

# 离子交换法分离 S-苄基- $\gamma$ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸

刘步云, 周治, 姚忠, 吴明刚, 宋希文, 余维娜, 肖彦玲, 韦萍

(南京工业大学食品与轻工学院, 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 210009)

**摘要:** 采用离子交换法对酶法合成的 S-苄基- $\gamma$ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸(S-Bzl-GGC)进行了分离纯化. 研究了 Q Sephrose FF 阴离子交换树脂对 S-Bzl-GGC 的吸附等温线, 很好地符合 Sips 吸附等温线模型. 考察了 pH 值、洗脱梯度、流速和进样量等条件对纯化效果的影响, 建立了一套基于 Q Sephrose FF 阴离子交换树脂的纯化方案. 结果表明, 在 pH 8.2、洗脱梯度 0~30% B(Tris-HCl 缓冲液+1 mol/L NaCl) 12 mL、流速 2 mL/min、进样量 500  $\mu$ L 的优化条件下, 经一步分离, 产物纯度可达 98.5%, 经  $^1\text{H-NMR}$  鉴定产物结构正确.

**关键词:** S-苄基- $\gamma$ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸; 吸附等温线; 离子交换; 纯化

**中图分类号:** TQ028.3; TQ936.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-606X(2009)04-0781-05

## 1 前言

$\gamma$ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteine, GGC)是由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸经肽键缩合而成的含巯基的二肽化合物, 是胞内谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的合成前体. 研究表明, GGC 具有与 GSH 相似的生理功能, 是生物体内重要的抗氧化剂, 具有免疫及解毒作用<sup>[1]</sup>; 同时由于 GGC 可被很多细胞直接吸收, 其提高胞内 GSH 浓度的效果优于直接提供 GSH 或半胱氨酸<sup>[2]</sup>, 因此 GGC 在医药、化妆品及食品添加剂方面具有广阔的应用前景. 目前, 有关规模化制备 GGC 的研究十分活跃, 利用 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase, GGT)的转肽活性制备 S-苄基- $\gamma$ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸(S-Bzl-GGC)<sup>[2]</sup>, 再以电化学还原脱苄基保护剂, 可直接获得 GGC, 该方法极具产业化前景.

由于 GGT 兼有转肽、自转肽和水解活性<sup>[3,4]</sup>, 反应产物中含有一些与 S-Bzl-GGC 结构类似的共存杂质, 如反应底物 S-苄基-L-半胱氨酸和 L-谷氨酰胺、少量自转肽产物 L-谷氨酰谷氨酰胺和水解产物谷氨酸. 在上述化学-酶法制备 GGC 的工艺中, 中间产物 S-Bzl-GGC 的纯度直接影响后续反应与终产物 GGC 的分离. 因此, 建立简便且易于放大的 S-Bzl-GGC 下游纯化策略将有助于进一步推进该技术的产业化. 目前, 国内外相关研究多集中在利用菌株生产 GGC<sup>[5]</sup>和 GGC 合成酶的催化机理<sup>[6]</sup>、GGC 合成酶的纯化<sup>[7]</sup>等方面, 对于 S-Bzl-GGC 纯化的研究尚未见报道.

本工作以酶法制备 S-Bzl-GGC 反应体系, 测定了

S-Bzl-GGC 的吸附等温线, 并在此基础上建立了基于离子交换的高效产物分离纯化方法, 考察了 pH 值、洗脱梯度、流速及进样量等条件对纯化效果的影响, 为规模化制备 GGC 提供参考.

## 2 实验

### 2.1 仪器与试剂

主要仪器: ÄKTA FPLC 蛋白质层析仪、C 1/10 玻璃层析柱(瑞典 Amersham Pharmacia 公司), BECKMAN COULTER 高效液相色谱(美国 Beckman 公司), Millipore-Q Plus 超纯水系统(美国 Millipore 公司), JAP5003N 电子天平(上海精密仪器有限公司).

