

贻贝粉酶解液中系统提取分离氨基酸

叶 眉 徐家敏

(青岛海洋大学食品工程系, 青岛 266003)

摘 要 本文报道了以脱脂贻贝粉为原料, 采用酶解法从其酶解液中分离、提取及纯化复合氨基酸和六种单一氨基酸的工艺。确定了贻贝粉以胃蛋白酶、枯草杆菌中性蛋白酶和胰蛋白酶联合的酶解工艺, 采用超滤方法去除酶解液中未水解的蛋白质等大分子物质及进行脱色处理。将超滤液通过701[#][CO⁻]型碱性阴离子交换树脂及[H⁺]型1×25强酸性阳离子交换树脂脱盐, 得到的脱盐液经真空浓缩、结晶、洗涤和烘干得复合氨基酸粉末, 得率为20%左右(相对于贻贝粉, w/w, 下同)。将超滤液通过活性炭柱吸附苯丙氨酸和酪氨酸, 再用洗脱液洗下, 经浓缩、结晶、洗涤和烘干得单一氨基酸成品, L-苯丙氨酸得率为2.45%, L-酪氨酸得率为1.21%。活性炭柱的通过液经732强酸性阳离子交换树脂柱及717强碱性阴离子交换树脂柱组吸附、分离、洗脱得纯L-精氨酸组分、纯L-谷氨酸组分、L-亮氨酸及L-缬氨酸组分。再经赶氨、浓缩、结晶、洗涤和烘干得成品, 得率分别为3.01%、1.02%、1.46%及1.34%。单一纯化的氨基酸产品, 经氨基酸自动分析仪定性、定量测定及红外光谱分析和通过自动指示旋光仪测定其比旋度进行鉴定, 证实确为本物质。复合氨基酸产品中游离氨基酸含量为90.9%, 灰分占0.38%; L-苯丙氨酸产品纯度93.3%, 灰分1.4%; L-酪氨酸产品纯度80.2%, 灰分0.9%; L-谷氨酸产品纯度90.6%, 灰分1.1%; L-亮氨酸产品纯度88.3%, 灰分1.4%; L-缬氨酸产品纯度87.8%, 灰分1.2%; L-精氨酸产品纯度92.7%, 灰分1.8%。可见, 尽管氨基酸得率不高(主要由分离操作造成), 但纯度高, 含盐量低, 质量优异。

关键词 贻贝粉, 酶解, 分离, 提取, 氨基酸

前 言

我国氨基酸制剂的研究起步较晚, 早期大多采用从蛋白质水解液中分离提取, 且多用酸解法, 现已有大规模的发酵法及酶解法代替酸碱水解蛋白质的生产方法。1981年, 上海、天津先后研究制成结晶氨基酸输液产品, 并利用鱼蛋白水解制成口服要素膳^[3]。至今我国已有多种结晶氨基酸输液和口服氨基酸制剂投入生产, 但与国际先进水平相比仍有差距, 需要对

收稿日期: 1994-09-23。

我国氨基酸原料和制剂生产进行进一步的研究。

开发海洋, 充分利用海洋资源是当今科技发展的重要方向, 而贻贝这种海产贝类以其优质的天然蛋白质、丰富的资源和低廉的价格引起许多学者的重视。传统的贻贝加工方法包括制罐、烘干及冷冻等, 现已发展到浓缩蛋白贻贝油及以贻贝为主要原料的滋补营养品。在贻贝的成分分析, 药理作用及营养评价等方面也进行了较多的研究^[1,2]。

本文从精加工、深加工的角度入手, 利用贻贝提取脂肪后的剩余副产品贻贝粉, 以酶法水解蛋白质, 克服了酸碱水解中盐分高、氨基酸消旋等缺点; 用超滤法去除酶解液中未水解的蛋白质及其它大分子物质和脱色, 克服了用活性炭脱色吸附使产品中总氨基酸含量降低的缺点。这种利用蛋白酶将贻贝蛋白转化为氨基酸的工艺, 不仅使贻贝的蛋白质得以充分开发利用, 而且也为医药保健, 化工及日常生活所需氨基酸提供了一个良好的来源。

