

Study on Anti-Nutritional Compounds in Seeds of *Brassica napus**

Yanlin Shao, Yanan Gao, Yueqin Kong, Youping Wang[#]

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou
Email: [#]wangyp@yzu.edu.cn

Received: Mar. 12th, 2013; revised: Mar. 20th, 2013; accepted: Apr. 10th, 2013

Copyright © 2013 Yanlin Shao et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Rapeseed (*Brassica napus* L.) is the second largest oil crop in the world. And rapeseed meal, the by-product after oil processing, has been considered as a good source for protein and animal forage, which makes rapeseed an useful economic crop. However, the utilization of rapeseed is still limited to the existence of abundant anti-nutritional factors including phenolic compounds, lignin and fibre. Hence, improving the quality of rapeseed with reduced anti-nutritional factors is becoming the primary mission for rapeseed breeders. The phenolic compounds of rapeseed mainly include plant tannins, proanthocyanidins, flavonoids, hydroxycinnamic acid derivatives and glucosinolate. Since proanthocyanidins (PAs) is relevant to the formation of pigments in seed coat, many studies focused on discovering biosynthetic pathway and better quantification of PAs. At the same time, the group of anti-nutritional factors is interrelated to one another, which need to be deeply clarified by further studies in the future, including their synthetic precursors, biosynthetic pathway and molecular mechanisms.

Keywords: *Brassica napus* L.; Phenolic Compounds; Lignin; Fibre

甘蓝型油菜种子抗营养物质的研究*

邵彦林, 高亚楠, 孔月琴, 王幼平[#]

扬州大学生物科学与技术学院, 扬州
Email: [#]wangyp@yzu.edu.cn

收稿日期: 2013年3月12日; 修回日期: 2013年3月20日; 录用日期: 2013年4月10日

摘要: 甘蓝型油菜是重要的油料作物, 不仅可生产食用油, 而且其饼粕富含蛋白质, 可作为动物饲料。油菜种子中因含有大量抗营养物质, 如多酚化合物、木质素和纤维素等, 其中多酚物质主要包括单宁、原花色素、类黄酮、羟基苯丙烯酸的衍生物和芥子油苷等, 这些物质会严重影响菜籽油的品质和饲料的营养价值。本文主要介绍这些抗营养物质的种类、分离和测定方法, 为油菜品质育种和改良提供参考。

关键词: 甘蓝型油菜; 多酚化合物; 木质素; 纤维素

1. 引言

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是一种重要的油料

*基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20123250110009)。

[#]通讯作者。

作物, 其种子不仅可以生产食用油, 也是重要的工业原料。榨完油后的菜籽饼粕因含有大量的必需氨基酸和蛋白质, 所以可作为优质动物饲料^[1]。但油菜种皮含有大量的抗营养物质, 如酚类化合物、木质素和纤

纤维素等, 这些物质与糖、蛋白质等结合, 使油菜种子中可利用营养成分含量下降, 同时这些成分的增加对油菜籽的后续加工也有一定的影响。本文主要介绍油菜种子中这些抗营养物质的种类、分离和测定方法, 为油菜品质育种和改良提供参考。

2. 油菜籽中的酚类化合物

甘蓝型油菜种子含有大量的酚类化合物, 主要有植物单宁、类黄酮、酚酸、简单酚类和羟基苯丙烯酸及其衍生物等。羟基苯丙烯酸的衍生物主要有芥子碱、芥子酸、阿魏酸和香豆酸等^[2]。

