

超声辅助酶法制备菜籽肽及其组成、 物理特性及结构分析

黎茂英¹, 黄桃翠², 刘文海³, 石慧¹, 韩梅², 陈泳玲⁴, 钟耕^{1,5}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 重庆市农业科学院, 重庆 400060; 3. 重庆红蜻蜓油脂
有限责任公司, 400010; 4. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716;
5. 川渝共建特色食品重庆市重点实验室, 重庆 400716)

摘要:为提高低温压榨菜籽饼的附加值和应用价值,采用石油醚对低温压榨菜籽饼进行脱脂,然后利用超声预处理分别辅助木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶直接酶解制备菜籽肽,通过单因素试验探究超声功率、超声时间及酶添加量对菜籽肽得率的影响,通过响应面法优化超声辅助酶解工艺条件,并对所得菜籽肽的组成、物理特性以及结构进行分析。结果表明:碱性蛋白酶酶解的菜籽肽得率高于木瓜蛋白酶的;最佳超声辅助碱性蛋白酶酶解工艺条件为酶添加量 12 289.79 U/g、超声时间 21.82 min、超声功率 306.56 W,该条件下菜籽肽得率为 55.19%;最佳条件下所得菜籽肽的分子质量范围为 88.02 ~ 1 290.00 Da,其中 98.40%的菜籽肽分子质量小于 500 Da,相较于未超声辅助酶解,所制备的菜籽肽氨基酸含量增加,粒径变小,Zeta 电位绝对值变大,二级结构中 α -螺旋和 β -折叠含量增加, β -转角含量减少,二级结构更有序、稳定。综上,超声辅助酶法不使用有机溶剂,环境友好,且产品品质较好,可以用于高效提取菜籽肽。

关键词:菜籽肽;超声辅助;酶解;品质

中图分类号:TQ464.7;TS201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)09-0036-07

Preparation of rapeseed peptides by ultrasound assisted enzymatic hydrolysis and analysis of its composition, physical properties and structure

LI Maoying¹, HUANG Taocui², LIU Wenhai³, SHI Hui¹, HAN Mei²,
CHEN Yongling⁴, ZHONG Geng^{1,5}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Academy of
Agricultural Sciences, Chongqing 400060, China; 3. Chongqing Red Dragonfly Oil Co., Ltd.,
Chongqing 400010, China; 4. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University,
Chongqing 400716, China; 5. Chongqing Key Laboratory of Specialty Food Co - Built by
Sichuan and Chongqing, Chongqing 400716, China)

Abstract: To enhance the added value and application potential of low temperature pressed rapeseed cake, the low temperature pressed rapeseed cake was defatted with petroleum ether, then ultrasound pretreatment was employed to assist in the direct enzymatic hydrolysis using both papain and alkaline protease to prepare rapeseed peptides. Single - factor experiments were conducted to investigate the

收稿日期:2023-12-14;修回日期:2024-04-28

基金项目:重庆市现代农业产业技术体系资助
(COMAITS202304)

作者简介:黎茂英(1997),女,硕士研究生,研究方向为植物
蛋白(E-mail)lmy.tian@foxmail.com。

通信作者:钟耕,教授,博士(E-mail)zhongdg@126.com。

effects of ultrasound power, ultrasound time, and enzyme addition amount on the yield of rapeseed peptides, followed by optimization of process conditions using response surface methodology. The composition, physical properties and structure of the obtained rapeseed peptides were analyzed.

The results indicated that the yield of rapeseed peptides obtained by alkaline protease hydrolysis was higher than that of papain. The optimal process conditions were alkaline protease addition amount 12 289.79 U/g, ultrasound time 21.82 min, and ultrasound power 306.56 W. Under the optimal conditions, the yield of rapeseed peptide was 55.19%, and the molecular weight of rapeseed peptides ranged from 88.02 Da to 1 290.00 Da, with 98.40% of rapeseed peptides less than 500 Da. Compared with the product without ultrasound assisted enzymatic treatment, the content of amino acid of rapeseed peptides increased, the particle size decreased, the absolute value of Zeta potential increased, α -helix and β -folding in the secondary structure increased, β -angle decreased, and the secondary structure was more orderly and stable. In conclusion, ultrasound assisted enzymatic methods does not use solvent, is environmentally friendly and has good product quality, and can be used for the efficient and direct extraction of rapeseed peptides.

