

啤酒废酵母中还原型谷胱甘肽提取

马德功¹, 崔文文²

(1. 山东轻工业学院食品与生物工程学院, 济南 250353

2. 青岛明月海藻集团有限公司, 胶南 266400)

摘要: 谷胱甘肽 (GSH) 是一种天然的活性短肽, 具有清除体内自由基等生理功能。本文分别采用微波辅助法、热水抽提法和其它抽提法从啤酒废酵母中提取 GSH, 主要探讨了微波辅助法和热水抽提法的提取工艺条件, 分析比较了不同方法的提取效果。结果表明: 热水抽提和微波处理是两种简便、有效的方法, 其中微波法具有好的应用前景。

关键词: 啤酒废酵母; 谷胱甘肽; 提取

中图分类号: Q516

文献标识码: A

文章编号: 1006-2513 (2008) 04-0139-04

A study on the extracting method of glutathione from abandoned beer yeast

MA De-gong¹, CUI Wen-wen²

(1. College of Food and Biology Engineering, Shandong Institute of Light Industry Jinan 250353;

2. Qingdao Bright Moon Seaweed Co., Ltd, Jiaonan 266400)

Abstract: Glutathione (GSH) is a natural active peptide that can get rid of the free radicle within our bodies. In this paper, microwave, hot water extraction and other extraction method are adopted, and the microwave assisted extraction and water extraction conditions are mainly studied. Comparison is made among all these methods. Hot water extraction and microwave method processing are two simple and effective methods and microwave method processing has a very good prospect.

Key words: abandoned beer yeast; glutathione; extraction

谷胱甘肽是一种具有重要生理功能的活性肽, 以还原态 (GSH) 和氧化态 (GSSG) 两种形态广泛存在于动植物以及微生物体内, 其中动物肝脏、酵母和小麦胚芽中 GSH 含量最为丰富^[1]。谷胱甘肽具有抑制衰老、治疗眼科疾病、预防糖尿病、感染性肝炎、消除疲劳等作用^[2,3]。基于谷胱甘肽的重要生理作用, 国内外学者对其生物学功能和制备方法进行了广泛研究。

GSH 的制备方法有酶处理法、热水抽提法、乙醇抽提法、微波法等。从猪血、玉米和鲜酵母中提取谷胱甘肽的方法, 国内已有少数几篇文章报道。尚未见对啤酒废酵母中谷胱甘肽提取方法

进行探讨的相关报道。本文首次综合探讨从啤酒废酵母中提取谷胱甘肽的方法, 确定最佳破壁浸提工艺条件, 为谷胱甘肽的工业生产和啤酒废酵母的开发与利用提供参考, 具有非常重要的社会价值和经济价值。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

啤酒酵母泥, 由济南趵突泉啤酒公司提供; 偏磷酸, 天津市凯通化学试剂有限公司提供; 碘化钾, 天津市化学试剂三厂提供; 电子天平

收稿日期: 2008-4-24

作者简介: 马德功 (1980-), 男, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向: 食品资源开发。

JA61001 型, 上海精密科学仪器有限公司提供; ER-692 微波炉, 中国电子器件总公司提供; 电热恒温水浴锅 HHS-4 型, 北京市医疗设备总厂提供。

1.2 实验方法

1.2.1 预处理及提取工艺流程^[4]

啤酒废酵母→无菌水稀释→80 目筛子筛分三次→100 目筛分二次→离心分离弃上清液→纯净的啤酒酵母干燥→干酵母→破壁抽提→离心→收集上清液→调节上清液 pH→测上清液中 GSH 含量

1.2.2 提取方法

(1) 微波法 a: 破壁、浸提两步法, 即将酵母泥均匀的涂于烧杯内壁, 微波直接作用一定时间, 再按比例加水常温下浸提。提取液离心、定容, 测 GSH 的含量。

(2) 微波法 b: 破壁、浸提一步法, 即将酵母细胞和一定比例的水加入烧杯, 溶解后微波作用一定时间, 在冰水中快速冷却、离心、定容测 GSH 的含量。

(3) 热水提取: 取经预处理啤酒废酵母若干, 与蒸馏水按比例充分混合后倒入一定体积的沸腾的水中, 再用一定体积水洗涤烧杯后一并倒入, 将混合液保持在 80~90℃ 浸提, 6min 后隔 2min 取一次样。放置冰水中速冻, 4000 r/min 离心, 取上清液测定 GSH 含量^[5]。

