

堇叶碎米荠低聚肽制备工艺优化及结构特征、氧化活性研究

Preparation, structural characteristics and antioxidant activity of *Cardamine violifolia* oligopeptides

问小龙¹ 向极钎^{1,2} 张亮¹ 李亚杰¹ 龙澜²

WEN Xiaolong¹ XIANG Jiqian^{1,2} ZHANG Liang¹ LI Yajie¹ LONG Lan²

(1. 恩施土家族苗族自治州农业科学院, 湖北 恩施 445000; 2. 湖北省富硒产业技术研究院, 湖北 恩施 445000)

(1. Enshi Tujia & Miao Autonomous Prefecture Academy of Agricultural Sciences, Enshi, Hubei 445000, China;

2. Hubei Selenium Industry Technology Research Institute, Enshi, Hubei 445000, China)

摘要:目的:制备堇叶碎米荠低聚肽,并拓展其应用范围。方法:以堇叶碎米荠为原料,使用碱性蛋白酶酶解,采用超滤膜进行分离浓缩,冷冻干燥后获取堇叶碎米荠低聚肽粉末,并对该低聚肽的结构和抗氧化活性进行分析。结果:堇叶碎米荠蛋白水解的最佳工艺条件为酶解温度 50℃、酶解 pH 10、加酶量 4%、底物质量分数 2%,此条件下水解度为 17.9%;堇叶碎米荠低聚肽的蛋白质和多肽含量分别为 49.01% 和 42.87%;该低聚肽在 200~220 nm 有较强的吸收带,具有酰胺键的特征吸收峰,二级结构以 β -转角为主,相对分子质量 < 1 000 的约占 90%;当堇叶碎米荠低聚肽质量浓度为 20 mg/mL 时,其羟自由基、ABTS 自由基、DPPH 自由基清除率分别为 84.54%, 98.22%, 60.33%。结论:试验优化的堇叶碎米荠低聚肽制备工艺合理可行,堇叶碎米荠低聚肽具有抗氧化活性。

关键词: 堇叶碎米荠; 低聚肽; 结构特征; 抗氧化

Abstract: Objective: This study aimed to prepare oligopeptides of *Camelina violifolia* and expand its application range. **Methods:** *C. violifolia* protein was hydrolyzed by alkaline protease, and then used ultrafiltration membrane for isolating and concentrating, and obtained oligopeptides by freeze-drying. The structure and antioxidant activity of *C. violifolia* oligopeptides were analyzed. **Results:** The optimum conditions for the

hydrolysis of *C. violifolia* protein were as follows: hydrolysis temperature 50℃, pH 10, enzyme dosage 4%, substrate concentration 2%, and hydrolysis degree 17.9%. The *C. violifolia* oligopeptides contents of protein and polypeptide were 49.01% and 42.87%, respectively. The oligopeptides had a strong absorption band at 200~220 nm, amide bond-specific absorption peaks, β -angle was the main secondary structure, and a 90% relative molecular weight of less than 1 000 Da. When the oligopeptides concentration was 20 mg/mL, the scavenging rates of hydroxyl radical, ABTS radical and DPPH radical were 84.54%, 98.22% and 60.33% respectively. **Conclusion:** The preparation process of the oligopeptides of *C. violifolia* is reasonable and feasible. The oligopeptides have good antioxidant capacity.

Keywords: *Cardamine violifolia*; oligopeptides; structural characteristics; antioxidant activity

堇叶碎米荠(*Cardamine violifolia* O. E. Schulz)别名野油菜,为十字花科一年或二年生草本植物,全草可作为野菜食用,也可作药用,具有清热祛湿的功能^[1]。据《湖北恩施药用植物志》^[2]记载,碎米荠性平,味淡,具有清热利湿的功效。2021年3月,国家卫健委批复堇叶碎米荠参照叶类蔬菜标准管理。

堇叶碎米荠中富含不饱和脂肪酸、硒蛋白、硒多糖、维生素、矿物质等成分^[3-5]。目前,关于堇叶碎米荠的研究大多集中在富硒栽培及硒耐受的机理、硒形态分析、营养成分、富硒蛋白和富硒多糖等大分子物质的功效评价等方面,吕昊^[6]研究发现,堇叶碎米荠富硒蛋白具有缓解疲劳的作用;林樾^[7]研究发现,堇叶碎米荠中的有机硒以硒代胱氨酸为主,并探究了富硒多肽对肝癌细胞的抑

基金项目:恩施州农科院青年创新基金项目(编号:2021-003);武汉市对口帮扶恩施州项目(编号:21001)

作者简介:问小龙,男,恩施土家族苗族自治州农业科学院助理研究员,硕士。

通信作者:向极钎(1967—),男,恩施土家族苗族自治州农业科学院研究员。E-mail: hmxjq@163.com

收稿日期:2023-04-10 **改回日期:**2023-10-10

制作用及其机理。然而有关藁叶碎米茅中小分子活性成分低聚肽的系统研究尚未见报道。

研究拟以藁叶碎米茅蛋白为原料,优化酶解工艺制得藁叶碎米茅低聚肽粉末,分析检测该低聚肽的理化成分和氨基酸组成,利用相对分子质量分布、紫外全波长扫描、红外光谱和扫描电镜对其结构进行表征,并通过羟自由基清除能力等 4 种化学评价方法分析藁叶碎米茅低聚肽的抗氧化能力,以期藁叶碎米茅功能食品的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

