

文章编号: 1674-7054(2018)04-0464-05

三公膏传统工艺的改进及其多肽含量的测定

李扬^{1,2} 杨莹¹ 张凌云^{1,2} 邓世明^{1,2}

(1. 海南大学 海洋学院, 海口 570228; 2. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 笔者采用酶解法改进三公膏传统生产工艺和采用双缩脲法测定三公膏中多肽含量。结果表明, 在三公膏传统工艺基础上增加酶解、离心除杂、脱油等步骤, 使生产周期从5天4夜缩短到2天左右, 出膏率由3.0%左右提高到8.84%, 多肽含量由11.90%提高到40.36%; 双缩脲法测定多肽含量简便、准确。

关键词: 三公膏; 工艺改进; 酶解; 多肽含量测定

中图分类号: S 879.2 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.04.016

三公膏是海南黎族民间流传数百年, 经常用来滋补身体的补气补血佳品, 具有温阳补肾、强身健体、促进生长发育等功效^[1]。三公膏传统熬制方法, 通常采用足龄公羊、公狗、公鸡, 褪毛去内脏后大锅连续不断熬制5天4夜收膏而成, 故称为三公膏。依据传统工艺, 通常50 kg左右的三公(公羊、公狗、公鸡)原料熬制成膏后能得到1.5 kg左右成品。三公膏的传统熬煮工艺, 不仅耗时长产率低, 所得三公膏中脂肪含量也较高, 容易变质。动物源药物含有丰富的蛋白质, 蛋白质在胃、肠酶作用下, 可释放出具有功能性的短肽, 如二肽, 三肽等, 这些小肽被称为生物活性肽, 它们无抗原性, 易于吸收及透过血脑屏障^[2], 同时还具有调节人体生理机能的作用, 涉及人体的消化、吸收、营养代谢调控、生长发育、免疫、神经调节等各个环节^[3]。目前已开发上市的有从猪脑中提取的复方脑肽节苷脂注射液, 从动物脾脏中提取的多肽药物保尔佳等。还有一些产品正在研发中, 例如鹿胎多肽微胶囊^[4], 龟甲胶多肽^[5]等。本研究基于三公膏组方和工艺特点, 采用现代酶解法改进三公膏传统制备工艺, 并脱脂去油, 离心除杂, 旨在改善三公膏的品质, 提高其得率。

1 材料与方法

1.1 材料 三公膏(购于海南省乐东黎族自治县), 鸡肉、羊肉、狗肉(购于海口市场), 85%磷酸、三氯乙酸、氢氧化钠、五水硫酸铜、盐酸, 等均为分析纯, 购于西陇化工有限公司; 木瓜蛋白酶(800 000 U·g⁻¹, 出产商 solarbio)、胰蛋白酶(250 000 U·g⁻¹, 出产商 solarbio)、Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准品或谷胱三肽标准品。

1.2 仪器 UV756CRT 紫外可见分光光度计(上海佑科仪器有限公司)、QL-901 旋涡混合仪(金坛市希望科研仪器有限公司)、HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华有限公司)、ML204 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)、TG16-WS 离心机(湖南迈达仪器有限公司)

1.3 三公膏制备工艺路线 传统三公膏制备工艺路线: 公鸡、公羊、公狗→褪毛去内脏洗净→剁成块状→大锅熬煮→过滤→浓缩→收膏。酶解法制备三公膏工艺路线: 公鸡、公羊、公狗→褪毛去内脏洗净→剁成块状→高压锅蒸煮→分离骨肉→分别研磨成肉糜、骨粉→合并肉糜、骨粉→酶解→过滤→离心除杂→浓缩→收膏。

1.4 酶解影响因素的优化 胰蛋白酶来自动物胰脏, 水解产物大多为多肽^[6], 木瓜蛋白酶是应用最广泛

收稿日期: 2018-03-23

修回日期: 2018-08-30

作者简介: 李扬(1991-), 男, 海南大学2015级硕士研究生, E-mail: 840020831@qq.com

通信作者: 邓世明(1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物研究与开发工作, E-mail: dsm701@126.com

