

面包酵母中谷胱甘肽抽提方法的研究

陈娜, 乔长晟, 胡玉霞, 谭之磊, 贾士儒

(天津科技大学天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要: 对从面包酵母中抽提还原型谷胱甘肽(GSH)的四种方法进行了研究。发现沸水浴抽提、微波辅助提取、超声波破碎和高压均质破碎方法均能有效地抽提胞内 GSH。高压均质破碎法在最佳操作条件下 GSH 抽提量最高为 3.975 mg/g, 抽提率达到 99.87%; 沸水浴抽提法 GSH 抽提量为 3.830 mg/g, 抽提率为 96.23%; 超声波破碎法和微波辅助提取 GSH 抽提量分别为 3.823 mg/g 和 3.593 mg/g, 抽提率分别为 96.12% 和 90.28%。高压均质破碎法是一种绿色加工过程, 更适用于工业化应用。

关键词: 还原型谷胱甘肽; 沸水浴抽提; 微波辅助提取; 超声波破碎; 高压均质破碎

中图分类号: TQ926.4; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)02-0157-04

Methods for Extracting GSH from *Saccharomyces cerevisiae*

CHEN Na, QIAO Chang-sheng, HU Yu-xia, TAN Zhi-lei, JIA Shi-ru

(Tianjin University of Science and Technology, Tianjin Key Laboratory of Industry Microbiology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Four methods for extracting GSH from *Saccharomyces cerevisiae* were studied in this paper. It was found that GSH could be efficiently extracted by boiling water extraction, microwave assistant extraction, ultrasonic disruption and high-pressure homogenization. Under the optimized extraction conditions, the GSH concentrations by high-pressure homogenization, boiling water extraction, ultrasonic disruption and microwave assistant extraction were 3.975 mg/g, 3.830 mg/g, 3.823 mg/g and 3.593 mg/g, respectively. And the extraction rates by the above-mentioned four methods were 99.87%, 96.23%, and 96.12% and 90.28%, respectively. The "green" high-pressure homogenization was the most suitable one for industrial production among the examined extraction methods.

Key words: GSH; boiling water bath extraction; microwave assistant extraction; ultrasonic disruption; high pressure homogenization

谷胱甘肽(glutathione)是由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸缩合而成的一种含有巯基的生物活性三肽化合物, 它分为还原型(GSH)和氧化型(GSSG), 在体内起重要作用的是 GSH。GSH 在生物体内具有众多生理功能, 特别是对于维持生物体内适宜的氧化还原环境起着至关重要的作用^[1]。近年来, 随着 GSH 更多的生理功能被发现, 它在食品添加剂、营养学上倍受关注。在肉制品中添加 GSH 具有强化风味的效果; 在面制品中加入 GSH 可利用它的氧化还原性能有效地抑制酶促褐变和非酶促褐变, 保持产品色泽, 同时也起到了强化氨基酸的作用; 在乳制品中 GSH 相当于维生素 C, 起稳定作用; 在水果罐头中起到防止色素沉积等作用^[2]。

由于 GSH 为胞内产物, 如何充分有效地从细胞内抽提 GSH 是其发酵生产的关键步骤。周迪南^[3]比较了热水抽提法和有机溶剂法抽提胞内 GSH, 结果表

收稿日期: 2007-10-30

基金项目: 天津科技大学引进人才科研启动基金(20050417)

作者简介: 陈娜(1984-), 女, 在读研究生, 研究方向: 生物化工

通讯作者: 贾士儒, 教授

明, 热水抽提法的抽提效率要高于有机溶剂法; 范崇东^[4]对热水抽提胞内 GSH 进行了条件优化。本文对沸水浴抽提法、微波辅助提取法、超声波破碎法和高压均质破碎法从 *Saccharomyces cerevisiae* 中抽提 GSH 进行了研究, 并对各自的抽提效果进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 菌株

Saccharomyces cerevisiae (面包酵母) CICC1447: 本实验室保藏菌株。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 试剂

