

搭配食品及配合饲料中有效赖氨酸 的 TNBS 测定法的应用

钟 丽 玉

摘 要

本文分析了谷物及豆类的搭配与热处理前后的有效赖氨酸含量,大米、面粉和玉米粉中有效赖氨酸含量较低,为了提高谷类蛋白质的生理价,将豆类与谷类按比例搭配,例如:大米与大豆以二比一混合,其有效赖氨酸含量从单一大米的 0.247% 提高到混合粉的 1.370% 约 5 倍之多,另一方面,米面食品经过加热或膨化也常常导致赖氨酸的损失,经分析约在 35~45%, 本文为选择合理的粮食搭配比例与加工方式提供科学依据。

一、前 言

米、面、玉米、高粱等粮食中的赖氨酸含量都欠低,因而营养较差。如果与某种赖氨酸含量较高的食品混合搭配食用。使其氨基酸构成的比例有所改善,使蛋白质的营养价值有所提高,这对儿童食品尤为重要。如豆类蛋白质中富有赖氨酸而缺少蛋氨酸,如果将豆类和谷类食品混合食用,则两者蛋白质的营养价值都相应提高。实验证明:面粉、玉米、大米的可利用蛋白 (Utilizable Protein) 分别为 3.2%, 3.0% 和 4.5%, 如果在面粉中加入 0.2% 赖氨酸,就可以使可利用蛋白提高到 5.1%~7.6%。如在面包中补充 0.3% 赖氨酸,那么可利用蛋白由 7.3% 增加到 10%。

同样,在饲料中添加赖氨酸,不但可以提高饲料效率,使牲畜体重增加;而且还可以促进肉中蛋白质含量的增加,脂肪含量则相对降低。有人曾做过实验,在以 84.8% 的玉米和 9.5% 的芝麻粕为主的饲料中,分别添加 0.42% 和 0.74% 的赖氨酸,在试验开始的六周中,猪的增重量为 594 克/日和 844 克/日,很明显,饲料中赖氨酸的含量愈高则增重愈快。

另外,粮食的贮藏与粮食加工往往导致赖氨酸的损失。例如赖氨酸与糖类结合;在棉籽中与棉酚结合等。赖氨酸还由于受热而破坏,故人们对如何提高食品营养价值,以及对食品中赖氨酸的含量与添加量的研究作了大量工作。然而所有这些研究都必须寻找一个简便易行的方法来测定食物和饲料中的赖氨酸含量,尤其是有效赖氨酸(ϵ -赖氨酸)的含量。

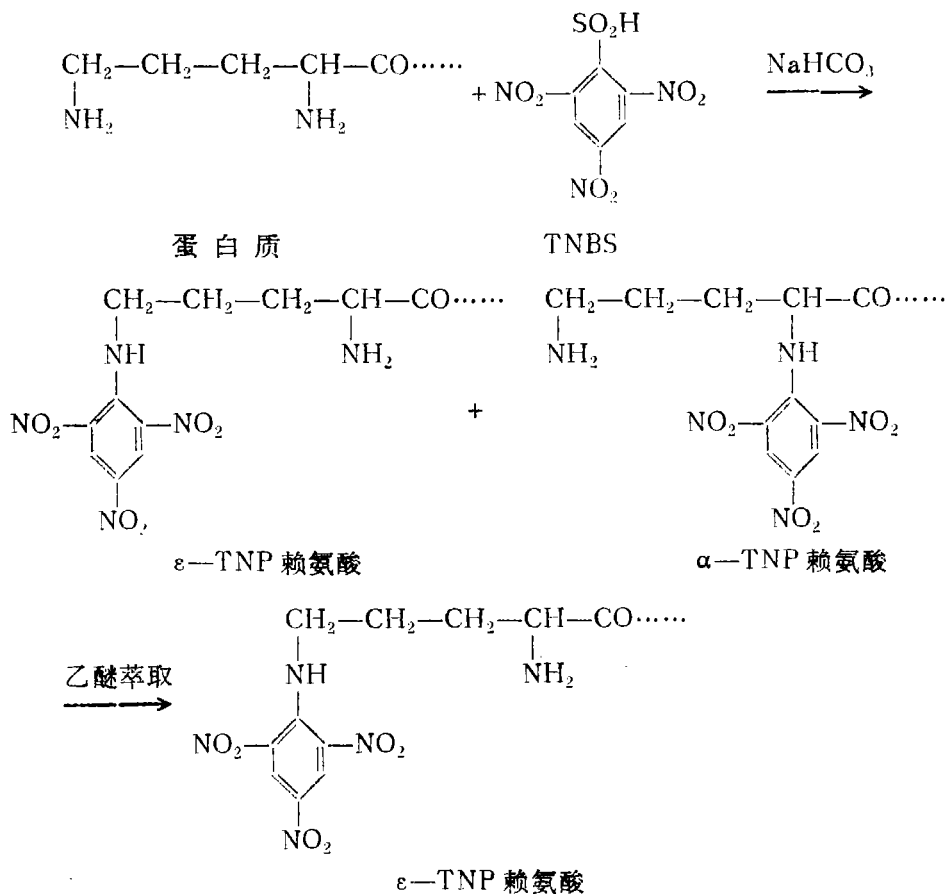
作者采用的是用三硝基苯磺酸(TNBS)测定粮食中的有效赖氨酸,此法操作较为简单,