(4) 乙醇抽提法: 取 10g 经预处理的啤酒废酵母, 与 90mL 体积分数 40% 的乙醇溶液相混合, 30℃ 下搅拌抽提 2h, 4000r/min 离心 15min 后取上清液测 GSH 提取率。

(5) 冻溶法: 在冰箱中反复冻结、解冻 3 次。

(6) 沸水抽提法: 沸水溶解并保持沸腾 10 min, 4000r/min 离心 15min, 取上清液测 GSH 提取率。

1.3 谷胱甘肽含量的测定 碘量法^[4,6]

(1) 原理: 利用 GSH 的还原性与碘酸钾反应, 当 GSH 全部反应完时, 碘酸钾将碘化钾氧化为碘, 碘使淀粉指示剂变为蓝色, 即为滴定终点。碘酸钾消耗量与 GSH 的含量成正相关, 满足关系式: 每毫升待测液 GSH 含量 = $V_{\text{滴定消耗体积}} \times C_{\text{滴定用标准碘酸钾浓度}} \times \text{GSH 分子量} / V_{\text{吸取的待测液体积}}$

(2) 方法: 取 5mL 的待测样品, 置于 250mL

的锥形瓶中, 加入 5mL 2% 偏磷酸溶液, 1mL 5% 的碘化钾溶液和 2 滴淀粉指示剂, 用碘酸钾溶液 0.001mol/L 滴定至溶液由无色变为蓝色即为滴定终点。可利用公式: 每毫升待测液中 GSH 含量 = $V_{\text{滴定消耗体积}} \times 0.001 \times 307.221 / V_{\text{吸取的待测液体积}}$

2 结果与讨论

2.1 酵母的微波处理法 a

2.1.1 微波作用时间对 GSH 提取率的影响

单次处理酵母量为 10g, 微波 650W, 酵母泥料液比 1: 1, 微波处理 2~40s, 浸提料液比 1: 15, 30℃ 抽提 15min, 4000r/min 离心, 取上清液测 GSH 提取率, 结果见图 1。

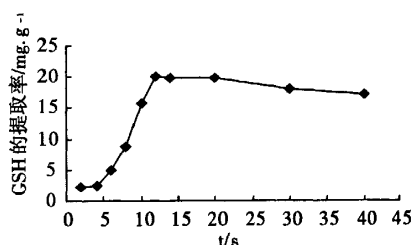


图 1 微波处理时间对 GSH 提取率的影响

从图 1 可以看出, 微波 5s 后提取率迅速升高, 12s 时 GSH 提取率出现最高值, 处理时间再延长, 则提取率反而有所下降, 这可能是 GSH 的氧化、分解或其它原因所导致的。

2.1.2 溶剂浸提时间对 GSH 提取率的影响

微波处理液用蒸馏水在 30℃ 下分别浸提 5~25min, 提取液经离心, 取上清液, 所含 GSH 用碘量法测定, 结果见图 2。

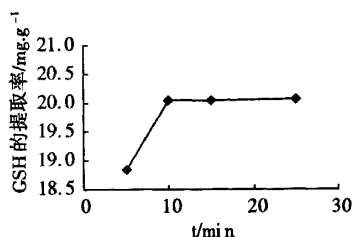


图 2 浸提时间对 GSH 提取率的影响

从图 2 可以看出, 酵母中谷胱甘肽随着浸提时间的延长, 不断溶出, 5 min 时已经达到较高的水平, 在 10 min 后提取提取率几乎不再变化,

考虑到节能和提高生产率方面,由此确定 10min 为提取时间。

2.1.3 浸提固/液比对 GSH 提取率的影响

称取相同的酵母量 5 份,使用微波功率为 650W,酵母泥料液比 1:1,微波处理 12s,浸提固/液比分别为 1:8、1:9、1:10、1:20、1:40,30℃ 抽提时间 15min,结果见图 3。