GSH 标准品: 上海生工生物工程有限公司; ALLOXAN 试剂: Sigma 公司; 甘氨酸: 北京奥博星生物技术责任有限公司; 牛血清蛋白标准品: 北京普博生物科技有限公司; 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为分析纯。

1.2.2 仪器设备

752 型紫外光栅分光光度计, CR21G 高速冷冻离心机, WP700MS-2069TW 型微波炉, SCIENTZ-II D

超声波破碎机, Niro-Soavi 高压均质机。

1.3 实验方法

1.3.1 工艺流程

发酵液→离心(4000 r/min, 10 min)→菌体细胞→去离子水洗涤→酵母菌悬液→抽提→酵母抽提液及菌体混合液→离心(10000 r/min, 10 min)→去上清液即为酵母抽提液

1.3.2 抽提方法

1.3.2.1 沸水浴抽提法^[3]

将酵母细胞与去离子水混合配成不同浓度(m/v)的酵母菌悬液装于试管中, 然后将试管放置于沸水浴中加热一段时间, 取出迅速放于冰浴中冷却。

1.3.2.2 微波辅助提取法^[5]

将酵母细胞与去离子水混合配成不同浓度(m/v)的酵母菌悬液盛于烧杯中, 然后将烧杯放置于微波炉中, 在输出功率为700 W的条件下进行微波辅助提取, 之后取出迅速放于冰浴中冷却。

1.3.2.3 超声波破碎法^[5]

将酵母细胞与去离子水混合配成不同浓度(m/v)的酵母菌悬液盛于烧杯中, 然后将烧杯放置于超声波处理隔音箱中, 调整托盘高度使探头浸入液面以下1/2液体高度, 并将烧杯置于冰浴槽中。在输出功率为800W、间隔时间/工作时间为2 s/1s的条件下进行抽提。

1.3.2.4 高压均质破碎^[6]

将酵母细胞与去离子水混合配成不同浓度(w/v)的酵母菌悬液(至少为200 mL)盛于烧杯中, 一定工作压力下进行均质破碎, 样品可循环操作, 过程流量为10 L/h。

1.3.3 分析方法

1.3.3.1 GSH 含量测定^[7]

四氧嘧啶法(ALLOXAN 试剂法)。

1.3.3.2 蛋白质含量测定^[8]

采用考马斯亮蓝染色法(595 nm)测定, 用牛血清蛋白作为标准蛋白质。

1.3.3.3 细胞干重测定^[5]

将离心、洗涤后得到的酵母细胞在60℃下烘干至恒重, GSH抽提量、蛋白质抽提量均以干细胞为基准(mg/g、g/g)。

1.3.3.4 四种方法抽提率的计算

用沸水浴法抽提胞内GSH, 在相同条件下反复抽提三次, 将三次抽提所得GSH总和视为胞内GSH总量, GSH抽提率计算如下:

$$\text{抽提率}(\%) = \frac{\text{GSH一次抽提量}}{\text{GSH三次抽提量总和}} \times 100\%$$

其它方法抽提率的计算同以上方法。

2 结果与分析

2.1 沸水浴抽提胞内 GSH

酵母细胞浓度对GSH抽提量的影响见图1。随着酵母细胞浓度的增加, 抽提液中GSH含量逐渐下降, 当浓度为3%时, GSH含量最高。当浓度增加到6%时, 其GSH含量较3%时减少甚微, 因此从整体抽提效果来看沸水浴抽提的最佳酵母细胞浓度为6%。

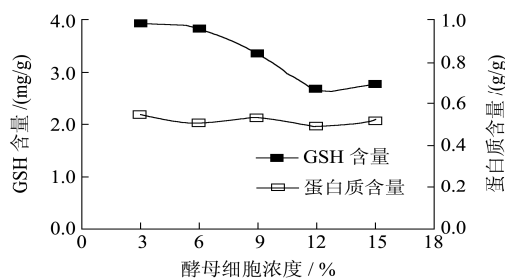


图1 酵母细胞浓度对GSH抽提量的影响

Fig.1 Effect of yeast concentration on the extracting of GSH

将酵母细胞与去离子水混合配成浓度为6%的菌悬液, 加热时间对GSH抽提量的影响见图2。沸水浴抽提GSH维持时间为6 min时GSH抽提量最高, 加热时间的延长或缩短都不利于GSH的抽提。