2.1. 单宁

单宁也称多酚, 是分子量在 500~28,000 Da 之间的一类特殊的多酚化合物, 广泛存在于植物体内并与植物的抗逆性密切相关^[3]。同时, 它们可以和植物体内的蛋白、淀粉、纤维素和矿质元素等形成各种复合物^[4]。人们根据单宁化学结构的不同, 将其分为三类, 即褐藻单宁、水解单宁和缩合单宁。褐藻单宁仅从几种褐藻中分离得到, 但是水解单宁和缩合单宁在植物界中广泛存在。水解单宁通常是以一个多元醇为核心, 通过几个或多个酯键与酚化合物相连, 连接的酚化合物有没食子酸或鞣花酸等。缩合单宁是黄烷醇的二聚体、低聚体或多聚体, 由于缩合单宁在热酸-醇处理下能生成花色素, 所以将缩合单宁也称为原花色素(proanthocyanidins, PAs)^[5]。油菜籽中含有大量的单宁, 单宁的大量存在导致种皮变为黑色, 饼粕味苦并带有涩味^[4]。Clandinin 和 Heard 运用在丁香中测量单宁的方法, 测得油菜饼粕中含有大约 3%的单宁, 然而 Fenwick 和 Hoggan 指出这一测量结果应该是单宁和芥子碱的总含量^[6,7]。Fenwick 等^[8]测得油菜品种“Tower”含有 2.71%的单宁, 去掉种皮后的油菜饼粕的单宁含量为 3.91%。Price 等^[9]测出脱脂油菜种子的子叶中单宁含量为 0.09%~0.39%。Mitarn 等^[10]测得种皮的缩合单宁含量在 0.02%~0.22%之间。Nacz 等^[11]发现油菜籽壳中的不溶性单宁占总单宁含量的 70%~95.8%。

2.2. 原花色素(PAs)

随着研究的深入, 人们发现油菜种皮中积累的黑

色物质主要是单宁中的一类, 即原花色素。在种子成熟的末期 PAs 被氧化, 同时它的酚羟基可以和蛋白质和多糖等形成复杂的化合物使得油菜种皮呈现黑色^[12]。PAs 主要是在种子的内种皮中积累, 以游离态和结合态两种形式存在。油菜种皮中的 PAs 首先是由 Bate-Smith 和 Ribereau-Gayon 发现的^[13], 随后 Durkee^[14]证实了这一发现, 他指出种皮的水解产物有花青素、天竺葵色素和一些花青素的衍生物。目前常用的测定 PAs 含量的方法是香草醛法^[9]。香草醛在酸性条件下可与 PAs 反应形成红色物质, 酸在这一过程中起催化作用, 用表儿茶素做标准曲线可以得到准确的 PAs 含量。但反应不具特异性, 单体的黄酮醇和二氢查尔酮也可以和香草醛发生反应^[12]。Nacz 等^[15]使用香草醛法, 测得在脱油种皮中可溶性 PAs 的含量占种皮干重的 2%。使用传统的化学分析法对油菜种子中的多酚物质进行分析, 杂质的影响比较大, 而且无法分离单一组分, 这阻碍了对油菜种子多酚的进一步研究。随着高效液相色谱质谱联用仪(LC-MS)的发展及电喷雾电离(ESI)技术的发展, 特别是质谱检测技术(如离子阱检测器、四级杆检测器和飞行时间检测器)的发展使得人们研究植物微量成分变得更为便利。Auger 等^[16]首次使用 LC-MS 及 ESI 技术对发育过程中油菜种皮 PAs 含量进行分析, 发现种子授粉 30 天后, 种皮可溶性 PAs 的含量可以达到种皮干重的 10%, 而在种子的成熟阶段, 可溶性 PAs 含量几乎为零。Lipsa 等^[17]用香草醛法进行油菜饼粕中可溶性 PAs 含量的测定, 测得油菜籽饼粕中含有 0.413%的 PAs, 将提取物通过 HPLC 进行分析, 没有发现 PAs 的聚合单体, 但可以明显的检测到寡聚体和多聚体的存在。通过几个明显色谱峰面积的计算, 测得可溶性寡聚体 PAs 占油菜饼粕干重的 0.107%, 可溶性多聚体 PAs 占油菜饼粕干重的 0.093%。

另一种测定 PAs 含量的方法是盐酸-正丁醇法(也叫原花色素分析法)^[18]。将含有可溶性/不溶性 PAs 的植物组织在酸性条件下酸解, 可溶性/不溶性的 PA 在酸性条件下水解释放粉红色的花青素, 在 550 nm 可以通过测定花青素的含量, 这一方法更多被用来测定种子中不溶性 PAs 的含量。Auger^[16]使用盐酸-正丁醇法测得发育过程中不溶性 PAs 在授粉 45 天左右达到最大值(大约占种皮干重的 1.2%), 而在成熟的种子中, 不溶性 PA 的含量也从最大值降低到 0.3%左右。

