

## 荞麦源降血糖糖肽结构表征及酶抑制动力学

周柳莎, 郦萍, 顾双, 俞瑜媛, 胡香莲, 施永清\*

(浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018)

**摘要** 为实现荞麦蛋白资源高值化利用,从 6 个菌株中筛选出植物乳杆菌和嗜热链球菌作为发酵菌株,制备  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制糖肽( $\alpha$ -GIG)。采用单因素实验确定优化中心点,然后做响应面试验优化发酵工艺。通过 Sephadex G-25 和反向高效液相色谱法(RP-HPLC)对发酵液进行分离纯化,制备  $\alpha$ -GIG。采用  $\beta$ -消除反应方法确定  $\alpha$ -GIG 中糖肽键类型,红外光谱扫描法测定二级结构。采用 Lineweaver-Burk 作图法探究酶抑制动力学,确定  $\alpha$ -GIG 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用类型。结果表明:在料液比 1:14.8、pH 7.5、接种量 2%、发酵 2.8 d 条件下,发酵产物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率达 70.83%。发酵液经 Sephadex G-25 分离得到 I1, I2, I3 3 个组分,其中 I2 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用较强,  $IC_{50}$  达 1.72 mg/mL。经 RP-HPLC 进一步分离纯化 I2,得到  $\alpha$ -GIG,其纯度为 94.17%。红外光谱扫描确定  $\alpha$ -GIG 的二级结构为: $\beta$ -折叠占 70.51%, $\alpha$ -螺旋占 18.95%, $\beta$ -转角占 10.54%。 $\alpha$ -GIG 中糖肽键类型为 O-糖肽键。酶抑制动力学研究表明, $\alpha$ -GIG 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用类型为混合型非竞争性抑制。 $\alpha$ -GIG 具有开发为天然  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的潜力。

**关键词** 荞麦;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶; 响应面; 结构表征; 抑制动力学

**文章编号** 1009-7848(2024)03-0086-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.009

糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)是以血糖代谢失调为特征的代谢疾病,可能引起患者肾病、心血管疾病、视网膜病变和神经性疾病等一系列并发症<sup>[1]</sup>。I 型糖尿病(T1DM)和 II 型糖尿病(T2DM)是 DM 的两种类型,其中 T2DM 占据糖尿病发病人数中的绝大部分,占比高达 90%,其发病原因与胰岛素对抗和胰腺  $\beta$  细胞功能障碍有关<sup>[2]</sup>。在对 T2DM 的治疗中,主要采用控制餐后血糖和药物治疗的方式,其中,通过抑制碳水化合物消化酶来减少低聚糖和葡萄糖分子的产生是一个重要途径<sup>[3]</sup>。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶是一种膜结合酶,附着于小肠上皮细胞,它能催化葡萄糖从二糖中裂解,通过抑制该酶活性是降低血清葡萄糖水平的有效方法<sup>[4]</sup>。阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇是目前普遍应用的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,然而这些化学合成药物往往会对人体产生不利影响,尤其是对胃肠道功能产生副作用<sup>[5]</sup>。从饮食中提取天然安全抗糖尿病药物成为必然趋势。

荞麦是一种具有高度营养的谷类植物,是优质蛋白质、多糖、脂质、膳食纤维及矿物质的良好来源,也是酚类物质的优质供体<sup>[6]</sup>。同时荞麦能提

供丰富的赖氨酸,这一氨基酸被称为谷物中的第一限制性氨基酸<sup>[7]</sup>。荞麦具有很高的生物学价值,在生理功能上表现出降低胆固醇、降血压、抗糖尿病、抗氧化、抗癌等多种活性<sup>[8]</sup>。Pande 等<sup>[9]</sup>经大鼠实验证实荞麦可以缓解由双酚 A 介导的氧化应激反应。Koyama 等<sup>[10]</sup>研究发现发酵荞麦芽可以有效抑制血管紧张素转换酶(ACE),预防自发性高血压的发生。郭晓娜等<sup>[11]</sup>研究了荞麦蛋白对乳腺癌细胞增殖具有抑制作用。Lin 等<sup>[12]</sup>研究荞麦多糖对巨噬细胞具有抗炎作用。Oh 等<sup>[13]</sup>研究荞麦多糖具有免疫调节作用。然而,荞麦源糖肽作为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的研究尚未见报道。本试验以荞麦为研究对象,通过乳酸菌发酵作用水解荞麦蛋白,制备  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制糖肽,分析多肽二级结构和糖肽键,研究其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制动力学,为生产新型天然  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂提供理论参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

原料:荞麦:山西众恬农业科技有限公司。

菌种:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*),中国工业微生物保

收稿日期:2023-03-16

第一作者:周柳莎,女,硕士

通信作者:施永清 E-mail: shiyq@zjsu.edu

藏中心;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、根霉菌(*Rhizopus*)、毛霉菌(*Mucor*),安琪酵母股份有限公司。

试剂: $\alpha$ -葡萄糖苷酶、对硝基苯- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷(PNPG)、阿卡波糖、茛三酮,上海源叶生物科技有限公司;色谱级乙腈,西班牙萨劳有限公司;其它试剂均为分析纯。

## 1.2 设备与仪器

TGL-16gR 型台式高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;HD-5 型电脑紫外检测仪,上海青浦沪西仪器厂;UV-2600 型紫外分光光度计,日本岛津公司;Waters-2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;Nicolet 型傅里叶红外光谱仪,美国尼高力仪器公司;Spectramax iD3 型多功能酶标仪,美谷分子仪器有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 接菌菌株及生长条件 植物乳杆菌、嗜热链球菌、枯草芽孢杆菌分别接种于 MRS 培养基、MC 培养基和 NB 培养基,以 180 r/min 的转速于 37 °C 下摇床培养;酵母菌接种于 PDB 培养基,28 °C 摇床培养;霉菌划线于 PDA 培养基,28 °C 斜面静置培养,所有菌种均活化 2 次至对数生长期。

活化后的细菌和酵母菌 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清,菌体用无菌生理盐水反复冲洗 3 次,重悬于生理盐水,调整细菌菌量为  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL( $\lambda=600$  nm,OD=0.80)<sup>[14]</sup>,酵母菌和霉菌用血细胞计数板计数,分别调整细胞和孢子浓度为  $10^6$  个/mL。

1.3.2 粗  $\alpha$ -GIG 的制备 称取 10.0 g 荞麦,加入 150 mL 水,4 °C 浸泡过夜,打成匀浆后煮沸 30 min,冷却备用。分别将活化好的 6 个菌株按体积分数 3% 的接种量接种于荞麦浆中,起始 pH 值自然(pH=6.5),在各菌最适温度下发酵 3 d,发酵液测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率、水解度和多肽得率,筛选出两个优势菌。

两菌按菌液体积比 1:1,接种量按体积分数 3% 接入上述荞麦浆液中,37 °C 发酵 3 d,进行混菌验证。发酵液过滤后 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液减压浓缩,冷冻干燥 48 h,即得到粗  $\alpha$ -GIG。

