

# 大孔吸附树脂分离纯化谷胱甘肽的工艺研究

朱义福<sup>1</sup>, 李文锋<sup>1</sup>, 郑明英<sup>1</sup>, 马建<sup>2</sup>, 江燕斌<sup>2</sup>

(1. 广东肇庆星湖生物科技股份有限公司, 广东肇庆 526040)

(2. 华南理工大学化学与化工学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 还原型谷胱甘肽(GSH)是生物体内一种具有重要生理功能的活性三肽, 具有多种生理功能, 发酵法是目前国内外生产 GSH 的主要方法。本文利用大孔吸附树脂 A 对 GSH 发酵抽提液分离纯化, 结果表明: (1)大孔吸附树脂 A 对 GSH 具有良好的吸附作用, 当吸附进行到 150 min 时, 大孔吸附树脂 A 对 GSH 的吸附呈现出吸附平衡状态; (2)当 pH=3.0 时, 大孔吸附树脂 A 对 GSH 吸附效果最佳, 吸附容量和吸附率均有最大值; (3)采用动态实验的方法, 对洗脱条件如洗脱剂种类、洗脱剂浓度及洗脱剂流速等进行了确定, 并对其工艺过程进行了验证。在最佳实验条件下, 即上柱 pH=3.0, 洗脱剂为 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液, 洗脱液流速 2 mL/min, GSH 抽提液的纯度可由 58.5% 提高到 95.3%, 此时洗脱液中 GSH 回收率 >87%。

**关键词:** 谷胱甘肽; 大孔吸附树脂; 纯化

**文章编号:** 1673-9078(2013)7-1641-1644

## Isolation and Purification of GSH by Macroporous Resin

ZHU Yi-fu<sup>1</sup>, LI Wen-feng<sup>1</sup>, ZHENG Ming-ying<sup>1</sup>, MA Jian<sup>2</sup>, JIANG Yan-bin<sup>2</sup>

(1. Star Lake Bioscience Co., Inc, Zhaoqing 526040, China)

(2. School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Reduced glutathione (GSH) is a biologically active peptide compound with a variety of physiological functions, produced mainly by fermentation. In this study, macroporous resin A was used for purification of the GSH fermentation broth. The experimental results showed that the macroporous resin A had a good adsorption on GSH. The adsorption reached equilibrium state when the process was carried out for 150 minutes. At pH 3.0, the macroporous resin A had the strongest adsorption of GSH with the maximum adsorption capacity and adsorption rate. Then, feasible pH, eluting agent species, concentration and flow rate were determined and validated by dynamic adsorption. Under the best absorption conditions (pH 3.0, 0.2 mol/L phosphate buffer as eluting agent and the eluting agent rate 2 mL/min), the purity of glutathione can be increased from 58.5% to 95.3%, and the glutathione recovery ratio in the eluting agent was > 87%, indicating that this method was effective for purification of GSH fermentation broth.

**Key words:** glutathione (GSH); macroporous adsorption resin; purification

还原型谷胱甘肽(GSH)广泛的分布于动植物细胞和微生物中, 是一种生物活性化合物<sup>[1]</sup>和重要的抗氧化剂, 具有多种重要的生理功能<sup>[2-3]</sup>, 在临床医药、食品工业、饲料以及有关生物研究领域有着十分广泛的应用<sup>[4-5]</sup>。

目前, GSH 的生产方法主要有溶剂萃取法、化学合成法、酶法和发酵法。溶剂提取法生产工艺比较落后, 生产规模小, 产量低, 而且产品质量不高; 化学合成法<sup>[6]</sup>生产工艺已较成熟, 但它存在成本高、反应步骤多、反应时间长、操作复杂等缺点, 更重要的是

收稿日期: 2013-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(21276091); 中央高校基本科研业务费项目(2011ZZ0006)

作者简介: 朱义福(1976-), 男, 工程师, 研究方向为分离工程

通讯作者: 江燕斌(1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向为传质与分离工程

通过化学合成法得到的 GSH 是左、右旋体的混合物, 需要进行光学拆分, 分离十分困难, 并且存在着环境污染等问题, 限制了其应用。酶合成法<sup>[7]</sup>生产 GSH 虽然工艺明确, 产品纯度较高, 但是操作较复杂, 并且需要底物氨基酸和昂贵的 ATP 做原料, 生产成本较高, 目前还处于实验研究阶段。发酵法是以廉价的糖类为原料, 利用特定微生物体内物质的代谢将廉价原料转化为 GSH。随着发酵工艺条件的优化及菌种选育等多种方法的发展使得发酵法生产 GSH 不断得到改进和完善, 已经成为目前国内外生产 GSH 最普遍的方法<sup>[8]</sup>。

