

大米肽中压离子交换色谱分离及其免疫活性评价

Isolation and identification of immunoactive peptides from rice protein hydrolysates with medium-pressure ion exchange chromatography

程云辉 毛田米 黄璐 陈茂龙 文李 许宙

CHENG Yun-hui MAO Tian-mi HUANG Lu CHEN Mao-long WEN Li XU Zhou

(长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南长沙 410114)

(College of Chemical and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:为进一步提高经过 DA201-C 型大孔吸附树脂脱盐、40%乙醇梯度洗脱的大米免疫活性肽 RPHs-A3 组分的纯度和免疫活性,采用中压离子交换色谱对其进行进一步分离纯化,并对分离得到组分的免疫活性进行了评价。结果表明,采用 WorkBeads 40 Q 强阴离子交换树脂、2.6 cm×40 cm 色谱柱对 RPHs-A3 组分进行分离的最佳条件为:上样浓度 30 mg/mL,上样量 5 mL,起始缓冲液 A 为 pH 9.0 的 0.01 mol/L Tris-HCl,洗脱缓冲液 B 为含 1 mol/L NaCl 的 pH 9.0、0.01 mol/L Tris-HCl,上样、洗脱流速分别为 1, 10 mL/min。共收集到 5 个组分,其中 RPHs-A3-B3 组分在 MTT 试验和小鼠巨噬细胞脂多糖(LPS)炎症模型中皆表现出较高免疫活性,对 RAW264.7 细胞具有显著增殖作用,其 SI 值为 1.315;且对炎症模型中细胞内 NO 释放量具有显著抑制作用($P < 0.05$),抑制率为 8.28%。采用中压离子交换色谱能有效地对 RPHs-A3 组分进行分离纯化,使 SI 值从 1.273 提高到 1.315,且对细胞内 NO 释放量具有显著抑制作用。

关键词:中压离子交换色谱;大米;免疫活性肽;分离纯化

Abstract: Medium-pressure ion exchange chromatography was used for further fractionation of rice immunoactive peptides obtained from Trypsin hydrolyzation and gradient ethanol elution with DA201-C macroporous adsorption resin (40% ethanol fraction). The results showed that the optimal parameters for fractionation of RPHs-A3 fractions by WorkBeads 40 Q on a 2.6 cm×40 cm columns were as follows: Sample: 5 mL, 30 mg/mL 40% ethanol fraction; Equilibration buffer A: pH 9.0, 0.01 mol/L Tris-HCl; Elution Buffer B: pH 9.0, 0.01 mol/L Tris-HCl containing 1 mol/L NaCl; Sample

基金项目:湖南省自然科学基金项目(编号:2018JJ2423)

作者简介:程云辉,女,长沙理工大学教授,博士。

通信作者:许宙(1983—),男,长沙理工大学讲师,博士。

E-mail: xz_jnu@126.com

收稿日期:2017-12-31

flow rate; 1 mL/min; Elution flow rate: 10 mL/min. Five fractions were obtained after NaCl gradient elution. The results of MTT assay and LPS-stimulated RAW264.7 macrophages inflammation model showed that fraction RPHs-A3-B3 had the highest immune activity. RPHs-A3-B3 produced a significant effect on the proliferation of RAW264.7 macrophages with a stimulation index value of 1.315. Meanwhile, RPHs-A3-B3 significantly decreased the production of NO in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages ($P < 0.05$). The inhibition rate was 8.28%. The research indicated that medium-pressure ion exchange chromatography can effectively fractionate rice immunoactive peptides. The SI value increased from 1.273 to 1.315. And RPHs-A3 had a significant inhibitory effect on intracellular NO release.

