

蛋白溶解度作为评定豆粕过熟程度 指标的研究

丁丽敏^① 计成戎 易沈慧乐
(动物科技学院)

摘要 本实验以南苑植物油厂未经加热的生豆粕为原料,用高压蒸锅在 108℃,0.294 kg·cm⁻²压力下处理 0,12,20 min,以及在 121℃,0.882 kg·cm⁻²压力下处理 5,20,40,60 min 和原样品共得到八种不同加热程度的豆粕,进行脲酶活性(PH 增值法、ISO 法)、蛋白溶解度(PS)、考马斯亮蓝值、DBL(可利用赖氨酸)测定,并进行了各个指标的相关性研究。结果表明,各指标均随加热时间的延长和加热温度的升高而逐渐下降,但下降的幅度各不相同,其中蛋白溶解度与加热时间的关系最为显著。且各指标间存在很强的相关,其回归系数都在 0.90 以上。用定氮法测定的蛋白溶解度和比色法测定的考马斯亮蓝值之间存在很强的相关,其回归方程 $y=32.91+0.9142x$, x =考马斯亮蓝值, y =蛋白溶解度($r=0.98$)。两者都可鉴别出不同加热程度特别是加热过度的豆粕。DBL 值随加热程度的加深而下降,说明加热破坏了赖氨酸,使赖氨酸有效率下降。粒度对蛋白溶解度影响显著,以 60~80 目为佳。综上所述,蛋白溶解度和考马斯亮蓝值是评价不同加热程度豆粕的最佳指标。在评定过熟程度上,蛋白溶解度比脲酶活性可靠。

关键词 蛋白溶解度; 考马斯亮蓝值; 脲酶活性; DBL; 豆粕加热程度
中图分类号 S829.1

Protein Solubility as an Indicator of Overprocessing of Soybean Meal

Ding Limin Ji Cheng Rong Yi Sheng Huile
(College of Animal Science and Technology)

Abstract Solvent-extracted soybean flakes from Nan Yuan vegetable oil rendering factory were autoclaved for 0,12,20 minutes at 108℃ 5ib/inch² and for 5,20,40,60 min at 121℃ 15 Pa. The samples were evaluated for Urease activity (Δ pH, ISO), protein solubility (PS) by Kjeldahl nitrogen method and by Coomassie dye binding method, DBL values. The results indicated that all the indexes decreased as the heating time was increased, but the decreased ranges of each index was different. There is a high correlation between the indexes ($r=0.98$). The regression formula for the relation between the protein solubility and Coomassie dye binding was: $y=32.91+0.9142x$ (x : Coomassie blue G, y : protein solubility). Both index can evaluate the degree of heating, The fact of DBL's decrease together

收稿日期: 1997-07-17

①丁丽敏,北京海淀区圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

er with the increased heating time suggested that lysine effectiveness was decreased due to the damage of protein under heating process. The samples particle sizes affect protein solubility. The best particle size for analysis was 60~80 mesh.

Key words autoclaving of soybean meal; PS; comassie blue G; urease activity

豆粕的加热程度对豆粕的质量有很大影响。因此,用简单可靠的化学方法评定大豆粕的质量,也越来越引起人们的注意。脲酶活性指标用于生熟度的测定最为广泛,许多国家都制定了自己的脲酶活性标准。但 Dale^[1]的研究表明,脲酶活性不能检测豆饼粕的过熟程度。Kratzer et al^[2]研究表明:用考马斯亮蓝染色法测定的蛋白溶解度与定氮法测定的蛋白溶解度之间存在高度的相关。而且考马斯亮蓝染色法具有灵敏、快速、简便的特性。因此,寻找出一种简便、快速、可靠的方法来检测豆饼粕的加热程度,无论是对大豆加工还是饲料加工厂都具有重要的指导意义。本试验主要研究蛋白溶解度及考马斯亮蓝法作为评价豆饼粕加热程度的可行性,以及其作为评价豆饼粕加热指标最适范围的研究。

1 材料与方法

1.1 豆粕的湿热处理

豆粕样品来自南苑植物油厂的生豆粕,此豆粕经溶剂浸提后未经加热处理。本试验应用高压锅(山东新华医疗器械厂的 YXQG901 型蒸汽消毒器)在 108℃, 0.294 kg/cm² 压力下处理 0, 12, 20 min, 以及在 121℃ 下处理 5, 20, 40, 60 min 加上原样得到 8 种不同加热程度的豆粕。

