碎米荠蛋白制备工艺及抗氧化活性

杜朝东[1]，于 添[2]，丛 欣[2]，陈尚卫[1]，朱 松[*1]

（1. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏无锡 214122；2. 恩施德源健康科技发展有限公司，湖北 恩施 445000）

摘要：以恩施堇叶碎米荠为原料，研究碎米荠硒蛋白的提取工艺，探讨碎米荠蛋白的抗氧化活性，结果表明：提取温度为 50 ℃，料液质量体积比为 1 g:40 mL，先后用去离子水和 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液分别提取 8 h。在此工艺条件下蛋白质得率最高，为 75.4%，其中水提蛋白质质量分数为 26.5%，硒质量分数为 1 748 μg/g；碱提蛋白质质量分数为 52.3%，硒质量分数为 1 513 μg/g。碎米荠碱提蛋白经 Sephadex G-100 凝胶层析柱分离得到两个组分，分别为峰 1 和峰 2，硒质量分数分别为 668 μg/g 和 650 μg/g，通过研究碎米荠蛋白对羟自由基（·OH）和 1-1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基（·DPPH）的清除能力，发现碎米荠蛋白均有一定的清除自由基的能力。

关键词：碎米荠，蛋白质，硒，提取工艺

中图分类号：TS 255　**文章编号：**1673-1689(2020)01-0068-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.01.010

Preparation of Cardamine Protein and Its Antioxidant Activity

DU Chaodong[1]，*YU Tian*[2]，*CONG Xin*[2]，*CHEN Shangwei*[1]，*ZHU Song*[*1]

（1. State Key Laboratory of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Enshi Deyuan Health Technology Development Limited Company，Enshi 445000，China）

Abstract： In order to develop and utilize Enshi Cardamine，in this paper，the extraction process of selenoprotein was studied，and the antioxidant activity of selenoprotein was investigated. The results indicated that the optimal conditions for the extraction were as follows: material ratio 1:40 g/mL，the extraction temperature was 50 ℃，the extraction time was 8 h by distilled water and then 8 h by 0.1 mol/L NaOH solution. Under the optimal conditions，the extraction rate of selenopratein was up to 75.4%. The content of water soluble protein was 26.5 g/dg，the selenium content was 1 748 μg/g，the content of alkali soluble protein was 52.3 g/dg，and the selenium content was 1 513 μg/g. The alkali soluble protein were separated by Sephadex G-100 gel chromatography，and two components were obtained，peak 1 and peak 2. The selenium content of peak 1 was 668 μg/g and the selenium content of peak 2 was 650 μg/g. By studying the ability of cardamine proteins to scavenge hydroxyl free radicals（·OH）and 1-diphenyl-2-trinitrophenyl hydrazine free radicals（·DPPH），it was found that the cardamine protein have certain ability to scavenge free radicals.

Keywords： cardamine，protein，selenium，extraction process

收稿日期：2018-08-08

基金项目：国家自然科学基金项目（31871794）；食品科学与技术国家重点实验室自主科研课题（SKLF-ZZB-201809）。

* **通信作者：**朱松（1979—），男，博士，副研究员，硕士研究生导师，主要从事功能性食品研究。E-mail：zhusong@jiangnan.edu.cn

硒是一种人类必须的微量元素，具有抗氧化[1~2]、抗肿瘤[3]、抗疲劳[4~5]和拮抗有害金属[6]等生物活性。中国营养学会将硒列为每日膳食营养素，建议成人每日适宜摄入量应在 50~250 μg，2014 年将最低摄入量提升至 60 μg。我国约有 70%的区域处于低硒地带，所以适当补充硒是必要的。硒分为有机硒和无机硒。由于吸收方式不同，有机硒的生物利用度远远高于无机硒，其中硒代蛋氨酸(Se-Met)的生物利用度更是在 90%以上，因此正确的补硒方式为适当补充富含有机硒的食物，有机硒主要以硒蛋白和硒多糖的形式存在，其中以硒蛋白为主[7]。硒蛋白的提取是研究硒蛋白性质的前提，常用的提取方法为溶剂提取法，同时辅以搅拌、超声或冻融等，但超声或冻融处理会破坏硒蛋白结构，甚至降低硒代氨基酸含量，使有机硒含量降低，不利于硒蛋白的提取。提取溶剂通常选用水、碱、醇、盐等，根据根据蛋白种类选用适宜的溶剂，或采用不同溶剂多次提取以提高硒蛋白提取率，高林[8]对采用碱提法提取富硒花生中的硒蛋白，蛋白得率高达 87%。