藁叶碎米茅:经中科院昆明植物研究所鉴定为十字花科碎米茅属植物藁叶碎米茅,恩施州农科院;

氢氧化钠、无水乙醇、过硫酸钾、硫酸亚铁、双氧水等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

水杨酸:分析纯,天津福晨化学试剂有限公司;

碱性蛋白酶(200 U/mg)、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍:上海源叶生物科技有限公司;

2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

抗氧化能力(FRAP 法)试剂盒:苏州科铭生物技术有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

分析天平:BS-124S 型,德国 Sartorius 公司;

pH 计:FE20K 型,梅特勒-托利多科技(中国)有限公司;

离心机:TG16-WS 型,湖南湘立科学仪器有限公司;

真空冷冻干燥机:S-18N 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

凯氏定氮仪:K9840 型,海能未来技术集团股份有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-1900 型,日本岛津仪器有限公司;

全波长酶标仪:Spectra Max190 型,美国 Molecular Devices 公司;

双道原子荧光光度计:AFS-9760 型,北京海光仪器有限公司;

膜分离系统:HC-DG2540-3X 型,成都和诚过滤技术有限公司;

扫描电镜:sigma3000 型,德国蔡司公司;

傅里叶红外光谱仪:Nicolet IS20 型,美国赛默飞公司;

高效液相色谱仪:1260 型,美国安捷伦公司。

1.3 试验方法

1.3.1 藁叶碎米茅低聚肽的制备 藁叶碎米茅干粉经碱

提、酸沉、脱盐、干燥后获取藁叶碎米茅蛋白,按质量分数 4%称取一定量的藁叶碎米茅粗蛋白溶于蒸馏水中,升温至 50 ℃,调节 pH 值为 9,加入 160 mg 碱性蛋白酶,酶解 2 h,酶解过程中使用氢氧化钠溶液保持 pH 值为 9,直至酶解结束,95 ℃水浴 10 min,离心,上清液依次通 30,5,1 kDa 的超滤膜,收集滤过液,减压浓缩后冷冻干燥,得到藁叶碎米茅低聚肽干粉。

(1) 单因素试验:固定藁叶碎米茅蛋白质量分数为 4%、酶用量为 5%,酶解温度为 50 ℃、酶解时间 2 h、pH 9,以水解度为指标,考察藁叶碎米茅蛋白质量分数(2%,3%,4%,5%,6%)、酶解温度(40,45,50,55,60 ℃)、酶用量(0%,3%,4%,5%,6%,7%)和 pH 值(7.5,8.0,8.5,9.0,9.5,10.0)对藁叶碎米茅蛋白酶解效果的影响。

(2) 正交试验:在单因素试验基础上,采用四因素三水平正交表 $L_9(3^4)$,以藁叶碎米茅蛋白水解度为测定指标,对酶解条件进行优化。

1.3.2 水解度测定 采用 Ph-STAT 法^[8-10]。

1.3.3 成分分析

(1) 蛋白质:按 GB 5009.5—2016 执行。

(2) 水分:按 GB 5009.3—2016 执行。

(3) 硒含量:按 GB 5009.93—2017 执行。

(4) 氨基酸含量:按 GB 5009.124—2016 执行。

(5) 酸溶蛋白含量:按 GB/T 22729—2008 执行。

(6) 游离氨基酸含量:参考谭建宁等^[11]的方法。

1.3.4 相对分子质量分布测定 参考 Liu 等^[12]的方法。

1.3.5 结构特征

(1) 紫外全波长扫描:参考 Liu 等^[12]的方法,扫描波长为 190~400 nm。

(2) 傅里叶变换红外光谱扫描:根据朱孝晨^[13]的方法。

(3) 扫描电镜:参考 Qin 等^[14]的方法,分别于 2 000,5 000 倍下获取图像。

1.3.6 体外抗氧化活性测定

(1) DPPH 自由基清除能力:参考 Zhao 等^[15]的方法,按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

$$A = \left(1 - \frac{A_2 - A_0}{A_1}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

A ——自由基清除率,%;

A_2 ——样品组吸光值;

A_1 ——对照组吸光值;

A_0 ——空白组吸光值。

(2) ABTS 自由基清除能力:参考 Pandhare 等^[16]的方法,按式(1)计算 ABTS 自由基清除率。

(3) 羟自由基清除能力:参考 Amarowicz 等^[17]的方

法,按式(1)计算羟自由基清除率。

(4) 总抗氧化能力(FRAP法):按抗氧化能力试剂盒说明书进行测定。

1.3.7 数据处理 各试验重复3次,结果以平均值±标准差表示,利用Excel 2017软件进行数据处理,采用SPSS 16.0软件进行显著性分析,OriginPro 9.1软件绘图,使用omnic 8和peakfit 4.12软件进行红外光谱数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶用量 由图1(a)可知,随着酶用量的增加,藁叶碎米荠蛋白水解度增加。当酶用量为5%时,藁叶碎米荠蛋白水解度为9.26%,继续增大酶用量,藁叶碎米荠蛋白水解度增加的趋势比较平缓,可能是因为底物大部分已参与反应,藁叶碎米荠蛋白水解度趋于饱和^[18]。因此,藁叶碎米荠蛋白酶解的最佳酶用量为5%。

