

酵母抽提物中游离氨基酸的测定与分析

钱敏¹, 白卫东^{1,2}, 赵文红^{1,2}, 陈海光¹, 陈悦娇¹, 黄桂颖¹

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510225) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 本文首先探索了游离氨基酸的 HPLC 法测定条件, 建立了同时测定 16 种游离氨基酸的方法, 然后对酵母抽提物中的游离氨基酸进行了分析研究。通过高效液相色谱法测定了热反应前后酵母抽提物、HVP 粉、猪肉酶解物中的游离氨基酸, 得出结论: 酵母抽提物中游离氨基酸的种类和含量最多; 热反应后的酵母抽提物中氨基酸含量减少, 且随着加入还原糖(木糖)含量的增多, 游离氨基酸含量也随着减少。因此, 酵母抽提物可作为 Maillard 反应制备肉味香精的良好氨基酸原料。

关键词: 酵母抽提物; 游离氨基酸; 测定方法

文章编号: 1673-9078(2012)7-878-881

Determination and Analysis of Free Amino Acid in Yeast Extract

QIAN Min¹, BAI Wei-dong^{1,2}, ZHAO Wen-hong^{1,2}, CHEN Hai-guang¹, CHEN Yue-jiao¹, HUANG Gui-ying¹

(1. College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The HPLC conditions for free amino acids detection was explored and a method for simultaneous determination of 16 kinds of free amino acids was established firstly. With this method, the free amino acids in yeast extract before and after heat treatment, HVP power and enzymatically-hydrolysed pork were analyzed. It was found that yeast extract without heat treatment had the most types and the highest contents of free amino acids. With the decreasing of reducing sugar(xylose) in heat treatment, the contents of free amino acids decreased. Yeast extract showed to be a good source of amino acids in the production of meat flavors with Maillard reaction.

Key words: yeast extract; free amino acid; determination method

酵母抽提物(又称酵母味素、酵母精, 英文名为 Yeast extract)是以蛋白质含量丰富、核酸含量高的食用酵母(一般是啤酒酵母和面包酵母)为原料, 采用生物技术, 将酵母细胞内的蛋白质核酸等进行降解后精制而成的天然调味料, 有粉状、膏状或液体状的产品。酵母抽提物中氨基酸种类较多, 故加入酵母抽提物有助于改善肉香风味。此外, 酵母抽提物中还含有功能性多肽谷胱苷肽、抗衰老活性因子、B 族维生素及磷、镁、锰、锌、硒等多种微量元素, 营养丰富, 而且来源丰富, 成本低。酵母抽提物在肉制品中有调鲜味平台的作用、美拉德反应相乘作用, 解决回味风味难题问题, 掩盖异味杂味等问题^[1-10]。

因此用酵母抽提物作为氨基酸源与还原糖进行 Maillard 反应制备肉味香精, 对降低生产成本、资源综合利用、绿色环保、促进国内肉味调味品的发展等方

收稿日期: 2012-04-07

基金项目: 粤港关键领域重点突破项目(2009A020700005); 广州市重大民生攻关项目(2011YZ-00016)

作者简介: 钱敏(1983-), 女, 助理实验师, 研究方向为食品化学

通讯作者: 白卫东(1967-), 男, 教授, 主要从事香精香料的开发和应用研究

面都能起到积极的作用。本文首先探索了酵母抽提物中氨基酸的测定方法^[11-13], 然后用高效液相色谱法测定了酵母抽提物热反应前后游离氨基酸的含量变化, 同时比较了其 HVP 粉(植物水解蛋白)、猪肉酶解物中游离氨基酸的种类和含量, 为酵母抽提物在肉味香精中的应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验原料

酵母抽提物(YE、型号 LB05): 湖北安琪酵母股份有限公司; 水解植物蛋白(HVP): 市售, 广州浩海贸易有限公司; 猪肉酶解物: 自制。

双蒸水(提前 1 d 蒸), 过膜; 6 mol/L NaOH;

