

引用格式:

习雪玲, 杨茗婷, 覃婷, 廖斌, 张军. 长萼堇菜叶蛋白水解物的制备及其活性分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 716–722.

XI X L, YANG M T, QIN T, LIAO B, ZHANG J. Preparation and activity analysis of *Viola inconspicua* Blume leaf protein hydrolysates[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(6): 716–722.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



长萼堇菜叶蛋白水解物的制备及其活性分析

习雪玲^{1,2}, 杨茗婷^{1,2}, 覃婷^{1,2}, 廖斌³, 张军^{1,2*}

(1.广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006; 2.广东省生物技术候选药物重点实验室, 广东 广州 510006; 3.中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 以长萼堇菜(*Viola inconspicua* Blume)为材料, 优选碱提酸沉法参数, 提取其叶蛋白; 采用酶法制备叶蛋白水解物; 利用超滤法分离叶蛋白水解物组分, 分析叶蛋白水解物的抗氧化活性, 并对叶蛋白水解物组分进行固相萃取脱盐、HPLC 分析及其对肿瘤细胞的抑制活性和对线虫寿命影响的测试。结果表明: 采用料液比、碱提 pH 和酸沉 pH 分别为 1:9、10.0 和 4.5 的参数组合可稳定提取长萼堇菜叶蛋白; 优选的 3 种蛋白酶(木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶)均能有效将水解物主要酶解为相对分子质量小于 3.3×10^3 的组分, 并通过超滤可有效分离出相对分子质量分别为 $<1 \times 10^3$ (PH1)、 $1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ (PH2) 和 3×10^3 (PH3) 的 3 个组分; 长萼堇菜蛋白水解物中 PH1 组分的抗氧化活性和抑肿瘤细胞活性优于其他组分; PH1 和 PH2 延长线虫寿命的效果相近, 都优于 PH3。可见, 长萼堇菜叶蛋白水解物组分 PH1 更具应用开发价值。

关 键 词: 长萼堇菜; 叶蛋白; 蛋白水解物; 秀丽隐杆线虫; 生物学活性

中图分类号: TQ936.1; TQ464.7

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2020)06-0716-07

Preparation and activity analysis of *Viola inconspicua* Blume leaf protein hydrolysates

XI Xueling^{1,2}, YANG Mingting^{1,2}, QIN Ting^{1,2}, LIAO Bin³, ZHANG Jun^{1,2*}

(1.School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 2.Guangdong Province Key Laboratory for Biotechnology Drug Candidates, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 3.School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China)

Abstract: *Viola inconspicua* Blume was purified using the optimized alkali extraction and acid precipitation method. Leaf protein hydrolysates were prepared by enzymatic method. The components of leaf protein hydrolysates were separated by ultrafiltration, and their antioxidant activities were analyzed. The isolated hydrolysate components were desalted by solid phase extraction, evaluated by HPLC analysis, and assayed the inhibitory activities to tumor cells along with the effects on lifespan of nematodes. *V. inconspicua* leaf proteins could be stably extracted with the optimized parameters(ratio of material to liquid 1:9, pH value of alkali extraction 10.0, and pH value of acid precipitation 4.5). The three selected proteases(papain, basic protease and flavor enzyme) could make most of hydrolysates with relative molecular weight less than 3.3×10^3 , and ultrafiltration could isolate the groups of hydrolysate components with molecular weight of $<1 \times 10^3$ (PH1), $1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ (PH2) and 3×10^3 (PH3), respectively. The antioxidant activity and anticancer activity of the component PH1 were better than those of other components. PH1 and PH2 had similar effects on lifespan of nematodes, but both were

收稿日期: 2020-06-28

修回日期: 2020-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570506); 广东药科大学创新强校项目(2017KCXTD020)

作者简介: 习雪玲(1992—), 女, 湖北襄阳人, 硕士研究生, 主要从事植物活性肽研究, 2296510646@qq.com; *通信作者, 张军, 博士, 副教授, 主要从事乡土植物资源研究, lsszhangj@gdpu.edu.cn

superior to PH3. Therefore, the component PH1 of *Viola inconspicua* leaf protein hydrolysates had more application and development value.