2.1.2 底物质量分数 由图1(b)可知,当底物质量分数为3%时,藁叶碎米荠蛋白水解度最大,达10.17%,继续增大底物质量分数,藁叶碎米荠蛋白水解度呈下降趋势,可能是因为随着底物质量分数的增加,溶液黏度增加,减缓了酶的扩散,降低了酶分子与底物的相互作用^[19],从而导致藁叶碎米荠蛋白水解度降低。因此,藁叶碎米荠蛋白酶解的最佳底物质量分数为3%。

2.1.3 酶解温度 由图1(c)可知,随着酶解温度的增加,藁叶碎米荠蛋白水解度增加。当酶解温度为55℃时,藁叶碎米荠蛋白水解度达10.74%,继续提升酶解温度,藁叶碎米荠蛋白水解度不再增加,可能是因为随着酶解温度的升高,酶活力受到影响甚至变性^[20],导致藁叶碎米荠蛋白水解度降低。因此,藁叶碎米荠蛋白酶解的最佳酶解温度为55℃。

2.1.4 酶解pH 由图1(d)可知,随着酶解pH值的增加,藁叶碎米荠蛋白水解度增加。当酶解pH为9.5时,藁叶碎米荠蛋白水解度达12.22%,继续增大酶解pH,藁叶碎米荠蛋白水解度略有下降。试验选取的碱性蛋白酶的最适pH为9~10^[20],当pH>10时,酶活力会下降从而导致藁叶碎米荠蛋白水解度降低。因此,藁叶碎米荠蛋白的最佳酶解pH值为9.5。

2.2 正交试验

根据单因素试验结果,选取酶解温度、pH、酶用量、底物质量分数4个因素进行正交试验,各因素水平见表1,试验设计及结果见表2。

由表2和表3可知,各因素均会影响藁叶碎米荠蛋白水解度,影响顺序依次为pH>底物质量分数>酶解温度>酶用量,其最佳酶解组合为A₁B₂C₂D₂,即酶解温度50℃、pH 9.5、酶用量5%、底物质量分数3%,此时藁叶碎米荠蛋白水解度为15.1%。

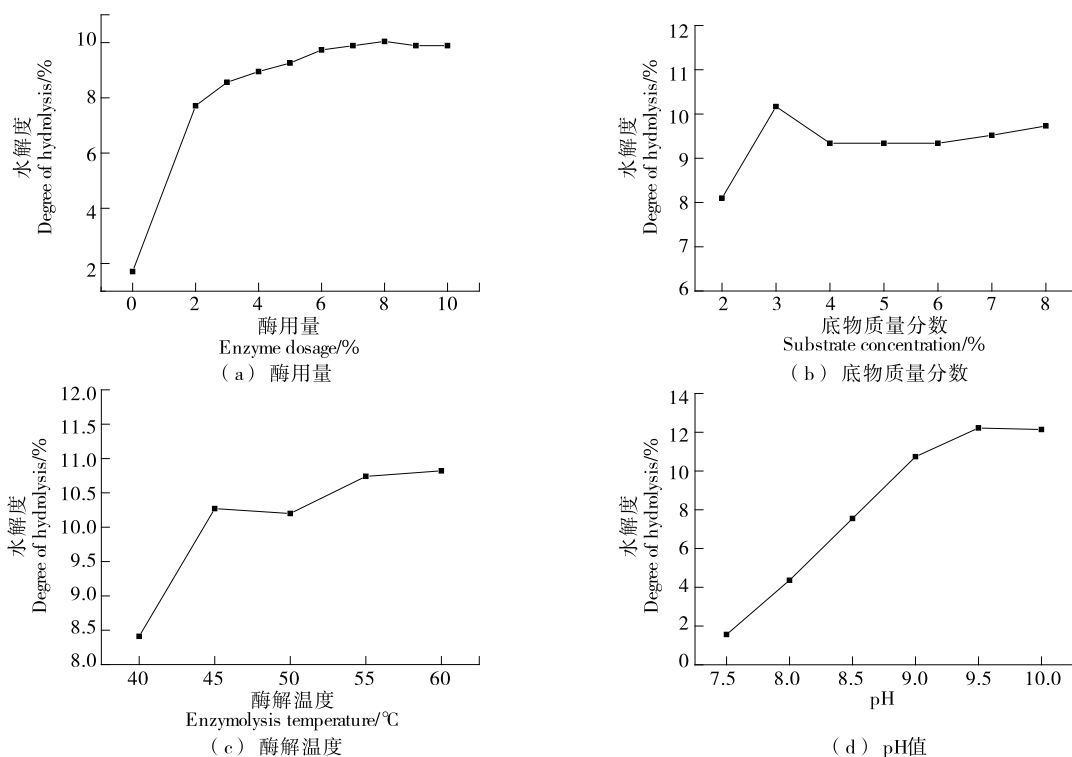


图1 各因素对藁叶碎米荠蛋白水解度的影响

Figure 1 The influence of various factors on the degree of hydrolysis of *C. violifolia* protein

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平	A 酶解温度/℃	B pH	C 酶用量/%	D 底物质量分数/%
1	50	9.0	4	2
2	55	9.5	5	3
3	60	10.0	6	4