分离纯化是发酵法生产 GSH 的关键, 要获得纯度很高的 GSH, 选择良好的提取及纯化方法极其重要。大孔吸附树脂是 20 世纪 60 年代出现的一类新型高聚物吸附剂, 主要是通过分子间作用力如范德华引

力、氢键等对被吸附分子进行吸附, 吸附剂表面的亲水性或者疏水性基团决定了其不同的吸附特性。同时, 大孔吸附树脂本身的多孔性结构决定其具有一定的分子筛作用。利用不同极性、不同孔径的大孔吸附树脂, 在吸附特性和分子筛作用下即可达到分离纯化不同化合物的目的<sup>[9-10]</sup>。本文对大孔吸附树脂 A 分离纯化 GSH 发酵液的工艺进行了探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器: 紫外分光光度计 (UV-2450, 岛津); 玻璃层析柱 (φ1.4×60 cm, 广州市从源仪器有限公司); 精密 pH 计 (pHS-3B, 上海虹益仪器仪表有限公司); 电子天平 (AL104, 梅特勒-托利多仪器有限公司); 高效液相色谱系统 (Agilent 1100, 美国 Agilent 公司)。

试剂: GSH 发酵液抽提液 (工业用品, 广东肇庆星湖生物科技有限公司); 大孔吸附树脂 A (工业用品, 广东肇庆星湖生物科技有限公司); 四氧嘧啶 (分析纯, 上海晶纯试剂有限公司); 其他试剂均为分析纯试剂。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 树脂的预处理

取一定量的大孔吸附树脂 A, 先用 2-3 倍树脂体积的去离子水洗涤树脂, 再用 2~3 倍树脂体积的乙醇或甲醇洗涤树脂, 如此重复 2~3 次, 以去除树脂中残留的杂质及树脂破碎颗粒, 最后以去离子水洗脱备用。

#### 1.2.2 静态吸附实验

进行静态吸附实验时, 先绘制静态吸附平衡曲线; 然后改变溶液 pH 值, 通过计算吸附容量和吸附率, 确定最佳上柱 pH 值。大孔吸附树脂 A 对 GSH 的吸附容量及吸附率的计算分别见式(1)、(2):

$$Q = \frac{C_0V_0 - C_iV_i}{m} \quad (1)$$

$$\omega = \frac{C_0 - C_i}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

注: Q 为树脂吸附容量 mg/g, ω 为大孔吸附树脂 A 对 GSH 的吸附率, C<sub>0</sub> 为起始上清液中 GSH 浓度 mg/mL, C<sub>i</sub> 为平衡后上清液中 GSH 浓度 mg/mL, V<sub>0</sub> 为起始上清液体积 mL, V<sub>i</sub> 为平衡后上清液体积 mL, m 为树脂质量 g。

#### 1.2.3 动态吸附实验

动态吸附实验步骤如下: (1)将经过处理的大孔吸附树脂 A 装入玻璃层析柱中, 注意装柱时要无气泡产生, 并用平衡缓冲液平衡后备用, 保证不干柱; (2)将处理好的 GSH 样品调节 pH, 以一定流速流入柱中; (3)进样完后, 用适量去离子水对柱子进行洗涤, 直到洗涤液中无 GSH 流出; (4)用合适浓度的平衡洗脱液

以一定的流速进行对 GSH 进行洗脱, 并确定其洗脱的工艺参数。

### 1.2.4 GSH 的浓度及纯度测定

GSH 的浓度测定参考文献<sup>[11]</sup>, 其纯度测定参考文献<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 静态吸附平衡曲线

大孔吸附树脂 A 对 GSH 的静态吸附平衡曲线如图 1 所示, 结果表明, 大孔吸附树脂 A 吸附 GSH 的效果良好。当吸附进行到 150 min 时, 大孔吸附树脂 A 对 GSH 的吸附达到饱和, 呈现出吸附平衡状态。