试剂: Q Sephrose FF 树脂(美国 GE Healthcare 公司), S-Bzl-GGC 标准品(本实验室自制, 纯度>99%), 甲醇、乙腈(色谱纯, 沃凯公司), 其他药品均为分析纯.

### 2.2 S-Bzl-GGC 的液相分析

样品中 S-Bzl-GGC 含量以 HPLC 方法定量分析. 色谱条件为: 色谱柱 Kromasil C18 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm), 检测波长 220 nm, 流速 1 mL/min, 流动相为 A(20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ):B(甲醇)=60:40, 进样量 20  $\mu$ L.

### 2.3 吸附等温线的测定

在 6 个砂芯试管中分别加入 0.15 g Q Sephrose FF 树脂和 10 mL 不同浓度的 S-Bzl-GGC 溶液, 室温下摇床振荡至吸附平衡, 将样品溶液分别滤出, 测定其中 S-Bzl-GGC 浓度, 树脂的平衡吸附量  $Q_e$  (mg/g) 以下式计算<sup>[8]</sup>:

收稿日期: 2009-02-09, 修回日期: 2009-05-13

基金项目: 国家自然科学基金预研基金资助项目; 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2003CB7160004); 江苏省高校“青蓝工程”基金资助项目

作者简介: 刘步云(1985-), 男, 江苏省南京市人, 硕士研究生, 主要从事酶工程及生物分离研究; 姚忠, 通讯联系人, Tel: 025-83172098, E-mail: yaozh09@263.net.

$$Q_e = (C_0 - C_e)V/W, \quad (1)$$

式中,  $C_0$  和  $C_e$  分别为吸附前后溶液中 S-Bzl-GGC 的浓度(mg/L),  $V$  为溶液体积(L),  $W$  为 Q Sepharose FF 树脂的干重(g).

## 2.4 离子交换分离 S-Bzl-GGC

以阴离子交换树脂 Q Sepharose FF 为分离介质, 填充于玻璃层析柱中(Amersham Pharmacia, 1 cm × 10 cm), 最终柱床体积为 6 mL. 分别考察 pH 值、洗脱梯度、流速及进样量等因素对分离效果的影响.

## 3 结果与讨论

### 3.1 吸附等温线的测定

溶质的吸附平衡行为是评价吸附剂性能的重要指标, 也是分析和设计吸附过程的理论基础. 分别配制不同初始浓度(80~1500 mg/L)的 S-Bzl-GGC 母液, 加入一定量树脂后于室温下吸附平衡, 16 h 后测定该温度下树脂的平衡吸附量, 结果如图 1 所示.

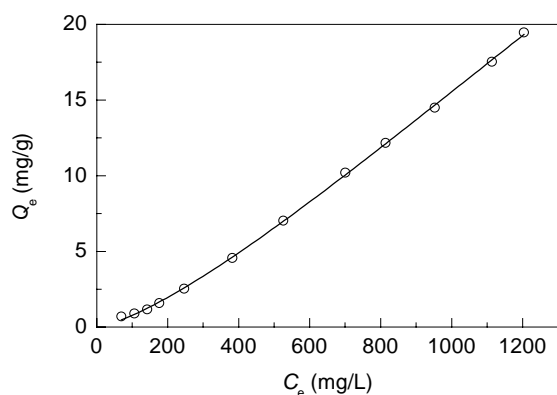


图 1 Q Sepharose FF 树脂对 S-Bzl-GGC 的吸附等温线  
Fig.1 Adsorption isotherm of S-Bzl-GGC on Q Sepharose FF resin

目前常用的描述溶质在树脂上吸附行为的等温吸附模型有 Langmuir 和 Freundlich 吸附等温式<sup>[9]</sup>, 但生物分子吸附行为往往不满足其假设<sup>[10]</sup>, 在实际吸附体系中模型的拟合度难以令人满意. Sips 模型是综合了 Langmuir 和 Freundlich 吸附等温式提出的一种针对生物吸附的经验性等温吸附模型<sup>[11]</sup>, 因此, 又称为 Langmuir-Freundlich 吸附等温线模型[式(2)], 该模型可理解为溶质吸附偏离 Langmuir 单分子层吸附的程度<sup>[12]</sup>:

$$Q_e = Q_{e,th} K_{ep} C_e^n / (1 + K_{ep} C_e^n), \quad (2)$$

其中,  $Q_{e,th}$  为理论最大吸附量(mg/g),  $K_{ep}$  为平衡结合常数(L/mg),  $n$  为非均匀吸附参数.

