

水产食品化学分析手册

万建荣 洪玉菁 奚印慈 吴光红 等编译

黄金陵 郑泽铤 审校



上海科学技术出版社

水产食品化学分析手册

万建荣 洪玉菁 等编译
奚印慈 吴光红 审校
黄金陵 郑泽铄

上海科学技术出版社

责任编辑 张雪娟

水产食品化学分析手册

万建荣 洪玉菁 奚印慈 吴光红 等编译

黄金陵 郑泽铨 审校

上海科学技术出版社出版、发行

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所经销 上海市印十二厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 27 字数 636,000

1993年4月第1版 1993年4月第1次印刷

印数 1—2000

ISBN 7-5323-2825-2/TS·234

定价: 26.00 元

(沪)新登字 108 号

编译者 (按姓氏笔划为序)

万建荣 中国水产科学研究院东海水产研究所
车文毅 江苏省商品检验局
冯秋星 中国水产科学研究院东海水产研究所
张金亮 青岛交洋食品有限公司
吴光红 江苏省淡水水产研究所
陈 琪 中国水产科学研究院东海水产研究所
赵志刚 上海施贵宝制药有限公司
洪玉菁 上海鱼品厂
姜丕耀 上海远洋渔业公司
秦建清 南通市商品检验局
夏松养 舟山海洋渔业公司
奚印慈 上海水产品加工技术开发中心

审校者

黄金陵 上海水产大学食品工程系
郑泽铎 上海第二医学院免疫研究室二室

序 言

为发展中国的水产加工事业,1986年以来,日本国际协力事业团负责向中国派遣日本专家、接受中国研究人员赴日本研修、无偿提供试验器材等,在上海水产品加工技术开发中心开展了日中技术协作研究,这种协作至今仍在继续之中。本书的几位编译者都参加了本技术协作并在日本接受了水产加工技术的研修,他们利用掌握的先进专业知识、技术、卓越的日语水平编译了此书,是中国水产加工界的一批生气勃勃的后起之秀。

本书几乎网罗了水产加工原料及制品品质测定的所有项目,是一本极好的专业书。对水产加工领域的研究人员、生产者、经营者来说,无疑是一本必备之书。我们期待着本书的出版能进一步促进中国的水产加工事业发展,扩大国际协作成果。

日本国际协力事业团
专家组组长 大西 登史良
1991年1月

は　じ　め　に

中国の水産加工の発展を目的として、1986年以来、上海水産加工センターにおいて日中共同のプロジェクト研究が実施され、現在なお継続中です。この間、日本国際協力事業団は、日本人専門家の中国への派遣、中国人研究者の日本への受入れ、機材の無償提供等の協力を行なってきました。本書の編訳に携わった諸氏は、何れもプロジェクトに参画し、日本で水産加工分野の技術研修を受け、専門の知識・技術に加え、卓越した日本語の語学力を有する新進気鋭の研究者達です。

本書は、水産加工原料及び製品の品質測定に関するほとんどすべての項目を網羅する専門書であり、水産加工分野における研究者、製造業者、流通業者にとって必携の書と云えます。本書の編訳出版により、中国水産加工の発展、さらには国際協力の成果が一層あがることを期待してやみません。

1991年1月

日本国際協力事業団

専門家チーム・リーダー 大西 登史良

前 言

近十年来,我国的渔业产量逐年增长,到1990年,我国的水产品总产量已超过日本而成为世界最大的渔业生产国。随着人民饮食生活水平的提高和“食品卫生法”的颁布实施,对食品的原料鲜度、加工产品的质量、添加剂的剂量要求越来越高,对生产环境等的监测控制越来越严。为此,在这方面所列课题越来越多,故迫切需要这方面的实验参考书。

