

用 HPLC 测定酶解玉米蛋白氨基酸的组成

周大寨¹, 黄国清², 唐巧玉¹

(1.湖北民族学院生物技术研究, 湖北 恩施 445000;

2 华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 利用高效液相色谱对玉米黄粉蛋白的酶解产物进行氨基酸组成测定, 发现酶解产物中含有大量的 Pro 和 Phe、Leu 等必需氨基酸, 因此可以用作保健食品来补充必需氨基酸和降低高血压患者的血压, 具有广阔的应用前景。

关键词: 玉米黄粉蛋白; 氨基酸; 组成

Study on Amino Acid Constituents in the Enzymatic Hydrolyzates of Corn Gluten Meal by HPLC

ZHOU Da-zhai¹, HUANG Guo-qing², TANG Qiao-yu¹

(1. Research Institute of Bio-technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China;

2. College of Food and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: With the RP-HPLC, the enzymatic hydrolyzates of corn gluten meal were found to be rich in Pro, Phe and Leu etc. Which were thought to be suitable as healthy food additives to supplement essential AA for easing hypertension.

Key words: corn gluten meal; amino acid; composition

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0179-03

玉米蛋白粉是玉米加工中的副产物, 它是从淀粉乳分离蛋白质时得到的黄浆水, 过滤后得到的不溶于水的蛋白质, 俗称黄粉子。玉米蛋白粉含蛋白质 60% 以上,

有的达到 70%, 其余是 20% 淀粉和 13% 纤维。玉米蛋白粉中主要为玉米醇溶蛋白(zein, 20%)、谷蛋白、球蛋白和白蛋白。由于玉米蛋白粉组成复杂, 口感粗糙, 水溶性特别差, 严重影响了其在食品工业中的应用, 当今国内主要将玉米黄粉用于饲料或者自然排放^[1]。我国每年随废液排走的玉米蛋白质高达 8 万多吨, 既浪费了宝贵的粮食资源, 又造成对环境的污染, 因此, 提高

收稿日期: 2003-11-08

作者简介: 周大寨(1976-), 男, 硕士, 主要从事天然产物研究与开发。

- [4] H Hencken. Chemical and physiological behavior of carotenoids and their effects on pigmentation[J]. Poultry Sci, 1992, 71(3): 711-717.
- [5] 程忠刚, 林映才. 肉鸡皮脂和蛋鸡蛋黄的着色研究进展[J]. 中国饲料, 2001, (4): 5-7.
- [6] A Blanch. International Poultry Production. 1999, 7 (2): 23-25.
- [7] 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997.
- [8] 李忠. 枸杞子类胡萝卜素化学及抗氧化作用研究[D]. 华中农业大学1998届博士学位论文.
- [9] 彭光华. 类胡萝卜素及其抗乳腺癌机理研究——细胞凋亡、细胞间隙连接通讯、基因表达及基因芯片检测[D]. 华中农业大学2002届博士学位论文.
- [10] Paola Vitaglione, Simona Monti, Patrizia Ambrosino, et al. Carotenoids from tomatoes inhibit heterocyclic amine formation[J]. European Food Research and Technology, 2002, 215, (2): 108-113.
- [11] 马自超, 庞业珍. 天然食用色素化学及生产工艺学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1994.
- [12] Britton G. "General Carotenoids Methods" in "Methods in Enzymology (Vol 111) Steroids and Isoprenoids (Part B)" [J]. Academic Press, New York, 1985.
- [13] G Britton, S Liaen-Jensen, H Pfander. Carotenoids Volume 1 B: Spectroscopy[M]. Birkhauser Verlag Basel, 1995. 32-38, 20-26, 290-300.
- [14] Tan B, Soderstrom D N. J Chem Educ, 1989, 66(3): 258.

对玉米黄粉蛋白质利用率有着重要的意义,本文利用高效液相的方法测定了玉米蛋白酶解后产物的氨基酸组成,发现酶解产物是保健食品的良好添加剂,为玉米黄粉蛋白的综合利用提供了一条新的途径。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪:包括四元泵、真空抽气机、DAD 检测器、柱温箱和手动进样器(配 20 μ l 定量环);反相柱(Agilent ODS C₁₈ 柱);甲醇、乙腈均为国产色谱纯试剂;OPA 来自 Agilent 公司;FMOC 和正缬氨酸内标来自于 Sigma 公司;氨基酸标准品来自 Agilent 公司;实验过程中所用水电阻率为 18.2 兆欧。

