

罗钦, 罗土炎, 宋永康, 等. 发酵鱼粉中寡肽的测定 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (7): 747—749.

LUO Q, LUO T-Y, SONG Y-K, et al. Detection of Oligopeptides in Fermented Fishmeal [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (7): 747—749.

发酵鱼粉中寡肽的测定

罗 钦, 罗土炎, 宋永康, 饶秋华, 涂杰峰

(福建省精密仪器农业测试重点实验室, 福建 福州 350003)

摘要: 采用 16% 单宁酸作为 2 000 Da 以上的高分子蛋白的沉淀剂, 利用自动定氮仪和氨基酸自动分析仪分别检测滤液中蛋白质和游离氨基酸的含量, 并计算出寡肽的含量。结果显示, 测得 1 500 Da 的低分子量蛋白的回收率为 90%~95%, 相对标准偏差 RSD 为 1.6%。

关键词: 发酵鱼粉; 蛋白质; 游离氨基酸; 寡肽; 单宁; 仪器测定

中图分类号: S 963; O 0656.3

文献标识码: A

Detection of Oligopeptides in Fermented Fishmeal

LUO Qin, LUO Tu-yan, SONG Yong-kang, RAO Qiu-hua, TU Jie-feng

(Fujian Precision Instruments Focus on Agricultural Testing Laboratory, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: 16% tannic acid was selected as precipitation agent for the polymer protein over 2000Da in Fermented fishmeal. The contents of proteins and free amino acids in the filtrate of fermented fishmeal were determined by the fully automatic azotometer and automatic amino acid analyzer, and then calculated the contents of oligopeptides. The results showed that the recovery rates of low molecular weight proteins of 1500Da were 90%~95% and the relative standard deviation was 1.6%.

Key words: Fermented fishmeal; free amino acids; Oligopeptides; Tannin; determination

鱼粉经过生物技术处理后, 可以转化成富含寡肽的发酵鱼粉, 按照现代消化理论, 寡肽可直接被消化道吸收, 且具有转运速度快, 耗能低和不易饱和等特点, 消除与游离氨基酸的吸收竞争, 大大地提高蛋白的吸收利用率^[1]。目前, 国内外已报道的测定寡肽的方法有 HPLC 法^[2]、HPLC-MS 法^[3]、凯氏定氮与甲醛滴定联用法^[4]和凯氏定氮与双缩脲反应联用法^[5], 全自动定氮与氨基酸自动分析联用法测定发酵鱼粉中寡肽含量未见报道。

寡肽主要指含 2~10 个氨基酸残基的肽, 其分子量在 2 000 Da 以下, 单宁酸可以沉淀分子量大于 2 300 Da 的高分子蛋白^[6], 发酵鱼粉中水溶性蛋白经单宁酸沉淀后分子量在 2 047.98 Da 以下^[5], 因此通过加入单宁酸基本上可以将寡肽与多肽分离。由于寡肽是由 2~20 个氨基酸组成的混合物, 用 HPLC 法和 HPLC-MS 法无法检测发酵鱼粉中寡肽的总量^[6]。凯氏定氮与甲醛滴定联用法和凯氏定氮与双缩脲反应联用法都属于常规化学分析方

法, 操作繁杂、费时, 有时难以满足实际工作需求。随着科技的进步, 劳动力成本上升和检测人员文化水平的提升, 全自动测定蛋白与游离氨基酸的仪器已得到广泛推广使用。

本研究采用单宁酸作为高分子蛋白质的沉淀剂, 通过全自动定氮仪检测发酵鱼粉滤液中蛋白总含量, 再通过氨基酸自动分析仪检测发酵鱼粉中游离氨基酸的含量, 从而计算出发酵鱼粉中寡肽的含量。该方法操作快速、准确, 能满足大批量样品的检测需求。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

分析天平: 感量 0.000 1 g; 消化炉; 离心机; Kjeltec2300 全自动定氮仪; pH 计 (pH S-3C 上海雷磁仪器厂); 日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪。

1.2 试剂及其配制

16% 单宁酸溶液: 单宁酸 16 g 溶于 100 mL 蒸

馏水中, 过滤取滤液; 混合指示剂: 0.1% 甲基红乙醇溶液和 0.5% 溴甲酚绿乙醇溶液等体积混合; 0.1 mol·L⁻¹ 硫酸标准溶液; pH 2.2 缓冲溶液; 40% 氢氧化钠溶液; 以上使用试剂均为分析纯, 试验用水为蒸馏水。