以前,我国曾出版过一些有关生物化学、食品学分析实验技术的参考书,但以水产品原料或加工产品为对象的实验参考书则很少。而水产品与农、畜产品相比,又有很大的特异性,其实验分析并不能简单地套用农、畜产品的分析方法。另一方面,这几年来,国内外水产品的实验技术有了很大进展,实验方法逐步向仪器化、微量化、短时间、多样品及高精度的方向发展。随着一些新的实验手段的开发应用,也使从更微细构造上来研究鱼贝藻类的成分、机能成为可能。从这些方面来看,也急需这方面的参考书。故我们决定组织编译本书,介绍一些适用于水产食品的分析实验方法。

我们根据水产品的特点,选择一些必要的、比较先进的、从生物化学、食品化学和细菌学三个方面进行介绍。与一般的实验参考书相比,本书具有三个特点:首先,在每项实验之前,比较详尽地介绍实验原理;其次,对每项实验方法都列有实例;第三,篇后列出大量的引用的参考文献,以供读者按图索骥,进行更深入的探讨。本书可供水产食品学师生及科研生产单位研究分析人员参考。我们期望通过本书的出版发行,起到抛砖引玉的作用,推动我国水产食品实验分析技术的发展。

我们还要特别感谢日本国际协力事业团〔简称 JI(A)〕驻上海代表及 JI(A) 专家组, 为了协助中国水产加工业发展, 进一步扩大 JI(A) 与中方合作成果给予本书出版的支持与资助。感谢上海水产大学以黄金陵教授为首的对本书稿的仔细审阅, 提出许多宝贵修改意见, 提高了书稿质量。

限于编译者才疏学浅, 收集的资料有限, 加之本书从计划酝酿到出版发行, 时间较紧, 书中谬误之处在所难免, 敬请广大读者给予批评指正。

编译者

1992 年 1 月

目 录

I. 生物化学实验法

一、非蛋白氮成分定量时的组织提取液制备法	张金亮(2)
(一) 三氯醋酸法	(3)
(二) 高氯酸法	(4)
(三) 苦味酸法	(5)
(四) 钨酸法	(5)
(五) 醇法	(6)
参考文献	(7)
二、氨基酸的纸层析分析法	姜丕耀(8)
参考文献	(16)
三、鱼类肌肉 ATP 关连化合物的定量	洪玉菁(17)
(一) 连续浓度梯度离子交换柱层析法	(18)
(二) 核苷磷酸化酶及黄嘌呤氧化酶并用定量 H_xR 、 H_x	(22)
参考文献	(29)
四、肌苷、次黄嘌呤、尿酸及核苷酸的分离定量法	赵志刚(31)
(一) 离子交换柱层析法	(31)
(二) 反相分配液相色谱法(1)	(34)
(三) 反相分配液相色谱法(2)	(35)
参考文献	(36)
五、核酸系列化合物的纸层析与滤纸电泳	车文毅(37)
(一) 纸层析	(37)
(二) 滤纸电泳法	(43)
参考文献	(48)
六、核糖的 DEAE 纤维素纸层析分离定量法	夏松养(49)
参考文献	(54)
七、鱼类肌肉核酸的苯酚提取法	洪玉菁(55)
(一) 提取鱼肉核酸的苯酚法与甲基化白蛋白柱层析分离	(55)
(二) 核酸的定量	(62)
参考文献	(66)
八、脂肪的分析测定	莫印慈(67)
(一) 脂肪提取	(67)
(二) 脂肪的一般化学指标测定	(69)
(三) 氧化指标测定	(72)
参考文献	(75)
九、水产品油脂中有关成分的分离测定	莫印慈(77)