1.2 豆粕不同加热程度的化学指标的检测

1.2.1 蛋白溶解度(定氮法) 按 Dale^[1]等提出的方法进行测定。样品全部粉碎至 60 目。称取 1.5 g 样本于 250 mL 烧杯中,加入 75 mL 0.2% 的 KOH 溶液,搅拌 20 min,再离心 10 min。取 15 mL 上清液定氮,测碱溶性蛋白的含量。

$$\text{蛋白溶解度} = \frac{15 \text{ mL 上清液中的蛋白质含量}}{\text{原样本的蛋白质含量}} \times 100\%$$

1.2.2 考马斯亮蓝法测定溶解度 按 Kratzer^[2]等提出的方法检测。取 40 mg 粉好的豆粕于 50 mL 三角瓶中,加入 10 mL 0.2% KOH 溶液。内容物搅拌 3~4 次。10 min 后用 1 号 Whatman 滤纸过滤,吸取 1 mL 上清液,用 5 mL 的 NaCl-Pi 缓冲液稀释。取 0.5 mL 此稀释液于 15 mL 试管中。同时用 0.5 mL 的混合液(此混合液为 1 mL 0.2% KOH 溶液,5 mL 缓冲液的混合液)作空白。每个试管加入 9.5 mL 考马斯亮蓝染色液,混合后,放置 5 min。在 595 nm 波长处比色,并用空白调零。同时用标准溶菌酶蛋白质(RPE)作标准曲线。

$$\text{考马斯亮蓝值} = \frac{\text{从标准曲线上查得的样品碱性蛋白的 RPE 含量}}{\text{样品的粗蛋白含量(定氮法测得)}} \times 100\%$$

1.2.3 脲酶活性 ΔpH 法 在 (30±0.5)℃ 和 pH 为 7.0 的条件下反应 30 min,试样的 pH 值与空白的 pH 值之差即为脲酶活性值。

1.2.4 脲酶活性 ISO 法 按《大豆制品中脲酶活性测定方法国家标准》进行测定。

1.2.5 DBL 法测定有效赖氨酸 用高压液相色谱测定豆粕中的总赖氨酸,按《染料结合赖

氨酸法》测定豆粕中的有效赖氨酸。

1.2.6 数据处理与统计分析 采用直线相关的方法求出各指标间的相关系数及回归方程。

2 结果与讨论

2.1 加热时间对蛋白溶解度的影响

表 1 湿热处理时间与蛋白溶解度的关系

| 项 目 | 处 理 | | | | | | | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 121 C 加热时间/min | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| 蛋白溶解度/% | 91.32 | 87.41 | 82.43 | 79.97 | 68.84 | 65.84 | 57.34 | 51.26 | 48.70 | 47.56 | 44.3 |

注:样品来自南苑的生豆粕,60 目下测得的。

从表 1 可以看出,随着加热时间的延长蛋白溶解度逐渐下降。而且蛋白溶解度与加热时间之间存在高度相关,其相关系数为 $r=0.98$ 。大豆蛋白由白蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白以及其他一些蛋白组成。白蛋白、球蛋白溶解于水而其他蛋白不易溶解于水。随着加热时间的延长,蛋白可溶性的比例下降,或者说不溶性蛋白的含量升高。因此,蛋白溶解度就随着加热时间的延长而下降。另外,加热使蛋白质的天然结构发生破坏,其二硫键发生断裂,失去其天然蛋白质的原来性质而形成沉淀,不能溶于原来的溶液中。蛋白质结构遭到破坏时,蛋白质分子的疏水基团大量暴露出来,使其从亲水胶体变为疏水胶体。而且,大豆蛋白是白蛋白球蛋白系统,单用加热的方法就可使其凝固沉淀。所以,随着加热时间的延长蛋白溶解度下降。

2.2 粒度对蛋白溶解度的影响

Parsons^[3]等指出颗粒大小影响蛋白溶解度的数值。Dale^[4]等的研究认为,豆饼粕的粒度对蛋白溶解度有很大影响。Dale^[4]指出当豆粕的粒度超过 60 目时,蛋白溶解度才趋于稳定。因为常规成分分析往往采用 40 目,为了更深入地研究粒度对蛋白溶解度的影响,本实验也做了粒度的研究。