1.3 样品处理

准确称取经粉碎并过 40 目筛 ($<0.37\text{ mm}$) 的发酵鱼粉样品 5 g, 精确至 0.000 1 g, 加入 50 mL 蒸馏水, 摆匀, 置于 4℃ 冰箱中放置过夜, 在 5 000 r·min⁻¹ 离心机中离心 30 min 后, 过滤, 滤液 (液_A) 备用。

1.4 滤液中蛋白质含量的测定

取滤液 (液_A) 10 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 加入 20 mL 左右的蒸馏水, 摆匀, 加入 10 mL 单宁酸溶液, 定容后摇匀, 立即过滤得滤液 (液_B)。移取 10 mL 滤液 (液_B) 按照《GB/T 6432-94 饲料中粗蛋白测定》方法进行消化, 采用 Kjeltec 2300 全自动定氮仪测定滤液 (液_B) 中蛋白质含量。

1.5 滤液中游离氨基酸含量的测定

准确吸取 0.20 mL 混合氨基酸标准溶液 ($2.5\text{ nmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 用 pH 2.2 的缓冲液稀释到 5 mL, 此标准稀释液浓度为 $0.1\text{ nmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 作为上机测定用的氨基酸标准溶液, 吸取 10 mL 滤液 (液_A), 用 pH 为 2.2 的缓冲液溶解, 定容至 50 mL, 采用日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪以外标法^[7] 测定滤液 (液_A) 中游离氨基酸含量。

1.6 含量计算

1.6.1 发酵鱼粉滤液中蛋白质 (D) 含量

$$D = \frac{X \times 25}{m}$$

式中: D 为发酵鱼粉滤液中蛋白质含量 (%); X 为仪器测得消化液蛋白质含量 (%); 25 为试样稀释倍数。

1.6.2 发酵鱼粉中游离氨基酸 (A) 含量

$$A = \frac{c \times \frac{1}{50} \times F \times V \times M}{m \times 10^9} \times 100$$

式中: A 为发酵鱼粉中游离氨基酸的含量 (%); c

为试样测定液中氨基酸含量 ($0.02\text{ nmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$); F 为试样稀释倍数; V 为试样定容体积 (mL); M 为氨基酸相对分子质量; m 为试样质量 (g); $\frac{1}{50}$ 为折算成每毫升试样测定的氨基酸含量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 10^9 为将试样含量由纳克 (ng) 折算成克 (g) 的系数。

1.6.3 鱼粉中寡肽 (G) 含量

$$G = D - A$$

式中: G 为发酵鱼粉中寡肽含量 (%); D 为滤液中蛋白质含量 (%); A 为滤液中游离氨基酸含量 (%).

同一样品 2 次测定结果的算术平均值作为结果, 结果精确至小数点后 2 位。

2 结果与分析

2.1 不同方法测得发酵鱼粉中寡肽含量的比较

目前测定寡肽的方法有 3 种: 本方法 (全自动定氮与氨基酸自动分析联用法)、方法 1 (凯氏定氮与甲醛滴定联用法^[5]) 和方法 2 (凯氏定氮法与双缩脲反应法相结合^[6])。用上述 3 种方法测定发酵鱼粉样品中寡肽含量的结果见表 1。

从表 1 可知, 本方法与方法 1 非常相似, 都为先测得滤液蛋白含量和游离氨基酸含量, 然后计算样品中寡肽含量, 主要区别是本方法为全自动仪器操作, 而方法 1 为常规化学分析方法操作。

从表 1 可知, 本方法与方法 2 测得的寡肽结果相差不大, 相对偏差为 2.7%, 但本方法与方法 2 测得的寡肽结果明显高于方法 1 测定的结果, 相对偏差为 5.9%。主要因为测得的游离氨基酸含量的结果相差较大, 可能由于方法 1 测定游离氨基酸采用的是甲醛滴定法, 甲醛除了释放出游离氨基酸的氢离子, 还释放出了可溶酸性多肽中的氢离子, 从而导致测定结果偏高, 而本方法与方法 1 测定滤液蛋白含量的结果相差不大, 最终导致用方法 1 测得的发酵鱼粉中寡肽含量低。