(一) 提取脂肪的分离·····	(77)
(二) 不皂化物的分离测定·····	(79)
(三) 脂肪酸的气相色谱测定法·····	(83)
参考文献·····	(86)
十、胡萝卜素的分离和测定·····	秦建清 (88)
参考文献·····	(90)
十一、聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳·····	万建荣 (91)
参考文献·····	(98)
十二、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	万建荣 (99)
参考文献·····	(104)
十三、淀粉凝胶电泳·····	奚印慈 (105)
参考文献·····	(111)
十四、蛋白质的凝胶过滤法·····	洪玉菁 (112)
参考文献·····	(123)
十五、鱼类组织中酶的提取与精制·····	吴光红 (124)
(一) 鱼类组织中酶的提取·····	(124)
(二) 鱼类组织中酶的精制·····	(127)
参考文献·····	(137)
十六、鱼肉肌原纤维的制备与观察·····	张金亮 (139)
(一) 肌原纤维的制备·····	(139)
(二) 肌原纤维的观察·····	(142)
参考文献·····	(144)
十七、鱼类肌肉蛋白质的制备·····	万建荣 (145)
(一) 肌动球蛋白的制备·····	(145)
(二) 肌球蛋白的制备·····	(147)
(三) 肌动蛋白的制备·····	(149)
(四) 调节系蛋白质的制备·····	(151)
参考文献·····	(151)
十八、鱼类肌肉蛋白质特性的测定·····	万建荣 (154)
(一) ATPase 活性的测定·····	(154)
(二) ATP 感度的测定·····	(158)
(三) 超沉淀的测定·····	(160)
(四) 肌动蛋白活性的测定·····	(161)
参考文献·····	(163)
十九、蛋白质的快速定量法·····	冯秋星 (165)
(一) 双缩脲法·····	(165)
(二) Folin-酚试剂法·····	(166)
(三) 紫外光吸收法·····	(168)
(四) 微量双缩脲法·····	(170)
参考文献·····	(172)
二十、蛋白质 SH 基的 DTNB 法测定·····	陈 琪 (173)
参考文献·····	(176)

二十一、蛋白质流动双折射简易测定	奚印慈 (177)
参考文献	(180)
二十二、鱼种及种属的免疫化学法鉴定	吴光红 (181)
(一) 抗原与抗体的概念以及免疫途径	(181)
(二) 双向免疫平板扩散法	(188)
(三) 红细胞凝集反应	(187)
参考文献	(188)

II. 水产食品学实验法

二十三、鱼肉鲜度的薄层层析简易测定法	吴光红 (192)
参考文献	(197)
二十四、鱼类鲜度 K 值的柱层析简易测定法	万建荣 (198)
参考文献	(202)
二十五、变性肌红蛋白的测定(金枪鱼肉)	车文毅 (204)
(一) 通过羧化同时定量测定 Fe^{2+} 型与 Fe^{3+} 型肌红蛋白	(204)
(二) 通过吸光比(E540/E503)测定变性肌红蛋白	(206)
参考文献	(208)
二十六、鱼肉氧化三甲胺、三甲胺的简易测定法	奚印慈 (209)
(一) 鱼肉中氧化三甲胺、三甲胺的微量扩散定量法	(209)
(二) TMA-N 特效电极测定法	(211)
参考文献	(213)
二十七、三甲胺自动分析法	洪玉菁 (214)
参考文献	(217)
二十八、鱼肉三甲胺成分的气相色谱定量法	洪玉菁 (218)
参考文献	(221)
二十九、组胺离子交换层析	张金亮 (222)
(一) 离子交换技术的基础知识	(223)
(二) 组胺的测定方法	(223)
参考文献	(226)
三十、仲胺的定量检测法	赵志刚 (227)
(一) 二硫代氨基甲酸铜比色法——改良法	(227)
(二) 仲胺的气相色谱定量法	(230)
(三) 高压液相色谱法	(233)
参考文献	(234)
三十一、亚硝酸根的定量检测法	赵志刚 (235)
(一) 比色法	(235)
(二) 气相色谱法	(237)
(三) 荧光测定法	(239)
参考文献	(241)
三十二、二甲基亚硝胺的定性定量	秦建清 (242)
(一) 薄层层析法	(242)