研究还发现油菜中的 PAs 为表儿茶素单体分子聚合而成的寡聚体或多聚体^[17,18], 种皮中的 PAs 的合成是以芳香族化合物作为合成底物, 经一系列反应产生二氢黄酮醇; 二氢黄酮醇在二氢黄酮醇羟化酶的作用下羟化产生二氢槲皮素; 二氢槲皮素通过二氢黄酮醇还原酶, 产生无色矢车菊素; 无色矢车菊素通过无色花色素双加氧酶氧化, 产生花青素(品红色); 花青素再通过花青素还原酶, 产生表儿茶素, 表儿茶素通过聚合反应而形成 PAs^[19]。

2.3. 类黄酮

类黄酮是植物中的一种次级代谢产物, 在植物界中广泛存在。一般具有抗氧化活性、抗致癌性、抑菌性、抗诱变作用和抗炎作用, 同时可以减少心血管疾病的发病率^[20]。植物中常见的类黄酮主要由槲皮素、山萘酚、异鼠李素及它们形成的糖苷类化合物。类黄酮中的黄酮醇类比较特殊, 它们一般不会形成糖苷, 单体分子常常聚合形成种皮中的主要色素物质 PAs。到目前为止, 发现的黄酮类化合物总数已超过 9000 种^[21,22]。Auger^[16]等利用 HPLC-MS 通过对发育过程中的油菜种皮酚类物质的研究, 发现油菜种皮中含有 13 种黄酮类物质, 主要黄酮类物质是表儿茶素单体及其形成的 5 种低聚体, 还有槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素-二己糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、异鼠李素-己糖苷-硫酸、山萘酚-芥子酰-三己糖苷、异鼠李素-二己糖苷和异鼠李素-芥子酰-三己糖苷 7 种黄酮醇形成的糖苷。它们的含量在不同株系的不同发育时间都有变化, 每种黄酮类物质的含量占种皮干重的 0.01%~0.1%。最近我们利用 LC-ESI-MS 方法对黄/黑籽油菜种子成熟过程中种皮色素进行定量分析, 发现黄籽中类黄酮的成分比黑籽含量低。在油菜种皮中含有大量的酚类化合物, 如芥子碱、芥子酸、二芥子酰葡萄糖、表儿茶素、槲皮素, 山萘酚、异鼠李素-二己糖苷、山萘酚-芥子酰-三己糖苷、异鼠李素-芥子酰-三己糖苷、异鼠李素-己糖苷-硫酸酯、异鼠李素-3-葡萄糖苷等。黑籽中芥子碱、表儿茶素和异鼠李素-二己糖苷的含量比黄籽高, 二芥子酰-葡萄糖比黄籽低^[23]。

2.4. 其它酚类化合物

在油菜种子中, 除了单宁、PAs 和类黄酮以外,

含量较多的其它酚类化合物主要还有芥子碱、芥子酸、芥子油苷、没食子酸、咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸、原儿茶酸、羟基苯甲酸以及它们形成的糖苷等^[24]。其中芥子碱是油菜种子中含量最多的一种酚酸, 其含量可达整个种子干重的 1%~2%^[25]。Mailer 等^[26]测得油菜饼粕含有 1.0%~1.8%的芥子碱和 11~34 $\mu\text{mol/g}$ 的芥子油苷。Aleksandra 等^[27]用 50%的甲醇水溶液进行多酚的提取, 将提取物进行 HPLC 分析, 测得油菜饼粕中芥子酸含量占油菜饼粕干重的 0.017%~0.036%、没食子酸占 0.001%~0.002%、咖啡酸占 0.00001%~0.00007%、阿魏酸占 0.0001%~0.002%、对香豆酸占 0.0005%~0.0009%。通过 HPLC 测得总酚酸含量占油菜饼粕干重的 0.02%~0.04%。Liu 等^[28]通过对 10 个甘蓝型油菜品种胚和种皮中酚化合物进行研究, 发现了 7 种主要可溶性的酚类化合物, 分别是芥子碱、芥子酸、原儿茶酸、阿魏酸、香豆酸和羟基苯甲酸。除芥子酸和芥子碱外, 其他几种酚酸的含量都在几万分之一左右。芥子碱在种皮和胚中都是含量最多的酚化合物, 分别占干重的 0.093%~0.176%和 1.565%~2.188%, 其次为芥子酸的含量, 芥子酸的含量分别为 0.007%~0.029%和 0.0107%~0.0266%。同时, 发现总酚和酚酸在胚中的含量远远要大于种皮中的含量。在胚中可溶性总酚含量占胚干重的 2.507%~3.524%, 种皮中的可溶性总酚含量占种皮干重的 0.447%~0.707%^[29]。

