

文章编号:1673-1689(2010)06-0895-06

啤酒酵母谷胱甘肽的高效抽提方法

杨海麟, 张玉然, 辛瑜, 仝艳军, 张玲, 王武*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:建立了一种从酿酒酵母干细胞中高效抽提谷胱甘肽(GSH)的新方法,料液比为 1:8,采用醋酸-盐酸调节抽提 pH 值为 3.5,抽提温度 $(70\pm 1)^\circ\text{C}$ 的条件下,GSH 抽提量可达 5.50 mg/g,比已报道的其它抽提法提高 54.49%~62.24%。抽提液经微滤(膜孔径 0.45、0.22 μm)、超滤(膜截留相对分子质量 5 000)处理,蛋白质总去除率为 60.98%。所得超滤液经高效液相法和氨基酸分析仪分析表明,粗提物中的杂质除蛋白质、小肽外,氨基酸类杂质主要为谷氨酸,为 GSH 的进一步精制提供了基础数据。

关键词:酿酒酵母;谷胱甘肽(GSH);抽提;微滤;超滤;分析

中图分类号:TS 201.2

文献标识码:A

An Efficient Method for Glutathione Extraction from Dried *Saccharomyces* Cells

YANG Hai-lin, ZHANG Yu-ran, XIN Yu, TONG Yan-jun, ZHANG Ling, WANG Wu*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract:An efficient method for glutathione(GSH) extraction from the dried *Saccharomyces* cells was proposed in this study. During extraction at $(70\pm 1)^\circ\text{C}$, the mixture of acetic acid-hydrochloric acid was used to adjusted pH 3.5, the ratio of solid to liquid (w/v) was kept at 1:8. GSH extraction result reached at 5.5 mg/g, which was 54.49% -62.24% higher than that of all of the reported extraction process. After treatment through micro-filtration (0.45、0.22 μm) and ultra-filtration (5 kD MWCO), 60.98% of the yeast protein was removed. The collection from ultrafiltration was analyzed by high performance liquid chromatography and amino acid analyzer, the result showed that glutamic acid was the major portion in amino acids impurity besides protein and small peptide in crude extract, and these would provide basic data for purifying GSH.

Key words: *Saccharomyces*, glutathione (GSH), ectraction, micro-filtration, ultra-filtration, analysis

谷胱甘肽(GSH)是一种具有重要生理功能的 天然活性三肽(L- γ -谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨

收稿日期:2009-10-22

基金项目:江南大学自主科研计划学科交叉创新团队基金项目(1042050205091140)。

作者简介:杨海麟(1971—),男,江苏无锡人,工学博士,副教授。主要从事发酵工程研究。

Email:19891996@sinan.com

* 通信作者:王武(1952—),女,福建福州人,教授,博士生导师,主要从事发酵工程、遗传工程的研究。

Email: wangwu@jiangnan.edu.cn

酸)^[1], 在空气中易氧化为氧化性谷胱甘肽(GSSG), 具有抗氧化、解毒、改善风味等作用, 在临床医学、食品行业、化妆品行业等领域有着广泛的用途^[2], 近期研究发现 GSH 还具有抑制艾滋病的作用^[3]。目前国内的 GSH 整体分离纯化技术较为落后, 致使产品质量在纯度、浓度等方面难以不能满足医药和食品行业的要求, 高纯度 GSH 产品大多依靠进口。生产出符合食品医药级要求的高纯度 GSH 产品亟待解决。GSH 的生产方法以发酵法为主, 从发酵液中分离提取 GSH 的方法主要有铜盐法、金属螯合亲和色谱法^[4]、离子交换树脂分离法^[5]等, 其中以离子交换树脂分离法最为有效, 生产成本最低, 易于工业化。

在 GSH 的抽提方法中, 陈娜等^[6]以面包酵母为原料研究了超声波破碎法, GSH 抽提量为 3.975 mg/g, 但细胞破壁后胞内蛋白质、色素、核酸等杂质大量溶出, 将对后期的膜过滤和树脂分离带来困难, 且难以工业化应用; 林志兴等^[7]以酿酒酵母为原料研究了热水抽提法, 克服了破壁的缺陷, GSH 抽提得率仅为 0.301%; 熊志强等^[8]以酿酒酵母为原料研究了乙醇抽提法, 此抽提法蛋白质浸出量更少, 但与热水抽提法所得 GSH 抽提量差别不大, 且抽提时间较长(60 min), 综上所述, 一种高 GSH 抽提量、低杂质浸出量的快速节能的抽提方法仍有待于探讨。