恩施碎米荠是一种超富硒植物，硒质量分数高达 1 400 mg/kg[9~10]，刘坤媛等[11]研究发现碎米荠蛋白中有机硒的含量远远高于富硒酵母、富硒花生等，其中有机硒以硒蛋白为主[12]。硒蛋白中硒的形态主要以硒代半胱氨酸(Se-Cys)和 Se-Met 为主，这使得碎米荠硒蛋白中硒更易于被人体吸收利用。当前人们对碎米荠硒蛋白有一定研究，国外对碎米荠硒蛋白的研究主要集中在碎米荠硒蛋白的生物利用度、结构与功能上[13]，而国内主要集中在碎米荠硒蛋白的结构特性、抗疲劳[11]和体内抗氧化上[14]，但对碎米荠碱提蛋白的研究较少。

作者以恩施碎米荠为原料，首先优化碎米荠硒蛋白提取工艺，初步探讨碎米荠蛋白抗氧化活性，为开发高附加值的碎米荠硒蛋白提供数据支持，拓展其在功能性食品方面的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

堇叶碎米荠：由恩施德源健康科技发展有限公司提供。

牛血清蛋白 BR，国药集团化学试剂限公司；福林酚、碳酸钠、硼氢化钾、铁氰化钾、氢氧化钾、氢氧化钠、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、福林酚试剂、五水合硫酸铜、四水合酒石酸钠 AR，国药集团化学试剂有限公司；硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸 北京百灵威科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SCIENTZ-10N 冷冻干燥机：宁波生物科技有限公司产品；SHA-B 双功能水浴振荡器：天津赛得利斯实验分析仪器制造厂产品；721N 型可见光分光光度计：上海仪电分析仪器有限公司产品；TD6 台式低速离心机：湖南赫西仪器装备有限公司产品；AF-600 原子荧光光谱仪：北京瑞利分析仪器有限公司产品；Waters1525 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器和 Empower 工作站 GPC 软件)：美国沃特世公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 总蛋白质含量测定 凯氏定氮法，参考国标 GB/T 5009.5-2016 进行。

1.3.2 提取溶剂的选择 参考陈雪青[15]的方法确定碎米荠蛋白种类：将干燥好的碎米荠打粉，过 80 目筛，称取 4 份碎米荠粉末各 20 g，按 1 g:40 mL，分别加入去离子水、NaCl 溶液(1 mol/L)、乙醇溶液(体积分数 80%)、碱液(0.1 mol/L 的 NaOH 溶液)，在 50 ℃下搅拌 8 h，2 810 *g* 离心 15 min，收集上清液，测定蛋白含量，比较各溶剂的得率，从而确定提取溶剂。

1.3.3 蛋白质得率的计算 溶液中蛋白质的测定参考胡宇航等[16]的方法(Folin-酚法)。绘制牛血清蛋白标准曲线为 Y=0.002 3X+0.0262，Y 为反应液的吸光度；X 为溶液中蛋白质的浓度，μg/mL；相关系数为 R^2=0.999 3，线性范围为 0~340 μg/mL。

蛋白质得率计算公式为：

蛋白质得率 (%)=提取液中蛋白质的质量(g)/恩施碎米荠质量(g)×100

1.3.4 蛋白提取工艺研究

1) 碎米荠蛋白提取工艺单因素实验 参考李宝瑞等[17]的方法，考察提取温度、提取时间、料液质量体积比和碱液浓度对蛋白质得率的影响，研究碎米荠硒蛋白提取工艺。

2)两次提取对提取率的影响 称取 4 g 碎米荠粉末按料液质量体积比 1 g:40 mL，加入去离子水，在 50 ℃下搅拌 8 h，2 810 *g* 离心 15 min，收集上清液，测定蛋白含量，再次向残渣中按 1 g:40 mL 加入去离子水，在 50 ℃下搅拌 8 h，2 810 *g* 离心 15 min，收集上清液，测定蛋白含量，得出两次水提取(水—水)

的蛋白质得率。参考上述方法测定现水提后碱提(水—NaOH 溶液)和两次碱提(NaOH 溶液—NaOH 溶液)的蛋白得率。

1.3.5 *碎米荠蛋白相对分子质量分布* 称取 0.5 g 蛋白样品溶于 2 mL 流动相,2 810 *g* 离心 15 min,上清液经 0.22 μm 水相过滤膜过滤,装入液相小瓶中,样品制备完成后在以下色谱条件下进样:色谱柱为 TSKgel 4000 SWXL 300 mm×7.8 mm, 流动相为水,流量为 0.5 mL/min,检测波长为 220 nm,柱温为 30 ℃。

1.3.6 *碎米荠蛋白纯化* 将水提蛋白经超滤膜超滤浓缩,收集截留液,冻干;将碱提蛋白旋转蒸发浓缩 4 倍,调节 pH 至等电点(pH=2.9),4℃静置过液,离心 15 min,收集沉淀,冻干,测定两种产物中的蛋白和硒含量。