用 Origin Pro 8.0 软件对实验数据以 Sips 吸附等温模型进行拟合, 结果显示, 在实验范围内 Sips 吸附等温

模型可较好地拟合实验数据(图 1,  $R=0.99962$ ), 拟合参数分别为  $Q_{e,th}=132.34$  mg/g,  $K_{ep}=1.161 \times 10^{-5}$  L/mg,  $n=1.353$ . 结果说明 1 个树脂活性位点上发生多个溶质分子的吸附, 原因是 Q Sepharose FF 树脂是强碱性树脂, 活性基团为季胺, 通过离子键(静电作用)与 S-Bzl-GGC 的羧基相结合; 同时, 溶液中的溶质分子还可通过氢键与树脂表面吸附的 S-Bzl-GGC 分子形成分子间缔合, 从而表现为多分子层吸附. 由于  $K_{ep}$  较小, 当溶质浓度较低时, 树脂平衡吸附量与吸附质的平衡浓度近似呈线性关系<sup>[13]</sup>, 与拟合图一致.

### 3.2 离子交换分离 S-Bzl-GGC

采用固定床吸附分离方式对实际反应液中的 S-Bzl-GGC 进行纯化, 考察 pH 值、洗脱梯度、进样量及流速等操作参数对分离效果的影响.

#### 3.2.1 pH 对分离效果的影响

分离体系的 pH 值可改变溶液中待分离物质的表面电荷性质和数量, 从而改变分配系数, 影响分离效果<sup>[14]</sup>. 分别配制不同 pH 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液作为 A 相, B 相为含 1 mol/L NaCl 的相应 pH 缓冲液, 检测波长 214 nm, 流速 1 mL/min, 进样量 100  $\mu$ L. 采用梯度洗脱方式纯化 S-Bzl-GGC(0~50% B 12 mL), 结果见图 2.

当缓冲体系 pH 为 7 时, 反应底物与产物均在穿透中流出; 随 pH 提高, 产物的保留时间逐渐延长, 分离效果也逐渐改善. 但当缓冲液的 pH > 8.5 时, 一方面产物的分离度下降明显, 另一方面产物的保留过强, 造成洗脱难度加大, 这对实际分离操作不利. 综合以上实验结果, 缓冲液 pH 为 8.2 时产物的分离效果最好.

#### 3.2.2 洗脱梯度对分离效果的影响

在液相色谱分离过程中, 洗脱方案的优化可进一步改善分离效果. 本实验采用 3 种不同洗脱梯度对 S-Bzl-GGC 进行分离纯化, pH 为 8.2, 其余条件同上, 结果如图 3 所示. 随洗脱梯度趋缓, 样品保留时间略有推后, 但分离度明显改善. 3 种不同洗脱梯度(B 0~50%, 0~40%, 0~30%)下产物与杂质的分离度  $R_s$  值分别为 0.83, 1.27, 1.54. 考虑到洗脱梯度趋缓虽然可提高分离度, 但也将导致洗脱液体积增加和产物浓度降低, 因此, 确定最适的洗脱梯度是 0~30% B 12 mL.

#### 3.2.3 流速对分离效果的影响

最佳洗脱条件下(pH 8.2 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液作为 A 相, B 相为含 1 mol/L NaCl 的相应 pH 缓冲液, 洗脱梯度 0~30% B 12 mL, 检测波长 214 nm, 流速 1 mL/min, 进样量 100  $\mu$ L)进一步考察流速对 S-Bzl-GGC 分离效果的影响, 结果(图 4)表明, 系统流速为 1 和 2 mL/min 时的分离度优于流速为 4 mL/min 时的分离度.