## 1.3.3 测定方法

1.3.3.1 水解度测定 利用 TCA 结合茛三酮法<sup>[15-16]</sup>

测定发酵液中水解度,以 1 mg/mL 的酪氨酸为标准溶液绘制标曲。2 mL 稀释发酵液中加入 20 g/100 mL 的 TCA 溶液 0.5 mL,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.2 mL 加入 0.8 mL PBS(pH=8.0)后再加入 0.2 mL 1.5 g/100 mL 茛三酮溶液,沸水浴 15 min,冷却后加入 8.8 mL 水,570 nm 处测定吸光值,记发酵液中溶于 TCA 的游离-NH<sub>2</sub> 含量为  $A_1$ 。取 2 mL 荞麦浆,用 6 mol/L 的盐酸 90 °C 加热消化 24 h,取出冷却,过滤除去不溶物,浓缩至 2 mL,用 10 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值后定容至 25 mL,得到酸解液,根据上述方法测定酸解液中总-NH<sub>2</sub> 含量为  $A_0$ 。

$$\text{水解度(DH)} = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.3.2 多肽得率测定 根据参考文献的方法<sup>[17]</sup>并做适当修改,以 10 mg/mL 的 Gly-Gly-Try-Arg 为标准溶液绘制标曲。吸取 4 mL 发酵液加入 20 g/100 mL 的 TCA 溶液 0.5 mL,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 3 mL,等比例加水稀释后再加入 4 mL 双缩脲试剂,涡旋混匀,室温条件放置 20 min,540 nm 处测定吸光值。

$$\text{多肽得率(\%)} = \frac{\text{多肽质量浓度} \times \text{体积}}{\text{总样品质量}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.3.3  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率测定 采用 Karimi 等<sup>[18]</sup>的方法,并做适当修改。发酵液用 0.1 mol/L 的 PBS (pH=6.8) 稀释至原浓度的 1/20 为样品稀释液,取 100  $\mu$ L 样品稀释液加入浓度为 1 U/mL 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液 10  $\mu$ L,37 °C 预热 10 min,再加入 25  $\mu$ L 5 mmol/L PNPG 溶液,37 °C 条件下反应 25 min,用 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应,405 nm 处测定吸光值  $A_3$ ,以不加  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的体系为样品空白组  $A_2$ ,水代替样品为对照组  $A_1$ ,水代替样品且不加  $\alpha$ -葡萄糖苷酶为对照空白组  $A_0$ ,参考 Mudgil 等<sup>[19]</sup>的方法进行计算。

$$\text{抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{A_3 - A_2}{A_1 - A_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

## 1.3.4 发酵工艺优化

1.3.4.1 混菌发酵单因素实验 设置基本工艺参数:料液质量比 1:15、初始 pH 6.5、接种量按体积分数 3%、植物乳杆菌和嗜热链球菌菌液体积比 1:1、发酵时间 3 d。在其它因素不变的条件下分别考察接种量(1~5%,以体积分数计)、料液质量比

(1:10~1:30)、发酵初始 pH 值(5.5~9.5)、接种比例和发酵时间(1~5 d)五因素影响下发酵产物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率、水解度和多肽得率的影响。

1.3.4.2 响应面法优化发酵工艺试验 根据 Box-Behnken 试验设计原理,以  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率为响应值( $Y$ ),选择接种量( $A$ )、初始 pH 值( $B$ )、料液比( $C$ )和发酵时间( $D$ )为四因素,用 Design-Expert 10 软件设计四因素三水平的响应面试验,试验因素和水平设计见表 1。

表 1 响应面因素水平编码表  
Table 1 Coding values of response surface test factor levels

水平	因素			
	接种量/%	起始 pH 值	料液比	发酵时间/d
-1	1	6.5	1:10	2
0	2	7.5	1:15	3
1	3	8.5	1:20	4

### 1.3.5 分离纯化

1.3.5.1 Sephadex G-25 分离 采用 Joshi 等<sup>[20]</sup>用葡聚糖凝胶分离生物活性小分子肽的方法。凝胶煮沸 2 h 充分溶胀后装柱(1.6 cm×60 cm),用超纯水过柱使电导检测仪在 280 nm 处检测的吸光值不变,即柱床达到平衡。称取 250 mg 粗  $\alpha$ -GIG 加入 2 mL 超纯水配成 125 mg/mL 的溶液,过 0.22  $\mu$ m 滤膜后上样,用超纯水进行洗脱,控制流速为 1.5 mL/min,280 nm 波长处检测吸光值,利用苯酚-硫酸法<sup>[21]</sup>测定每管组分在 490 nm 处的吸光值,收集各波长范围下产生的分离峰,减压浓缩后冷冻干燥,即得到各分离组分 I1、I2、I3。

1.3.5.2 RP-HPLC 分离 将经 Sephadex G-25 分离得到的高活性组分 I2 进一步用 RP-HPLC 分离纯化制备  $\alpha$ -GIG<sup>[22]</sup>。流动相 A 为含 0.1% TFA 的超纯水,B 为含 0.1% TFA 的乙腈,过 0.22  $\mu$ m 滤膜后超声 30 min 排气。选用 BioBasic-18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,300 Å,5  $\mu$ m),上样量 50  $\mu$ L,于 220 nm 波长下检测。洗脱条件:0~5 min,90% A;5~20 min,90%~70% A;20~30 min,70%~50% A;30~35 min,50%~10% A;35~40 min,10%~90% A。多次上样,收集组分,得到纯化  $\alpha$ -GIG。

1.3.6 红外光谱二级结构分析 利用红外光谱法分析蛋白质二级结构<sup>[23]</sup>,称取 10 mg 样品加入 1 g 干燥 KBr,研磨后压片,用红外光谱仪进行扫描,扫描波段为 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数 20 次,分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ 。用 PeakFitv4.12 软件对酰胺一带(1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$  波数段)Gaussian 函数傅里叶自去卷积后二阶求导,经多次曲线拟合使残差最小,通过峰面积计算各峰所占百分比,确定二级结构。

1.3.7 糖肽键分析 采用  $\beta$ -消除反应的方法<sup>[24]</sup>,配制 2 mg/mL 的  $\alpha$ -GIG 溶液,等体积加入 0.4 mol/L 的 NaOH 溶液后于 45  $^{\circ}\text{C}$  下进行  $\beta$ -消除反应 2 h,用紫外分光光度计对波长区段为 200~500 nm 的样品进行扫描,比较 NaOH 处理前后的紫外吸光度值变化。

1.3.8  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制动力学分析 采用 Lineweaver-Burk 作图法<sup>[25]</sup>,确定  $\alpha$ -GIG 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用类型。首先,将 100  $\mu$ L 不同浓度的抑制剂  $\alpha$ -GIG(0.4,0.8,1.2 mg/mL)稀释后加入 96 孔板中,用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH=6.8)代替抑制剂为对照组,底物 PNPG 的浓度分别设为 0.2,0.5,1,3,5 mmol/L,按照 1.3.3.3 节的方法测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率。以底物浓度倒数  $1/S$  为横坐标,反应速率倒数  $1/V$  为纵坐标绘制 Lineweaver-Burk 双倒数图,确定米氏常数  $K_m$  和最大反应速率  $V_{\max}$ <sup>[26]</sup>。

$$\frac{1}{V} = \frac{V_{\max}}{K_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4)$$