无需特殊仪器，且能获得满意结果。

二、有效赖氨酸的测定法

(一) 原 理

蛋白质在碱性条件下水解生成各种游离氨基酸，其中 ϵ -赖氨酸与 TNBS 反应生成 ϵ -TNP 赖氨酸及 α -TNP 赖氨酸，然后用乙醚萃取 α -TNP 赖氨酸，即得 ϵ -TNP 赖氨酸在 346 毫微米波长下比色。其反应方程式如下：



(二) 试 剂

- (1) 1% 2,4,6 三硝基苯磺酸，(可用三硝基氯化苯合成或市售)，用时现配。
- (2) 0.25% NaOH C.P
- (3) 1% NaHCO₃ C.P
- (4) 70% C₂H₅OH C.P 体积/体积
- (5) 浓 HCl (A.R.)
- (6) DL-赖氨酸(A.R)
- (7) C₂H₅OC₂H₅ (A.R)

(三) 步 骤

(1) 正确称取通过 60 目的脱脂样品 100~500mg(根据待测样品中赖氨酸的含量,如豆类可称取 100mg。粮谷类称取 500mg)置于 10 毫升的离心管中。

(2) 将盛有样品的离心管加 0.7 毫升 70% C_2H_5OH , 使样品充分润湿。然后加 5 毫升 0.25% $NaOH$ 在振荡器上振荡 3 小时。

(3) 将盛有样品的离心管在 3000~4000 R.P.M 离心机中离心 10 分钟。

(4) 取离心液 0.1 毫升(含量低则可取 0.2 毫升)于 15 毫升磨口三角瓶或容量瓶中,加 0.90 毫升蒸馏水(如取 0.2 毫升离心液,则加 0.8 毫升蒸馏水,依此类推)。取另一磨口三角瓶或容量瓶,加入 1 毫升蒸馏水作空白对比,然后在样品管和空白管中各加 1 毫升 4% $NaHCO_3$, 再加 1 毫升 1% $TNBS$ 。几秒钟后,在盛有试样的管内显出橙色,而空白管则呈浅黄色。置恒温箱中,保温 40℃ 继续反应 90 分钟。

(5) 取出样品及空白管,并加 3 毫升浓盐酸进一步水解。此时试样管中呈现浅黄色,空白管中几乎无色。塞紧盖子,摇匀,并置 120℃ 恒温箱中保温 90 分钟。

(6) 取出试样及空白管,使其冷却至室温,然后加 5 毫升蒸馏水,使其总体积为 11 毫升,摇匀。

(7) 把试样及空白样分别用滤纸过滤入预先已加好 10 毫升乙醚的分液漏斗中,让滤纸滴干,塞紧分液漏斗的玻璃塞,摇动漏斗,以使乙醚和溶液充分混和。静置,待溶液分成水相和醚相后,收集水相,允许 1~2 滴乙醚收集于水中,然后弃去醚相。

(8) 将收集的水相重复倒回新盛有 10 毫升乙醚的分液漏斗中,每次塞紧玻璃塞、摇匀、静置,使混合液分清为醚相和水相。将水相收集于清洁干燥的三角瓶中。此时要避免醚相进入。为此可在分液漏斗中保留 1~2 滴水相,不予收集。水相即是 ϵ - TNP 赖氨酸溶液。

(9) 把盛有水相的三角瓶置于 50℃ 水浴中 20 分钟,以便除去残留的乙醚。

(10) 冷却至室温,用分光光度计在 346 毫微米波长处用空白管作对照,进行比色。

(四) 标准曲线的绘制

精确称取 DL-赖氨酸,配成 $0.5 \times 10^{-3}M$ 的溶液。按下述配比添加试剂,配制成标准系列。

试 剂	DL-赖 氨 酸 (ml)										
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
$H_2O(ml)$	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
4% $NaHCO_3(ml)$	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1% $TNBS(ml)$	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

