

玉米谷胱甘肽提取技术的研究

张艳荣, 陈丽娜, 刘婷婷, 王大为*

(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 以淀粉加工副产物玉米胚为原料, 经过超临界流体萃取脱脂及微波破壁处理后, 采用热水浸提法提取谷胱甘肽, 通过正交试验确定超临界流体萃取脱脂工艺条件为压力 25MPa, 萃取温度 40℃, 时间 120min, CO₂ 流量 20L/h。在此条件下脂类物质萃取率 57.03%, 玉米胚粕含脂率 0.72%。最佳热水浸提工艺条件为固液比 1:20 (g/ml)、浸提温度 90℃、浸提液 pH 值 3.0、浸提时间 20min。在此条件下谷胱甘肽提取量为 104mg/100g 玉米胚。

关键词: 玉米胚; 谷胱甘肽; 超临界流体萃取; 热水浸提

Study on Extraction Technology of Corn Glutathione

ZHANG Yan-rong, CHEN Li-na, LIU Ting-ting, WANG Da-wei*

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: With corn embryo being coproduct in corn starch production as material, glutathione (GSH) was extracted through hot water extraction after supercritical CO₂ fluid extraction and microwave treatment. The results showed that optimum conditions of supercritical CO₂ fluid extraction are pressure 25 MPa, temperature 40 °C, time 120 min, CO₂ flow 20 L/g; On these conditions the extraction rate of fat is 57.03%, and fat content of embryo dregs is 0.72%. The optimum conditions of hot water extraction are solid:liquid 1:20, temperature 90 °C, pH3.0, time 20 min. On these conditions GSH yield is 104 mg/100 g corn embryo.

Key words corn embryo; glutathione; supercritical fluid extraction; hot water extraction

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0232-05

谷胱甘肽属于含有巯基的小分子活性肽^[1], 可分为氧化型和还原型两大类。还原型谷胱甘肽中含有一个活性巯基, 极易被氧化, 两分子还原型谷胱甘肽(简称 GSH)活性巯基氧化缩合为二硫键, 即得到氧化型的谷胱甘肽(简称 GSSG), 只有还原型谷胱甘肽才具有生理活性, 而生物体内的氧化型谷胱甘肽需还原才能发挥其重要的生理功能。还原型谷胱甘肽的分子量为 307.33, 熔点 189~193℃(分解), 晶体呈白色粉末状, 等电点(pI)5.93, 易溶于水、稀醇、液氨和二甲基甲酰胺, 而不溶于醇、醚和丙酮^[2]。还原型谷胱甘肽广泛存在于自然界中, 动物肝脏、酵母和植物胚芽中都含有丰富的 GSH, 其中玉米胚中还原型谷胱甘肽的含量约为 112~126mg/100g^[3]。GSH 在许多重要的生物学现象中起着直接或间接的作用, 如蛋白质和 DNA 的合成、物质的运输、酶的激活、新陈代谢及保护细胞等。GSH 作为许多酶反应的辅基, 可清除体内过多的自由基, 参与体内三羧酸循环及糖代谢, 并具有解毒, 延缓衰老、预防糖尿病、消除疲劳、抗炎以及防止诱变和癌变等作用^[4], 被广泛应用于医药及保健食品的生产。GSH 在食品工业中亦得到

广泛应用, 可作营养调节剂, 用于增强肉类风味调味品, 满足人们对肉的嗜好性需求; 在酸奶和婴儿食品中起到类似 VC 的作用; 在水果罐头中起到防止色素沉着, 防止水果褐变等作用^[4-5]。

我国玉米产量为 1.11 亿吨左右, 占粮食总产量的 22.4%, 占世界总产量的 20%, 如何提高玉米产业经济效益, 对发展我国玉米产业具有重要意义。湿法加工玉米淀粉时, 产生大量的玉米皮、玉米蛋白及玉米胚等副产物, 目前主要作为饲料的原料, 附加值极低, 既造成环境的污染, 又浪费了资源^[6-8]。玉米胚芽重量约占全粒的 10%~13%, 本研究以玉米胚为原料, 采用超临界 CO₂ 流体萃取技术对原料进行脱脂, 可最大限度保持玉米胚中还原型谷胱甘肽的生理活性; 采用微波破壁技术提高 GSH 的溶出率, 经过高速离心分离、超滤等纯化技术制备玉米谷胱甘肽, 提高玉米的经济价值, 延长玉米产业链, 促进玉米经济的发展。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-06-10