Keywords: *Viola inconspicua* Blume; leaf proteins; protein hydrolysates; *Caenorhabditis elegans*; biological activity

植物蛋白质及其水解物可应用于饲料、食品和健康产品等^[1]。相较于蛋白质,蛋白水解物一般有更好的生物可吸收性^[2]。已有玉米、绿豆、核桃等种子蛋白水解物的研究^[2-4]和苜蓿、花椰菜、桑椹等叶蛋白水解物的研究^[5-7]。相较于种子,植物叶的资源更丰富和更经济,但叶的蛋白含量明显低于种子的蛋白含量,且叶中含有较多的多糖、多酚和色素等成分,导致叶蛋白普遍较难提取^[8]。碱提酸沉法可用于大量提取叶蛋白,但其最适的料液比和碱提、酸沉 pH 值等提取参数因植物不同而异,需进行有针对性的优化^[9]。此外,在制备植物蛋白水解物的过程中,也需通过超滤等方法分离出水解物更具代表性的活性组分^[10]。

植物源蛋白水解物有多种生物学活性,如从大豆、桑椹和当归中制备的蛋白水解肽分别具有典型的抗肿瘤、抗氧化和抗衰老的活性^[7,11-12]。来源于不同植物(特别是远亲缘关系植物)中的蛋白水解物一般会呈现较大的序列差异性^[13]。基于序列决定活性,为分离出活性更典型的蛋白水解物,有必要在更多科属来源的和更多地域特色的植物中开展蛋白水解物研究。

植物叶蛋白的提取方法主要有苯酚提取法、TCA/丙酮提取法、TCA/丙酮/苯酚提取法及碱提酸沉法^[12,14]。前 3 种方法多用于蛋白质组等微量蛋白试验分析^[12];碱提酸沉法适于规模化提取蛋白质及其后续的水解肽制备与活性评估。有研究^[5,15-16]采用碱提酸沉法提取水稻胚乳蛋白、黑豆蛋白和苜蓿叶蛋白,经酶解制备水解肽后进一步分析其生物学活性。在制备蛋白质水解物过程中,常用的蛋白酶有胰酶、胃蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶^[4,9-10,17-18]。相对而言,后 3 种酶因易购、经济和产物多样性高等应用更普遍。

广东省现有堇菜属植物 20 余种。长萼堇菜(*Viola inconspicua* Blume)是其中资源最丰富的品种^[19-20]。长萼堇菜的活性肽和代谢产物具有典型

的抗炎、抗菌和抗氧化活性^[19,21]。前期研究^[19-20]解析了长萼堇菜的短序列 cDNA 谱和转录组,进而从该植物中鉴定了一系列活性肽。长萼堇菜转录组编码数以万计的蛋白序列,这些蛋白的人工酶解,有望释放出序列组成丰富多样的蛋白水解物。目前,关于堇菜科植物叶蛋白水解物的组分及活性鲜见报道。

本研究中,采用碱提酸沉法提取长萼堇菜叶蛋白,并优选最适料液比和碱提、酸沉 pH 值,采用木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶水解叶蛋白,采用超滤分离出不同分子量范围的组分,评估不同组分潜在的抗氧化活性、抑癌细胞活性与延长线虫寿命活性,旨在优化长萼堇菜叶蛋白水解物的制备方法,明确蛋白水解物的活性及其组分差异,以期促进长萼堇菜的人工栽培和开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为广州大学城正常土壤生长的草本植物长萼堇菜。

1.2 方法

1.2.1 长萼堇菜叶蛋白的提取和酶解

采用碱提酸沉法^[5]提取长萼堇菜叶蛋白。利用 Glycine-SDS-PAGE 电泳检测分析不同料液比(1 8、1 9 和 1 10)、碱提 pH 值(8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 和 10.5)和酸沉 pH 值(4.5、5.0 和 5.5)对叶蛋白提取结果的影响。参照文献[22]的方法,用木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和碱性蛋白酶(索莱宝)水解长萼堇菜叶蛋白;利用 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测分析酶解效果。碱性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶水解的长萼堇菜叶蛋白水解物分别记为 APHr、FPHr 和 PPHr。

