热时间达 60 min 时, 仍有 50% 以上 TBL 未发生降解。由此可见 TBL 对热不敏感, 较为稳定, 常规的食品热加工手段并不能完全消除 TBL。

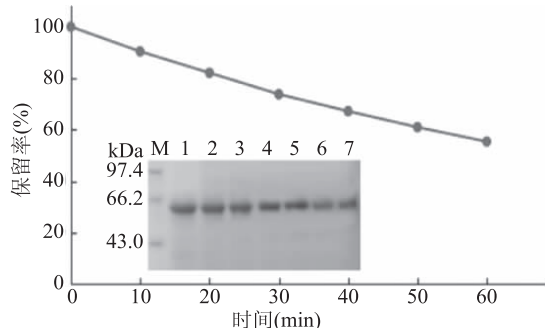


图3 热处理对苦荞凝集素保留率的影响

Fig.3 Effect of heat treatment on retention rate of TBL

注: 1~7: TBL 沸水浴中分别加热 0、10、20、30、40、50、60 min。

2.3 pH 对苦荞凝集素的影响

将苦荞凝集素在不同 pH 缓冲液中分别处理 30 min 后进行 SDS-PAGE, 结果见图 4。不同 pH 处理后, TBL 电泳结果仍为一条带, 条带的位置相同。在 pH8.0 时, TBL 有最大保留率, 当酸度为 pH4.0 时, TBL 的保留率仍在 80% 左右。TBL 在 pH4~12 环境条件均有很高的保留率, 表明该蛋白具有很好的酸碱稳定性。同时, 也进一步验证了在优化提取工艺时选择 pH4.7 浸提缓冲液是可取的。

2.4 体外模拟消化实验

苦荞凝集素分别经体外模拟人工胃液和肠液消化后进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 5 和图 6 所示。模拟胃液和肠液中, 胃蛋白酶和胰蛋白酶的泳带清晰可见 (图 5、图 6)。从 TBL 电泳条带可知, 模拟胃液对 TBL 的降解作用明显强于模拟肠液。对蛋白条带进行灰度分析, 并以模拟消化实验中反应 0 min 时 TBL 的灰度值为 100%, 计算苦荞凝集素的保留率。由图 5 可知, 随着 SGF 处理时间延长, TBL

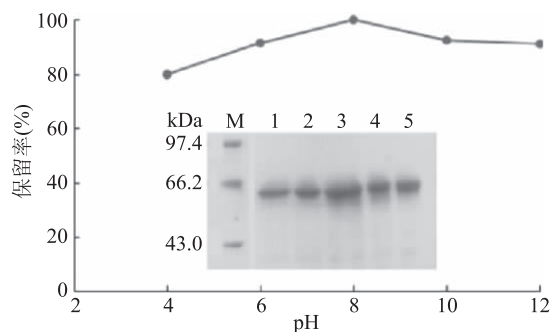


图4 pH对苦荞凝集素保留率的影响

Fig.4 Effect of pH on retention rate of TBL

注:1~5:TBL分别在pH4、6、8、10、12处理30 min。

保留率迅速降低,40 min时基本消化完全,降解一半TBL所需时间仅为10 min。由图6可知,TBL在SIF中很难消化,即使作用时间为50 min时,TBL也未发生明显变化(泳道8)。