*通讯作者

基金项目: 吉林省重大科技攻关专项(200302-06)

作者简介: 张艳荣(1965-), 女, 副教授, 博士研究生, 主要从事功能食品的研究和开发。

1.1 原辅材料

玉米胚(湿法玉米淀粉副产物) 长春大成新资源集团有限公司; CO₂(纯度 99.9%, 食品级) 长春市氧气厂。

1.2 试剂

碘酸钾、碘化钾、偏磷酸、甲酸、无水乙醇、硫酸、氢氧化钠、盐酸、酒石酸钾钠、NaCl、Na₂CO₃、CuSO₄·5H₂O、茚三酮、正丁醇(均为分析纯) 北京化学试剂公司; 还原型谷胱甘肽标准品(色谱纯) Sigma 公司; 牛血清白蛋白(生化试剂) 上海博奥生物科技有限公司。

1.3 仪器与设备

HA221-50-06超临界萃取装置 南通超临界萃取有限公司; DZF-6050真空干燥箱 上海精宏试验设备有限公司; SH10A快速水分测定仪 上海恒平科学仪器有限公司; WF250万能粉碎机 上海蓝深制药机械有限公司; UV2003紫外-可见分光光度计 上海天美科学仪器有限公司; PHS-3TC微型数显酸度计 上海天达仪器有限公司; CT15RT高速冷冻离心机 上海天美生化仪器设备工程有限公司; HZS-HA水浴振荡器 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; RE-52AA旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; BSZ-160F电脑自动部分收集器 上海精科实业有限公司; 724-1可见分光光度计 上海光学仪器厂; NN-J993微波炉 Matsushita Electric Industrial公司; 2760-6001蠕动泵 保定兰格恒流泵有限公司; 超滤装置 自制。

1.4 方法

1.4.1 工艺流程

玉米胚→清选及破碎→超临界CO₂萃取→微波细胞破壁→浸提→离心分离→超滤→柱层析离子交换分离提纯→等电点沉淀→真空浓缩干燥→成品

1.4.2 主要操作要点

1.4.2.1 原料预处理

将玉米胚中混杂的碎粉、皮屑等杂质全部去除后流水漂洗分离出胚芽, 45℃以下真空低温干燥至水分含量低于10%, 粉碎得粒度为0.125mm的胚芽粉备用。

1.4.2.2 超临界CO₂流体萃取

玉米胚芽中含有大量的脂肪, 如不进行脱脂处理, 一方面给谷胱甘肽的提取和纯化带来困难, 同时也造成优质食用油脂的浪费。本研究采用超临界CO₂萃取技术进行玉米胚脱脂处理, 可避免压榨法、有机溶剂浸出法引起胚粕蛋白变性、有机溶剂残留等缺陷, 整个分离操作可在较低温度下进行, 操作方便, 选择性好, 脱脂率高, 兼有脱色脱异杂味作用, 且最大限度地保留原料中生物活性物质的生理活性^[9]。本研究采用L₉(3⁴)正交试验设计对影响原料脱脂、脱杂的超临界CO₂流体萃

取效果的主要因素进行研究和分析, 以脂肪萃取量为评价指标, 因素压力(A)、温度(B)、时间(C)、CO₂流量(D)水平设计见表1。

表1 超临界流体萃取L₉(3⁴)正交试验设计
Table 1 Design of L₉(3⁴) orthogonal test on supercritical fluid extraction

水平	因 素			
	A 压力(MPa)	B 温度(℃)	C 时间(min)	D CO ₂ 流量(L/h)
1	20	35	60	20
2	25	40	90	25
3	30	45	120	30

