

大孔树脂分离啤酒废酵母中谷胱甘肽的研究

邱雁临¹, 胡静², 缪谨枫¹, 梁亮¹

(1. 湖北工业大学生物工程学院, 湖北 武汉 430068) (2. 山东齐鲁制药有限公司, 山东 济南 250000)

摘要: 对大孔树脂 D001 分离啤酒废酵母中的还原型谷胱甘肽进行了研究。其最佳试验条件为: pH 4.5 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液平衡, pH 7.5 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液洗脱, 洗脱流速为 2.0 mL/min。在最佳分离条件下, 大孔树脂 D001 分离 GSH 的平均收得率为 20.03%, 产品中 GSH 的含量为 28.47%, 产品颜色为白色。

关键词: 谷胱甘肽; 大孔树脂; 啤酒废酵母

中图分类号: TQ936.1; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)02-0131-03

Separation of Glutathione from Waste Beer Yeast by Macroporous Resin

QIU Yan-ling¹, HU Jing², MIAO Jing-feng¹, LIANG Liang¹

(1. College of Bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

(2. Qilu pharmaceutical Co., LTD., Jinan 250000, China)

Abstract: Macroporous resin D001 was adopted for separation of GSH from waste beer yeast. The result indicated that the optimum concentration of phosphate buffer, pH values for adsorption and elution and the elution rate were 0.02 mol/L, 4.5, 7.5, and 2.9 mL/min, respectively. Under those conditions, the purity of the crude white GSH was 28.47% analyzed by HPLC, and the average yield was 20.03%.

Key words: glutathione; macroporous resin; abandoned beer yeast

谷胱甘肽(简称 GSH)是一种活性三肽, 具有维持红细胞膜的完整性、DNA 的生物合成、细胞的正常生长以及细胞膜的完整性、细胞的正常生长以及细胞免疫等多种生理功能。临床上, GSH 可以用于迅速提高机体免疫力, 在抗氧化、抗辐射、清除自由基、解毒、促进铁质吸收等方面具有良好的效果且无副作用; 在食品加工领域, GSH 具有增强食品营养价值和强化食品风味等功能^[1-3]。

从酵母细胞中提取 GSH 得到的提取液中常常含有大量的蛋白质、氨基酸、肽类等多种杂质, 要得到纯度较高的 GSH 需要进行分离纯化。以往 GSH 的分离纯化在我国多采用铜盐法, 该法存在效率低, 需要 H₂S 气体, 对环境污染大等缺点。由于 GSH 是两性物质, 在一定条件下带电荷, 所以利用离子交换法分离纯化谷胱甘肽是一种有效的途径, 在这方面日本学者研究较多, 已有专利报道^[4], 但国内还未形成工业化生产。本文对大孔树脂 D001 分离啤酒废酵母中的 GSH 进行了研究, 希望为 GSH 的工业化生产提供实验依据。

收稿日期: 2007-11-05

基金项目: 湖北省教育厅重大项目资助(2003Z001)

作者简介: 邱雁临(1942-), 女, 教授、博导。研究方向: 生化技术及再生资源利用

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

啤酒废酵母 GSH 抽提液(GSH 含量为 1.243 mg/mL)^[6], 由本课题组提供; 大孔树脂 D001(由武大弘源氨基酸厂提供)。

1.1.2 主要试剂

5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB, 洛阳产); 98% GSH(Sigma, 武汉新锐生物有限公司分装); 庚烷磺酸钠(美国 Itegis 公司); 以上均为分析纯, 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器

LC-6A 高效液相色谱仪(日本岛津); 722 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); HD-2000 核酸蛋白检测仪(上海嘉鹏科学仪器有限公司); BSZ-100 自动收集器(上海泸西分析仪器厂); LCJIO 冷冻干燥机(军事医学科学院); Φ1.6 cm×70 cm、Φ2.6 cm×70 cm 玻璃层析柱(武汉华顺科技实业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 GSH 的检测

见文献^[6]。

1.2.2 静态吸附试验

在各试管中加入经预处理的大孔树脂^[7],调 pH 为 3~8 (梯度为 0.5), 然后向各试管中加入谷胱甘肽的抽提液、混匀、放置数分钟后检测上清液中 GSH 的含量, 并折算成大孔树脂吸附的 GSH 含量。

1.2.3 洗脱液的优选

在各试管中加入含 GSH 的大孔树脂, 分别加入 pH 7.0 和 pH 7.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液平衡各管, 平衡液中 NaCl 的浓度分别为 0.2~0.8 mol/L (梯度为 0.1), 放置数分钟后, 检测上清液中 GSH 的含量, 并折算成大孔树脂中的 GSH 含量。

