

苯甲醛反应沉淀分离 L-精氨酸

翁连进, 杨欣, 王士斌, 甘林火, 邹建辉

(华侨大学化学工程系, 福建 泉州 362011)

摘要: 考察了 pH 值、苯甲醛与 L-精氨酸的摩尔比、氯化钠和氯化铵浓度、L-赖氨酸与 L-精氨酸的质量比及 L-精氨酸初始浓度等因素对苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的影响。结果表明, 苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的 pH>11 为宜; 苯甲醛与 L-精氨酸的摩尔比为 1.25 时, L-精氨酸的沉淀率可达到 90% 以上; 氯化钠对沉淀基本上没有影响, 而氯化铵浓度增大则沉淀率迅速下降; 当 L-赖氨酸与 L-精氨酸的质量比小于 1 时 L-精氨酸沉淀率仍可以在 80% 以上, 当它们的质量比大于 1 以后, 沉淀率迅速下降; L-精氨酸初始浓度应在 15 g/L 以上才可保证沉淀在 90% 以上。

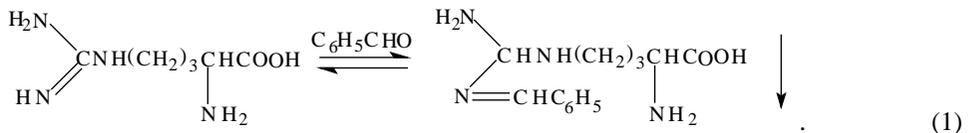
关键词: 苯甲醛; L-精氨酸; 沉淀

中图分类号: TQ464.7 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2004)02-0109-05

1 前言

L-精氨酸是人及动物的半必需氨基酸, 在医药方面有重要的应用。虽然已有发酵法生产 L-精氨酸的报道, 但由于一些废弃蛋白如人发、猪毛、猪血粉等中含 L-精氨酸量较高, 来源丰富, 从这些蛋白酸解中和液中提取 L-精氨酸仍具有相当的经济效益。

苯甲醛沉淀法^[1-4]是报道较早的从蛋白酸解液中提取 L-精氨酸的一种方法, 是利用 L-精氨酸的胍基与苯甲醛在低温下反应生成苯亚甲基精氨酸沉淀物的特定反应, 把 L-精氨酸与其它的氨基酸分离, 再经精制得 L-精氨酸或 L-精氨酸盐酸盐。苯甲醛沉淀 L-精氨酸的反应式如下:



蛋白质酸解产生的氨基酸中只有 L-精氨酸有胍基, 因此这个反应的选择性很高。从人发中提取 L-精氨酸的提取率约为 15%, 而从鸡毛提取则约为 35%^[3], 沉淀率确实不高, 有时甚至很难产生沉淀。原因可能是蛋白酸解液中成份太复杂, 除 L-精氨酸外, 还含有十几种 L 型蛋白氨基酸; 蛋白酸解液经碱中和, 酸解后的中和液中存在大量的无机盐, 无机盐的存在可能影响了沉淀的进行。由于 L-精氨酸的提取率不高, 该工艺在工业上的应用不多。

目前已有的文献均为具体工艺的简单说明, 缺乏对影响苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的各种因素的系统研究, 难以对该工艺进行改进。本工作考察了 pH 值、苯甲醛与 L-精氨酸的摩尔比、氯化钠和氯化铵浓度、L-赖氨酸与 L-精氨酸的质量比及 L-精氨酸的初始浓度等因素对苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的影响, 为该工艺的改进提供了依据。

收稿日期: 2003-08-04, 修回日期: 2003-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 39800040, 30370415); 国务院侨办科研基金资助项目(编号: 02QZR01); 福建省自然科学基金资助项目(编号: E9910018, E0310020)

作者简介: 翁连进(1969-), 男, 博士, 副教授, 福建省泉州市人, 从事生物物质分离提纯研究, E-mail: ljweng6907@hotmail.com.

2 实验

2.1 仪器与试剂

UV-1200 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), PHS-3C 型 pH 计(上海雷磁仪器厂), BP210S 电子天平(德国赛多利斯公司).