3. 油菜种子中木质素和纤维素

油菜的种皮中含有大量的木质素、膳食纤维和多糖成分。木质素和纤维素在植物界中广泛分布, 主要参与植物细胞次生壁的形成, 在次生壁中大量积累, 主要提供给细胞壁以高的机械强度, 同时还可以帮助植物细胞抵抗外界生物和非生物胁迫等。但作为饲料的油菜饼粕, 种皮中高含量的木质素和纤维素不仅降低了油菜饼粕中营养成分的含量, 同时, 会影响动物的口感及消化吸收效率。

Marles 等^[30]使用巯基乙酸分析法对油菜籽中的木质素含量进行粗测。在油菜饼粕中加入含有巯基乙酸的酸解液, 巯基乙酸和木质素形成酸不溶性的物质, 将不溶物分离, 溶于碱液中, 通过比色法即可测得木质素的含量。根据不同的分析方法可将植物组织中的纤维素及木质素分为不同的类别。将植物组织用

中性洗涤剂分解,大部分细胞内容物溶解于洗涤剂中(包括脂肪、可溶性糖类、淀粉和蛋白质等),剩余的不溶性残渣称为中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)^[31],主要包括半纤维素、纤维素和与木质素相连的化合物。如用酸性洗涤剂对植物组织进行处理,最后剩余的固体成分即称为酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF),主要包括纤维素、木质素和木质素-N连接的产物。将 ADF 用 72%的硫酸进行酸解处理,去掉固体中含有的纤维素成分,剩余固体称为酸性洗涤木质素(acid detergent lignin, ADL),主要包括木质素和木质素相连的多酚化合物,以上这几种木质素和纤维素的含量是判定植物组织木质素和纤维素含量的主要指标。而将植物组织中,除了淀粉以外的其它多糖成分统称为非淀粉多糖(non-starch polysaccharides, NSP),非淀粉多糖一般包括三大类,即纤维素、非纤维多糖和果胶聚糖。根据 NSP 的溶解性,非淀粉多糖可分为可溶性非淀粉多糖和不溶性非淀粉多糖。Daun 等^[32]对不同品种油菜的化学成分进行测定,发现油菜饼粕的纤维素含量占油菜饼粕干重的 13%~18%(NDF 和 ADF 之和)。Slominski 等^[33]将黄籽油菜饼粕的提取物进行气相色谱分析,测得油菜饼粕含有 8%~10%的蔗糖,2%~3%的寡聚糖,20%~22%的 NSP,和 5%~8%的木质素和多酚。在黑籽油菜中,测得总纤维素含量为 30%,有 26%的 NDF,8.0%的木质素和多酚。可以看出,油菜籽粕中含有大量的木质素和纤维素,黑籽油菜中这两种成分的含量要明显高于黄籽油菜。

传统的方法对油菜籽抗营养物质的测定先将种子破碎,然后对目标物质进行分离,再通过不同的方法进行定量分析。整个流程花费较多的时间,并且费用比较昂贵。基于这些原因,Font 等^[34]首先尝试了使用近红外反射光谱(NIRS)仪进行油菜种子纤维素含量的无损分析。该方法的特点是操作简单,费用较低,同时, NIRS 也可用来测定种子的蛋白质含量、含油量、芥子油苷的含量和芥子碱的含量^[35]等。Font^[34]等通过 NIRS 测得甘蓝型油菜中的 ADF 含量为 11.74%。Wittkop 等^[36]通过 NIRS 法分析黄籽油菜和黑籽油菜中各种成分的差异,测得黄籽油菜株系 YE2-DH162 中, NDF 占种子干重的 14.47%, ADF 为 9.63%, ADL 为 3.24%, 含油量为 44.63%, 蛋白含量为 25.34%,

芥子油苷为 14.45 $\mu\text{mol/g}$ 。在黑籽油菜 YE2-DH897 株系中, NDF 占种子干重的 17.97%, ADF 为 12.71%, ADL 为 5.91%, 含油量为 44.45%, 蛋白含量为 22.45%, 芥子油苷的含量为 14.98 $\mu\text{mol/g}$ ^[37]。同时, 我们实验室也尝试使用固体核磁共振技术(solid-state NMR), 在低场条件下, 对油菜的木质素含量进行分析^[38]。