1.3.7 *硒含量的测定* 总硒含量的测定参考 GB 5009.93-2010。硒代蛋氨酸和硒代胱氨酸的测定采用 HPLC-AFS 法[18,19],检测条件为:载气流量为 800 mL/min,灯电流为 90/0 mA,负高压为 320 V。流动相为 0.015 mol/L 的 KH_2PO_4 和 0.01 mol/L 的 KCl 溶液。色谱柱 PRP-X100 液相色谱柱。

1.3.8 *碎米荠碱提蛋白和水提蛋白自由基清除性能检测* 碎米荠硒蛋白对·OH 清除率的测定参考任尧[20]的方法;碎米荠硒蛋白对 DPPH·清除率的测定参考 Zhao 等[21]的方法。

1.3.9 *碱提蛋白的纯化及其自由基清除活性* 将适量的 Sephadex G-100 凝胶用超纯水浸泡 24 h,用 1 mol/L NaOH 溶液浸泡 1 h,然后用纯水洗涤凝胶至中性,减压抽滤 1 h,立即装入玻璃层析柱(规格), 用 0.5 mol/L pH8.0 Tris-HCl 洗脱液平衡 2 h,保持流速为 0.5 mL/min,上样 3 mL(1.2.7 中最优提取条件下得到的碱提蛋白溶液), 每 10 min 接收 1 管,在波长 220 nm 处检测,将各组份收集,冻干,测定各组份的自由基清除率及硒含量。

1.4 数据处理

实验数据采用 SPSS 23 处理,采用 Excel 2013、Origin 9.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 碎米荠蛋白提取溶剂的选择

碎米荠原料蛋白质质量分数为 14.4%。由图 1 所示,样品经去离子水,1 mol/L NaCl 溶液,0.1 mol/L NaOH 溶液和体积分数 80%乙醇溶液提取, 得率分别为 39.0%、32.7%、53.4%和 5.2%。由上述可知碎米荠中碱提蛋白含量最高,其次为水提蛋白,然后依次为盐提蛋白和醇提蛋白,各种蛋白质质量分数之间存在着显著性差异(P<0.05)。为了获得较高的蛋白质质量分数,所以首先研究以碱液为提取剂时不同提取条件对碎米荠蛋白质得率的影响。

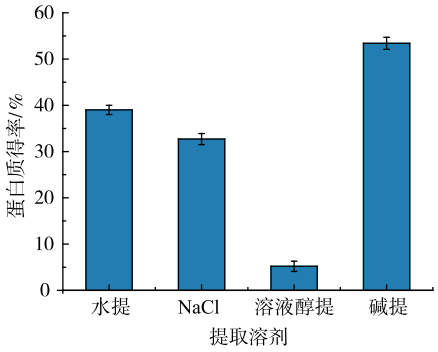


图 1 提取溶剂对蛋白质得率的影响

Fig. 1 Effect of extraction solvent on extraction yield of cardamine protein

2.2 碎米荠蛋白提取单因素实验

2.2.1 *碱液浓度对碎米荠蛋白得率的影响* 碱液浓度是影响碎米荠蛋白提取的主要因素。由图 2 可知,随着碱液浓度的增加得率逐渐增加,在 P<0.05 时,具有显著性差异。可能是由于蛋白被水解末端羧基与末端氨基增多,增加蛋白的亲水性,当碱液浓度达到 0.1 mol/L 后,得率增加相对变缓,当碱液浓度在 0.15 mol/L 后,得率增加缓慢,有研究表明碱性太强会造成 Lys、Cys、Ser、Thr 降解, 甚至会产生

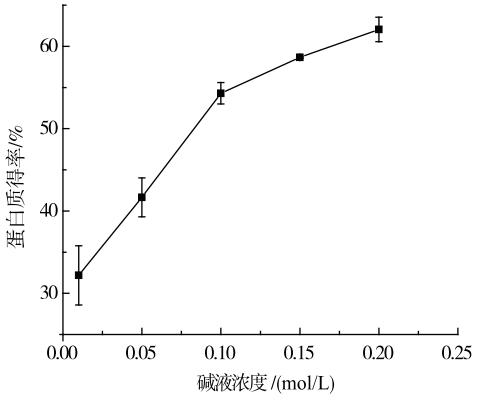


图 2 碱液浓度对蛋白得率的影响

Fig. 2 Effect of alkali concentration on extraction yield of protein

赖氨酰丙氨酸[22]。而且由于 Cys 被破坏，导致有机硒含量降低。综合上述因素与经济因素选用 0.1 mol/L 为提取最佳碱液浓度。

2.2.2 提取温度对碎米荠蛋白质得率的影响　由图 3 可看出，得率随温度的增加而增加。当温度达到 50 ℃后，得率不再增加，甚至有所降低，这与李大鹏等[23]提取豆粕中大豆分离蛋白现象一致。可能是由于随着温度的升高，分子的热运动增强，蛋白质的构象发生改变，有利于蛋白质的溶解；但是温度过高可能使蛋白质变性而沉淀，而且随着温度的升高，提取物中多酚、色素的含量也会随之升高，降低蛋白样品中蛋白含量和品质。所以综合考虑选取 50 ℃为最佳提取温度。