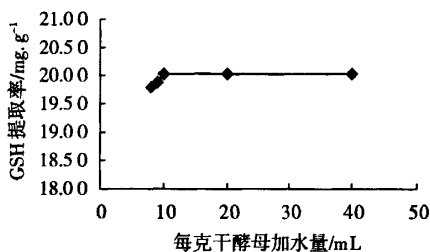


图 3 固/液比对 GSH 提取率的影响

从图 3 中可以看出,液/固比达到 10 以后谷胱甘肽的提取率几乎不再变化,所以选择了每克干细胞中加水 10mL 这一比。

由以上实验确定了方法 a 的工艺参数为:微波处理 650W,时间 12s,加水比例为每克干细胞加水 10mL,30℃ 提取时间 10min,提取率可达 20.03mg·g⁻¹。

2.2 酵母的微波辅助处理法 b

2.2.1 微波作用时间对 GSH 提取率的影响

称取相同的酵母量 10 份,使用微波功率为 650W,料液比 1:15,微波处理 30~80s,结果见图 4。

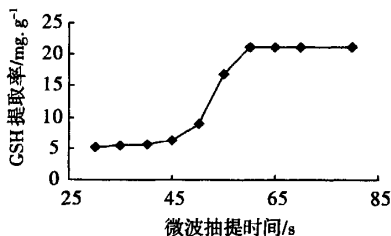


图 4 微波抽提时间对 GSH 提取率影响

从图 4 可以看出,在微波直接作用下提取使用的时间比较短,650W 下只需要 60s,提取就达到最高。且 GSH 由少到多的突变区间比较短(10~15s)。

2.2.2 固/液比对 GSH 提取率的影响

使用微波功率为 650W,按照浸提固/液比分

别为 1:8、1:12、1:16、1:20、1:30,作成体积相同的酵母细胞悬浮液 5 份,分别微波处理 60s,结果见图 5。

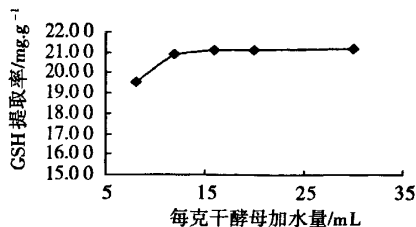


图 5 不同加水比例对提取率的影响

从图 5 可以看出,在相同的悬浮液体积的条件下,经相同时间的微波处理,溶剂量少时提取率偏低,当物料比高于 16mL/g 时提取率几乎相等。经综合考虑,实验中确定物料比为 16mL/g。

由以上实验可确定方法 b 的提取工艺条件:物料比为 16mL/g 的酵母悬浮液在 650W 下处理 60s,提取率可达 21.14mg/g。

2.3 热水抽提法

2.3.1 破壁液与菌体比例及破壁时间对 GSH 提取率的影响

预处理的啤酒废干酵母与蒸馏水(w/v)比例 1:6、1:9、1:12,按比例分别配成 200mL 酵母悬浮液,85℃ 条件下热处理并不断搅拌,8min 后每隔 2min 取样,速冷,4000r/min 离心,取上清液测其提取率(mg·g⁻¹)结果见图 6。

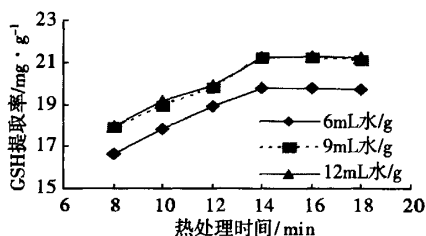


图 6 液/回比及破壁时间对提取率影响

从图 6 可看出,不同加水比例下热提 14min 提取率均达到最高值。时间再延长,由于 GSH 的氧化、分解,GSH 提取率反而下降。另外可看出提取率随加水量增加而增加,但当达到 9mL/g 后提取率几乎不再增加,所以选择破壁液与菌体比例 9:1 较佳。

2.3.2 破壁温度对 GSH 提取率的影响

预处理干啤酒废酵母与蒸馏水 (w/v) 1: 9, 按比例配制 3 份 200mL 酵母悬浮液, 分别在 80℃、85℃、90℃ 条件下热处理并不断搅拌, 8min 后每隔 2min 取样, 速冷, 4000r/min 离心, 取上清液测其提取率 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 结果见图 7