Key words: rapeseed peptide; ultrasound assist; enzymatic hydrolysis; quality

油菜是世界上仅次于大豆的第二大油料作物^[1],根据《“十四五”全国种植业发展规划》,2025年我国油菜籽产量预计将达到1 800万t左右^[2],而全球每年加工油菜籽所产生的菜籽饼粕(Rapeseed cake, RC)高达3 550万t^[3],我国的RC产量也达到886万t,RC含有35%~40%的蛋白质^[4],是良好的蛋白质资源。研究表明,菜籽蛋白具有良好的水、油结合能力以及起泡性,且其氨基酸组成合理,满足人体对必需和非必需氨基酸的需求,适宜作为新型功能性食品原料^[5-6]。然而,RC中含有抗营养因子(硫代葡萄糖苷、粗纤维)和有毒成分(硫氰酸盐)^[7],除小部分RC被用作动物饲料外,大部分被用作肥料和燃料,甚至被丢弃,RC的食用转化利用率低,造成了资源浪费^[8]。

我国工业上生产菜籽油的方法有压榨法(包括低温压榨和热榨)、浸出法、预榨-浸出法,其中低温压榨法压榨条件相对温和,避免了高温加工产生有害物质^[9],因此低温压榨法生产的菜籽油质量好,其菜籽饼的可利用价值也高。Pan等^[10]研究表明,低温压榨菜籽饼中蛋白质可作为植物蛋白的来源之一。临床营养学研究表明,肽的吸收和消化快于氨基酸和蛋白质,且不容易导致过敏^[11]。Montesano等^[12]认为根据氨基酸序列的不同,肽可表现出免疫调节、抗菌、抗氧化、抗血栓、降低胆固醇和降血压等作用。目前生产生物活性肽最广泛的方法是使用酶(胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶等)水解蛋白质,这种方法比微生物发酵法更快、更容易控制^[11],且酶解反应不会残留有机溶剂或其他潜在有毒物质,在食品安全方面具有优势。然而,单一生物酶解法的效率通常有限,因此研究人员开始探索物理预处理与酶法相结合的方式以提高肽的提

取效率^[13]。

超声波因具有经济、高效的优点,是常用的预处理方法。在酶解前使用超声波进行预处理有助于样品在悬浊液体系中均匀分散,且超声波产生的空化和机械剪切作用能够有效地将大颗粒物质分解成较小的分子,从而暴露更多的酶切位点,增加底物与蛋白酶的接触面积^[14]。此外,超声波处理会改变蛋白质的组织或分子形态和结构,增强其与蛋白酶的结合,加速酶促反应^[15]。目前,酶解制备蛋白肽的方法多为先采用碱法提取蛋白质再酶解为小分子肽^[16],该方法操作步骤烦琐,且加工过程中会存在蛋白质变性和有害物质(Lysinoalanine)生成的缺点^[17]。因此,本研究以低温压榨菜籽饼为原料,经石油醚脱脂、超声预处理后直接酶解制备菜籽肽,并通过响应面试验优化工艺条件,以实现菜籽肽的高效制备以及RC的进一步利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

低温压榨菜籽饼:实验室自制,水分含量(8.51±0.13)%,蛋白质含量(干基)(38.17±0.06)%,硫苷含量(干基)(28.78±0.40)%,植酸含量(干基)(24.40±0.28)%,芥酸含量(干基)(0.14±0.04)%。

木瓜蛋白酶(800 U/mg),上海源叶生物科技有限公司;碱性蛋白酶(≥200 000 U/g),北京索莱宝科技有限公司;石油醚、氢氧化钠、三氯乙酸等均为分析纯。

pH计,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;Spectrum 100傅里叶红外光谱仪,珀金埃尔默公司;5840R冷冻离心机,德国Eppendorf公司;SY-10真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;759系列紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器

有限公司;K9860 自动凯氏定氮仪,济南海能仪器股份有限公司;LA8080 - 全自动氨基酸分析仪,美国 Agilent 公司;DAWN/LC - 20A 多角度激光光散射 - 凝胶渗透色谱联用仪,日本岛津公司/美国怀雅特公司;ZEN3700 激光粒度仪,马尔文仪器公司。