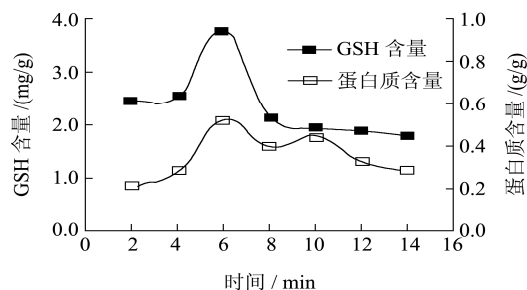


图2 沸水浴时间对GSH抽提量的影响

Fig.2 Effect of boiling water bath extraction time on the extracting of GSH

2.2 微波辅助提取法抽提胞内 GSH

图3及图4分别为不同酵母细胞浓度及抽提时间对GSH及蛋白质抽提量的影响。

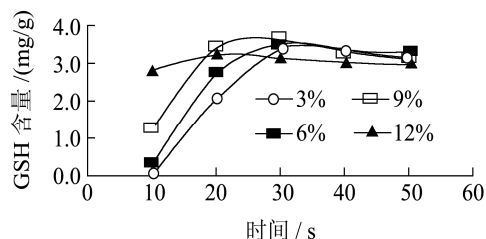


图3 微波辅助提取时间对不同浓度酵母细胞GSH抽提量的影响

Fig.3 Effect of microwave assistant extraction time on the extracting of GSH under different yeast concentration

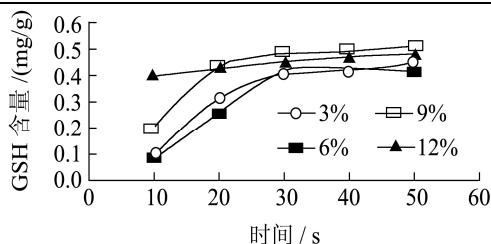


图4 微波辅助提取时间对不同浓度酵母细胞蛋白质抽提量的影响

Fig.4 Effect of microwave assistant extraction time on the extracting of protein under different yeast concentration

由图3可以看出,700 W下GSH抽提率在某一时间段突然变化,这与微波辅助提取的原理是一致的,细胞由于吸收了微波能,能量聚集,短时间内压力超过细胞壁的承受能力会突然破裂,GSH溶出细胞,并且微波产生的电磁场加速了GSH向溶剂界面扩散的速度,减少了GSH从细胞到溶剂的扩散时间^[5],这个过程只需要10 s~30 s。继续作用,对抽提率没有明显的提高,GSH的抽提率由于高温作用略有下降。由图4可以看出,蛋白质的溶出有相同趋势,但是较长时间的处理蛋白质抽提率变化很小。从而确定酵母细胞浓度为9%,抽提时间30 s为最佳工艺条件。

2.3 超声波破碎法抽提胞内GSH

酵母细胞浓度对GSH抽提量的影响见图5。当细胞浓度为9%时,GSH抽提量达到最大值。

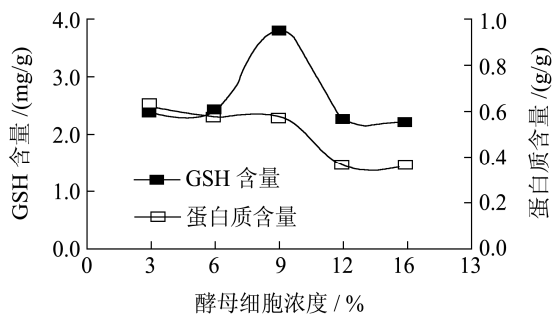


图5 酵母细胞浓度对GSH抽提量的影响

Fig.5 Effect of yeast concentration on the extracting of GSH

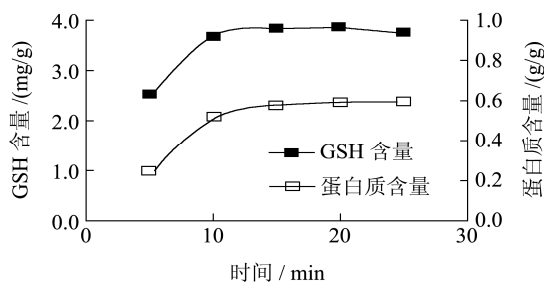


图6 破碎时间对GSH抽提量的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic disruption time on the extracting of GSH