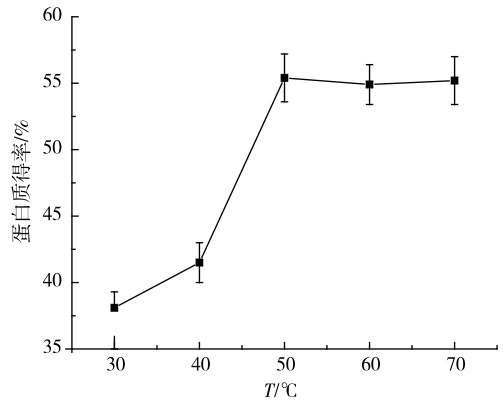


图 3　提取温度对蛋白质得率的影响

Fig. 3　Effect of temperature on extraction yield of protein

2.2.3 提取时间对碎米荠蛋白得率的影响　由图 4 看出随着时间的延长，得率逐渐增加，当达到 8 h 时，得率达到最高，后逐渐下降，可能是由于提取时间过长蛋白变性而沉淀，且随着时间的延长，原料中的多酚及色素等物质也会被大量提取进溶剂中，降低蛋白品质，甚至部分多酚与蛋白结合使蛋白沉淀，造成蛋白损失，且对不利于后续纯化过程。所以从得率、经济和蛋白保存方面来看，8 h 为最佳提取时间。

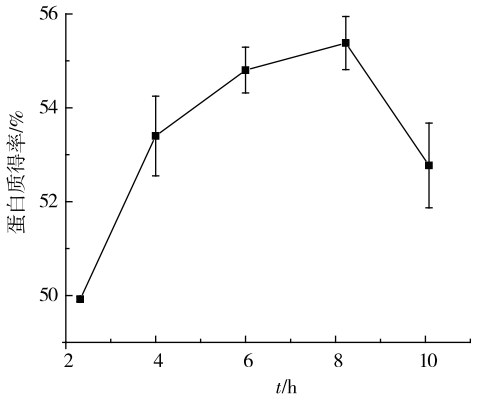


图 4　提取时间对蛋白得率的影响

Fig. 4　Effect of time on extraction yield of protein

2.2.4 料液质量体积比对碎米荠蛋白质得率的影响　由图 5 得出得率随料液质量体积比的增大而增大，且存在显著性差异（$P<0.05$）。当料液质量体积比为 1 g:40 mL 以后，得率增加速率降低，可能是由于当料液质量体积比较低时如 1 g:20 mL，溶液的粘度大，蛋白浓度大，固相和液相浓度差较小，推动力小，得率小，同时由于固相中吸附较多的提取液，导致蛋白得率较低；当料液比大于 1 g:40 mL 后得率增速变缓，但料液体积增大，旋蒸浓缩所需时间过长，且蛋白颜色过深，由棕色变为黑色，所以选择 1 g:40 mL 为最佳提取料液质量体积比。