L-精氨酸(生化试剂, 上海源聚生物科技有限公司), 苯甲醛(分析纯, 上海化学试剂公司), 其它均为分析纯试剂.

2.2 L-精氨酸测定方法

溶液中 L-精氨酸的浓度按文献[5]的方法测定.

2.3 实验方法

反应沉淀过程: 将配制好的 L-精氨酸溶液置于冰浴中, 搅拌下缓慢滴加苯甲醛, 反应过程中用 pH 计测量反应体系的 pH, 并用少量固体氢氧化钠中和因反应而产生的氢离子, 使整个反应过程 pH 的变化范围内维持在 0.2, 完全滴加苯甲醛后继续搅拌至 pH 不再变化, 于冰箱中静置 24 h 以上. 过滤, 取滤液测定其中的 L-精氨酸浓度, 用差量法确定 L-精氨酸的沉淀率.

pH 对沉淀率影响实验: L-精氨酸溶液的 pH 为其等电点 10.76, 分别用浓盐酸调低 pH 或固体氢氧化钠调高 pH 值, 再进行反应沉淀.

苯甲醛与 L-精氨酸的摩尔比对沉淀影响实验: 分别取若干份相同体积的已调节 pH 至 11 的 L-精氨酸溶液, 根据不同摩尔比计算出所需的苯甲醛体积, 用刻度移液管准确移取并缓慢滴加到 L-精氨酸溶液中, 进行反应沉淀.

杂质对 L-精氨酸沉淀影响实验: 先移取一定体积的 L-精氨酸溶液若干份, 根据不同实验目的用电子天平准确称取所要加入的杂质质量, 加少量氢氧化钠调节至预定 pH, 再滴加苯甲醛进行反应沉淀.

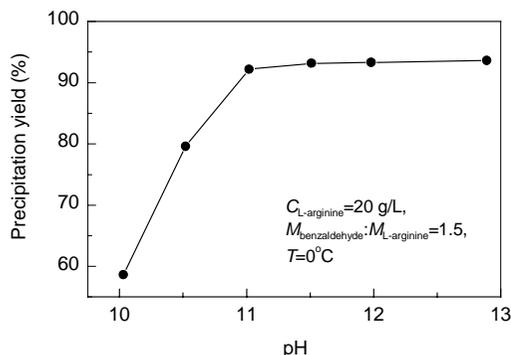


图1 平衡 pH 值对 L-精氨酸沉淀率的影响

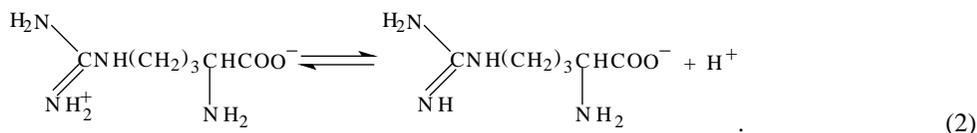
Fig.1 Effect of pH on precipitation yield of L-arginine

3 结果与讨论

3.1 pH 值对 L-精氨酸沉淀率的影响

从苯甲醛与 L-精氨酸的反应式可见, 反应过程与溶液的 pH 有关. 图为 L-精氨酸的沉淀率与反应平衡的 pH 之间的关系. 从图 1 可见, 苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的 pH 值在 11 以上时, 才能使沉淀率达 90%.

pH 对苯甲醛与 L-精氨酸反应的影响主要与 L-精氨酸上的胍基的电离状态有关, L-精氨酸上的胍基易与氢离子结合, 为了使该反应能够进行, 必须将胍基上结合的氢离子解离. 胍基上氢离子解离方程式如下:



胍基上氢离子解离常数 $pK_R = 10^{-12.48}$, 只有当溶液中 pH 达到较高(11 左右)时, 才有明显的解

离发生,使 L-精氨酸与苯甲醛发生沉淀反应.因此在用苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸时应将 pH 调节到高于 11.

3.2 苯甲醛与 L-精氨酸摩尔比的影响

苯甲醛与 L-精氨酸的反应是可逆反应,按摩尔比 1:1 加入苯甲醛不能使 L-精氨酸反应沉淀达较高程度,根据可逆反应平衡移动原理,适当加入反应物苯甲醛,以提高 L-精氨酸的反应沉淀率.