1.4.2.3 微波细胞破碎

称取一定量经脱脂处理的玉米胚粉, 加入按1:20料水比加入蒸馏水搅拌均匀, 进行微波破壁处理, 温度90℃, 微波时间3min/次, 微波次数为五次, 间隔时间1min。然后在90℃热水中浸提20min, 离心分离取上清液用碘量法快速测定GSH含量检测微波破壁效果^[10-11]。

1.4.2.4 热水抽提GSH

采用L₉(3⁴)正交试验设计对影响热水浸提GSH的主要因素进行研究和分析, 以谷胱甘肽提取量作为考察指标, 确定最佳浸提工艺参数。影响GSH热水浸提效果的主要因素固液比(A)、温度(B)、浸提液pH值(C)、浸提时间(D)水平设计见表2。

表2 谷胱甘肽热水浸提L₉(3⁴)正交试验设计
Table 2 Design of L₉(3⁴) orthogonal test on hot water extraction GSH

水平	因 素			
	A 固液比(%)	B 温度(℃)	C pH	D 时间(min)
1	1:20	80	1.0	15
2	1:25	90	3.0	20
3	1:30	100	5.0	25

1.4.2.5 分离及纯化

将谷胱甘肽热水浸提液在4℃、11000r/min条件下离心分离5min, 取上清液选用PES膜进行超滤除去其中的蛋白质, 膜孔径为0.1μm, 超滤压力范围为0.1~0.15MPa。采用732阳离子交换树脂过滤液进一步纯化, 洗脱液为0.2mol/L的NaOH溶液。

1.4.2.6 等电点沉淀精制、浓缩干燥

还原型谷胱甘肽的等电点为pH5.93, 当其溶液的pH调整到5.93时, 可使还原型谷胱甘肽沉淀出来, 将上述含有GSH和NaOH的洗脱液用1mol/L盐酸调pH为5.93, 使GSH达到等电点沉淀后离心, 然后用去离子水溶解所得沉淀, 检测GSH含量及回收率, 45℃真空浓

缩干燥得还原型谷胱甘肽。

1.5 理化分析

1.5.1 成分检测

脂肪含量：按 GB5512—85 规定方法进行；蛋白质含量：按 GB5511—85 规定方法进行；还原型谷胱甘肽含量快速检测：碘量法^[11-12]；蛋白质浓度快速检测：Lowry 法^[13]。

1.5.2 紫外分光光度法检测还原型谷胱甘肽

首先配制 0.2mg/ml 的 GSH 标准品，然后分别在 230nm 波长处测其吸光度及紫外图谱，以 GSH 质量浓度 (mg/ml) 为横坐标，OD_{230nm} 下的吸光值为纵坐标，制作标准工作曲线。

取 GSH 的浸提液，进行紫外分光光度法定性定量分析，计算 GSH 的提取量^[11-12]。

1.5.3 纸层析法测定谷胱甘肽

首先将薄层板在 105℃ 下烘活化 20min，然后将配制好的 1g/L 的 GSH 标准溶液与不同浓度的样品分别点在层析纸上，用展开剂展开后，在 110℃ 下烘干 4min，然后用 0.4% 的茚三酮显色。将层析色谱图中的标品与样品进行对照，分别求得标品及样品的 R_f 值进行比较，对样品中的 GSH 进行测定^[14]。

2 结果与分析

2.1 超临界 CO₂ 萃取最佳条件的确定

由表 3 极差分析可知，各因素对脂类萃取量的影响程度强弱次序为 A > C > B > D，即萃取压力对超临界 CO₂ 脱脂效果影响最大，其次是萃取时间，然后是萃取温度，CO₂ 流量影响最小。超临界 CO₂ 萃取脱脂最佳工

艺条件为 A₂B₂C₃D₁，即萃取压力 25MPa，温度 40℃，时间 120min，CO₂ 流量 20L/h，脂类萃取率 57.03%，玉米胚粕含脂率 0.72%。