1.2 试验方法

1.2.1 超声辅助酶法制备菜籽肽

向低温压榨菜籽饼中按料液比 1:10 加入石油醚,搅拌均匀,密封静置脱脂 12 h,去除上层清液,沉淀置于通风橱至石油醚挥发完全,粉碎,过 250 μm (60 目)筛,得到脱脂菜籽粕。准确称取 10.0 g 脱脂菜籽粕按料液比 1:10 溶于水中,以一定超声功率预处理一定时间,采用 1.0 mol/L NaOH 溶液将预处理液 pH 调节至酶的最适 pH 后,加入一定量的木瓜蛋白酶(最适 pH 8)或碱性蛋白酶(最适 pH 9),分别置于 60 $^{\circ}\text{C}$ (木瓜蛋白酶)或 55 $^{\circ}\text{C}$ (碱性蛋白酶)下水浴 1 h,100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴灭酶 10 min,冷却,离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min)20 min,取上清液于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 预冻 24 h,经真空冷冻干燥得到菜籽肽,置于干燥器中贮存备用。

1.2.2 菜籽肽含量的测定及得率的计算

参考鲁伟等^[18]的方法采用 BCA 法测定样品中菜籽肽的含量,并稍作改进。将菜籽肽产品按照料液比 1:100 溶于质量分数 10% 的三氯乙酸溶液中,混匀后静置 10 min,离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min)20 min,取上清液测定其在 570 nm 处吸光度,代入标准曲线方程($y = 0.5257x + 0.1318$, $R^2 = 0.9976$,式中: x 为菜籽肽质量浓度,mg/mL; y 为 570 nm 处的吸光度)计算菜籽肽含量。

菜籽肽得率(X)按公式(1)计算。

$$X = \frac{CV}{1000m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 为上清液中菜籽肽含量,mg/mL; V 为上清液体积,mL; m 为脱脂菜籽粕的质量,g。

1.2.3 菜籽肽成分的测定

水分含量参照 GB 5009.3—2016 测定;蛋白质含量参照 GB 5009.5—2016 测定;总糖、还原糖含量分别采用硫酸蒽酮法^[19]和 3,5 - 二硝基水杨酸法^[20]测定;氨基酸组成参照 GB 5009.124—2016 测定。

1.2.4 菜籽肽物理特性的表征

1.2.4.1 菜籽肽分子质量的测定

采用十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS - PAGE)^[21]和多角度激光光散射 - 凝胶渗透色谱联用仪(MALLS - GPC)^[22-23]测定菜籽肽的分

子质量。SDS - PAGE:吸取 10 μL 5.5 mg/mL 菜籽肽溶液与 2.5 μL 样品缓冲液混合,煮沸 10 min,冷却后加入到胶孔,在 6% 浓缩胶和 12.5% 分离胶、恒压 80 V 下电泳 45 min,待进入分离胶后采用 120 V 电泳至溴酚蓝跑到分离胶底部。电泳结束后使用考马斯亮蓝染色、脱色至条带清晰,拍照保存。MALLS - GPC:称取适量菜籽肽,溶于 0.9% NaCl 溶液配制质量浓度不低于 5 mg/mL 的溶液,过 0.22 μm 水系膜,在流速 1.00 mL/min、波长 660.00 nm、折射率 1.33、校准常数 5.9318×10^{-5} 条件下进样分析。

1.2.4.2 粒径和 Zeta 电位测定

参照 Li 等^[21]的方法采用激光粒度仪测定粒径。分析条件:水折射率 1.330,材料折射率 1.450。

参照 Crudden 等^[24]的方法测定 Zeta 电位。用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)配制 1 mg/mL 菜籽肽溶液,取 0.9 mL 菜籽肽溶液在室温下用激光粒度仪测定其 Zeta 电位。

1.2.5 菜籽肽结构的测定

采用 Spectrum 100 傅里叶红外光谱仪分析蛋白质结构。分析条件:扫描范围 400 ~ 4 000 cm^{-1} ,扫描次数 64 次。

1.2.6 数据处理

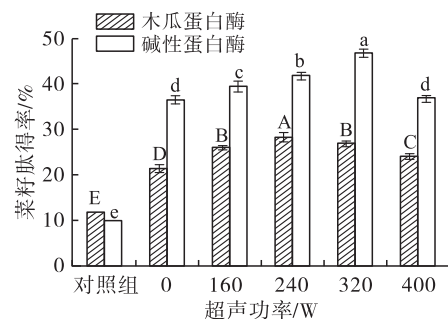
试验结果均以“平均值 \pm 标准差”表示,采用 GraphPad Prism 8 软件作图,采用 Tukey 检验进行显著性分析($p < 0.05$),采用 JMP Trial 16 软件进行回归分析和 t 检验。

