

*Candida utilis*提取液的组成对 D001 阳离子交换树脂分离谷胱甘肽效率的影响

王 淼, 苏晓晋

(江南大学食品学院, 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 研究富含谷胱甘肽(GSH)的 *Candida utilis* WSH 02-08 提取液的组成对其在 D001 阳离子交换树脂上交换效率的影响。结果表明, 提取液中大分子肽对 GSH 在 D001 阳离子交换树脂上交换效率有较大影响。采用超滤处理酵母提取液和改进从酵母中提取 GSH 的方法可以大大降低样品中大分子肽的含量, 相对分子质量分别降低到小于 2000 和 4000, D001 阳离子交换树脂对其中 GSH 的吸附性能明显改善, 吸附效率从原来的 40% 左右提高到 70% 以上。

关键词: 谷胱甘肽; 离子交换; 超滤

Effects of *Candida utilis* Extract Compositions on Glutathione Separation Efficiency of D001 Cation Ion Exchange Resin Columns

WANG Miao, SU Xiao-jin

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this paper, the effects of the *Candida utilis* WSH 02-08 extract compositions on the glutathione (GSH) adsorption efficiency of D001 cation ion exchange resin columns were studied. The results showed that the big molecular weight polypeptides obviously affects the adsorption efficiency of D001 cation ion exchange resin for GSH. By ultrafiltration treatment of the extract with respect to a suitable extract method, the content of the big molecular weight polypeptides in sample decreases largely, down to MW <2000 and MW <4000 respectively, whereas the adsorption efficiency of D001 cation ion exchange resin for GSH increases obviously from about 40% to above 70%.

Key words glutathione ion exchange ultrafiltration

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0059-04

谷胱甘肽(简称 GSH)是具有重要生理功能的三肽, 近年来, 在医药和食品领域倍受人们关注, 并已得到多方面的应用^[1]。

谷胱甘肽的分离纯化是发酵法生产工艺中最重要的部分之一, 也是影响其工业化生产的限制因素之一。对于作为功能性食品添加剂使用的 GSH, 要求具有一定的

收稿日期: 2007-01-18

作者简介: 王淼(1962-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。

参考文献:

- [1] 胡小松. 我国果品加工业的现状与发展[J]. 食品与机械, 1998(1): 4-6.
- [2] 廖小军. 发展我国果汁工业的对策[J]. 中国食品工业, 1997, 4(11): 53-55.
- [3] 左光泽. 用活性炭提取水中的微量有机磷的方法[J]. 刑事技术, 1999(3): 37.

- [4] 孙传经. 气相色谱分析原理与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999.
- [5] 马建强, 甘春芳. 气相色谱-火焰光度检测法测定蔬菜中的甲胺磷残留量[J]. 广西师院学报: 自然科学版, 2001, 18(2): 6-8.
- [6] EURR-SUN H, JERRY N C, MATTHEW J Z. Ozone and hydrogen peroxyacetic acid treatment to reduce or remove EBCs and ETU residues in a solution[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 5689-5694.

纯度, 并且产品成本不宜过高。传统分离 GSH 的铜盐法由于重金属铜的残留和残留铜去除成本高等问题, 不适合用作食品添加剂的 GSH 的生产。对于一些亲和层析法分离 GSH 来讲, 大多利用 GSH 的 -SH 与亲和材料的特异性结合来分离, 但该方法需要采用特殊的洗脱剂进行洗脱, 而且成本高, 也不适用于食品行业。从理论上讲, 采用离子交换法从酵母细胞提取液中分离 GSH 最具可行性。酵母细胞提取液是一种含多种组分的胶体溶液, 其中含有大量的蛋白质、肽类、氨基酸、核苷酸等多种杂质, 特别是一些寡肽和氨基酸, 由于其结构特征和性质与 GSH 接近, 往往会影响离子交换效率。在笔者对离子交换法从酵母细胞提取液中分离 GSH 的系统研究过程中体会到酵母提取液中的大分子肽对阳离子交换效率有较大的影响。本实验研究了酵母提取液、超滤液以及改进提取方法后获得的提取液的分子量分布, 考察了它们对其中 GSH 在 D001 阳离子交换树脂上吸附效率的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

