

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620101152328

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

海藻游离氨基酸的分析检测与非蛋白质氨基酸的分离纯化

Seaweeds Free Amino Acids Analysis and Non-protein Amino Acid Separation and Purification

王龙梅

指导教师姓名: 林祥志 研究员; 邵宗泽 研究员

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 04 月

论文答辩时间: 2013 年 05 月

学位授予日期: 2013 年 06 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	I
Abstract	II
第一章 绪论	1
1.1 氨基酸简介	1
1.1.1 蛋白质氨基酸简介	1
1.1.2 非蛋白质氨基酸简介.....	2
1.2 氨基酸的生物合成	3
1.2.1 微生物发酵生产氨基酸	3
1.2.2 酶法生产氨基酸	3
1.3 氨基酸的药用及生物功能	5
1.3.1 氨基酸作为原料药的发展历程.....	5
1.3.2 氨基酸制剂的发展进程.....	6
1.3.3 氨基酸的生产现状	7
1.4 氨基酸的分离提取	7
1.5 氨基酸的检测分析	8
1.6 海藻中氨基酸研究概况	11
1.7 海藻乙醇提取物抗氧化活性研究	11
1.8 海藻中非蛋白质氨基酸研究	12
1.8.1 海藻非蛋白质氨基酸分离提取纯化研究目的及意义	12
1.8.2 蜈蚣藻氨酸分离提取纯化	13
1.9 研究意义和内容	13
第二章 藻类中游离氨基酸柱前衍生化 PITC-HPLC 测定	15
2.1 材料与方法	15
2.1.1 藻种与处理.....	15
2.1.2 培养基.....	15

2.1.3 主要试剂.....	16
2.1.4 主要仪器设备.....	16
2.2 方法	17
2.2.1 微藻的培养.....	17
2.2.2 海藻样品的前处理.....	18
2.2.3 游离氨基酸的粗提	18
2.2.4 液相色谱条件	18
2.2.5 对照品混合溶液和样品的衍生.....	19
2.2.6 定性与定量分析.....	19
2.2.7 海藻样品未知组分的制备分离与鉴定.....	19
2.2.8 抗氧化活性测试.....	20
2.3 结果与讨论	21
2.3.1 游离氨基酸标准色谱图及其 PITC 检测线性关系分析.....	21
2.3.2 方法的精密度、重复性及稳定性试验.....	23
2.3.3 回收率试验.....	23
2.3.4 微藻样品游离氨基酸定性分析结果.....	23
2.3.5 藻类样品游离氨基酸定量分析结果.....	29
2.3.6 海藻样品未知组分的制备分离与结构鉴定.....	34
2.3.7 海藻乙醇粗提物抗氧化活性测试.....	35
2.3.8 讨论.....	36
第三章 带形蜈蚣藻非蛋白质氨基酸的分离纯化.....	39
3.1 材料	39
3.1.1 藻种.....	39
3.1.2 树脂材料.....	39
3.1.3 主要试剂.....	39
3.1.4 主要仪器.....	39
3.2 实验方法	40
3.2.1 海藻样品的前处理.....	40
3.2.2 带形蜈蚣藻非蛋白质氨基酸粗提.....	40

3.2.3 薄层层析.....	41
3.2.4 液相色谱检测分析.....	41
3.3 结果与讨论	41
3.3.1 离子交换树脂分离纯化.....	41
3.3.2 薄层层析.....	43
3.3.3 A1, A2, A3 液相色谱检测分析	44
3.3.4 讨论.....	47
第四章 结论与展望	48
4.1 结论	48
4.2 展望	48
参 考 文 献	50
附 录	59
致 谢	61