不同的苯甲醛与 L-精氨酸摩尔比对沉淀率的影响如图 2 所示.从图可见,当苯甲醛与 L-精氨酸的摩尔比为 1.25 时,沉淀率达到了 90.93%,再增大摩尔比虽然还能略微增大沉淀率,但加入苯甲醛所耗成本上升.苯甲醛与 L-精氨酸的最适摩尔比可选 1.25.

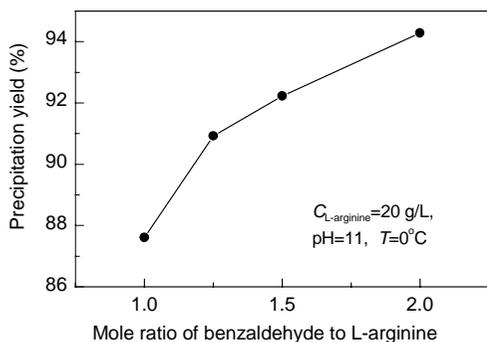


图 2 苯甲醛与 L-精氨酸摩尔比对沉淀率的影响

Fig.2 Effect of mole ratio of benzaldehyde on precipitation yield of L-arginine

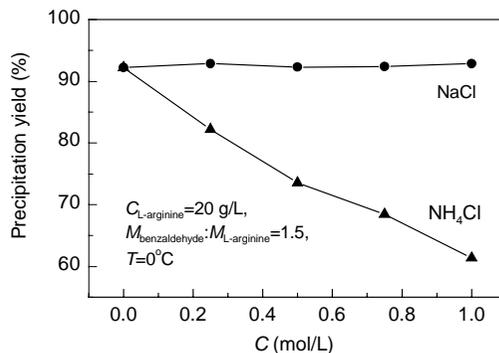


图 3 氯化钠和氯化铵对沉淀率的影响

Fig.3 Effect of NaCl or NH₄Cl concentration on L-arginine precipitation yield

3.3 氯化钠和氯化铵对苯甲醛沉淀 L-精氨酸的影响

蛋白质酸解通常用盐酸,酸解后用氢氧化钠、氨水或液氨中和,因此中和液中含有大约 4 mol/L 的氯化钠或氯化铵.图 3 是分别在不同浓度的氯化钠和氯化铵存在下苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的沉淀率.从图可见,氯化钠的存在对苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸基本没有影响,而氯化铵浓度增大则苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的沉淀率下降.

由于氯化铵是强酸弱碱盐,加入氢氧化钠调节溶液的 pH 值时,会产生 NH₃-NH₄Cl 缓冲体系,因此在实验中, pH 很难调节至 11,溶液中氯化铵含量越高,则溶液的 pH 越低,实验中氯化铵浓度从 0.25 mol/L 递增至 1.0 mol/L,而溶液 pH 由 10.5 递减到 10,与 3.1 节的结果比较可见,氯化铵存在使 L-精氨酸的沉淀率下降,主要原因是由于 NH₃-NH₄Cl 缓冲体系的形成造成反应体系 pH 下降引起的.

从实验结果分析可知,必须尽可能除去蛋白酸解中和液中的铵盐或蛋白质的酸解液用钠碱来中和,才能使 L-精氨酸的沉淀率达到较高的程度.

3.4 L-赖氨酸对苯甲醛沉淀 L-精氨酸的影响

蛋白酸解中和液中含有除 L-色氨酸外的所有其它蛋白氨基酸,其中 L-赖氨酸、L-脯氨酸等极易溶于水,蛋白酸解中和液经浓缩后,这些极易溶的氨基酸仍保留在溶液中,它们的浓度较高,这些氨基酸的大量存在可能对 L-精氨酸的沉淀产生影响.以 L-赖氨酸为例来考察杂质氨基酸对苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的影响.图 4 为苯甲醛沉淀 L-精氨酸的沉淀率随 L-赖氨酸与 L-精氨酸质量比的增大而变化的情况.从图可见,随 L-赖氨酸与 L-精氨酸的质量比的增大,L-精氨酸沉淀率迅速下降.