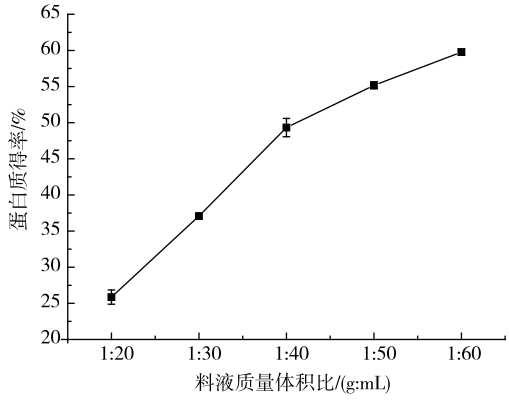


图 5　料液质量体积比对蛋白质得率的影响

Fig. 5　Effect of ratios of water to material on extraction yield of protein

2.2.5 两次提取对碎米荠蛋白得率的影响　为了提高碎米荠蛋白得率，采用两步提取法提取蛋白。

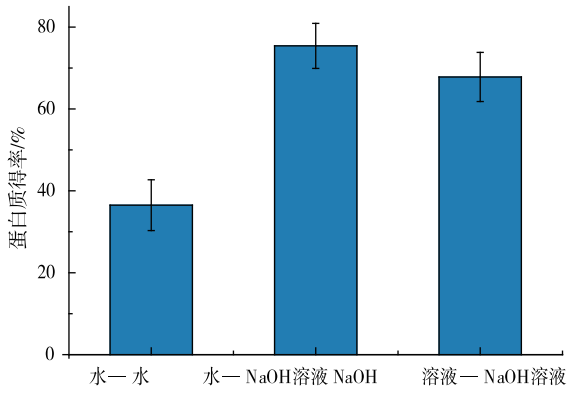


图 6　两次提取时提取溶剂的选择

Fig. 6　Selection of extraction solvents for two extractions

由图 6 可知,水—水、水—NaOH 溶液(0.1 mol/L)和 NaOH 溶液—NaOH 溶液提取的得率分别为 36.5%,75.4%和 67.8%。其中采取水—NaOH 溶液 组合时得率最高,可能是由于水溶蛋白和碱溶蛋白分别占碎米荠总蛋白的 30.0%和 53.4%,若只采用一种提取剂仅能将对应的蛋白提取出来而其他种类的蛋白则溶出较少。且因为醇溶蛋白和盐溶蛋白含量较低,提取价值不大,所以提取蛋白时采用水—NaOH 溶液组合。

综上所述提取温度 50 ℃,料液质量体积比为 1 g:40 mL,先水提 8 h 后碱提 8 h 为最佳提取工艺。得到的水提蛋白经超滤冻干后得到的样品蛋白质质量分数为 26.5%,硒质量分数为 1 748 μg/g,碱提蛋白经酸沉后蛋白质质量分数为 52.3%,硒质量分数为 1 513 μg/g。

2.2.6 *碎米荠蛋白相对分子质量分布* 分别测定 2.2.5 中提取得到的蛋白质相对分子质量分布,得图 7 和图 8。水提蛋白的相对分子质量主要为 87 694、9 928、5 997,碱提蛋白相对分子质量主要为 84 992 和 5 800,二者蛋白相对分子质量均小于 100 000,证明碎米荠蛋白相对分子质量小于 100 000。

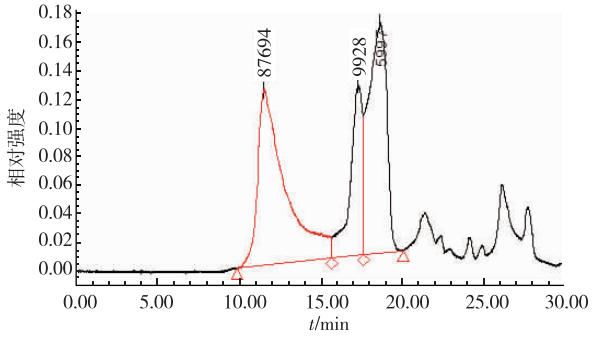


图 7 水提蛋白相对分子质量分布

Fig. 7 Water extract protein molecular weight distribution

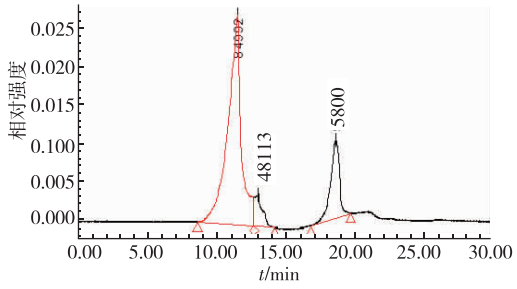


图 8 碱提蛋白相对分子质量分布

Fig. 8 Alkaline extraction protein molecular weight distribution

2.3 碎米荠蛋白对·OH 和 DPPH 自由基清除能力的测定

由图 9 可知,维生素 C 清除·OH 能力最强。碎米荠水提蛋白对·OH 的清除能力大于碱提蛋白,且二者的·OH 的清除能力均比大豆蛋白强(P<0.05)。同时三者的硒含量也是碎米荠水提蛋白最高,碎米荠碱提蛋白次之,大豆蛋白最低(P<0.05),说明蛋白硒含量越高,其.OH 的清除能力越大,这与 Zhao 等[21]的结论相同。