1.2.4 洗脱流速的优选

根据洗脱条件, 确定洗脱流速。

1.2.5 冻干GSH粉的HPLC鉴定分析

见文献^[8]。

2 结果与分析

2.1 静态吸附试验结果

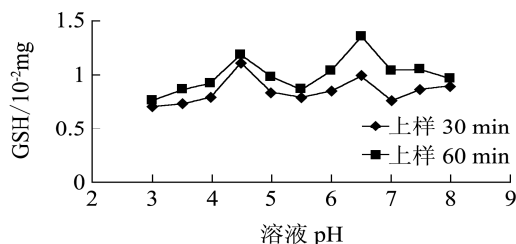


图1 上样pH对大孔树脂中GSH含量的影响

Fig.1 Effects of different pH value

图 1 结果表明, 大孔树脂对 GSH 的吸附分别在 pH 4.5 和 pH 6.5 处有两个峰值。通过比较试验, 其在 pH 6.5 时对 GSH 的吸附非常不稳定, 很容易脱落, 因此试验采用 pH 4.5 上样。

图 2 表示的是大孔树脂随时间变化在不同 pH 下吸附量的变化。由图可以看出: 大孔树脂在 180 min 时吸附量基本达到饱和状态, 此时 pH 4.5 条件下的吸附量最大, 其与大孔树脂上样 pH 的选择试验结果是相吻合的。

经计算大孔树脂在最佳试验条件下的交换容量为 1 g 湿树脂含 1.275 mg GSH。

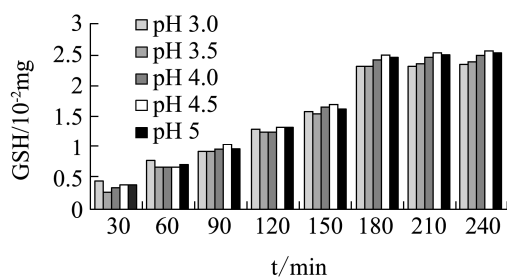


图2 静态吸附试验结果图

Fig.2 Results of static adsorption

2.2 洗脱液优选结果

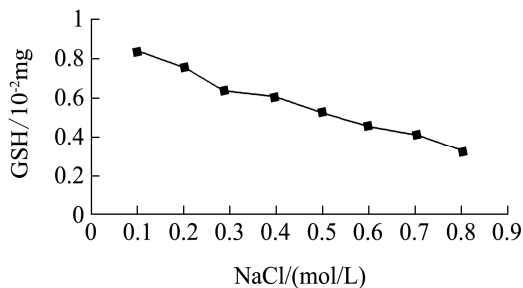


图3 pH 7.0时不同NaCl浓度对洗脱效果的影响

Fig.3 Results of elute with pH 7.0 and different NaCl concentration by macroporous resin

如图 3 所示, NaCl 浓度在 0.8 mol/L 时大孔树脂还含有 GSH, 此时需要改变 pH 值以提高洗脱液的洗脱效果。选用 pH 7.5 的洗脱液再次进行试验。

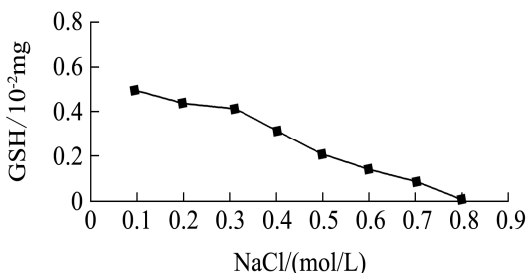


图4 pH 7.5时不同NaCl浓度对洗脱效果的影响

Fig.4 Results of elute with pH 7.5 and different NaCl concentration by macroporous resin

图 4 结果表明: NaCl 浓度在 0.8 mol/L 时, 大孔树脂中的 GSH 的量为 0, 当 NaCl 浓度为 0.3 mol/L 时最佳, 浓度过大, 洗脱液中盐浓度过大, 影响产品的纯度。

