

茚三酮法测定蛋白饲料中水溶蛋白质

西南农业大学 叶元士

5816.17

蛋白质、氨基酸的水溶性是影响蛋白质营养价值有效发挥的一个主要因素。一般认为,饲料中水溶蛋白的增加,有利于消化酶对蛋白的水解作用,从而有利于动物体对蛋白成分的消化、吸收,使蛋白质的消化利用率显著增加。因此,对饲料中水溶蛋白测定方法和增加水溶蛋白含量的方法等的研究具有非常重要的意义。前者一般采用半微量凯氏定氮法,但此法时间较长,工序较多。本文探讨采用茚三酮法测定水溶粗蛋白、纯蛋白和水溶非蛋白的条件,以有助于这类工作的进一步开展。

1. 茚三酮测定水溶蛋白的依据

蛋白质的定量测定方法主要有以下几种:①280nm紫外光比色法,要求样品无色、微量;②Folin-酚法,要求样品无色、微量;③半微量凯氏定氮法,测固体样品,定氮测粗蛋白;④双缩脲法,只能测蛋白质和肽,不能测氨基酸;⑤茚三酮法,测液体样品,定氮。由于蛋白饲料的水溶提取液一般带有显色,且蛋白含量较高,方法①、②、④均不适宜测粗蛋白,而方法③则要求将水溶提取液干燥、消化后再蒸馏、滴定,显得过于繁杂。如果采用茚三酮法,则有较多优点:①直接测水样即蛋白饲料水溶提取液;②以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮的标准样品,直接将水溶提取液显色可测水溶粗蛋白;③以三氯醋酸(TCA)将水溶提取液中蛋白质沉淀去除后,用茚三酮显色可测非蛋白质含量(包括氨、氨基酸等);④以水溶粗蛋白含量减去水溶非蛋白含量可得知水溶纯蛋白的含量。因此,采用茚三酮法可同时直接测定水溶粗蛋白、水溶纯蛋白、水溶非蛋白的含量。

2. 茚三酮法的基本原理和操作

茚三酮在80℃以上可与蛋白质肽链的侧

链、末端氨基、氨基酸的氨基、氨等含氮化合物发生颜色反应,除脯氨酸、羟脯氨酸与茚三酮生成黄色化合物外,与其他氨基酸均生成紫红色化合物,在570nm波长具有最大光吸收,且在一定浓度范围内产生的颜色深浅(即O·D570的光密度值的大小)与样品中蛋白质、氨基酸的含量成正比。以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮的标准样品,可定量测定蛋白质、肽、氨基酸等含氮量,再乘以6.25可得粗蛋白质的含量。茚三酮法的主要步骤如下:

2.1 水溶提取液的制备 这是关键步骤,其主要影响因素为样品与水的比例、浸提时间、浸提温度等。这在后面将详细介绍。

2.2 显色 取水溶提取液0.1~0.5ml,加pH5.5、0.2M的醋酸盐缓冲液至2ml,茚三酮试剂(2g茚三酮溶解于50ml乙二醇甲醚后,加25ml pH5.5、0.2M醋酸盐缓冲液,25ml去离子水,0.08g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2ml,于沸水中煮沸30分钟,冷至室温加50%乙醇6ml,以不加待测样品(以水代替)的显色液为对照,用721型分光光度计于570nm测O·D值。

2.3 水溶非蛋白的显色 取水溶提取液0.5ml,加15% TCA 0.5ml,摇匀,1500r/min离心15分钟,取上清液按上述显色步骤显色。

2.4 标准曲线的制作 取烘至恒重的标准级 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mg,加水定容至100ml,得0.5mg/ml的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标准溶液,按一定梯度(0.50、100、150、200、250、300μg/ml)取标准液与茚三酮显色,测O·D570,以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的氮量为横坐标,O·D570为纵坐标,得N—O·D570标准曲线。

2.5 计算 根据样品O·D570值在N—O·D570标准曲线中查出相应N量,按下述公式计算:

7410

$$\text{水溶粗蛋白}\% = \frac{\text{N 量} \times 6.25 \times \text{稀释倍数}}{\text{用茚三酮反应的提取液毫升数} \times \text{样品重(g)}} \times 100$$

(或水溶非蛋白)

$$\text{水溶纯蛋白}\% = \text{水溶粗蛋白}\% - \text{水溶非蛋白}\%$$

3. 蛋白饲料水溶提取液制备条件的探讨

取效果的影响

3.1 样品粒度要求

从理论上讲样品愈细提取效果愈好,但实际工作中过细的粒度是难以达到的。在本试验中一般是将样品烘干、研磨,经 40 目或 60 目分样筛筛分即可。

加水过多使提取液中蛋白含量过低,而加水过少则不能使水溶成分完全溶解。因此选择适宜的固、液比例是较为主要的。作者以豆饼、菜籽饼为原料,按表 1 设置了不同的固液比,在相同条件(60℃水浴 2.5h)下测其水溶粗蛋白的含量见表 1。

3.2 样品重(W)与加水体积(V)的比例对提

表 1 在不同固液比时水溶粗蛋白的提取效果 (%)

固、液比(W/V)	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:80
豆 饼	7.891	8.045	8.526	8.546	8.550	8.491	8.554
菜籽饼	0.989	1.001	1.256	1.540	1.546	1.492	1.498