材 料 与 方 法

(一) 原料和试剂

1. 原料贻贝粉 贻贝综合利用提取脂肪后剩余物质经干燥粉碎制得。

2. 酶制剂

a 胃蛋白酶 上海长城生化制药厂出品, 酶活力 1: 3,000。

b 枯草杆菌中性蛋白酶 AS1.398 山东沂水皮革酶制剂厂, 酶活力 45,000 UI/G。

c 胰蛋白酶 Difco 进口分装, 酶活力 1: 25。

3. 粉状活性炭、硅藻土、无水乙醇、磺基水杨酸、茚三酮、浓盐酸、氢氧化钠、浓硫酸、苯甲酸钠、氨水; 均为 A. R.; 95% 乙醇: 工业级。

4. 氨基酸标准样品 HITACHI 公司出品。

5. 732 强酸性乙烯系阳离子交换树脂、717 强碱性乙烯系阴离子交换树脂、701 弱碱性环氧系阴离子交换树脂 上海树脂厂出品。

[H⁺]型 1×25 强酸性阳离子交换树脂 中科院上海药物研究所抗菌素研究室提供。

6. 超滤膜 德国 Kalle 公司出品, UF-PS-200H/PP 100, UF-PES-8/PP 100, UF-PS-4/PP 60。

(二) 设备

501 型超级恒温水浴, D60-2P 型电动搅拌机, LG10-3 型高速冷冻离心机, 岛津 AEL-403M 型电子分析天平, pH S-2 酸度计, 日立 835-50 型氨基酸自动分析仪, 2.0×5.0 cm 及 2.5×60cm 交换柱, WD-1 蠕动泵, H-60 型超滤器, ZFQ85A 型旋转蒸发器, 0260 型电动真空干燥箱, Nicolet-750 型红外光谱仪, WZZ 型自动指示旋光仪。

(三) 实验步骤

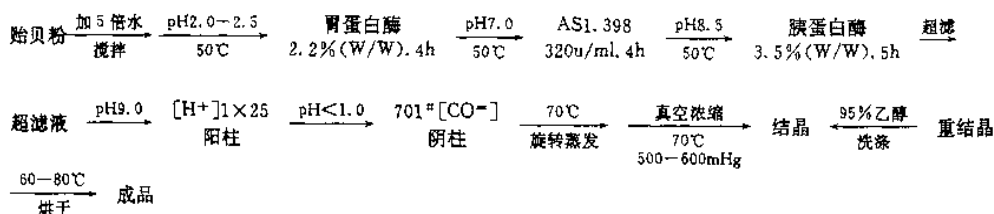
1. 取 100g 贻贝粉加 5 倍水浸泡, 搅拌, 加 0.1% 苯甲酸钠防腐, 通过正交实验获得酶解的最佳条件为^[1,2,4,7]: 胃蛋白酶, pH2.0-2.5, 温度 50℃, 加量 2.2% (W/W, 相对与贻贝粉, 下同), 水解 4hr; 枯草杆菌中性蛋白酶 (AS1.398), pH7.0, 温度 50℃, 加量 320u/ml, 水解 4hr; 胰蛋白酶, pH8.5, 温度 50℃, 加量 3.5%, 水解 5hr。待酶解完毕后, 加热升温至 80℃10min 使酶失活, 离心分离酶解液得清液。

2. 将上述清液用 H-60 型超滤器进行超滤^[8,18], 使用 UF-PS-200H/PP 100, UF-PES-8/PP 100, UF-PS-4/PP 60 膜得到浅棕黄色超滤液。