按实验步骤(4)~(10)进行同样操作,并以光密度E为纵座标,以赖氨酸毫升数为横座标,绘制标准曲线。

(五) 计 算

$$\text{有效赖氨酸} = \frac{\text{从E查表得赖氨酸毫升数} \times 0.5 \times 10^{-3} \text{M赖氨酸} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品重量(毫克)}} \times 100\%$$

(g/100g样品)

或用 100 克蛋白质中含赖氨酸的克数表示或用 16 克氮中含赖氨酸的克数表示
即

$$\text{有效赖氨酸克/100克蛋白质} = \frac{\text{赖氨酸克/100克样品}}{P\%} \times 100\%$$

式中 E 为待测样品的光密度

P 为待测样品的粗蛋白含量

三、实 验

赖氨酸测定方法的研究很多,本人根据实验室具体条件,曾对茚三酮等比色法进行探索但结果不佳。作者以实验为例,并用回归直线方程进行判别,认为 TNBS 法重现性与正确性较好。

取 $0.5 \times 10^{-3} \text{M}$ 的 DL-赖氨酸溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 毫升,按上述方法测得光密度分别为 0.072, 0.114, 0.157, 0.196, 0.234, 求得回归直线方程为 $E_1 = 0.0328 + 0.406I$ (图 1) 相关系数 $\rho_1 = 0.999$, 如果设置信度为 0.01, 由相关系数表得知 $\rho_a = 0.959$, 则 $\rho_1 > \rho_a$, 所以 E_1 与 I 的线性关系很显著, 这样的回归直线方程是有意义的。

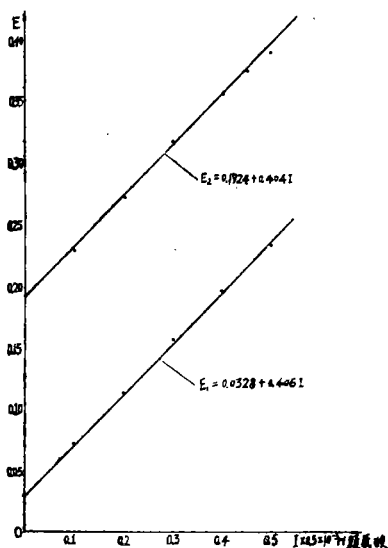


图 1 赖氨酸 E-I 图

为了检验本实验的重现性,我们将 $0.5 \times 10^{-3} \text{M}$ 的 DL-赖氨酸溶液以 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 毫升分别加入到实测光密度 E_0 为 0.155 玉米提取液中,实测得混合液的光密度为 0.230, 0.273, 0.318, 0.357, 0.390。求得回归直线方程为 $E_2 = 0.1924 + 0.404I$ (图 1)

$\rho_2 = 0.998$ $\rho_2 > \rho_a$, 所以 E_2 与 I 之间的线性关系是显著的。

从上述 E_1 方程和 E_2 方程可知,在加入同量的玉米提取液的情况下,其直线的斜率不变,差别仅在于截距。此截距的大小正好接近于玉米提取液本身的光密度 $E_0 = 0.155$, 从方程推得 $E_0' = 0.1924 - 0.328 =$

0.1596, 它们之间的绝对误差为 0.0046, 相对误差为 2.88%。

四、谷类及豆类粮食中有效赖氨酸的测定

主要谷类及豆类粮食中的有效赖氨酸含量如表一。

由表可知,面粉、大米、玉米的赖氨酸含量相对较低,营养价值较差;而豆类中赖氨酸含量较高。如果将豆类和谷类进行搭配食用,则蛋白质的营养价值相应提高,达到了氨基酸的互补作用。为此进行下面的试验测定得表二。

表一

样品名称(脱脂)	粗 蛋 白 %	ϵ -赖 氨 酸 %	ϵ -赖氨酸克/100克蛋白质
面 粉	10.59	0.267	2.518
大 米	7.10	0.247	3.479
玉 米	8.31	0.244	3.012
大 豆	51.71	3.620	7.000
蚕 豆	—	1.893	—

表二

搭配粮食中有效赖氨酸的含量

搭 配 比 例	粗 蛋 白 %	ϵ -赖 氨 酸 %
玉米:大豆 = 2:1	20.65	1.356
玉米:大豆 = 2:0.5	13.70	0.916
玉米:大豆 1:1	—	1.898
大米:面粉:大豆 = 2.5:1.3:1.6	18.46	1.216
大米:面粉:大豆 = 1.15:0.8:1	17.61	1.246
大米:大米 = 2:1	18.50	1.368

