

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.01.029

# 菜籽多肽的精制工艺及产物特性研究

## Study on refining process and properties of rapeseed peptides

姚轶俊<sup>1,2,3</sup> 王立峰<sup>1,2</sup> 殷实<sup>1,2</sup>YAO Yi-jun<sup>1,2,3</sup> WANG Li-feng<sup>1,2</sup> YIN Shi<sup>1,2</sup>徐斐然<sup>1,2,3</sup> 石嘉恂<sup>1,2</sup> 鞠兴荣<sup>1,2,3</sup>XU Fei-ran<sup>1,2,3</sup> SHI Jia-yi<sup>1,2</sup> JU Xing-rong<sup>1,2,3</sup>

(1. 南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏 南京 210023; 3. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing, Jiangsu 210023, China; 2. Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing, Jiangsu 210023, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**摘要:**以菜籽多肽粗品为研究对象,利用粉末活性炭进行脱色处理后,将多肽溶液吸附聚集到 DA201-C 大孔吸附树脂上,经乙醇解吸后,得到菜籽精制多肽(RP75)。并分析了菜籽精制多肽(RP75)的基本组成、抗血栓活性、抗炎活性以及氨基酸组成特性。结果表明,DA201-C 大孔吸附树脂精制的最佳工艺是多肽浓度 30 mg/mL,流速 3 BV/h, pH 4.5,乙醇解吸浓度 75%。精制后菜籽多肽(RP75)的肽含量为 74.94%,抗营养因子植酸、硫苷均未检出,有丰富氨基酸组成,并具有良好的抗血栓活性( $IC_{50} = 8.82$  mg/mL)和抗炎活性( $IC_{50} = 0.80$  mg/mL),可以作为一种潜在促进健康的可食用功能性产品。

**关键词:**菜籽多肽;精制工艺;功能特性;氨基酸

**Abstract:** In this study, the crude rapeseed peptide was used as the research object. After treatment with powdered activated carbon, peptide solution was adsorbed onto DA201-C macroporous adsorption resin and then desorbed by ethanol to obtain rapeseed refined peptides (RP75). The basic composition, antithrombotic activity, anti-inflammatory activity and amino acid composition of rapeseed refined peptides (RP75) were also analyzed. The results showed that the optimum process for the refining of the DA201-C macroporous adsorption resin were peptide concentration 30 mg/mL, flow rate 3 BV/h, pH 4.5 and desorption concentration of

the ethanol 75%. Peptide content was 74.94%, no glucosinolate or phytic acid was detected in RP75. On the other hand, RP75 contained rich amino acids and exhibited excellent bioactivities including anti-thrombotic and anti-inflammatory activities with  $IC_{50}$  values of 8.82 mg/mL and 0.80 mg/mL. These results indicated that RP75 could be used as a potential health promoting ingredient with functional activity.

**Keywords:** rapeseed peptide (RP75); refining process; functional properties; amino acid

油菜的栽种历史悠久,中国作为主要的油菜生产国之一,油菜籽产量超过  $1.40 \times 10^7$  t。加工处理后,会产生  $9.00 \times 10^6$  t 的菜籽饼粕。菜籽饼粕中不仅含有丰富的糖、卵磷脂、维生素、微量元素等,还含有高达 35%~42% 的蛋白质<sup>[1]</sup>。菜籽蛋白的氨基酸组成合理,与其它植物蛋白相比,几乎不存在限制氨基酸,具有很好的营养性<sup>[2]</sup>。以菜籽蛋白为原料,经生物酶法可以得到利用率高、易吸收、抗原性低,不会产生过敏反应的小分子菜籽多肽<sup>[3]</sup>,其生物活性受到广泛关注。研究表明,菜籽多肽具有抗氧化<sup>[4-6]</sup>、抑制 ACE<sup>[7]</sup>、抑制肿瘤生长等生物活性<sup>[8]</sup>,这类研究将促使菜籽多肽在功能性食品市场上有广阔的前景。

菜籽蛋白在水解制备菜籽多肽的过程中,不仅要用碱液来调节蛋白酶的最适 pH 值,还要通过不断的增加碱液来维持体系的 pH 值,导致样品中混入了大量的无机盐。此外,水解液最终色泽呈现黑褐色,干燥后的产品色泽也较深。这些因素使菜籽肽相关产品在食品、医药等领域中的应用得到限制。目前在实验室及工业生产中多

**基金项目:**国家重点研发计划项目(编号:2016YFD0401401);南京市科技计划项目(编号:201716034);江苏省产学研合作项目(编号:BY2016009-01)

**作者简介:**姚轶俊,女,南京财经大学在读博士研究生。

**通信作者:**王立峰(1977—),男,南京财经大学教授,博士。

E-mail: wanglifeng\_8@163.com

**收稿日期:**2018-09-11

肽物质的精制通常包括脱色、脱盐等步骤,常用的脱色方法是活性炭脱色,脱盐方法是大孔吸附树脂法<sup>[9]</sup>。大孔吸附树脂法,主要是通过分子间疏水相互作用有选择性地对分子进行吸附,不仅能降低其中可溶性成分,保留水解物中的疏水性肽段,而且成本较低、重复利用性好<sup>[10]</sup>。