产朊假丝酵母(*Candida utilis*) WSH 02-08 GSH 积累株 江南大学生物工程学院, 环境生物技术研究室提供。

D001 阳离子交换树脂 西安蓝深交换吸附材料有限责任公司; 采用常规的处理方法处理成 H 型待用。

DTNB、98% GSH Sigma 华美生物工程公司分装。

1.2 方 法

1.2.1 谷胱甘肽提取液的制备

热水抽提法^[2]及其在此基础上的适当改进。

1.2.2 离子交换固定床对谷胱甘肽的分离纯化

1.2.3 酵母提取液的超滤

采用截留分子量为 5000 的超滤膜对富含 GSH 的酵母提取液进行超滤^[3]。

1.2.4 GSH 的含量分析

改良的 DTNB 法^[4]。

1.2.5 蛋白质的含量分析

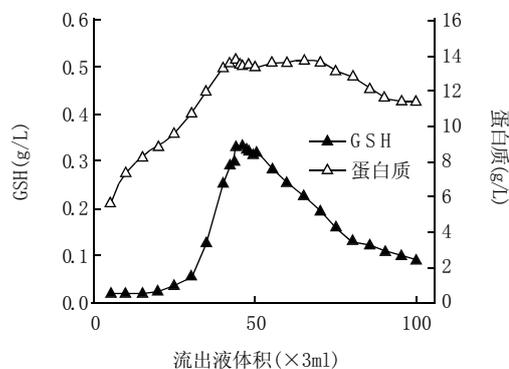
紫外分光光度法^[5]。

2 结果与分析

2.1 提取液超滤后对谷胱甘肽在阳离子交换树脂上交换行为的影响

将热水抽提的提取液直接进行离子交换, 结果表明, 在上样过程中, 会出现 GSH 顶出峰, 这是由于提取液中存在比 GSH 更强的吸附物质。采用截留分子量为

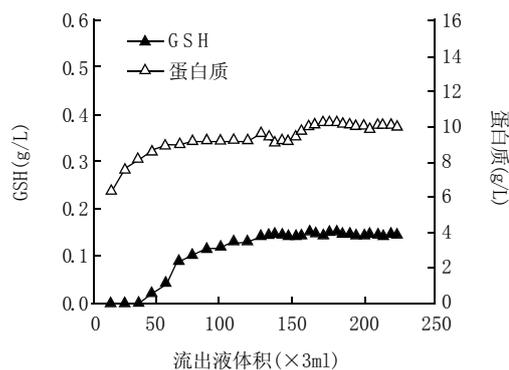
5000 的超滤膜将酵母提取液进行超滤, 以除去截留的大分子的肽。将未经超滤和超滤后的 pH 值为 3.5 的 GSH 提取液上固定床 D001 阳离子交换柱, GSH 在树脂上的交换行为如图 1 和图 2 所示。



上样液中 GSH 的浓度为 0.21 g/L。

图 1 未超滤的提取液的离子交换穿漏曲线

Fig.1 GSH outflow curves of extract treated without ultrafiltration on ion exchange column



上样液中 GSH 的浓度为 0.13 g/L。

图 2 超滤后的透过液的离子交换穿漏曲线

Fig.2 GSH outflow curves of extract treated without ultrafiltration on ion exchange column

从图 1 和图 2 可以明显的看到, 经过超滤后的 GSH 透过液和未经过超滤的 GSH 提取液, 在阳离子交换树脂上的交换行为发生了明显的变化。超滤后的 GSH 截留液在进行阳离子交换时穿漏曲线并没有 GSH 的顶出峰, 这可能是由于超滤过程已经将提取液中强吸附物质除去。由于没有强吸附物质和 GSH 竞争吸附, 所以 GSH 的相对选择系数增大。

表 1 超滤对 GSH 和蛋白质吸附率的影响

Table 1 Effects of ultrafiltration on adsorption efficiency of GSH and protein on ion exchange column

	GSH 吸附率 (%)	蛋白质吸附率 (%)
未超滤	41	78
超滤	72	46

从表 1 中可以看出经过超滤后，树脂对 GSH 的吸附率大大提高，相对的蛋白质吸附率却相应的减少很多。因此，为了使树脂对 GSH 的交换容量尽可能大，应该尽量除去离子交换上样液中的大分子蛋白质。为了进一步了解这种强吸附的物质是小分子的寡肽、氨基酸还是大分子的多肽，超滤前后提取液中肽的分子量分布情况，本研究还采用 HPLC 测定了超滤前后提取液中肽的分子量分布。从实验结果可以看出，大分子的多肽对阳离子交换树脂的交换效率的确有较大影响。经过超滤除去了分子量大于 3000 的肽，虽然从分子量分布来看，酵母提取液中大分子的肽占的比例并不多，但它对 D001 阳离子交换树脂的交换效率有较大影响。超滤是除去酵母提取液中大分子蛋白质的有效方法之一。同时也可以看出，除去提取液中大分子的肽可以有效提高离子交换效率。