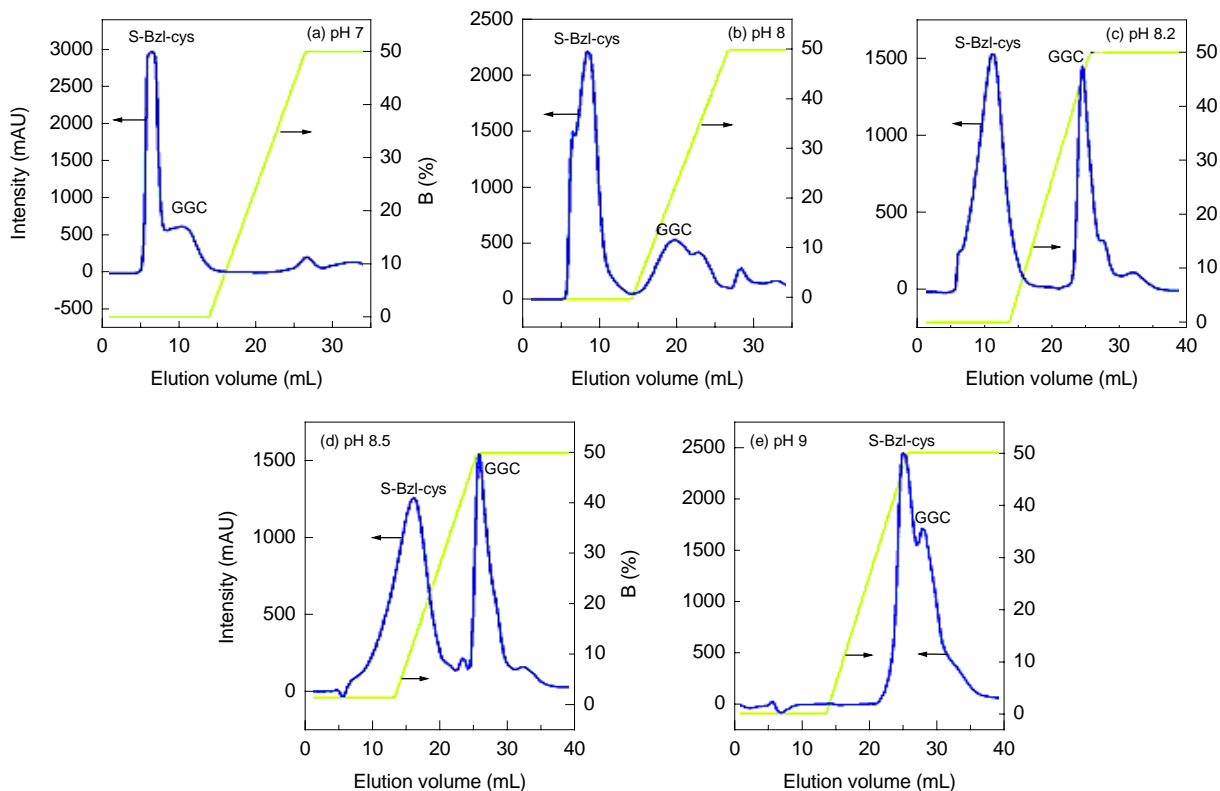


图 2 pH 对分离 S-Bzl-GGC 的影响  
 Fig.2 Influence of pH value on separation of S-Bzl-GGC