2 结果与分析

2.1 超声辅助酶法制备菜籽肽单因素试验

2.1.1 超声功率对菜籽肽得率的影响

不同超声功率(0、160、240、320、400 W)对菜籽肽得率的影响如图 1 所示。



注:空白对照组为不加酶、不做超声处理,其他处理同 1.2.1;固定试验条件为木瓜蛋白酶添加量 12 000 U/g、碱性蛋白酶添加量 9 000 U/g、超声时间 15 min、超声功率 240 W,当考察其中一个因素时,其他条件不变;同一个指标不同字母表示具有显著差异($p < 0.05$)。下同

图 1 不同超声功率下的菜籽肽得率

由图1可知,随着超声功率的增加,木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的菜籽肽得率均呈现先增加后降低的趋势,当超声功率分别为240、320 W时,木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的菜籽肽得率达到最大值。在一定范围内增加超声功率会增强空化和机械剪切作用,使原料分散得更均匀,将大颗粒物质剪切成小分子,暴露更多的酶切位点,增大底物与蛋白酶的接触面积,从而促进酶解,使菜籽肽得率增大。然而,当超声功率过高时,体系温度上升,空化作用减弱,同时游离的蛋白颗粒会重新聚集^[25],导致酶切位点被包裹,降低蛋白颗粒与酶接触的机会,使菜籽肽得率降低。因此,选择超声功率240、320、400 W进行工艺优化。

2.1.2 超声时间对菜籽肽得率的影响

不同超声时间(0、10、15、20、25 min)对菜籽肽得率的影响如图2所示。

由图2可知,随着超声时间的延长,2种蛋白酶的菜籽肽得率整体呈现先升高后降低的趋势,当超声时间为15 min时,木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的菜

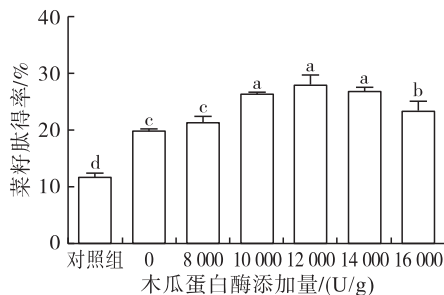


图3 不同木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶添加量下的菜籽肽得率

由图3可知,木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的菜籽肽得率均随着酶添加量的增加呈现先增加后减小的趋势,分别在酶添加量12 000 U/g和11 000 U/g时达到最大值。酶添加量越大,酶浓度越高,与底物发生的反应越强烈^[26];但由于反应体系中底物浓度是一定的,超量增加酶添加量不会再增加反应速率,而且酶与底物反应后,小分子蛋白肽聚集并包裹住剩余的底物,导致菜籽肽得率降低^[27]。对比2种酶的菜籽肽得率发现,碱性蛋白酶的得率高于木瓜蛋白酶。因此,选择碱性蛋白酶为酶解用酶,且选择酶添加量9 000、11 000、13 000 U/g进行后续工艺优化。

2.2 超声辅助酶法制备菜籽肽响应面工艺优化

参考单因素试验结果,以碱性蛋白酶添加量(A)、超声时间(B)、超声功率(C)为考察因素,菜籽肽得率(Y)为考察指标,采用Desing-Expert 10软件根据Box-Behnken原则进行试验设计,试验设计与结果如表1所示。

籽肽得率均达到最大值。在一定超声范围内,延长超声时间会溶解更多的蛋白质,加快与酶的反应速率^[25],从而使菜籽肽得率增加。然而,当超声时间超过15 min时,随着超声时间延长,溶解出的蛋白颗粒很有可能重新聚集,且可酶解的蛋白质含量是一定的,从而导致菜籽肽得率降低。因此,选择超声时间15、20、25 min进行工艺优化。