## 1.4 数据处理

所有试验结果均用 3 次重复试验平均值 $\pm$ 标准差表示,采用软件 IBM SPSS Statistics 25 进行数据统计学分析,软件 Origin 2018 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选及混菌验证

在发酵条件相同的情况下,荞麦经细菌、酵母菌及霉菌发酵得到的发酵液在不同程度上均能抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,其中以两种乳酸菌——植物乳杆菌、嗜热链球菌效果最佳,抑制率分别可达到 46.09% 和 48.79%,但是水解度和多肽得率不高,可能是因为水解产生的糖肽能有效抑制  $\alpha$ -葡

葡萄糖苷活性;毛霉发酵水解度高,但是产生的多肽含量少,并且对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制效果弱,仅能达到 30.18%;根霉发酵产生高含量肽的同时对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有较好的抑制作用,但是与乳酸菌相比仍具有显著性差异。因此,选择植物乳杆菌和嗜热链球菌作为发酵菌株,经混菌发酵验证,其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率达 53.63% 显著高于单菌发酵,确定两种乳酸菌为发酵荞麦制备  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制糖肽的组合菌株。

## 2.2 混菌发酵条件优化

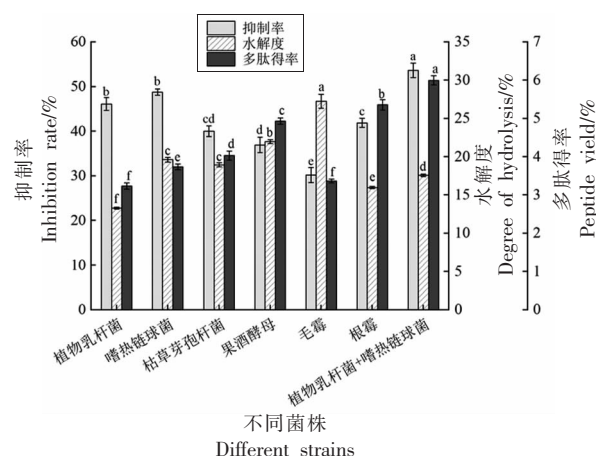
### 2.2.1 单因素实验

2.2.1.1 接种量对发酵的影响 由图 2 可知,随着接种量增加,发酵产物的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率、水解度和多肽得率均呈现先增大后减小的趋势,推测原因主要是随着菌量增加,菌生长过程中产生的蛋白酶含量增加从而产生较多功能肽段,当随着菌量进一步增加,微生物生长所需的碳源和氮源损耗加大,分解产生多肽进一步被利用以满足菌体生长所需<sup>[27]</sup>,各项指标又呈现下降趋势。

2.2.1.2 接菌比例对发酵的影响 由图 3 可知,植物乳杆菌和嗜热链球菌接菌比例在 3:1 至 1:3 变化的过程中,接菌比例为 1:1 的条件下水解度最高,但是发酵液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率和多肽得率的影响较小,可能是因为所选比例范围对两菌相互作用的影响不明显,因此,在响应面的试验设计中不选择植物乳杆菌和嗜热链球菌的接菌比例作为优化的因素。

2.2.1.3 发酵初始 pH 对发酵的影响 由图 4 可知,发酵初始 pH 值对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率、水解度和多肽得率的影响明显,随 pH 值升高呈现先升高后降低的趋势,可能是因为 pH 值影响基质中离子含量和微生物膜表面的电荷量及通透性<sup>[28]</sup>,过酸和过碱的环境均不适合微生物的生长代谢,在 pH 值为 7.5 时能满足菌体生长所需,且蛋白酶产率高, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率、水解度和多肽得率均达到最高。

2.2.1.4 料液比对发酵的影响 由图 5 可知,料液比为 1:15 时发酵液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率达到最高,其水解度和多肽得率呈现逐步下降趋势。料液比影响发酵基质含水量,料液比值高使得荞麦浆过于浓稠含水量低,且流动性低和黏稠度高



注:字母不同表示具有显著性差异( $P < 0.05$ );下同。

图 1 菌株筛选和混菌发酵结果验证

Fig.1 Strain screening and verification of mixed bacteria fermentation

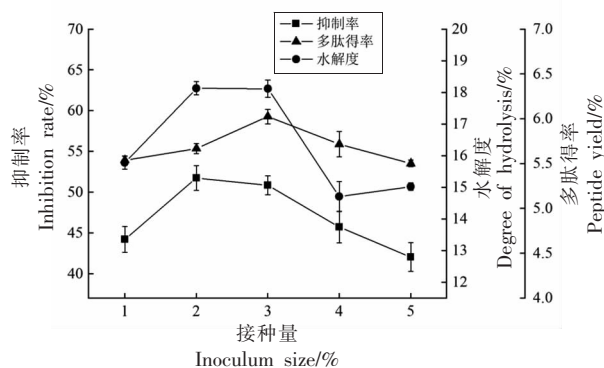


图 2 接种量对发酵的影响

Fig.2 Effect of inoculum size on fermentation

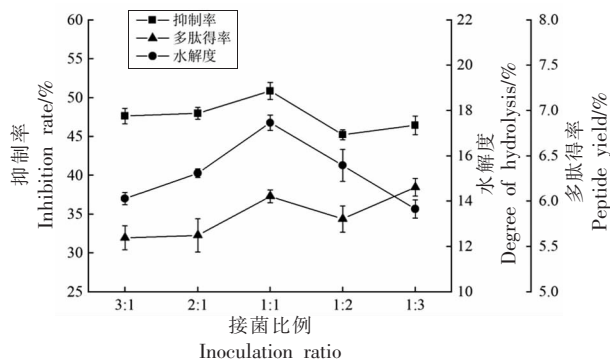


图 3 接菌比例对发酵的影响

Fig.3 Effect of inoculation ratio on fermentation

的发酵基质不利于氧气进入,而料液比过低时营养物质浓度低,从而影响菌的生长繁殖。

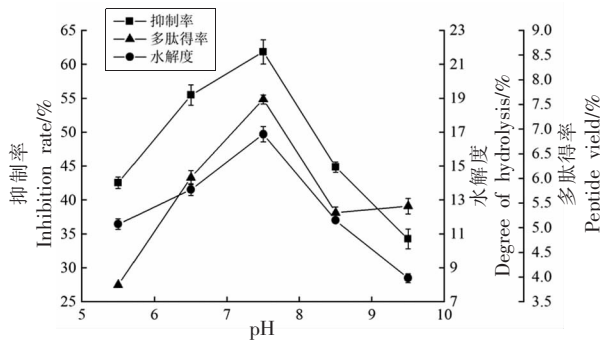


图4 初始 pH 值对发酵的影响

Fig.4 Effect of pH on fermentation

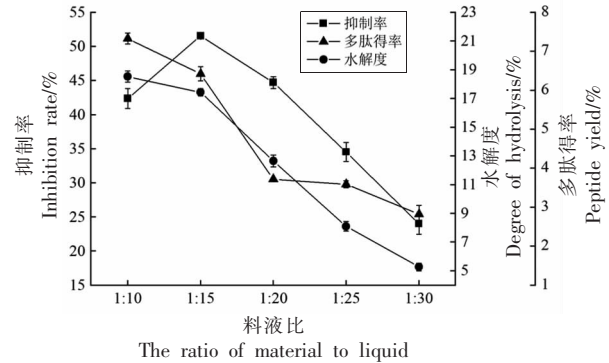


图5 料液比对发酵的影响

Fig.5 Effect of the ratio of material to liquid on fermentation

2.2.1.5 时间对发酵的影响 由图6可知,随着发酵时间的延长,发酵液的各项指标变化先增加后降低,在发酵起始阶段菌株发酵利用蛋白质产生具有活性的功能肽,水解度和多肽含量升高,使得 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率升高,而当发酵继续进行,多肽被进一步分解,使得发酵液对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率降低。