从上表的数据可以看出,当豆饼粕的粒度为 60 目、80 目时,PS 为 91.32 和 91.53,其数据非常接近,这与杨秀文^[5]的结果一致。但当粒度超过 150 目时,其蛋白溶解度反而变小,

表 2 不同粒度对蛋白溶解度的影响

| 项 目 | 处理 1 | 处理 2 | 处理 3 | 处理 4 |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 粉碎粒度/目 | 40 | 60 | 80 | 150 |
| 蛋白溶解度/% | 90.70 | 91.32 | 91.53 | 89.87 |

Dale 也得到一样的结果。实验发现,当豆粕的粒度为 150 目时,样品中加入氢氧化钾溶液后,样品往往形成许多小球,悬浮在溶液中,使样品不能很好的溶解在 KOH 溶液中,所以造成碱性蛋白的下降,因而使溶解度下降。本实验研究结果及前人的结果表明,测定溶解度时,粒度过 60 目其结果趋于稳定,过大(>150 目)反而下降。粒度过小 PS 也下降,不利于拉开豆饼粕在溶解度上的差异,因此建议在测定蛋白溶解度时以过 60 目,在 60~80 目间为

佳。

2.3 检测豆粕加热程度各指标的相关性研究

目前已创立了数种估测豆饼粕质量的体外分析法。但许多学者认为真正能鉴定饲料质量的方法是生物试验。可是它是一种耗时、复杂的方法,不适于配合饲料生产中应用。因此,在实际生产中,往往用体外分析法来估测豆饼的质量。抗胰蛋白酶是影响畜禽生产性能的主要因素,但测定抗胰蛋白酶的方法复杂,所以采用间接的方法——脲酶活性的测定。脲酶活性对于检测加热适度的豆饼($\Delta\text{pH}>0.02$)时是可靠的,但对于评价过度加热的豆饼粕则无能为力。Dale 等^[1]创立了蛋白溶解度方法,认为它可以评价过度加热的豆饼粕。Kratzer 等^[6]又创立了考马斯亮蓝比色法测定溶解度,两种方法简便、快速,而且存在高度相关。本实验分别检测了不同加热程度的豆粕的脲酶活性、蛋白溶解度、考马斯亮蓝值、DBL 值等,并分析了各方法间的相关,以及与生产性能之间的关系。

表3 不同加热处理及各指标的检测

| 热处理时间 | 豆粕号 | 蛋白溶解度 /% | 考马斯亮蓝值 | 脲酶 | 脲酶 ΔpH | DBL /% | DBL/总赖氨酸 /% |
|--------------|-----|-------------|--------|-------|-------------------------|-----------|----------------|
| 生豆粕 | 1 | 91.32 | 64.60 | 5.84 | 2.23 | 3.09 | 102.3 |
| 108 C 0 min | 2 | 87.21 | 60.35 | 2.18 | 1.99 | 3.045 | 100.83 |
| 108 C 12 min | 3 | 80.61 | 53.30 | 0.63 | 0.715 | 2.804 | 92.85 |
| 108 C 20 min | 4 | 74.05 | 43.63 | 0.066 | 0.173 | 2.500 | 82.78 |
| 121 C 5 min | 5 | 66.36 | 36.19 | 0.0 | 0.0 | 2.243 | 74.27 |
| 121 C 20 min | 6 | 56.82 | 16.49 | 0.0 | 0.0 | 2.006 | 66.42 |
| 121 C 40 min | 7 | 41.31 | 13.18 | 0.0 | 0.0 | 1.775 | 58.77 |
| 121 C 60 min | 8 | 32.53 | 4.30 | 0.0 | 0.0 | 1.62 | 53.64 |