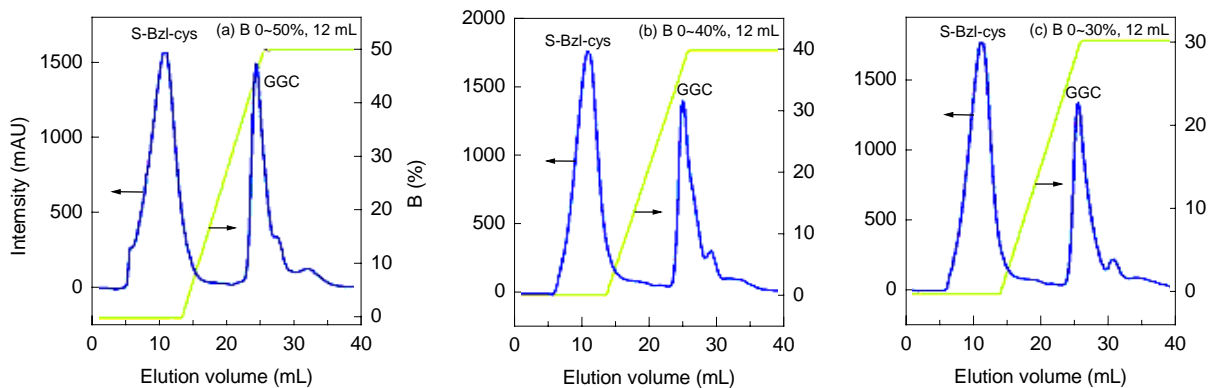


图 3 洗脱梯度对分离 S-Bzl-GGC 的影响  
 Fig.3 Influence of elution gradient on separation of S-Bzl-GGC

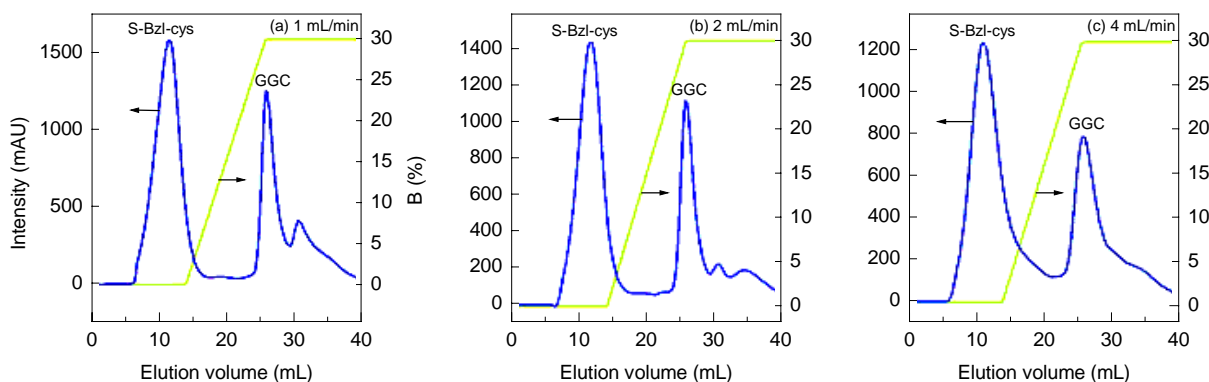


图 4 流速对分离 S-Bzl-GGC 的影响  
 Fig.4 Influence of flow rate on separation of S-Bzl-GGC

根据范·第姆特方程<sup>[15]</sup>

$$H=A+B/u+Cu, \quad (3)$$

其中,  $H$  为理论塔板高度(cm),  $A$  为涡流扩散项(cm),  $B/u$  为分子扩散项(cm),  $Cu$  为传质阻力项(cm),  $u$  为流动相的线速度(cm/s). 在液相色谱中, 当流动相的线流速较大时, 可以忽略分子扩散项对柱效的影响, 影响柱效的主要因素是传质阻力项. 本实验中随流速增加, 理论塔

板高度加大, 理论塔板数(柱效)随之降低, 表现为峰宽变宽, 分离度下降. 同时 HPLC 检测的纯化产物的纯度和回收率也随流速增加而降低. 考虑到流速过低会增加操作时间, 不具备大规模分离的操作可行性, 确定分离优化流速为 2 mL/min.

### 3.2.4 进样量对分离效果的影响

在样品浓度及其他条件不变的情况下, 考察不同的进样量对分离效果的影响, 结果如图 5 所示.