流动相 A: pH 7.8 NaH₂PO₄ 缓冲溶液(0.04 mol/L);

流动相 B: 乙腈(ACN): 甲醇(MeOH): 水(40: 40: 20, V/V/V);

氨基酸标准溶液(Asp、Glu、Ser、His、Gly、Thr、Arg、Ala、Tyr、Cys、Val、Met、Phe、Ile、Leu、Lys); 衍生剂: OPA Reagent(conc.); 硼酸盐缓冲溶液, 均为安捷伦科技有限公司。

1.2 样品制备及处理

分别取酵母抽提物、水解植物蛋白 (HVP)、猪肉酶解物各 1 g, 加双蒸水定容至 100 mL, 取 40 mL 加活性炭 0.3 g, 轻摇后静置 20 min, 过滤, 过膜, 待测。

样品 1: 取 1.00 g 酵母抽提物, 用双蒸水溶解后再定容至 100 mL, 取 40 mL 加活性炭, 过滤, 过膜, 待测;

样品 2: 酵母抽提物 1.00 g, 双蒸水 10.00 g, 置于三角瓶中, 于高压灭菌锅中 105 °C 中反应 1 h, 反应完冷却至室温, 定容至 100 mL, 取 40 mL, 加活性炭, 过滤, 过膜, 待测;

样品 3: 酵母抽提物 1.00 g, 木糖 0.1000 g, 双蒸水 10.00 g, 置于三角瓶中, 于高压灭菌锅中 105 °C 中反应 1 h, 反应完冷却至室温, 定容至 100 mL, 取 40 mL, 加活性炭, 过滤, 过膜, 待测;

样品 4: 酵母抽提物 1.00 g, 木糖 0.1500 g, 双蒸水 10.0 g, 置于三角瓶中, 于高压灭菌锅中 105 °C 中反应 1 h, 反应完冷却至室温, 定容至 100 mL, 取 40 mL, 加活性炭, 过滤, 过膜, 待测。

1.3 测定条件

泵的设置: 流速: 1 mL/min、停止时间: 26 min、柱后时间: off (4 min); 色谱柱: ZORBAX Eclipse AAA, 150 mm×4.6 mm, 0.5 μm; 梯度程序: 时间/流动相 B (%): 0/0, 2.9/0, 19.1/57, 22.3/100, 23.2/0, 26/0, 结束时间 26 min, 后运行 15 min; 检测器: UV 338 nm; 柱温: 40 °C。

自动进样程序: 从 1 号瓶 (硼酸盐缓冲溶液): 抽取 2.5 μL; 从样品瓶 (2 号瓶为 AA 标准): 抽取; 在空气中混合 3 μL, 最大速度, 2 次; 等待 0.5 min; 从 31 号瓶 (未加盖, 水) 中清洗, 抽取 0 μL; 从 3 号瓶 (OPA): 抽取 0.5 μL; 在空气中混合 3 μL, 最大速度, 6 次; 从 31 号瓶 (未加盖, 水) 中清洗, 抽取 0 μL; 从 4 号瓶 (FMOC): 抽取 0.5 μL; 在空气中混合 4 μL, 最大速度, 6 次; 从 5 号瓶 (水) 中抽取 32 μL; 在空气中混合 18 μL, 最大速度, 2 次; 进样。

定性定量测定: 按照 16 种标准氨基酸的保留时间 (min) 对样品中氨基酸进行定性 (Asp: 1.938 min; Glu min: 4.088 min; Ser: 6.536 min; His: 7.453 min; Thr: 7.815 min; Gly: 7.965 min; Arg: 8.591 min; Ala: 9.243 min; Tyr: 10.469 min; Cys: 11.944 min; Val: 12.339 min; Met: 12.595 min; Phe: 13.827 min; Ile: 13.995 min; Leu: 14.665 min; Lys: 15.080 min); 再按不同浓度的混合标准氨基酸液进样, 外标法定量, 以含量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线并