为解决上述问题, 本实验对抽提啤酒酵母 GSH 的方法进行改进, 采用醋酸-盐酸调节抽提前 pH, 并对相关条件进行优化。发现此改进的方法 GSH 抽提量最高可达 5.50 mg/g, 与以上抽提方法进行实验比较, 其 GSH 抽提量比其它方法提高 54.49%~62.24%, 蛋白浸出量增加不大。抽提液经微滤、超滤技术处理后, 蛋白质总去除率为 60.98%, 并对超滤液成分和稳定性探讨分析, 为离子交换树脂法(得到高纯度 GSH 最有效节能的方法)精提纯化 GSH 提供有利条件和参考。此法 GSH 抽提量高、杂质浸出量低、快速节能易操作, 可为工业上综合利用废啤酒酵母提取 GSH 提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

市售安琪啤酒干酵母。

1.2 主要试剂

GSH 与 GSSG 纯品: 日本协和公司产品; DT-NB 试剂: 上海世泽生物科技有限公司产品, SIG-

MA 公司分装; 乙腈(色谱纯): 江苏汉邦科技有限公司生产产品; 其它试剂均为化学分析纯。

1.3 主要仪器

Agilent 高效液相色谱系统: 美国安捷伦公司生产; 安捷伦氨基酸分析仪: 美国安捷伦公司生产; 3K15 低温高速离心机: 德国 SIGMA 公司产品; 超滤装置: 中科院上海应用物理所膜分离技术研究发展中心研发; 微滤杯: 天津市津腾实验设备有限公司生产; UV754 紫外可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司生产。

1.4 实验方法

1.4.1 GSH 抽提法(醋酸-盐酸调节抽提前 pH)条件的优化 各取 3 g 啤酒干酵母, 加入 27 ml 去离子水中, 其中 3 组先加冰醋酸调抽提前 pH 3.7, 再加浓盐酸调抽提前 pH 分别为 2.3、3.0、3.5, 其中 2 组加冰醋酸调抽提前 pH 4.0、5.0, 其中一组加浓盐酸调抽提前 pH 3.5, 另取一组不加酸调节抽提前 pH 作为对照, 84±1℃下, 搅拌加热 14 min; 各取 10 mL 去离子水, 分别按料液比 1:6.7、1:7.1、1:8、1:10、1:12.5、1:20、1:40 加入啤酒干酵母, 混匀, 醋酸-盐酸(先加冰醋酸调 pH 约 3.7, 再加浓盐酸)调节 pH 为 3.5, 61±1℃下, 搅拌加热 14 min; 各取 10 ml 去离子水, 加入 1.25 g 啤酒干酵母, 混匀, 醋酸-盐酸(先加冰醋酸调 pH 约 3.7, 再加浓盐酸)调节 pH 为 3.5, 分别在 5 个不同的温度(50±1)、(60±1)、(70±1)、(80±1)、(90±1)、(94±1)℃下, 搅拌加热 14 min。以上各组加热搅拌后均置于冰箱中冷却至室温离心(6 000 r/min, 12 min), 测定不同条件下上清液中 GSH 的浓度。

1.4.2 几种 GSH 抽提方法的比较 参照文献报道方法, 在各自不同最优化的条件下, 把改进的 GSH 抽提法与几种报道的 GSH 抽提方法进行比较。其中超声波破碎法^[6]的输出功率为 800 W, 间隔时间/工作时间为 2 s/1 s, 破壁率为 90.9%; 乙醇抽提法^[8]中使用的为体积分数 25% 的乙醇; 热水抽提法^[9]抽提后菌液用盐酸调 pH 为 3.00; 以上各方法抽提后的菌液, 均置于冰水浴中冷却至室温, 离心(6 000 r/min, 12 min), 测定上清液体积, 及其中 GSH 和蛋白质浓度。

