

贻贝粉酶解液提取复合氨基酸

叶眉¹ 高昕²

(¹ 青岛市卫生防疫站 266003)

(² 青岛市轻工业研究所 266003)

提要 报道了以脱脂后的贻贝粉为原料,采用酶解法从其酶解液中分离提取复合氨基酸的工艺。其收率为20%,纯度约为90%。其中必需氨基酸(不计色氨酸)约占复合氨基酸总量的55%,其氨基酸模式与FAO/WHO组织确定的模式及人乳模式进行了对照,通过适量添加个别氨基酸可使其配比接近人乳模式。

关键词 贻贝粉,蛋白酶,酶解,复合氨基酸

国内在80年代就有以蚕蛹为原料经酸水解制取复合氨基酸的报道,90年代则由酶解法代替。本文采用胃蛋白酶、枯草杆菌中性蛋白酶、胰蛋白酶联合酶解法进行贻贝粉酶解,克服了传统的酸碱水解带来的盐分含量高、氨基酸消旋及破坏的缺点^[1,3]。可将蛋白质深度水解,从而使酶解液中游离氨基酸含量增加。

酶解后所得复合氨基酸溶液的脱盐是提取工艺中的另一关键问题。经典的乙醇脱盐法会使蛋白质随无机盐共沉淀,且乙醇消耗量大。电渗析或电渗析法^[2,3,14]脱盐限于实验室条件难于实现。本实验采用超滤^[12,13]和离子交换树脂法相结合的脱盐法收到良好效果,脱盐率达91%,工艺简单易行。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

贻贝粉 鲜贻贝晒干,提取脂肪后剩余物经烘干、粉碎得干粉,其蛋白质含量为48.75%。

胃蛋白酶 上海长城生化制药厂出品,酶活力1:3 000,最适pH 2.0~2.5,温度45~65℃。

枯草杆菌中性蛋白酶 AS 1.398 山东沂水皮革酶制剂厂出品,酶活力45 000 UI/g,最适

pH 7.0~8.0,温度35~50℃。

胰蛋白酶 Difco 进口分装,酶活力1:25,最适pH 8.0~9.0,温度40~55℃。NaOH,浓HCl,苯甲酸钠,95%乙醇均为分析纯试剂;粉状活性炭,701弱碱性环氧系阴离子交换树脂(上海树脂厂生产);[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);UF-PS-200H/PP 100,UF-PES-8/PP 100,UF-PS-4/PP 60超滤膜(德国Kalle公司出品);氨基酸标准样品(日本日立公司)。

1.2 主要设备

501型超级恒温水浴锅、JJ-1型定时电动搅拌机、LG10-3型高速冷冻离心机、岛津AEL-403M型电子分析天平(1×10⁻⁵g)、日立835-50型氨基酸自动分析仪、pH S-2酸度计、WD-1型蠕动泵、H-60型超滤器、2.0cm×5.0cm及2.5cm×6.0cm交换柱、ZFQ85A型旋转蒸发器、0260型电热真空干燥箱。

1.3 方法

1.3.1 分析方法

总氮:凯氏定氮法;蛋白质含量:总氮含量×6.25;游离氨基酸态氮:甲醛滴定法;灰分:灰化法;氨基酸组成分析:日立835-50型氨基酸自动分析仪测定。

收稿日期:1995年5月2日

1.3.2 有关设备工作条件

LG10-3 型高速冷冻离心机工作条件: 酶解原液离心: 4℃, 10 000r/min, 25min; 活性炭脱色液离心: 4℃, 4 000r/min, 25min; H-60 型超滤器工作条件: 吹 N₂ 加压 < 0.3MPa, pH 1~14, 温度: 加冰袋 (0~6℃); ZFQ85A 型旋转蒸发器工作条件: 转速 10r/min, 真空度 0.08MPa, 温

度 70℃; 电热真空干燥箱工作条件: 温度 70℃, 真空度 0.08MPa。

1.3.3 原料预处理

将提取脂肪后的胎贝粉加 5 倍水浸泡搅拌, 放入温度预控好的水浴锅中, 待料液温度升至所要求温度时, 进行酶解实验。

2 结果与讨论

2.1 复合氨基酸的提取

2.1.1 酶水解

选择了胃蛋白酶、枯草杆菌中性蛋白酶、胰蛋白酶联合水解的方法。选择了先以胃蛋白酶水解, 继以枯草杆菌中性蛋白酶和胰蛋白酶水解的顺序。参考有关文献^[4,10,11]确定了各酶作用的最适 pH 值及温度, 而对它们的作用时间由酶水解度曲线实验确定, 其使用量由正交实验确定。最后选定干胎贝粉的最佳酶