表 1 3 种发酵鱼粉中寡肽含量测定方法的比较

Table 1 The comparison among three methods of detection of oligopeptides in fermented fishmeal (单位 / %)

| 样品 | 本方法 | | | 方法 1 | | | 方法 2 | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|
| | 滤液蛋白 | 游离氨基酸 | 寡肽 | 滤液蛋白 | 游离氨基酸 | 寡肽 | 总肽含量 | 沉淀中蛋白含量 | 寡肽 |
| 发酵鱼粉 | 22.44 | 7.21 | 15.23 | 22.86 | 9.32 | 13.54 | 28.32 | 12.24 | 16.08 |

2.2 回收率试验

准确称取发酵鱼粉 5 g, 添加不同量的 1 500 Da 低分子量蛋白标样, 共 5 个处理进行寡肽回收试验, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 寡肽的添加回收率为 90%~95%。

2.3 精密度试验

用本方法测定发酵鱼粉 10 次, 测定结果见表 3。从表 3 可知, 发酵鱼粉中寡肽含量平行测定结果相对标准偏差 RSD 为 1.6%, 小于 3%, 表明本方法的精密度良好, 符合国标方法允许误差的要求。

表 2 回收率测定结果

Table 2 The results of recovery rates

| 处理 | 样品重量/g | 样品中寡肽量/g | 标样添加量/g | 测得寡肽量/g | 回收率/% |
|----|--------|----------|---------|---------|-------|
| 1 | 5.0126 | 0.7634 | 0.1000 | 0.0921 | 92 |
| 2 | 5.0147 | 0.7637 | 0.1500 | 0.1420 | 95 |
| 3 | 5.0227 | 0.7650 | 0.2000 | 0.1821 | 91 |
| 4 | 5.0316 | 0.7663 | 0.2500 | 0.2318 | 93 |
| 5 | 5.0647 | 0.7714 | 0.3000 | 0.2709 | 90 |

表 3 精密度测定结果

Table 3 The results of the relative standard deviation

| 样品 | 寡肽含量 10 次平行测定值/g | | | | | | | | | | 平均值/g | 相对标准偏差 RSD/% |
|------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 发酵鱼粉 | 15.02 | 15.44 | 15.01 | 15.39 | 14.97 | 15.39 | 15.31 | 14.88 | 15.24 | 15.59 | 15.22 | 1.6 |

3 结论

根据上述试验结果可以看出, 用 Kjeltec2300 全自动定氮仪与日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪联用组成的全自动定氮与氨基酸自动分析联用法测定发酵鱼粉中寡肽的含量, 其测定精确度和准确度很好, 回收率为 90%~95%, 相对标准偏差 RSD 为 1.6%, 并且全自动定氮与氨基酸自动分析联用法操作简便、快速省力, 可广泛应用于大批量发酵鱼粉的寡肽含量测定。

参考文献:

- [1] 施用晖, 乐国钟, 刘选珍, 等. 体外消化过程中蛋白质品质与寡肽释放的研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2001, 37(6): 12—14.

- [2] 冯秀燕, 计成. 高效液相色谱法进行寡肽分离测定的研究 [J]. 中国饲料, 2001, 20: 25—27.
- [3] SFORZA S, FERRONI L, GALAVERNA G, et al. Extraction, Semi-Quantification, and Fast On-line Identification of Oligopeptides in Grana Padano Cheese by HPLC-MS. Agric [J]. Food Chem, 2003, 51 (8): 2130—2135.
- [4] 罗钦, 陈人弼, 宋永康. 鱼粉中寡肽和游离氨基酸的测定方法 [J]. 福建农业学报, 2005, 20 (4): 285—288.
- [5] 罗钦, 陈人弼, 宋永康. 发酵鱼粉中寡肽检测技术研究 [J]. 福建农业学报, 2008, 23 (3): 327—330.
- [6] 李小东, 陈朝晖, 寇裕民, 等. 大豆蛋白肽的测定方法 [J]. 大豆通报, 2004, (1): 25.
- [7] 刘大川, 陈栋梁, 刘嵬, 等. GB/T 22492-2008 大豆肽粉 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.

(责任编辑: 林海清)