(二) 气相色谱法(GLC).....	(247)
(三) 气-质联用法	(250)
参考文献	(252)
三十三、挥发性有机酸的柱层析法	车文毅 (253)
参考文献	(256)
三十四、维生素 B ₂ 的定量	夏松养 (257)
参考文献	(260)
三十五、水分活度的测定	陈 琪 (261)
(一) A _w 测定仪法.....	(261)
(二) 平衡蒸汽压法.....	(264)
参考文献	(271)
三十六、鱼糜制品中淀粉的定量法	夏松养 (273)
参考文献	(276)
三十七、亚硫酸盐的定量法	秦建清 (278)
(一) 盐酸副玫瑰苯胺比色法 ^[1,2]	(278)
(二) 康维皿微量扩散法 ^[3,4]	(280)
(三) 改进的兰金法 ^[5]	(281)
参考文献	(282)
三十八、水产食品中过氧化氢的定性及定量分析	车文毅 (283)
(一) 鱼糜制品测定.....	(283)
(二) 青鱼子测定.....	(287)
参考文献	(288)
三十九、水产品中多氯联苯的测定	秦建清 (289)
(一) 气相色谱法.....	(289)
(二) 薄层层析法.....	(296)
参考文献	(297)
四 十、水产品中汞的测定.....	吴光红 (298)
参考文献	(301)
四十一、水产品组织化学的观察	张金亮 (302)
(一) 组织标本的制作方法.....	(302)
(二) 组织标本的观察.....	(305)
参考文献	(307)
四十二、鱼类异尖线虫亚科幼虫的观察与鉴定	姜丕耀 (308)
(一) 由荧光抗体法来确认幼虫存在的方法.....	(308)
(二) 幼虫分离法.....	(309)
(三) 识别法.....	(311)
(四) 活力测定法.....	(313)
参考文献	(314)
四十三、水产食品中还原糖的测定方法.....	冯秋星 (316)
(一) 高锰酸钾法.....	(316)
(二) 直接热滴定法.....	(318)

(三) 碘量法(测定醛糖).....	(326)
参考文献	(327)
四十四、水产食品中苯甲酸、山梨酸的测定方法	赵志刚 (328)
(一) 苯甲酸及其盐的测定	(328)
(二) 山梨酸及其盐的测定 ^[43]	(331)
(三) 苯甲酸和山梨酸的定性及定量法——气相色谱法.....	(333)
参考文献	(335)
四十五、水产食品中 BHA、BHT 的测定方法	莫印慈 (336)
(一) 薄层层析定性法.....	(337)
(二) 气相色谱定量法.....	(339)
参考文献	(341)
III. 细菌学实验法	
四十六、水产食品中活菌数和耐热性菌数的检验方法.....	万建荣 (344)
(一) 活菌数的标准琼脂平板培养法.....	(344)
(二) 耐热性细菌(芽孢菌数)检验法 ^[13]	(347)
参考文献	(348)
四十七、水产食品中大肠菌群及大肠菌检验	万建荣 (349)
(一) 大肠菌群的脱氧胆酸盐乳糖培养基混释平板检验法.....	(349)
(二) 大肠菌群和大肠菌的最可能数值检验法.....	(350)
(三) 大肠菌群的 IMVie 分类试验法	(356)
(四) 革兰氏(Gram's) 染色法与芽孢染色法	(357)
(五) 大肠菌的 E.C 试验法检验 ^[2,8]	(359)
参考文献	(361)
四十八、低温细菌的检验.....	莫印慈 (362)
(一) 标准低温细菌检验测定法.....	(362)
(二) 迅速简易的低温细菌检验测定法.....	(363)
(三) 用选择性培养基的低温细菌检验测定法.....	(364)
(四) 分离细菌最适温度的测定.....	(366)
参考文献	(368)
四十九、沙门氏菌的检验方法	洪玉菁 (369)
(一) 平板计数法(Conradi 法) ^[13]	(370)
(二) 确定试验的方法.....	(370)
(三) 最可能数计数法(MPN 法) ^[13]	(375)
(四) 荧光抗体筛选检验法.....	(375)
参考文献	(378)
五十、厌氧菌的气体喷射培养法	吴光红 (379)
参考文献	(386)
五十一、细菌芽孢的制备与培养	张金亮 (388)
(一) 芽孢的制备方法.....	(388)
(二) 芽孢发芽率的研究.....	(391)
参考文献	(394)

