

鱼粉中寡肽和游离氨基酸的测定方法

罗 钦, 陈人弼, 宋永康

(福建省农业科学院中心实验室, 福建 福州 350003)

摘 要: 采用16%单宁酸沉淀鱼粉中的蛋白质, 用凯氏定氮法和甲醛滴定法分别测出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, 该方法操作简便, 适用于大批量鱼粉中寡肽和游离氨基酸的测定, 在测定鱼粉中寡肽和游离氨基酸的含量取得较好结果。

关键词: 肽; 寡肽; 游离氨基酸; 测定方法

中图分类号: S 963.321; Q 503

文献标识码: A

Determination method of oligopeptides and free amino acids in fish meal

LUO Qin, CHEN Ren-bi, SONG Yong-kang

(Central Laboratory, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian, 350003, China)

Abstract: The tannic acid was selected as the precipitant of peptide in fish meal. The contents of protein and free amino acids in the filtrate of fish meal are determined by the Kjeldahl method and formaldehyde-titration method respectively, then calculate the contents of oligopeptides. The results showed that this method was convenient in operation and suitable for application in the determination of oligopeptides and free amino acids in large fish meal samples and the results were good in determination of oligopeptides and free amino acids in fishmeal by using this method.

Key words: Peptide; Oligopeptides; Free Amino Acids; Determination method

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, 按照现代消化理论, 寡肽可直接被消化道吸收, 具有转运速度快, 耗能低和不易饱和等特点, 能消除与游离氨基酸的吸收竞争, 大大提高了蛋白的吸收利用率^[1]。寡肽可增强鱼类的免疫力, 提高鱼类的养殖成活率, 在水产养殖中的应用具不可忽视的作用, 而鱼粉是水产饲料的主要蛋白源, 但目前国内外关于鱼粉中寡肽含量的测定方法很少报道。单宁酸可以沉淀分子量为2 300 Da的高分子蛋白^[2]。通过加入单宁酸基本上可以将寡肽与多肽分离。氨基酸为两性电解质, 在接近中性的水溶液中, 全部解离为双极离子, 甲醛溶液加入后, 与中性的氨基酸的非解离型氨基酸反应, 生成单羟甲基诱导体, 此时放出的氢离子可用标准碱滴定, 根据碱液的消耗量计算出游离氨基酸的含量。本试验采用单宁酸作为高分子蛋白质的沉淀剂, 结合凯氏定氮^[3]和甲醛滴定法^[4]来测定鱼粉中寡肽和游离氨基酸的含量, 该方法操作方便, 适用于鱼粉及

含肽产品中的寡肽和游离氨基酸的检测。

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; 凯氏定氮装置; pH计(pH S-3C 上海雷磁仪器厂); 电磁搅拌器; 碱式滴定装置; 振荡器。

1.2 试剂及其配制

16%单宁酸溶液: 取单宁酸16 g溶于100 ml蒸馏水中, 过滤取滤液; 混合催化剂: 取6 g硫酸钾和0.4 g硫酸铜混合均匀; 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; 0.01 mol·L⁻¹盐酸标准溶液; 蔗糖; 2%硼酸溶液: 取2 g硼酸溶于100 ml蒸馏水中; 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠标准溶液; 0.05 mol·L⁻¹氢氧化钠标准溶液: 取0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠标准溶液当天稀释; 中性甲醛溶液(pH 8.10): 量取200 ml甲醛溶液于400 ml烧杯中, 置于电磁搅拌器上, 边搅拌边用0.05

收稿日期: 2005-04-02 初稿; 2005-08-29 修改稿

作者简介: 罗钦(1979-), 男, 研究实习员, 从事水产饲料分析检测工作。

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调至 pH8.10; 30%过氧化氢; pH6.8 缓冲溶液; 40%氢氧化钠溶液: 称取 40 g 氢氧化钠溶于 100 ml 蒸馏水中。以上使用试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

