

甲壳胺和 N-亚甲基甲壳胺对贻贝酶 解液中氨基酸吸附性研究

于广利 叶 眉 徐家敏

(青岛海洋大学, 266003)

摘 要 报道了甲壳胺(chitosan)及 N-亚甲基甲壳胺(N-methylene chitosan)对贻贝酶解液中各种氨基酸吸附情况。在一定 pH (6.0) 及浓度 (945mg/kg) 下: (1) 甲壳胺对贻贝酶解液中各种氨基酸均有吸附, 其中, 对 Tyr, Phe, His, Arg, Asp 及 Glu 的吸附率较高; (2) N-亚甲基甲壳胺对贻贝酶解液中 His, Arg, Tyr, Ileu, Met 及 Lys 吸附率较高; (3) 甲壳胺和 N-亚甲基甲壳胺对贻贝酶解液中总氨基酸的吸附率分别为 12.94% 和 11.70%。

关键词 甲壳胺(CHS), N-亚甲基甲壳胺(NMCHS), 贻贝酶解液, 氨基酸, 吸附

前 言

贻贝 (*Mytilus edulis linnaeus*), 营养丰富, 蛋白质含量高, 其营养价值高于虾、蟹及干贝, 有海中鸡蛋之称。贻贝经各种酶联合酶解后, 各种氨基酸尤其是人体必需氨基酸含量高且齐全, 所以, 可望制成复合氨基酸制剂, 或从中提取、分离单个氨基酸, 以提高其医用价值^[1]。

甲壳胺(以下简称 CHS), 为线型聚阳离子高分子化合物, 已被广泛应用于处理食品加工废水, 回收蛋白质^[3,11]。在回收氨基酸方面国内、外已有不少报道。如 Myer^[8] 报道了甲壳胺从虾废水中回收氨基酸、核苷酸等风味物质; Muzzarilli^[9] 等将 CHS 与 CuSO₄ 反应制成 Cu-CHS 络合物, 回收 Asp, Glu, Cys, Try 等; HONGK.No^[6] 等研究了 CHS-Cu, CHS-Cr-Cu, CHS-Cu (Cr)-Am 络合物在碱性 (pH8~11) 条件下对各种氨基酸的吸附情况; 柯火仲^[2] 等则研究了甲壳胺的氨基含量对铜吸附量和氨基酸回收率的影响, 并得出甲壳胺(从虾壳中提取)与铜络合物对 His, Asp, Leu 的回收率高。以上研究均从 CHS 与过渡金属元素 (Cu, Cr) 形成络合物的角度, 研究了该络合物在碱性条件下对各种氨基酸的吸附情况, 本文研究了在酸性 (pH6.0) 条件下 CHS 与 N-亚甲基甲壳胺^[3] (以下简称 NMCHS) 对贻贝酶解液中各种氨基酸的吸附情况。

收稿日期: 1994-03-22。

材 料 与 方 法

(一)仪器与试剂

1. 仪器 835-50 氨基酸自动分析仪 (日本, HITACHI 公司); LG10-3 冷冻离心机; 恒温水浴; 电动搅拌器; PHS-2 型酸度计。

2. 试剂 甲壳胺 (DA75%; 粘度 0.5Ps; 荣城产); 胃蛋白酶 Pepsinum (酶活力 1: 3000, 上海长城生化制药厂); 胰蛋白酶 Trypsin (酶活力 1: 25, Difco 进口分装); 枯草杆菌中性蛋白酶 AS1, 389 Neutrase (酶活力 45000UI/g, 山东沂水皮革酶制剂厂); 标准氨基酸 (日本, HITACHI 公司); 其它试剂均为 A.R. 级。

(二)方法

1. NMCHS 制备 取 3 克 CHS 于 500ml 烧杯中, 加 2% 冰醋酸 (HAC) 300ml, 搅拌至全溶, 在搅拌下慢慢加入甲醛 (36%) 溶液 20ml, 室温放置 2hr, 用 2N NaOH 调 pH 为 10, 过滤, 水洗中性, 然后用甲醇、乙醚洗涤、过滤, 60℃ 烘干、备用。

2. 贻贝酶解液制备 取已提取脂肪的贻贝粉 100g, 加入 5 倍量的水, 浸泡。用胃蛋白酶 (2.2% W/W) 在 pH2.0~2.5 条件下于 50℃ 恒温水浴中恒速搅拌酶解 4hr, 然后, 用枯草杆菌酶 (320UI/g) pH7.0 条件下于 50℃ 恒温水浴中恒速搅拌酶解 5hr, 再用胰蛋白酶 (3.5% W/W) 于 pH8.5 下恒速搅拌酶解 5hr, 最后将温度升到 80℃, 并搅拌 10min, 使酶失活, 调 pH 为 7.0, 在 LG10-3 型离心机中离心 15min, 弃去沉淀物, 得到酶解母液。