1.2.2 蛋白水解物的超滤分离与抗氧化分析

根据蛋白酶解结果, 参照文献[23-24]的方法, 采用膜超滤法分离 APHr、FPHr 和 PPHr, 其中相对分子质量小于 1×10^3 的分别记为 APH1、FPH1 和 PPH1, 相对分子质量为 $1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ 的分别记为 APH2、FPH2 和 PPH2, 相对分子质量大于等于 3×10^3 的分别记为 APH3、FPH3、PPH3。将各组水解物冻干, 备用。采用 DPPH 法^[25-26]分析各组水解物的抗氧化活性, 以还原性谷胱甘肽(GSH)为阳性对照。

1.2.3 蛋白水解物的固相萃取与 HPLC 分析

基于增加水解物序列多样性的考虑, 先将超滤分离的 3 种酶促水解物组分依据同一相对分子质量范围条件等比例预混成 3 个组分, 相对分子质量由小到大, 分别记为 PH1、PH2、PH3, 再用于固相萃取(SPE)脱盐、HPLC 分析和活性分析。利用 C_{18} 固相萃取柱脱盐纯化超滤分离组分, 洗脱液用氮吹仪浓缩后冻干, 备用。采用分析型 HPLC(LC3000, 创新通恒)色谱法^[2]比较不同组分的水解物, 评估超滤分离效果。HPLC 条件: 分析柱型号为依利特 SinoChrom 300A($10 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$); 流动相 A 相为 5% 乙腈/0.1% 三氟乙酸, B 相为 90% 乙腈/0.1% 三氟乙酸。

1.2.4 细胞和线虫试验

采用 CCK8 法^[27]分析不同终质量浓度(0.00、0.02、0.10 mg/mL)的 PH1、PH2、PH3 对肿瘤细胞(人骨肉瘤 143B 细胞)的抑制活性, 其中, 以顺铂(DDP)和 5-氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照。采用标准方法^[28]培养野生型秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)和同步化, 选取 L4 期线虫分析蛋白水解物对线虫寿命的影响。

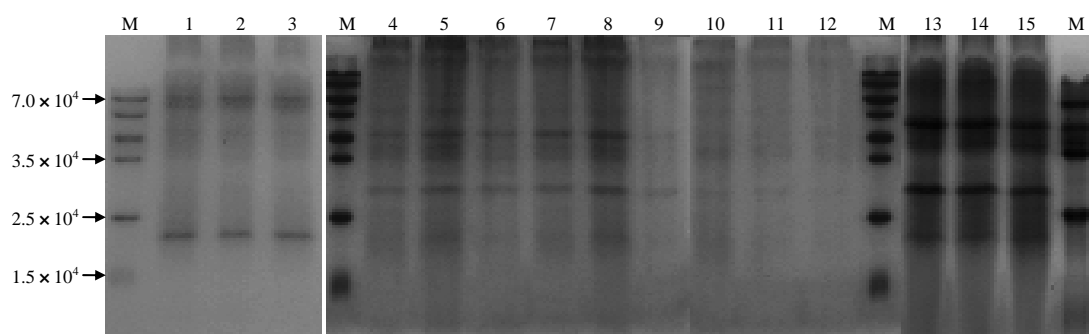
1.3 数据处理与统计分析

运用 Microsoft Excel 2016、Graph Pad Prism 8 和 SPSS 19.0 分析试验数据, 采用单因素方差分析方法(ANOVA)进行组间差异分析。

2 结果与分析

2.1 料液比和碱提与酸沉 pH 值对长萼堇菜叶蛋白提取的影响

从图 1 的 1~3 泳道可以看出, 3 种料液比提取的叶蛋白浓度相近。考虑到蛋白提取的稳定性和经济性, 在后续的比较试验中, 料液比定为 1 9。从 4~9 泳道可以看出, 碱提 pH 值为 10.0 时, 叶蛋白浓度相对较高。从 10~12 泳道可以看出, 酸沉 pH 值为 4.5 时, 蛋白条带相对较清晰。从 13~15 泳道可以看出, 以料液比 1 9、碱提 pH 值 10.0 和酸沉 pH 值 4.5 的参数组合, 可稳定提取长萼堇菜叶蛋白。