1.3 样品处理

称取经粉碎并过 40 目筛的鱼粉样品 2 g, 置于 100 ml 容量瓶中, 加入 70 ml 左右的蒸馏水, 摇匀, 于振荡器上振荡 3 h 后加入 10 ml 单宁酸溶液, 定容后摇匀, 立即用滤纸过滤。

1.4 滤液中蛋白质含量的测定

取滤液 10 ml 置于 150 ml 凯式烧瓶中, 加入混和催化剂 6.4 g, 混和均匀后再加入 12 ml 浓硫酸, 在消化炉上小心加热, 待泡沫消失后, 加强火力 (360~410°C) 直至溶液澄清后, 再加热 2 h 以上。

将消化后的溶液冷却后加蒸馏水 20 ml, 转入 100 ml 容量瓶中, 冷却后再用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 为试样分解液。取 10 ml 2% 硼酸溶液, 加入混和指示剂 5 滴, 使凯氏蒸馏装置的冷凝管末端浸入此溶液。准确移取 10 ml 试样分解液注入蒸馏装置的反应室中, 用少量蒸馏水洗净入口, 加入 10 ml 40% 氢氧化钠溶液, 塞好玻璃塞, 并在入口处加水封好, 蒸馏 4 min, 冷凝管末端离开吸收液面, 再蒸馏 1 min, 用蒸馏水洗冷凝管末端, 洗液一并流入吸收液。

吸收液立即用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸标准溶液滴定, 溶液由蓝绿色变为灰红色为终点。记录消耗盐酸标准溶液滴定的体积。同时测定空白值。

1.5 滤液中游离氨基酸含量的测定

将 pH 计接通电源, 预热 30 min 后, 用 pH 缓冲溶液校准 pH 计。

吸取 10 ml 滤液于烧杯中, 加 5 滴 30% 过氧化氢。将烧杯置于电磁搅拌器上, 电极插入烧杯内试样中适当位置。

开动电磁搅拌器, 先用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠慢慢调节 pH 达到 7.5 左右后, 再用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节至 pH8.10, 并且保持 1 min 不变。然后慢慢加入 15 ml 中性甲醛溶液, 1 min 后用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠标准溶液滴定至 pH8.10。记录消耗氢氧化钠标准溶液滴定的体积。

1.6 含量测定

1.6.1 鱼粉中游离氨基酸 (A) 含量

$$A = \frac{C(\text{NaOH}) \times V(\text{NaOH}) \times 0.136 \times 10}{W} \times 100\%$$

式中: A 为鱼粉中游离氨基酸的含量, %; C (NaOH) 为氢氧化钠标准滴定溶液的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; V (NaOH) 为加入中性甲醛溶液之后, 滴定试样消耗 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠标准溶液的体积, ml; 0.136 为与 1.0 ml 氢氧化钠标准溶液 [C (NaOH) = $1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$] 相当的氨基酸的质量, g; W 为样品的质量, g。

1.6.2 鱼粉中寡肽 (G) 含量 $G = T - A$;

$$T = \frac{(V - V_0) \times C(\text{HCl}) \times 0.014 \times 6.25 \times 100}{W} \times 100\%$$

式中: G 为鱼粉中寡肽含量, %; T 为滤液中蛋白质含量, %; A 为滤液中游离氨基酸含量, %; V 为样品消耗盐酸标准溶液的体积, ml; V_0 为空白消耗盐酸标准溶液的体积, ml; C (HCl) 为盐酸标准溶液的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 0.014 为与 1.0 ml 盐酸标准溶液 [C (HCl) = $1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$] 相当的氮的质量, g; 6.25 为氮换算为蛋白质的系数; W 为样品的质量, g。

同一样品两次测定结果的算术平均值作为结果, 结果精确至小数点后两位。

2 结果与分析

2.1 不同沉淀剂对滤液中蛋白质沉淀的影响

通过不同沉淀剂处理同一种鱼粉样品后, 用凯氏定氮法测出滤液中蛋白质含量, 结果列于表 1。

表 1 不同沉淀剂对滤液中蛋白质的沉淀结果比较
Table 1 Comparison among the results of different precipitants to protein in the filtrates