由此可见,混合搭配后的粮食 ϵ -赖氨酸含量有一定的提高。例如食用单一豆类,此时 ϵ -赖氨酸为 0.2470,而采用 2:1 与大豆搭配食用,则 ϵ -赖氨酸含量达到 1.368 为单一大米的 5.47 倍。依此测定数据来看,也具有一定的规律性和正确性。

五、食品加工方式对赖氨酸含量的影响

用大豆为原料,在膨化加工条件下变改加工参数,其 ϵ -赖氨酸含量的变化见表三。

表三

在膨化加工过程中 ϵ -赖氨酸含量的变化

样 品 名 称	膨 化 加 工 的 参 数			ϵ -赖 氨 酸 %
	时 间(分)	温 度 $^{\circ}\text{C}$	水 份 %	
大豆(原料)	0	室温	11.88	3.730
大豆(原料)	7	140	11.03	3.125
大大(原料)	10	140	9.59	2.770
大豆(原料)	13	140	8.18	2.589
大豆(原料)	16	140	7.81	2.347

由表可见,大豆随加热时间和加热温度的增加赖氨酸含量逐渐下降。加工前后对比水份损失 34.3%,赖氨酸损失 37.1%。加热时间增加近一倍,则水份减少 25.8%,赖氨酸减少 17.1%,各种搭配粮食经膨化加工后, ϵ -赖氨酸有所下降,见表四。

表四

搭配粮食经膨化加工后 ϵ -赖氨酸的含量

搭 配 比 例	原料中 ϵ -赖氨酸 %	膨化后 ϵ -赖氨酸 %
玉米:大豆 = 2:1	1.3560	0.8620
玉米:大豆 = 1:1	1.8976	1.0574
玉米:大豆 = 2:0.5	0.9156	0.5054
大米:大豆 = 2:1	1.3680	0.8770
大米:面粉:大豆 = 2.5:1.3:1.6	1.2155	0.6940
大米:面粉:大豆 = 1.52:0.8:1	1.2460	0.6260

从表四中可以看出,赖氨酸在加工前后的损失,玉米,大豆按 2:1 搭配的粮食损失值为 0.494 达 36.4%; 1:1 的为 0.8402 达 44.3%; 2:0.5 的为 0.4102 达 44.8%; 大米:大豆 2:1 的为 0.491 达 35.9%。大米,面粉,大豆按 2.5:1.3:1.6 的为 0.5215 达 42.9% 1.52:0.8:1 的为 0.834 达 66.9%。故一般经过加工后其赖氨酸损失为 35~45%。

六、结 论 与 讨 论

(一) ϵ -赖氨酸测定数值,一般都具有一定的相对性,从本实验得到的回归方程显示了本方法具有一定的正确性和重现性。一般重现正确率可达 97%,本实验测得各类粮食的数据尚有一定的规律性。

(二) 各类粮食经加工处理后。 ϵ -赖氨酸有明显的下降,故在加工过程中必须注意赖氨酸的损失,在必要时还需作一定的添加或补充。本实验均采用膨化粉。经膨化后,赖氨酸的损失率达 35~45%,最高达 66.9%。

(三) 赖氨酸含量低与含量高的粮食搭配食用,可以提高蛋白质的生理价。本法为选择合理的搭配比例,提供了依据。尤其对生产儿童食品更有意义。

(四) TNBS 法操作简单,无需特殊仪器,在实验过程中不必制得数量极微的 ϵ -TNP 蛋白质沉淀,而让其保留在水溶液中。从而减少实验误差。具有一定的优越性。

参 考 文 献

- [1] Analyst 98 (673) 1973
- [2] Analytical Biochemistry 27 (273) 1969 70 (434.9) 1976
- [3] 粮食学与粮食化学 无锡轻工业学院
- [4] 营养与食品卫生学 武汉医学院主编、人民卫生出版社
- [5] 国外谷物蛋白质赖氨酸分析测定法 上海科技情报所编、(上海科学技术文献出版社)

Application of Available Lysine Determination -- TNBS Method in Mixed Foods and Feeds

Zhon Li-yu

Abstract

Available lysine content of cereals and beans was analyzed, before and after mixing and heat treatment. Available lysine content was lower in rice, wheat flour and corn. In order to raise the biological value of cereal proteins, Maked cereals and Soybeans are mixed with certain ratio. For example, when two parts of rice and one part of soybeans are mixed available lysine content is increased from 0.247% for rice alone to 1.370% for the mixture about 5 time. On the other hand, available lysine content of foods from rice and wheat flour decreased. According to analysis about lose 35~45% after heat treatment or extrusion. This paper provides scientific basis for selecting reasonable ratio of cereals and soybeans mixed and processing methods.