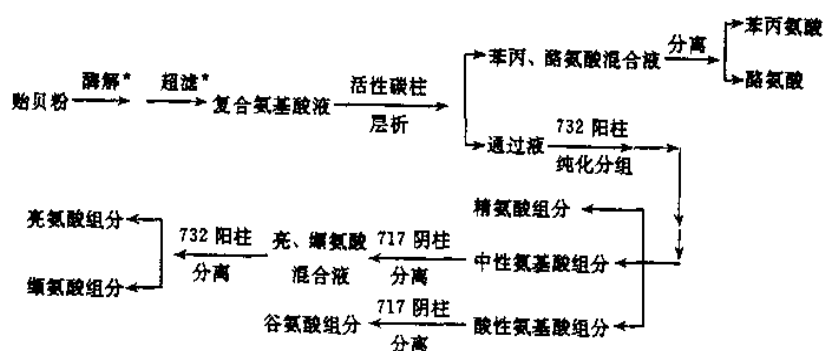
3. 将最终超滤液调 pH9.0 上 $[H^+]$ 型 1×25 强酸性阳离子交换树脂柱, 流出液 pH2—3, 调 pH1 以下, 上 $701^{\#}$ $[CO^-]$ 型碱性阴离子交换树脂, 流出液 pH7—8, 进行脱盐^[12]。
4. 复合氨基酸的脱盐液首先用 ZFQ85A 旋转蒸发器在 70℃ 进行旋转蒸发, 浓缩到一定体积, 此时没有结晶物出现, 再在电热真空干燥箱中, 70℃, 真空度 500—600mmHg 进行真空浓缩, 至氨基酸结晶完全。
5. 活性炭于 150℃ 下烘烤 4—5 小时去除气体, 加水浸泡 1 小时, 与等量硅藻土打浆装柱。超滤液上活性炭柱吸附苯丙氨酸及酪氨酸, 用水洗柱, 再用 1M 氨水洗脱收集出现茚三酮反应的流出液, 直到茚三酮反应消失。将洗脱液浓缩赶氨, 调 pH3—4^[9,13], 加 0.2% 活性炭脱色^[9,11], 过滤, 滤液冷至室温, 冰箱内 4℃ 下放置 2 天, 析出固体, 过滤得酪氨酸, 再重结晶一次, 用无水乙醇洗涤, 烘干得成品, 母液浓缩结晶, 得苯丙氨酸, 再重结晶一次, 洗涤, 60℃ 烘干得成品。
6. 活性炭柱不吸附部分上两根串联 732 阳树脂柱至饱和, 用蒸馏水冲柱至中性, 拆开二柱, 分别再串一根 732 阳柱, 1 号柱及再串柱用 0.05M 氨水洗脱, 用自动部分收集器收集每管 5ml, 收集茚三酮反应的流出液至 pH7, 再用 0.1M 氨水洗脱, 收集到 pH11, 最后用 2M 氨水洗出精氨酸, 至流出液茚三酮反应消失为止; 2 号柱及串联柱用 0.1M 氨水洗脱, 当洗脱液出现茚三酮反应时, 用自动部分收集器收集每管 5ml, 收集至茚三酮反应消失, 洗脱液经氨基酸自动分析仪分析, 分别合并酸、中性及精氨酸的组分^[10,14]。
7. 将酸性组分调 pH5—6, 上两根串联 717 阴柱至饱和, 用蒸馏水冲洗至 pH8, 再分别串联两根 717 阴柱, 用 0.1M HCl 洗脱, 至出现茚三酮反应, 用自动部分收集器收集, 每管 1.5—2.0 ml, 至茚三酮反应消失, 洗脱液经氨基酸自动分析仪分析, 合并谷氨酸组分^[10]。
8. 将 732 阳柱分得的中性氨基酸组分, 以 NaOH 调 pH8—8.5 上一根 717 阴柱至饱和, 再串联三根 717 阴柱, 用蒸馏水冲洗至 pH8, 用 0.1M HCl 洗脱, 以自动部分收集器收集, 每管 5ml, 收集至茚三酮反应消失, 经氨基酸自动分析仪分析合并的缬氨酸、亮氨酸为主的组分。
9. 将亮、缬为主的组分, 调 pH3.5—4.0, 上三根串联 732 阳柱至饱和, 用 0.1M NH_4Cl 洗脱, 按分离谷氨酸的方法洗脱和收集洗脱液, 洗脱液经氨基酸自动分析仪分析无缬氨酸时改用 0.1M NH_3-NH_4Cl 洗脱亮氨酸, 将洗脱液进行氨基酸分析, 合并亮氨酸、缬氨酸^[10]。
10. 将纯精氨酸、谷氨酸、亮氨酸、缬氨酸组分进行赶氨、0.2% 活性炭脱色、过滤、滤液浓缩、结晶、95% 乙醇洗涤、60—80℃ 烘干 4—6 小时得成品。
11. 将由上述工艺分离的六种单纯氨基酸样品用 Nicolet-750 型红外光谱仪测定结构及 D, L 构型^[5,6], 与标准谱图对照^[19]; 用 WZZ 自动指示旋光仪测定旋光度^[15], 计算比旋光度, 与标准对照^[20]; 用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪定性、定量分析, 测定保留时间, 与标准氨基酸保留时间对照进行定性测定, 测定峰面积以确定样品的纯度和复合氨基酸的氨基酸组成。