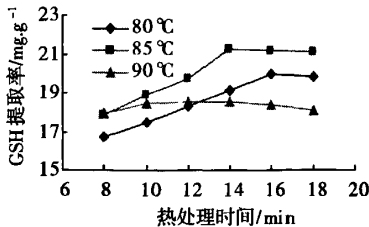


图7 桶壁温度对 GSH 提取率的影响

从图 7 可以看出 80℃ 时最高值出现时间推迟且 GSH 提取率较 85℃ 时低; 随着温度升高, 最高值出现时间提前, 85℃ 时需 14min, 90℃ 时 10~12min; 一方面温度高时细胞破壁充分, 有利于 GSH 的溶出, 另一方面温度高时 GSH 易分解, 得率下降, 综合考虑, 采用 85℃ 较合理。

由以上实验确定热水抽提法的提取工艺条件: 物料比为 9mL/g, 热处理温度 85℃, 处理时间 14min, 提取率达 $21.24 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.4 与其它抽提方法的比较

对微波法和热水抽提法在操作工艺、耗能及提取率等方面与其它三种方法进行了分析比较^[7] (表 1)。

表 1 各种抽提方法的比较

提取方法	温度/℃	最佳时间 /min	GSH 提取 率 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
微波法 a	30~100	1/5	20.03
	30	10	
微波法 b	30~100	1	21.14
热水提取	85	14	21.24
40% 乙醇提取	30	120	17.16
冻溶法	-20	360	20.09
沸水提取	100	10	18.20

通过比较可以看到, 几种方法都可有效地提取酵母细胞中的 GSH。乙醇提取和沸水提取提取率稍低; 冻溶法: 能得到很高的提取率, 但是要经过 3 次以上的冻结才能达到较好的提取效果, 此外该方法耗时长; 热水抽提: 85℃ 下搅拌 14min, 提取率高, 与沸水抽提法比, 抽提率高, 提取温度低, 耗能少, 与微波法相比, 热提时间

长, 耗能多。但用于工业化生产设备投资要小, 在现阶段对 GSH 生产企业来说是较可行的工艺。微波方法: 两种工艺都能在较短的时间内达到较高的提取率。与热水抽提法相比, 由于是新技术设备投资大, 但节能 (微波法 a 只要对酵母泥处理 12s 就可常温浸提, 微波法 b 对酵母悬浮液作用时间仅 60s 就完成对 GSH 的浸提)、生产效率高。微波提取技术是生物细胞小分子物质提取的一个有效的方法, 有较好的应用前景^[8]。

3. 结论

3.1 确定了微波提取 a、b 和热水抽提 3 种破壁浸提工艺条件

3 种方法都能高效地从啤酒废酵母中提取谷胱甘肽, 提取率分别达到 $20.03 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $21.14 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $21.24 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3.2 啤酒废酵母破壁浸提方法比较显示

热水法和微波法可作为两种首选方法。热水抽提法不需添加除水以外的试剂, 污染小, 在较低的温度下进行, 同时提取时间较短, GSH 损失少, 设备投资少, 在现阶段较适合应用于工业生产 GSH; 微波法处理时间短, 收率高, 工业生产效率低, 生产效率高, 是一种快速、简便、有效的方法, 具有很好的应用前景。

3.3 利用价值

啤酒废酵母中谷胱甘肽含量比较高, 具有很好的利用价值。

参考文献:

- [1] Zhang J Y, Hu Z D, Chen X G. Quantification of glutathione and glutathione disulfide in human plasma and tobacco leaves by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. Talanta, 2005 (65): 986-990
- [2] 张玉臣, 杜永丽, 聂翠芳, 等. 还原型谷胱甘肽的临床应用进展 [J]. 社区医学杂志, 2005, 3 (4): 26-27
- [3] 赵振寰, 荆伟丽, 张光兰. 还原型谷胱甘肽的临床应用 [J]. 齐鲁医学杂志, 2006, 21 (2): 185-186
- [4] 邱雁临, 殷伟, 潘飞等. 吸附层析法从啤酒废酵母中提取谷胱甘肽 [J]. 生物技术, 2005, 15 (1): 49-51
- [5] 周楠迪, 李寅, 等. 从酵母中提取谷胱甘肽的初步研究 [J]. 生物技术, 1997, 7 (4): 30-33
- [6] 安贤惠. 还原型谷胱甘肽提取方法初探 [J]. 淮海工学院学报, 2003, 12 (2): 49-52
- [7] 范崇东, 王森, 徐榕榕. 热水提取酵母中谷胱甘肽的条件优化 [J]. 食品添加剂 2004, (2): 134