Keywords: Medium-pressure ion exchange chromatography; rice; immunoactive peptides RPHs-A3; fractionation

基于酶法降解食源性蛋白质并结合分离纯化技术从酶解肽混合物中获得活性肽一直被当作筛选食源性活性肽的经典方法^[1],本课题组^[2]前期已基于蛋白质酶解物疏水性的差异,通过 DA201-C 型大孔吸附树脂从大米蛋白质胰酶(Trypsin)酶解物中分离出具有较强免疫活性的 RPHs-A3 (Rice protein hydrolysates-40% ethanol fraction)组分;为进一步提高 RPHs-A3 组分的纯度和免疫活性,拟基于 RPHs-A3 组分带电性的差异,继续采用离子交换色谱对其进行分离纯化。

中压液相色谱压力范围为 0.5~2.0 MPa,其压力介于低压与高压液相色谱之间。与低压柱色谱相比,具有分辨率高、分离速度快、可梯度洗脱等优势;与高压液相色谱相比,尽管在稳流、精度、检测灵敏度方面还有差距,但其制备量大、可自主填充分离柱填料而提高分离选择性等特点,使其成为近年来备受关注的活性肽分离纯化新方法^[3-4]。WorkBeads 40 Q 是一种以季氨基为官能团的强阴离子交换剂,具

有载量高、重复性与化学稳定性好等特点,在实验室或工业规模分离纯化蛋白质、多肽和核酸等领域具有良好的应用前景。

本研究拟以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 MTT 增殖试验 SI 值和脂多糖(LPS)炎症模型 NO 释放量为双考察指标,利用 WorkBeads 40 Q 对 RPHs-A3 组分进行分离纯化,在考察不同分离条件对大米免疫活性肽分离效果影响的基础上,确定中压离子交换色谱分离 RPHs-A3 的最佳条件,并进一步提高 RPHs-A3 组分的纯度和免疫活性,为中压离子交换色谱技术在活性肽分离纯化中的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

大米蛋白:碱提酸沉法提取;

胰蛋白酶:合肥博美生物科技有限公司;

二甲基亚砜(DMSO)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT):上海生物工程有限公司;

DMEM 培养基:美国 HyClone 公司;

胎牛血清(FBS):美国 Gibco 公司;

小鼠巨噬细胞(RAW264.7):江苏省原子医学研究所;

Work Beads 40 Q:杭州开泰生物技术有限公司;

氯化钠、无水乙醇、氢氧化钠、Tris、盐酸:分析纯试剂,上海国药集团有限公司;

其他试剂:分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

台式 pH 计:DELTA320 型,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;

可见分光光度计:22PC 型,上海棱光技术有限公司;

玻璃层析柱:2.6 cm×40 cm 色谱柱,利穗科技有限公司;

全自动蛋白质纯化系统:APPS MV 100D 型,利穗科技有限公司;

酶标分析仪:DNM-9602 型,北京普朗新技术有限公司;

恒温培养箱:DNP-9052 型,苏州威尔实验用品有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 大米活性肽 RPHs-A3 组分的制备工艺流程

一定底物浓度大米蛋白悬浮液→调 pH 值→一定温度下超级恒温水浴酶反应器中溶解 30 min→按不同底物浓度、加酶量、pH 值、温度进行酶解(pH-stat 法使体系 pH 稳定)→灭酶(85℃,15 min)→离心(3 500 r/min,15 min)→上清液→真空浓缩(终体积为 5~10 mL)→冷冻干燥(-45℃,30 Pa 以下,40 h)→大米蛋白酶解物 RPHs→DA201-C 型大孔吸附树脂吸附、脱盐→40%乙醇洗脱→RPHs-A3 组分^[5]

1.2.2 中压离子交换色谱分离方法

(1) 离子交换剂的选择:采用强阴离子交换树脂 WorkBeads 40 Q 对 RPHs-A3 组分进行分离纯化。前期研究确定 RPHs-A3 组分的等电点范围为 pH 2.25~3.50,因此使

RPHs-A3 组分带负电的 pH 范围为 pH>3.50,又因 WorkBeads 40 Q 的 pH 稳定范围为 2~13,故选择 WorkBeads 40 Q 对 RPHs-A3 组分进行分离纯化。