2.2.2 响应面优化

2.2.2.1 响应面优化试验结果 根据单因素实验结果,利用 Box-Behnken 模型设计四因素三水平试验,共进行 29 次,试验结果见表 2 所示。

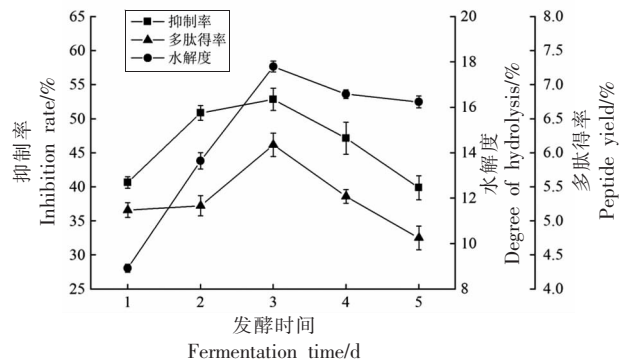


图6 发酵时间对发酵的影响

Fig.6 The effect of fermentation time on fermentation

表2 响应面优化试验结果

Table 2 Experimental results of response surface optimization analysis

试验号	接种量 (A)	pH 值 (B)	料液比 (C)	发酵时间 (D)	抑制率/%	试验号	接种量 (A)	pH 值 (B)	料液比 (C)	发酵时间 (D)	抑制率/%
1	0	-1	-1	0	47.58	16	0	0	-1	-1	56.73
2	0	0	0	0	72.12	17	0	0	1	1	48.19
3	-1	0	0	1	56.25	18	0	0	0	0	71.57
4	0	0	1	-1	58.87	19	0	-1	0	1	46.73
5	0	0	0	0	70.62	20	0	0	0	0	72.02
6	-1	0	1	0	49.98	21	-1	0	-1	0	55.53
7	-1	1	0	0	47.58	22	0	1	1	0	46.64
8	1	-1	0	0	52.29	23	0	-1	1	0	49.61
9	1	0	1	0	52.16	24	0	1	0	-1	50.41
10	1	0	0	-1	60.61	25	0	0	-1	1	52.50
11	0	0	0	0	70.12	26	0	-1	0	-1	53.08
12	1	1	0	0	49.68	27	-1	-1	0	0	50.86
13	1	0	-1	0	55.72	28	0	1	-1	0	51.45
14	1	0	0	1	50.55	29	0	1	0	1	46.63
15	-1	0	0	-1	58.68						

2.2.2.2 数学模型的建立和方差分析 通过软件 Design-Expert 10 对表 2 中 29 组试验数据进行回归分析,得到多元二次回归方程: $Y=71.29+0.18A-0.65B-1.17C-3.13D+0.17AB+0.50AC-1.91AD-1.71BC+0.64BD-1.61CD-7.67A^2-13.59B^2-9.54C^2-7.75D^2$ 。

由表 3 可以看出,模型显著性  $P<0.0001$  为极显著,失拟项  $P=0.0952>0.05$  表现为不显著,当模型相关系数大于 0.80 时可以认为模型拟合程度

良好,本试验中模型相关系数  $R^2=0.9821$ ,调整系数  $R^2_{Adj}=0.9642$ ,表明试验中有 96.42%的试验结果能用该模型解释,模型拟合程度良好,试验误差范围较小,试验数据可信度较高<sup>[29]</sup>。回归方程一次项自变量  $C$  达到显著水平, $D$  达到极显著水平,二次项中  $AD$ 、 $BC$  影响显著, $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  影响极显著,四因素对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的影响程度表现为  $D>C>B>A$ ,即发酵时间>料液比>pH 值>接种量。

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of the established regression model

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	1 900.70	14	135.76	54.87	<0.0001	**
A	0.38	1	0.38	0.15	0.7017	
B	5.02	1	5.02	2.03	0.1763	
C	16.47	1	16.47	6.66	0.0218	*
D	117.38	1	117.38	47.44	<0.0001	**
AB	0.11	1	0.11	0.05	0.8344	
AC	0.99	1	0.99	0.40	0.5372	
AD	14.55	1	14.55	5.88	0.0294	*
BC	11.70	1	11.70	4.73	0.0473	*
BD	1.65	1	1.65	0.67	0.4276	
CD	10.40	1	10.40	4.20	0.0595	
A <sup>2</sup>	318.76	1	318.76	154.30	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	1 198.05	1	1 198.05	484.24	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	590.09	1	590.09	238.51	<0.0001	**
D <sup>2</sup>	390.01	1	390.01	157.64	<0.0001	**
残差	34.64	14	2.47			
失拟项	31.52	10	3.15	4.04	0.0952	
纯误差	3.12	4	0.78			
总变异	1 935.34	28				

注:\*\*代表差异极显著( $P<0.01$ );\*代表差异显著( $P<0.05$ )。

如图 7 所示,响应曲面的坡度和等高线图的形状可以看出各因素间的交互作用及影响,经响应面优化分析得到最佳工艺条件:接种量为 2.035%,pH 值为 7.474,料液比为 1:14.795,发酵时间为 2.797 d,发酵产物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率达 71.64%。从试验可操作性考虑,选择接种量 2%,pH 7.5,料液比 1:14.8,发酵时间 2.8 d 进行验证试验,测得  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率为 70.83%,试验结果与模型基本一致,模型可信度高。

### 2.3 $\alpha$ -GIG 分离纯化

#### 2.3.1 Sephadex G-25 分离纯化 粗 $\alpha$ -GIG 经

Sephadex-G25 分离于 280 nm 处检测到 3 个吸收峰,依次命名为 I1、I2、I3,得率分别为 38.24%,5.82%和 14.96%。经苯酚-硫酸法测定,组分 I1 和 I2 在 490 nm 处出现吸收值,且与 280 nm 处吸收峰位置重合,证明两组分均为糖肽结构,而组分 I3 于 490 nm 处没有产生吸光值,没有糖的存在,可以认定为是单一的肽结构。I1、I2、I3 半抑制质量浓度分别为 14.71,1.72,8.54 mg/mL,组分 I2 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果显著高于其它两个组分,因此对糖肽组分 I2 进行进一步分离纯化。