的蛋白酶,与前者互补,采用胰蛋白酶和木瓜蛋白酶作为双酶水解用酶,用量分别为 $5\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ [7]和 $7\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ [4]。根据文献[8-9],木瓜蛋白酶使用温度和pH值均较宽泛。胰蛋白酶适宜弱碱性条件,其适宜温度为 $40\sim 45\ ^\circ\text{C}$ 。在 $45\sim 50\ ^\circ\text{C}$ 之间胰蛋白酶的活力虽然下降,但水解度仅降低10%左右,影响较小;当温度达到 $55\ ^\circ\text{C}$ 时,胰蛋白酶水解度大大下降[7]。笔者综合考虑这2种酶的使用特性及实际工艺的便利,选用 $50\ ^\circ\text{C}$ 、pH7恒温水浴酶解。料液比过大,底物浓度高,降低了底物蛋白分子和酶分子的扩散运动,从而降低了底物和酶分子的碰撞几率,使反应速度降低;料液比过低,水量的增加也给后续工序如浓缩增加负担[10]。根据文献和经验,笔者选择料液比1:10。

1.5 不同酶解时间对三公膏得率的影响 按1:2:2的比例称取4份等质量的公鸡肉、公狗肉、公羊肉,清洗干净,记录质量。加水用高压锅熬煮约1 h,分离骨肉,将骨和汤液一起熬煮至骨酥脆,骨头研磨成骨渣;肉捣成肉糜,将骨渣和肉糜二者充分混匀,与汤液混合,调整料液质量比为1:10(公鸡、公羊、公狗肉即为固体部分质量),于 $50\ ^\circ\text{C}$ 水浴锅中,加入 $7\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 木瓜蛋白酶和 $5\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 胰蛋白酶。4份分别水浴酶解3、5、7、9 h,酶解过程中使用玻璃棒每隔0.5 h搅拌3~5 min。酶解结束后,过滤, $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,弃上层(油层)和沉淀层(残渣),取中间清液重复上述离心1次,起到脱油去脂和离心除杂的作用。再取中间清液煮沸浓缩至稠膏,最后收膏即成。成膏后称重,计算成膏得率。

1.6 三公膏多肽含量测定

1.6.1 考马斯亮蓝法标准曲线的制备 称取1.00 mg牛血清白蛋白加1 mL去离子水配制成质量浓度为 $1.00\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液,称取10.00 mg考马斯亮蓝G-250粉末加入5 mL 95%乙醇和10 mL 85%磷酸,加去离子水定容至100 mL,得到考马斯亮蓝溶液。取7支试管,其中1支加0.1 mL蒸馏水作为空白对照,其余6支分别用移液枪移取不同体积(0.01、0.02、0.04、0.05、0.07、0.09 mL)的 $1.00\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白标准溶液并且补加蒸馏水至0.1 mL。7支试管分别加入5 mL配制好的考马斯亮蓝溶液,混合均匀,静置5 min。在紫外-可见分光光度计595 nm处测定吸光度,绘制标准曲线。

样品溶液的制备和考马斯亮蓝法测定:将酶解3、5、7、9 h的三公膏分别用蒸馏水配制成 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液并且取1 mL于试管中,另取2支试管,其中一支加入1 mL蒸馏水作为空白对照,另一支试管加入用同样方法配置的传统熬制三公膏的溶液制成待测溶液。在7支试管中分别加入配制好的考马斯亮蓝溶液5 mL,摇匀,静置5 min。采用玻璃比色皿在紫外-可见分光光度计595 nm处测得吸光度(表3)。用所得的吸光度从标准曲线中查得相当于牛血清白蛋白的微克数,以计算样品中所含的多肽含量。

1.6.2 三氯乙酸法标准曲线的绘制 依照文献[11]的方法,选用Gly-Gly-Tyr-Arg四肽标准品配制标准溶液。5%的三氯乙酸依次配制0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的四肽标准溶液10 mL,然后分别取6.0 mL标准溶液,加入4.0 mL双缩脲试剂,混匀,静置,540 nm处测其吸光度值,并绘制标准曲线。