目前针对多肽物质的脱盐工艺研究相对集中在大豆肽及小麦胚芽多肽等<sup>[11-12]</sup>。对于菜籽多肽的研究较少,而且已有研究基本集中于对分离纯化出的单一肽段进行鉴定及功能评价,如谢慧慧等<sup>[8]</sup>从菜籽粕中分离纯化出菜籽抗肿瘤肽,并结合 Western Blot 分析菜籽抗肿瘤肽对肿瘤细胞生长及肿瘤细胞内凋亡相关蛋白表达的影响,初步明确菜籽抗肿瘤肽的作用机理。针对菜籽肽产品本身的精制研究工艺和产物特性研究还未见报道。本试验在前期通过酶解菜籽粕制备菜籽多肽的基础上拟就菜籽多肽的精制工艺中的脱盐进行探讨,以期为后续菜籽多肽的功能性应用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

宁杂 19 号油菜籽粕:江苏省农业科学院所;

粉末状活性炭、凝血酶(12 IU/mL)、脂多糖(LPS):化学纯,北京索莱宝科技有限公司;

噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、双抗(青霉素 10 kU/mL,链霉素 10 mg/mL):分析纯,美国 Gibco 公司;

NO 试剂盒:上海碧云天生物科技有限公司;

RAW264.7 巨噬细胞:上海细胞库;

DA201-C 大孔吸附树脂:郑州勤实科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

数显恒温水浴锅:HH-4 型,国华电器有限公司;

纯水机:Milli-Q 型,美国密理博公司;

台式冷冻干燥机:FreeZone 2.5 L 型,美国 LABCONCO 公司;

紫外可见分光光度计:U-3900 型,日本 HITACHI 公司;

上下摇摆摇床:TY-80B 型,南京大学;

生物安全柜:1300-A 型,美国赛默飞世尔科技有限公司;

CO<sub>2</sub> 培养箱:250i 型,美国赛默飞世尔科技有限公司;

酶标仪:SpectraMax M2e 型,美国 Molecular Devices 公司;

氨基酸分析仪:L-8900 型,日本 Hittachi 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 菜籽肽粗品制备 根据实验室优化的条件,以宁杂 19 号油菜籽粕(由江苏省农业科学院所提供)为原料,

将菜籽饼粕粉碎、脱油后,利用碱提酸沉提取菜籽分离蛋白,通过 Alcalase 和 Flavourzyme 分步水解制备菜籽蛋白水解物,Alcalase 添加量 6 000 IU/g,水解时间 3 h;Flavourzyme 添加量 4 000 IU/g,水解时间 2 h,制备得到菜籽肽粗品。

1.3.2 粉末活性炭脱色处理 取一定量菜籽多肽液,根据本实验室优化后的条件,采用粉末活性炭脱色。活性炭添加量 2%,脱色温度 60 ℃,脱色时间 60 min,pH 3.5。此时,多肽脱色率为 85.41%,回收率为 71.54%。将脱色后的菜籽多肽冷冻干燥后于-20 ℃储藏备用。

### 1.3.3 DA201-C 大孔吸附树脂精制工艺确定

(1) 样品浓度的影响:将脱色后的菜籽多肽配置成 15,30,45,60,75 mg/mL。然后分别取一定量的菜籽多肽脱色溶液以 2 BV/h 流速流经层析柱,上样吸附结束后,用 2 BV 蒸馏水洗脱,再用 50%乙醇解吸,流速与上样流速一致,洗脱 2 BV 后停止洗脱,旋转蒸发浓缩后,测定脱盐率和肽的回收率。取水解液 5 mL,加入 10%三氯乙酸溶液 5 mL,静置 30 min,离心 20 min(8 000×g)。取 1 mL 上清液加入 3 mL 双缩脲溶液(0.75 g 无水硫酸铜和 3 g 酒石酸钾钠溶于 250 mL 的蒸馏水,在搅拌时加入 10%氢氧化钠溶液 150 mL 和碘化钾 0.5 g,定容至 500 mL),在 25 ℃条件下,静置 30 min 后,在 540 nm 处测定吸光度。以牛血清蛋白为标准蛋白绘制标准曲线,对照标准曲线求得样品溶液中的蛋白含量(mg/mL)。按式(1)计算蛋白回收率。

$$c = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

$c$ ——蛋白回收率,%;

$m_1$ ——菜籽蛋白水解液中蛋白含量,mg/mL;

$m_2$ ——菜籽粗蛋白含量,mg/mL。

(2) 流速的影响:取一定量菜籽多肽脱色溶液,分别以 1,2,3,4,5 BV/h 流速流经层析柱,上样吸附结束后,用 2 BV 蒸馏水洗脱,再用 50%乙醇解吸,流速与上样流速一致,洗脱 2 BV 后停止洗脱,旋转蒸发浓缩后,测定脱盐率和肽回收率。