1.4.3 抽提液的膜过滤及其超滤液稳定性 在真空度为 0.095 MPa 下, 取 pH 2.0 的 500 mL 抽提样液, 分别采用含孔径 0.45 μm 和 0.22 μm 混合纤维素酯微孔滤膜的微滤设备进行分级微滤, 依次测定微滤前后样液中 GSH 和蛋白质含量; 取 pH 2.0 的 300 mL 微滤的样液, 在膜压差 ΔP=0.25 MPa

下,采用含截留相对分子质量 5 000 聚醚砜超滤膜的超滤设备进行超滤,测定超滤前后样液中 GSH 和蛋白质含量,并采用高效液相法(HPLC)和氨基酸分析仪分别测定超滤液中 GSH 的纯度及氨基酸的种类含量;取超滤液各 25 mL,浓盐酸分别调节 pH 为 2.0、4.3、6.0、7.0,放置于层析柜内(24±1)℃,计时,测定在 0、50、90、180 min 时超滤样液中 GSH 的浓度。

1.5 测定方法

1.5.1 GSH 的含量测定(DTNB 法) 改进的 Ellman's 测定方法^[9],试管中共 16 mL 反应体系,含有 0.8 mL DTNB 溶液(4 mmol/L DTNB,0.1 mol/L Na₂HPO₄),一定体积的 Na₂HPO₄ 缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.98)和样品溶液,漩涡混合器混合后,室温静置 6 min,测定 412 nm 处样液 OD 值,根据建立的标准曲线计算测定样品中 GSH 的浓度。

$$\text{料液比} = \frac{\text{干酵母总量(g)}}{\text{去离子水体积(mL)}}$$

$$\text{GSH 抽提量} = \frac{\text{菌液离心后上清液中 GSH 质量(mg)}}{\text{干酵母总量(g)}}$$

$$\text{蛋白质浸出量} = \frac{\text{菌液离心后上清液中蛋白质质量}}{\text{干酵母总量(g)}}$$

$$\text{GSH 收率(\%)} =$$

$$\frac{\text{膜过滤后溶液中 GSH 质量(mg)}}{\text{膜过滤前溶液中 GSH 质量(mg)}} \times 100$$

1.5.2 GSH 的纯度测定 采用高效液相检测法(HPLC),色谱条件:色谱柱为 Agilent C18 柱 150 mm×4.6 mm,5 μm;流动相为磷酸盐溶液(取磷酸二氢钾 2.72 g,庚烷磺酸钠 1.21 g,加水溶解,定容至 1 L,磷酸调节 pH 至 2.5)-乙腈(125:1);体积流量为 0.7 mL/min;检测波长 220 nm。柱温 25℃,进样 10 μL。

1.5.3 蛋白质含量测定 采用 Bradford 检测法,见参考文献[11]。

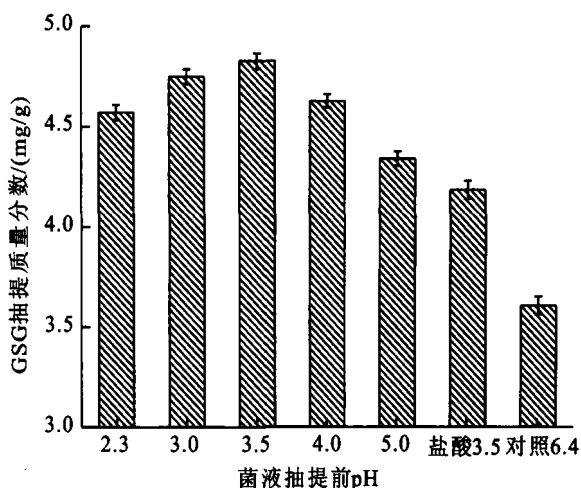
1.5.4 氨基酸组成测定 采用氨基酸 OPA FMOC 柱前衍生化,氨基酸分析仪测定,色谱条件:色谱柱为 ODS HYPERSIL 250 mm×4.6 mm,5 μm;流速为 1.0 mL/min;柱温 40℃;检测波长 338 nm,262 nm(Pro,Hypro)。