### 2.2 pH 值对吸附的影响

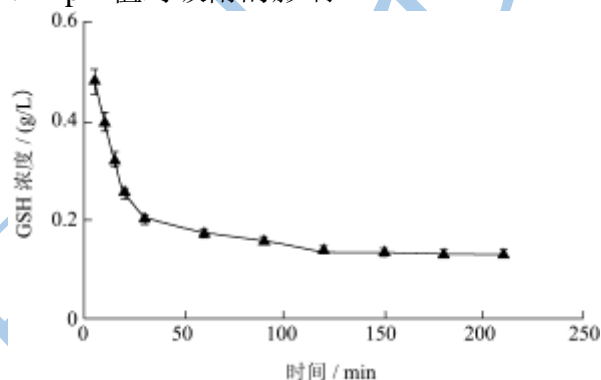


图 1 静态吸附平衡曲线

Fig.1 Static adsorption equilibrium curve

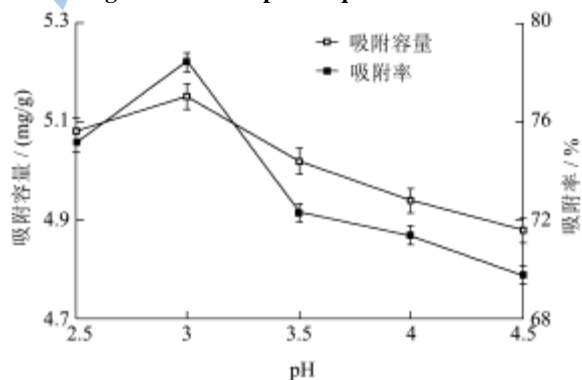


图 2 不同 pH 值对吸附的影响

Fig.2 Effect of pH on the adsorption

在不同 pH 值下, 大孔吸附树脂 A 对 GSH 的吸附情况如图 2 所示。结果表明, 当 GSH 浓料液 pH=3.0 时, 大孔吸附树脂 A 对 GSH 的吸附容量和吸附率均高于其他 pH 下大孔吸附树脂 A 对 GSH 的吸附状态。这是因为料液 pH 值的大小决定了 GSH 在溶液中的状态, 从而也决定了其吸附的平衡特性。当溶液 pH 大于等电点 2.83 时, GSH 以负离子状态存在, 不易被树脂所吸附, 且 pH 过大, GSH 易被氧化, 增大了其损失率, 降低了产品收率<sup>[13]</sup>。而当溶液 pH 值过小时, 溶液中氢离子浓度增大, 容易与 GSH 正离子形成竞

争吸附, 从而导致树脂对 GSH 的吸附容量降低。

### 2.3 洗脱剂种类的选择

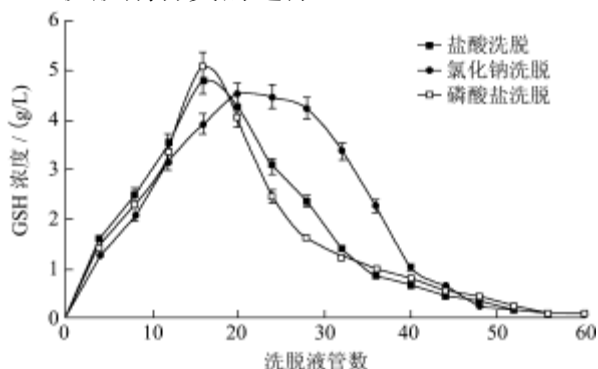


图 3 不同洗脱剂的洗脱效果

Fig.3 The eluting efficiency of different eluting agents

由于 GSH 在 pH 过大时不稳定, 易被氧化, 从而使其损失率增大, 不利于分离纯化过程的进行。因此, 实验仅考察了盐酸、氯化钠及磷酸平衡缓冲液对洗脱效果的影响, 结果见图 3。由图 3 可知, 用氯化钠洗脱时, GSH 的峰值比较低, 峰分布比较宽, 不利于收集。另外两种洗脱液的洗脱曲线类似, 但磷酸缓冲液的洗脱曲线峰值比用盐酸洗脱时高更, 分布更为集中。这可能是用盐酸洗脱时, 柱子内溶液 pH 变化较为剧烈, 不利于洗脱过程的进行, 而用磷酸缓冲液洗脱时, 柱子内溶液 pH 变化则较为平缓。因此, 选用磷酸缓冲液为大孔吸附树脂 A 吸附 GSH 的洗脱剂。