(3) pH 的影响:取一定量的菜籽多肽脱色溶液,分别调节 pH 为 3.5,4.5,5.5,6.5,7.5,然后都以 2 BV/h 流速流经层析柱,上样吸附结束后,用 2 BV 蒸馏水洗脱,再用 50%乙醇解吸,流速与上样流速一致,洗脱 2 BV 后停止洗脱,旋转蒸发浓缩后,按式(2)、(3)计算脱盐率和肽回收率。

$$c = 1 - \frac{c_1 \times v_1}{c_2 \times v_2} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

$c$ ——脱盐率,%;

$$\begin{aligned}
 c_1 & \text{——脱盐后 } \text{Cl}^- \text{ 浓度, mg/mL;} \\
 v_1 & \text{——收集液体积, mL;} \\
 c_2 & \text{——脱盐前 } \text{Cl}^- \text{ 浓度, mg/mL;} \\
 v_2 & \text{——上样体积, mL,} \\
 c_1 & = \frac{m_3}{m_4} \times 100\%, \quad (3)
 \end{aligned}$$

式中:

$$\begin{aligned}
 c_1 & \text{——肽回收率, \%;} \\
 m_3 & \text{——脱盐后样品多肽含量, mg/mL;} \\
 m_4 & \text{——脱盐前样品多肽含量, mg/mL.}
 \end{aligned}$$

(4) 解吸剂的影响: 不同体积分数的乙醇解吸试验经脱色条件处理, 并确定大孔吸附树脂精制工艺后, 在解吸阶段分别采用体积分数 25%, 50%, 75%, 100% 的乙醇解吸, 经过旋转蒸发、冷冻干燥后得到 4 个菜籽肽组分, 分别是 RP25、RP50、RP75、RP100。按式(4)计算精制肽回收率。

$$c_2 = \frac{m_5}{m_6} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

$$\begin{aligned}
 c_2 & \text{——精制肽回收率, \%;} \\
 m_5 & \text{——冻干后各组分的多肽含量, mg/mL;} \\
 m_6 & \text{——解吸前样品多肽含量, mg/mL.}
 \end{aligned}$$

#### 1.3.4 产物特性测定

(1) 多肽含量: 参照文献[13]。

(2) 含盐量: 参照文献[14]。

(3) 灰分: 按 GB/T 5009.4—2003 执行。

(4) 单宁含量: 采用邻二氮菲—铁(III)分光光度法<sup>[15]</sup>。称取一定量的样品溶于水中, 在 95 °C 中水浴 1 h 后, 冷却至室温, 过滤, 将滤液移至 100 mL 容量瓶中并定容。从 100 mL 容量瓶中取稀释液 1 mL 于 50 mL 容量瓶中, 分别加入 0.01 mol/L 的铁(III)溶液(称取 2.41 g 硫酸铁铵溶于 500 mL 蒸馏水, 并加入 0.5 mL 浓硫酸) 3 mL, 置于 80 °C 水浴 25 min。冷却至室温后依次加入缓冲液(15 g 冰醋酸和 20 g 醋酸钠溶于 250 mL 蒸馏水, 配成 pH 4.4 的溶液) 4 mL、0.015 mol/L 的邻二氮菲溶液(取邻二氮菲 1.485 g 溶于 500 mL 蒸馏水) 6 mL、0.05 mol/L EDTA 溶液(0.25 g EDTA 二钠盐溶于 500 mL 蒸馏水) 1 mL, 定容至 50 mL 后摇匀, 静置 10 min, 在 510 nm 波长测定 OD 值。对照单宁标准曲线求得样品溶液中单宁的含量。

(5) 植酸含量: 采用三氯化铁滴定法<sup>[16]</sup>。取 2 g 样品于 50 mL 容量瓶, 采用盐酸浸提, 离心后取 2 mL 上清液, 稀释至 10 mL。加入 10 g/100 mL 磺基水杨酸溶液 2 滴, 用三氯化铁溶液滴定至紫色不褪去。

(6) 硫苷含量: 采用氯化钡法<sup>[17]</sup>。称取样品 0.1 g 于 10 mL 试管中, 在沸水浴中干蒸 10 min, 加入 8 mL 的沸

水, 接着在沸水浴中蒸煮 40 min, 搅拌后, 取出来静置冷却后, 稀释至 10 mL。取 0.5 mL 过滤后, 加入 0.1% 羧甲基纤维素钠 2 mL, 再加入氯化钡显色溶液(称取 177 mg 的氯化钡加入 6.2% 的盐酸溶液 2 mL 和 20 mL 的蒸馏水, 加热溶解后定容至 250 mL) 1 mL, 然后在 24 °C 恒温箱中放置 3 h, 在 540 nm 测 OD 值。经换算得出硫苷含量, 并以氯化钡、羧甲基纤维素钠空白溶液作为参比溶液。