2 结果与讨论

2.1 GSH 抽提法(醋酸-盐酸调节抽提前 pH)条件的优化

2.1.1 抽提 pH 对 GSH 抽提量的影响 由图 1 可

知,抽提前 pH 3.5 时,GSH 抽提量最大,且离心后抽提液在 pH 2.3 和 3.0 时较为浑浊,杂质较多,在 pH 为 4.0 和 5.0 时色素相对较深;在抽提前 pH 3.5 下,醋酸-盐酸调节比盐酸调节时,GSH 抽提量提高 15.38%,这可能是由于醋酸及其盐在 pH 3.5~5.0 时具有较好的缓冲能力,使抽提前后菌液 pH 较稳定(仅由 3.5 升至 3.9),而盐酸调节时菌液 pH 抽提前后波动较大(由 3.5 升至 5.4),较低且稳定的抽提 pH 有利于 GSH 的释放,因此选用醋酸-盐酸调节抽提前 pH 3.5 最佳。



注:a. pH 2.3~5.0 的溶液使用醋酸-盐酸调节;b. 对照组自然 pH 值为 6.4

图 1 抽提 pH 对 GSH 抽提量的影响

Fig. 1 Effect of pH on extraction of GSH

2.1.2 料液比对 GSH 抽提量的影响 由图 2 可知,GSH 抽提量在料液比 1:40 时最大,1:8 时次之。前者比后者 GSH 抽提抽高 5.18%,但使用去离子水的量是后者的 5 倍,综合生产中减少劳动强度、节水节能考虑,选择料液比 1:8 时较适宜。

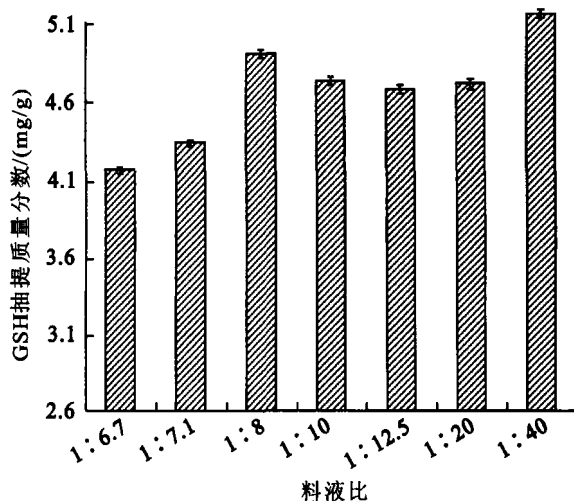


图 2 料液比对 GSH 抽提量的影响

Fig. 2 Effect of the ratio of solid to liquid on GSH extraction

2.1.3 抽提温度对 GSH 抽提量的影响 由图 3

可知,随着温度的升高 GSH 抽提量先升高再下降,其中以 $(70\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 最大。温度较低可能会使细胞膜通透性差,GSH 没有更好的从膜内释放,温度过高可能会导 GSH 的氧化,因此选择 $70\pm 1^{\circ}\text{C}$ 为最佳抽提温度。

2.2 几种 GSH 抽提方法的比较

由表 1 可知,超声波破碎法和改进的抽提法 GSH 抽提量最高,分别为 6.11 和 5.50 mg/g,后者比前者低 9.98%,但改进的抽提法得到的抽提液蛋白、色素等杂质含量也远远低于超声波破碎法,对下一步的离子交换法精提 GSH 有利;热水抽提法和乙醇抽提法的蛋白浸出量比改进的抽提法少 10.36%和 14.34%,但改进的抽提法 GSH 抽提量分别比二者提高 54.49%和 62.24%,且抽提温度低、料液比相对较大。综合考虑,改进的抽提法(醋酸-盐酸调节抽提前 pH)最佳。为使离子交换法更

好的精提 GSH,以下采用膜过滤方法去除离心后抽提液中的菌体、蛋白等杂质。

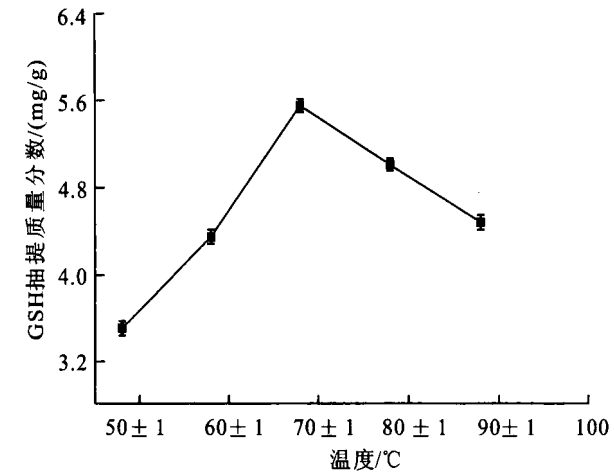


图 3 抽提温度对 GSH 抽提量的影响
Fig. 3 Effect of extraction temperature on the GSH extraction