4. 展望

通过对大量遗传背景不同的黄籽和黑籽油菜种子 PAs、NDF、ADF、ADL、芥子碱、芥子油苷、蛋白含量和含油量的研究,发现在黄籽油菜中,种子的蛋白含量和含油量有所增加,可能的原因是黄籽油菜中种皮变薄,导致其纤维素含量和多酚物质减少,这样就增加了种子氨基酸合成前体的含量,最终导致种子蛋白含量的增加^[39]。同时发现黄籽油菜中多酚及类黄酮的含量也较低,研究表明木质素和类黄酮有相同的合成途径,即苯丙素类(phenylpropanoid)途径,它们有共同的合成前体,所以获得低木质素含量的油菜籽也就意味着低 PA 含量的油菜籽^[40]。目前在甘蓝型油菜中与类黄酮合成相关基因的克隆也有报道,如结构基因 *TT7*(黄酮醇-3'-羟化酶)^[41]、*TT12*(跨膜转运蛋白)^[42]、*BAN*(花色素还原酶)^[16]和 MYB 型转录因子 *TT2*^[43]。但所克隆的这些基因是否与油菜种皮色素的形成有关尚不清楚,而且甘蓝型油菜为异源四倍体,基因会出现重组和加倍现象。比如 Wei 等^[44]从甘蓝型油菜中克隆的 *TT2* 基因具有 3 个拷贝, RT-PCR 分析结果表明其中的 *BnTT2-2* 在种子中表达最高,但与拟南芥不同的是该拷贝还在根中表达,另外 2 个拷贝 *BnTT2-1* 和 *BnTT2-3* 表达量相对较低,且无组织特异性。甘蓝型油菜中的 ADL 是主要的抗营养成分,其含量在黄籽中远远低于黑籽,并且 ADL 的含量和种子蛋白含量有较好的负相关性,所以可以用 ADL 的含量作为一个选育优良品种的标记成分^[44]。同时,由于 ADL 和酚酸有共同的合成前体,所以认为获得低 ADL 含量的种子即意味着低酚酸。目前为止,育种学家对甘蓝型油菜种子抗营养物质的合成机理也进行了初步的研究,例如对控制 PA 合成基因的克隆^[45];通过基因工程技术,抑制芥子碱合成基因的表达,得到低芥子碱含量的油菜种子^[46];通过 RNA 干扰技术,抑制芥子酸酯的合成,从而降低油菜种子中芥子酸酯

的含量^[47]；以及对控制抗营养物质基因的 QTL 分析及分子标记的研究等等。在不同株系中，抗营养物质含量的差异，反映了控制它们合成的蛋白质的差异及转录组差异，最终反映了它们基因组的差异。随着研究的深入，人们更加关注种子在发育过程中抗营养物质合成前体成分的变化以及关键基因或转录因子，因为它们才是最终导致油菜种子抗营养成分差异的关键因素。

参考文献 (References)