(2) 起始缓冲液 pH 的选择:采用试管小试法^{[6]98-99} 确定缓冲液起始 pH。首先分别配制 0.50,0.01 mol/L 的不同 pH 的缓冲液,pH 以 1.0 为梯度,从 2.0 增至 11.0。取 10 mL 的试管,每管加入 1.5 mL 树脂,然后依次在每支试管中加入 0.5 mol/L 的不同的缓冲液 10 mL,混合一段时间后弃去上清液,如此反复洗涤 10 次。再换用 0.01 mol/L 的缓冲液,每次 10 mL 反复洗涤 5 次^[7]。向洗涤好的树脂中分别加入等量浓度相同的大米免疫活性肽溶液,充分混合后,放置 5~10 min 后,测定上清液中未被吸附的蛋白含量。

(3) 中压离子交换色谱分离 RPHs-A3 组分的条件:将处理好的 Work Beads 40 Q 树脂填充到 2.6 cm×40 cm 规格的玻璃柱中,用 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)以 10 mL/min 的速度平衡层析柱 3~4 BV;用平衡缓冲液配制浓度为 30 mg/mL 的大米免疫活性肽溶液,上样量 5 mL,上样流速 0.5 mL/min;上样结束后,用平衡缓冲液以 10 mL/min 的流速进行洗脱,在 220 nm 波长下检测洗脱液吸光值,收集穿透峰;然后用 0.0~0.5 mol/L 的 NaCl 进行梯度洗脱,收集洗脱峰;对各组分进行脱盐后浓缩干燥,得到不同分离组分。

1.2.3 RPHs-A3 分离组分免疫活性的测定

(1) 小鼠巨噬细胞增殖试验:采用 MTT 法,取对数期的 RAW264.7 细胞,细胞浓度为 7×10^5 个/mL、100 μ L 并接种于 96 孔板中,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 4 h 后,加入大米免疫活性肽,空白对照组加等量的无菌水,阳性对照组加等量 IgG,继续在培养箱中孵育 20 h;在终止孵育前 4 h 加入 20 μ L MTT(5 mg/L);弃掉每孔中的液体,向孔中加入 150 μ L 二甲基亚砜,避光条件下轻震 5 min^[8],采用酶标仪在 492 nm 检测吸光度(OD 值),并按式(1)计算 SI 值。

$$SI = \frac{OD_1}{OD_2}, \quad (1)$$

式中:

SI——细胞增殖指数;

OD₁——试验组 OD 值;

OD₂——对照组 OD 值。

(2) 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的 NO 释放量的测定:当培养皿中的细胞生长至对数期时,弃去细胞培养基上清,用移液枪吸取无菌 PBS 将细胞轻轻吹下,离心收集细胞,96 孔培养板中接种 3×10^4 个/孔的细胞,每孔 200 μ L 细胞液,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜,待细胞贴壁后,以 3 复孔为一组,分为对照组、LPS 炎症模型组、RPHs-A3 和 RPHs-A3-B(1~5)预处理组,根据文献^[9]修改如下:

① 对照组:均加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基;

② 炎症模型组:加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基,培养 12 h,再加入用 DMEM 培养基稀释的 LPS 溶液,培养 24 h;

③ RPHs-A3 和 RPHs-A3-B(1~5)预处理组:加入用 DMEM 培养基稀释的 RPHs-A3 和 RPHs-A3-B(1~5)溶液,

使 RPHs-A3 和 RPHs-A3-B(1~5)的终浓度均为 50 μg/mL, 阳性对照组加等量 IgG, 培养 12 h, 加入用 DMEM 培养基稀释的 LPS 溶液, 培养 24 h。

收集细胞培养基上清, 于 4 °C、12 000 × g 低温离心 5 min 以去除细胞杂质等。用 GRIESS 法检测上清中的 NO 含量。并按式(2)计算 NO 抑制率。

$$IR = \frac{c_1 - c_2}{c_1} \times 100\% , \quad (2)$$

式中:

IR——NO 抑制率;

c₁——LPS 刺激产生 NO 浓度;

c₂——RPHs-A3-B(1~5)预处理后产生 NO 浓度。

2 结果与讨论

2.1 中压离子交换色谱分离条件的优化

2.1.1 试管小试法确定缓冲液起始 pH 缓冲液起始 pH 值的选择对离子交换色谱吸附特性很关键^[10], 缓冲液起始 pH 决定了 RPHs-A3 组分及 WorkBeads 40 Q 的带电状态, 确保 WorkBeads 40 Q 带充足电荷的同时决定了 RPHs-A3 组分带电荷的种类和数量, 是 RPHs-A3 组分是否发生吸附的重要参数^{[6]86}。本研究考察了在不同缓冲液起始 pH 下 WorkBeads 40 Q 对 RPHs-A3 组分的吸附效果, 结果见表 1。由表 1 可知, 起始 pH 对 RPHs-A3 组分吸附效果影响较大, 在 pH 为 9.0 的条件下, 上清液中 RPHs-A3 组分的含量最低, 为 2.01 mg/mL, 说明在此 pH 条件下 RPHs-A3 组分在 WorkBeads 40 Q 树脂上的吸附量最大, 因此确定 pH 9.0 为最佳起始 pH。

表 1 不同起始 pH 下 WorkBeads 40 Q 对 RPHs-A3 的吸附†

Table 1 The Adsorption of RPHs-A3 by WorkBeads 40 Q at different initial pH

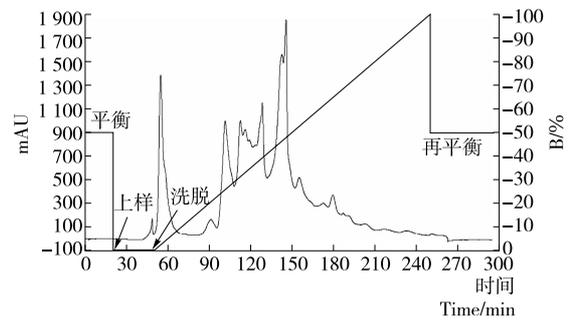
起始 pH	含量/(mg · mL ⁻¹)	起始 pH	含量/(mg · mL ⁻¹)
2.0	5.65	7.0	4.90
3.0	5.48	8.0	4.16
4.0	5.44	9.0	2.01
5.0	5.17	10.0	2.71
6.0	5.41	11.0	3.11

† 上样浓度 5 mg/mL。

2.1.2 离子强度变化方式对 RPHs-A3 组分分离效果的影响

WorkBeads 40 Q 强阴离子层析柱的分离原理是基于溶质分子所带电荷性质和电荷量的不同而使其在层析柱中移动速度不同来实现分离的^[11]。本研究探索了不同离子强度变化方式对 WorkBeads 40 Q 分离纯化 RPHs-A3 组分的影响, 以确定最佳分离条件。选择起始缓冲液为 pH 9.0、0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 极限缓冲液为含 0.5 mol/L NaCl 的 pH 9.0、0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 通过中压液相色谱将 2 种缓冲液按一定比例混合, 可以得到 NaCl 浓度在 0.0~0.5 mol/L 连续变化的离子强度梯度。图 1 为采用梯度洗脱方式分离 RPHs-A3 组分的图谱, 由图 1 可知, 随