在碱性条件下,苯甲醛只与含有胍基的氨基酸反应,在 18 种蛋白氨基酸中只有 L-精氨酸有胍基,可以排除苯甲醛与 L-赖氨酸反应的可能. L-精氨酸沉淀率受 L-赖氨酸影响可能与两种不同氨基酸在水溶液相互促进溶解有关. 两种不同氨基酸在水溶液共存时的溶解度有两种不同的趋势,一种是相互促使溶解度减小,一种是相互促进溶解度增大,虽然有关的研究报道不多,特别是有关 L-精氨酸与另外一种氨基酸在溶液中的溶解度的报道更少,但已有文献表明两种不同氨基酸在溶液中共存时相互促进溶解,文献[6]报道了 DL-丙氨酸和 DL-丝氨酸在水溶液中共存时相互促进溶解. 精氨酸的胍基与苯甲醛发生反应,但其氨基与羧基仍然存在,因此苯亚甲基精氨酸的分子结构仍具有氨基酸的基本特点,它可能与 L-赖氨酸有互溶作用,增大了苯亚甲基精氨酸在溶液中的溶解度,形成了随着溶液中 L-赖氨酸与 L-精氨酸质量比的增大 L-精氨酸的沉淀率下降的现象.

文献[3]的实验结果为 L-赖氨酸与苯亚甲基精氨酸在溶液中相互促溶的推测提供了有力的支持. 以苯甲醛沉淀法分别从人发和鸡毛酸解中和液中提取 L-精氨酸,人发中提取的收率(以人发质量计)为 1.2%左右,而从鸡毛中提取的收率(以鸡毛质量计)为 2.1%. 人发中含精氨酸约为 7%,以此计算 L-精氨酸的收率为 15%,鸡毛中含精氨酸为 5.4%,L-精氨酸计算收率达到 35%. 鸡毛中精氨酸含量比人发低,但精氨酸的提取率反而高,这只能从二者蛋白质中各种氨基酸含量的区别来探索原因. 文献[7]列出了鸡毛中各种氨基酸的含量,其中 L-赖氨酸仅为 0.2%. 人发中 L-赖氨酸含量没有直接的报道,但可以从生产胱氨酸的一次母液中 L-精氨酸与 L-赖氨酸的含量比来推测,由于 L-赖氨酸和 L-精氨酸在水中的溶解度很大,这两种氨基酸近乎完全地保留在人发生产胱氨酸的一次母液中. 用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定的胱氨酸母液干粉中含 L-精氨酸 5.00%,含 L-赖氨酸 1.75%^[8],可见人发中 L-赖氨酸含量比鸡毛中含量高得多,可能正是人发中 L-赖氨酸含量较高因而对 L-精氨酸沉淀的影响较大,使得苯甲醛沉淀法从人发中提取 L-精氨酸的提取率反而低,间接证明了 L-赖氨酸可能与苯亚甲基精氨酸在溶液产生相互促溶作用.

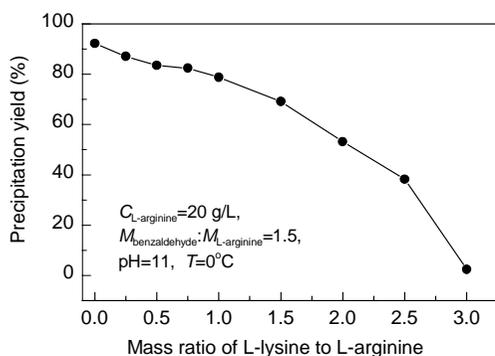


图 4 L-赖氨酸对苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的影响
Fig.4 Effect of mass ratio of L-lysine to L-arginine on precipitation yield of L-arginine