表 1 几种 GSH 抽提方法的比较
Tab. 1 The Comparison of some types of GSH extractions

方法与结果	料液比	抽提温度/ $^{\circ}\text{C}$	抽提时间/min	抽提前 后菌液 pH	GSH 抽提质量 分数/(mg/g)	蛋白浸出量/ (g/g)
超声波破碎法	1 : 11	—	15	6.5(自然 pH)~6.7	6.11	*
热水抽提法	1 : 12	90	12	6.5(自然 pH)~6.4	3.56	0.225
乙醇抽提法	1 : 7	20	60	6.3(自然 pH)~6.2	3.45	0.215
改进的抽提法	1 : 8	70 ± 1	14	3.5(醋酸—盐酸调 pH)~3.9	5.50	0.251

注:1.“*”表示超声波破碎后,胞内物质释放至上清液中,杂质干扰测定;2. 改进的抽提法即上述醋酸-盐酸调节抽提前 pH 时的抽提方法。

2.3 抽提液的膜过滤及其超滤液稳定性

2.3.1 抽提液的膜过滤 在上述最优化的抽提条件下,GSH 抽提量最高为 5.5 mg/g,蛋白浸出量为 0.251 g/g,上清液中还带有核酸、多糖、色素等杂质,若直接把抽提液上离子换柱进行分离,会使树脂 GSH 吸附量降低,也影响 GSH 产品纯度的提高,以下采用不同孔径的微滤膜和超滤膜对抽提样液处理,测定滤液中 GSH 和杂蛋白浓度,计算 GSH 收率和杂蛋白去除率,结果见表 3。

表 2 抽提样液膜过滤结果
Tab. 2 The results of membrane filtration about extraction solution

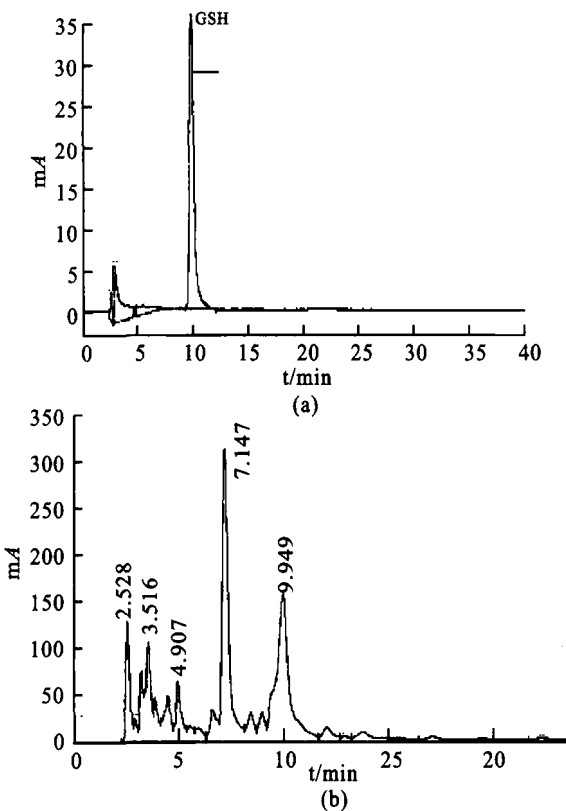
过膜步骤	GSH 收率/%	蛋白质去除率/%	GSH 总收率/%	蛋白质总去除率/%
0.45 μm 膜微滤	91.48	16.50	91.48	16.50
0.22 μm 膜微滤	96.60	19.65	88.37	32.91
5 kD 膜超滤	86.00	41.79	76.00	60.98

由表 2 可知,经过膜过滤后,杂蛋白已被大量去除,超滤液中蛋白质含量为 0.098 g/g,且离心后残留的菌体、色素减少,溶液变澄清,这将提高离子交换树脂的利用率。以下为对超滤液中进行高效液相分析的图谱(见图 4)。