(7) 产物体外抗血栓活性: 酶标仪温度设置 37 °C, 检测波长 405 nm。不同浓度的样品溶液、凝血酶溶液和纤维蛋白溶液都以 0.05 mol/L Tris-HCl 和 0.12 mmol/L 的 NaCl 混合缓冲溶液配置(pH 7.2)。在 96 孔板里加入 0.1 g/100 mL 纤维蛋白原溶液 140 μL 和样品溶液 40 μL, 混合均匀后在 405 nm 处读数(SB)。加入 10 μL 的凝血酶溶液(12 IU/mL), 启动反应 10 min 后, 在 405 nm 处读数(S)。取 40 μL 的缓冲液代替样品溶液, 重复上述步骤, 读数分别是 CB 和 C<sup>[18]</sup>。样品凝血酶的抑制率按式(5)计算:

$$c_0 = \frac{(C-CB)-(S-SB)}{(C-CB)} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

$c_0$ ——凝血酶的抑制率, %;

C——缓冲液启动反应 10 min 后在 405 nm 处 OD 值;

CB——缓冲液混合均匀后在 405 nm 处 OD 值;

S——样品溶液启动反应 10 min 后在 405 nm 处 OD 值;

SB——样品溶液缓冲液混合均匀后在 405 nm 处 OD 值。

(8) 产物体外抗炎活性: 将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 放置于培养基 DMEM(10% FBS, 0.1% 青霉素—链霉素溶液) 中生长, 并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下进行培养。将 100 μL 的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 接种于 96 孔板中(2 × 10<sup>5</sup> 个/孔), 加入不同浓度(100, 200, 500, 1 000 μg/mL) 的样品。1 h 后加入浓度为 1 μg/mL 的 LPS(脂多糖), 在培养箱(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 中孵育 24 h。24 h 后使用 NO 试剂盒测定上清液 NO 的释放量, 吸取 50 μL 的上清液于 96 孔板中, 并加入 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 试剂各 50 μL 反应 10 min, 在 540 nm 测定吸光度。NO 很不稳定, 会在细胞中迅速代谢生成 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>。通过测定其中亚硝酸盐含量来间接反映细胞中 NO 的释放量。NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度用不同浓度的亚硝酸钠替代样品做标准曲线来确定。

$$c = \frac{c_1 - c_2}{c_1} \times 100\%, \quad (6)$$

式中:

$c$ ——NO抑制率,%;

$c_1$ ——只加入LPS(脂多糖)所产生的亚硝酸盐浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

$c_2$ ——加入不同浓度样品和LPS(脂多糖)所产生的亚硝酸盐浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(9)产物氨基酸组成分析:取0.2 g样品置于水解管中,加入6 mol/L的盐酸,真空封口,在110 °C条件下水解24 h。反应结束后经过滤浓缩后采用0.02 mol/mL的HCl溶液定容至50 mL,再经0.22  $\mu\text{m}$ 的过滤器过滤后,采用氨基酸分析仪进行氨基酸组分的分析。

#### 1.4 数据处理

每组试验均重复3次,结果表示为平均值 $\pm$ 标准偏差。利用SPSS17.0统计软件进行方差分析,显著性水平为 $P<0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DA201-C大孔吸附树脂精制工艺研究

2.1.1 样品浓度的影响 样品浓度对脱盐率和多肽回收率的影响见图1。由图1可知,随着多肽液浓度的升高,多肽回收率呈下降趋势,当多肽液浓度 $>30$  mg/mL时,多肽回收率下降趋势加剧。多肽液浓度较低时,肽能够与大孔树脂充分地接触,在疏水相互作用下,尽可能多地被吸附。但随多肽液浓度的降低,生产周期就会延长,图1表明,整体上多肽液浓度对脱盐率没有明显影响。综合考虑,多肽液浓度可选择30 mg/mL。

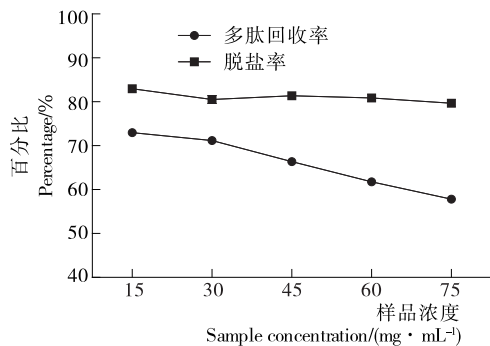


图1 样品浓度对多肽回收率和脱盐率的影响

Figure 1 Effect of sample concentration on recovery of peptide and desalination rate

2.1.2 流速的影响 流速对脱盐率和多肽回收率的影响见图2。由图2可知,洗脱流速不同对多肽回收率有显著的影响,洗脱流速1 BV/h时比5 BV/h多肽回收率高出12.02%;而整体来看,流速对脱盐率显著性不明显。因为洗脱流速3 BV/h时比1 BV/h多肽回收率没有明显的降低,且流速越快生产周期越短,所以选择3 BV/h较为合理。

