

南海海洋珍珠贝肉牛磺酸提取工艺初探^{*}

刘芳, 叶克难

(中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要: 牛磺酸是一类含硫的特殊氨基酸, 是人体正常生长不可缺少的非蛋白质结构氨基酸, 由于人体只能有限地合成牛磺酸, 因此膳食中的牛磺酸就显得非常重要。珍珠贝肉经过混合酶解, 脱色, 过滤等过程得到酶解提取液, 再经树脂纯化分离得到纯化液, 测定各自的牛磺酸质量分数以及氨基酸质量分数。海洋珍珠贝肉中牛磺酸质量分数丰富, 从珍珠贝肉中提取牛磺酸的工艺简单易行, 是天然牛磺酸来源的良好途径, 具有较大的开发价值。

关键词: 珍珠贝肉; 牛磺酸; 提取

中图分类号: S986.2 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2005) S1-0251-03

我国海域面积广阔, 海洋生物资源丰富, 海产品加工利用的历史悠久, 但长期以来, 除部分食用外大部分海产品下脚料被丢弃, 不仅造成资源的浪费而且对环境造成污染。海洋贝类具有很高的营养价值和丰富的生理活性成分, 富含人体自身不能合成的多种氨基酸, 以及脂肪酸、维生素、糖类和矿物质等, 更有人体所必须的磷、铁、钙、锌等微量元素, 贝肉的营养成分还有容易溶解于汁液中的优点, 易于被人体消化和吸收。

牛磺酸 (Taurine, Tau), 是一种含硫的非蛋白质结构氨基酸。研究表明牛磺酸的生理功能表现在视网膜、中枢神经系统、心血管系统、肝胆系统以及生殖与发育等方面, 并在体内参与广泛的代谢过程, 具有抗动脉粥样硬化以及抗心动失常、改善充血性心力衰竭以及促进大脑发育等功效^[1]。由于人体只能有限地合成牛磺酸, 因此膳食中的牛磺酸就显得非常重要。婴儿如果缺乏牛磺酸, 会发生视网膜功能紊乱与生长、智力发育迟缓。牛磺酸的缺乏还会影响到视力、心脏与脑的正常生长与发育。目前国际市场上从天然物提取的牛磺酸的价格远高于合成品, 我国海洋生物资源丰富, 牛磺酸在鱼、贝类中含量十分丰富, 软体动物中尤甚, 可以说海洋生物是牛磺酸的天然宝库。因此探讨从海洋生物中提取牛磺酸具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验用新鲜大珠母贝为荣辉珍珠养殖有限公司

提供。牛磺酸标准品 (中国惠兴生化试剂有限公司); 木瓜蛋白酶, 中性蛋白酶 (广州市仟壹生物技术有限公司); 胰蛋白酶 (上海伯奥生物科技有限公司); 其他试剂均为分析纯。

DS 电热三用水箱 (北京医疗设备厂); 722—2000 型分光光度计 (山东高密彩虹分析仪器有限公司)。

1.2 方法

采用工艺流程: 洗净珍珠贝肉→匀浆→木瓜蛋白酶酶解 (或中性蛋白酶酶解)→胰蛋白酶酶解→灭酶→脱色→过滤→树脂分离纯化。

取一定量的珍珠贝肉解冻后, 用清水洗净, 以 1:2 的比例加入无离子水, 放入搅拌器中匀浆, 直至浆糊状。以 0.5 mol/L HCl 溶液调节匀浆液 pH 至 4.5 ~ 5.5, 称取 w 为 3% ~ 6% 木瓜蛋白酶, 加入匀浆液, 恒温 45 °C, 不断搅动, 反应 4 h。然后以 0.5 mol/L NaOH 溶液调节匀浆液 pH 至 8.0 ~ 9.0, 称取 $w=5\%$ 胰蛋白酶, 加入匀浆液, 恒温 45 °C, 不断搅动, 反应 5 ~ 6 h。升温至 100 °C 灭酶, 得酶解珍珠贝液, 调节 pH 为 6.5 ~ 7.2。在酶解液中加入 $w=2\%$ 活性炭, 置水浴锅中保温 90 °C, 不断搅拌 30 ~ 45 min, 冷却至 4 °C, 待有色物被吸附完全后, 倒入布氏漏斗过滤, 收集滤液。

以中性蛋白酶代替木瓜蛋白酶时, 用 0.5 mol/L HCl 溶液调节匀浆液 pH 至 6.5 ~ 7.0, 称取 w 为 3% ~ 6% 中性蛋白酶加入匀浆液中, 恒温 45 °C, 不断搅动, 反应 4 h, 以下步骤同上。