由图 4 可知,超滤后样液中 GSH 在 9.949min 处出峰,由于样液中存在色素、蛋白和其他小分子杂质,从图谱来看 GSH 纯度不高,若要得到高纯度的 GSH 纯品,后续的离子交换层析很有必要的。由于膜过滤技术,已去除了大部分杂蛋白,滤液中的氨基酸的成分含量有可能成为 GSH 分离时的主要干扰物质,以下为超滤后样液中氨基酸的分析图谱结果。

由图 5、表 3 可知,超滤液中谷氨酸的质量浓度最高(2.287 g/L),比滤液中 GSH 含量(DTNB 法测定为 0.653 g/L)的 3.5 倍,成为影响 GSH 纯度的主要小分子物质,后续离子交换层析条件的摸索应主要以分离氨基酸(谷氨酸为主)和 GSH 为指标

进行探讨。



注:A 图为 GSH 纯品的 HPLC 图谱,B 图为超滤后样液的 HPLC 图谱

图 4 超滤后样液的 HPLC 图谱

Fig 4 HPLC chromatogram of solution after ultra-filtration

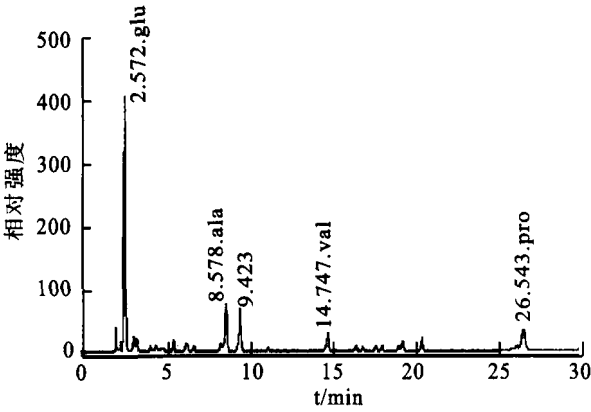


图 5 超滤后样液中氨基酸组分分析

Fig 5 Amino acid analysis about the solution ultra-filtration

表 3 超滤后样液中氨基酸组分分析

Tab.3 Amino acid analysis about solution ultra-filtration

氨基酸名称	质量浓度/(g/L)	氨基酸名称	质量浓度/(g/L)
谷氨酸	2.287	苯丙氨酸	0.072
脯氨酸	0.390	异亮氨酸	0.061
丙氨酸	0.299	酪氨酸	0.056
缬氨酸	0.162	苏氨酸	0.049
精氨酸	0.119	丝氨酸	0.033
亮氨酸	0.101	甘氨酸	0.023
天冬氨酸	0.082	甲硫氨酸	0.022
赖氨酸	0.080	组氨酸	0.015

2.3.2 超滤液 GSH 稳定性 把超滤后的样液上离子交换柱,从开始上样到最后洗涤去杂,需要一段时间,而 pH 对 GSH 稳定性具有很大影响,以下测定了不同 pH 条件下,不同时间处超滤样液中 GSH 的浓度,计算氧化率,结果见图 6。

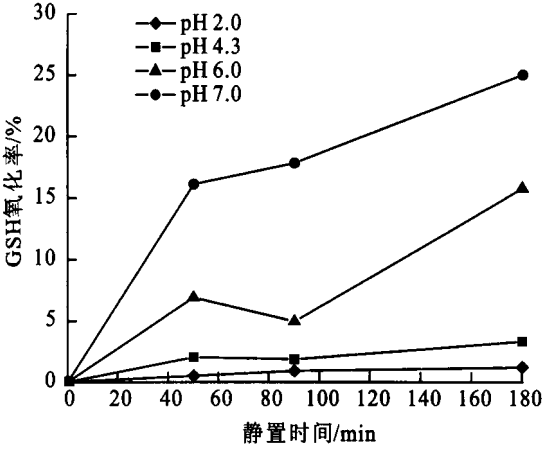


图 6 不同时间时 pH 对超滤液中 GSH 稳定性的影响
Fig.6 Effects of time and pH on the GSH stability

由图 6 可知,pH 越低,超滤液中 GSH 稳定性越好,在 pH 2.0 时,180 min 后 GSH 总氧化率为 2.57%,因此在对 GSH 上柱的过程中,条件允许的范围,控制 pH 较低为好。