由表 1 可见,在 1:40 以上所得豆饼、菜籽饼的水溶粗蛋白含量无显著的差异,因此对豆饼、菜籽饼选择 1:40 固液比即可。

3.3 温度对提取效果的影响

以豆饼、菜籽饼为原料,按 1:40 固液比分别在 27℃、40℃、60℃、80℃、98℃水浴锅内浸提 2.5h,所得水溶粗蛋白含量见表 2。

根据溶解原理,浸提温度愈高,蛋白质等水溶成分在水中的溶解速度愈快,但高温易使蛋白质发生热变性而沉淀,使水溶蛋白测定结果偏低;而温度过低则需延长浸提时间,在实际工作中也不适宜。因此选取中等温度较为适宜。从表 2 可见,豆饼、菜籽饼在 60℃水浴锅内的浸提效果最好,可以选取该温度为提取温度。

表 2 在不同温度下水溶蛋白的提取效果 (%)

温度(℃)	27	40	60	80	98
豆 饼	7.341	8.145	8.525	8.547	8.091
菜籽饼	1.234	1.387	1.542	1.548	1.238

3.4 浸提时间对提取效果的影响

以豆饼、菜籽饼为原料,在固液比为 1:40、60℃水浴浸提,于不同时间取样测水溶粗蛋白含量,见表 3。

表 3 在不同浸提时间下测定水溶粗蛋白的效果 (%)

时间(h)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
豆 饼	2.693	3.325	4.345	6.134	7.613	8.498	8.489	8.523	8.521	8.513
菜籽饼	0.573	0.921	1.120	1.215	1.491	1.495	1.487	1.500	1.498	1.501

浸提时间愈长,提取效果愈好,而工作时间也就延长。在表 3 中,豆饼在 3.5h、菜籽饼在 2h 所得水溶粗蛋白含量均达到或接近最大值,可以选取这两个时间作为水溶蛋白提取时间。

总体来看,蛋白饲料水溶蛋白的水溶提取液的制备要求粒度较细,固液比适宜,中等提取温度和适宜的提取时间,不同原料可能上述条件有所差异,但大体的趋势可能相同。通过本试验结果来看,豆饼、菜籽饼水溶粗蛋

白的提取固液比在 1 : 40 (W/V), 温度在 60℃, 时间分别在 3.5h 和 2h 较为适宜。

4. 茚三酮法与凯氏定氮法测定水溶粗蛋白结果的比较

作者同时应用茚三酮法、凯氏定氮法测定豆饼、菜籽饼、玉米油渣、缙霉素渣的水溶粗蛋白, 结果见表 4。

表 4 凯氏定氮法、茚三酮法测定水溶粗蛋白结果的比较 (%)

原 料	豆 饼	菜籽饼	玉米油渣	缙霉素渣
凯氏法	8.488	1.551	0.476	9.565
茚三酮法	8.501	1.560	0.460	9.611

从表 4 可见, 豆饼、菜籽饼、玉米油渣、缙霉素渣 4 种原料用 2 种方法测得的水溶粗蛋

白含量的差值分别为 0.013、0.009、0.016 和 0.046, 差异并不显著。因此, 用茚三酮法的测定结果是可信的。

5. 用茚三酮测定豆饼、菜籽饼在固体发酵过程中水溶粗蛋白、纯蛋白和水溶非蛋白的变化

如何提高蛋白饲料中水溶蛋白含量是一个值得深入研究的课题。作者曾采用固体发酵法生产发酵血粉, 使发酵血粉的水溶氨基酸总量 (28.82mg/g) 较普通蒸煮血粉 (2.05mg/g) 增加了 14 倍。在本文中作者采用固体发酵法, 用米曲霉 (BA-1) 发酵处理豆饼和菜籽饼, 并用茚三酮法测定了在发酵过程中水溶粗蛋白、纯蛋白和水溶非蛋白的变化, 同时测定了不同时间粗蛋白的变化, 结果分别见表 5 和表 6。

表 5 菜籽饼在固体发酵过程中各种蛋白的变化 (%)

时 间(h)	0	12	24	36	48	60
粗蛋白	40.60	42.37	44.79	47.81	45.76	44.60
水溶粗蛋白	1.546	1.875	7.875	25.200	10.095	8.985
水溶纯蛋白	1.049	1.080	5.898	19.775	7.882	6.872
水溶非蛋白	0.496	0.795	1.888	5.425	2.213	2.113

表 6 豆饼在固体发酵过程中各类蛋白的变化 (%)

时 间(h)	0	12	24	36	48	60
粗蛋白	42.11	41.14	43.14	46.14	47.10	48.39
水溶粗蛋白	8.556	6.244	9.580	11.164	13.736	18.500
水溶纯蛋白	5.310	4.390	5.930	8.296	9.500	13.862
水溶非蛋白	3.520	1.850	3.650	3.850	4.240	4.638

由表 5 可知, 菜籽饼的粗蛋白、水溶粗蛋白、水溶纯蛋白和水溶非蛋白的含量在 0~36h 内增长较为迅速, 36h 达最高点, 以后开始下降。在 36h 与 0h 相比, 粗蛋白、水溶粗蛋白、水溶纯蛋白、水溶非蛋白的增长效果非常显著。

由表 6 可知, 豆饼的粗蛋白、水溶粗蛋白、水溶纯蛋白、水溶非蛋白, 在 60h 达最高点, 与 0h 相比, 四项指标分别增加了 14.91%、116.22%、161.05% 和 31.76%。

通过上述实例可知, 应用茚三酮法可以很方便地测定饲料的水溶粗蛋白、水溶纯蛋白和水溶非蛋白, 尤其在饲料固体发酵过程中, 可以应用茚三酮法有效地监测上述指标的变化, 这对发酵条件的掌握、发酵方法的研究具有重要意义。同时, 通过上述结果可知, 应用固体发酵可以有效地增加豆饼、菜籽饼的水溶蛋白的含量, 这对蛋白饲料的改良、新蛋白饲料的开发均有重要作用。