3. 吸附剂用量及 pH 值选择 根据 W.A. Bough 等的报道, 用甲壳胺回收水产品煮盘汁中可食蛋白质的最佳 pH 值为 6~7, 由于本实验的目的是尽可能除去大分子蛋白质保留氨基酸, 而母液 pH 是 7.0, 当 pH>9 或 pH<5 时不可避免地造成母液中碱性或酸性氨基酸沉淀, 还由于 CHS 的 PK 值为 6.8, 所以, 本实验取 6.0 为最佳 pH 值。根据 Koo-Hung 等的报道, CHS 作为一种高分子絮凝剂, 用于水质澄清上, 其用量占固型物干重的 1~3%, 本实验所得母液含固型物为 20.6%, 经反复试验选取 0, 315, 630, 945, 1260mg/kg 为 CHS 与 NMCHS 的吸附剂量。取一定量的母液, 加入不同量的吸附剂, 调 pH 为 6.0, 在 3500rpm 下离心 10min, 倾出上清液, 在 620nm 下测定透光度 (T%); 然后, 将沉降物取出, 100℃ 烘干、称重, 计算沉降率 (PR%)。结果见表 1, 表 2。

表 1 CHS 与 NMCHS 对母液的澄清效果

Table 1 Effects of CHS and NMCHS to the clarifying of mother liquor

透光度(T%) Transparency	用量(mg/kg) Use contents					
		0	315	630	945	1260
组别 Groups						
CHS		13	47	68	70	71
NMCHS		13	43	65	69	70

表 2 CHS 与 NMCHS 对母液中蛋白质及其它悬浮杂质的沉降率的影响
Table 2 Effects of the precipitating rate (PR%) of CHS and NMCHS to the Proteins and other suspending materials in mother liquor

组别 Groups	沉降率(PR%) Precipitant rate	用量(mg / kg) Use contents					
			0	315	630	945	1260
CHS			0	3.75	6.66	10.67	11.14
NMCHS			0	3.53	6.85	9.69	9.88

4. CHS 与 NMCHS 对贻贝酶解母液中氨基酸吸附试验 取 CHS 与 NMCHS 各 2g, 分别加入 2% (HAC) 200ml, 搅拌溶解。在 50ml 烧杯中分别加入一定量的酶解液, 然后分别加入 0, 315, 630, 945, 1260mg / kg 的 CHS 及 0, 315, 630, 945, 1260mg / kg 的 NMCHS, 用 10N NaOH 调 pH 至 6.0, 静置 10min, 在 3500rpm 下离心 10min, 倾出上清液, 向沉淀物中加入少量的水洗涤 3 次, 合并洗涤液, 定容到一定体积, 上机分析。结果见表 3, 表 4。

表 3 甲壳胺对母液中各种氨基酸的吸附情况
Table 3 The absorption of chitosan (CHS) to every kind of amino acid in the hydrolysis mussel solution with protease

含量(mg / 100ml) Contents(mg / 100ml) 氨基酸 Amino acids	项目 Items	母 液 Monther liquor CO	甲壳胺浓度(mg / kg) Concentration of chitosan				吸附率 (Ai, %) Absorption rate Ai = (CO - Ci) / CO, i = 1, 2, 3, 4			
			315	630	945	1260				
			C1	C2	C3	C4	A1	A2	A3	A4
Asp		38.20	35.21	34.68	32.51	32.03	7.83	9.21	14.9	16.14
Thr		47.91	45.71	43.54	42.68	40.91	5.59	9.12	10.92	14.61
Ser		45.00	43.41	42.99	42.48	41.47	3.56	4.47	9.60	7.85
Glu		91.66	82.62	80.64	78.65	77.91	9.86	12.02	14.19	15.0
Gly		94.12	88.56	87.54	86.37	86.09	5.89	6.49	8.23	7.69
Ala		114.32	110.85	108.67	106.3	105.53	3.04	4.94	7.02	7.69
Val		220.36	220.3	218.42	217.84	217.28	0.03	0.88	1.14	1.40
Met		82.31	82.3	80.35	79.05	76.35	0.02	2.38	3.96	7.24
Ileu		128.84	127.86	125.5	120.74	118.03	0.76	2.58	6.29	8.39
Leu		260.16	254.78	251.86	240.1	238.62	2.07	3.9	7.71	8.28
Tyr		198.97	161.1	156.67	149.31	147.4	19.04	21.31	24.96	25.92
Phe		438.58	404.53	377.19	335.23	331.7	7.76	14.0	23.56	24.37
Lys		330.58	305.77	303.1	302.59	300.89	7.51	8.32	8.47	8.98
His		17.46	16.11	14.11	13.69	10.88	7.73	19.19	21.59	37.69
Arg		450.17	408.75	392.52	382.97	379.1	9.20	13.25	14.93	15.0
Total		2558.64	2387.9	2317.7	2227.5	2200.	9.93	9.42	12.94	14.0