### 2.4 洗脱剂浓度的确定

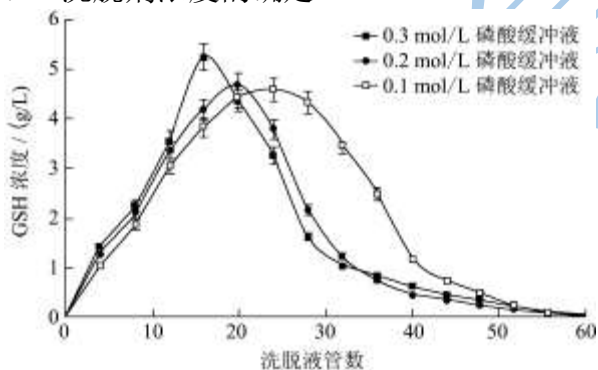


图 4 不同浓度洗脱剂对洗脱的影响

Fig.4 Effect of different eluting concentration on the elution process

实验考查了不同浓度的磷酸缓冲液对柱子的洗脱过程, 结果如图 4 所示。由图 4 可见, 在不同浓度条件下, 磷酸缓冲液均可以将 GSH 从大孔吸附树脂 A 上洗脱下来。但洗脱剂浓度对洗脱效果有明显影响, 其出峰位置及峰值有一定差别; 用较低磷酸缓冲液浓度洗脱时, 出峰时间较晚, 且峰型比较平缓, 其峰值也比较小, 不利于收集产品; 随着磷酸缓冲液的浓度提高, 出峰时间逐步提前, 峰型变窄, 其峰值也逐步

提高, 有利于产品收集。但是, 当洗脱剂中磷酸缓冲液浓度过高时, 会提高进入洗脱液中的磷酸盐的浓度, 使得洗脱液中 GSH 纯度降低, 后续甚至还得增加除盐工艺, 增大生产成本。综合比较, 适宜的洗脱剂为 0.20 mol/L 磷酸缓冲液。

### 2.5 洗脱流速的确定

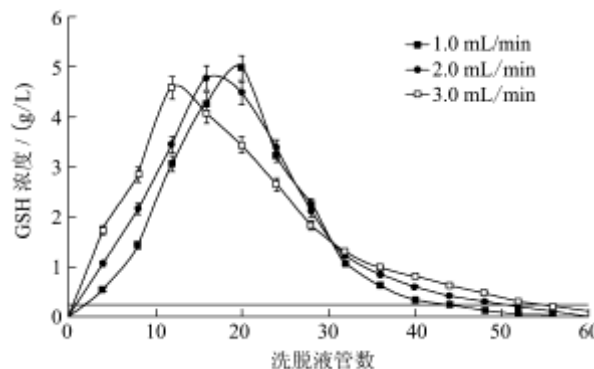


图 5 不同洗脱流速对洗脱的影响

Fig.5 Effect of different flow rate on the elution

洗脱过程是一个典型的色谱过程, 选择适宜的流速有利于保证分离效果及后续工作的进行。实验研究了不同流速对洗脱过程的影响, 结果如图 5 所示。图 5 表明, 洗脱剂流速越快, 固液接触时间越短, 洗脱液和吸附在树脂上的 GSH 来不及交换, 导致洗脱的程度也就越不完全, 峰也更加平缓, 这样不利于 GSH 的收集。较慢的流速可以使得固液两相有充足的接触时间, 从而使得洗脱过程越完全。但是, 流速过慢将会延长洗脱时间, 对生产不利, 且会增大 GSH 的氧化损失率, 因此洗脱剂流速不宜太慢。综合考虑, 洗脱流速以 2.00 mL/min 为宜。

### 2.6 大孔吸附树脂 A 纯化 GSH 的工艺效果

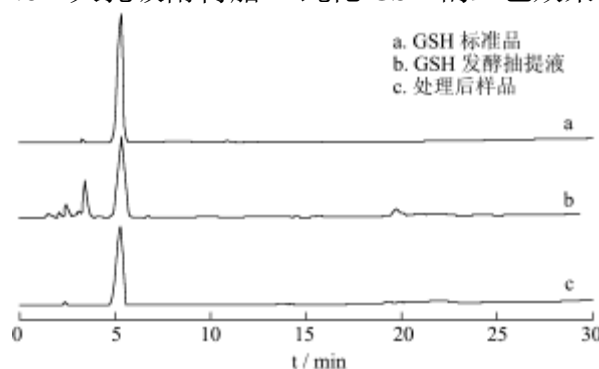


图 6 不同样品的 HPLC 分析结果

Fig.6 HPLC results of different samples

综上所述, 本文确定大孔吸附树脂 A 纯化 GSH 的适宜工艺条件为: 上柱料液 pH=3.0, 选用 0.20 mol/L 的磷酸缓冲液作为洗脱剂, 并以 2.00 mL/min 的流速匀速洗脱, 根据紫外出峰情况收集其洗脱液。洗脱峰经减压浓缩, 真空冷冻干燥得到 GSH 干品, 用高效