干树脂经无离子水浸泡膨胀, 倾去细小颗粒,

* 收稿日期: 2005—02—02

作者简介: 刘芳 (1982 年生), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 叶克难; E-mail: ls116@zsu.edu.cn

然后用 4 倍体积的 2 mol/L HCl 溶液及 2 mol/L NaOH 溶液依次浸洗, 每次浸 2 h, 并分别用无离子水洗至中性。再用 1 mol/L NaOH 溶液浸泡 0.5 h (转型), 用无离子水洗至中性。用灌注法将树脂装柱, 待用。

将滤液 pH 调节至 2.0 ~ 3.0, 缓慢流经阳离子交换树脂, 收集流出液, 重复过柱 3 次, 分别测定其氨基氮含量和牛磺酸含量。

氨基氮含量分析: 甲醛滴定法^[2]。
牛磺酸含量分析: 可见分光光度法^[3]。原理: 牛磺酸+苯酚+次氯酸钠→蓝色化合物, 该化合物在 630 nm 下有最大吸光度。在牛磺酸浓度为 0 ~ 0.0018 mol/L 范围内, 线形关系良好, 相关系数 0.9984。

2 结 果

珍珠贝肉经复合酶解作用后, 经过灭酶, 脱色, 过滤等过程, 得到淡黄褐色澄清酶解液, 过柱收集流出液, 测定其牛磺酸及氨基氮含量, 测定结果如表 1 和 2。

表 1 不同酶酶解珍珠贝肉提取液的牛磺酸含量

Tah 1 Content of taurine in the extraction of shellfish wastes digested with different enzymes

项目	先木瓜蛋白酶, 后胰蛋白酶		先中性蛋白酶, 后胰蛋白酶	
	牛磺酸/(mol·mL ⁻¹)	牛磺酸回收率/%	牛磺酸/(mol·mL ⁻¹)	牛磺酸回收率/%
提取液	5.816×10 ⁻²	/	8.367×10 ⁻²	/
流出液 I	1.427×10 ⁻²	23.5	1.181×10 ⁻²	13.3
流出液 II	5.485×10 ⁻²	86.3	5.165×10 ⁻²	55.0
流出液 III	5.268×10 ⁻²	79.1	8.956×10 ⁻²	89.5

表 2 不同酶酶解珍珠贝肉提取液的氨基氮含量

Tah 2 Content of amino nitrogen in the extraction of shellfish wastes digested with different enzymes

项目	先木瓜蛋白酶, 后胰蛋白酶		先中性蛋白酶, 后胰蛋白酶	
	氨基氮/(g·mL ⁻¹)	氨基氮去除率/%	氨基氮/(g·mL ⁻¹)	氨基氮去除率/%
提取液	0.700×10 ⁻²	/	0.672×10 ⁻²	/
流出液 I	0.238×10 ⁻²	67.4	0.196×10 ⁻²	72.4
流出液 II	0.224×10 ⁻²	70.7	0.182×10 ⁻²	75.9
流出液 III	0.224×10 ⁻²	72.1	0.168×10 ⁻²	79.1

分析牛磺酸浓度可知, 木瓜蛋白酶组和中性蛋白酶组过柱 1 次后, 流出液牛磺酸浓度明显下降, 2 次过柱后浓度有所回升, 3 次过柱后木瓜蛋白酶组浓度略有下降, 中性蛋白酶组浓度继续上升。分析牛磺酸回收率可知, 木瓜蛋白酶组经 2 次过柱后

回收率达到最高 (86.3%), 再次过柱后略有下降 (79.1%); 中性蛋白酶组经 3 次过柱后回收率达到最高 (89.5%)。

木瓜蛋白酶组和中性蛋白酶组经一次过柱后, 氨基氮浓度明显下降, 2、3 次过柱浓度变化不大。3 次过柱后, 木瓜蛋白酶组的去氮率为 72.1%, 中性蛋白酶组的去氮率为 79.1%。

另外, 木瓜蛋白酶组测得珍珠贝肉中牛磺酸质量分数为 11.63×10⁻³, 即每 1 g 珍珠贝肉含 11.63 mg 牛磺酸, 中性蛋白酶组测得珍珠贝肉中牛磺酸质量分数为 13.61×10⁻³, 即每 1 g 珍珠贝肉含 1361.2 mg 牛磺酸。

3 讨 论

3.1 牛磺酸质量分数的测定

牛磺酸, 化学名为 2-氨基乙磺酸, 是一种非蛋白质结构氨基酸。它以游离氨基酸的形式普遍存在于动物体内各种组织, 并以小分子二肽或三肽的形式存在于中枢神经系统, 但不参与蛋白质合成。