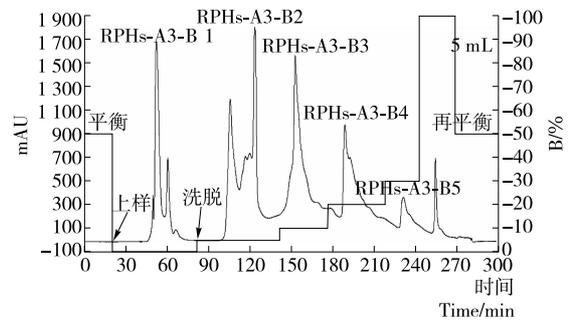
着离子强度的增大, RPHs-A3 组分依次被分为 5 个组分, 选择性差导致分辨率较低, 分离效果较差; 图 2 为采用阶段洗脱方式分离 RPHs-A3 组分的图谱, 由图 2 可知, 阶段洗脱方式对 RPHs-A3 组分的分离效果较好, 选择性好, 分辨率较高。RPHs-A3 组分在不同的离子强度下依次被分为 5 个组分, 穿透峰 RPHs-A3-B1 为未被吸附的部分, 组分 RPHs-A3-B2、RPHs-A3-B3、RPHs-A3-B4、RPHs-A3-B5 依次为含 0.05、0.10、0.20、0.30 mol/L NaCl 的 pH 9.0、0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液从离子交换剂上洗脱下来的组分。由于起始缓冲液的离子强度较低, RPHs-A3 组分与 WorkBeads 40 Q 上季氨基之间结合能力更强, 能取代缓冲液离子而吸附到 WorkBeads 40 Q 上。但随着离子强度增大, 缓冲液离子会与 RPHs-A3 组分竞争结合 WorkBeads 40 Q, 从而减弱了 RPHs-A3 组分与 WorkBeads 40 Q 之间的静电作用力, 首先使一些带净电荷较少、吸附得不太牢固的活性肽解吸而被洗脱下来; 继续增大离子强度, 使结合得更为牢固的一些活性肽被洗脱, 各个组分将在特定离子强度的缓冲液中被洗脱下来, 从而实现分离^[12]。比较图 1 和图 2 可知, 阶段洗脱分离



色谱柱尺寸为 2.6 cm × 40 cm; 离子交换剂为 WorkBeads 40 Q; 样品为 5 mL、20 mg/mL RPHs-A3 组分; 平衡缓冲液 A 为 pH 9.0、0.01 mol/L Tris-HCl; 洗脱缓冲液 B 为含 1 mol/L NaCl 的 pH 9.0、0.01 mol/L Tris-HCl; 上样流速 1 mL/min; 洗脱流速 10 mL/min

图 1 离子强度线性洗脱分离 RPHs-A3 组分图谱

Figure 1 The separation of fraction RPHs-A3 by linear elution of different ionic strength



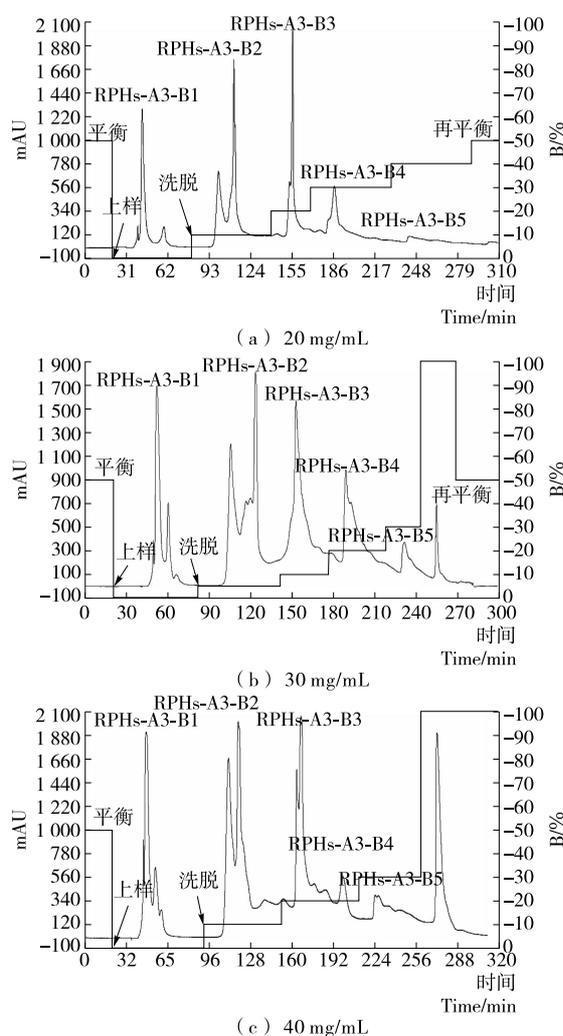
色谱柱尺寸为 2.6 cm × 40 cm; 离子交换剂为 WorkBeads 40 Q; 样品为 5 mL、30 mg/mL RPHs-A3 组分; 平衡缓冲液 A 为: pH 9.0、0.01 mol/L Tris-HCl; 洗脱缓冲液 B 为含 1 mol/L NaCl 的 pH 9.0、0.01 mol/L Tris-HCl; 上样流速 1 mL/min; 洗脱流速 10 mL/min