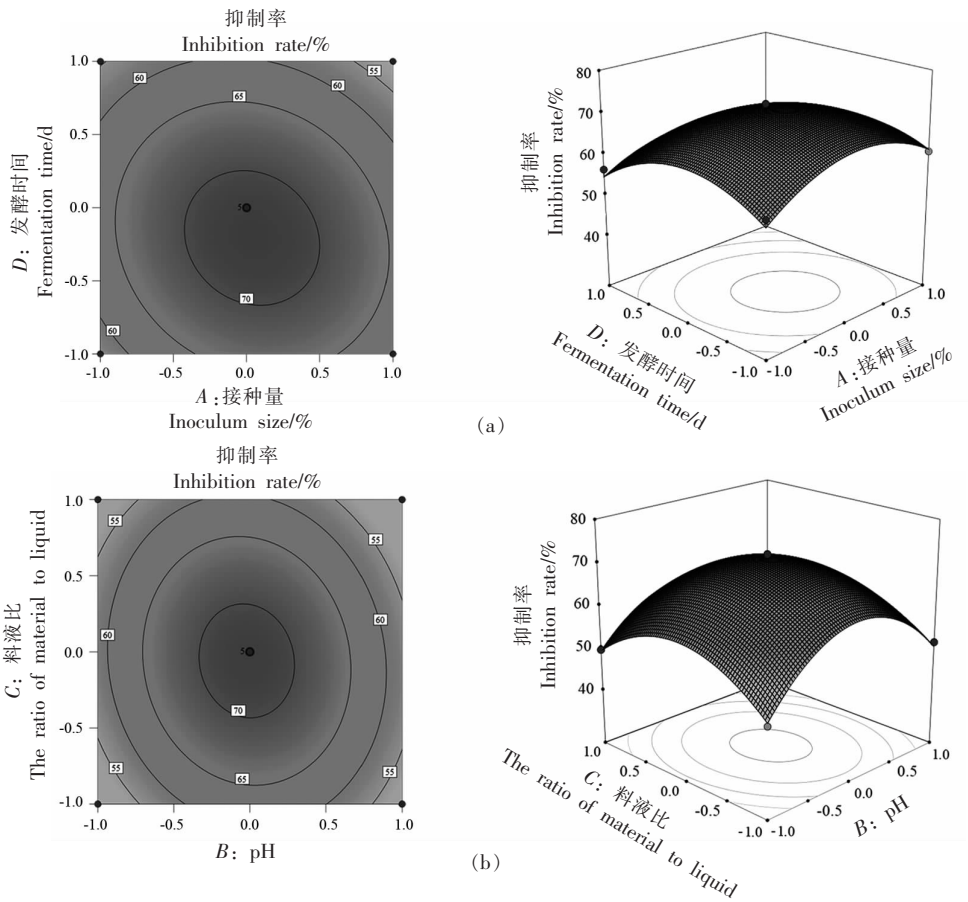


图7 各因素交互作用对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率影响的响应面和等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots showing the effect of interactions among various factors on inhibition rate of  $\alpha$ -glucosidase

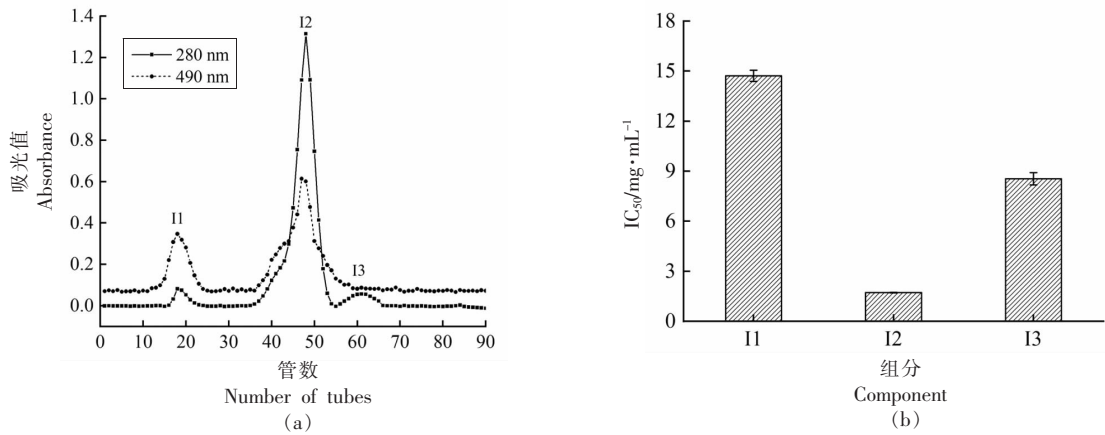


图8 Sephadex-G25 层析分离图谱(a)和各组分半抑制浓度(b)

Fig.8 Sephadex-G25 chromatogram (a) and half-inhibitory concentration of each component (b)

2.3.2 RP-HPLC 分离 12 经 RP-HPLC 分离后得到液相色谱图如图 9a 所示, 前 5 min 出现的峰为溶剂峰<sup>[30]</sup>, 收集 10 个分离程度较好的分离峰, 经  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定, P9 组分为主要活性

物质, 保留时间为 17.89 min, 出峰时间较晚, 具有较高疏水性的特点<sup>[31]</sup>。对收集的组分 P9 进一步用 RP-HPLC 进行纯度鉴定, 纯度达到 94.17%, 可认为分离纯化得到纯  $\alpha$ -GIG。

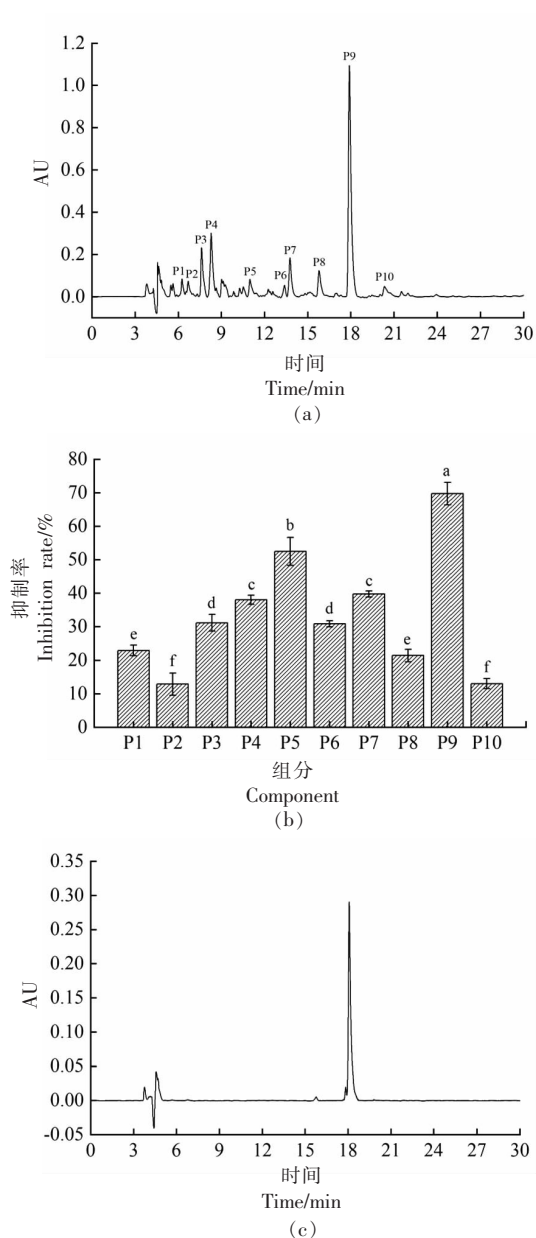


图 9 组分 I2 的高效液相色谱图 (a)、各分离组分对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率 (b) 和  $\alpha$ -GIG 的纯度分析图 (c)