2.1.3 pH的影响 pH对脱盐率和多肽回收率的影响见

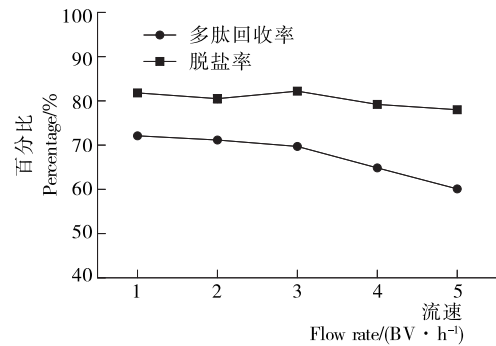


图2 流速对多肽回收率和脱盐率的影响

Figure 2 Effect of flow rate on recovery of peptide and desalination rate

图3。图3表明,pH对脱盐率影响不大,而在pH为4.5~5.5时多肽回收率较大,当pH为4.5时多肽回收率最大,可能是当pH值在蛋白质等电点时,蛋白质分子所带净电荷少,分子间的静电斥力小,吸引力增强,所以不易被水洗脱,选择pH 4.5较为合理。

2.1.4 解吸剂的影响 图4为不同体积分数乙醇解吸所得的多肽回收率。75%乙醇解吸所得组分的多肽回收率最高(74.40%)。随着乙醇体积分数的增加,解吸率增加,

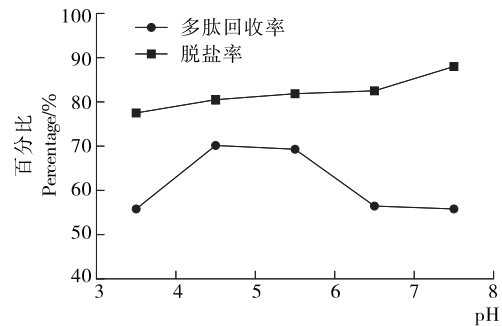
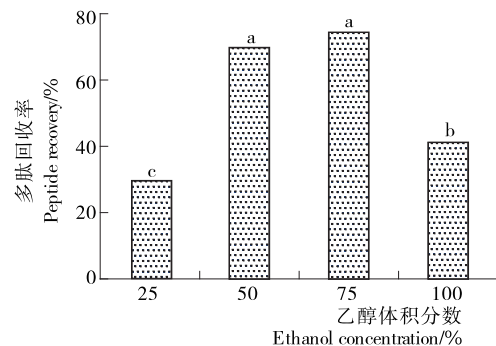


图3 pH对多肽回收率和脱盐率的影响

Figure 3 Effect of pH on recovery of peptide and desalination rate



不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

图4 乙醇体积分数对多肽回收率的影响

Figure 4 The effect of different volume fraction of ethanol on peptide recovery

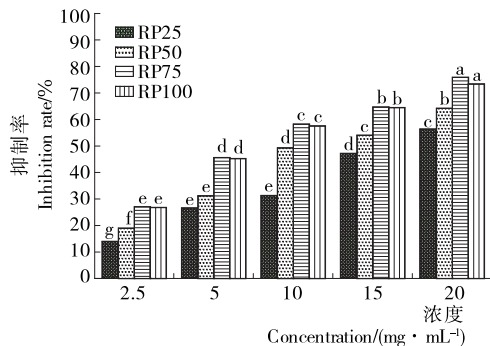


但乙醇浓度太高,达到 100%时,肽类物质难以溶解,解吸液也出现了浑浊现象<sup>[19-20]</sup>。解吸时,不同体积分数乙醇的极性不同,导致与不同肽段亲和力不一样,所以以不同体积分数乙醇对菜籽肽进行洗脱,可能得到具有不同生物活性的菜籽多肽<sup>[21]</sup>。

### 2.2 DA201-C 大孔吸附树脂精制过程中解吸剂浓度对多肽功能特性的影响

不同体积分数乙醇洗脱组分的凝血酶抑制率见图 5;不同体积分数的乙醇洗脱组分对 LPS 刺激诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的抑制作用见图 6。抑制凝血酶催化形成纤维蛋白能力,即凝血酶抑制率可以用来评价体外抗血栓的能力。由图 5 可知,随着浓度的不断增加(2.5~20.0 mg/mL),4 个组分(RP25、RP50、RP75、RP100)的凝血酶抑制率也不断增加,RP25、RP50、RP75、RP100 的 IC<sub>50</sub> 值分别是 16.94,13.13,8.82,9.08 mg/mL,其中 RP75 的抑制凝血酶催化形成纤维蛋白的能力最强。

本试验中,采用 LPS 刺激诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7



不同字母表示差异显著(P<0.05)

图 5 不同体积分数的乙醇洗脱组分的凝血酶抑制率  
Figure 5 Thrombin inhibition rate of ethanol elution components of different volume fraction