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiments

序号	A	B	C	D	水解度/%
1	1	1	1	1	12.48
2	1	2	2	2	14.91
3	1	3	3	3	12.59
4	2	1	2	3	9.71
5	2	2	3	1	12.81
6	2	3	1	2	13.06
7	3	1	3	2	11.47
8	3	2	1	3	11.75
9	3	3	2	1	12.83
k_1	13.33	11.22	12.43	12.71	
k_2	11.86	13.16	12.48	13.15	
k_3	12.02	12.83	12.29	11.35	
R	1.31	1.61	0.19	1.36	

表 3 正交试验方差分析[†]

Table 3 Analysis of orthogonal experiment

来源	平方和	自由度	均方	F 值
修正的模型	46.892	8	5.862	1 824.726
截距	4 152.919	1	4 152.919	1 296 362.725
A	11.693	2	5.846	1 824.995
B	19.275	2	9.638	3 008.482
C	0.174	2	0.087	27.132
D	15.750	2	7.875	2 458.295
错误	0.058	9	0.003	
总计	4 199.869	27		
校正后总数	46.950	26		

[†] $R^2=0.999$; $R^2_{\text{Adj}}=0.998$ 。

2.3 莳叶碎米荠低聚肽成分

由表 4 可知,莳叶碎米荠低聚肽水分含量为 5.25%,蛋白质含量为 49.01%,总硒含量为 412.67 mg/kg,酸溶性蛋白质含量为 44.2%,占总蛋白质的 90%,游离氨基酸含量为 1.33%,经计算,肽含量为 42.87%。说明莳叶碎米荠蛋白经酶解制备得到的低聚肽,其蛋白、肽和硒元素含量较高,是开发富硒功能食品的优质原料。

由表 5 可知,莳叶碎米荠低聚肽中氨基酸总量为 48.10 g/100 g,其中色氨酸、胱氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺在酸性条件下被水解,未检测到^[21]。莳叶碎米荠低聚肽

表 4 莳叶碎米荠低聚肽的成分

Table 4 Composition of *C. violifolia* oligopeptides

蛋白质/%	水分/%	硒含量/(mg·kg ⁻¹)	多肽含量/%
49.01±2.04	5.25±0.25	412.67±12.00	42.87±0.06

表 5 莳叶碎米荠低聚肽的氨基酸组成

Table 5 Amino acid composition of *Cardamine violifolia* oligopeptides

氨基酸种类	含量/(10 ⁻² g·g ⁻¹)	氨基酸种类	含量/(10 ⁻² g·g ⁻¹)
天冬氨酸	2.98	亮氨酸	5.89
苏氨酸	2.08	酪氨酸	3.03
丝氨酸	1.90	苯丙氨酸	3.73
谷氨酸	4.74	组氨酸	1.23
脯氨酸	2.17	赖氨酸	4.09
甘氨酸	2.75	精氨酸	0.80
丙氨酸	4.43	给质子能力氨基酸	27.24
缬氨酸	4.15	疏水性氨基酸	24.49
蛋氨酸	1.18	氨基酸总量	48.10
异亮氨酸	2.94		

中必需氨基酸种类和含量丰富(7 种,24.06%),疏水性氨基酸占氨基酸总量的 50.91%,给质子能力氨基酸占氨基酸总量的 56.63%。有研究^[22-23]报道,氨基酸的组成与低聚肽的抗氧化能力紧密相关,疏水性氨基酸和给质子能力氨基酸占比高,可稳定和清除自由基,从而提升低聚肽的抗氧化能力。

2.4 莳叶碎米荠低聚肽的相对分子质量分布

使用 GPC 软件处理色谱数据,结果显示莳叶碎米荠低聚肽的重均相对分子质量为 621,数均相对分子质量为 461,主要为小分子物质。由图 2 可知,莳叶碎米荠低聚肽的凝胶色谱图中主要有 4 个峰,每个峰的相对分子质量分布见表 6,峰 1、2、3、4 的数均相对分子质量分别为

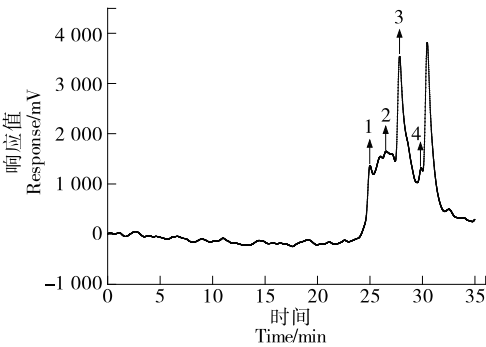


图 2 莳叶碎米荠低聚肽的流出曲线图

Figure 2 Flow graph of GPC for *C. violifolia* oligopeptides

表 6 藁叶碎米荠低聚肽的相对分子质量分布

Table 6 Molecular weight distribution of *C. violifolia* oligopeptides

峰	峰值分子量	数均相对分子质量	重均相对分子质量	多分散系数	开始时间/min	结束时间/min	峰面积百分比/%
1	1 546	1 567	1 596	1.018 51	23.84	25.34	10.64
2	771	782	832	1.063 94	25.34	27.41	36.13
3	462	383	397	1.036 55	27.41	29.51	46.01
4	234	238	238	1.000 00	29.51	30.09	7.22