结 果 与 讨 论

(一)CHS 与 NMCHS 对母液的澄清及沉降结果与讨论

从表 1 和表 2 的数据可以看出,随着 CHS 或 NMCHS 用量的增加,上清液的透光度(T%)及沉降率(PR%)也逐渐增加。当达到 945mg/kg 时,如再增加用量,则 T%与 PR%的增加量较小,基本达到平衡。因此,可把 945mg/kg 作为在 pH6.0 时的最佳用量。

(二)CHS 对母液中各种氨基酸吸附结果与讨论

从表 3 可以看出:贻贝经各种酶联合酶解后,氨基酸含量高,尤其是人体必需的氨基酸(除 Try 未测之外其余七种)含量高,占总量的 58.96%,鸡蛋中必需氨基酸也只占其总量的 42.1%^[4]从表 1 中还可以看出,随着 CHS 浓度的增加,上清液中氨基酸总量逐渐减少,同时说明 CHS 对氨基酸的吸附逐渐增加,为了达到既能除去蛋白质及其它杂质且又能减少对氨基酸吸附的目的,确定 945mg/kg (pH6.0) 为最佳条件,在此条件下,CHS 对各种氨基酸的吸附率(%)分别是 Tyr (24.96) > Phe (23.56) > His (21.59) > Arg (14.93) > Asp (14.9) > Glu (14.19) > Thr (10.92) > Ser (9.60) > Lys (8.47) > Gly (8.23) > Leu (7.71) > Ala (7.02) > Ileu (6.29) > Met (3.96) > Val (1.14),总吸附率为 12.94%。

表 4 N-亚甲壳胺(NMCHS)对母液中各种氨基酸的吸附情况

Table 4 The absorption of N-methyl chitosan MNCHS to every kind of amino acid in the hydrolysis mussel solution with protease

含量(mg/100ml) Contents 氨基酸 Amino acids	项目 Items	母液 Monther liquor CO	N-亚甲壳胺 浓度 Concentration of N-methylene chitosan				吸附率(Bi, %) Absorption rate Ai = (CO-Di) / CO, i = 1,2,3,4			
			315	630	945	1260	B1	B2	B3	B4
			D1	D2	D3	D4				
Asp		38.20	35.32	34.83	34.65	34.13	7.54	8.82	9.29	10.65
Thr		47.91	47.87	47.21	46.93	46.72	0.83	1.46	2.0	2.48
Ser		45.00	44.87	44.46	44.23	44.19	0.29	1.20	1.70	1.86
Glu		91.66	88.43	87.40	85.75	85.42	3.52	4.65	6.44	6.81
Gly		94.12	93.79	93.04	92.65	92.02	0.35	1.15	1.36	2.23
Ala		114.32	106.95	104.78	104.54	104.08	6.45	8.35	8.55	8.96
Val		220.36	220.06	219.92	218.09	217.59	0.14	0.18	1.03	1.26
Met		82.31	78.37	74.47	72.60	72.02	4.79	9.52	11.8	12.5
Ileu		128.84	115.46	113.0	112.49	110.34	10.43	12.29	12.69	14.4
Leu		260.16	256.54	255.79	254.08	252.75	1.39	1.87	2.34	2.85
Tyr		198.97	170.89	168.97	160.64	159.0	14.1	15.1	19.26	24.1
Phe		438.58	399.66	396.32	393.95	384.25	8.87	9.64	10.2	12.4
Lys		330.58	312.71	310.79	293.51	292.51	5.51	5.99	11.2	11.5
His		17.46	11.01	10.55	10.1	8.87	36.9	39.58	42.4	49.2
Arg		450.17	360.76	350.92	335.08	324.27	19.86	22.05	25.6	28.0
Total		2558.64	2342.7	2312.75	2259.3	2288.2	8.44	9.61	11.7	12.9