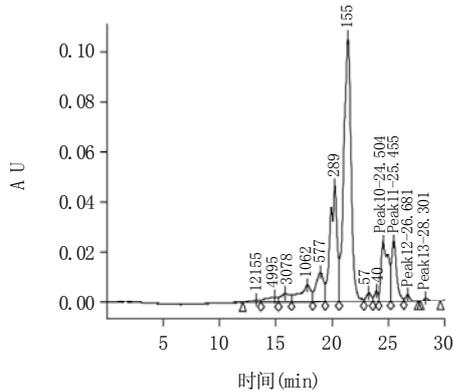


图 3 超滤前 GSH 提取液中肽的相对分子质量分布
Fig.3 Peptide molecular weight distribution of GSH extract treated without ultrafiltration

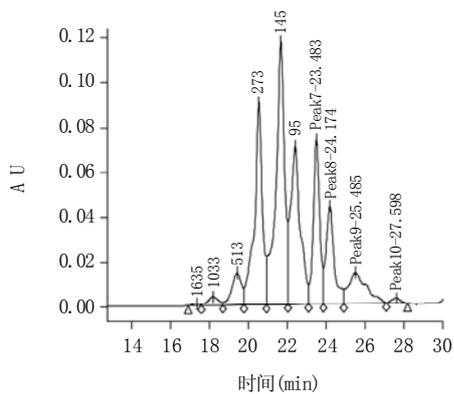


图 4 超滤后 GSH 提取液中肽的相对分子质量分布
Fig.4 Peptide molecular weight distribution of GSH extract treated with ultrafiltration

2.2 酵母中 GSH 的提取方法对离子交换效率的影响

为了降低提取液中杂蛋白、肽对离子交换效率的影响，本研究采用 HPLC 分析了提取液中肽的分子量分

布，并对提取工艺加以改进，使酵母中大分子蛋白质尽可能少的溶出。从图 4 的实验结果可以看出，改进后的提取液中大分子蛋白质明显的减少，其蛋白质去除率较改进前的工艺提高 34.48%。

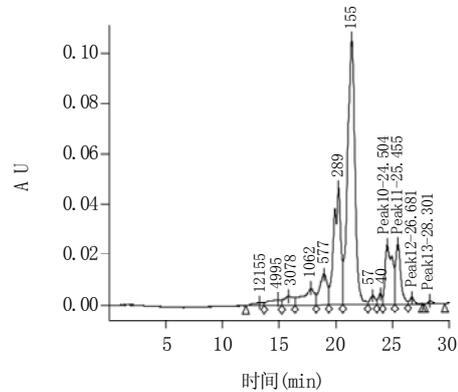


图 5 酵母提取液中肽的相对分子质量分布
Fig.5 Peptide molecular weight distribution of GSH extract

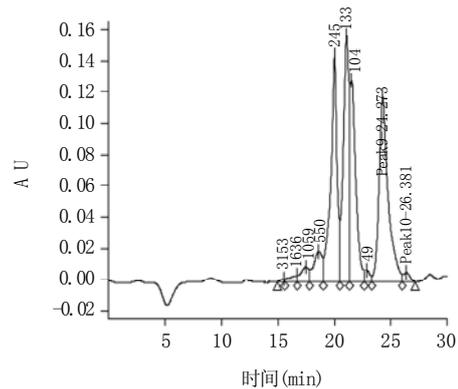


图 6 改进提取方法后酵母提取液中肽的相对分子质量分布
Fig.6 Peptide molecular weight distribution of modified GSH extract

2.3 细胞碎片对离子交换效率的影响

前面的研究表明 D001 阳离子交换树脂在一定条件下对 GSH 的吸附具有选择性。因此，GSH 的分离纯化过程中如能采用带菌体直接上固定床离子交换柱，既省时、节能，又可以减少操作步骤，减少在分离纯化过程中 GSH 的损失，降低成本，提高生产效率。

将含有细胞碎片的提取液和离心超滤后的谷胱甘肽提取液分别在同样条件下上柱吸附，其吸附情况见图 7 和图 8 所示。

从图 7、8 可以看出，含有细胞碎片的提取液和超滤后提取液在 D001 阳离子交换树脂上的吸附情况相似，均无 GSH 的顶出峰，且各胱甘肽的吸附率接近，约 73%~75%。因此，用含有细胞碎片的提取液直接上柱吸附来分离 GSH 里可行的。