1.2 色谱条件

色谱柱:Hypersil C₁₈ 柱(250mm $\times$ 4.0mm i.d.);柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ l;流动相 A:20mmol/L pH 7.2 乙酸-乙酸铵缓冲液+0.018% 三乙胺+0.3% 四氢呋喃,流动相 B:20mmol/L pH7.2 乙酸-乙酸铵缓冲液:甲醇:乙腈=1:2:2,流动相使用前经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤;洗脱程序见表 1,DAD 检测器程序:0~20min 波长 338nm,Bw10,参比波长 390nm,Bw 20;20~25min 波长 262nm,Bw16,参比波长 324nm,Bw8。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 The process of grad elution

	Time(min)	A%	%B	Flow(ml/min)
1	0.00	100	0.0	0.450
2	17.00	40	60.0	0.450
3	18.10	0	100.0	0.450
4	18.50	0	100.0	0.800
5	23.90	0	100.0	0.800
6	24.00	0	100.0	0.450
7	25.00	100	0.0	0.450

1.3 样品制备及处理

酶解产物的制备:玉米蛋白粉(蛋白质含量 51%)用 Alcalase 2.4L 酶解,酶解条件为:温度 50 $^{\circ}$ C、酶量 1.5%、底物浓度 10%、pH8、时间 5h;反应完后 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min 灭酶,4500r/min 离心 15min,取上清液经 10000Dal 的超滤膜过滤,透过液冷冻干燥得测定样品,蛋白质含量为 87%。

称取 0.5478g 样品用 6mol/L 盐酸定容至 100ml,从中取出 2.5ml 放入两端封口的玻璃管中进行消化。消化条件为:在 6mol/L 盐酸加 1% 苯酚在 110 $^{\circ}$ C 马弗炉中消化 24h,取出玻璃管,用去离子水冲洗干净,然后在 70 $^{\circ}$ C 水浴上赶酸至蒸干,然后用 0.1mol/L 盐酸定容至 10ml 待用。

1.4 衍生

准确吸取 5 μ l 待测液干净的塑料离心管中,加入 5 μ l 0.1 mol/L 盐酸、10 μ l 1nmol/ μ l 正缬氨酸内标和 72 μ l 0.4mol/L pH9.4 硼酸缓冲液,混匀,加入 3 μ l FMOC 混匀反应 30s,再加入 5 μ l OPA 反应 1.5min,进样。

2 结果与分析

2.1 标准氨基酸的标准曲线与相关系数

在浓度范围内,以峰面积为纵坐标,氨基酸浓度为横坐标,得到各氨基酸的工作曲线回归议程,见表 2,对 17 种氨基酸混合标准溶液按照设定的色谱条件作标准曲线,色谱图见图 1。

表2 17种氨基酸标准曲线及相关系数

Table 2 The standard curve and correlation coefficient of 17 kinds amino acids

氨基酸名称	保留时间	标准曲线	相关系数
Asp	5.750	$Y=0.905x-0.006$	0.99984
Glu	7.560	$Y=1.01x-0.0015$	0.99992
Ser	10.173	$Y=1.02x-0.0028$	0.99994
His	10.757	$Y=0.789x-0.0071$	0.99944
Gly	11.335	$Y=1.03x-0.0081$	0.99963
Thr	11.625	$Y=0.995-0.0057$	0.99986
Ala	13.052	$Y=1.03-0.0059$	0.99985
Arg	13.469	$Y=1.03-0.0058$	0.99983
Tyr	14.332	$Y=0.958-0.0043$	0.99986
Cys-SS-Cys	14.576	$Y=0.860-0.0080$	0.99946
Val	16.554	$Y=1.03x-0.0037$	0.99991
Met	16.760	$Y=1.04x-0.0049$	0.99989
Phe	18.087	$Y=0.954x-0.0053$	0.99976
Ile	18.398	$Y=1.25x-0.017$	0.99919
Leu	18.752	$Y=0.573-0.0011$	0.99991
Lys	19.190	$Y=0.126x-0.0070$	0.96886
Pro	21.207	$Y=0.710-0.0099$	0.99810

DAD1 A. Sig=338.10 Ref=390.20.TT(TEST/SIG 10039.D)