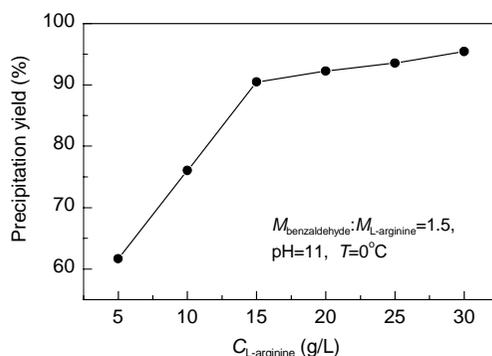


图 5 L-精氨酸初始浓度对其沉淀率的影响
Fig.5 Effect of initial L-arginine concentration on precipitation yield

3.5 L-精氨酸初始浓度对其沉淀率的影响

图 5 是 L-精氨酸初始浓度对其沉淀率的影响. 从图可见,沉淀率随 L-精氨酸初始浓度增大而增大,当 L-精氨酸初始浓度在 15 g/L 时,L-精氨酸的沉淀率达到 90%. 这种现象说明苯亚甲基精氨酸在水中有一定的溶解度, L-精氨酸的初始浓度较小时,所产生的苯亚甲基精氨酸大部分溶解于水中,因此沉淀率较低. 采用苯甲醛沉淀 L-精氨酸时,为了达到较高的沉淀率,对 L-精氨酸的

初始浓度有一定的要求,如果原料液中 L-精氨酸浓度太低,必需先进行一定程度的浓缩以保证要求的 L-精氨酸初始浓度.

4 结 论

- (1) 苯甲醛反应沉淀 L-精氨酸的 pH 高于 11 为宜.
- (2) 苯甲醛的加入量以苯甲醛与 L-精氨酸的摩尔比在 1.25 为佳.
- (3) 氯化钠的存在对 L-精氨酸的沉淀基本没有影响;氯化铵的存在则由于生成了 $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 缓冲体系,使反应体系 pH 难以调至高于 11,致使 L-精氨酸沉淀率降低.
- (4) L-精氨酸的沉淀率随 L-赖氨酸含量的增大而降低.
- (5) L-精氨酸的初始浓度不能过低,必须在 15 g/L 以上.

参考文献:

- [1] 李良铸,李明焯. 最新生化药物制备技术 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2002. 68.
- [2] 林元藻,王凤山,王转花. 生化制药学 [M]. 北京:人民卫生出版社,1998. 75.
- [3] 郑连义,徐志栋,康怀平. 人发和鸡毛水解提取胱氨酸和精氨酸 [J]. 中国生化药物杂志,1998,19(4): 189-190.
- [4] 张伟国,钱和. 氨基酸生产技术及其应用 [M]. 北京:中国轻工业出版社,1997. 196.
- [5] 胡桂娟,刘寄明,刘嘉芬. 化学法测定精氨酸总量 [J]. 落叶果树,1995,1: 22.
- [6] Kuramochi H, Noritomi H, Hoshino D, et al. Measurements of Solubilities of Two Amino Acids in Water and Prediction by the UNIFAC Model [J]. Biotechnol. Progr., 1996, 12(3): 371-379.
- [7] 张伟国,钱和. 氨基酸生产技术及其应用 [M]. 北京:中国轻工业出版社,1997. 143.
- [8] 王晓明. 胱氨酸母液粉中氨基酸含量与营养评价 [J]. 江汉大学学报,2000,17(3): 21-23.

Separation of L-arginine by Reacting Precipitation with Benzaldehyde

WENG Lian-jin, YANG Xin, WANG Shi-bin, GAN Lin-huo, ZOU Jian-hui

(Department of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou, Fujian 362011, China)

Abstract: Effects of pH, mole ratio of benzaldehyde to L-arginine, NaCl and NH_4Cl concentrations, mass ratio of L-lysine to L-arginine and initial L-arginine concentration on L-arginine precipitation yield by reacting with benzaldehyde were investigated. Results show that the maximum precipitation yield(90%) is reached at pH higher than 11 and mole ratio of L-lysine to L-arginine of 1.25, the yield hardly changes with the increase of NaCl concentration but decreases sharply with the increase of NH_4Cl concentration, the precipitation yield also decreases with the increase of mass ratio of L-lysine to L-arginine. The initial L-arginine concentration should be more than 15 g/L to keep over 90% precipitation yield.

Key words: benzaldehyde; precipitation; L-arginine