图 2 离子强度阶段洗脱分离 RPHs-A3 组分图谱

Figure 2 The separation of fraction RPHs-A3 by stage elution of different ionic strength

RPHs-A3组分的效果要优于梯度洗脱。由于梯度洗脱的离子强度是连续增加的,洗脱峰也连续被洗脱下来,选择性较差导致分辨率降低;阶段洗脱的离子强度是逐级增加的,各级洗脱峰相距较远,分辨率提高。本研究后续将选择阶段洗脱方式对大米免疫活性肽 RPHs-A3 组分进行分离纯化。

2.1.3 上样量对 RPHs-A3 组分分离效果的影响 本研究探索了上样量对分离效果的影响,在不同上样量条件下 WorkBeads 40 Q 对 RPHs-A3 组分的分离效果见图 3。由图 3 可知,随着上样量的增加,分离效果逐渐变差,分辨率降低,其原因是上样量过大超出了 WorkBeads 40 Q 的有效交换容量。兼顾考虑分离效率,在保证分离效果的前提下通常会选择大的上样量,故以 30 mg/mL、5 mL 为最佳上样量。本研究选用 WorkBeads 40 Q 强阴离子交换树脂、2.6 cm×40 cm 色谱柱对 RPHs-A3 组分进行分离的较佳条件确定为:上样



色谱柱尺寸为 2.6 cm×40 cm;离子交换剂为 WorkBeads 40 Q;样品为 5 mL 不同浓度的 RPHs-A3 组分;平衡缓冲液 A 为: pH 9.0, 0.01 mol/L Tris-HCl;洗脱缓冲液 B 为含 1 mol/L NaCl 的 pH 9.0, 0.01 mol/L Tris-HCl;上样流速 1 mL/min;洗脱流速 10 mL/min

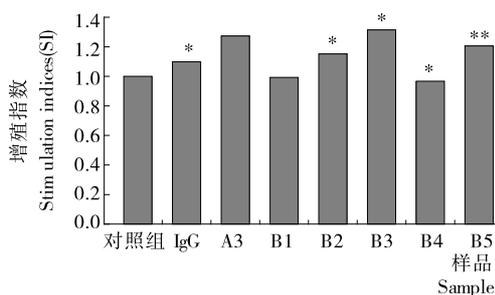
图 3 不同上样量条件下 RPHs-A3 组分分离图谱

Figure 3 The separation of fraction RPHs-A3 under different loading conditions

浓度 30 mg/mL,上样量 5 mL,平衡缓冲液 A 为 pH 9.0 的 0.01 mol/L Tris-HCl,洗脱缓冲液 B 为含 1 mol/L NaCl 的 pH 9.0、0.01 mol/L Tris-HCl,上样、洗脱流速分别为 1,10 mL/min。

2.2 中压离子交换色谱分离组分免疫活性的研究

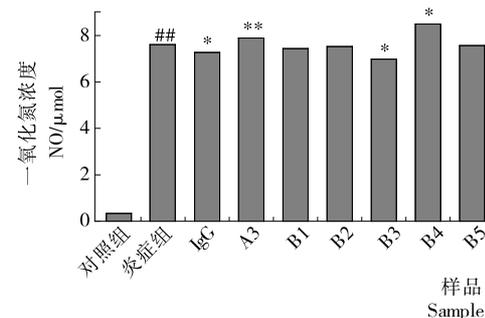
本研究分别以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 MTT 增殖试验 SI 值和脂多糖(LPS)炎症模型细胞内 NO 释放量为考察指标,考察了中压离子交换色谱各分离组分的免疫活性,结果见图 4、5。