稀释 3 倍后直接加到 H-60 型超滤器中, 加入 0.1% 苯甲酸钠防腐, 依次用 PS-200H/PP, PES-8/PP, PS-4/PP 的超滤膜进行超滤 (夏季应在超滤器外包冰袋防酶解液变质)。超滤时在磁力搅拌下, 充 N₂ 加压 < 0.3MPa。得到浅棕黄色超滤液。

选择的滤膜应能除去肽类以上的大分子物质, 得到氨基酸和盐的混合液。蛋白质深度水解产生的肽平均分子量低于 2 000^[16], 而常见氨基酸中分子量最大者为色氨酸 (分子量为 204), 选用截留分子量为 300 的超滤膜进行分离, 可得满意效果。由于国内无此种膜生产, 本实验采用滤膜最小截留分子量为 4 000。因此, 较为理想的方法是将超滤和反渗透 (截留分子量 300) 相结合, 超滤作为反渗透的前处理, 去除大分子物质及肽。如此操作处理量大, 快速简捷, 氨基酸变化及损失均小。利用超滤法处理酶解上清原液, 不仅可去除大分子物质及脱色, 同时也可得到不同分子量段的分级产物。本实验得到的分级产物经定性实验证明含

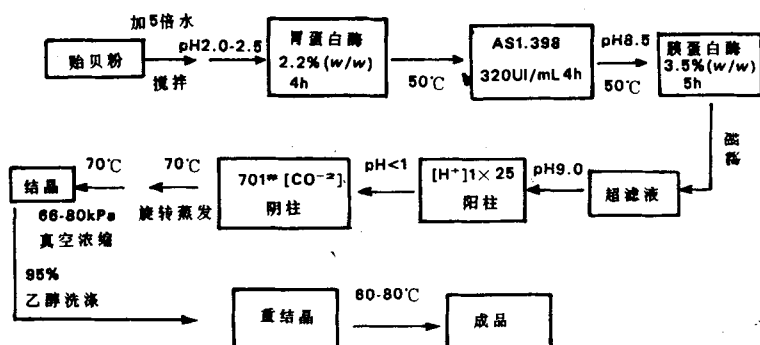


图 复合氨基酸提取工艺流程

Fig The extraction process of amino acid mixture

解条件如下:

将搅拌好的胎贝粉浆加 0.1% 苯甲酸钠防腐, 用 6 mol/L HCl 调 pH 至 2.0~2.5, 恒温 50℃, 加 2.2% 胃蛋白酶 (W/W, 相对于干胎贝粉), 不断搅拌酶解 4h, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 恒温 50℃, 加 AS1.398 1.3%, 320UI/ml, 不断搅拌酶解 4h, 用 NaOH 调 pH 至 8.5, 恒温 50℃, 加胰蛋白酶 3.5% (W/W) 不断搅拌酶解 5h。酶解完全后, 加热升温至 85℃, 10min, 使酶失活。离心去渣, 得酶解上清液。经测定, 水解度达 91%, 游离氨基酸-N/总-N 达 84%。

2.1.2 超滤

由酶解得到的上清液为深褐色浑浊体。为除去大分子、未水解蛋白质、部分多肽和脱色, 采用了对敏感性生物物质几乎无影响的超滤分离法。由于上清液中大分子物质的分子量变化范围大, 加上本实验设备等因素的影响使超滤的前处理达不到要求。因此选用截留分子量分别为 200 000, 8 000, 4 000 的超滤膜进行分段连续式超滤流程^[15]。将上清酶解原液以蒸馏水

有大量粘多糖活性物质。可见超滤对生物混合物的分级处理是有效的。

2.1.3 脱盐

选用 701[#][CO⁻²]型弱碱性阴离子交换树脂及[H⁺]型 1×25 强酸性阳离子交换树脂,借助调节氨基酸分子的带电状态,从而通过阳、阴两种离子交换树脂达到脱盐目的。不同种类的阳离子树脂对钾、钠、钙等阳离子吸附能力不同,1×25 阳离子树脂交联度为 13,比 732 阳离子树脂约高 1 倍,因此对无机阳离子吸附的多。