1 567, 782, 383, 238, 峰面积分别为 10.64%, 36.13%, 46.01%, 7.22%, 制备的藁叶碎米荠低聚肽主要以寡肽为主, 且各峰的分散系数均接近 1, 说明相对分子质量分布越小, 相对分子质量越集中。有研究^[24-25]表明, 抗氧化活性较好的肽, 其相对分子质量均较小。

2.5 藁叶碎米荠低聚肽的紫外光谱扫描

由图 3 可知, 低聚肽在 200~220 nm 范围内有较强的吸收带, 可能是肽键存在的原因, 吸收了能量而产生电子跃迁; 275 nm 处有一个较弱吸收峰, 吸收值为 0.592, 可能是因为低聚肽中存在一些紫外光谱的生色团, 吸收了某一段光波内的光子而产生电子跃迁, 如 C=O、—COOH、—NH₂ 等^[26]。

2.6 藁叶碎米荠低聚肽的红外光谱扫描

蛋白质二级结构的分析常使用酰胺 I 带的谱图, 它能够反映 α -螺旋(1 660~1 650 cm⁻¹)、 β -折叠(1 640~1 600 cm⁻¹)、 β -转角(1 700~1 660 cm⁻¹)及无规卷曲(1 650~1 640 cm⁻¹)等不同结构信息^[27]。通过对藁叶碎米荠低聚肽酰胺 I 带(1 700~1 600 cm⁻¹)的图谱进行基线校准、高斯去卷积、二阶导数拟合后得到分峰拟合图如图 4 所示。

由图 4 可知, 对酰胺 I 带进行分峰拟合后共获得 7 个单一峰, 各子峰的面积代表相对应结构所占比例, 结果见表 7。由表 7 可知, 藁叶碎米荠低聚肽二级结构中有多种构象并存, 主要以 β -转角为主, 含量为 57.4%, 其次是 α -螺旋、无规卷曲和 β -折叠。 α -螺旋和 β -折叠代表蛋白分

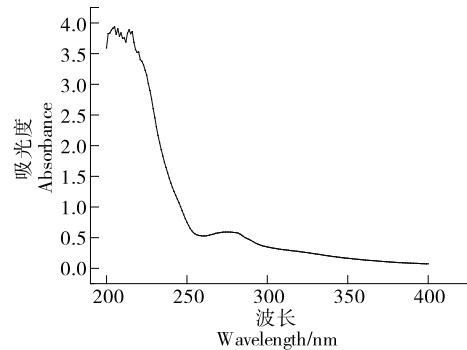


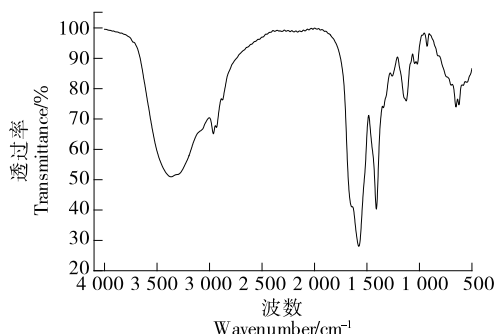
图 3 藁叶碎米荠低聚肽的紫外全波长扫描

Figure 3 UV scanning analysis of *C. violifolia* oligopeptides

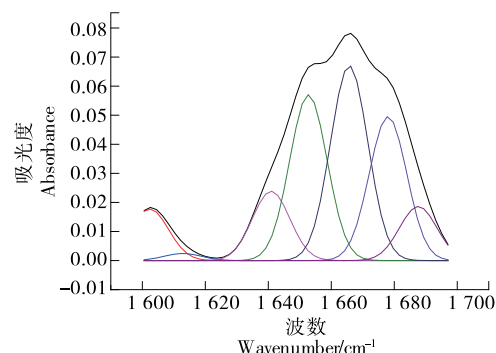
子的有序性, β -转角和无规卷曲代表蛋白分子的分散程度^[28]。这可能是因为酶解破坏了蛋白质间的氢键和肽键, 从而使蛋白质结构从有序向无序转变^[29]。

2.7 藁叶碎米荠低聚肽的扫描电镜

由图 5 可知, 藁叶碎米荠蛋白在酶解成低聚肽后, 微观结构有明显差异。藁叶碎米荠蛋白的外观结构以不规则片状结构存在, 表面比较平整光滑。酶解过 1 000 Da 超滤膜得到的低聚肽外观结构变化明显, 表面不再光滑, 变成具有许多小孔的海绵状。这可能是酶解导致蛋白质分子间的氢键和范德华力被破坏, 蛋白质结构被破坏, 内部结构中的疏水性基团暴露出来, 低聚肽的抗氧化活性可能会因此而提高^[24]。



(a) 红外光谱扫描图



(b) 酰胺 I 带分峰拟合图

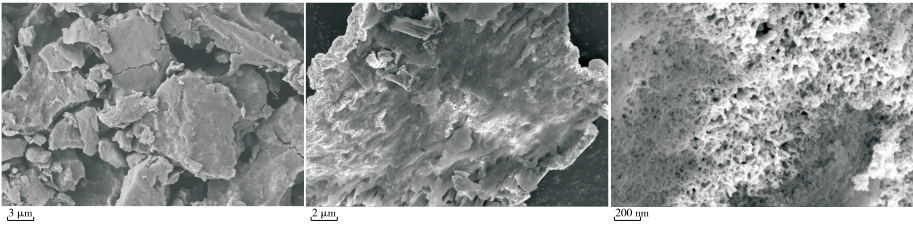
图 4 藁叶碎米荠低聚肽的红外光谱扫描图和酰胺 I 带分峰拟合图

Figure 4 FTIR spectrum and peak fitting diagram in the amide I band of *C. violifolia* oligopeptides