附录	(395)
(一) 氨基酸的一些物理常数	(395)
(二) 某些蛋白质的物理性质	(397)
(三) 核苷、核苷酸及其衍生物的一些物理常数	(397)
(四) 层析法常用数据表	(403)
(五) 离心机转数 r/min 与相对离心力(RCF)的换算	(406)
(六) 试剂的配制及一些常用数据表	(406)
(七) 化学名称的缩写	(412)

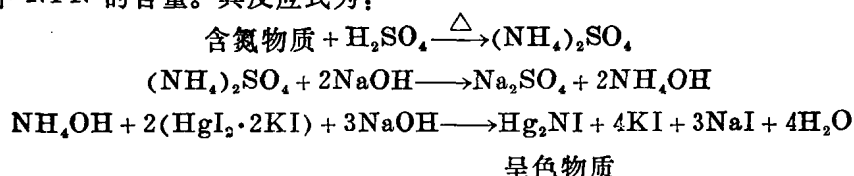
I

生物化学实验法

一、非蛋白氮成分定量时的组织提取液制备法

非蛋白氮(Nonprotein nitrogen,简称 NPN)是指除去试料中蛋白质以后所测得的 剩余含氮物质中的氮。

测定非蛋白氮的含量是使含氮物质与硫酸共热,生成硫酸铵。硫酸铵与氢氧化钠作用,产生氢氧化铵和硫酸钠。在有氢氧化钠存在的条件下,氢氧化铵与奈氏试剂(Nessler's reagent,含 HgI_2 和 KI)作用产生碘化二汞铵溶液。碘化二汞铵溶液呈黄色,用比色法可测出试料中 NPN 的含量。其反应式为:



呈色物质

对非蛋白氮定量时,操作的关键就是组织提取液的制备。为了除去试料中的蛋白质,又要尽量不将非蛋白含氮物质沉淀,这就需要对不同的试料、不同的测定目的,选用不同的去除蛋白质的方法。

去除蛋白质的方法很多,但其最基本的原理是利用多数蛋白质是亲水性胶体,当其稳定因素被破坏,或与某些试剂结合成不溶解的盐后,即产生沉淀,再经过滤或离心分离制得非蛋白含氮物的组织提取液。

非蛋白氮又可称为“抽提液氮”。由于测定非蛋白氮时,都是先使样品中的蛋白质沉淀,而含非蛋白氮的物质是呈溶解状态,留在溶液中。所以,也有些人,称此为“可溶性氮”,但这种提法并不太恰当。

非蛋白氮包括游离氨基酸、肽、碱(生物碱)、氧化三甲胺、肌酸、肌酸内酰胺、核苷酸等成分。这些成分与食品的味道、褐变、腐败等有很密切的关系,因此,非蛋白氮的测定有其重要的实用意义。在本篇中,仅就对非蛋白氮定量时,组织提取液的制备方法介绍一下。

制备非蛋白氮组织提取液时,首先应考虑以下两方面的因素。众所周知,鱼肉、加工食品等样品制备非蛋白含氮物组织提取液时,均要首先除去样品中的蛋白质。为此,可使用乙醇、丙酮、钨酸、苦味酸、三氯醋酸、高氯酸、磷钨酸、氢氧化铁、氢氧化铜等蛋白质沉淀剂;也可利用加热(热水提取)、透析、超滤等处理方法。由于蛋白质沉淀剂有如此多样,而每一种沉淀剂所适用的范围又有差别,测定非蛋白氮的目的也不大相同,因而使得选择蛋白质沉淀剂和去除蛋白质的处理方法就变得非常复杂而困难。不过,从选用最普遍性的方法出发,一般制备非蛋白含氮物组织提取液必须考虑以下事项:(1)各种蛋白质沉淀剂和各种去除蛋白质的处理方法,对蛋白质的去除能力各有不同,因此要根据需要,选择与所测组分相适应的沉淀剂和方法。尤其是在已知试料组成成分的时候;(2)过剩的沉淀剂对定量结果有否影响。若有影响,就要探讨在制得的提取液中,如何去除沉淀剂的方法。