得出回归方程。根据回归方程, 样品经处理后进样分析得出样品中各种游离氨基酸的含量。

2 结果与分析

2.1 氨基酸标准曲线的绘制

在本试验确定的色谱条件下, 分别以浓度为 0.10、0.30、0.50、0.70、0.90 nmol/mL 的混合氨基酸标准液进样量 20 μL, 得到色谱图如图 1 所示, 以峰面积外标法定量, 得到 16 种氨基酸的标准曲线, 如表 1 所示, 由相关系数 R 值 (R>0.9990) 可知, 各标准曲线的相关性良好, 可用于分离和检测样品中 16 种游离氨基酸。

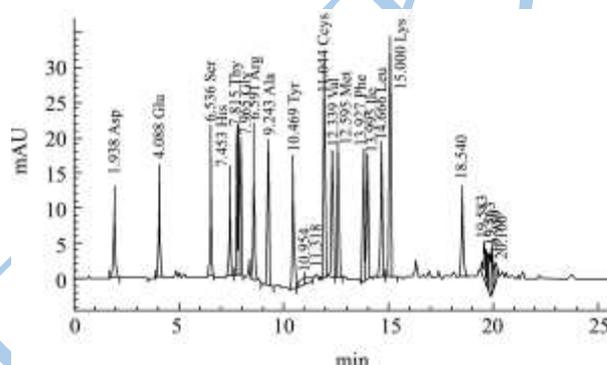


图 1 混合氨基酸标准色谱图

Fig.1 The standard chromatogram of mixed amino acids

表 1 16 种氨基酸的标准曲线

Table 1 The standard curve equations of 16 kinds of amino acids

氨基酸	标准曲线	R
Asp	$y = 7.24905x + 2.05788$	0.99915
Glu	$y = 6.11562x + 1.97048$	0.99923
Ser	$y = 9.80027x + 1.65773$	0.99957
His	$y = 3.51748x + 1.11679$	0.99934
Gly	$y = 1.36949x - 5.80951$	0.99963
Thr	$y = 8.38962x + 1.17088$	0.99902
Arg	$y = 6.99615x + 1.40920$	0.99935
Ala	$y = 1.16790x + 2.01130$	0.99933
Tyr	$y = 5.51363x + 1.36721$	0.99911
Cys	$y = 6.51074x + 1.39630$	0.99929
Val	$y = 8.39115x + 0.96225$	0.99937
Met	$y = 7.06399x + 1.44682$	0.99949
Phe	$y = 6.23591x - 1.05316$	0.99985
Ile	$y = 7.85063x + 7.01321$	0.99991
Leu	$y = 7.89093x + 7.36045$	0.99997
Lys	$y = 9.77625x + 1.33746$	0.99991

注: x 为氨基酸的质量(μg), y 为氨基酸的峰面积。

2.2 酵母抽提物、HVP 粉、猪肉酶解物中游离氨基

酸含量的测定

将各样品按照上述氨基酸色谱分析条件进行分析,依保留时间定性,分别得到酵母抽提物、HVP粉、猪肉酶解物的氨基酸测定色谱图,分别见图2、图3、图4,然后按各氨基酸的标准曲线计算进行定量,得到各氨基酸含量,见表2。

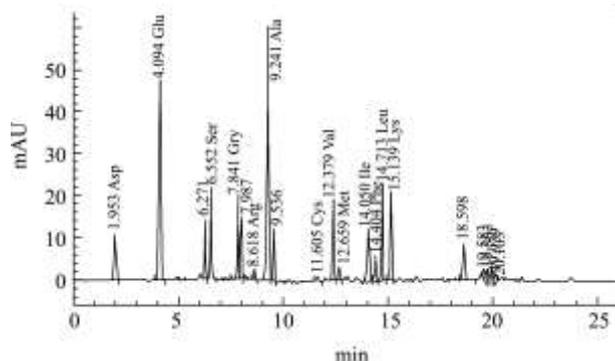


图2 酵母抽提物中游离氨基酸测定色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of free amino acids in yeast extract