沉淀剂	滤液中蛋白质 (%)
10.0 ml 16% 单宁酸	7.14
20.0 ml 10% 碘基水杨酸	11.79
20.0 ml 10% 三氯醋酸	11.55
未加沉淀剂	13.81

由表 1 可知, 作为高分子蛋白质沉淀剂, 在沉淀剂都使用过量的情况下, 16% 单宁酸沉淀高分子蛋白质的量比 10% 碘基水杨酸和 10% 三氯醋酸沉淀的小, 使用 16% 单宁酸作为鱼粉蛋白质的沉淀剂, 可以沉淀更小分子量的蛋白质, 故在本试验中采用单宁作为沉淀剂。

2.2 不同酸度下 16% 单宁酸对滤液中蛋白质、游离

氨基酸和寡肽的含量测定

在不同酸度下用16%单宁酸处理同一种鱼粉样品后，测出的滤液蛋白质、游离氨基酸和寡肽含量结果见图1和表2。

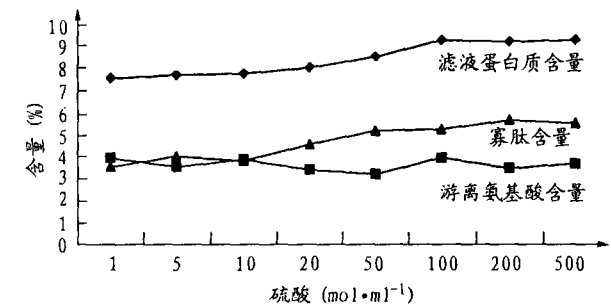


图1 在不同酸度下16%单宁酸对滤液蛋白质、游离氨基酸和寡肽含量的测定结果

Fig. 1 The tested results of protein, free amino acid and oligopeptides in the filtrate using 16% tannic acid at different acidity

表2 不同酸度两次测定游离氨基酸结果

Table 2 Tested results of free amino acid at different acidity

硫酸 (mol·L ⁻¹)	游离氨基酸含量(%)	
	第1次	第2次
0	3.87	3.83
0.001	4.29	3.69
0.005	3.12	4.04
0.05	3.53	2.93

由图1可见，滤液中蛋白质含量先随着酸度的不断加大而不断升高，然后趋于平稳。而游离氨基酸含量变化则呈现无规律性，且波动大，可见酸的加入严重影响了游离氨基酸含量的测定结果。从表2可知，当样品处理时加入酸时游离氨基酸的测量结果重现性很差，而在不加入酸的情况下，游离氨基酸的测量结果重现性好。

2.3 不同沉淀剂和不同酸度对滤液蛋白质含量测定的影响

在不同沉淀剂和不同酸度条件下，滤液中蛋白质含量的测定结果见表3。

从表3可以看出，无论是选择哪种沉淀剂，酸的加入都会使得滤液中蛋白质含量的测定值增大，这可能是酸参与了蛋白质的水解。因此本试验中以不加入酸为条件进行测定。

2.4 不同振荡时间对滤液蛋白质、游离氨基酸和寡肽含量的影响

采用16%单宁酸作为鱼粉蛋白质沉淀剂，在不加酸的条件下测出的不同振荡时间里的滤液蛋白质、游离氨基酸和寡肽的含量，结果见表4。

表3 在不同沉淀剂和不同酸度条件下滤液蛋白质含量的测定结果

Table 3 Protein content in the filtrate of various acidity with different precipitants

沉淀剂	硫酸 (mol·L ⁻¹)	滤液蛋白质 (%)
16%单宁酸	0	0.1
	7.14	8.86
10%碘基水杨酸	0	11.79
	0.1	14.24
10%三氯醋酸	0	11.55
	0.1	14.28