液相色谱分析其纯度。在上述条件下处理样品,以 GSH 标准品 (a) 为对比样,采用 HPLC 对 GSH 发酵抽提液 (b) 和处理后样品 (c) 进行纯度分析,结果见图 6。结果表明,发酵抽提液中 GSH 纯度仅为 58.50%,而处理后样品中 GSH 纯度达到了 95.30%,此时 GSH 回收率可达到 87.15%,可见采用大孔吸附树脂 A 处理 GSH 发酵抽提液是有效的。

### 3 结论

3.1 测定了大孔吸附树脂 A 对谷胱甘肽的静态吸附平衡曲线,结果表明大孔吸附树脂 A 对谷胱甘肽具有良好的吸附作用,静态吸附平衡时间为 150 min。

3.2 静态吸附实验表明,pH 值对吸附过程影响明显,当 pH=3.0 时,与谷胱甘肽的等电点 2.83 相近,此时大孔吸附树脂 A 对谷胱甘肽吸附效果最佳,吸附容量 >5.10 mg/g。

3.3 洗脱剂种类、浓度和洗脱流速均有较大影响,通过动态吸附实验确定的适宜工艺条件为:上柱 pH = 3.0,洗脱剂为 0.20 mol/L 的磷酸缓冲液,洗脱液流速 2.00 mL/min。在上述适宜条件下,GSH 发酵液的纯度可由 58.50% 提高到 95.30%,该过程洗脱液中 GSH 回收率达 87.15%。可见,采用大孔吸附树脂 A 处理 GSH 发酵抽提液是有效的,达到了分离纯化的目的。

### 参考文献

- [1] Li Y, WEI G Y, CHEN J. Glutathione: a review on biotechnological production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 66: 233-242
- [2] SIES H. Glutathione and its role in cellular functions [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 27(9-10): 916-921
- [3] PONSODA X, BORT R, JOVER R, et al. Increased toxicity of cocaine on human hepatocytes induced by ethanol: role of GSH [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1999, 58(10): 1579-1585
- [4] REGAN R F, GUO Y P. Potentiation of excitotoxic injury by high concentrations of extracellular reduced glutathione [J]. *Neuroscience*, 1999, 91(2): 463-470
- [5] SEN C K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1997, 8(12): 660-672
- [6] CAMERA E, PICARDO M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes [J]. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2002, 781(1-2): 181-206
- [7] KOUSSAKU M, KEIKO T, JYOJI K, et al. Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells containing an ATP regeneration system [J]. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1981, 11(2): 72-75
- [8] 古邵彬,吴影,李荣春.发酵法生产谷胱甘肽的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(30): 9689-9691  
Gu Shao-bin, Wu Yin, Li Rong-chun. The progress of glutathione production by microbial fermentation [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(30): 9689-9691
- [9] 高蓉,林亮,李稳宏,等.大孔吸附树脂纯化化香果序总黄酮工艺研究[J]. *化学工程*, 2010, 38(7): 9-13  
Gao Rong, Lin Liang, Li Wen-hong, et al. Separation and purification process of flavones from *Platycarya a strobilacea* Sieb. et Zucc by macroporous adsorption resin [J]. *Chemical Engineering (China)*, 2010, 38(7): 9-13
- [10] 林海胜,李稳宏,唐璇,等.大孔吸附树脂分离纯化胡芦巴中总皂苷工艺[J]. *化学工程*, 2009, 37(10): 5-9  
Lin Hai-sheng, Li Wen-hong, Tang Xuan, et al. Purification process of total saponins in fenugreek by macroporous adsorption resin [J]. *Chemical Engineering (China)*, 2009, 37(10): 5-9
- [11] 刘娟,王雅琴,刘刚,等.发酵液中还原型谷胱甘肽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): 35-38  
Liu Juan, Wang Ya-qin, Liu Gang, et al. Comparison of three methods for determination of glutathione [J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology*, 2004, 31(3): 35-38
- [12] 王春,严伟民.注射用还原型谷胱甘肽质量标准分析方法-HPLC法的建立与验证[J]. *中国临床药理学杂志*, 2005, 14(3): 167-169  
Liu Juan, Wang Ya-qin, Liu Gang, et al. Comparison of three methods for determination of glutathione [J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology*, 2004, 31(3): 35-38
- [13] 朱义福.还原型谷胱甘肽的稳定性研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(8): 919-923  
Zhu Yi-fu. Stability of Reduced Glutathione under Different Conditions [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(8): 919-923