表 7 藁叶碎米荠低聚肽的二级结构含量

Table 7 The content of secondary structure of *C. violifolia* oligopeptides

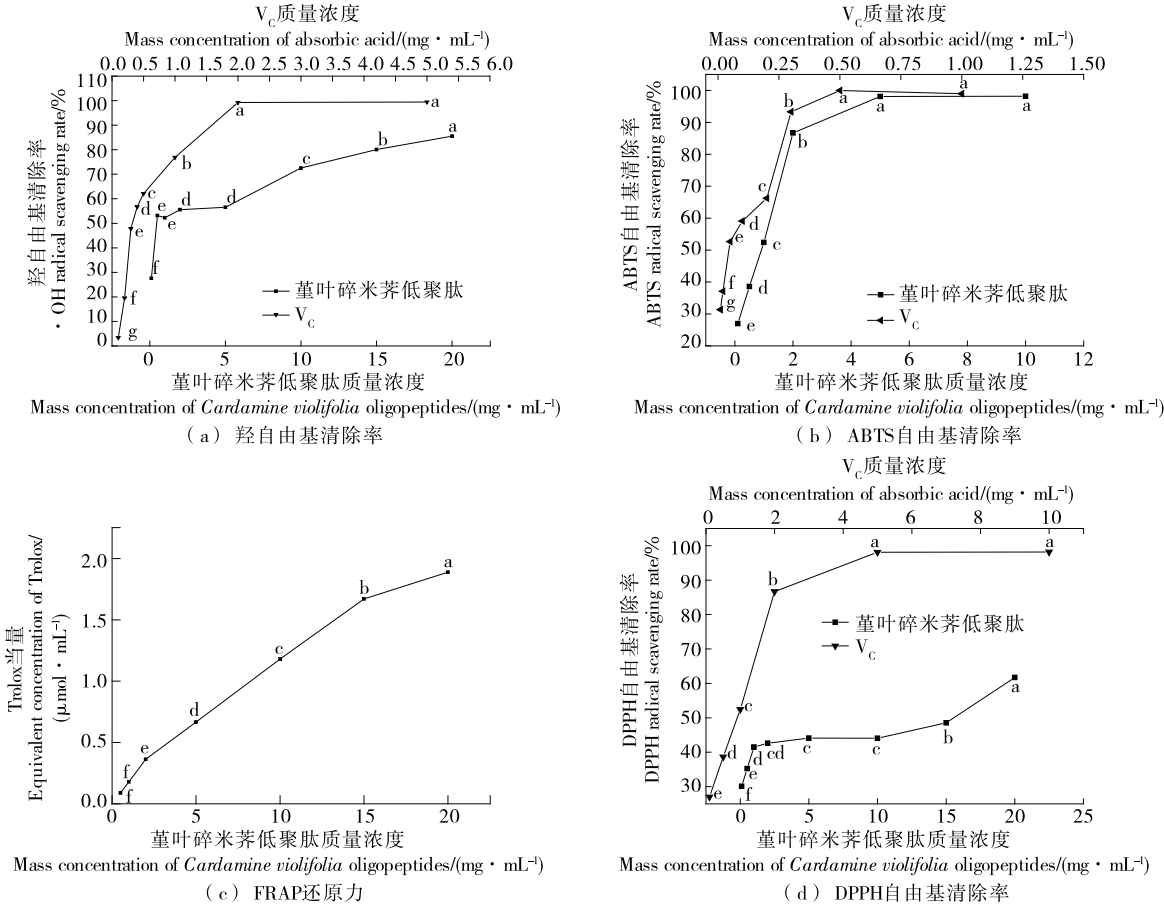
序号	波数/cm ⁻¹	二级结构	二级结构含量/%
1	1 602.41	β-折叠	7.23
2	1 612.84	β-折叠	1.03
3	1 640.90	无规卷曲	10.13
4	1 652.76	α-螺旋	24.19
5	1 665.71	β-转角	28.48
6	1 678.02	β-转角	21.03
7	1 687.63	β-转角	7.89



(a) 藁叶碎米荠蛋白(5 000 ×) (b) 藁叶碎米荠低聚肽(5 000 ×) (c) 藁叶碎米荠低聚肽(5万 ×)

图 5 藁叶碎米荠蛋白和低聚肽的扫描电镜

Figure 5 Scanning electron microscope of *C. violifolia* protein and oligopeptides



小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 6 藁叶碎米荠低聚肽的抗氧化能力

Figure 6 Antioxidant capacity of *C. violifolia* oligopeptides

2.8 藁叶碎米荠低聚肽的体外抗氧化能力

由图 6 可知,藁叶碎米荠低聚肽清除自由基($\cdot\text{OH}$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 和 $\text{ABTS}\cdot$)的能力和抗氧化能力(FRAP 法)均表现出明显的量效关系,随样品质量浓度的增加而增强;当藁叶碎米荠低聚肽质量浓度为 20 mg/mL 时,对羟自由基、ABTS 自由基和 DPPH 自由基的清除率分别为 84.54%,98.22%,60.33%,其 IC_{50} 值分别为 0.35,1.00,16.00 mg/mL,抗氧化能力(FRAP 法)为 1.82 $\mu\text{mol/mL}$ Trolox。藁叶碎米荠低聚肽表现出较好的抗氧化能力,可能是蛋白被酶解后,低相对分子质量水解物或肽更能有效地与自由基发生反应^[29];产生了一些离子化的氨基、羧