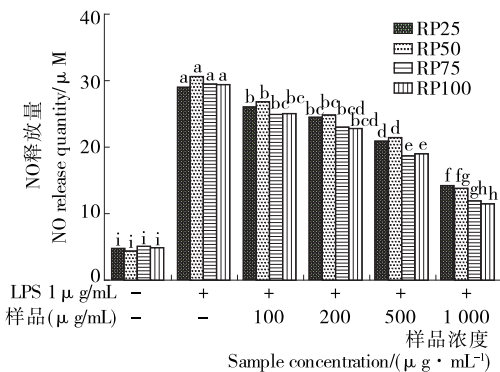


图 6 不同体积分数乙醇洗脱组分对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的抑制作用

Figure 6 The inhibitory effect of ethanol elution components of different volume fraction on NO release in LPS-stimulated RAW264.7 cells

释放 NO 的炎症模型来评价体外抗炎活性。由图 6 可知,RP25、RP50、RP75、RP100 在 0.1~0.2 mg/mL 时,LPS 刺激诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生的 NO 释放量没有显著性差异(P>0.05),RP25、RP50、RP75、RP100 在 0.5 mg/mL 后,LPS 刺激诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生的 NO 释放量有了显著性差异(P<0.05)。RP25、RP50、RP75、RP100 抑制 LPS 刺激诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO 的 IC<sub>50</sub> 值分别是 0.97,1.01,0.80,0.78 mg/mL。结合 2.1.4,精制工艺中解吸时乙醇的体积分数选择 75%较为合理,此时,RP75 具有良好的抗血栓活性(IC<sub>50</sub> = 8.82 mg/mL)和抗炎活性(IC<sub>50</sub> = 0.80 mg/mL)。Zhong 等<sup>[22]</sup>发现大豆蛋白水解物用 DA201-C 大孔吸附树脂处理时,经 75%乙醇洗脱的组分具有最高的降胆固醇活性;Zhang 等<sup>[23]</sup>研究发现草鱼鱼鳞肽经 80%乙醇洗脱的组分具有最高的 ACE 抑制活性;Zhang 等<sup>[24]</sup>认为 RPH55 (DA201-C 大孔吸附树脂纯化菜籽蛋白水解液时,经 55%乙醇洗脱的菜籽肽组分)总抗氧化高于 RPH25 和 RPH85,所以 DA201-C 大孔吸附树脂可以用不同体积分数的乙醇解吸来分离纯化肽类以满足不同功能活性的需求。

### 2.3 菜籽精制多肽(RP75)的基本组成

从表 1 来看,经 DA201-C 大孔吸附树脂精制后的菜籽多肽,肽含量高达 74.94%,灰分含量为 2.25%,单宁含量为 0.60%,而植酸和硫苷均未检出。菜籽精制多肽(RP75)抗营养因子总体含量较低,肽含量较高,无机物含量较低,基本满足食用要求。

表 1 菜籽精制肽的组成

Table 1 Composition of rapeseed refined peptide

肽/%	灰分/%	单宁/%	植酸	硫苷
74.94±0.85	2.25±0.23	0.60±0.09	未检出	未检出

### 2.4 菜籽精制多肽(RP75)的氨基酸组成特性

从表 2 可以看出,菜籽精制多肽(RP75)是由丰富氨基酸组成的植物蛋白肽。菜籽精制多肽(RP75)中 Glu、必需氨基酸、疏水性氨基酸以及带正电荷氨基酸含量较高,分别占氨基酸总量的 16.50%,34.77%,36.10%,14.88%。研究表明,疏水性氨基酸和 Glu 残基含量可能在抗血栓活性方面起到了重要的作用<sup>[25-26]</sup>;带正电荷的氨基酸和疏水性氨基酸被认为在肽的抗炎活性方面起到了作用<sup>[27]</sup>,由此可以推断 RP75 可能具有较好的抗血栓和抗炎活性。

## 3 结论

本研究发现利用 DA201-C 大孔吸附树脂精制菜籽肽的最佳工艺条件为多肽浓度 30 mg/mL,流速 3 BV/h,pH 4.5,乙醇解吸浓度 75%。经测定利用该方法制得的

表 2 菜籽精制多肽(RP75)的氨基酸组成<sup>†</sup>

Table 2 Amino acid composition of rapeseed refined peptide g/100 g

氨基酸	含量	氨基酸	含量
Asp	6.85	Tyr	3.39
Thr	3.74	Phe	3.62
Ser	3.49	Lys	3.99
Glu	13.33	His	2.31
Gly	3.96	Arg	5.72
Ala	4.72	Pro	4.09
Cys	4.83	EAA	28.08
Val	1.54	PCAA	12.02
Met	0.03	HAA	29.16
Ile	3.38	总量	80.77
Leu	11.78		

<sup>†</sup> 必需氨基酸(EAA): Val, Ile, Leu, Met, Thr, Phe, Lys; 疏水性氨基酸(HAA): Met, Phe, Val, Leu, Ile, Pro, Ala; 带正电荷氨基酸(PCAA): Arg, Lys, His。

菜籽精制多肽(RP75)中抗营养因子总体含量较低, 肽含量较高, 有丰富氨基酸, 并具有良好的抗血栓活性和抗炎活性。

但是本研究仅通过成分分析、体外抗血栓及抗炎活性测定进行了研究, 后续将在此基础上通过细胞试验及分子生物学评价手段对菜籽多肽的功能特性和作用机制进行进一步的探究, 以期为其功能性应用提供理论依据。

### 参考文献

[1] 王立峰, 袁建, 鞠兴荣, 等. 双低油菜籽油脂加工副产品的研究现状与发展趋势[J]. 中国油脂, 2005(9): 9-12.