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1. Introduce	1
1.1 Amino acids introduce	1
1.1.1 Protein amino acids introduce.....	1
1.1.2 Non-protein amino acids introduce	2
1.2 Amino acids biosynthesis	2
1.2.1 Microbial fermentation production of amino acids	2
1.2.2 Enzyme catalysis production of amino acids.....	3
1.3 Medicinal and biological functions of amino acids	5
1.3.1 APIs development history.....	5
1.3.2 Amino acid preparation development history.....	6
1.3.3 Amino acid production situation.....	7
1.4 Amino acids seperation and extraction	7
1.5 Amino acids detection and analysis	8
1.6 Amino acis of seaweeds research summary	11
1.7 Seaweeds ethonal extracts anti-oxidant research	11
1.8 Non-protein amino acids in seaweeds research	12
1.8.1 Research significance and content of non-protein amino acids.....	12
1.8.2 Grateloupine seperation and purification.....	13
1.9 Research significance and content	13
Chapter 2. Free amion acids of seaweeds PITC detection	15
2.1 Materials and reagents	15
2.1.1 Algae treatment.....	15
2.1.2 Medium.....	15

2.1.3 Main reagents.....	16
2.1.4 Main equipment.....	16
2.2 Methods	17
2.2.1 Culture of microalgae	17
2.2.2 Pre-treatment of seaweed samples.....	18
2.2.3 Extraction of amino acids	18
2.2.4 HPLC method	19
2.2.5 Standard amino acids and samples derivitized	19
2.2.6 Qualitative and quantitative analysis	19
2.2.7 Unknown compounds seperation and identification.....	20
2.2.8 Anti-oxidant test.....	21
2.3 Results and discussion	21
2.3.1 HPLC figure of standard amino acids and linear relevance	21
2.3.2 Precision, repeatability, stability of method.....	23
2.3.3 Recovery experiment.....	23
2.3.4 Results of Qualitative Analyses of microalgae	23
2.3.5 Results of Quantitative Analyses of microalgae	29
2.3.6 Unknown compounds purification and structure idenfication.....	34
2.3.7 Results of enthanol extracts anti-oxidant test	35
2.3.8 Discussion.....	36
Chapter 3. Non-protein amino acids of <i>G. turuturu</i> purification.....	39
3.1 Materials	39
3.1.1 Seaweed	39
3.1.2 Resin material	39
3.1.3 Main reagents.....	39
3.1.4 Main equipment	39
3.2 Methods.....	40
3.2.1 Pre-treatment of seaweed samples.....	40
3.2.2 Extraction of amino acids of <i>Grateloupia turuturu</i>	40

3.2.3 TLC analysis	41
3.2.4 HPLC detection.....	41
3.3 Results and discussion	41
3.3.1 Ion exchange method separation and purification	41
3.3.2 TLC detection results	43
3.3.3 A1, A2, A3 HPLC analysis	44
3.3.4 Discussion	46
Chapter 4. Conclusion and prospect.....	48
4.1 Conclusion	48
4.2 Prospect.....	48
References	50
Appendices.....	59
Acknowledgements.....	61

摘要

海藻是海洋中主要的低等海洋植物，是重要的海洋初级生产者，同时也是海洋天然活性物质的主要来源之一。海藻中广泛存在海洋毒素、萜类、甾体、脂肪酸、肽类、特殊氨基酸等活性化合物，这些活性成分是新药开发的重要来源。海藻的药用功效及其活性成分的研究长期以来受到国内外学者的重视。海藻在增强人体免疫调节、降血脂、抗肿瘤、抗氧化、抑菌消炎等方面具有广泛的药理作用。在特色海洋食品、新药开发、经济饵料方面具有良好前景。

本论文对六种海洋大型经济藻类和室内培养的多种海洋微藻的游离氨基酸进行测定分析。筛选含有未知组分的海藻，深入开展具有药用价值的微藻资源的发掘保藏、藻体活性物质的高效萃取和纯化的研究工作。本研究主要取得了以下成果：

1. 建立了一种用异硫氰酸苯酯柱前衍生反相高效液相色谱测定藻类中 17 种游离氨基酸的方法，测定藻类中游离氨基酸的种类及含量，为研究藻类营养价值提供实验依据。方法：70%乙醇浸泡，过强酸型阳离子交换树脂，收集高浓度氨水洗脱液，浓缩后异硫氰酸苯酯（PITC）柱前衍生，反相高效液相色谱法（RP-HPLC）分析，测定藻类中各氨基酸峰面积并采用归一化法计算其含量。结果：各氨基酸均能依次分离，基线平稳。结论：PITC 柱前衍生反相高效液相色谱法可作为藻类中游离氨基酸的测定手段之一。