- [1] R. Scarth, J. Tang. Modification of *Brassica* oil using conventional and transgenic approaches. *Crop Science*, 2006, 46(3): 1225-1236.
- [2] C. Batista, L. Barros, A. M. Carvalho and I. C. Ferreira. Nutritional and nutraceutical potential of rape (*Brassica napus* L. var. *napus*) and “tranchuda” cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata*) inflorescences. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(6): 1208-1214.
- [3] P. Schofield, D. M. Mbugua and A. N. Pell. Analysis of condensed tannins: A review. *Animal Feed Science Technology*, 2001, 91(1): 21-40.
- [4] F. Shahidi and M. Naczki. An overview of the phenolics of canola and rapeseed: Chemical, sensory and nutritional implications. *Journal of American Oil Chemists Society*, 1992, 69: 917-924.
- [5] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 1-18.
- [6] D. Clandinin, J. Heard. Tannins in prepress-solvent and solvent-processed rapeseed meal. *Poultry Science*, 1968, 47(2): 688-689.
- [7] R. Fenwick, S. Hoggan. The tannin content of rapeseed meals. *British Poultry Science*, 1976, 17: 59-62.
- [8] G. R. Fenwick, L. C. Caralyn, A. W. Pearson and E. J. Butler. The treatment of rapeseed meal and its effect on chemical composition and egg tainting potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1984, 35(7): 757-761.
- [9] M. L. Price, S. Van Scoyoc and L. G. Butler. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1978, 26(5): 1214-1218.
- [10] B. N. Mitaru, R. Blair, T. M. Bell and R. D. Reichert. Tannin and fiber contents of rapeseed and canola hulls. *Canadian Journal of Animal Science*, 1982, 62: 661-663.
- [11] M. Naczki, R. Amarowicz, D. Pink and F. Shahidi. Insoluble tannins of canola/rapeseed. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48(5): 1758-1762.
- [12] A. E. Hagerman, M. E. Rice and N. T. Ritchard. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin₁₆ (4→8) catechin (procyanidin). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1998, 46(7): 2590-2595.
- [13] E. C. Bate-Smith, P. Ribereau-Gayon. *Qualitas plant. Et Materiae Vegetabiles*, 1959, 5: 189.
- [14] A. B. Durkee. The nature of tannins in rapeseed (*Brassica campestris*). *Phytochemistry*, 1971, 10: 1583-1585.
- [15] M. Naczki, T. Nichols, D. Pink and F. Sosulski. Condensed tannins in canola hulls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1994, 42(10): 2196-2200.
- [16] B. Auger, N. Marnet, V. Gautier, A. Maia-Grondard, F. Leprince, M. Renard, S. Guyot, N. Nesi and R. Jean-Marc. A detailed survey of seed coat flavonoids in developing seeds of *Brassica napus* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, 58(10): 6246-6256.
- [17] F. Lipsa, R. Snowdon and W. Friedt. Quantitative genetic analysis of condensed tannins in oilseed rape meal. *Euphytica*, 2012, 184(2): 195-205.
- [18] L. J. Porter, L. N. Hrstich and B. G. Chan. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochemistry*, 1986, 25: 223-230.
- [19] L. Lepiniec, I. Debeaujon, J. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi and M. Caboche. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 405-430.
- [20] M. C. Wong, P. W. Emery, V. R. Preedy and H. Wiseman. Health benefits of isoflavones in functional foods: proteomic and metabonomic advances. *Inflammopharmacology*, 2008, 16(5): 235-239.
- [21] 何兰, 姜志宏. 天然产物资源化学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 340-372.
- [22] C. A. Williams, R. J. Grayer. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 2004, 21(4): 539-573.
- [23] J. Jiang, Y. Shao, A. Li, C. Lu, Y. Zhang and Y. P. Wang. Flavonoid profiling and gene expression in developing seeds of yellow- and black-seeded *Brassica napus*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, in press.
- [24] X. Li, N. Westcott, M. Links and M. Y. Gruber. Seed coat phenolics and the developing silique transcriptome of *Brassica carinata*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, 58(20): 10918-10928.
- [25] R. Khattab, M. Eskin, M. Aliani and U. Thiyam. Determination of sinapic acid derivatives in canola extracts using high-performance liquid chromatography. *Journal of American Oil Chemists Society*, 2010, 87(2): 147-155.
- [26] R. J. Mailer, A. McFadden, J. Ayton and B. Redden. Anti-nutritional components, fibre, sinapine and glucosinolate content, in Australian canola (*Brassica napus* L.) meal. *Journal of American Oil Chemists Society*, 2008, 85(10): 937-944.
- [27] S. C. Aleksandra, K. Trokowski, G. Karlovits and E. Szlyk. Determination of antioxidant capacity, phenolic acids, and fatty acid composition of rapeseed varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2010, 58(13): 7502-7509.
- [28] Q. Liu, L. Wu, H. M. Pu, C. Y. Li and Q. H. Hu. Profile and distribution of soluble and insoluble phenolics in Chinese rapeseed (*Brassica napus* L.). *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 616-622.
- [29] T. Swain, W. E. Hillis. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1959, 10(1): 63-68.
- [30] S. Marles, M. Y. Gruber. Histochemical characterisation of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the Brassicaceae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 84(3): 251-262.
- [31] F. A. Mascharenhas, J. Kersten and C. H. Cast. The study of several modifications of the neutral detergent fiber procedure. *Animal Feed Science Technology*, 1983, 9(1): 19-28.
- [32] J. K. Daun, D. R. De Clercq. Quality of yellow and dark seeds in *Brassica campestris* canola varieties Candle and Tobin. *Journal of American Oil Chemists Society*, 1988, 65: 122-126.
- [33] B. A. Slominski, L. D. Campbell and W. Guenter. Carbohydrates and dietary fibre components of yellow and brown seeded canola. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1994, 42(3): 704-707.
- [34] R. Font, D. R. Mercedes, J. M. Fernandez and A. D. Haro. Acid detergent fiber analysis in oilseed Brassicas by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003, 51(10): 2917-2922.
- [35] F. T. Zum, A. Baumert, D. Strack, H. C. Becker and C. Mollers. Genetic variation for sinapate ester content in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibration equations. *Plant Breeding*, 2007, 126(3): 291-296.
- [36] B. Wittkop, R. J. Snowdon and W. Friedt. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. *Euphytica*, 2009, 170(1-2): 131-140.
- [37] B. Wittkop, R. J. Snowdon and W. Friedt. New NIRS calibrations for fiber fractions reveal broad genetic variation in *Brassica napus* seed quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*