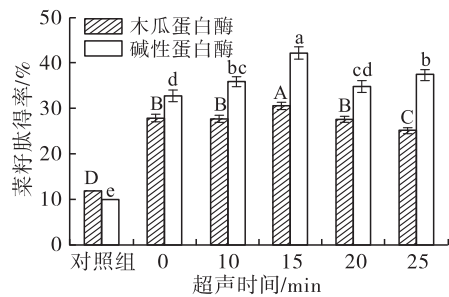


图2 不同超声时间下的菜籽肽得率

2.1.3 酶添加量对菜籽肽得率的影响

木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶添加量对菜籽肽得率的影响如图3所示。

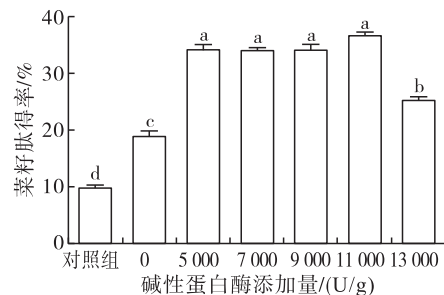


表1 Box-Behnken 试验设计与结果

试验号	A	B	C	Y/%
1	1(13 000 U/g)	0(20 min)	1(400 W)	40.23
2	0(11 000 U/g)	-1(15 min)	-1(240 W)	49.27
3	-1(9 000 U/g)	0	-1	50.35
4	0	0	0(320 W)	58.95
5	0	0	0	58.68
6	-1	0	1	49.07
7	0	-1	1	46.10
8	-1	-1	0	52.20
9	-1	1(25 min)	0	48.73
10	0	0	-1	57.14
11	1	1	0	50.15
12	0	1	0	50.39
13	0	0	0	57.21
14	0	0	0	59.01
15	1	-1	0	44.21
16	1	0	-1	47.35
17	0	1	1	51.64

运用 Desing - Expert 10 软件对表 1 中菜籽肽得率和 3 个因素进行二次多元回归拟合,得到回归方程: $Y = 58.2 - 2.30A + 1.14B - 1.29C + 2.35AB - 1.46AC + 1.11BC - 5.99A^2 - 3.39B^2 - 5.46C^2$ 。

通过 t 检验对模型系数进行显著性检验,结果如表 2 所示。

表 2 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	462.08	9	51.34	24.74	0.000 2 **
A	42.35	1	42.35	20.41	0.002 7 **
B	10.44	1	10.44	5.03	0.059 9
C	13.31	1	13.31	6.42	0.039 1 *
AB	22.11	1	22.11	10.65	0.013 8 *
AC	8.52	1	8.52	4.10	0.082 4
BC	4.89	1	4.89	2.36	0.168 7
A^2	151.00	1	151.00	72.76	<0.000 1 **
B^2	48.31	1	48.31	23.28	0.001 9 **
C^2	125.60	1	125.60	60.52	0.000 1 **
残差	14.53	7	2.08		
失拟项	10.96	3	3.65	4.10	0.103 3
纯误差	3.57	4	0.89		
总方差	476.61	16			

注: ** 表示差异极显著 ($p < 0.01$); * 表示差异显著 ($p < 0.05$)

由表 2 可知,模型的 p 值小于 0.01,说明该模型达到极显著水平,证明了该试验方法的可靠性,可用于菜籽肽提取的试验设计。一次项 A 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 的 p 值小于 0.01,影响极显著,交互项 AB 的 p 值小于 0.05,影响显著;一次项 B 和交互项 AC 、 BC 的 p 值大于 0.05,影响不显著。综上,各因素对菜籽肽得率的影响不是简单的线性关系。失拟项的 p 值为 0.103 3,表明未知因素对试验结果的干扰很小。通过响应面优化得到制备菜籽肽的最佳条件为碱性蛋白酶添加量 12 289.79 U/g、超声时间 21.82 min、超声功率 306.56 W,在此条件下菜籽肽理论得率为 54.90%。对最佳工艺条件进行验证试验,得到菜籽肽平均得率为 55.19%,该结果高于李菊芳 (34.45%)^[28]、付静 (53.19%)^[29] 等的酶法制备菜籽肽得率,而低于易起达^[30] (73.02%) 的。