1.6.3 三公膏样品溶液制备 将酶解3、5、7、9 h的三公膏和传统熬制三公膏分别用蒸馏水配制成 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液并且分别取1 mL于试管中,另取1支试管加入1 mL蒸馏水作为空白对照。

1.6.4 三公膏样品溶液测定

1) 考马斯亮蓝法测定:在7支试管中分别加入配制好的考马斯亮蓝溶液5 mL,摇匀,静置5 min。采用玻璃比色皿在紫外-可见分光光度计595 nm处测得吸光度值(表3)。用所得的吸光度从标准曲线中查得相当于牛血清白蛋白的微克数,以计算样品中所含的多肽含量。

2) 三氯乙酸法测定:分别取样品溶液2.5 mL加入到2.5 mL 10%三氯乙酸溶液中,于旋涡混合仪上混合均匀,静置20 min,然后 $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。取上清液置于50 mL容量瓶中,并用5%的三氯乙酸定容至刻度,摇匀。分别取6.0 mL样品溶液(5%的三氯乙酸定容),加入4.0 mL双缩脲试剂,测定吸光度,根据标准曲线求得样品多肽含量。

2 结果与分析

2.1 不同酶解时间对三公膏得率的影响 在不同酶解时间下三公膏得率的测定结果见表1。

表1 不同酶解时间的三公膏得率

Tab.1 Extraction yield of Sangonggao under enzymatic hydrolysis for different hours

项 目 Project	酶解时间 hydrolytic time/h			
	3	5	7	9
公鸡肉 Cock/g	41.72	41.80	40.86	40.54
公羊肉 He-goat/g	83.45	83.25	80.23	81.16
公狗肉 Male dog/g	83.48	83.13	80.54	81.29
成膏质量 Paste weight/g	6.61	13.53	17.82	18.09
出膏率 Extraction yield/%	3.17	6.50	8.84	8.91

由表1可知 随着酶解时间的延长 三公膏得率逐步提高 但9 h 酶解出膏率 8.91% 与酶解 7 h 的出膏率 8.84% 相近。考虑从减少工艺成本出发 笔者将酶解时间定为 7 h。

2.2 三公膏多肽含量测定

2.2.1 考马斯亮蓝法测定的三公膏多肽含量 图1 为牛血清白蛋白标准曲线。考马斯亮蓝法测定样品溶液的多肽含量吸光度见表2。用所得的吸光度从标准曲线中查得相当于牛血清白蛋白的微克数,以此计算样品中的多肽含量(表2)。

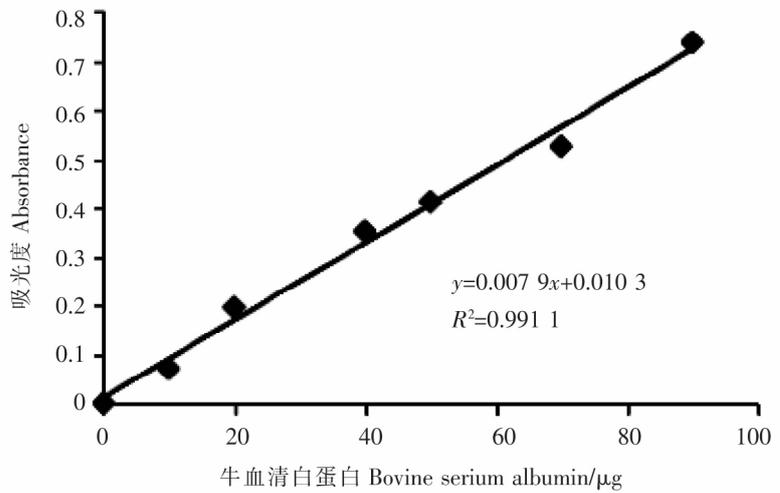


图1 牛血清白蛋白标准曲线

Fig.1 Standard curve of bovine serum albumin

表2 考马斯亮蓝法测定多肽含量

Tab.2 Determination of polypeptide content of Sangonggao by Coomassie blue staining