[2] 董加宝, 张长贵, 王祯旭. 食用菜籽蛋白研究及应用[J]. 粮食与油脂, 2005(12): 11-13.

[3] 聂慎德. 菜籽肽制备及其抗氧化活性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009: 5-6.

[4] YU Wan-cong, GAO Jie, XUE Zhao-hui, et al. Radical-scavenging activity, ACE-inhibiting capability and identification of rapeseed albumin hydrolysate[J]. Food Science & Human Wellness, 2013, 2(2): 93-98.

[5] HE Rong, GIRGIH A, MALOMO S, et al. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1): 219-227.

[6] ZHOU Cun-shan, YU Xiao-jie, QIN Xiao-pei, et al. Hydrolysis of rapeseed meal protein under simulated duodenum digestion: Kinetic modeling and antioxidant activity[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 68: 523-531.

[7] HE Rong, GIRGIH A, ROZOY E, et al. Selective separation and concentration of antihypertensive peptides from rapeseed pro-

tein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes[J]. Food Chemistry, 2016, 197(Pt A): 1 008-1 014.

[8] XIE Hui-hui, WANG Yi-feng, ZHANG Jing, et al. Study of the fermentation conditions and the antiproliferative activity of rapeseed peptides by bacterial and enzymatic cooperation [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(3): 619-625.

[9] 陈丽丽, 赵利, 袁美兰, 等. 大孔吸附树脂对草鱼蛋白水解液脱盐的作用[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 84-88.

[10] GOKMAN V, SERPEN A. Equilibrium and kinetic studies on the adsorption of dark colored compounds from apple juice using adsorbent resin [J]. Journal of Food Engineering, 2002, 53(3): 221-227.

[11] 张佳秀, 侯俊财, 邹艳楠, 等. 大孔树脂对酶解大豆肽脱盐效果影响及其最佳条件研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 203-206.

[12] 赵泽龙. 小麦低聚肽制备工艺的优化及性质与抗氧化能力测试[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016: 35-36.

[13] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.

[14] 刘军, 徐志宏, 魏振承, 等. 棉籽蛋白源 ACE 抑制肽的制备过程中脱盐技术的研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(7): 36-40.

[15] 李晓文, 严聃, 盛灿梅. 邻二氮菲-铁(III)分光光度法测定茶叶中微量单宁[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 90-91.

[16] 王国蓉, 万文贵, 王丽, 等. 三氯化铁滴定法测定植酸含量方法的优化及改进研究[J]. 食品科学, 2009, 30(10): 188-190.

[17] 王宁惠. 油菜籽(饼粕)中硫代葡萄糖甙总量速测方法——氯化钡法[J]. 青海农林科技, 2009(3): 58-59.

[18] YANG Wen-gen, WANG Zhang, XU Shi-ying. A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplatereader[J]. 中国化学快报: 英文版, 2007, 18(4): 449-451.

[19] 潘道东, 林璐. DA201-C 大孔吸附树脂静态吸附 ACE 抑制肽的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 16-19.

[20] 邓惠玲, 郑炯, 阚建全. 大孔树脂 DA201-C 对猪血红蛋白 ACE 抑制肽吸附性能的研究[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 27-31.

[21] 张晓平, 赵世锋, 蒋琼, 等. 酶解燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 189-193.

[22] ZHONG Fang, ZHANG Xiao-mei, MA Jian-guo, et al. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalasehydrolysates[J]. Food Research International, 2007, 40(6): 756-762.

[23] ZHANG Feng-xiang, WANG Zhang, XU Shi-ying. Macroporous resin purification of grass carp fish (Ctenopharyngodonidella) scale peptides with in vitro angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory ability[J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 387-392.

(下转第 212 页)

表 5 主成分因子旋转后的载荷矩阵

Table 5 Load matrix after principal component factor rotation

变量	因子 1	因子 2	因子 3	因子 4
总香味量	0.858	0.139	0.399	0.119
新植二烯	0.018	0.796	0.158	-0.015
酮类	0.853	-0.010	0.082	-0.038
醛类	0.817	0.169	-0.201	0.172
醇类	-0.086	0.134	0.799	-0.101
酯类	0.689	0.326	0.103	0.425
呋喃类	0.438	0.158	-0.058	0.889
酚类	0.887	-0.171	0.011	-0.213
氮杂环类	0.432	0.493	0.051	0.099