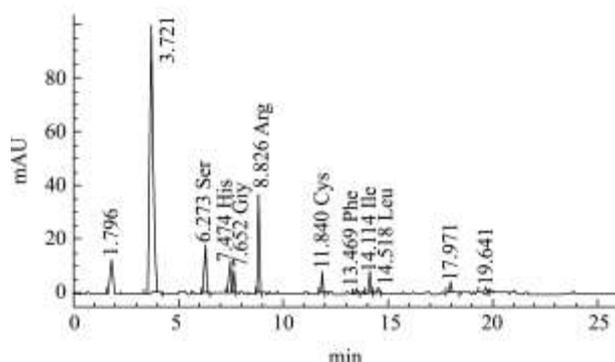


图3 HVP粉中游离氨基酸测定色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of free amino acids in hydrolyzed vegetable protein

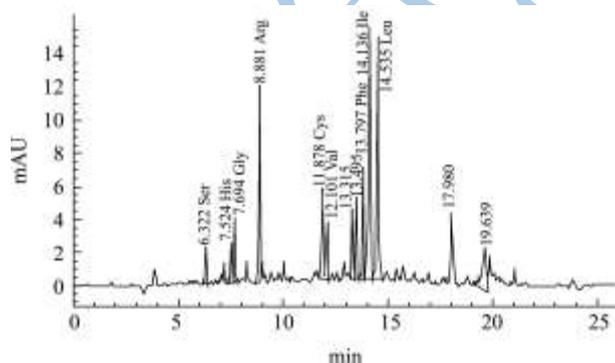


图4 猪肉酶解物中游离氨基酸测定色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of free amino acids in hydrolyzed pork

由表2可看出用此方法检测出酵母抽提物中游离氨基酸的种类和含量最多,共检测出14种氨基酸,总量达156.80 mg/g,其中对肉味产生贡献的Glu、Ala、Gly、Cys、Met总含量较高,达77.32 mg/g,占了氨

基酸总量的一半,Glu含量最多,其次是Ala、Leu等,比HVP粉中多出Asp、Glu、Thr、Ala、Val、Met、Lys七种氨基酸,比猪肉酶解物中多出Asp、Glu、Thr、Ala、Met、Lys六种氨基酸。可见,酵母抽提物中含有丰富的氨基酸可作为Maillard反应制备肉味香精的反应原料,可能对产生肉香味有重要贡献。

表2 酵母抽提物、HVP粉、猪肉酶解物中氨基酸种类及含量(mg/g)

Table 2 The types and contents of amino acids in yeast extract, hydrolyzed vegetable protein and hydrolyzed pork

氨基酸种类	酵母抽提物	HVP粉	猪肉酶解物
Asp	9.71	-	-
Glu	40.84	-	-
Ser	9.91	9.81	7.01
His	-	18.95	8.11
Thr	6.59	-	-
Gly	7.50	3.15	1.38
Arg	1.28	28.33	7.99
Ala	25.74	-	-
Tyr	-	-	-
Cys	1.00	6.32	3.96
Val	11.95	-	1.83
Met	2.24	-	-
Phe	5.57	0.69	5.25
Ile	9.06	5.44	9.77
Leu	15.24	0.90	8.79
Lys	10.17	-	-
总量	156.80	73.59	54.09