M 预染蛋白 Marker; 1~3 料液比分别为 1 8、1 9、1 10 时提取的蛋白; 4~9 碱提 pH 值分别为 8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5 时提取的蛋白; 10~12 酸沉 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5 时提取的蛋白; 13~15 优选条件下提取的 3 组叶蛋白。

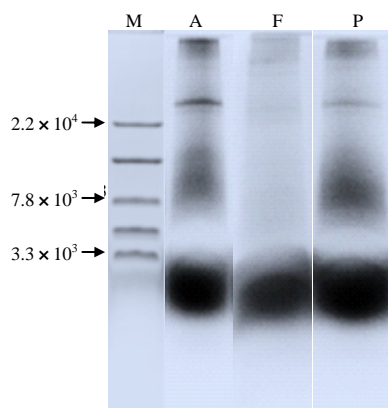
图 1 不同参数条件下提取的长萼堇菜叶蛋白的 Glycine-SDS-PAGE 检测结果

Fig.1 The result of Glycine-SDS-PAGE analysis of *Viola inconspicua* leaf proteins extracted by different parameters

2.2 3 种蛋白酶对长萼堇菜叶蛋白的水解效果

从图 2 可知, 3 种酶促水解产物均以相对分子质量小于 3.3×10^3 的含量较多。基于此, 选择通过

2 种超滤膜进一步从原初水解物(APHr、FPHr、PPHr)中分离出不同相对分子质量范围的组分。



M 多肽 Marker ; A APhr ; F FPhr ; P PPhr。

图 2 3 种蛋白酶水解长萼堇菜叶蛋白质 2 h 后的产物的 Tricine-SDS-PAGE 检测结果

Fig.2 The result of Tricine-SDS-PAGE analysis of hydrolysates digested from *Viola inconspicua* leaf proteins by three enzymes for 2 hours

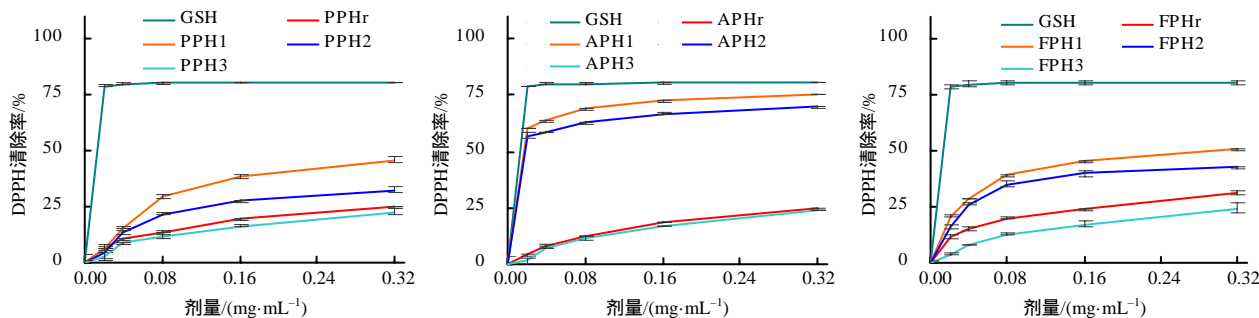


图 3 长萼堇菜叶蛋白水解物对 DPPH 的清除率

Fig.3 DPPH scavenging ratios of *Viola inconspicua* leaf protein hydrolysates

2.4 长萼堇菜叶蛋白水解物的超滤分离效果

如图 4 所示,在前 10 min, PH1 只有 1 个主要的色谱峰,而 PH2 和 PH3 各有 2 个明显的色谱峰。这应归因于 PH2 和 PH3 的相对分子质量范围