牛磺酸的测定方法较成熟, 有高效液相色谱法、荧光法、紫外、可见分光光度法、氨基酸分析仪测定法。显色剂也较多, 有茚三酮 (最大吸收波长 440 nm)、邻苯二甲醛 (最大吸收波长为 560 nm)、酚试剂 (最大吸收波长为 630 nm)、乙酰丙酮 (最大吸收波长为 413 nm) 等^[4-9]。

牛磺酸具有以下性质: 牛磺酸+苯酚+次氯酸钠→蓝色化合物, 因此我们可采用分光光度法测定, 在其最大吸收光波 630 nm 下, 测定其吸光度, 以标准曲线法定量。测得其标准直线回归方程为: y=5.5088x-0.0461, 相关系数 r=0.9984, 线形关系良好。

3.2 牛磺酸的纯化

据 KataKa 等报道^[7], 牛磺酸的天然提取液以离子交换树脂去除杂质, 效果较好。在 pH 2.0 ~ 3.0 时, 氨基酸主要以阳离子形式存在, 易与阳离子树脂交换, 而牛磺酸因其不同于其它氨基酸及多肽的磺酸结构, 不易在强酸型阳离子树脂上交换, 故当提取液流经离子交换柱就起到了纯化作用。分别测定流出液中牛磺酸的质量分数和氨基氮质量分数, 与提取液比较, 可知牛磺酸的回收率以及氨基氮的去除率 (表 1, 2)。

经 3 次过柱后, 木瓜蛋白酶组的去氮率为 72.1%, 中性蛋白酶组的去氮率为 79.1%, 由此可见, 酶解法的去氮效果较好, 能够去除大部分氨基态氮。木瓜蛋白酶组经 2 次过柱后牛磺酸回收率达到 86.3%, 再次过柱后略有下降, 中性蛋白酶组

经3次过柱后牛磺酸回收率达到89.5%。珍珠贝母细胞自溶破壁方法^[8]的牛磺酸回收率为87.5%，略高于木瓜蛋白酶组，却低于中性蛋白酶组，总体说来酶解法优于细胞自溶破壁法。另外，木瓜蛋白酶组测得珍珠贝肉中牛磺酸质量分数为 11.63×10^{-3} ，中性蛋白酶组测得珍珠贝肉中牛磺酸质量分数为 13.61×10^{-3} ，均高于生白鱼 1.51×10^{-3} 、生鱿鱼 3.56×10^{-3} 、生牡蛎 3.96×10^{-3} 、生淡菜 6.55×10^{-3} 以及生扇贝 8.27×10^{-3} ^[9]。由此可见，珍珠贝下脚料中牛磺酸含量较高，可作为良好的牛磺酸来源，具有巨大的开发利用价值。

参考文献：

[1] BARRY SK. Taurine: An Overview of its Role in Preventive Medicine[J] . Provent Med, 1989, 18: 79—100.

[2] 宁正祥. 食品成分分析手册[M] . 北京: 中国轻工业出版社, 1998.

[3] 汉译海氏有机化合物词典(第1册)[M] . 北京: 科学出版社, 1982.

[4] 金凤明, 李桂贞, 施超欧. 复合氨基酸中牛磺酸的高效液相色谱分析[J] . 石油化工高等学校学报, 2000, 13(3): 46—49.

[5] 李秀花, 邱服斌, 肖荣, 等. 紫外分光光度法测定动物脑组织中牛磺酸含量[J] . 山西医药杂志, 2001, 30(3): 209—210.

[6] 李珊, 刘玉兰, 林伯群, 等. 吸光光度法测定牡蛎中牛磺酸[J] . 青岛医学院学报, 1998, 34: 269—270.

[7] KATAKA H, OHNISHI N. 植物中存在牛磺酸氨基酸[J] . 氨基酸和生物资源, 1985(4): 53—55.

[8] 钱俊青, 陈浚, 任建华. 珍珠贝母体中牛磺酸的提取[J] . 氨基酸和生物资源, 2000, 22(1): 27—30.

[9] 郑建仙. 功能性食品(第二卷)[M] . 北京: 中国轻工业出版社, 1999.

Analysis on Extraction of Taurine from Shellfish Wastes in South China Sea

LIU Fang, YE Ke nan

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Taurine, a sulfonated β amino acid, is not incorporated into proteins and is one of the most abundant free amino acid in mammalian tissue. It is an essential dietary constituent for the human as a result of limited biosynthetic capability. Shellfish wastes are dealt with the process of multi enzyme hydrolysis, decolorizing, filtering and purifying with ion exchange resin. The hydrolysate is determined the contents of taurine and amino nitrogen and the results indicate that taurine is present in high concentrations in shellfish wastes and the technology of distilling taurine from shellfish wastes is simple to operate and is valuable for exploiture.

Key words: shellfish wastes; taurine; extraction