项目 project	空白	传统三公膏	酶解 3 h 三公膏	酶解 5 h 三公膏	酶解 7 h 三公膏	酶解 9 h 三公膏
	Blank	Traditional Sangonggao	Hydrolyzed 3 h	Hydrolyzed 5 h	Hydrolyzed 7 h	Hydrolyzed 9 h
吸光度 Absorbance	0	0.954	0.728	0.957	1.148	0.972
多肽含量 Polypeptide content/%	0	11.94	9.08	11.98	14.40	12.17

2.2.2 三氯乙酸法测定的三公膏多肽含量 对于测定多肽含量有多种方法,三氯乙酸法也是常用的一种方法。采用三氯乙酸沉淀水解液中的大分子蛋白质 继而采用双缩脲法,便可测定其中 2 个(含 2 个)以上肽键的多肽的含量。利用 10% 的三氯乙酸沉淀样品中未酶解的大分子蛋白质,经离心分离后,在上清液中加入双缩脲试剂,于 540 nm 处测定其吸光度值,根据标准曲线计算出样品中的多肽含量^[11]。图2 为 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准曲线。用所得的吸光度从标准曲线中查得相当于牛血清白蛋白的微克数,以此计算样品中所含的多肽含量(表3)。

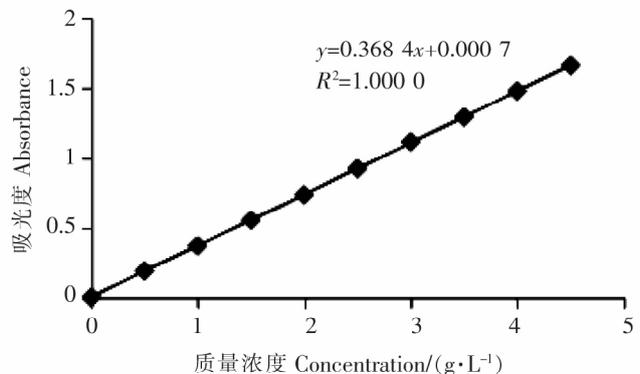


图2 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准曲线

Fig.2 Standard curve of Gly-Gly-Tyr-Arg tetrapeptide

样品溶液制备:将酶解 3 5 7 9 h 的三公膏样品以及购得传统熬制三公膏配成 10 g · L⁻¹ 溶液,分别取 2.5 mL 加入到 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液中,于旋涡混合仪上混合均匀 静置 20 min 然后 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取上清液置于 50 mL 容量瓶中,并用 5% 的三氯乙酸定容至刻度 摇匀。

分别取 6.0 mL 样品溶液,加入 4.0 mL 双缩脲试剂,测定吸光度值,根据标准曲线求得样品多肽含量(表 3)。

表 3 三氯乙酸法测定的三公膏多肽含量

Tab. 5 Polypeptide content of Sangonggao determined with trichloroacetic acid

项目	传统三公膏 Traditional Sangonggao	酶解 3 h 三公膏 Hydrolyzed 3 h	酶解 5 h 三公膏 Hydrolyzed 5 h	酶解 7 h 三公膏 Hydrolyzed 7 h	酶解 9 h 三公膏 Hydrolyzed 9 h
吸光度	0.439	0.513	1.105	1.487	1.236
多肽含量/% Polypeptide content	11.90	13.91	29.99	40.36	33.55