Fig.9 RP-HPLC analysis of component I2 (a), inhibitory effect of separation components on  $\alpha$ -glucosidase activity (b) and purity analysis chart of  $\alpha$ -GIG (c)

## 2.4 红外光谱谱图分析

图 10a 是  $\alpha$ -GIG 的傅里叶红外光谱图, 图中特征峰符合一般多糖和多肽的吸收峰特征, 3 427.71  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰由分子内或分子间 N-H 和 O-H 的伸缩振动引起, 2 946.12  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰主要由  $-\text{CH}_2$  和  $-\text{CH}_3$  基团中 C-H 的非对称伸缩

振动引起<sup>[32]</sup>。C=O 的伸缩振动引起 1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$  处的红外吸收峰, 该处是蛋白质结构中酰胺一带的特征吸收峰, 较醛、酮、酸中羰基引起的吸收峰而言, 吸收值波数更低, 波数在 1 623.70  $\text{cm}^{-1}$  的吸收峰属于酰胺一带<sup>[33]</sup>。1 432.74  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰来源于 C-H 变形振动, 主要由于亚甲基的面内弯曲振动产生。在 1 000~1 100  $\text{cm}^{-1}$  波数带出现的 1 059.16  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰证明了吡喃糖环的存在, 877.15  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰确定糖苷键类型为  $\beta$ -糖苷键<sup>[34]</sup>。

蛋白质在酰胺 I 带 (1 600~1 700  $\text{cm}^{-1}$ ) 具有丰富的二级结构信息, 对该波数段基线校准后用 Gaussian 函数傅里叶自去卷积后二阶求导, 对求导后的二阶导数谱图进行分峰拟合, 共得到 4 个波数段的峰如图 10b 所示, 波数分别为 1 620.60, 1 536.09, 1 654.92, 1 671.13  $\text{cm}^{-1}$ , 通过峰面积计算各峰所占百分含量, 最终确定  $\alpha$ -GIG 二级结构为

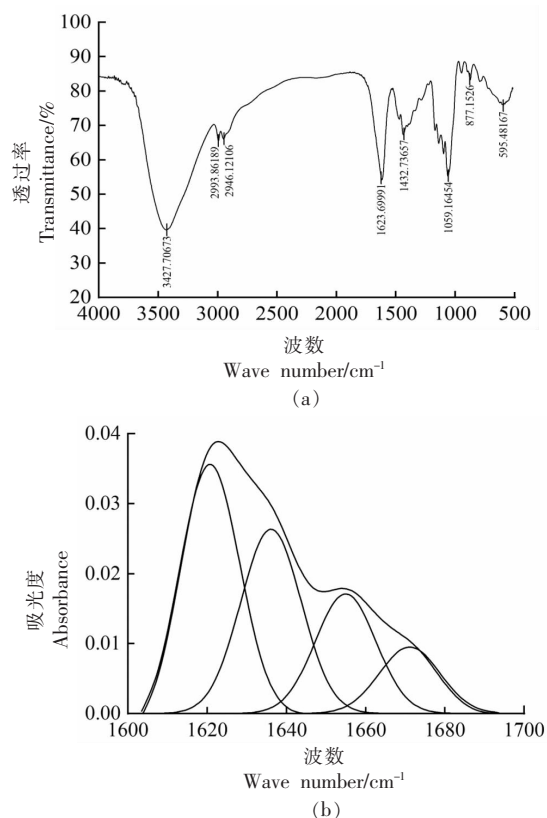


图 10  $\alpha$ -GIG 的傅里叶红外光谱图 (a) 和分峰拟合曲线谱图 (b)

Fig.10 Fourier transform infrared spectrum of  $\alpha$ -GIG (a) and peak fitting curve spectrum (b)



$\beta$ -折叠占 70.51%, $\alpha$ -螺旋占 18.95%, $\beta$ -转角占 10.54%, $\beta$ -折叠在蛋白二级结构中占据绝大部分,高含量的 $\beta$ -折叠可以暴露蛋白内部的疏水性位点,有利于提高多肽的生物活性<sup>[35]</sup>。

## 2.5 糖肽键类型分析

O-糖肽键和 N-糖肽键为糖肽键的主要类型,其中 O-糖肽键可经稀碱处理发生 $\beta$ -消除反应,由赖氨酸连接的糖链发生断裂形成 $\alpha$ -氨基丙烯酸和 $\alpha$ -氨基丁酸,在 240 nm 处产生吸收值,而 N-糖肽键则相对稳定,不会在碱性环境中发生该反应<sup>[36]</sup>。 $\alpha$ -GIG 经 $\beta$ -消除反应后,240 nm 处的波长下的吸光值由原来的 0.517 上升到 1.468,表明 $\alpha$ -GIG 中糖肽键类型为 O-糖肽键。

## 2.6 $\alpha$ -GIG 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶体外抑制作用及动力学分析

### 2.6.1 $\alpha$ -GIG 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用

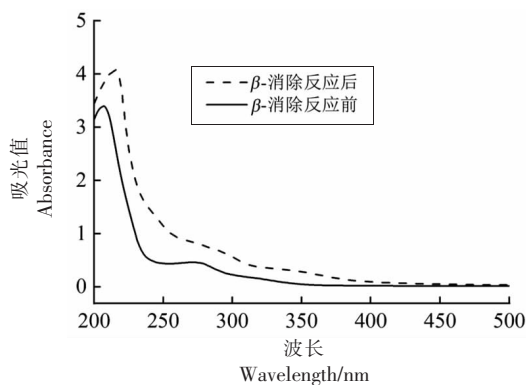


图 11  $\beta$ -消除反应前、后 $\alpha$ -GIG 的紫外扫描谱图

Fig.11 UV scanning spectra in  $\alpha$ -GIG before and after  $\beta$ -elimination reaction

GIG 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有明显的抑制作用, $IC_{50}$  为 0.63 mg/mL,但仍低于阳性对照阿卡波糖。 $\alpha$ -GIG 随着浓度升高对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用先加强后逐渐稳定,对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用表现为剂量依赖,因此,通过酶抑制动力学分析其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制类型。

2.6.2  $\alpha$ -GIG 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制动力学分析 通过 Lineweaver-Burk 作图法分析  $\alpha$ -GIG 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用类型。不同浓度的  $\alpha$ -GIG 在反应速率和底物浓度(PNPG)的双倒数图中相交于第三象限,随着样品浓度增加, $K_m$  和  $V_{max}$  都逐渐减小,这一特征表明  $\alpha$ -GIG 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶呈现出非竞争性和反竞争性的混合型抑制作用<sup>[37]</sup>,只能通过酶-底物-抑制剂复合物的形式发挥作用。