将酵母细胞与去离子水混合配制成浓度为9%的溶液,破碎时间对GSH抽提量的影响见图6。随着破碎时间的延长,GSH不断被释放出来,15 min时达到最大量,继续延长时间GSH抽提量有下降趋势,主要是由于高温高压的作用使得GSH氧化而减少。从而确定酵母细胞浓度为9%,破碎15 min为最佳工艺条件。

2.4 高压均质破碎抽提GSH

酵母细胞浓度对GSH抽提量的影响见图7。在压力为70 MPa、循环3次的条件下酵母细胞浓度为12%时,GSH抽提量最高,继续提高酵母细胞浓度,破壁效率下降,GSH抽提量也随之下降。

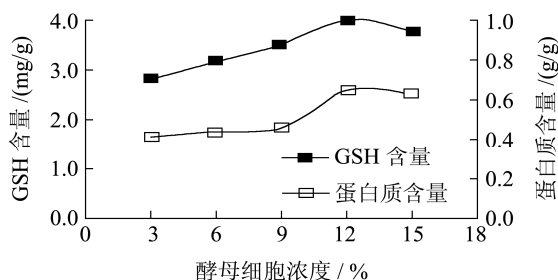


图7 酵母细胞浓度对GSH抽提量的影响

Fig.7 Effect of yeast concentration on the extracting of GSH

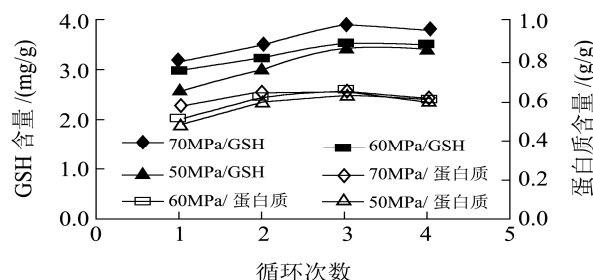


图8 不同压力及循环次数对GSH及蛋白质抽提量的影响

Fig.8 Effect of different pressure and cycle numbers on the extracting of GSH and protein

图8为酵母浓度为12%时不同均质压力及循环次数对GSH及蛋白质抽提量的影响。在相同酵母浓度下压力越高,GSH抽提量越大;在相同压力下,循环3次时,GSH抽提量达到最大值,均质次数过多,GSH及蛋白质会因瞬间高压部分失活,抽提量下降^[9]。综合考虑,酵母浓度为12%、70 MPa下均质循环3次为最佳条件。

2.5 四种方法抽提率的计算

四种抽提方法在各自最佳条件下抽提量及抽提率的计算结果见图9。

从图9可以看出,各种方法均能充分有效地抽提胞内GSH。高压均质破碎法在最佳操作条件下GSH抽提量最高为3.975 mg/g,抽提率达到99.87%;沸水

浴抽提法 GSH 抽提量为 3.830 mg/g, 抽提率为 96.23%; 超声波破碎法和微波辅助提取 GSH 抽提量分别为 3.823 mg/g 和 3.593 mg/g, 抽提率分别为 96.12% 和 90.28%。