从表3可以看出,各化学指标均随着加热时间的延长和加热温度的升高而下降。蛋白溶解度和考马斯亮蓝值均随加热时间的延长而逐渐下降,以至加热非常过度也未降为零。蛋白溶解度在加热到121℃ 60 min 时从91.32%降到32.53%,考马斯亮蓝值从64.60%降为4.30%,其下降幅度都很大。而脲酶活性在加热到121℃ 5 min 就变为0,即使加热时间再长其值也为0。从豆粕的颜色来看,豆粕的颜色逐渐加深,在121℃ 5 min 时豆粕颜色已经发红,表明赖氨酸与还原糖发生了梅拉德反应,其有效率下降了。从DBL 值来看,加热121℃ 5 min 的豆粕的赖氨酸有效率为74.27%,比生豆粕(102.3%)下降了28.03%。当加热到121℃ 60 min 时为53.64%,比生豆粕下降了48.66%,说明过度加热使赖氨酸受到了破坏。通过回归计算表明,各化学指标之间存在高度相关,其相关系数 r 都在0.90以上(见表4)。

考马斯亮蓝值随蛋白溶解度的下降而下降,呈相同趋势。蛋白溶解度与考马斯亮蓝值之间的相关系数 $r=0.98$,说明溶解度即可用定氮法,也可用考马斯亮蓝法测定。定氮法不需特殊设备和试剂,在生产上有其可行和方便之处。Kratzer^[6]研究表明,体外法(蛋白溶解度、橙黄G、考马斯亮蓝值、福尔马林滴定法、脲酶活性、抗胰蛋白酶活性)之间存在高度相关。他认为任何一种方法都可用于检测豆饼的加热程度。对于同一来源的豆饼粕,当脲酶活性未降低为零之前,蛋白溶解度与脲酶活性之间存在高度相关,其相关系数 $r=0.94$ 。证明脲酶活

性可用于检测未加热过度的豆粕。但当脲酶活性降为 0 之后,蛋白溶解度与脲酶活性之间没有相关。蛋白溶解度与 DBL 值之间存在很高的相关,其相关系数为 $r=0.98$,说明随着蛋白溶解度的下降,可利用赖氨酸的值也下降。所以是否可利用蛋白溶解度值来估测可利用氨基酸的值,值得进一步研究。

表 4 各化学指标间的相关

| X | Y | 回归方程 | 相关系数 |
|---------------|-----------------|---------------------|----------|
| 考马斯亮蓝值 | 蛋白溶解度 (PS)/% | $Y=32.91+0.9142X$ | $r=0.98$ |
| 蛋白溶解度/% PS | DBL/% | $Y=0.66012+0.026X$ | $r=0.98$ |
| 考马斯亮蓝值 | DBL/% | $Y=1.4943+0.02443X$ | $r=0.99$ |
| PH | ISO | $Y=1.97X-0.171$ | $r=0.90$ |

3 结论

①蛋白溶解度可用于评价不同加热程度的豆饼粕。蛋白溶解度即可用定氮法也可用考马斯亮蓝法测定。且两者之间存在高度相关,其回归方程为: $y=32.91+0.9142x$,其中 x 为考马斯亮蓝值, y 为蛋白溶解度。脲酶活性只能用于评定加热不足、加热适度的豆粕,不能用于评定脲酶活性为 0 后的豆粕(即加热过度的豆粕)。各化学指标(蛋白溶解度、考马斯亮蓝、DBL 值)均随加热时间的延长和加热温度的升高而下降,各化学指标间存在高度相关,相关系数都在 0.90 以上。说明这几种指标均可用于评定同一加工程序的不同加热程度。

②粒度对蛋白溶解度影响显著,以 60~80 目为佳。

参 考 文 献

- 1 Dale N M, et al. Reliability of urease activity as indicator of overprocessing of soybean meal. Poultry Sci 1986,65(Supple):164
- 2 Kratzer F H, et al. Chemical and biological evaluation of soya-bean flakes autoclaved for different duration. Animal feed science and technology, 1990a,31:247~259
- 3 Parsons C M, et al. Soybean protein solubility in potassium hydroxide: an in vitro test of in vivo protein quality. J Anim Sci, 1991,69:2918~2924
- 4 Dale N M, et al. Protein solubility as an indicator of optimum processing of soybean meal. Georgia Nutrition Conference, 1987
- 5 杨秀文. 不同豆饼、粕蛋白溶解度、代谢能及氨基酸利用率对肉仔鸡生产性能的影响. [研究生论文], 北京:北京农业大学畜牧系,1991
- 6 Kratzer F H, et al. Evaluation of heat-damage to protein by coomassie blue G dye-binding. Journal of Food Science Volume, 1990b,55:3