2.3 菜籽肽成分

2.3.1 基本成分

最佳条件所得菜籽肽基本成分如表 3 所示。

表 3 菜籽肽基本成分 %

水分	蛋白质	总糖	还原糖
3.17 ± 0.12	48.32 ± 0.09	5.28 ± 0.15	4.10 ± 0.14

由表 3 可知,菜籽肽水分含量为 3.17%,蛋白质含量为 48.32%,总糖含量为 5.28%,还原糖含量为 4.10%。

2.3.2 氨基酸组成及含量

菜籽肽氨基酸组成及含量如表 4 所示。

表 4 菜籽肽氨基酸组成及含量 mg/g

氨基酸	空白对照组	菜籽肽
天冬氨酸	7.4 ± 0.0 ^b	34.7 ± 0.0 ^a
苏氨酸	2.5 ± 0.0 ^b	15.9 ± 0.0 ^a
丝氨酸	4.6 ± 0.2 ^b	29.4 ± 0.8 ^a
谷氨酸	12.6 ± 0.0 ^b	81.7 ± 0.1 ^a
甘氨酸	14.1 ± 0.0 ^b	37.6 ± 0.0 ^a
丙氨酸	4.9 ± 0.0 ^b	20.0 ± 0.0 ^a
半胱氨酸	0.3 ± 0.1 ^b	3.7 ± 0.1 ^a
缬氨酸	7.3 ± 0.0 ^b	41.1 ± 0.0 ^a
蛋氨酸	1.3 ± 0.1 ^b	9.4 ± 0.1 ^a
异亮氨酸	3.6 ± 0.1 ^b	17.2 ± 0.0 ^a
亮氨酸	7.3 ± 0.0 ^b	31.8 ± 0.0 ^a
酪氨酸	2.0 ± 0.0 ^b	13.4 ± 0.1 ^a
苯丙氨酸	2.8 ± 0.0 ^b	17.1 ± 0.0 ^a
赖氨酸	8.9 ± 0.1 ^b	37.0 ± 0.0 ^a
组氨酸	1.3 ± 0.1 ^b	12.6 ± 0.0 ^a
精氨酸	4.3 ± 0.0 ^b	26.2 ± 0.0 ^a
脯氨酸	8.9 ± 0.0 ^b	27.3 ± 0.1 ^a
总量	94.2 ± 0.1 ^b	456.3 ± 0.4 ^a

注:同行不同字母代表具有显著差异 ($p < 0.05$)。下同

由表 4 可知,菜籽肽中含有 17 种氨基酸,总量为 456.3 mg/g,显著高于空白对照组 (94.2 mg/g)。WHO/FAO 推荐成年人每天摄入的蛋白质总量为 0.83 g/kg^[31],并且尽可能地摄入多样化,保证必需氨基酸摄入达到需求。因此,菜籽肽可以作为良好的植物蛋白补充来源。

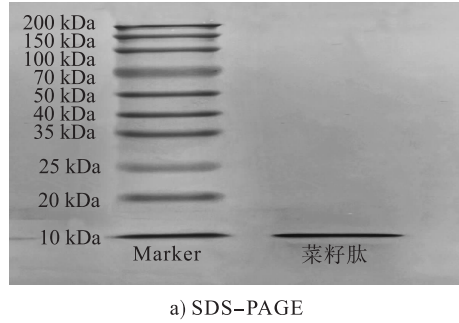
2.4 菜籽肽物理特性

2.4.1 分子质量

菜籽肽 SDS - PAGE、MALLS - GPC 谱图见图 4,分子质量及分布见表 5。

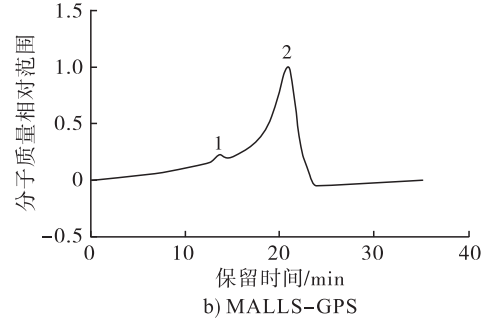
由图 4a 可知,经碱性蛋白酶酶解后,菜籽肽在 10 kDa 附近只有一条泳带,说明其分子质量处于该范围以内。由图 4b 和表 5 可知,菜籽肽 2 个峰位分子质量分别为 1 290.00 Da (峰 1) 和 88.02 Da (峰 2),其重均分子质量分别为 7 546.00 Da (峰 1) 和 279.90 Da (峰 2)。其中,重均分子质量 279.90 Da 的占比为 98.40%,表明菜籽肽段的分子质量大部分小于 500 Da,与 Wali 等^[32] 研究发现菜籽肽中有 69.70% 肽段的重均分子质量都小于 500 Da 的结果

基本一致。峰1、峰2的多分散系数分别为2.61、2.08,旋转半径与重均分子质量大小顺序不一致,这



a) SDS-PAGE

可能是在菜籽肽溶液中蛋白质表面电荷聚集引起分子大小降低造成的。



b) MALLS-GPS

图4 菜籽肽分子质量测定谱图

表5 菜籽肽分子质量及分布

峰号	重均分子质量/Da	多分散系数	旋转半径/nm	占比/%
1	7 546.00	2.61	86.8	1.60
2	279.90	2.08	108.8	98.40