将[H⁺]型 1×25 和 701[#]树脂按常规法处理装柱,将超滤液适当浓缩,调 pH 9.0,使大部分氨基酸呈阴离子状态,流入[H⁺]型 1×25 阳柱(流出液 pH 2~3),水解液中钾、钠、钙、镁等阳离子大部分被吸附^[1-3]。把上述流出液调 pH 1.0 以下,使所有氨基酸呈阳离子状态,然后流入 701[#][CO⁻²]阴离子交换树脂柱(流出液 pH 7~8),水解液中的氯、磷酸根等阴离子被吸附。

脱盐率达 91.03%,证明此法脱盐效果好。

2.1.4 活性炭脱色^[6]

由脱盐液制得的复合氨基酸颜色不甚理想,须经活性炭脱色处理。在脱盐后的水解液中加 0.5%(W/V)活性炭,置水浴锅中保温 90℃,不断搅拌 2h。取出冷却至 4~10℃,待有色物被吸附沉降完全后,离心、抽滤去活性炭,得脱色液。

活性炭量选择 0.5%(W/V),是考虑到活性炭对氨基酸有吸附作用。据吴祖道^[7]及邹学满^[8]报道,在活性炭用量达 5%(W/V)时,特别是活化活性炭,对氨基酸混合液在室温下只处理 10min 就可使酪、苯丙、甲硫氨酸完全被吸附,而其他如异亮、亮、精氨酸的吸附也达 10%,绝大多数氨基酸损失 50%以上。即使未活化的活性炭对氨基酸的吸附也很强,被吸附的氨基酸用同温,同 pH 的无离子水洗涤,几乎无法被洗脱,这在本实验中已得到证实。因此选择低的活性炭用量(0.5%, W/V),以减少对氨基酸的吸附。实验证明,在此用量下 90℃处理

2h,可达满意脱色^[7]。

2.1.5 复合氨基酸的制备

脱色液首先用 ZFQ85A 旋转蒸发器在 70℃下浓缩到一定体积(无结晶出现),再在电热真空干燥箱中(70℃, 66~80kPa)进一步浓缩,直至氨基酸结晶完全。过滤,得结晶。结晶用 95%的乙醇洗涤,重结晶 1 次,于 60~80℃烘干,得复合氨基酸粉末^[9],得率为 20%(W/W,相对于干贻贝粉),相对于贻贝粉中蛋白质质量的得率为 41.0%。纯度达 90%,其中必需氨基酸(不计色氨酸)占总量的 55.12%,复合氨基酸组成分析见表 1。

表 1 复合氨基酸产品氨基酸组成分析

Tab. 1 The composition of amino acid in the amino acid mixture

氨基酸名称	含量(%)	氨基酸名称	含量(%)
天门冬 ASP	1.26	胱氨酸 CYS	2.46
苏氨酸 Thr [*]	1.92	缬氨酸 Val [*]	7.86
丝氨酸 Ser	1.67	蛋氨酸 Met	2.73
谷氨酸 Glu	3.11	异亮氨酸 Zieu [*]	3.74
甘氨酸 Gly	2.25	亮氨酸 Leu [*]	9.58
丙氨酸 Ala	3.13	酪氨酸 Tyr	7.84
苯丙氨酸 Phe [*]	16.48	赖氨酸 Lys [*]	12.81
组氨酸 His	0.43	精氨酸 Arg	16.19

* 表示必需氨基酸

真空浓缩结晶时,关键在于控制器内真空度,若真空度过高,则蒸发损失大;真空度太低则氨基酸随水汽跑掉,选择的最佳真空度为 66~80kPa。因脱色液已由超滤去除分子量大于 4 000 的物质,所以在浓缩液中很少出现大量汽泡,不需加消泡剂。

2.2 与人乳中各种必需氨基酸配合比率(A/E)的比较

人乳模式是指 1g 必需氨基酸中各必需氨基酸的毫克数,实验制得的复合氨基酸产品的 A/E 比值与人乳模式及 FAO/WHO 模式的对照见表 2。

胱氨酸和酪氨酸原为非必需氨基酸,但由于胱氨酸可减少蛋氨酸的用量,而酪氨酸可减少苯丙氨酸的用量,故一般必需氨基酸的组成都包含胱氨酸和酪氨酸在内。

表 2 必需氨基酸的组成 (A/E) 对照表

Tab. 2 The composition of essential amino acid (A/E)