$$F_2 = 0.139X_1 + 0.796X_2 - 0.01X_3 + 0.169X_4 + 0.134X_5 + 0.326X_6 + 0.158X_7 - 0.171X_8 + 0.493X_9, (4)$$

$$F_3 = 0.399X_1 + 0.158X_2 + 0.082X_3 - 0.201X_4 + 0.799X_5 + 0.103X_6 - 0.058X_7 + 0.011X_8 + 0.051X_9, (5)$$

$$F_4 = 0.119X_1 - 0.015X_2 - 0.038X_3 + 0.172X_4 - 0.101X_5 + 0.425X_6 - 0.889X_7 - 0.213X_8 - 0.099X_9. (6)$$

从关系表达式可看出,总香味含量、醛类、酚类和酮类在第 1 主成分上有较高的正载荷,说明第 1 主成分可以体现这些指标的信息;氮杂环类和新植二烯对第 2 主成分影响较大;总香味含量和醇类对第 3 主成分影响较大;对第 4 主成分影响较大的是呋喃类和酯类。

### 3 结论

(1) 不同卷烟烟丝中致香成分和评吸质量之间具有一定的相关性,其中,卷烟评吸指标香气和杂气与所含的总香味物质以及大部分香味物质呈显著正相关;刺激性和余味与各类致香物质不具有相关性。由此,在追求卷烟烟香的同时,要充分考虑致香物质附带的杂气对卷烟感官质量的负面影响,针对不同叶组配方可通过精确的量化配比试验,确定卷烟的最佳致香状态。

(2) 对致香成分和评吸指标进行多元线性逐步回归分析,得到香气和谐调的 2 个预测模型方程,经显著性测验均达到了极显著水平,均可作为预测和估计卷烟香气和谐调性提供参考依据。另外,总香味含量、酮类、新植二烯、酚类和醛类作为影响卷烟感官质量的主要影响因子,总香味含量对感官质量的影响尤为关键。该结果对卷烟产品维护及新型卷烟配方的设计具有积极意义。

烟丝挥发性香味物质与类型卷烟感官质量相关性研究有助于为卷烟配方制定及维护提供标准设定依据,从而实现稳定卷烟产品的感官质量和吸食品质的目的。但当前尚未能形成烟丝挥发性香味物质标准数据库,如能构建标准数据库,将有助于排除因不同评吸人员感官差

异造成的卷烟产品香味不稳定因素,这也是下一步研究的方向。

### 参考文献

[1] 史宏志, 刘国顺. 烟草香味学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 45-50.

[2] SWAIN A P, JUN R F P, STEDMAN R L. Composition studies on tobacco XXI: The headspace vapours of leaf[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, 17(8): 349-353.

[3] 于川芳, 李晓红, 罗登山, 等. 玉溪烤烟外观质量因素与其主要化学成分之间的关系[J]. 烟草科技, 2005(1): 5-7.

[4] 肖协忠, 王放, 贺英, 等. 烤烟致香成分与香气质量的相关性分析[J]. 中国烟草科学, 2008, 29(6): 1-6.

[5] 李炎强, 洗可法. 顶空共蒸馏法分析烟草中性香味成分[J]. 中国烟草学报, 1997, 12(1): 18-20.

[6] 朱忠, 洗可法. 中上部不同成熟度烤烟烟叶与主要化学成分和香味物质组成关系的研究[J]. 中国烟草学报, 2008, 23(1): 15-18.

[7] 胡建军, 周冀衡, 李文伟, 等. 烤烟香味成分与其感官质量的典型相关分析[J]. 烟草科技, 2007(3): 3-8.

[8] 于建军, 庞天河, 任晓红, 等. 烤烟中性致香物质与评吸结果关系研究[J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(4): 346-349.

[9] 于建军, 庞天河, 章新军, 等. 鄂西南烤烟吸食质量与致香物质的关系[J]. 华中农业大学学报: 自然科学版, 2006(4): 25-28.

[10] 刘宇, 颜合洪. 烟草致香物质的研究进展[J]. 作物研究, 2006, 20(5): 470-474.

[11] 吴宁宁, 杨俊, 张天栋, 等. 卷烟的感官特征与其烟丝提取物 GC/MS 数据之间的关系[J]. 烟草科技, 2013(11): 31-35.

[12] 张文彤, 董伟. SPSS 统计分析高级教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013: 168-175.

(上接第 169 页)

[24] ZHANG Feng-xiang, WANG Zhang, XU Shi-ying, et al. Purification and Characterization of a Radical Scavenging Peptide from Rapeseed Protein Hydrolysates [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2009, 86(10): 959-966.

[25] REN Yao, WU Hui, LAI Fu-rao, et al. Isolation and identification of a novel anticoagulant peptide from enzymatic hydrolysates of scorpion (Buthusmartensii, Karsch) protein[J]. Food Research International, 2014, 64(Complete): 931-938.

[26] ZHANG Shao-bing. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2016, 202: 1-8.

[27] ZHAO Lei, WANG Xuan, ZHANG Xiao-lei, et al. Purification and identification of anti-inflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (Cervuselaphus Linnaeus) [J]. Journal of Food & Drug Analysis, 2016, 24(2): 376-384.