基等供氢体与富含疏水氨基酸的肽和活性氨基酸序列^[30-32],从而提高了抗氧化活性。有研究^[33]报道,多肽分子量越小,表现出的抗氧化能力越强,藁叶碎米荠蛋白水解度越好,相对分子质量越小,抗氧化活性越好。总体而言,藁叶碎米荠低聚肽清除自由基的能力相对于抗坏血酸要稍弱一些,但其作为植物来源,安全性高,是开发功能食品的良好原料。

3 结论

试验表明,藁叶碎米荠低聚肽的蛋白质、肽含量较高,硒含量为 (412.67 ± 12.00) mg/kg,必需氨基酸含量为24%且种类丰富,主要成分为相对分子质量 $<1\ 000$ 的小肽,外观结构呈明显的球体颗粒状,在200 nm处有肽键的特征吸收峰,二级结构以多种构象并存, β -转角为主要结构(57.4%)。藁叶碎米荠低聚肽的总抗氧化能力较强,对羟自由基、ABTS自由基的 IC_{50} 值分别为0.5,1.0 mg/mL。综上,藁叶碎米荠低聚肽是一种有效的抗氧化小肽,是开发富硒功能食品的优质原料。后续可进一步研究藁叶碎米荠低聚肽的精制纯化、稳定性、体内抗氧化活性及其他功能活性。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志: 第33卷[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 184.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China: Vol 33 [M]. Beijing: Science Press, 1987: 184.
- [2] 方志先, 廖朝林. 湖北恩施药用植物志[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2006: 388-389.
FANG Z X, LIAO C L. Medicinal flora of Enshi, Hubei[M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 2006: 388-389.
- [3] 龙澜, 殷红清, 薛华, 等. 野生转家种藁叶碎米荠营养成分分析及品质评价[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(11): 112-114.
LONG L, YIN H Q, XUE H, et al. Content determination of nutrients components in cultivated *Cardamine violifolia* from wild type and quality evaluation[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(11): 112-114.
- [4] 雷红灵, 方响亮, 周大寨. 藁叶碎米荠硒蛋白的体内抗氧化作用研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(1): 201-205.
LEI H L, FANG X L, ZHOU D Z. In vivo antioxidant of selenoprotein in *Cardamine violifolia*[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2015, 43(1): 201-205.
- [5] 杨大伟. 恩施高富硒植物碎米荠含硒多糖研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007: 24-25.
YANG D W. Studies on polysaccharide containing selenium of *Cardamine* with rich selenium from Enshi [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2007: 24-25.
- [6] 吕昊. 含硒蛋白运动补剂缓解运动性疲劳作用研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(21): 172-175.
- [7] 林樾. 藁叶碎米荠硒形态分析及其富硒多肽对肝癌细胞作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021: 42-43.
LIN Y. Speciation analysis of selenium in *Cardamine Violifolia* and its selenium enriched peptides activity in hepatoma cells[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021: 42-43.
- [8] 李雪. 紫花芸豆抗氧化肽的分离纯化及其稳定性的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019: 11-12.
LI X. Isolation, purification and stability of antioxidant peptides from purple bean [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019: 11-12.
- [9] 谢丽蒙, 程凡升, 袁瑾, 等. 食源性蛋白质水解度常数 h_{tot} 值的测定[J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(1): 15-18.
XIE L M, CHENG F S, YUAN J, et al. Study on the h_{tot} value of foodborne protein[J]. Amino Acids and Biological Resources, 2013, 35(1): 15-18.
- [10] 贾蕾, 何慧, 向极钎, 等. 碎米荠硒肽的制备及其体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 205-212.
JIA L, HE H, XIANG J Q, et al. Study on preparation and antioxidant activity of selenopeptide from *Cardamine ensiensis* in vitro[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 205-212.
- [11] 谭建宁, 杜成智, 梁巨艳, 等. 龙俐叶总游离氨基酸含量测定[J]. 南方农业学报, 2016, 47(4): 645-649.
TAN J N, DU C Z, LIANG C Y, et al. Determination of total free amino acid content in *Sauropus spatulifolius* Beille[J]. Journal of Southern Agricultural Sciences, 2016, 47(4): 645-649.
- [12] LIU W Y, LU J, GAO F, et al. Preparation, characterization and identification of calcium-chelating Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ossein oligopeptidess [J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(6): 851-860.
- [13] 朱孝晨. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白与多糖的制备及生物活性研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2018: 16.
ZHU X C. Preparation of C-phycoerythrin and polysaccharides from *Spirulina platensis* and their biological activities[D]. Yantai: Yantai University, 2018: 16.
- [14] QIN X, ZHANG J, LI G, et al. Structure and composition of a potential antioxidant obtained from the chelation of pea oligopeptide and sodium selenite[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103619.
- [15] ZHAO P, WANG Y, ZHANG Y, et al. The extraction of different proteins in selenium enriched peanuts and their antioxidant properties[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2016, 23(3): 353.
- [16] PANDHARE G R, KATKE S D. Studies on preparation of chia seed fortified cookies[J]. Contemporary Research in India, 2018, 8(1): 25-28.
- [17] AMAROWICZ R, NACZK M, SHAHIDI F. Antioxidant activity of