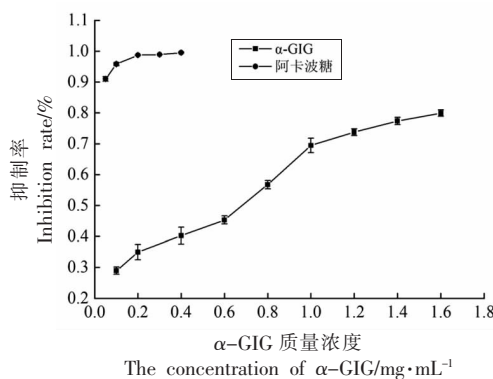
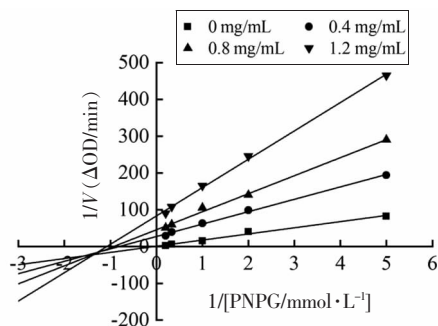
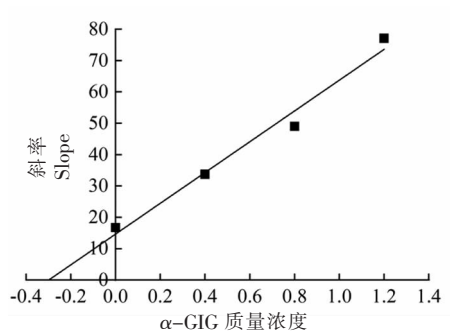


图 12  $\alpha$ -GIG 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用

Fig.12 Inhibitory effect of  $\alpha$ -GIG on  $\alpha$ -glucosidase activity



(a)



(b)

图 13  $\alpha$ -GIG 抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的 Lineweaver-Burk 图(a)和直线斜率对  $\alpha$ -GIG 浓度二次倒数图(b)

Fig.13 Lineweaver-Burk plot of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity in the presence of  $\alpha$ -GIG (a) and quadratic reciprocal plot of line slope versus  $\alpha$ -GIG concentration (b)

### 3 结论

本试验利用植物乳杆菌和嗜热链球菌发酵荞麦得到 $\alpha$ -GIG,并通过酶抑制动力学探究其对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用。响应面试验优化得到最佳发酵工艺条件:接种量2%,pH 7.5,料液比1:14.8,发酵时间2.8 d。发酵液经Sephadex G-25分离得到高活性组分I2,RP-HPLC进一步分离I2制备得到纯 $\alpha$ -GIG。对 $\alpha$ -GIG的二级结构分析发现 $\alpha$ -GIG中含有高含量的 $\beta$ -折叠,有利于暴露疏水性位点,这与其具有较强的生物活性功能有关。酶的抑制动力学研究结果表明 $\alpha$ -GIG对酶的抑制类型为混合型非竞争性抑制,抑制剂不与酶的活性位点直接结合,在抑制机理上与竞争性抑制剂不冲突,具有与阿卡波糖、伏格列波糖等开发为联合降糖药物的可能。本研究为降血糖糖肽的开发利用提供理论依据,未来的研究将重点关注糖肽的分子结构及发挥酶抑制活性的特征位点,进一步研究酶抑制机理,并进行体内试验探究降糖效果,为制造天然降糖食品提供新方向。

### 参 考 文 献

- [1] NINOMIYA K, INA S, HAMADA A, et al. Suppressive effect of the alpha-amylase inhibitor albumin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) on postprandial hyperglycaemia[J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1503.
- [2] 包美丽, 杨添植, 张立钢, 等. 双酶法制备马鹿茸降血糖肽工艺优化及其对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效[J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 88-95.  
BAO M L, YANG T Z, ZHANG L G, et al. Optimization of preparation of hypoglycemic peptides from red deer (*Cervus elaphus*) antlers by two-step enzymatic hydrolysis and their  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity[J]. *Food Science*, 2017, 38(6): 88-95.
- [3] IBRAHIM M A, BESTER M J, NEITZ A W H, et al. Structural properties of bioactive peptides with alpha-glucosidase inhibitory activity[J]. *Chemistry Biology & Drug Design*, 2018, 91(2): 370-379.
- [4] WANG R C, ZHAO H X, PAN X X, et al. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of alpha-glucosidase inhibitory peptides from soy protein[J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(5): 1848-1856.
- [5] 延海莹, 刘盟梦, 乔乐克, 等. 扇贝裙边活性肽的制备及其降血糖活性研究[J]. *食品工业*, 2018, 39(3): 117-121.  
YAN H Y, LIU M M, QIAO L K, et al. Study on scallop skirt active peptide and glucose tolerance activity[J]. *Food Industry*, 2018, 39(3): 117-121.
- [6] GIMENEZ-BASTIDA J A, ZIELINSKI H. Buckwheat as a functional food and its effects on health[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(36): 7896-7913.
- [7] JIN J, OHANENYE I C, UDENIGWE C C. Buckwheat proteins: functionality, safety, bioactivity, and prospects as alternative plant-based proteins in the food industry[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(7): 1752-1764.
- [8] SANA N, BAHISHT R, MUDASSIR K, et al. Health benefits of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), potential remedy for diseases, rare to cancer: a mini review[J]. *Infectious Disorders Drug Targets*, 2021, 21(6): e170721189478.
- [9] PANDE S, RANJAN R, RYAZANOVA M, et al. Buckwheat-enriched diet alleviates bisphenol A mediated oxidative stress via modulation of sirtuin 1 and antioxidant status in experimental rats[J]. *Food Chemistry*, 2021, 373: 131507.
- [10] KOYAMA M, HATTORI S, AMANO Y, et al. Blood pressure-lowering peptides from neo-fermented buckwheat sprouts: a new approach to estimating ACE-inhibitory activity[J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(9): e105802.
- [11] 郭晓娜, 姚惠源. 苦荞麦蛋白质对乳腺癌细胞的增殖抑制作用[J]. *食品科学*, 2010, 31(19): 317-320.  
GUO X N, YAO H Y. Anti-proliferative effect of tartary buckwheat protein fraction TBWSP31 on breast cancer cells[J]. *Food Science*, 2010, 31(19): 317-320.
- [12] LIN H C, LIN J Y. M1 polarization but anti-LPS-induced inflammation and anti-MCF-7 breast cancer cell growth effects of five selected polysaccharides[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020: 9450246.
- [13] OH M J, CHOI H D, HA S K, et al. Im-