2.4.2 粒径、Zeta 电位

菜籽肽粒径分布如图5所示,Zeta 电位如表6所示。

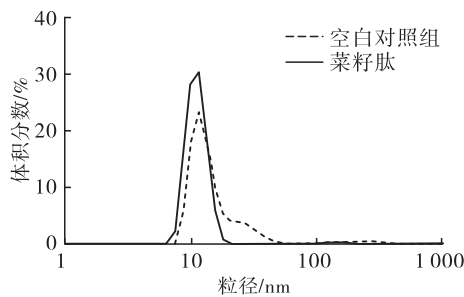


图5 菜籽肽粒径分布

表6 菜籽肽的 Zeta 电位

样品	Zeta 电位/mV
空白对照组	-3.97 ± 0.30
菜籽肽	-4.40 ± 0.52

由图5可知,空白对照组的平均粒径为(11.80 ± 0.07) nm,菜籽肽的平均粒径为(11.04 ± 0.03) nm,菜籽肽的平均粒径略小于空白对照组的。由表6可知,菜籽肽的 Zeta 电位绝对值大于空白对照组的,表明菜籽肽中蛋白质表面同性电荷间的排斥作用会降低蛋白质分子的聚集,减少聚集体的形成,溶液趋于稳定,粒径更小。

2.5 菜籽肽结构

蛋白质二级结构常用酰胺 I 带(1 600 ~ 1 700 cm⁻¹)来反映,其中 α-螺旋和 β-折叠为有序结构,β-转角和无规卷曲为无序结构。蛋白质的二级结构对其稳定性至关重要,二级结构中 α-螺旋和 β-折叠含量越高其结构相对更稳定。菜籽肽的

二级结构如表7所示。

由表7可知,与空白对照组相比,菜籽肽中 α-螺旋和 β-折叠含量相对更高,说明菜籽肽的二级结构更有序、稳定,同时也说明超声处理和酶解对蛋白质的二级结构有影响。

表7 菜籽肽的二级结构

二级结构	酰胺 I 带波数区间/cm ⁻¹	含量/%	
		空白对照组	菜籽肽
α-螺旋	1 650 ~ 1 670	1.92 ± 0.03 ^b	9.76 ± 0.01 ^a
β-折叠	1 605 ~ 1 640	11.71 ± 0.05 ^b	21.35 ± 0.02 ^a
β-转角	1 670 ~ 1 695	86.37 ± 0.03 ^a	64.60 ± 0.01 ^b
无规卷曲	1 640 ~ 1 650	ND ^b	4.29 ± 0.06 ^a

注:ND 表示未检出

3 结论

超声辅助酶法制备菜籽肽的最佳工艺条件为碱性蛋白酶添加量 12 289.79 U/g、超声时间 21.82 min、超声功率 306.56 W,在此条件下菜籽肽的得率为 55.19%。最佳条件下制备的菜籽肽中分子质量小于 500 Da 的占比为 98.40%。与空白对照组相比,超声辅助酶法制备的菜籽肽氨基酸含量更高,平均粒径更小,Zeta 电位绝对值更大,α-螺旋和 β-折叠含量相对更高,菜籽肽的二级结构更有序、稳定。综上,超声辅助酶法制备菜籽肽过程中不使用溶剂,对环境友好,可用于高效制备优质低温压榨菜籽肽。

参考文献:

- [1] CHMIELEWSKA A, KOZŁOWSKA M, RACHWAŁ D, et al. Canola/rapeseed protein: Nutritional value, functionality and food application: A review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(22): 3836-3856.
- [2] 李梅婷. 我国油菜籽生产效益及影响因素研究[D]. 湖北荆州:长江大学, 2023.
- [3] GOŁĘBIEWSKA K, FRAS A, GOŁĘBIEWSKI D. Rapeseed meal as a feed component in monogastric animal nutrition: A review [J]. Ann Anim Sci, 2022, 22(4): 1163-1183.