- istry, 2012, 60(9): 2248-2256.
- [38] J. J. Jiang, Y. L. Shao, A. M. Li, Y. T. Zhang, C. X. Wei and Y. P. Wang. FTIR and NMR study of seed coat dissected from different colored progenies of *Brassica napus*-*Sinapis alba* hybrids. *Journal of Science and Food Agriculture*, 2013, in press.
- [39] A. G. Badani, R. J. Snowdon, B. Wittkop, F. D. Lispa, R. Baetzel, R. Horn, H. A. De, R. Font, W. Luhs and W. Friedt. Colocalization of a partially dominant gene for yellow seed colour with a major QTL influencing acid detergent fibre (ADF) content in different crosses of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome*, 2006, 49(12): 1499-1509.
- [40] S. Marles, M. Y. Gruber. Histochemical characterisation of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the Brassicaceae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 84(3): 251-262.
- [41] B. B. Xu, J. N. Li, X. K. Zhang, R. Wang, L. L. Xie and Y. R. Chai. Cloning and molecular characterization of a functional flavonoid 3'-hydroxylase gene from *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(3): 350-363.
- [42] Y. R. Chai, B. Lei, H. L. Huang, J. N. Li, J. M. Yin, Z. L. Tan, R. Wang and L. Chen. *TRANSPARENT TESTA* 12 genes from *Brassica napus* and parental species cloning, evolution, and differential involvement in yellow seed trait. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, 281(1): 109-123.
- [43] Y. Wei, Y. Chai, J. J. Lu, Z. L. Tan, D. C. Pu and J. N. Li. Molecular cloning of *Brassica napus* *TRANSPARENT TESTA* 2 gene family encoding potential MYB regulatory proteins of proanthocyanidin biosynthesis. *Molecular Biology Reports*, 2007, 34(2): 105-120.
- [44] L. Liu, A. Stein, B. Wittkop, P. Sarvari, J. Li, X. Yan, F. Dreyer, M. Frauen, W. Friedt and R. J. Snowdon. A knockout mutation in the lignin biosynthesis gene *CCR1* explains a major QTL for acid detergent lignin content in *Brassica napus* seeds. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 124(8): 1573-1586.
- [45] Y. L. Wei, J. N. Li, J. Lu, Z. L. Tang, D. C. Pu and Y. R. Chai. Molecular cloning of *Brassica napus* *TRANSPARENT TESTA* 2 gene family encoding potential MYB regulatory proteins of proanthocyanidin biosynthesis. *Molecular Biology Reports*, 2007, 34(2): 105-120.
- [46] V. S. Bhinu, U. A. Schafer, R. Li, J. Huang and A. Hannoufa. Targeted modulation of sinapine biosynthesis pathway for seed quality improvement in *Brassica napus*. *Transgenic Research*, 2009, 18(1): 31-44.
- [47] S. Wei, X. Li, M. Y. Gruber, R. Li, R. Zhou, A. Zebarjadi and A. Hannoufa. RNAi-mediated suppression of *DET1* alters the levels of carotenoids and sinapate esters in seeds of *Brassica napus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2009, 57(12): 5326-5333.