注:“-”表示痕量或没有检测到。

2.3 酵母抽提物在肉味香精中游离氨基酸的含量测定

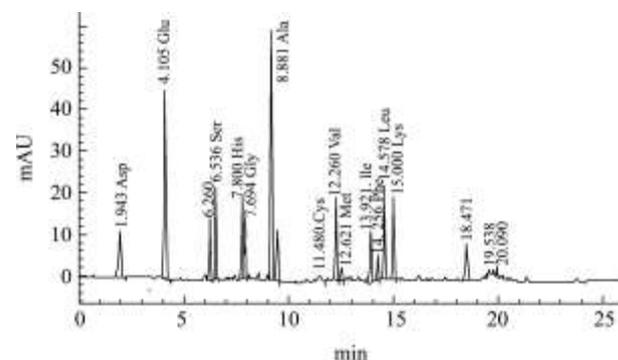


图5 样品2中游离氨基酸色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of free amino acids in sample 2

比较热反应前后氨基酸含量的变化,以及添加一定量还原糖后酵母抽提物中氨基酸的含量变化。经加热的酵母抽提物自身会发生一些化学反应,加入还原

糖后, 酵母抽提中的氨基酸可能与还原糖发生美拉德反应, 理论上游离氨基酸的含量会有所变化。

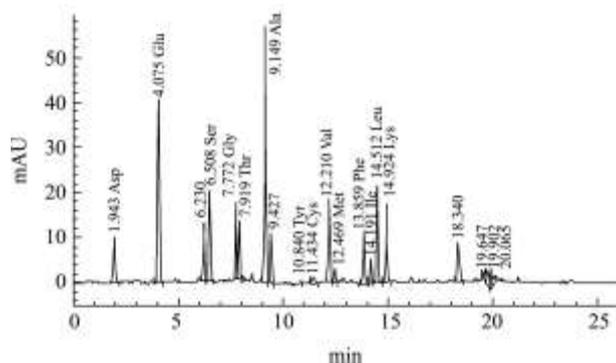


图 6 样品 3 中游离氨基酸色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of free amino acids in sample 3

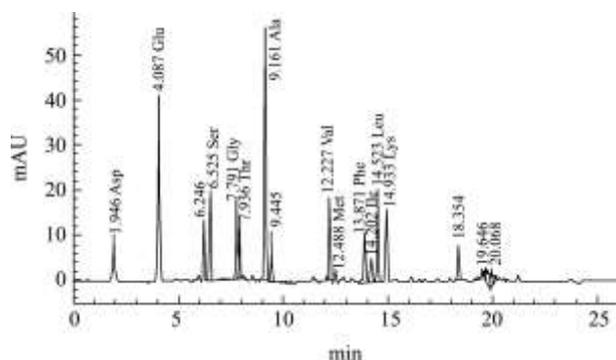


图 7 样品 4 中游离氨基酸色谱图

Fig.7 HPLC chromatogram of free amino acids in sample 4

表 3 样品 1-4 中各种氨基酸含量 (ng/μL)

Table 3 The content of the amino acid in sample 1-4

游离氨基酸	样品1	样品2	样品3	样品4
Asp	97.10	99.91	96.73	95.73
Glu	408.44	396.60	367.06	374.88
Ser	99.12	98.14	94.48	92.69
His	-	-	-	-
Thr	65.85	63.93	60.14	59.10
Gly	75.04	73.72	69.90	67.48
Arg	-	-	-	-
Ala	257.42	250.48	242.54	240.20
Tyr	-	-	-	-
Cys	-	-	-	-
Val	119.51	112.23	107.58	103.85
Met	22.39	-	-	-
Phe	55.68	54.27	110.33	97.35
Ile	90.64	86.34	41.44	39.57
Leu	152.41	147.90	151.05	137.59
Lys	101.70	92.07	90.51	80.35
总量	1491.90	1475.59	1431.76	1388.79

注：“-”表示痕量或无。

根据上面图的测定结果, 对照标准曲线, 定性定量测定出样品 1~4 的氨基酸含量。结果见表 3。

样品 1 即为热反应前酵母抽提物中游离氨基酸的测定结果见图 2、热反应后游离氨基酸测定结果见图 5、添加 1.00 g 木糖反应后游离氨基酸的测定结果见图 6; 加入 1.50 g 木糖反应后游离氨基酸的测定结果见图 7。