2. 对海藻氨基酸粗提液进行测定分析。不同海藻的氨基酸组成和比例基本相似，但也存在一定的种间差异。通过与混合标准氨基酸样品的保留时间及峰型对比定性，检测到海藻样品中除含有多种蛋白质氨基酸外还含有多种未知组分。对未知组分分离纯化收集，鉴定未知组分的结构，最终从铜藻中分离得到 β -丙氨酸。

3. 带形蜈蚣藻甲醇浸提液，真空冷冻浓缩，经过各离子交换树脂分离纯化，薄层层析和 RP-HPLC 检测分析，最终得到一定纯度的非蛋白质氨基酸粗提品。

关键词：游离氨基酸；海藻；反相高效液相色谱

Abstract

Seaweeds are the main lower marine plants, they are regarded as the important primary producers in the ocean. As one of the main sources of marine bioactive chemicals, seaweeds have been proven to have rich organics with interesting biological activities in marine biotoxin, terpenoids, steroids, fatty acid, peptides and special amino acids and so on. All of these are the important sources of developing new drugs. For a long time, the bioactivities and medicinal effects of seaweeds attract the worldwide researchers' attention, including immuno-modifying, reducing blood lipid, antitumour, antiviral, antioxidant, and antibiotic. They have a perspective future in the special sea food, new drugs development, economical bait and so on.

The free amino acids of six kinds of economical marcoalgae and many indoor culture marine mircoalgae were analysed in this paper. Screening out the algae including unknown compounds, exploring and preserving medicinal effects algae, and efficiently extracting and purifying bioactive substances from these plants are our research emphases. The following achievements are concluded:

1. We established a method using phenylisothiocyanate (PITC) precolumn derivatization reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) to detect seventeen kinds of free amino acids. Analysing the free amino acids types and contents provided experimental basis to the algae nutritive value research. Methods: 70% ethanol soaking, using strong acidic cation-exchange resin, collecting high concentration $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ eluent, derivatized with PITC after evaporating the solvent by reduced pressure distillation. RP-HPLC analysed and calculated the area of every peak, then figured the proportion using normalization method. Results: PITC-RP-HPLC could be one of the seaweeds free amino acids analysis methods.

2. We analysed the seaweeds amino acids crude extracts. Different seaweeds' amino acids composition and proportion were similar, but differences existed between species. Compared with the retention time and peak pattern of mixed standard amino

acids, analysed the amino acids of seaweeds, we found that in addition to many kinds of protein amino acids, there were also lots of unknown compounds. Collected the pure unknown chemicals, then identified their structure. We got β -alanine from *Sargassum horneri*.

3. *Grateloupia turuturu* Yamada methanol soaking, vacuum freeze concentration, separating and purifying by using ion-exchange resin, detecting by thin layer chromatography(TLC) and RP-HPLC, and we got crude non-protein amino acids at last.

Key words: free amino acid; seaweeds; RP-HPLC

第一章 绪论

1.1 氨基酸简介

蛋白质是一切生命之源，各种生命活动主要是通过蛋白质来体现^[1]。氨基酸是蛋白质的基本组成单位，是生命有机体的重要组成部分。作为生命控制中心，氨基酸在机体营养供给和防治多种疾病方面发挥着重要的作用^[2]。作为一种重要的生物化工产品，氨基酸不仅广泛应用于食品、医药、化妆品、饲料添加剂等领域，如：多种氨基酸输液制剂和氨基酸口服液可治疗营养或代谢失调；甘氨酸和谷氨酸钠可用做调味剂；赖氨酸、色氨酸和甲硫氨酸等必需氨基酸可用于制造动物饲料；氨基酸也被用于合成特殊化学物质的中间体，如多肽、低热量二肽甜味剂(α -天冬酰苯丙氨酸甲酯)、螯合物及用于合成表面活性剂、药物和其他工业产品^[3]。

自然界除了组成蛋白质的 20 种氨基酸外，还存在许多非蛋白质氨基酸。氨基酸是构成机体蛋白质的基本单位，食物中的氨基酸含量是决定蛋白质营养价值的重要因素。非蛋白质氨基酸不存在于蛋白质分子中，是以游离态和结合态存在于生物体的各种组织和细胞中。