- munomodulatory effects of polysaccharide fraction isolated from *Fagopyrum esculentum* on innate immune system[J]. *Biochemical and Biophysical Communications*, 2018, 496(4): 1210–1216.
- [14] NIELSEN M S, MARTINUSSEN T, FLAMBARD B, et al. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time [J]. *International Dairy Journal*, 2009, 19(3): 155–165.
- [15] 路清宇. 黑小麦麸皮抗氧化肽的制备及其特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2021.
- LU Q Y. Preparation and characterization of antioxidant peptides from black wheat bran[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2021.
- [16] SAMAEI S P, MARTINI S, TAGLIAZUCCHI D, et al. Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from alcalase protein hydrolysate fractions of hemp (*Cannabis sativa* L.) bran [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemical*, 2021, 69(32): 9220–9228.
- [17] 李红敏, 周小理. 荞麦多肽的制备及其抗氧化活性的研究[J]. *食品科学*, 2006(10): 302–306.
- LI H M, ZHOU X L. Study on preparation of peptides from buckwheat and antioxidative activity [J]. *Food Science*, 2006(10): 302–306.
- [18] KARIMI A, AZIZI M H, GAVLIGHI H A. Fractionation of hydrolysate from corn germ protein by ultrafiltration: *In vitro* antidiabetic and antioxidant activity[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(5): 2395–2405.
- [19] MUDGIL P, KAMAL H, KILARI B P, et al. Simulated gastrointestinal digestion of camel and bovine casein hydrolysates: identification and characterization of novel anti-diabetic bioactive peptides[J]. *Food Chemistry*, 2021, 353: 129374.
- [20] JOSHI I, K J, NOORANI K P M, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by-catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101770.
- [21] 胡彦波, 翟丽媛, 刘扬, 等. 薇菜多糖的分离纯化及体外抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2022, 43(1): 59–66.
- HU Y B, ZHAI L Y, LIU Y, et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *osmunda japonica*[J]. *Food Science*, 2022, 43(1): 59–66.
- [22] SHAZLY A B, HE Z Y, EL-AZIZ M A, et al. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2017, 232: 753–762.
- [23] CHOI S M, MA Y G. Conformational study of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(20): 8046–8053.
- [24] 魏文志, 夏文水, 李湘鸣, 等. 小球藻糖蛋白的分离纯化与性质测定[J]. *食品科学*, 2006(11): 101–104.
- WEI W Z, XIA W S, LI X M, et al. Isolation, purification and characterization of the glycoprotein from *chlorella pyrenoidosa* [J]. *Food Science*, 2006(11): 101–104.
- [25] WANG L, ZHANG B, XIAO J, et al. Physicochemical, functional, and biological properties of water-soluble polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt fruit[J]. *Food Chemistry*, 2018, 249: 127–135.
- [26] LV Q Q, CAO J J, LIU R, et al. Structural characterization, alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activities of polysaccharides from wheat bran[J]. *Food Chemistry*, 2021, 341: 128218.
- [27] 王莹, 包怡红, 康宁. 混菌固态发酵榛仁粕制备降血压肽工艺优化研究[J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(12): 35–41.
- WANG L, BAO Y H, KANG N. Optimization of antihypertensive peptide preparation by mixed solid fermentation of hazelnut meal[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2018, 33(12): 35–41.
- [28] 盖梦. 液态发酵法制备燕麦 ACE 抑制肽的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- GAI M. Study on producing ACE inhibitory peptides from oat by liquid-state fermentation [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [29] ISHAK N H, SARBON N M. Optimization of the enzymatic hydrolysis conditions of waste from short-fin scad (*Decapterus macrosoma*) for the production of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide using response surface methodology[J]. *Inter-*

- national Food Research Journal, 2017, 24 (4): 1735-1743.
- [30] 卢红妍, 杨行, 方丽, 等. 松仁清蛋白抗氧化肽的分离纯化及结构鉴定[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 40-45.
- LU H Y, YANG H, FANG L, et al. Isolation, purification and structural identification of antioxidant peptides derived from enzymatic hydrolysis of pine nut kernel (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.) albumin [J]. Food Science, 2019, 40(24): 40-45.
- [31] WOUTERS A G B, ROMBOUITS I, SCHOE-BRECHTS N, et al. Foam fractionation as a tool to study the air-water interface structure-function relationship of wheat gluten hydrolysates[J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2017, 151: 295-303.
- [32] 贺磊. 魔芋 ACE 抑制肽制备技术及理化性质研究 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2017.
- HE L. Study on the preparation technology and physic-chemical properties of konjac ACE inhibitory peptides[D]. Xi'an: Shanxi University of Science and Technology, 2017.
- [33] 刘文, 张悦容, 张腾军, 等. 牡蛎体液糖蛋白的分离纯化及其理化性质分析[J]. 中国食品学报, 2013, 13(11): 179-184.
- LIU W, ZHANG Y R, ZHANG T J, et al. Isolation, purification and characterization of glycoprotein from oyster juice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(11): 179-184.
- [34] SHEN C Y, JIANG J G, LI M Q, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of novel polysaccharides from *Citrus aurantium* Linn. variant amara Engl[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 352-362.
- [35] 刘文颖, 冯晓文, 李国明, 等. 牡蛎低聚肽的结构表征及体外抗氧化作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(12): 261-269.
- LIU W Y, FENG X W, LI G M, et al. Structure characterization and antioxidant effects *in vitro* of oyster oligopeptides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(12): 261-269.
- [36] 刘晓飞, 侯艳, 马京求, 等. 发芽糙米糖蛋白结构表征及抗氧化性能分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 328-337.
- LIU X F, HOU Y, MA J Q, et al. Structure characterization and antioxidant effects *in vitro* of oyster oligopeptides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 328-337.
- [37] DENG Y T, LIN-SHIAU S Y, SHYUR L F, et al. Pu-erh tea polysaccharides decrease blood sugar by inhibition of alpha-glucosidase activity *in vitro* and in mice[J]. Food & Function, 2015, 6(5): 1539-1546.

## Structural Characterization and Enzyme Inhibition Kinetics of Hypoglycemic Glycopeptides Derived from Buckwheat

Zhou Liusha, Li Ping, Gu Shuang, Yu Yuyuan, Hu Xianglian, Shi Yongqing\*

(College of Food and Biological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

**Abstract** To realize the high-value utilization of buckwheat protein resources,  $\alpha$ -glucosidase-inhibiting glycopeptide ( $\alpha$ -GIG) was prepared by fermentation of *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus thermophilus* which were selected from 6 strains. One-factor-at-a-time method aimed to determine the level of experimental factors and a further response surface experiment was used to optimize fermentation. The fermentation broth was separated and purified by Sephadex G-25 and reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) to prepare  $\alpha$ -GIG. The method of  $\beta$ -elimination reaction was used to determine the type of glycopeptide bond and infrared spectroscopy was used to analyze the secondary structure. The inhibitory effects of  $\alpha$ -GIG on  $\alpha$ -glucosidase was investigated by enzyme kinetics. The results showed that when the inoculum was 2%, pH was 7.5, solid-liquid ratio was 1:14.8 and fermentation time was 2.8 d, the  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate was 70.83%. I1, I2, I3 were separated from Sephadex G-25, and I2 with the best enzyme inhibitory effect whose  $IC_{50}$  is 1.72 mg/mL. I2 was further separated and purified by RP-HPLC to obtain  $\alpha$ -GIG with a purity of

94.17%. Fourier transform infrared spectroscopy suggest that the secondary structure composition was estimated as 70.51%  $\beta$ -folding, 18.95%  $\alpha$ -helices and 10.54%  $\beta$ -corner.  $\beta$ -elimination reaction demonstrated the existence of *O*-glycosidic linkage in  $\alpha$ -GIG. The results of the enzyme inhibition kinetics study showed that  $\alpha$ -GIG exhibited a mixed-type non-competitive inhibition of  $\alpha$ -glucosidase. Therefore,  $\alpha$ -GIG had the potential to be developed as a natural  $\alpha$ -glucosidase inhibitor.

**Keywords** buckwheat;  $\alpha$ -glucosidase; response surface; structure characterization; inhibition kinetics