项目	赖氨酸	苏氨酸	缬氨酸	蛋氨酸+胱氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	苯丙氨酸+酪氨酸	色氨酸
人乳模式	145	93	128	76	111	211	201	35
FAO/WHO 模式	153	111	139	97	111	194	167	28
复合氨基酸产品 ¹⁾	195	29	120	79	57	146	372	1

1) 复合氨基酸产品的 A/E 是不计色氨酸情况下的值。

由表 2 可见, 本实验制得的复合氨基酸样品多数氨基酸(赖氨酸、缬氨酸、蛋氨酸+胱氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸+酪氨酸)的 A/E 比值与人乳和 FAO/WHO 模式相当或略高, 少数氨基酸(苏氨酸、异亮氨酸及亮氨酸)与 FAO/WHO 及人乳模式有差异, 后者可以通过适当添加达到要求。

3 结论

3.1 以提取脂肪后的贻贝粉为原料, 提取复合氨基酸, 为氨基酸的需要提供了新的来源, 为解决贻贝粉综合利用提供依据, 具有经济和实用意义。

3.2 本文采用酶水解贻贝粉蛋白质, 克服了传统的酸碱水解带来的盐分含量高, 氨基酸消旋及破坏的缺点。首次采用超滤法去除大分子物质及脱色, 不仅对氨基酸无影响, 而且可得到分级活性物质。采用离子交换树脂法脱盐, 脱盐液经真空浓缩、结晶、洗涤、烘干等程序, 复合氨基酸得率为 20%, 氨基酸含量达 90%, 灰分 0.38%, 其中必需氨基酸(不计色氨酸)占 55.12%。

3.3 结合原料特点设计工艺, 设备及实验材料取源于国产, 易于推行。产品纯度高, 氨基酸种类齐全, 通过适量添加个别氨基酸可使其

配比接近人乳模式, 适用于饲料、食品等氨基酸的强化剂和添加剂, 也可用于营养治疗。

参考文献

- [1] (美) M. 里切里尔主编, 1989. 加工食品的营养价值手册. 轻工业出版社, 133~134.
- [2] 欧阳平凯、汪群慧, 1991. 化工进展 2: 31~34.
- [3] 王传怀、余 宠等, 1984. 氨基酸杂志 4: 8~12.
- [4] 吴永沛, 1989. 厦门水产学院学报 1: 52~57.
- [5] 李光全等, 1986. 医药工业 17: 37~39.
- [6] 王绍寅等, 1988. 第二军医大学学报 9(5): 250~251.
- [7] 吴祖道等, 1986. 氨基酸杂志 1: 25~30.
- [8] 邹学满, 1985. 氨基酸杂志 2: 21~25.
- [9] 高振忠, 1987. 氨基酸杂志 2: 7~9.
- [10] (日) 门隆兴吉, 1982. 广岛食工试研报 16: 15~19.
- [11] 中村喜孝, 1983. *New Food Industry* 25(9): 62-64.
- [12] Amicon Corporation, 1985. *Hollow Fiber Ultrafiltration. Cartridges Publication*, 525, 494, 465, 552.
- [13] Johnson. A. and Tragarah. G., 1990. *Desulfation* 77:135-179.
- [14] R. Consclen, A. H. Gordon and A. J. P. Martin, 1947. *Biochem. P.* 4(41):597.
- [15] Kamaleshk Sirkar and Ravi Prasad, 1991. *Protein Ultrafiltration Some Negelected Considerations. Steuens Institute of Technology*, 35-59.
- [16] Tannebaum S. R., Athern M. and Bates R. P., 1970. *Food Tech.* 24:604.

EXTRACTION OF AMINO ACID MIXTURE FROM DEGREASE MUSSEL POWDER BY ENZYMOLYSIS

Yie Mei¹ and Gao Xin²

(¹*Qingdao Anti-Epidemic Station 266003*)

(²*Qingdao Institute of Light Industry 266003*)

Received: May, 2, 1995

Key Words: Mussel powder, Protease, Enzymolysis, Amino acid mixture, Ultrafiltration, Desaltion

Abstract

The extraction process of amino acid mixture from degreased mussel powder by enzymolysis was investigated. The overall conversion was around 20% and the purity was about 90%, the essential amino acid (except for Try) contents accounted 55% of total amount and the mixture ingredients were compared with the FAO/WHO standard and those of human milk.