1.1.1 蛋白质氨基酸简介

在 20 种常见蛋白质氨基酸中，按其功能划分，有 8 种必需氨基酸，它们是 L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-苏氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-色氨酸。L-组氨酸是初生儿生长发育期间必需的氨基酸，也称为半必需氨基酸或条件必需氨基酸。这 8 种氨基酸在人体、动物体中占有非常重要的地位，因为它们不能在体内合成或者合成速度远不能满足机体的需求，而必须依靠外界食物供给，若缺乏这些氨基酸则会引起机体生理功能障碍，影响正常代谢，严重者则会导致疾病的发生^[4]。

就市场供给而言，研究表明，近 20 年来，饲料氨基酸（L-赖氨酸、DL-甲硫氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸）快速增涨，占据整个氨基酸市场份额的 56%。而食品氨基酸（L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、L-天冬氨酸）占 32%，L-谷氨酸用于

味精的生产(谷氨酸单钠盐), L-苯丙氨酸和 L-天冬氨酸是合成甜味肽 L-天冬氨酰、L-苯丙氨甲酯(阿斯巴甜) 的初始原料^[2]。

其余的蛋白质氨基酸用于制药和化妆品工业, 它们也是合成手性活性成分的理想原材料, 合成的活性成分可应用于医药、化妆品和农业领域。

1.1.2 非蛋白质氨基酸简介

非蛋白质氨基酸大多是蛋白质中存在的 α -氨基酸的类似物或衍生物, 如磷酸化、甲基化、糖苷化、羟化、交联氨基酸等^[5]。也包括 β 、 γ 、 δ 氨基酸以及 D-氨基酸, 如: β -丙氨酸 (β -alanine)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid)、 δ -氨基乙酰丙酸 (δ -aminolevulinic acid) 等。它们不参与蛋白质合成, 但有些是很重要的代谢物前体或中间产物, 如瓜氨酸与鸟氨酸是合成精氨酸的中间产物。据统计, 从动植物、海洋生物、微生物体内分离得到的非蛋白质氨基酸多达 700 余种, 植物能够产生形形色色的氨基酸作为次生代谢产物, 目前已知的非蛋白质氨基酸中, 大约 300 种发生在植物界, 动物中发现了 50 多种, 其余大部分存在于微生物中^[6]。

随着分离纯化及分析鉴定的技术的不断成熟, 越来越多的非蛋白质氨基酸被研究者们发现。近年来, 随着对其研究的深入, 其生物学功能及药用功效也逐渐被人们了解并开发利用。非蛋白质氨基酸作为药用成分已超过蛋白质氨基酸。部分非蛋白质氨基酸对机体生存和发育有着重要的作用。牛磺酸在维持脑部活动及促进大脑发育方面起着非常重要的作用, 它不出现在蛋白质当中, 是中枢神经系统中含量最丰富的游离氨基酸之一。牛磺酸是婴儿至关重要的营养强化剂, 是胎儿正常发育所必需的。同时, 牛磺酸还具有消炎、抗心律失常等作用^[7, 8]。

除此之外, 非蛋白质氨基酸具有驱虫、降血压、抗结核、抗坏血病等作用。随着人们对非蛋白质氨基酸的深入研究, 非蛋白质氨基酸的药用功效也越来越广泛应用于临床, 造福人类^[9]。

1.2 氨基酸的生物合成

1.2.1 微生物发酵生产氨基酸

广义上来说，氨基酸发酵是指用微生物制造氨基酸的所有方法，狭义的概念是指由碳源和无机氮源(或尿素)大量生产氨基酸的发酵法。微生物发酵是生产氨基酸最有效的方法，通过筛选野生菌株、各种营养缺陷型及抗性菌株，解除代谢调控中的反馈与阻遏，从而合成过量的目标氨基酸^[10]。自 1957 年日本创先采用微生物发酵法工业生产谷氨酸以来，各种氨基酸产品发酵生产的研究呈现欣欣向荣景象。利用微生物发酵法制造的氨基酸最初产品为 L-谷氨酸，其产量最大，其次为赖氨酸。在四种氨基酸生产方法—分离提取法、合成法、发酵法、酶催化法中，氨基酸主要来源于微生物发酵和酶催化法这两种生物工艺过程。由于它们的经济效益和生态优势，使得氨基酸工业发展迅速^[11]。氨基酸发酵法可分为直接发酵法和利用前体进行微生物转化法。由直接发酵法生产的氨基酸有：赖氨酸、丙氨酸、谷氨酸、脯氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、精氨酸、瓜氨酸、苯丙氨酸、及组氨酸等。由前体添加法生产的氨基酸主要有丝氨酸、L-色氨酸、苯丙氨酸。除抗生素外，氨基酸成为发酵法生产的第二个最重要的产品。