2.3 长萼堇菜叶蛋白水解物的抗氧化活性

从图 3 可知,不同水解物组分的抗氧化活性与其使用剂量呈正相关,与其相对分子质量大小呈负相关。相对分子质量小于 1×10^3 的水解物组分的抗氧化活性最强;3 种酶解产生的相对分子质量小于 1×10^3 的水解物组分的抗氧化活性间差异有统计学意义($P < 0.05$)。使用剂量为 $0.04 \sim 0.16$ mg/mL 时,同等剂量的 PPH1、APH1 和 FPH1 对 DPPH 的清除率差异极显著($P < 0.01$)。APH1 对 DPPH 清除的 IC_{50} 值(4.08×10^{-3} mg/mL)极显著低于 PPH1 的(3.41×10^{-1} mg/mL)和 FPH1 的(2.60×10^{-1} mg/mL)。这一结果应归因于 3 种酶对叶蛋白的不同酶切位点能释放不同序列组成的蛋白水解物。

大于 PH1 的。可见,用反相 HPLC 色谱法检测 PH1、PH2 和 PH3,可快速定性分析长萼堇菜叶蛋白水解物组分的超滤分离效果。

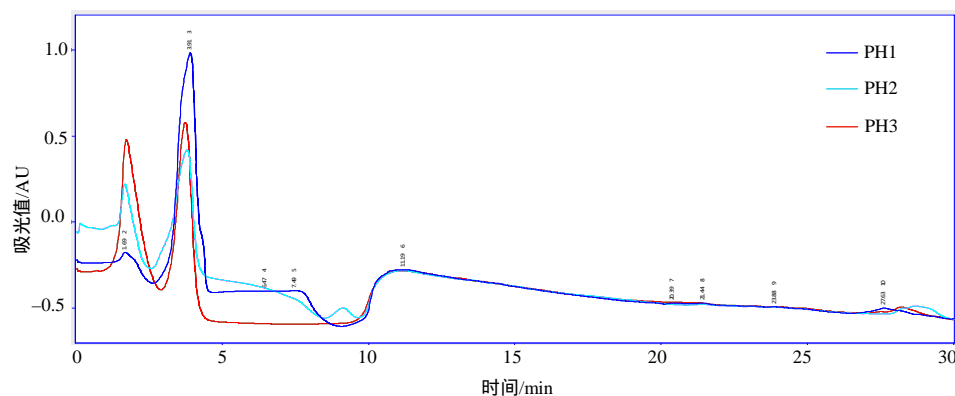


图 4 不同相对分子质量范围的长萼堇菜叶蛋白水解物的 HPLC 分析结果

Fig.4 The result of HPLC analysis of *Viola inconspicua* leaf protein hydrolysates with different relative molecular weight ranges

2.5 长萼堇菜叶蛋白水解物的抗肿瘤细胞活性

从图 5 可知,不同水解物组分对 143B 细胞活

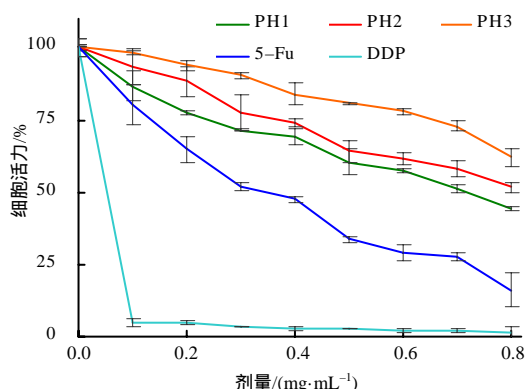


图 5 长萼堇菜叶蛋白水解物对肿瘤细胞活性的抑制作用

Fig.5 Activity inhibition of tumor cells treated by *Viola inconspicua* leaf protein hydrolysates