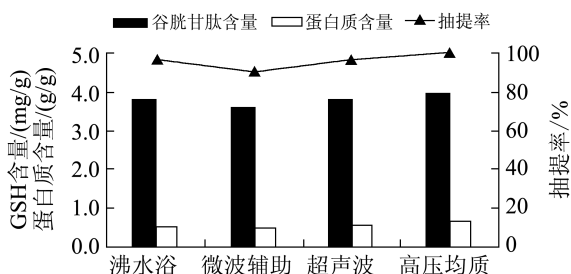


图9 不同抽提方法在最佳工艺条件下的抽提效果

Fig.9 The extracting ratio of different extraction methods under best condition

3 结论

3.1 在实验条件下, 沸水抽提法的最佳工艺条件为酵母浓度 6%, 加热 6 min; 微波辅助提取在输出功率为 700 W 下, 最佳工艺条件为酵母浓度 9%, 处理 30 s; 超声波破碎法在输出功率为 800 W、间隔时间/工作时间为 2 s/1 s 的条件下进行抽提, 最佳工艺条件为酵母浓度 9%, 处理 15 min; 高压均质化的最佳工艺条件为压力在 70 MPa 下, 12% 的酵母浓度均质循环 3 次。

3.2 在实验条件下, 高压均质破碎法在最佳操作条件下 GSH 抽提量最高为 3.975 mg/g, 提取率达到 99.87%; 沸水浴抽提法, GSH 抽提量为 3.830 mg/g, 提取率为 96.23%; 超声波破碎法和微波辅助提取, GSH 抽提量分别为 3.823 mg/g 和 3.593 mg/g, 提取率

分别为 96.12% 和 90.28%。通过计算各种方法的抽提率, 可以看出各种方法均能充分有效地抽提胞内 GSH。

3.3 高压均质破碎以其高破碎率对于工业大规模生产具有很好的经济前景, 沸水浴抽提法不需要特殊设备, 适合实验室及工业化大规模生产, 也是一种很好的抽提方法。

参考文献

- [1] Meister A. Antioxidant functions of glutathione[J]. Life Chem Rep, 1994, 12 (1): 23-27
- [2] 周宇光, 付国平, 肖仔君. 谷胱甘肽的生产和应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2003, 24(3): 89-91
- [3] 周迪南, 李寅, 陈坚, 等. 从酵母中提取 GSH 的初步研究[J]. 生物技术, 1997, 7(4): 30-33
- [4] 范崇东, 王淼, 徐榕榕. 热水提取酵母中谷胱甘肽的条件优化[J]. 食品工业科技, 2004, 15(14): 50-52
- [5] 范崇东, 王淼. 酵母细胞中 GSH 的微波辅助提取[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 27-31
- [6] 孙海翔, 尹卓容, 马美范. 高压均质破碎啤酒酵母细胞壁的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(2): 66-67
- [7] 刘娟, 王雅琴, 刘刚, 等. 发酵液中还原型 GSH 三种测定方法的改进及其比较[J]. 北京化工大学学报, 2004, 31(3): 37-38
- [8] 李健武, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994
- [9] 张志森, 杨诗斌, 宋明淦, 等. 高压均质机理分析与探讨[J]. 包装与食品机械, 2001, 19(1): 14-16

(上接第108页)

参考文献

- [1] GB/T4789.28-2003, 《食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂》[S]
- [2] GB/T4789.2-2003, 《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》[S]
- [3] 周德庆, 等. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 12. 56-65
- [4] 魏景超著. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979. 9
- [5] 齐祖同, 等主编. 中国真菌志[M]. 第五卷: 曲霉属及其相关有

性型. 北京: 科学出版社, 1997

- [6] 刘勤晋, 周才琼, 许鸿亮, 等. 普洱茶的渥堆作用[J]. 茶叶科学, 1986, 6(2): 55-56
- [7] 何国藩, 林月婵, 徐福祥. 广东普洱茶渥堆中细胞组织的显微变化及微生物分析[J]. 茶叶科学, 1987, 7(2): 54-57
- [8] 温琼英, 刘素纯. 黑茶渥堆(堆积发酵)过程中微生物种群的变化[J]. 茶叶科学, 1991, 11(增刊): 10-16
- [9] 周红杰, 李家华. 渥堆过程中主要微生物对云南普洱茶品质形成的研究[J]. 茶叶科学, 2004, 24(3): 212-218