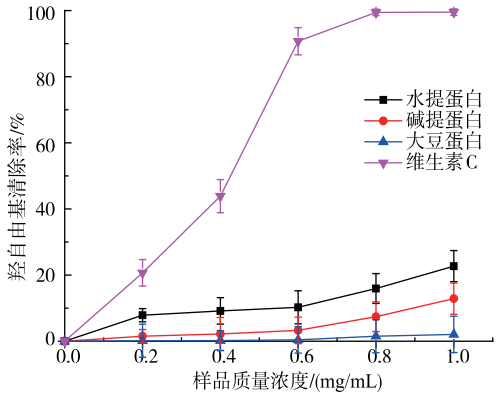


图 9 碎米荠蛋白对·OH 的清除率

Fig. 9 Clearance rate of ·OH in cardamine protein

由图 10 可知维生素 C 清除 DPPH 自由基能力最强,其次为碎米荠水提蛋白,其在 1 mg/mL 时清除率为 82.5%,碎米荠碱提蛋白为 64.4%,大豆蛋白对 DPPH 自由基清除率最低,为 56.8%,其中 $IC50_{大豆蛋白}$(1.542 mg/mL)> $IC50_{碱提蛋白}$(1.345 mg/mL)> $IC50_{水提蛋白}$(0.4490 mg/mL)三者的硒含量从高至低为碎米荠水提蛋白、碎米荠碱提蛋白和大豆蛋白。说明蛋

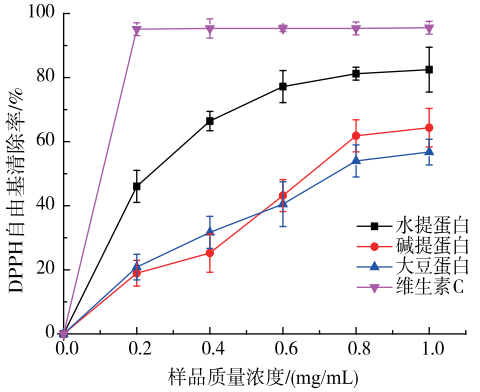


图 10 碎米荠蛋白对 DPPH·的清除率

Fig. 10 DPPH· clearance rate of cardamine protein

白对 DPPH 自由基的清除能力与硒的含量有关,硒含量越高,清除 DPPH 自由基的能力越强。综上所述,水提蛋白抗氧化能力最强其次为碱提蛋白,Du 等[24]和岳念晶等[25]分别对富硒灵芝和富硒大蒜研究发现相似结果。

2.4 碱提蛋白的纯化及其自由基清除能力

由于碎米荠蛋白中碱提蛋白含量最高,且对其研究较少,所以对水—NaOH 溶液提取得到的碱提蛋白进行分离纯化,将 1.2.5 中水—NaOH 溶液提取得到的碎米荠碱提蛋白经 Sephadex G-100 凝胶分离,在紫外 280 nm 下测得两个峰,分别为 80~160 min(峰 1),160~310 min(峰 2)结果见图 11。参考 2.2.6 中碱提蛋白相对分子质量分布可知,峰 1 的蛋白相对分子质量为 8.5×10^4,峰 2 的蛋白相对分子质量为 5.8×10^4,上述峰 1、峰 2 两组分的硒质量分数分别为 668、650 mg/kg。

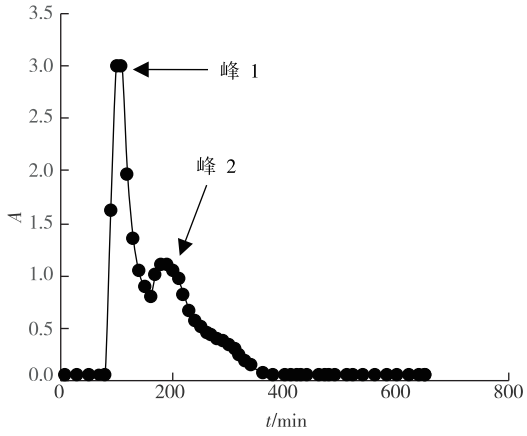


图 11 碎米荠碱提蛋白 Sephadex G-100 分离图谱

Fig. 11 Elution profile of cardamine alkali extract protein separated in Sephadex G-100 column

碎米荠碱提硒蛋白两组分氨基酸组成分析结果如表 1 所示。峰 1 蛋白中氨基酸质量分数为 38.8%。峰 2 的氨基酸质量分数为 32.4%。2 种蛋白中各氨基酸占各自总氨基酸的比例相差不大,其中峰 1 和峰 2 中 7 种必需氨基酸占总氨基酸的41.0%、38.1%,主要区别在于 Tyr(峰 1:4.36%、峰 2:2.63%)Met(2.06%、1.54%)、Lys(6.88%、5.49%)、Pro(4.15%、5.81%)和 Cys(0.01%、0.07%),且峰 1 中硒代蛋氨酸和硒代胱氨酸含量皆高于峰 2。