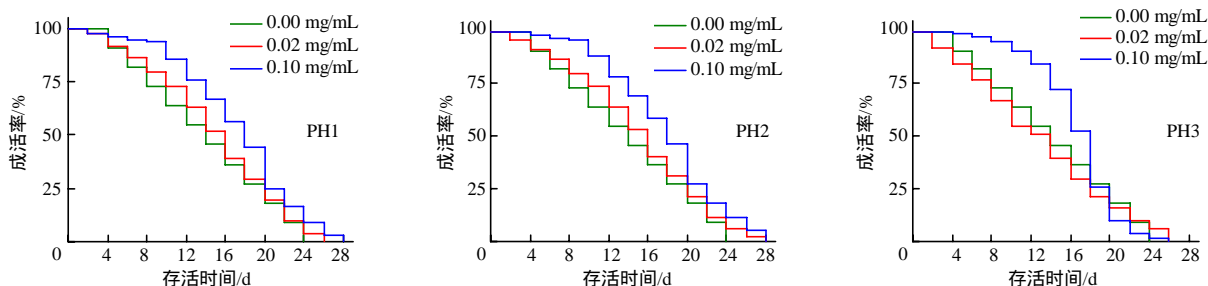


图 6 添加长萼堇菜叶蛋白水解物后的线虫寿命

Fig.6 Lifespan of *Caenorhabditis elegans* fed with *Viola inconspicua* leaf protein hydrolysates

3 结论与讨论

本研究中,采用碱提酸沉法成功制备了长萼堇菜叶蛋白。在使用该方法提取不同植物的蛋白时,依据起始材料性质的不同,最适的料液比、碱提 pH 值和酸沉 pH 值会有相应的差异。苜蓿干草为原料的最适料液比、碱提 pH 和酸沉 pH 分别为 1:35、10 和 4.2^[29];甘薯鲜叶为原料的最适料液比、碱提 pH 和酸沉 pH 分别为 1:4、8.0 和 4.5^[30];牡丹籽饼为原料的最适料液比、碱提 pH 和酸沉 pH 分别为 1:12、8.5 和 4.0^[31]。本研究优选的提取长萼堇菜叶蛋白最适的料液比、碱提 pH 和酸沉 pH 分别为 1:9、10.0 和 4.5,均介于上述文献所用的参数数值范围内。

在来源于植物的蛋白质水解物中,现已发现的典型活性成分主要在相对分子质量小于等于 3×10^3 的组分中^[5,15,23]。本研究中,长萼堇菜叶蛋白的 3 种酶促水解产物均以相对分子质量小于 3.3×10^3 的含量较多。在抗氧化方面,已从大米、

力的抑制作用低于化疗药物 5-Fu 和 DDP 的,但仍表现出一定的抑制活性;3 组水解物的抗肿瘤细胞活性均与其使用剂量呈正相关,与其相对分子质量大小呈负相关,PH1 的抗肿瘤细胞活性最强。

2.6 长萼堇菜叶蛋白水解物的延长线虫寿命活性

如图 6 所示,未添加水解物的线虫组中,线虫存活时间低于 25 d;添加 PH1、PH2 和 PH3 的线虫组中,水解物质量浓度为 0.10 mg/mL 组的延寿效应整体优于 0.02 mg/mL 组的,且最大存活时间分别是 28、28、26 d,PH1 和 PH2 对线虫寿命的延长作用优于 PH3 的。

小麦、核桃、板栗和紫苏等植物中鉴定出有较强抗氧化活性的蛋白水解肽,同时也发现相对分子质量小于 1×10^3 的肽段的抗氧化能力显著强于相对分子质量大于 3×10^3 的多肽和蛋白质组分的^[2,15,23-24,26]。本研究中,长萼堇菜叶蛋白水解物中相对分子质量小于 1×10^3 的组分具有最优的抗氧化活性,与上述研究结果一致。

在抗肿瘤方面,部分植物的蛋白水解物已被发现有明显的抑瘤效应^[11,32-33]。大豆蛋白水解物能显著抑制 2 种肿瘤细胞(HeLa 和 C-3)的活性,IC₅₀ 值分别为 2.15、2.27 mg/mL^[11]。从嘉兰(*Gloriosa superba*)根茎蛋白水解物中纯化的相对分子质量约为 3×10^3 的多肽对 SW620 细胞具有抑制活性^[32]。本研究中,长萼堇菜叶蛋白水解物对肿瘤细胞表现出一定的抑制活性,以相对分子质量小于 1×10^3 的组分的抑制效果相对最优。