表4 在不同振荡时间条件下滤液蛋白质、游离氨基酸和寡肽含量的测定结果

Table 4 Contents of protein, free amino acid and oligopeptides in the filtrate during different vibration periods

振荡时间 (h)	滤液蛋白质 (%)	游离氨基酸 (%)	寡肽 (%)
0.5	7.14	3.62	3.52
1	7.23	3.89	3.34
3	7.49	3.85	3.64
6	7.46	3.85	3.61
12	7.39	3.82	3.57
24	7.60	4.39	3.21

肽是由一个氨基酸的氨基与另一个氨基酸的羧基结合的线性聚合物，由于亲水性基团（氨基和羧基）的结合，肽的疏水性基团与亲水性基团的比例明显高于游离氨基酸，所以随着肽链的不断增多，其亲水性不断被减弱而疏水性却不断被增强。由表4可见，振荡时间从0.5~3 h时，滤液中蛋白质含量随振荡时间的增加而明显的增加，而3~12 h中，滤液蛋白质含量则无明显的变化，趋于平稳，但当振荡时间为24 h时，滤液中蛋白质含量明显的变大，可能是因为高分子蛋白水解的原因。从表4中也可知，从1~12 h时，游离氨基酸含量不随振荡时间的增加而发生较大变化，有平稳之势，但在0.5 h时明

显偏小,在24 h时则偏大。当振荡时间小于3 h时因为溶解时间不足够而使得滤液蛋白质、游离氨基酸和寡肽含量偏小,而振荡时间在3~12 h之间时含量基本不变,但当振荡时间为24 h时,可能是因为水解的原因使得滤液蛋白质和游离氨基酸含量偏大而寡肽含量偏小,故为了使寡肽能完全的溶解,又不会影响到蛋白质的水解,本试验在样品处理时采用3 h作为振荡时间。

2.5 本法在鱼粉样品中测定的应用

从水产饲料企业中挑选出4种常用的鱼粉,采用16%单宁酸作为鱼粉蛋白质沉淀剂,在不加酸、振荡时间为3 h的条件下测定滤液蛋白质、游离氨基酸和寡肽含量,结果列于表5。

表5 本法测定不同鱼粉样品滤液中蛋白质、游离氨基酸和寡肽的含量

Table 5 Content of protein, free amino acid and oligopeptides in different fishmeal filtrate using tannic acid as the precipitant

鱼粉名称	滤液蛋白质 (%)	游离氨基酸 (%)	寡肽 (%)
智利鱼粉	7.49	3.85	3.64
三叉鱼粉	2.59	1.74	0.85
山东鱼粉	6.79	4.62	2.17
七星鱼粉	8.72	5.80	2.92

表5结果显示,不同地区鱼粉中的滤液蛋白质、游离氨基酸和寡肽的含量存在明显的差异。本试验

结果显示,国外鱼粉(智利鱼粉)的寡肽含量最高,其次为七星鱼粉,三叉鱼粉含量最低。实际生产中,国外鱼粉在价格或饲养效果上都比国内鱼粉高,有可能是鱼粉中寡肽含量高的原故。

3 小结与讨论

3.1 试验中所用的鱼粉其寡肽和游离氨基酸的含量很低,因此在加入甲醛之前和加入甲醛之后两次用0.05 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液调节pH值时,pH都必须调节到8.10,其数值在1 min内偏离不超过0.01,否则将会严重影响测量的结果,这与文献[4]有别。

3.2 因寡肽的易吸收、可增强鱼类的免疫力和提高养殖成活率的优点,因此,如何进一步提高鱼粉中寡肽的含量值得深入研究。

参考文献:

- [1] 施用晖,乐国钟. 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] 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.
- [3] GB/T6432-1994, 饲料工业标准汇编[S]. 北京: 中华人民共和国国家标准, 2002. 70-72.
- [4] GB/T12143.2-89, 果、蔬汁饮料卫生标准[S]. 北京: 中国食品工业标准汇编饮料卷软饮料和冷冻饮品分册, 2004. 204-206.

(责任编辑: 林树文)