3 结 语

用醋酸-盐酸调节抽提 pH 时,在 pH 3.5、料液比 1:8、抽提温度(70±1)℃、抽提 14 min 的最佳条件下,GSH 的抽提量可达 5.50 mg/g,虽比超声波破碎法低 9.98%,但此法没有破壁,杂质浸出量小,能耗小,且相对于其它方法 GSH 抽提量提高了 54.49%~62.24%,抽提温度低,料液比大。综合考虑,此法 GSH 抽提量高、杂质浸出量低、快速节能易操作,可为工业上综合利用废啤酒酵母提取 GSH 提供参考。

热水抽提的样液离心后,仍有大量菌体和杂蛋白,如果直接超滤会导致超滤速度减慢,GSH 氧化加剧,如果不经微滤超滤直接上离子交换柱进行分离,也会使树脂利用率降低,分离度减小。为解决以上问题,对离心的样液先进行孔径为 0.45、0.22 μm 的膜过滤后,再在膜压差 ΔP=0.25 MPa、pH 2.0 条件下,进行截留分子量 5 kD 的聚醚砜超滤膜处理,得到的滤液 GSH 总回收率为 76%,蛋白去除率 60.98%,缩短了超滤时间,也将提高离子交换树脂的利用率。

通过高效液相检测法分析了超滤液中的成分,图谱表明,超滤液中存在一种和 GSH 特性相近的

物质,且 GSH 纯度不高;利用氨基酸分析仪检测出超滤液中杂氨基酸的含量,其中以谷氨酸含量最高,为主要的干扰杂质,以上数据为离子交换树脂

法(得到高纯度 GSH 最有效节能的方法)精提纯化 GSH 提供有利条件和参考。

参考文献(References):

- [1] Meister A, Anderson M E. Glutathione[J]. **Annual Review of Biochemistry**, 1983, 52: 711—760.
- [2] Izawa S, Inoue Y, Kimura A. Oxidative stress response in yeast-effect of glutathione on adaptation to hydrogen-peroxide stress in *Saccharomyces Cerevisiae*[J]. **Febs Letters**, 1995, 368(1):73—76.
- [3] 刘振玉. 谷胱甘肽的研究与应用[J]. 生命的化学, 1995, 15(1):19—21.
LIU Zhen-yu. Study and application of glutathione[J]. **Life Chemistry**, 1995, 15(1): 19—21. (in Chinese)
- [4] 王辉, 冯万祥. 含汞树脂分离提纯谷胱甘肽[J]. 华东理工大学学报, 1996, 22(6):717—721.
WANG Hui, FENG Wan-xiang. Purification of glutathione by organomercurial resin[J]. **Journal of East China University of Science and Technology**, 1996, 22(6):717—721. (in Chinese)
- [5] Maki H, Fukuda H. The separation of glutathione and glutamic acid using a simulated moving-bed absorber system[J]. **Fermentation Technology**, 1987, 65(1):61—70.
- [6] 陈娜, 乔长晟, 胡玉霞, 等. 面包酵母中谷胱甘肽抽提方法的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(2):157—160.
CHEN Na, QIAO Chang-sheng, HU Yu-xia, et al. Methods for extracting GSH from *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. **Modern Food Science and Technology**, 2008, 24(2):157—160. (in Chinese)
- [7] 林志兴, 吕永琴, 丁轲, 等. 从酿酒酵母中分离纯化谷胱甘肽[J]. 生物加工过程, 2007, 5(04):60—64.
LIN Zhi-xing, LV Yong-qin, DING Ke, et al. Separation and purification of glutathione from *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2007, 5(04):60—64. (in Chinese)
- [8] Xiong Zhi-Qiang, Guo Mei-Jin, Guo Yuan-Xin, Efficient extraction of intracellular reduced glutathione from fermentation broth of *Saccharomyces Cerevisiae* by ethanol[J]. **Bioresource Technology**, 2009, 100(2):1011—1014.
- [9] Ellman G L. A calorimetric method for determining low concentrations of mercaptans[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1958, 74(2):443—450.
- [10] Bradford M, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72:248—254.

(责任编辑:杨萌)