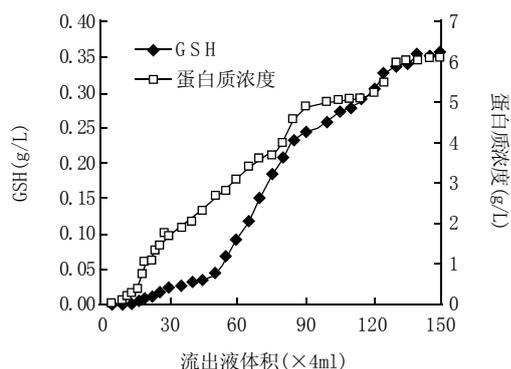


图7 提取液带菌体上柱 GSH 的吸附情况
Fig.7 GSH adsorption curves of extract with cell on ion exchange column

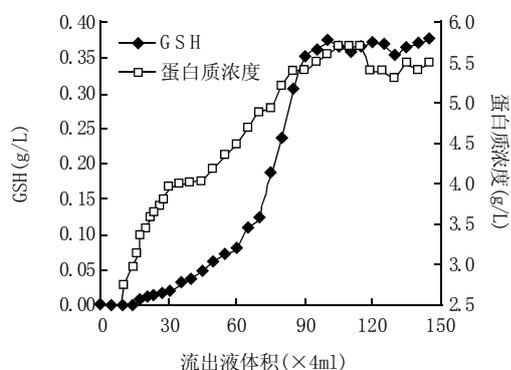


图8 超滤后的提取液上柱 GSH 的吸附情况
Fig.8 GSH adsorption curves of extract treated with ultrafiltration on ion exchange column

3 结论

3.1 酵母提取液中的较大分子的多肽是除离子交换操作条件外,影响离子交换效率的主要因素之一;多肽与

表2 带菌上柱和超滤后上柱的效果比较

Table 2 Comparison of ion exchange efficiency with extraction with cell and extraction treated with ultrafiltration

项目	含有细胞碎片的提取液	超滤后提取液
GSH 吸附率 (%)	75.5	73.5
回收率 (%)	80.1	80.2
蛋白质去除率 (%)	68	60
浓缩倍数	2.9	2.5
纯化倍数	5	3.9

GSH 竞争与树脂的功能基团的结合,影响离子交换树脂的吸附效率。

3.2 采用超滤处理酵母提取液和改进从酵母中提取 GSH 的方法可以大大降低样品中大分子肽的含量,超滤处理酵母提取液后样品中肽的相对分子质量可以降低到小于 2000;改进从酵母中提取 GSH 的方法后,样品中肽的相对分子质量可以降低到 4000 以下。

3.3 采用超滤处理酵母提取液和改进从酵母中提取 GSH 的方法使 D001 阳离子交换树脂对其中 GSH 的吸附性能明显改善,吸附效率从原来的 40% 左右提高到 70% 以上。

参考文献:

- [1] PENNINGCKX M. A short review on the role of glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental, and oxidative stresses [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 26(9/10): 737-742.
- [2] 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(2): 132-134.
- [3] 苏晓晋,王淼,王帅,等. 应用超滤技术除去富含谷胱甘肽的酵母提取液中蛋白质的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2006(2): 136-138.
- [4] ELLMAN G L. A calorimetric method for determining low concentrations of mercaptans [J]. *Arch of Biochem and Biophys*, 1959, 82: 70-77.
- [5] LIN J H, WEI W L, PENG X X. Experiment of modern biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2001: 36-38.



美国研究称人体皮肤上至少寄生 180 种细菌

纽约大学医学院微生物学家马丁·布莱瑟博士指出,人体皮肤上至少寄生 180 种细菌,真正的数目可能更多,估计有 250 多种,当中有长住的(而且应该住很久了),有些则只是路过串门;而不同性别的“房东”原来也会影响住客的种类。

细菌的数目以大比数 10:1 压倒我们身边细胞的数目,不过不用怕,因为活在我们体内的,绝大部分是“好”细菌,还挺热心地一直帮助我们这些“房东”。虽然正常皮肤上有很多细菌,但一般不会引起感染。细菌性皮肤病感染可影响很小,只出现小脓疱,也可在几小时内扩散累及一大片皮肤。皮肤感染的严重程度从很小的痤疮到危及生命,如葡萄球菌皮肤烫伤样综合征。

马丁博士说:“没有好细菌,我们根本活不下来。”细菌在动物身上已经住了 10 亿年了,它们的出现和组合绝非偶然,“它们跟我们一起进化。”所以,研究人员建议我们不应过于频繁地清洁身体,因为这样只会洗掉我们的保护层而已。