2.2 还原型谷胱甘肽的检测

2.2.1 还原型谷胱甘肽及蛋白质测定标准曲线的绘制

采用碘量法和紫外分光光度法对 GSH 定量分析。标准曲线见图 1 和图 2。

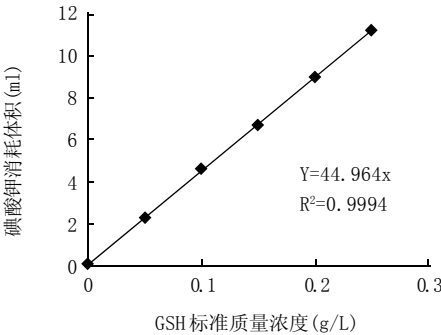


图1 碘量法测定 GSH 标准曲线
Fig.1 Standard curve of determining GSH by iodometry method

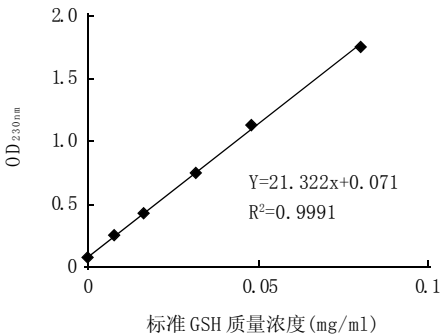


图2 紫外分光光度法测定 GSH 含量标准曲线
Fig.2 Standard curve of determining GSH by ultraviolet spectrophotometry method

表3 正交试验结果分析

Table 3 Analysis of orthogonal test results

试验号	因素与水平				萃取率 (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	18.83
2	1	2	2	2	24.46
3	1	3	3	3	28.13
4	2	1	2	3	43.28
5	2	2	3	1	57.03
6	2	3	1	2	45.94
7	3	1	3	2	46.35
8	3	2	1	3	44.76
9	3	3	2	1	46.67
K ₁	71.42	108.46	109.53	122.53	
K ₂	146.25	126.25	114.41	116.75	
K ₃	137.78	120.74	131.51	116.17	
k ₁	23.81	36.15	36.51	40.84	
k ₂	48.75	42.08	38.14	38.92	
k ₃	45.93	40.25	43.84	38.72	
R	24.94	5.93	7.33	1.93	

2.2.2 紫外-可见分光光度法 GSH 分析结果

将离子交换纯化后的样液收集，由于采用 NaOH 溶液作为洗脱液，因此溶液本身呈碱性，直接在 OD_{230nm} 处有最大吸收峰，打印样品图谱与标品图谱进行比较。如图 3 所示，样品与标品的出峰位置及峰形基本一致，范围在 229~232nm 之间，但图谱右侧稍向外散，说明溶液中还存在极少量的与 GSH 分子量接近的短肽，可以确定本实验所提物质为还原型谷胱甘肽^[15]。根据 GSH 含量的标准曲线方程计算出洗脱液中谷胱甘肽含量为 1.25mg/100ml，即纯化后还原型谷胱甘肽提取量为 56.21mg/100g 玉米胚。

2.2.3 纸层析法分析 GSH 结果

采用纸层析法对提取物进一步分析，同一物质在相同条件下的 R_f 值是一致的，即它们在同一位置出现颜色

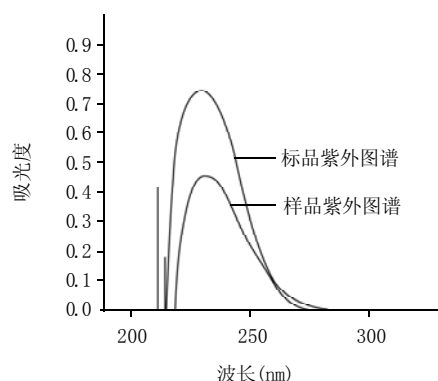


图3 GSH 标品与样品的紫外图谱比较
Fig.3 Comparison of ultraviolet spectrophotometry profile between standard preparation and sample of GSH

斑点，只是由于浓度不同斑点的颜色不同。而本实验提取的物质与GSH标品同时进行纸层析，结果如图4所示，第一个是标准品跑出的层析图，其余四个是不同浓度的样品，可以求得GSH标品的 R_f 值为0.32，而样品的 R_f 值为0.31，即标品与样品的色带位置一致，只是它们浓度不同而颜色深浅不一，因此可以断定本研究所提取的物质为还原型谷胱甘肽^[14]。