- various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(7): 2 755-2 759.
- [18] 张娅妮, 阮晓惠, 陈浩, 等. 核桃蛋白的酶解工艺优化及产物特性研究[J]. 中国油脂, 2021, 46(10): 18-23.
- ZHANG Y N, RUAN X H, CHEN H, et al. Optimization of enzymatic process and product properties of walnut protein [J]. China Oils and Fats, 2021, 46(10): 18-23.
- [19] 邓宇, 曹文红, 陈忠琴, 等. 白贝肉酶解工艺的优化及其产物呈味特性研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(3): 11-17.
- DENG Y, CAO W H, CHEN Z Q, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of *Monetaria moneta* and flavor characteristics of its products[J]. Chinese Condiments, 2023, 48(3): 11-17.
- [20] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 205-208.
- WANG Z, XU S Y, TANG J. Food chemistry[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009: 205-208.
- [21] PEREZE G, BECERRA L G, CERVANTES E L. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of glutelin from cocoa (*Theobroma cacao* L.) seed [J]. CyTA-Journal of Food, 2017, 15(4): 489-496.
- [22] SAIDI S, DERATANI A, BELLEVILLE M P, et al. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process [J]. Food Research International, 2014, 65: 329-336.
- [23] 樊雨梅, 汝文文, 史传超, 等. 阿胶低聚肽的成分分析及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 314-318, 323.
- FAN Y M, RU W W, SI C C, et al. Composition and its antioxidant activity of *Colla Corii Asini* oligopeptides [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 41(18): 314-318, 323.
- [24] 任海伟, 石菊芬, 王曼琪, 等. 藏绵羊胎盘肽的抗氧化能力及结构表征[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 162-169.
- REN H W, SHI J F, WANG M Q, et al. Antioxidant capacity of placental peptide from Tibetan sheep and its structural characterization[J]. Food & Machinery, 2019, 36(4): 162-169.
- [25] 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. Structural characteristics and in vitro antioxidative activity of oyster oligopeptides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 21(12): 261-269.
- [26] 邢其毅, 裴伟伟, 徐瑞秋, 等. 基础有机化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2016: 145-146.
- XING Q Y, PEI W W, XU R Q, et al. Basic organic chemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2016: 145-146.
- [27] MUTHUSELVI L, DHATHATHREYAN A. Simplecoacervates of zein to encapsulate gitoxin [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006, 51(1): 39-43.
- [28] 陈默. 珍珠油杏仁蛋白和抗氧化肽的制备及功能活性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022: 32-33.
- CHEN M. Preparation and functional activity of pearl oil apricot almond protein and antioxidant peptides [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022: 32-33.
- [29] ZHANG F, QU J, THAKUR K, et al. Purification and identification of an antioxidative peptide from peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed dreg[J]. Food Chemistry, 2019, 285: 266-274.
- [30] 刘文颖, 冯晓文, 程青丽, 等. 小麦低聚肽的结构特征及其体外抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 72-79.
- LIU W Y, FENG X W, CHENG Q L, et al. Structural characteristics and in vitro antioxidative activity of wheat oligopeptides[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 72-79.
- [31] BAO C, CHEN H, CHEN L, et al. Comparison of ACE inhibitory activity in skimmed goat and cow milk hydrolyzed by alcalase, flavourzyme, neutral protease and proteinase K [J]. Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology, 2016, 20: 77-84.
- [32] AMBIGAIPALAN P, AIKHALIFA A S, SHAHIDI F. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using alcalase, flavourzyme and thermolysin[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 1 125-1 137.
- [33] 刘文颖, 冯晓文, 程青丽, 等. 大米低聚肽的制备和结构表征及体外抗氧化作用[J]. 华南理工大学学报, 2021, 49(21): 47-54.
- LIU W Y, FENG X W, CHENG Q L, et al. Preparation, structural characterization and in vitro antioxidant activity of rice oligopeptides[J]. Journal of South China University of Technology, 2021, 49(21): 47-54.
- (上接第 166 页)
- [28] 黄祥元, 黄美容. 黄精提取物中总皂苷含量的测定[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 106-108.
- HUANG X Y, HUANG M R. Content determination of total saponins in extracts of *Rhizoma Polygonati*[J]. Food & Machinery, 2012, 28(6): 106-108.
- [29] 喻祖文, 张旺凡. 多倍体黄精中多糖和皂苷的提取及含量测定[J]. 中国现代中药, 2011, 13(5): 20-22.
- YU Z W, ZHANG W F. The extraction and determination of polyploid main active ingredients of *Polygonatum* [J]. Modern Chinese Medicine, 2011, 13(5): 20-22.
- [30] YOU X J, GUO R, WANG L, et al. Ultrasonic extraction process of saponins from *Polygonatum sibiricum* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(3): 163-166.
- [31] LIU G, FENG S, SUI M, et al. Extraction and identification of steroidal saponins from *Polygonatum cyrtoneura* Hua using natural deep eutectic solvent-synergistic quartz sand-assisted extraction method [J]. Journal of Separation Science, 2023, 46(7): 2200823.