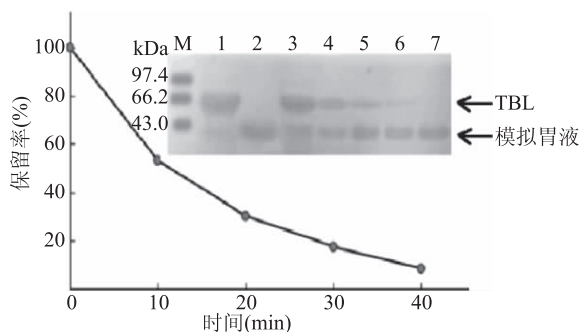


图5 苦荞凝集素的SGF消化

Fig.5 SGF digestion profiles of TBL

注:1:TBL;2:模拟胃液;3~7:TBL在SGF中分别消化0、10、20、30、40 min。

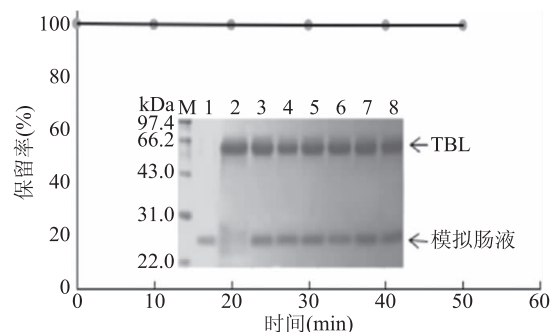


图6 苦荞凝集素的SIF消化

Fig.6 SIF digestion profiles of TBL

注:1:模拟肠液;2:TBL;3~9:TBL在SIF中分别消化0、10、20、30、40、50 min。

为探索加热过程对蛋白消化性的影响,将苦荞凝集素加热处理后,进行体外模拟消化实验,SDS-PAGE结果如图7和图8所示。由图7可知,加热后的TBL在SGF中仅处理10 min后,电泳条带基本完全消失,蛋白被消化完全。即使在SIF中的消化也非常迅速,仅处理10 min,加热后的TBL被SIF完全降解,没有任何可见的残留蛋白条带(图8)。因此,预加热过程可以明显增强消化酶对TBL的降解。这一结果与黑龟豆^[13]、肾小豆^[15]中凝集素的消化性类似。

许多豆类蔬菜不能生吃,很重要的一个原因是其含有大量凝集素,直接食用不易消化。经过100℃煮沸后,蛋白对消化酶的敏感性明显增强,易被降解消化。因此,加热是消除抗营养因子及过敏原的一个重要控制手段。可能是由于天然凝集素形成特定的空间结构,将消化酶的识别位点折叠包围于分子内部,不易被消化酶识别并作用。加热后,虽然蛋白一级结构未发生改变,没有降解,但空间结构发生较大变化,如由紧密变得更为松散,易被胃蛋白酶或胰蛋白酶识别、结合、分解。

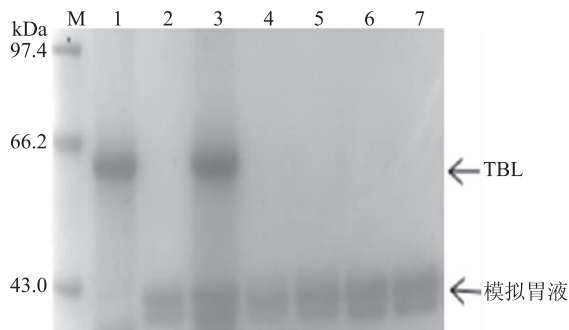


图7 热处理后苦荞凝集素的SGF消化结果

Fig.7 SGF digestion profiles of the heated TBL

注:1:TBL;2:模拟胃液;3~7:加热后TBL在SGF中分别消化0、10、20、30、40 min。

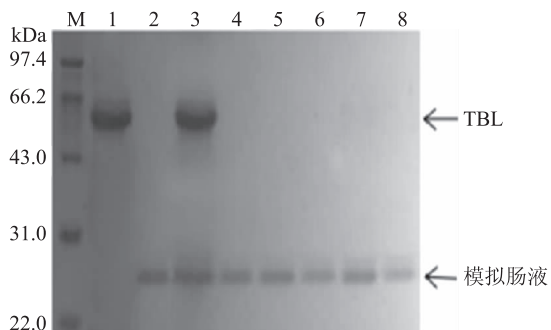


图8 热处理后苦荞凝集素的SIF消化结果

Fig.8 SIF digestion profiles of the heated TBL

注:1:TBL;2:模拟肠液;3~8:加热后TBL在SIF中分别消化0、10、20、30、40、50 min。

3 讨论与结论

本实验对苦荞凝集素的稳定性及体外消化性进行了初步研究。TBL对热不敏感,沸水浴中加热60 min时,蛋白仍可保留一半以上。同时TBL还具有很好的酸碱稳定性,在pH4~12环境条件下处理30 min时仍具有较高的保留率。天然TBL对人工胃液的消化有一定耐受性,在人工肠液中表现出更强的稳定性,即使消化时间为50 min时,TBL也未发生降解。以上结果显示TBL具有很好的稳定性。然而,加热处理促使TBL空间结构发生改变,使其对胃蛋白酶及胰蛋白酶的敏感性明显增强。

作为一种抗营养因子,TBL的稳定性及消化特性与荞麦制品的安全性息息相关。从食品加工工艺角度出发可知,经过充分蒸煮加热处理后,有利于提高荞麦制品的食品安全性。另外,糖及其衍生物对凝集素活力有抑制作用,如核桃凝集素的凝集活性

可被 N-乙酰-D-葡萄糖胺和 N-乙酰-D-半乳糖胺抑制^[16], D-甘露糖和 D-葡萄糖可抑制 TBL 的凝集活性。此外,由于金属离子对凝集素的结构及结合糖的活性均有影响,失去金属离子后凝集素稳定性降低。如 Con A 脱去金属离子后,通过主链 Ala-Asp 肽键的顺反异构,其空间结构由“锁定”状态转变为“打开”状态,使得 Con A 对胰蛋白酶的敏感性显著增强^[17]。同样,使用金属螯合剂可提高木瓜蛋白酶对加纳纳 II 型凝集素的消化性^[18]。因此,除了常规的酸碱及热处理加工手段,是否可通过配合使用某些糖类或金属螯合剂抑制凝集素活性以提高食品安全性,还有待进一步探索。