* 与对照相比, P<0.05; ** 与 RPHs 相比, P<0.01; B1、B2、B3、B4、B5 分别对应 RPHs-A3-B1、RPHs-A3-B2、RPHs-A3-B3、RPHs-A3-B4、RPHs-A3-B5, A3 对应 RPHs-A3

图 4 RPHs-A3-B(1~5) 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖活性的影响

Figure 4 The effect of fractions RPHs-A3-B(1~5) on proliferation of Murine Macrophage RAW264.7



与对照相比, P<0.01; * 与炎症组相比, P<0.05; ** 与炎症组相比, P<0.01; B1、B2、B3、B4、B5 分别对应 RPHs-A3-B1、RPHs-A3-B2、RPHs-A3-B3、RPHs-A3-B4、RPHs-A3-B5, A3 对应 RPHs-A3

图 5 RPHs-A3-B(1~5) 对脂多糖(LPS)炎症模型 NO 释放的影响

Figure 5 The effect of fractions RPHs-A3-B(1~5) on intracellular NO release in lipopolysaccharide (LPS) inflammation model

从图 4 可知,组分 RPHs-A3-B2、RPHs-A3-B3、RPHs-A3-B5 对 RAW264.7 细胞皆具有较好的增殖作用,其 SI 值分别为 1.152、1.315、1.206,与 RPHs-A3 组分(SI 值为 1.273)相比,RPHs-A3-B3 组分的 SI 值显著提高(P<0.05)。

由图 5 可知,50.00 μg/mL 的各分离组分对 NO 释放的抑制效果有着明显差异,RPHs-A3-B4 对 NO 释放无抑制作用;RPHs-A3-B1、RPHs-A3-B2 和 RPHs-A3-B5 3 个组分对 NO 释放有抑制作用,但效果不显著;而 RPHs-A3-B3 组分

则对 NO 释放具有显著抑制作用($P < 0.05$), NO 浓度可由 LPS 刺激的(7.605 ± 0.000) μmol 降至 (6.975 ± 0.008) μmol ($P < 0.05$), 抑制率为 8.28%。MTT 试验活性检测 results 和炎症模型活性检测结果皆表明中压离子交换色谱分离纯化获得的免疫活性最佳组分为 RPHs-A3-B3, 后续研究拟将采用低压凝胶过滤色谱继续对其进行分离纯化。