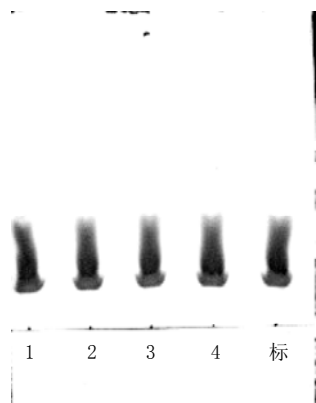


图4 GSH 标品与样品纸层析图片比较
Fig.4 Comparison of filter paper chromatogram between standard preparation and sample of GSH

2.3 热水浸提还原型谷胱甘肽条件的优化

2.3.1 热水浸提还原型谷胱甘肽正交试验结果

由表4极差分析可知，各因素对热水浸提GSH的影响程度强弱顺序为 $D > A > B > C$ ，即浸提时间对浸提效果影响最大，其次是固液比，然后是浸提温度，pH影响最小，最佳工艺条件为 $A_1B_2C_2D_2$ ，即固液比1:20(g/ml)，浸提温度90℃，pH3.0，浸提时间20min，GSH提取量为104mg/100g玉米胚。

2.3.2 各因素对浸提效果的影响

2.3.2.1 固液比对GSH提取效果的影响

试验结果表明，当固液比过小时，物料黏度大，

表4 热水浸提GSH正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test on hot water extraction of GSH

试验号	因素与水平				GSH 提取量 (mg/100g)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	57
2	1	2	2	2	104
3	1	3	3	3	70
4	2	1	2	3	55
5	2	2	3	1	48
6	2	3	1	2	64
7	3	1	3	2	52
8	3	2	1	3	67
9	3	3	2	1	43
K_1	232	164	188	148	
K_2	167	220	203	221	
K_3	162	177	170	192	
k_1	77.33	54.67	62.67	49.33	
k_2	55.67	73.33	67.67	73.67	
k_3	54.00	59.00	57.67	64.00	
R	23.33	18.66	10.00	24.34	

溶质的溶出阻力增强，导致GSH提取率下降。继续降低物料浓度，GSH溶出阻力虽然增强，分子自由程增大，分子间碰撞机会减少，胞内GSH释放程度减弱，GSH提取率下降。因此，最佳固液比为1:20(g/ml)。

2.3.2.2 温度对GSH提取率的影响

温度是影响GSH溶出率的重要因素之一。GSH属于胞内小分子物质，随着温度的升高，分子运动加剧，细胞内溶解物穿过破损细胞壁的能力加强，GSH分子易于溶出。但温度与GSH溶出的浓度并不呈线性关系。开始时，随着温度的升高，GSH溶出浓度逐渐增大，当90℃时达到最高，随着温度继续升高，溶出的GSH在高温下部分氧化，使GSH浓度开始下降，因此浸提温度为90℃时，浸提效果最佳。

2.3.2.3 pH值对GSH浸提效果的影响

GSH属于酸性肽，其等电点为5.93，在酸性条件下稳定。试验结果表明，pH1.0时GSH提取率稍低；而且物料对设备腐蚀性增强，不利于安全操作；pH为5.0时，GSH不稳定，部分发生氧化导致GSH提取率下降。当浸提液pH3.0时，GSH溶出量最大，而且性质稳定。

2.3.2.4 浸提时间对GSH浸提效果的影响

浸提时间是影响GSH提取率的关键因素。根据化学平衡原理，溶质在溶剂中的溶解程度随着浸提时间延长而增加，当溶出物质的浓度达到一定值时反应趋于平衡，继续延长浸提时间，溶出物浓度增加不大，且已溶出的GSH由于氧化和逆反应等原因而减少。浸提时间为20min时GSH浸提效果最好。

3 结论

杏花花粉中苦杏仁苷的提取工艺的研究

张红城¹, 尹 策¹, 董 捷^{1,*}, 李春阳², 陈翠丽³

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093 2. 江苏省农科院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014

3. 北京联合大学应用文理学院生物系, 北京 100083)