(四) 工艺流程

1. 提取复合氨基酸的工艺流程



2. 氨基酸分离工艺流程



结 果 与 讨 论

1. 本文联合采用酶解法、超滤法及离子交换树脂层析法从贻贝粉中提取分离多种氨基酸, 其得率、纯度见表 1。

表 1 各种产品的有关测定数据

Table 1 The conversion, purity and ash content of several Amino Acids

氨基酸 Amino acid	游离氨基酸纯度(%) Free amino acid (%)	灰分(%) Ash %	得率(%, W/W, 相对于贻贝粉) Conversion (%)
L-酪氨酸 Tyr	80.2	0.94	1.21
L-苯丙氨酸 Phe	93.3	1.42	2.05
L-谷氨酸 Glu	90.6	1.08	1.02
L-缬氨酸 Val	87.8	1.17	1.34
L-亮氨酸 Leu	88.3	1.39	1.46
L-精氨酸 Arg	92.7	1.81	3.01
复合氨基酸 Mixed amino acid	90.9	0.38	20.00

由表 1 可见, 样品氨基酸纯度较高, 灰分都低于 2%, 其中脱盐后的复合氨基酸灰分只有 0.38%。

本文采用酶法水解, 不仅使水解时间减少而且使工作条件有所改善, 并且酶解液的含盐量大大降低, 不必进行酸水解的脱酸过程。本实验采用超滤方法去除未水解蛋白质及其它大分子物质, 不仅使在真空浓缩过程中不起泡, 还使混合氨基酸纯度大大提高; 其分子量分级浓缩物大多为糖类, 进一步研究确定其中含有粘多糖等活性物质。

本实验中复合氨基酸产品氨基酸含量为 90% 左右, 比不去除未水解蛋白质等大分子物质而直接获得的复合氨基酸的纯度(70—80%) 高。

采用 732 阳离子交换树脂和 717 阴离子交换树脂对复合氨基酸进行分离得到六种氨基酸, 但得率不高, 主要原因在于实验所用的树脂柱较短且细、体积小, 使交换容量有限, 氨基酸分离效果不很理想, 可望进一步得到改进。

2. 鉴定结果

(1) 红外光谱法^[16,17](标准谱图查对法)及旋光度测定法

六种单一氨基酸样品经红外光谱分析, 与相对的六种氨基酸标准红外谱图^[19]进行对照, 各样品具有典型的其标准品特征吸收, 其谱图(波形、波数、峰宽、峰强)与标准红外谱图一致; 并均为 L 型氨基酸。并分别测定旋光度, 与标准比旋光度^[20]对照, 结果见表 2。