从表 3 数据看出: 酵母抽提物中的氨基酸是非常丰富的, 其中必需氨基酸所占比例为 40.77%。; 对肉味产生贡献的 Glu、Ala、Gly、Cys、Met 总含量较高, 占氨基酸重量的 59.17%, Glu 含量最多, 其次是 Ala、Leu 等; 热反应前酵母抽提物中的游离氨基酸含量最多, 达到 1491.9 ng/μL, 热反应后游离氨基酸含量有所减少, 其中 Met 减少最多, 随着加入还原糖(木糖)含量的增多, 游离氨基酸含量随着减少, 其中 Ile 减少最多。从数据分析可推断, 酵母抽提物经热反应时, 游离氨基酸与还原糖发生了反应。

3 结论

本论文采用高效液相色谱法测定酵母抽提物、猪肉酶解物、HVP 粉中游离氨基酸的含量, 并对酵母抽提物在肉味香精中游离氨基酸的含量进行了测定。得出结论: 酵母抽提物中游离氨基酸的种类和含量最多, 共检测出 14 种氨基酸, 总量达 156.80 mg/g, 其中对肉味产生贡献的 Glu、Ala、Gly、Cys、Met 总含量较高, 达 77.32 mg/g, 占了氨基酸总量的一半, 可见, 酵母抽提物中含有丰富的氨基酸可作为 Maillard 反应制备肉味香精的反应原料; 热反应后游离氨基酸含量相对于热反应前有所减少, 其中 Met 减少最多, 随着加入还原糖(木糖)含量的增多, 游离氨基酸含量随着减少, 其中 Ile 减少最多, 因此, 酵母抽提物经热反应时, 游离氨基酸与还原糖发生了反应。

参考文献

- [1] 安琪酵母股份有限公司. 酵母抽提物及其在食品行业中的应用—酵母抽提物研制与应用新进展[J]. 中国食品添加剂, 增刊:298-300
- [2] 张虹, 张宏, 毕丽君. 酵母抽提物的研究[J]. 中国调味品, 2000, 2: 20-23
- [3] 李祥. 酵母抽提物的生产及其在食品工业中的应用[J]. 中国调味品, 1998, 10: 5-7
- [4] 盛国华. 作为调料的酵母抽提物的特性和应用[J]. 中国调味品, 1995, 8: 2-5

- [5] 李沛,王昌楼,刘改芳,等.酵母抽提物及其在食品调味品行业中的应用[J].中国调味品,2005,7:10-12
- [6] Ames J A, Maclead G M. Volatile Components of a Yeast Extract Composition [J]. J. Sci. Food. Agri. 1985, 50: 125-128
- [7] Nagodawithana T. Yeast-Derived Flavor and Flavor Enhancers and Their Probable Mode of Action [J]. Food Technology. 1992, 11: 138-144
- [8] 钱敏,白卫东,蔡培钿,等.酵母抽提物的研究概况[J].肉类研究,2009,120(2):84-88
- [9] 黄松,王杰,丁婕,等.三七中十八种游离氨基酸的柱前衍生化-HPLC 法测定[J].中国医药工业杂志,2011,1:23
- [10] 江凌,田小群,朱明军,等.自溶-酶联技术制备啤酒废酵母抽提物工艺及产理化参数研究 [J].现代食品科技,2008,5: 444-447
- [11] 周玲,汪学荣,彭祥伟.鸭骨泥酶解条件优化及游离氨基酸组成分析[J].食品科技,2011,36(9):170-173
- [12] 程勇,陈玲,邓晓春.柱前衍生 HPLC 法测定烟叶中 20 种游离氨基酸含量[J].2010,277(8): 34-40
- [13] 胡红华,吴熙然,孙智平,等.DNFB 柱前衍生 RP-HPLC 法测定大蒜中蒜氨酸含量[J].现代食品科技,2009,25(2):198-220