摘 要: 本研究探讨了从杏花花粉中用不同溶剂提取苦杏仁苷, 及提取溶剂的浓度、料液比、超声时间、提取时间对苦杏仁苷提取工艺的影响, 并采用紫外分光光度法定性、定量。结果表明: 提取苦杏仁苷的最佳溶剂是乙醇, 最佳提取工艺是浓度为 100% 的乙醇, 料液比 1:7, 超声提取 20min, 振荡提取 12h。杏花花粉中的苦杏仁苷的含量为 6.1%。

关键词: 杏花花粉; 苦杏仁苷; 提取

Study on Extracting Process of Amygdalin from Almond Pollen

ZHANG Hong-cheng¹, YIN Ce¹, DONG Jie^{1,*}, LI Chun-yang², CHENG Cui-li³

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China

2. Institute of Agro-food Science and Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

3. Department of Biology, College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100083, China)

Abstract: This research discussed the effects of different solvents on the yield of amygdalin from almond pollen. The influences of concentrations of the solvent, solid-liquid ratio, ultrasonic treatment time and extract time were also discussed. The method of UV spectrophotometry was used to determinate quantity of amygdlin. Results indicated that the best extraction solvent is ethanol, and the optimum technological conditions are concentration of ethanol 100%, solid-liquid ratio 1:7, ultrasonic treatment time 30 min, and extract time 12 h. On these conditions the content of amygdalin extracted from almond pollen is 6.1%.

收稿日期 2007-05-22

*通讯作者

作者简介: 张红城(1967-), 男, 博士, 研究方向为食品生物技术。

3.1 采用超临界 CO₂ 萃取对玉米胚进行脱脂处理, 最佳工艺参数为萃取压力 25 MPa, 萃取温度 40 °C, 时间 120 min, CO₂ 流量 20 L/h, 在此条件下脂类物质萃取量 57.03%, 玉米胚粕含脂率 0.72%。

3.2 热水浸提 GSH 最佳工艺条件为: 固液比 1:20 (g/ml), 浸提温度 90 °C, 浸提液 pH 3.0, 浸提时间 20 min。GSH 提取量为 104 mg/100 g 玉米胚。

参考文献:

- [1] 袁尔东, 郑建仙. 功能性食品基料—谷胱甘肽的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(5): 52-57.
- [2] 沈蓓英, 江志伟. 具有生物活性新型功能性食品添加剂谷胱甘肽[J]. 粮食与油脂, 1993(2): 27-32.
- [3] 李峰, 徐军庆. 低聚肽的研究与开发[J]. 食品与药品, 2005(7): 43-44.
- [4] 张景硕. 谷胱甘肽的药理与用途[J]. 中国医院药学杂志, 1994, 14(8): 98-102.
- [5] 杨培惠, 齐剑英. 谷胱甘肽的应用及其检测方法[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 23(1): 52-54.
- [6] 彭军. 中国玉米加工业的现状和发展[J]. 食品开发, 2001(6): 3-5.
- [7] 石桂春. 玉米加工利用的现状与途径[J]. 玉米科学, 1998(4): 67-69.
- [8] 胡学烟. 玉米胚开发与利用[J]. 粮食与油脂, 2001(11): 32-33.
- [9] 张艳荣, 马福敏, 王大为. 超临界 CO₂ 萃取玉米皮纤维脂类物质的研究[J]. 食品科学, 2005(6): 149-151.
- [10] 范崇东, 王淼. 酵母细胞中谷胱甘肽的微波辅助萃取[J]. 食品与发酵工业, 2003, 10(17): 27-30.
- [11] 夏亦明. 总谷胱甘肽的测定方法[J]. 营养学报, 1990, 12(1): 18-22.
- [12] 张少辉. 谷胱甘肽的紫外分光光度测定[J]. 辽宁大学学报, 1992, 19(4): 66-69.
- [13] LAYNE E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins[M]//COLEEICK S P, KAPLAN N O. Methods in enology. New York: Academic Press, 1957: 447-454.
- [14] ZOUHAIR A, XU Ji-yang, WU Wu-tong. Determination of glutathione in biosynthesis reaction by paper chromatography[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1997, 28(3): 176-179.
- [15] 杨祖英, 马永建, 常凤启. 食品检验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 302-336.