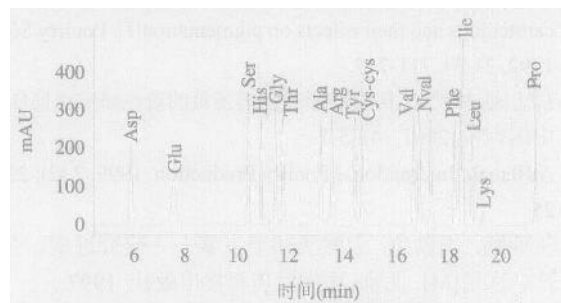


图1 标准氨基酸图谱

Fig.1 Atlas of standard amino acids

2.2 样品中各种氨基酸含量

将制备好的玉米蛋白酶解物在标准氨基酸的标准曲

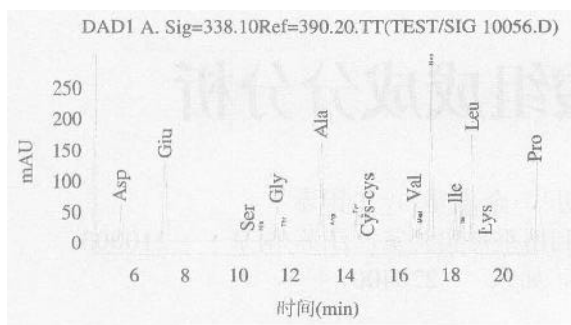


图2 玉米蛋白水解物色谱图

Fig.2 The chromatogram of the hydrolyzates the hydrolyzates of corn gluten meal

线相同的色谱条件用HPLC测定酶解玉米蛋白氨基酸的组成,其完全水解物的色谱图见图2。通过标准曲线,经过计算,得出玉米蛋白酶解物中各氨基酸的含量为见表3。

3 讨论

通过对玉米蛋白酶解产物的17种氨基酸含量进行测定,发现酶解产物中含有较高量的Glu、Leu、Pro、Phe和Val等氨基酸,因此玉米蛋白酶解产物可以用来保健食品来补充Leu、Phe、Val等人体必须氨基酸,同时也可以用来制备具有高降血压活性的多肽,因为具有高降血压活性的多肽含有较多的Pro和Phe等芳香族氨基酸,从玉米蛋白中提取出的降血压肽是目前所以原料中活性最高的^[2]。因此,玉米蛋白通过酶解后,由于其具有独特的氨基酸组成,使其很适于用作保健食品的添加剂,用以补充Leu、Val、Phe等必需氨基酸和降低高血压患者的血压等,具有广阔的应用前景。

表3 酶解物中各种氨基酸的含量

Table.3 The content of all kinds of amino acid in the hydrolyzates

氨基酸	浓度(pmol/μl)	百分含量(%)
Asp	23.44	4.56%
Glu	77.68	16.69%
Ser	6.20	0.95%
His	7.38	1.67%
Gly	18.61	2.04%
Thr	7.85	1.37%
Ala	53.50	6.96%
Arg	9.21	2.34%
Tyr	15.21	4.02%
Cys-SS-Cys	1.88	0.66%
Val	21.06	3.60%
Met	9.34	2.04%
Phe	20.86	5.03%
Ile	6.12	1.17%
Leu	71.82	13.76%
Lys	2.65	0.57%
Pro	36.56	6.15%

参考文献:

- [1] 尤新. 玉米的综合利用及深加工[M]. 北京, 轻工业出版社, 1993.
- [2] Shinsuke Miyoshi, Hiromi Ishikawa, Toshiyuki Kaneko. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -Zein hydrolysate[J]. Agric Biod Chem, 1991, 55(5): 1313-1318.

信息

欧盟将修改食品添加剂规则

据海外媒体报道,欧盟最近提议修改食品添加剂规则。修改内容包括肉类亚硝酸盐规定水平的减少、防止使用凝胶成形的食品添加剂等。与此同时,欧盟也已提议批准将乙基纤维素、赤藻糖醇、4-己基雷琐酚和大豆半纤维素等作为食品添加剂使用。

据悉,亚硝酸盐和硝酸盐已经作为储存咸肉、火腿等肉产品的添加剂而被使用。亚硝酸盐可以保持咸肉的颜色和气味,延缓或阻止细菌病原体的生长。在大部分咸肉产品中,添加亚硝酸盐成为阻止毒素增长的必需程序。不过,按照目前的法令规定,在非加热处理、盐渍和干燥肉制品中钾亚硝酸盐的最大残留不能超过 50×10^{-6} ,其他盐渍肉和肉罐头不能超过 100×10^{-6} 。盐渍鲑鱼和小鲑鱼的残留不能超过 200×10^{-6} 。

据报道,欧盟为了实现将亚硝胺水平尽可能控制在最低水平的目标,所提议的规则修改将降低允许添加到食品中的硝酸盐和亚硝酸盐的水平,同时也将用于维持水平的微生物安全。

据悉,去年4月,欧盟已经做出决定停止在欧盟境内销售含有特定的从海藻或果胶中提取的食品添加剂的迷你果冻。此次提议的规则修改将使这一停止销售决定永远有效。