表 1 碎米荠碱提蛋白两组分氨基酸组成

Table 1 Composition of amino acid from two components of cardamine alkali

氨基酸	峰 1/%	峰 2/%
Asp	4.89	4.22
Glu	5.18	4.31
Ser	1.51	1.34
His	0.95	0.78
Gly	2.24	2.12
Thr	1.16	0.92
Arg	2.36	1.69
Ala	2.47	2.05
Tyr	1.69	0.81
Cys	0.002 3	0.021
Val	3.14	2.36
Met	0.8	0.48
Phe	2.28	1.95
Ile	2.09	1.58
Leu	3.78	2.92
Lys	2.67	1.70
Pro	1.61	1.80
Se-Met	0.24	0.02
Se-Cystine	0.001 7	0.005 6
总量	38.8	31.04

分别对 2 个峰进行·OH 和 DPPH 自由基清除能力检测得到图 12~13。由图 12 可知峰 1 与峰 2 的·OH 清除能力相同,且都大于大豆蛋白对·OH 的清除能力,与碱提蛋白相近且弱于水提蛋白。由层析图(图 11)可知,峰 1 的含量远远大于峰 2 的含量,所以从得率的角度来说峰 1 优于峰 2。由图 13 可知维生素 C 对 DPPH 自由基清除率最大,其次为峰 1,清除率为 65.7%,峰 2 与大豆蛋白对 DPPH 自由基的清除能力相差不大,分别为 36.3%和 39.6%,峰 1 清除 DPPH 自由基能力强于峰 2,可能是由于峰 1 的总硒和硒代氨基酸含量比峰 2 高,而硒含量的增加有助于蛋白对自由基的清除[26],由图 14 可知峰 1 蛋白相对分子质量为 88 257。

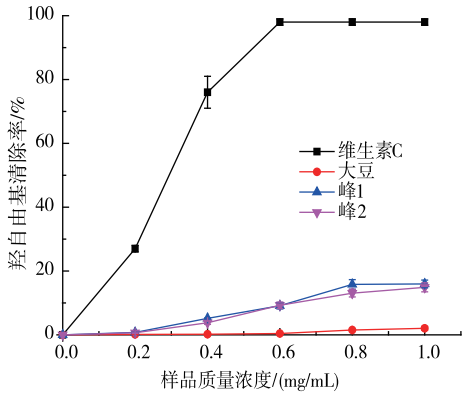


图 12 碎米荠纯化蛋白对·OH 的清除率

Fig.12 Clearance of ·OH by purified protein from cardamine

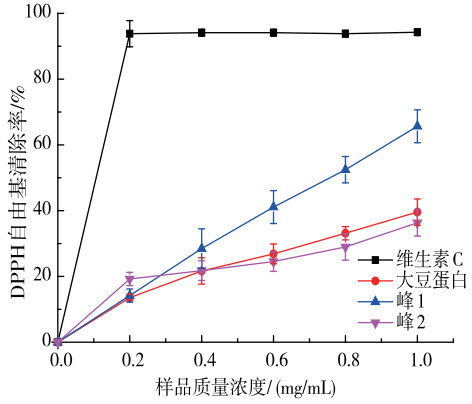


图 13 碎米荠纯化蛋白对 DPPH·的清除率

Fig. 13 DPPH· clearance rate of purified protein from cardamine

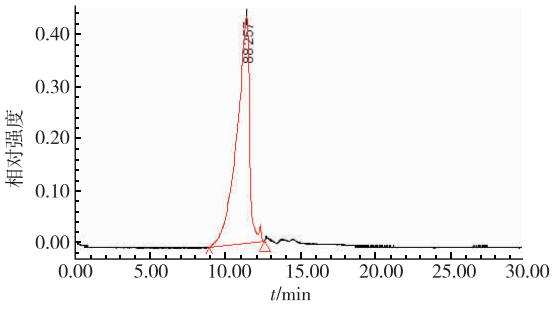


图 14 碱提蛋白相对分子质量分布

Fig. 14 Alkaline extraction protein molecular weight distribution

3 结 语

以恩施碎米荠为原料,比较不同提取方法对碎米荠蛋白得率的影响,采用单因素法得到最佳工艺为:提取温度 50 ℃,料液质量体积比为 1 g:40 mL,先后用水和 0.1 mol/L NaOH 溶液分别提取 4 h。在此工艺条件下蛋白得率最高,为 75.4%,其中水提蛋白的蛋白质质量分数为 26.5%, 硒质量分数为 1 748 μg/g,碱提蛋白的蛋白质质量分数为 52.3%,硒质量分数为 1 513 μg/g。采用 Sephadex G-100 凝胶层析对碎米荠碱提蛋白进行纯化得到两个组分。通过研究 4 种恩施碎米荠蛋白对 DPPH 自由基和羟自由基的清除能力,发现碎米荠蛋白均具有一定的抗氧化活性。

参考文献:

[1] STEINBREBNER H,SIES H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins[J]. **Biochim Biophys Acta**. 2009, 1790(11):1478-1485.