在抗衰老方面,从当归蛋白水解物中分离的多肽组分(约 20 aa)^[12]和从玉米中分离的二肽

(TA)^[34]均可延长线虫寿命。抗氧化剂被认为具有延寿效应^[35],同时蛋白水解肽的抗氧化活性也被认为涉及对线虫的延寿机制^[12]。本研究中,长萼堇菜叶蛋白水解物中的组分 PH1 和 PH2 对秀丽隐杆线虫寿命的延长作用和抗氧化活性均优于组分 PH3 的,表明蛋白水解物组分的抗衰老活性与抗氧化活性呈正相关。

综上所述,在长萼堇菜叶蛋白水解物组分中,相对分子质量小于 1×10^3 的组分具有更好的应用开发潜力。

参考文献:

- [1] ZHANG C, SANDERS J P M, XIAO T T, et al. How does alkali aid protein extraction in green tea leaf residue: a basis for integrated biorefinery of leaves[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133046.
- [2] SHENG J, YANG X, CHEN J, et al. Antioxidative effects and mechanism study of bioactive peptides from defatted walnut(*Juglans regia* L.) meal hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(12): 3305–3312.
- [3] JIN D X, LIU X L, ZHENG X Q, et al. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 427–436.
- [4] BUDSEEKOAD S, TAKAHASHI YUPANQUI C, ALASHI A M et al. Anti-allergic activity of mung bean (*Vigna radiata*(L.) Wilczek) protein hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis using non-gastrointestinal and gastrointestinal enzymes[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): e12674.
- [5] XIE Z J, HUANG J R, XU X M, et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 370–376.
- [6] XU Y, LI Y T, BAO T, et al. A recyclable protein resource derived from cauliflower by-products: potential biological activities of protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 114–122.
- [7] SUN C, TANG X, REN Y, et al. Novel antioxidant peptides purified from mulberry(*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf protein hydrolysates with hemolysis inhibition ability and cellular antioxidant activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(27): 7650–7659.
- [8] WANG N, WU X L, KU L X, et al. Evaluation of three protein-extraction methods for proteome analysis of maize leaf midrib, a compound tissue rich in sclerenchyma cells[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 856.
- [9] GÖRGÜÇ A, BIRCAN C, YILMAZ F M. Sesame bran as an unexploited by-product: effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds[J]. Food Chemistry, 2019, 283: 637–645.
- [10] LÓPEZ-BARRIOS L, ANTUNES-RICARDO M, GUTIÉRREZ-URIBE J A. Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black bean(*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion[J]. Food Chemistry, 2016, 203: 417–424.
- [11] MORA-ESCOBEDO R, ROBLES-RAMÍREZ M D C, RAMÓN-GALLEGOS E, et al. Effect of protein hydrolysates from germinated soybean on cancerous cells of the human cervix: an in vitro study[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2009, 64: 271.
- [12] WANG Q Q, HUANG Y X, QIN C X, et al. Bioactive peptides from Angelica *sinensis* protein hydrolyzate delay senescence in *Caenorhabditis elegans* through antioxidant activities[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016: 8956981.
- [13] PARK S, YOO K O, MARCUSSEN T, et al. Cyclotide evolution: insights from the analyses of their precursor sequences, structures and distribution in violets (*Viola*)[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2058.
- [14] WANG W, SCALI M, VIGNANI R, et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds[J]. Electrophoresis, 2003, 24(14): 2369–2375.
- [15] ZHANG J H, ZHANG H, WANG L, et al. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide[J]. European Food Research and Technology, 2009, 229(4): 709–719.
- [16] EVANGELHO J A D, VANIER N L, PINTO V Z, et al. Black bean(*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: physicochemical and functional properties[J]. Food Chemistry, 2017, 214: 460–467.
- [17] 霍永久, 刘正旭, 金晓君, 等. 鸡蛋清和蛋白多酶水解工艺的优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(2): 149–155.
HUO Y J, LIU Z X, JIN X J, et al. Optimization for hydrolyzing process of egg white protein using multi-enzyme[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2015, 41(2): 149–155.
- [18] AIELLO G, LAMMI C, BOSCHIN G, et al. Exploration of potentially bioactive peptides generated