各种非蛋白含氮物组织提取液制备方法中,有热水提取法、钨酸法、三氯醋酸法、高氯酸

法、苦味酸法等,已有许多研究者,在这方面探讨过其去除蛋白质的效果和对组织提取液组分的分析。

Saifer^[1]在定量人脑中游离氨基酸时,试用了57%乙醇法、丙酮·盐酸法、氯仿·乙醚(1:1)法、三氯醋酸法、磺基水杨酸法以及苦味酸法和高氯酸法。由上述方法制得的提取液中,游离氨基酸组分的测定结果表明,高氯酸法对游离氨基酸的提取效果较好;用75%乙醇法、丙酮·盐酸法以及氯仿·乙醚法的提取液中,碱性氨基酸含量较低;由三氯醋酸法及磺基水杨酸法制得的提取液,其游离氨基酸含量与高氯酸法大致相同;但苦味酸法所得提取液中,碱性氨基酸的含量稍低。

日本的森^[2]等人对盐渍鲑鱼试用了热水提取法、钨酸法和三氯醋酸法,制得的组织提取液,用微生物法对其中的游离氨基酸进行了定量。结果表明,甘氨酸、亮氨酸、色氨酸、赖氨酸的含量,在用钨酸法的组织提取液中稍高;苏氨酸的含量在三氯醋酸提取液中稍高;而用热水提取时,组织提取液中酪氨酸的含量稍高。由于考虑到微生物法定量的误差较大,且上述几种方法中,各氨基酸含量的差别又不是太大,因而可得出的结论是:三种方法的效果大致一样。

在上述游离氨基酸的定量测定时,需特别注意组织提取液中肽对测定结果的影响。提取液在加水分解前与加水分解后,其游离氨基酸含量的差值,就是构成肽的氨基酸量。通过大量实验,人们得知,钨酸法提取液中,肽的含量少;而用热水提取法所得的提取液肽的含量较高。

当然,也要注意蛋白质的种类不同,与蛋白质沉淀剂的结合能力也有所不一样。Gorbach^[3]等对酪蛋白、血纤维蛋白、卵蛋白、麻仁球蛋白分别用磷钼酸、磷钨酸、三氯醋酸及氟化钙等蛋白质沉淀剂,测出了它们各自的沉淀率如表1-1所示。由此可看出,磷钼酸对各种蛋白质都有较高的沉淀率,磷钨酸仅次于磷钼酸。同时,也可看出,钨酸和氟化钙对卵蛋白,三氯醋酸对血纤维蛋白及卵蛋白的沉淀率相当低。

表 1-1 各种蛋白质沉淀剂的沉淀率(%)

	磷 钼 酸	磷 钨 酸	钨 酸	CaF ₂ *	三氯醋酸
酪蛋白	99.54	98.16	90.63	98.60	97.45
血纤维蛋白	99.78	94.05	98.89	98.89	61.72
卵蛋白	99.46	96.31	79.33	65.22	60.71
麻仁蛋白	99.13	99.12	99.56	97.63	99.63

* 0.65%NaF 5ml+ 3%CaCl₂ 2ml。

现将各种非蛋白含氮物组织提取液制备方法介绍如下。

(一) 三 氯 醋 酸 法

【原理】

三氯醋酸为有机酸。蛋白质分子在三氯醋酸溶液中,其分子内部结构,尤其是空间结构遭到破坏,使蛋白质分子由亲水胶体变为疏水胶体而沉淀。该沉淀是不可逆的沉淀。

用三氯醋酸法去除蛋白质,制备组织提取液时,常用于测定非蛋白氮、氨基酸、肌酸、挥发性盐基氮、氧化三甲胺等的研究。它对各种蛋白质的沉淀率如前所述。该法对动物胶、鱼