- [4] 熊芳敏. 油菜籽粕饲料的物理脱毒及应用[J]. 中国畜牧种业, 2022, 18(4): 67-68.
- [5] 翟晓娜, 师建芳, 赵慧凝, 等. 菜籽饼粕蛋白的提取、功能特性及其在食品中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 389-397.
- [6] 杨万富, 黄桃翠, 刘和平, 等. 冷榨菜籽蛋白的碱性电解除水提取工艺及其结构性能表征[J]. 农业工程学报, 2021, 37(23): 288-295.
- [7] CHENG H, LIU X, XIAO Q, et al. Rapeseed meal and its application in pig diet: A review [J/OL]. Agriculture, 2022, 12(6): 849 [2023-12-14]. <https://doi.org/10.3390/agriculture12060849>.
- [8] 仇莉, 李向红, 雷然, 等. 基于响应面法优化油菜籽饼粕缓蚀剂的提取制备工艺[J]. 化学研究与应用, 2023, 35(9): 2028-2037.
- [9] YU P, YANG Y, SUN J, et al. Identification of volatile sulfur-containing compounds and the precursor of dimethyl sulfide in cold-pressed rapeseed oil by GC-SCD and UPLC-MS/MS [J/OL]. Food Chem, 2022, 367: 130741 [2023-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130741>.
- [10] PAN M, XU F, WU Y, et al. Application of ultrasound-assisted physical mixing treatment improves *in vitro* protein digestibility of rapeseed napin [J/OL]. Ultrason Sonochem, 2020, 67: 105136 [2023-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105136>.
- [11] 李依娜, 余元善, 肖更生, 等. 植物源活性肽的研究开发概况[J]. 中国果菜, 2020, 40(11): 48-54.
- [12] MONTESANO D, GALLO M, BLASI F, et al. Biopeptides from vegetable proteins: New scientific evidences[J]. Curr Opin Food Sci, 2020, 31: 31-37.
- [13] 郭超凡, 王云阳. 蛋白质物理改性的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 428-433.
- [14] 张婧倩, 龙肇, 梁安源, 等. 超声预处理对米渣蛋白酶解特性的影响[J]. 现代食品科技, 2019, 35(11): 138-143, 222.
- [15] 吴菲菲, 巢玲, 李化强, 等. 超声技术在食品工业中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7): 2670-2677.
- [16] 肖勇生, 包珍, 张良, 等. 米糠蛋白肽的制备及其生物活性研究进展[J]. 食品工业, 2022, 43(2): 243-246.
- [17] ZAKY A A, ABD EL-ATY A M, MA A, et al. An overview on antioxidant peptides from rice bran proteins: Extraction, identification, and applications[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(5): 1350-1362.
- [18] 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.
- [19] 程立超, 徐祺. 硫酸蒽酮法测定柑橘属植物多糖的研究[J]. 中国林副特产, 2020(2): 27-28.
- [20] 张永勤, 王哲平, 宋雨梅, 等. 还原糖测定方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 321-323, 326.
- [21] LI Z H, ZHOU B, LI X T, et al. Effect of alkaline electrolyzed water on physicochemical and structural properties of apricot protein isolate [J]. Food Sci Biotechnol, 2019, 28(1): 15-23.
- [22] EVANS M, GALLAGHER J A, RATCLIFFE I, et al. Determination of the degree of polymerisation of fructans from ryegrass and chicory using MALDI-TOF mass spectrometry and gel permeation chromatography coupled to multiangle laser light scattering[J]. Food Hydrocolloid, 2016, 53: 155-162.
- [23] 胡卫珍, 齐振宇, 陈晓芳, 等. 凝胶渗透色谱联用多角度激光光散射测定铁皮石斛多糖分子量及其分布[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(6): 1166-1167, 1175.
- [24] CRUDDEN A, AFOUFA-BASTIEN D, FOX P F, et al. Effect of hydrolysis of casein by plasmin on the heat stability of milk[J]. Int Dairy J, 2005, 15(10): 1017-1025.
- [25] NAIK M, NATARAJAN V, MODUPALLI N, et al. Pulsed ultrasound assisted extraction of protein from defatted bitter melon seeds (*Momordica charantia* L.) meal: Kinetics and quality measurements [J/OL]. LWT-Food Sci Technol, 2022, 155: 112997 [2023-12-14]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112997>.
- [26] GÖRÇÜÇ 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 Chem, 2019, 283: 637-645.
- [27] AGUILAR-ACOSTA L A, SERNA-SALDIVAR S O, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ J, et al. Effect of ultrasound application on protein yield and fate of alkaloids during lupin alkaline extraction process[J/OL]. Biomolecules, 2020, 10(2): 292 [2023-12-14]. <https://doi.org/10.3390/biom10020292>.
- [28] 李菊芳, 魏芳, 董绪燕, 等. 微波辅助菜籽蛋白水解产物的高效制备及其部分功能特性研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(11): 83-88.
- [29] 付静, 陈德经. 菜籽肽制备工艺的研究[J]. 食品工业, 2012, 33(3): 15-17.
- [30] 易起达. 酶解制备菜籽肽及其抗氧化作用研究[D]. 南京: 南京财经大学, 2013.
- [31] Protein and amino acid requirements in human nutrition: Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation [M]. Geneva: World Health Organization, 2007.
- [32] WALI A, MA H, AADIL R M, et al. Effects of multifrequency ultrasound pretreatment on the enzymolysis, ACE inhibitory activity, and the structure characterization of rapeseed protein [J/OL]. J Food Process Preserv, 2017, 41(6): e13413 [2023-12-14]. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13413>.