由于对胃肠道的消化具有一定抵抗作用,植物凝集素有望发展为二代生物粘附药物传输系统,减少非特异性蛋白损失。课题组之前的研究发现,TBL 识别 HCT116 细胞表面的 galectin-3 受体,通过内吞作用进入细胞,调控 miR-135a&b 的表达并影响 Wnt 信号通路,可以显著抑制结肠癌细胞的增殖^[19]。TBL 具有良好的稳定性及耐消化性,具备开发成抗肿瘤药物的优势条件。

参考文献

[1] He S, Shi J, Walid E, et al. Reverse micellar extraction of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*): Optimisation of extraction conditions by response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2015, 166: 93-100.

[2] Becker J W, Reeke G N, Wang J L, et al. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides [J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(4): 1513-1524.

[3] Santos AFS, Silva M D C, Napoleao T H, et al. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications [J]. Current Topics in Peptide and Protein Research, 2014, 15: 41-62.

[4] Yan Q J, Zhu L F, Kumar N, et al. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with antiproliferative activity [J]. Food Chemistry, 2010, 122(3): 589-595.

[5] Kompella U B, Lee V H. Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: Design considerations [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 46(1): 211-245.

[6] Lajolo F M, Genovese M I. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(22): 6592-6598.

[7] Zhang J, Shi J, Ilic S, et al. Biological properties and characterization of lectin from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) [J]. Food Reviews International, 2008, 25(1): 12-27.

[8] Wickham M, Faulks R, Mills C. *In vitro* digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2009, 53(8): 952-958.

[9] 林汝法, 周小理, 仁贵兴, 等. 中国燕麦的生产与贸易、营养与食品 [J]. 食品科学, 2005, 26(1): 259-263.

[10] 闫斐艳, 崔晓东, 李玉英, 等. 苦荞麦黄酮对食管癌细胞 Ec9706 增殖的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1142-1145.

[11] 申剑, 崔晓东, 王转花. 苦荞凝集素的纯化及性质鉴定 [J]. 食品科学, 2015, 36(3): 308-312.

[12] Laemmli U K, Favre M. Gel electrophoresis of proteins [J]. Journal of Molecular Biology, 1973, 80: 575-599.

[13] He S D, Simpson B K, Ngadi M O, et al. *In vitro* studies of the digestibility of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*) [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 397-404.

[14] Thomas K, Aalbers M, Bannon, et al. A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2004, 39(2): 87-98.

[15] Tang C H, Chen L, Ma C Y. Thermal aggregation, amino acid composition and *in vitro* digestibility of vicilin-rich protein isolates from three *Phaseolus* legumes: A comparative study [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 957-963.

[16] 冀爱青, 韩红艳, 杨红雁, 等. 核桃凝集素的提取及其性质 [J]. 食品科学, 2014, 35(20): 22-25.

[17] Blumberg S, Tal N. Effect of divalent metal ions on the digestibility of concanavalin A by endopeptidases [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure, 1976, 453(2): 357-364.

[18] Zhu-Salzman K, Hammen P K, Salzman R A, et al. Calcium modulates protease resistance and carbohydrate binding of a plant defense legume lectin, *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 132(2): 327-334.

[19] 郭培钰, 崔晓东, 贾乔瑾, 等. 苦荞凝集素靶向抑制结肠癌细胞 HCT116 增殖的机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(1): 73-80.

(上接第 56 页)

[26] Porta H, Rocha-sosa M. Lipoxigenase in bacteria: A horizontal transfer event [J]. Microbiology, 2001, 147(12): 3199-3200.

[27] 付悦, 侯书群, 黄相中, 等. 抗氧化剂对单线态氧 (1O_2) 清除能力的一种生物评价方法 [J]. 云南民族大学学报, 2016, 25(2): 114-120.

[28] 李世科, 李春阳, 曾晓雄. 复合抗氧化剂对油茶籽油的氧化稳定性研究 [J]. 中国粮油学报, 2016, 31(2): 81-86.

[29] 李家洲. BHT 与 TBHQ 对煎炸油稳定效果的比较研究 [J]. 中国油脂, 2006, 31(6): 70-71.

[30] 周德权, 吴歆. 脂肪氧化程度测定方法评述 (II) [J]. 中国油脂, 1998, 23(4): 56-57.

[31] 钱奕, 卢立新. 膜包装菜籽油光照加速试验的氧化指标研究 [J]. 包装工程, 2012, 33(4): 13-16.

[32] 王璋, 许时婴, 江波, 等译. 食品化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 230.

[33] Taghvaei M, Jafari S M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(3): 1272-1282.