[2] 雷红灵. 恩施碎米荠富硒生理生化及其含硒蛋白的研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2010.

[3] LI Lihui,LIN Qinlu,CHEN Haijun. The biological functions of selenium and research development of Se-enriched foodstuff[J]. **Modern Food Science and Technology**,2005,21(03):204-206.

[4] LV Hao. Research in relieve sport fatigue effect of Selenium protein supplement[J]. **Food Research and Development**, 2016, 37(21):172-175.

[5] CHENG Zhaoyu,FANG Lei. Study on the extraction technology of Se-enriched agrocybe cylindracea and anti-fatigue effect[J]. **Food Research and Development**,2015,36(21):33-37.

[6] WU Zhilin,TONG Xinzhao,YI Xuebin,et al. Advances in studies on selenium enhancing plant toxicity against heavy metals[J]. **Grain Science and Technology and Economy**,2014,39(2):22-27.

[7] ZHONG Na,WANG Xiaoru,CHEN Dengyun. Research development of organic selenium[J]. **Chinese Pharmaceutical Affairs**, 2007,21(4):268-271.

[8] Gao Lin, Zhao Wenting, Tian Xia, et al. Preparation of isolate protein from selenium-enriched peanut[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2017 (10): 107-115.

[9] 向天勇. 恩施碎米荠的生物学特性及叶片含硒化合物研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2006.
[10] XIANG jiqian, LI yajie, YANG yongkang, et al. Research status of cardamine[J]. **Journal of Hubei University for Nationalities (Natural Science Edition)**, 2011, 29(4): 440-443.
[11] LIU Kunyuan, TIAN Xiuli, QIN Zhiguo, et. Structure characteristics and anti-motor fatigue activity of selenium-containing protein from *Cardamine hupingshanensis*[J]. **Food Science**, 2015, 36(9): 160-165.
[12] ROSEN B P, LIU Z. Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview[J]. **Environment International**, 2009, 35(3): 512-515.
[13] KONIECZKA P. Methods of selenium supplementation. Bioavailability and determination of selenium compounds.[J]. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, 2016, 56(1): 36-55.
[14] LEI Hongling, FANG Xiangliang, ZHOU Dazhai. In vivo antioxidation of selenoprotein in Cardamine violifolia[J]. **Journal of Northwest A&F University (Nat. Sci. Ed)**, 2015, 43(1): 201-205.
[15] CHEN Xueqing. Separation, purification, and primary structural analysis of glycoprotein derived from selenium-enriched Green Tea[D]. **Shanghai: Shanghai Normal University**, 2016.
[16] HU Yuhang, DAI Jun, CHEN Shangwei, et al. Preparation, separation and amino acid sequence analysis of corn peptides with hypoglycemic activity[J]. **Food & Machinery**, 2017, 33(6): 147-152.
[17] LI Baorui, CHEN Yanzhuo, HAN Jie, et al. Extraction of soluble selenium-containing protein from selenium-enriched Soybean [J]. **Food Research and Development**, 2016, 37(3): 60-64.
[18] ZHAO Lei, DU Ming, ZHANG Meili, et. Selenium distribution in Se-enriched Ganoderma Lucidum[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2005, 5(4): 119-123.
[19] LIU Yang, ZHANG Tan, YANG Jing, et. Anaysis of selenium speciation in the selenized Yeasts by RPLC-ICP-MS[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(12): 1261-1265.
[20] 任尧. 宽体金线蛭 / 东亚钳蝎分离蛋白中抗凝血、抗疲劳活性肽的酶法制备及其结构鉴定研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
[21] 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.
[22] HOU F, DING W, QU W, et al. Alkali solution extraction of rice residue protein isolates: Influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation[J]. **Food Chemistry**, 2017, 218: 207-215.
[23] LI Dapeng, ZHAO Rui. Study on extraction technique of Soybean isolated protein in microtherm Soybean Mea[J]. **The Processing of Agricultural Products**, 2007(12): 22-24.
[24] DU M, WANG C, HU X S, et al. Biological properties of different protein extracts from selenium-enriched Ganoderma lucidum [J]. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, 2008, 59(2): 134-147.
[25] YUE Jingnian, QI Xiangyang, XIE Bijun, et. In vitro Antioxidation Activities of Se-proteins Extracted from Se-enriched Garlic in EnShi[J]. **Modern Food Science & Technology**, 2009, 25(9): 1005-1010.
[26] 周鹏.富硒碱溶性蛋白抗氧化肽的制备、分离纯化及结构研究[D].上海:上海师范大学,2016.