从表 4 也可以看出, NMCHS 对酶解液中各种氨基酸同样表现不同的吸附作用, 其吸附规律与 CHS 一样, 随着用量的增加, 总吸附率也增加, 但从总体看, 其增加的幅度较 CHS 稍低。在 945mg/kg (pH6.0) 条件下, 对各氨基酸吸附率 (%) 顺序依次是: His (42.4) > Arg (25.6) > Tyr (19.26) > Ileu (12.96) > Met (11.8) > Lys (11.2) > Phe (10.2) > Asp (9.29) > Ala (8.55) > Glu (6.44) > Leu (2.34) > Thr (2.00) > Ser (1.70) > Gly (1.36) > Val (1.03)。

结 论

通过对甲壳胺 (CHS) 和 N-亚甲基甲壳胺 (NMCHS) 对贻贝酶解液中各种氨基酸的吸附性的比较研究, 可以得出如下的结论: (1) 甲壳胺和 N-亚甲基甲壳胺对贻贝酶解液中各种氨基酸均有吸附作用, 浓度不同则吸附作用不同, 且氨基酸的种类不同时, 其吸附率有较大的差别。二者均对极性 His, Arg, Tyr 表现出较大的吸附作用; CHS 对酸性 Asp, Glu 及 NMCHS 对中性 Ileu, Met 也有较大的吸附作用; 而对非极性的 Val 却呈现出极小的吸附性。吸附作用的大小与 CHS、NMCHS 以及不同的氨基酸结构有关; (2) 在 pH6.0 以及 945mg/kg 用量的条件下, CHS 和 NMCHS 对贻贝酶解液中总氨基酸吸附率 (%) 分别为 12.94 和 11.70。随着两种吸附剂浓度的增加, NMCHS 对总氨基酸的吸附率低于 CHS, 这是由于甲壳胺分子中的部分氨基被修饰了的缘故。在 1267mg/kg 时, NMCHS 对 His 及 Arg 吸附率分别达 49.2 和 28.0, 所以, 对甲壳胺进行适当的修饰将有利于吸附某些特殊种类的氨基酸; (3) 在上述条件下, 该两种化合物能基本达到澄清母液的目的, 同时对母液中总氨基酸的吸附率又不高 (12% 左右), 因此, 可望成为分离、提纯各种酶解液中氨基酸的良好试剂。

参 考 文 献

- [1] 李八方等, 1992. 青岛海洋大学学报《海洋药物专辑》, 59-69。
- [2] 柯火仲等, 1991. 化学世界, 4: 158-163。
- [3] 王士奎等, 1992. 化学世界, 8: P362-365。
- [4] 1991. 中国预防科学院营养与食品卫生研究所编, 食物成分表, 78-79。
- [5] 竹本喜一, 1981. 现代化学, 123 (57): 57-61。
- [6] HONG K. No *et al*, J. of Food Sci. 51(1): 60-62。
- [7] Koo-Hung, *et al*, 1986. US.P.4609470。
- [8] Myers, S. P. *et al*, Foodstuffs, 46:23。
- [9] Muzzarelli, R. A. A, Muzzarelli *et al* (ed.) 1978. 1st international conf. on "CHITIN / CHITOSAN":335。
- [10] Muzzarelli, R. A. A, *et al*, Carbohy. Poly. 1985, 5:297-307。
- [11] W. A. Bough, Process. 1976. Biochem. Jan / Feb: 11-16。

STUDY ON ABSORPTION OF CHITOSAN AND N-METHYLENECHITOSAN TO EVERY KIND OF AMINO ACID IN THE HYDROLYSIS MUSSEL LIQUOR WITH PROTEASE

Yu Guangli Ye Mei Xu Jiamin

(Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT The absorption of chitosan (CHS) and N-methylenchitosan (NMCHS) to every kind of amino acids in the hydrolysis mussel liquor with protease was reported. At pH6.0 and the concentration of 945mg / kg of chitosan (1) Chitosan can adsorb every kind of amino acids, and the absorption rates of chitosan to Tryosine, Phenylalanine, Histidine, Arginine, Aspartic acids and Glutamic acid were high; (2) N-methylenchitosan adsorb every kind of amino acids too, and the absorption rates to Histidine, Arginine, Tryosine, and Isoleucine Methionine and Lysine were high; (3) The total absorption rates of chitosan and N-methylenchitosan to every kind of amino acids in the hydrolysis mussel liquor with protease were 12.94% and 11.70%, respectively.

KEYWORDS Chitosan (CHS), N-methylenchitosan (NMCHS), Mussel hydrolysis liquor with protease, Amino acid, Absorption