- from the enzymatic hydrolysis of hempseed proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(47): 10174–10184.
- [19] ZHANG J, LI J T, HUANG Z, et al. Transcriptomic screening for cyclotides and other cysteine-rich proteins in the metallophyte *Viola baoshanensis*[J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 178: 17–26.
- [20] SHU H Y, ZHANG J, LIU F Y, et al. Comparative transcriptomic studies on a cadmium hyperaccumulator *Viola baoshanensis* and its non-tolerant counterpart *V. inconspicua*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(8): E1906.
- [21] PARSLEY N C, SADECKI P W, HARTMANN C J, et al. *Viola “inconspicua”* no more: an analysis of antibacterial cyclotides[J]. Journal of Natural Products, 2019, 82(9): 2537–2543.
- [22] JIANG H P, TONG T Z, SUN J H, et al. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad(*Decapтерus maruadsi*) muscle protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2014, 154: 158–163.
- [23] ZOU Z P, WANG M J, WANG Z G, et al. Antihypertensive and antioxidant activities of enzymatic wheat bran protein hydrolysates[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(1): e13090.
- [24] FENG Y X, RUAN G R, JIN F, et al. Purification, identification, and synthesis of five novel antioxidant peptides from Chinese chestnut(*Castanea mollissima* Blume) protein hydrolysates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 92: 40–46.
- [25] 袁野, 朱仕豪, 凌志辉, 等. 瓜蒌皮多酚纯化工艺及抗氧化活性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2019, 45(4): 420–424.
- YUAN Y, ZHU S H, LING Z H, et al. The purification process and antioxidant activity of polyphenols from the pericarpium trichosanthis[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2019, 45(4): 420–424.
- [26] KIM J M, LICEAGA A M, YOON K Y. Purification and identification of an antioxidant peptide from perilla seed(*Perilla frutescens*) meal protein hydrolysate[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(5): 1645–1655.
- [27] CAI L, QIN X J, XU Z H, et al. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and cck-8 method[J]. ACS Omega, 2019, 4(7): 12036–12042.
- [28] ZHOU Y, XU Q G, ZHOU X H, et al. Stress resistance and lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* enhanced by peptides from mussel(*Mytilus edulis*) protein hydrolysate[J]. Food & Function, 2018, 9(6): 3313–3320.
- [29] 许英一, 李红, 杨伟光, 等. 碱提酸沉法提取紫花苜蓿干草叶蛋白初探[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 264–266.
- XU Y Y, LI H, YANG W G, et al. Study on preparation of leaf protein from alfalfa hay by alkali extraction and acid precipitation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(6): 264–266.
- [30] 吕巧枝, 木泰华, 孙艳丽. 甘薯叶可溶性蛋白提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 18–22.
- LV Q Z, MU T H, SUN Y L. Study on the extraction technology of soluble protein from sweet potato leaves[J]. Food Research and Development, 2007, 28(3): 18–22.
- [31] 徐玥, 张存芳, 杨耿, 等. 碱提酸沉法提取牡丹籽饼中蛋白质的研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(8): 28–30.
- XU Y, ZHANG C L, YANG G, et al. Extraction of protein from peony seed cake by alkali extraction and acid precipitation method[J]. China Oils and Fats, 2019, 44(8): 28–30.
- [32] JAHANBANI R, GHAFARI S M, SALAMI M, et al. Antioxidant and anticancer activities of walnut(*Juglans regia* L.) protein hydrolysates using different proteases[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2016, 71(4): 402–409.
- [33] BUDCHART P, KHAMWUT A, SINTHUVANICH C, et al. Partially purified *Gloriosa superba* peptides inhibit colon cancer cell viability by inducing apoptosis through p53 upregulation[J]. The American Journal of the Medical Sciences, 2017, 354(4): 423–429.
- [34] ZHANG Z, ZHAO Y, WANG X, et al. The novel dipeptide Tyr-Ala(TA) significantly enhances the lifespan and healthspan of *Caenorhabditis elegans*[J]. Food & Function, 2016, 7(4): 1975–1984.
- [35] DETIENNE G, DE HAES W, MERGAN L, et al. Beyond ROS clearance: peroxiredoxins in stress signaling and aging[J]. Ageing Research Reviews, 2018, 44: 33–48.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳 正