发酵法生产氨基酸发展迅速的一个重要原因是使用经过特殊选育的高生物合成能力的菌株。这些菌株最初是从自然界中具有产酸能力的微生物中筛选出，并建立、优化培养条件开始的^[12]。伴随着发酵技术的进步，氨基酸生产菌株通过 DNA 重组、定向突变、细胞融合等基因工程改造，对氨基酸生物合成系统的代谢调节机制及关键酶进行了深入系统的研究，生化工程与生物反应器、微生物或酶的固定化等生物化工技术的应用，大型发酵罐的不断应用于生产，又进一步推动着氨基酸发酵工业的发展，现在大部分氨基酸均可采用微生物发酵生产。

1.2.2 酶法生产氨基酸

发酵法具有原料来源丰富，价格便宜且可直接生产各种 L-氨基酸的优点，但是发酵液中产物浓度较低，生产周期长、发酵过程需严格控制、不能生产 D-氨基酸。然而，酶法可制得 L-型和 D-型氨基酸，还具有产物浓度高、酶反应周

期短、得率高、易分离提纯以及可应用固定化技术而易实现生产自动化、连续化等优点，但酶法需添加与最终产物化学结构相似的底物为原料，相对发酵法来说原料费用高而受限制，从长远看，酶法是发展氨基酸生产大有潜力的好方法。

酶催化可用来生产蛋白氨基酸、非蛋白氨基酸及其它氨基酸衍生物。酶催化法是在发酵工业的基础上发展起来的，酶催化效率很高，一般情况下其催化效率是无机催化剂的 10^{10} 倍^[13]，而且酶只能催化一种或一类相似的化学反应，对底物具有高度的专一性。在工业上，利用生物体细胞内特定的酶或细胞作为催化剂，利用其只对某种特殊的旋光或立体异构物起催化作用，而对其对映体没有作用生产氨基酸的方法具有极大的学术意义和广阔的应用前景。如 D-氨基酸氧化酶与 DL-氨基酸作用时，只有 D 型底物能被分解，因此，可以此法来分离消旋化合物，生产具有光学活性的氨基酸。利用酶的专一性还能进行食品分析。酶的专一性在食品加工上极为重要。

大多数酶的本质是蛋白质。酶的作用条件一般在温和的条件下，如中性 pH、常温常压下进行。强酸、强碱或高温条件都能使酶活性部分或全部丧失。因此，与发酵法相比，酶催化法具有副产物少、易于分离精制、经济可行等优点。与化学法相比，酶催化法具有反应条件温和，专一性强、环境污染少等优点。酶催化法的突出优点在于可以生产难以用发酵法或化学合成法制备的光学活性氨基酸及一些 D-氨基酸、氨基酸衍生物等。这在药用氨基酸生产中的应用尤为显著。

酶催化法很多时候是以发酵法或化学合成法的中间产物作为底物，而不能像发酵法由简单的原料生产目标产物，所以在工业生产当中酶催化法与发酵法相互补充、相互配合。酶与底物的特异性结合特点是实现生物催化的基础，定向进化等先进技术将有助于开发出选择性高、稳定好的酶，尤其是对新产品的开发具有一定指导意义。目前工业生产上常用的酶主要有氨基酰化酶、内酰胺酶、氨肽酶、氨裂合酶，转氨酶^[14]。

目前，制约酶催化法在工业上发展的主要因素是廉价底物的获取，它将很大程度上降低生产成本，这是实现工业化生产的重要因素之一。专一性且高效性的酶的选择及全细胞生物催化剂的制备获取也是需要进一步研究开发的技

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库