表 2 六种氨基酸比旋度鉴定结果

Table 2 The specific rotatory power of the six amino acids

	苯丙氨酸 L-Phe	酪氨酸 L-Tyr	谷氨酸 L-Glu	缬氨酸 L-Val	亮氨酸 L-Leu	精氨酸 L-Arg
标准比旋度 Standard specific rotatory power [α] _D ²⁰	-34.90°	-10.60°	+31.40°	+22.90°	-10.42°	+12.5°
比旋度 Specific rotatory power [α] _D ²⁰	-33.96°	-9.83°	+30.84°	+22.08°	-10.81°	+11.85°

从表 2 可以看出, 各种氨基酸其比旋度也与标准比旋度相符, 其差异是由于样品不纯造成的。并确定其左、右旋。

(2) 样品定性、定量分析

实验得到的混合氨基酸和六种氨基酸样品在 835-50 型氨基酸自动分析仪上进行定性、定量测定, 将样品谱图与标准谱图对照, 通过比较保留时间进行定性测定(见表 3), 证实六种单一氨基酸确为本物质, 其纯度如表 1 所示。复合氨基酸的氨基酸组成见表 4。

表 3 六种单纯氨基酸保留时间的测定结果

Table 3 The reservation time of six individual amino acids

氨基酸 Amino acid	样品保留时间(min) Reservation time (min)	标准保留时间(min) Standard reservation time (min)
L-酪氨酸 Tyr	31.90	31.94
L-苯丙氨酸 Phe	30.44	30.54
L-谷氨酸 Glu	14.18	13.98
L-缬氨酸 Val	23.50	23.50
L-亮氨酸 Leu	28.53	28.67
L-精氨酸 Arg	47.88	48.24

由表 3 可见, 样品保留时间同标准保留时间基本一致, 从而定性鉴定确为其物质。

表 4 复合氨基酸的氨基酸组成

Table 4 The analysis of amino acids in the amino acid mixture

氨基酸 Amino acid	含量(%) Content (%)	氨基酸 Amino acid	含量(%) Content (%)
天门冬氨酸 Asp	1.26	异亮氨酸 Ile [*]	3.74
苏氨酸 Thr [*]	1.92	亮氨酸 Leu [*]	9.58
丝氨酸 Ser	1.67	酪氨酸 Tyr	7.34
谷氨酸 Glu	3.11	苯丙氨酸 Phe [*]	16.48
甘氨酸 Gly	2.25	赖氨酸 Lys [*]	12.31
丙氨酸 Ala	3.13	组氨酸 His	0.43
缬氨酸 Val [*]	7.86	精氨酸 Arg	16.19
蛋氨酸 Met [*]	2.73		
合 计 Total %	90.90		

* 表示必需氨基酸

Essential amino acid

由表 4 可见, 必需氨基酸(不计色氨酸)占复合氨基酸总量的 55.12%, 复合氨基酸纯度达 90.90%。

结 论

1. 本文以脱脂贻贝粉为原料, 确定了胃蛋白酶, 枯草杆菌中性蛋白酶和胰蛋白酶联合的酶解工艺, 首次采用超滤方法去除酶解液中未水解的蛋白质等大分子物质及进行脱色处理。确定了活性炭柱, 732[#] 阳离子及 717[#] 阴离子柱系统分离制备多种氨基酸的方法。
2. 提取了复合氨基酸和六种单纯氨基酸, 经 IR 分析和比旋度测定及氨基酸自动分析仪分析, 六种氨基酸确为其物质。本工艺为氨基酸的需求提供了新的来源, 同时解决了贻贝粉的综合利用问题, 有一定的经济和实用价值。
3. 结合原料特点, 设计工艺路线, 将新方法与传统工艺相结合, 产品质量好、纯度高, 复合氨基酸种类齐全, 适用于饲料、食品方面等氨基酸强化和添加使用, 并可应用于医药原料和营养治疗等领域。