3 结论

中压色谱是对常压色谱的延续与发展, 具有分辨率高、分离速度快、可梯度洗脱、制备量大、可自主填充分离柱填料等优点。目前多用于天然产物的分离纯化, 在生物活性肽领域里的应用较少, 还有待进一步的研究。本研究表明中压离子交换色谱能显著提高大米免疫活性肽 RPHs-A3 组分的免疫活性, 使其 SI 值从 1.273 提高到 1.315 ($P < 0.05$), 且对细胞内 NO 释放的抑制率为 8.28% ($P < 0.05$)。本研究不仅得出了中压离子交换色谱分离纯化大米免疫活性肽 RPHs-A3 组分的最佳条件, 同时也为中压离子交换色谱技术在活性肽分离纯化中的应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 陈月华, 程云辉, 许宙, 等. 食源性生物活性肽免疫调节功能研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 209-213.
- [2] 王璐, 陈月华, 许宙, 等. 大米免疫活性肽水解用酶的筛选[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 38-42.
- [3] 徐嘉, 杨骏, 黄孝春, 等. 连翘酯苷反相硅胶中压制备工艺的优化[J]. 中国药师, 2012, 15(1): 47-50.
- [4] FENG Jia-tao, XIAO Yuan-sheng, GUO Zhi-mou, et al. Purification of compounds from *Lignum Dalbergia Odorifera*, using two-dimensional preparative chromatography with Click oligo (ethylene glycol) and C18 column[J]. *Journal of Separation Science*, 2011, 34(3): 299-307.
- [5] 卜汉萍. 大米免疫活性肽的制备及分离纯化[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2014: 15-16.
- [6] 田亚平, 周楠迪. 生化分离原理与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [7] 王戈莎. 大米多肽的分离纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008: 13.
- [8] WU Ting-feng, HSU Chiung-yueh, HUANG Hwei-sheng, et al. Proteomic analysis of pycnogenol effects in RAW 264.7 macrophage reveals induction of cathepsin D expression and enhancement of phagocytosis[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55: 9 784-9 791.
- [9] WEN Li, CHEN Yue-hua, ZHANG Li, et al. Rice protein hydrolysates (RPHs) inhibit the LPS-stimulated inflammatory response and phagocytosis in RAW264.7 macrophages by regulating the NF- κ B signaling pathway[J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(75): 10.1039/C6RA08927E.
- [10] 钟芳, 张晓梅, 麻建国. 大豆肽的离子交换色谱分离及其活性评价[J]. 食品与机械, 2006, 22(5): 16-19.
- [11] CUMMINS P, DOWLING O, O'CONNOR B. Ion-exchange chromatography: basic principles and application[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 681(681): 215-228.
- [12] 贾晨, 李静媛, 金玉兰, 等. 章鱼下脚料发酵液中多肽的分离及抗氧化活性的研究[J]. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2015, 32(1): 36-41.

(上接第 110 页)

形效果的影响。研究表明, 管坯的壁厚随着温度的增加而增加, 随着摩擦系数的增大而增加; 翘曲程度随着摩擦系数的增大而增加; 载荷随着温度的增加而降低, 随着摩擦系数的增大而增大。本研究提出针对食品机械多界面管材的塑性成形工艺, 管件设备能够同时满足加工工艺中冷挤压与温挤压结合的特点, 材料本身质量轻, 成本低, 便于加工, 可满足家用面条机、和面机、食物料理机等食品机械需求。

参考文献

- [1] TRABELSI O, MALVÈ M, MENAT A, et al. Simulation of swallowing dysfunction and mechanical ventilation after a Montgomery T-tube insertion[J]. *Computer Methods in Biomechanics & Biomedical Engineering*, 2015, 18(14): 1 596-1 605.
- [2] MARIUS U, MĂ © RIAUX C A, KURZ-BESSONC B. The propagation of gravity currents in a V-shaped triangular cross-section channel: experiments and theory[J]. *Journal of Fluid Mechanics*, 2014, 754(9): 232-249.
- [3] ENDO S, MIZUTA K, TAKAHASHI G, et al. The effect of ventilation tube insertion or trans-tympanic silicone plug insertion on a patulous Eustachian tube[J]. *Acta Oto-Laryngologica*, 2016, 136(6): 551-555.
- [4] PENG L F, XU Z T, FUM W, et al. Forming limit of sheet metals in meso-scale plastic forming by using different failure criteria[J]. *International Journal of Mechanical Sciences*, 2017, 120: 190-203.
- [5] BONET J, BHARGAVA P, WOOD R D. Finite element analysis of the superplastic forming of thick sheet using the incremental flow formulation[J]. *International Journal for Numerical Methods in Engineering*, 2015, 40(17): 3 205-3 228.
- [6] BREPOLS T, VLADIMIROV I N, REESE S. Numerical comparison of isotropic hypo- and hyperelastic-based plasticity models with application to industrial forming processes[J]. *International Journal of Plasticity*, 2014, 63: 18-48.
- [7] HAN Z W, HU Q C, ZHANG Z H, et al. Strain analysis in advanced tool forming process with spline finite strip (SFS) method[J]. *Ironmaking & Steelmaking*, 2013, 40(6): 413-419.
- [8] OÑATE E, FRANCI A, CARBONELL J M. A particle finite element method for analysis of industrial forming processes[J]. *Computational Mechanics*, 2014, 54(1): 85-107.