3 结 论

本实验基本确定了酶解法改进三公膏的工艺路线为:原材料高压蒸煮后,木瓜蛋白酶、胰蛋白酶双酶酶解,酶解液过滤离心,取中间清液煮沸浓缩至稠膏,最后收膏即成。通过工艺改进,产品得率从 3.0% 提高到了 8.84%,多肽含量从 11.90% 提高到了 40.36%,显著缩短了产品的生产周期。用改进后的熬制工艺制得的棕褐色块状固体三公膏,比传统工艺制得的三公膏具有溶解度高,羊膻味等不良气味减弱等优点。酶解将不易被人体吸收的骨胶原蛋白充分利用,肉糜增大了底物接触面积;酶解离心使得脂肪含量大幅下降,既方便贮存,又改善了传统三公膏中油腻、沙砾的口感。双缩脲法测定结果表明,酶解 9 h 较酶解 7 h 所得三公膏中多肽含量稍有降低,这可能是由于随着酶解时间增加,多肽进一步酶解成为氨基酸,降低了多肽含量。三公膏的酶解工艺的优化和质量控制指标等方面尚需进一步研究完善。

采用考马斯亮蓝法和三氯乙酸-双缩脲法测定三公膏中多肽含量,2 种方法测定的结果差异较大,原因可能是考马斯亮蓝法只能测定相对分子质量 $> 1 \times 10^3$ 的多肽含量。由于低于 1×10^3 的多肽类的相对分子质量小,其与考马斯亮蓝染料间范德华力小,结合力差,无法显色,造成测定的多肽含量偏小。说明该法不适合测定三公膏中的多肽含量。

参考文献:

- [1] 李攀,阳杂,王公法. 国际旅游岛下海南黎族养生保健文化发展研究[J]. 湖南税务高等专科学校学报, 2010, 23(2): 46-48.
- [2] 庞广昌,陈庆森,胡志和,等. 蛋白质的消化吸收及其功能评述[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 375-391.
- [3] 崔凤霞. 海参胶原蛋白生化性质及胶原肽活性研究[D]. 中国海洋大学, 2007: 31-40.
- [4] 刘芳. 鹿胎多肽的制备、抗氧化性研究及其微胶囊产品开发[D]. 吉林大学, 2016: 25-40.
- [5] 史宗洁,张榕村,韦山,等. 龟甲胶多肽的制备方法和制药新用途[P]. 中国专利: CN104232714A, 2014-12-24.
- [6] GILDBERG A, ARNESEN J A, CARLEHÖG M. Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation [J]. Process Biochemistry, 2002, 38(4): 475-480.
- [7] 付英杰,田景振. 阿胶低肽酶解工艺的实验研究[J]. 中成药, 2010, 32(1): 143-146.
- [8] 喻峰,熊华,吕培蕾,等. 核桃粕酶解工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 89-91.
- [9] 钱磊,张志军,周永斌,等. 酶法水解滑菇蛋白制备抗氧化肽的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(20): 72-76.
- [10] 龙彪,彭志英,陈中,等. 采用木瓜蛋白酶制备乌鸡蛋白肽的研究[J]. 食品工业科技, 2005(6): 135-137.
- [11] 鲁伟,任国谱,宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.

Improvement of the Traditional Preparation Process and Determination of Polypeptide Content of a Li Ethnic Group Medicine: Sangonggao

LI Yang^{1 2}, YANG Ying¹, ZHANG Linyun¹, DENG Shiming^{1 2}

(1. College of Ocean, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Sangonggao is a popular traditional healthcare medicine prepared by the Hainan Li Ethnic Group, and its preparation is time consuming and less effective. An enzymatic hydrolysis was used to improve the traditional preparation process of Sangonggao, and the polypeptide content of Sangonggao was determined by employing the Coomassie blue staining method or the biuret method. The results showed that the preparation process of Sangonggao was improved through additional steps such as glycolysis, centrifugation and removal of fats and oils in the basis of the traditional preparation process. With this improved method the preparation was shortened from 5 days and 4 nights to about 2 days and the Sangonggao paste yield increased from about 3.0% to 8.84%; the polypeptide content of the prepared Sangonggao was raised from 11.90% to 40.36%. The biuret method was found to be simple and accurate in determination of polypeptide content in Sangonggao.

Keywords: Sangonggao; process improvement; enzymatic hydrolysis; determination of polypeptide content

(责任编辑: 叶 静)