参 考 文 献

- [1] 李八方, 管华诗, 王长云, 1992. 贻贝保健食品的研究. 青岛海洋大学学报, Sp. Issue 专辑, Dec.: 59-69.
- [2] 侯文璞等, 1985. 贻贝的营养价值. 食品科学, 61(1).
- [3] 谢保源, 1980. 我国氨基酸制剂的研究和发展概况. 中国医药工业杂志, 21(1): 31-34.
- [4] 相泽孝亮(日本)等著, 黄文涛, 胡学智译, 1989. 酶应用手册. 上海科学技术出版社.
- [5] 吴永沛, 1989. 酶法加工牡蛎调味品的研究. 厦门水产学院学报, (1): 52-57.
- [6] 门隆兴吉(日本), 1982. Application of proteolytic Enzyme Treatment in Oyster extract preparation. 广岛食工试研

- 报, (16): 15-19.
- [7] 林南琴, 1989. 蛋白质和酶学研究方法, 第一册, 42-45. 科学出版社.
- [8] 夏其昌, 1989. 蛋白质和酶学研究方法, 第一册, 46-52. 科学出版社.
- [9] 王绍寅, 评德余, 1988. 第二军医大学学报, 9(5): 250-251.
- [10] 杨慧云, 1987. 从蚕蛹水解液中系统分离制备多种氨基酸的实验. 生化药物杂志, (2): 7-9.
- [11] 肖宗厚等, 1983. 从蚕蛹中提取氨基酸的研究. 中药通报, 8(5).
- [12] 李光全, 王用翼, 顾维娟, 1986. 鱼粉水解蛋白注射液的制备和质量改进. 医药工业, 17(57): 37-39.
- [13] 王绍寅等, 1987. 血红素制备中分离提取氨基酸的研究. 氨基酸杂志, (3): 6-8.
- [14] D. T. 普卢默著, 1985. 实用生物化学导论. 科学出版社.
- [15] 1990. 中华人民共和国药典, 二部, 附录 17.
- [16] 1986. 有机分析教程. 陕西师范大学出版社.
- [17] 谢晶璇编著, 1987. 红外光谱在有机化学和药物化学中的应用. 科学出版社.
- [18] Kamaleshk Sirkar, Ravi prasad. Sirkar and Prasad, 1991. Protein ultrafiltration-some neglected considerations. Stevens Institute of Technology, : 37-59.
- [19] Sadtler. Catalogue of infrared spectra. U. S. A.
- [20] Robert Weast, 1977-1978. CRC handbook of chemistry and physics, 58th edition, section C.

EXTRACTION AND SEPARATION PROCESSES OF AMINO ACIDS FROM DEGREASED MUSSEL POWDER

Ye Mei Xu Jiamin

(Food Enginnering Department of Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT Extraction and separation processes of six individual amino acids and amino acid mixture from degreased mussel powder were investigated. The degreased mussel powder was hydroly order. The ultrafiltration method was used to decolor and remove the undehydrolyzed protein and other macromolecules from hydrolyzed solution. The desalting method of the final ultrafiltered fluid was ion exchange. The $[H^+]1 \times 25$ acid ion exchange resin and 701⁺ $[CO^-]$ base ion exchange resin were used. The desalted solution was concentrated under vacuum environment, crystallized, and then washed and dehydrated to get the crystals contained in the amino acid mixture. The overall conversion was about 20% and the purity was about 90%. The aromatic amino ultrafiltered fluid were absorbed by active carbon column. The L-Glutamic acid, L-Valine, L-Leucine and L-Arginine in the penetrated solution, which could not be absorbed by the active carbon column, were absorbed by 732 strong acid ion exchange resin and 717 strong base ion exchange resin columns. The active carbon column and ion exchange columns were eluted to get the six pure individual amino acids. Identified and analyzed by amino acid analyzer, IR spectrum and autoindication polarimeter, the conversion of the six amino acids were 2.05%, 1.21%, 1.02%, 1.34%, 1.46% and 3.01% respectively and the purity was 93.3%, 80.2%, 90.6%, 87.8%, 88.3% and 92.7% respectively. The ash content was 1.42%, 0.94%, 1.08%, 1.17%, 1.39% and 1.81% respectively.

KEYWORDS Mussel powder, Enzymolysis, Separation, Extraction, Amino acid