2.3 洗脱流速优选结果

从图 5 可看出, 随着洗脱流速的增加, 吸光度值 A 先增后减, 当流速为 2.0 mL/min 时, 洗脱液吸光度值 A 最大, 即表明效果最佳。

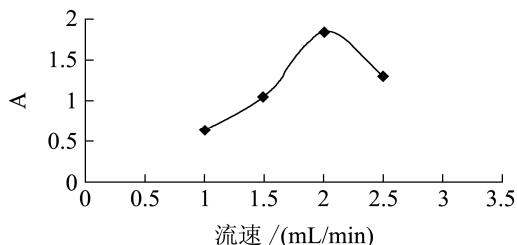


图5 洗脱流速与洗脱液吸光度 A 的变化关系

Fig.5 The variable relations between velocity of elution and absorbency

2.4 HPLC对冻干粉GSH的测定

由冻干粉 HPLC 图谱与标样 HPLC 图谱对照可

知, 本研究所得的冻粉含有 GSH, 但存在大量杂质, 需进一步纯化。

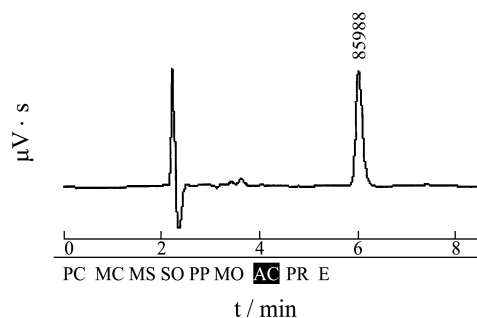


图6 标样液相色谱图

Fig.6 Liquid phase chromatograms of standard sample

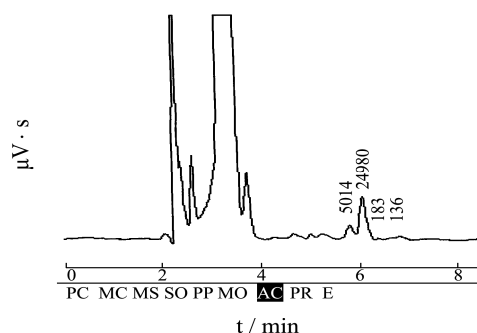


图7 冻干粉液相色谱图

Fig.7 Liquid phase chromatograms of lyophilized powder

图6的GSH峰面积为85988; 图7的GSH峰面积为14673。因此, 样品GSH的含量为:

$$98\% \times (24980 / 85988) = 28.47\%$$

2.5 GSH的分离纯化扩大试验

表1 GSH的分离纯化扩大试验结果

Table 1 The ampliative results of purification of GSH by macroporous resin

次数	啤酒废酵母GSH抽提液体积/mL	干粉量/mg	产品中GSH含量/mg	GSH收得率/%
1	305	266.73	75.75	19.98
2	308	268.64	76.29	19.93
3	306	270.2	76.74	20.18
平均				20.03

注: 啤酒废酵母GSH抽提液的GSH含量为1.243 mg/mL。

扩大试验显示: 在最佳分离纯化条件下, 大孔树脂D001分离GSH的平均收得率为20.03%, 产品中GSH的含量为28.47%, 粗品颜色为白色。

3 结论

3.1 大孔树脂 D001 分离纯化 GSH 最佳条件为: pH 4.5 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (含 10 mmol/L NaCl) 为平衡液上样, 采用 pH 7.5 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (含 0.3 mol/L NaCl) 为洗脱液, 洗脱流速为 2.0 mL/min。

3.2 大孔树脂 D001 分离 GSH 的平均收得率为 20.03%, 所得到的冻干粉呈白色, 经 HPLC 检测其 GSH 含量为 28.47%, 证明用大孔树脂 D001 分离 GSH 是可行的。

3.3 本研究为啤酒废酵母的综合利用开拓了新途径, 所得的 GSH 产品可用作食品添加剂和饲料添加剂, 若要用作原料药, 则需进一步精制纯化。

参考文献

- [1] PENNINGCKX M. A short review on the role of glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental, and oxidatives stresses[J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 26(9/10):737-742
- [2] Lomaestro B M and Malone M, Glutathione in health and disease: pharma-cotherapeutic issues [J].Ann Phammacother, 1995,29: 1263-1273
- [3] Spector D, Labarre J, Toledano M B, A genetic investigation of the essential role of glutathione [J].Biol Chem, 2001, 276(10):7011-7016
- [4] 渡边幸一,等. 谷胱甘肽的精制法:日本,06056884[P]. 1994
- [5] 潘艺,林庆生.强酸性阳离子树脂对高浓度蔗糖溶液的水解催化研究[J].现代食品科技,2006, 22(3):65-69
- [6] 潘飞,邱雁临,黄欣.啤酒废酵母中还原型谷胱甘肽的抽提新方法探讨[J].生物技术,2005,15(4):50-52
- [7] 游见明.大孔树脂分离鱼腥草总黄酮的研究[J]. 现代食品科技,2005,21(2):66-68