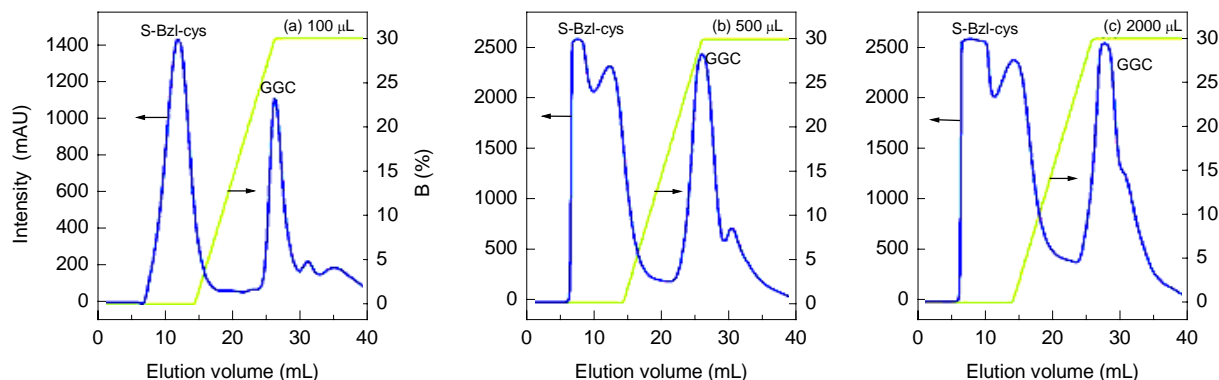


图5 进样量对分离 S-Bzl-GGC 的影响

Fig.5 Influence of sample quantity on separation of S-Bzl-GGC

对于固定的离子交换层析柱, 进样量对分离程度有很大影响. 由图 5 可知, 随进样量增加, 样品与后一个杂质峰之间的分离效果逐渐变差. 分析表明, 进样量为 500  $\mu\text{L}$  与进样量为 100  $\mu\text{L}$  时样品纯度和回收率均相差不多; 而进样量加大到 2000  $\mu\text{L}$  时, 样品峰过载, 产物

的纯度及回收率均明显下降(表 1). 考虑到层析柱柱床体积的限制, 确定最适的进样量为 500  $\mu\text{L}$ .

表 1 不同进样量对纯化 S-Bzl-GGC 效果的影响

Table 1 Effect of sample quantity on purification of S-Bzl-GGC

Sample quantity ( $\mu\text{L}$ )	Concentration (mg/mL)	Purity (%)	Recovery rate (%)
100	0.0319	98.87	84.6
500	0.1094	98.45	87.2
2000	0.0809	74.39	72.9

## 4 S-苄基- $\gamma$ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸的纯度分析及 NMR 表征

在建立了一整套纯化工艺的基础上, 对被纯化物质进行纯度及结构确认是非常重要的. 本工作对分离纯化后的 S-Bzl-GGC 进行了 HPLC 定量分析和核磁鉴定, 结果如图 6 和 7 所示, 最终产物纯度达 98.5%, 且结构是正确的.

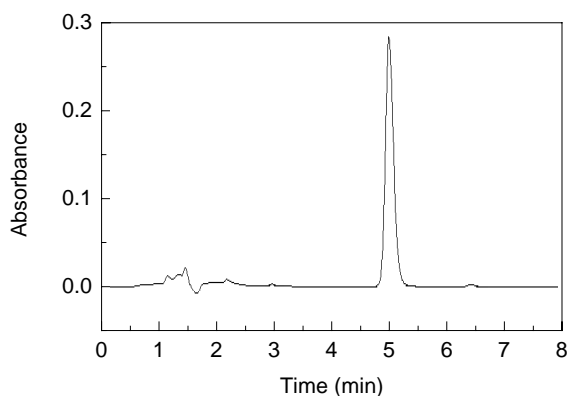


图6 HPLC 对纯化的 S-Bzl-GGC 的分析  
Fig.6 HPLC analysis of purified S-Bzl-GG

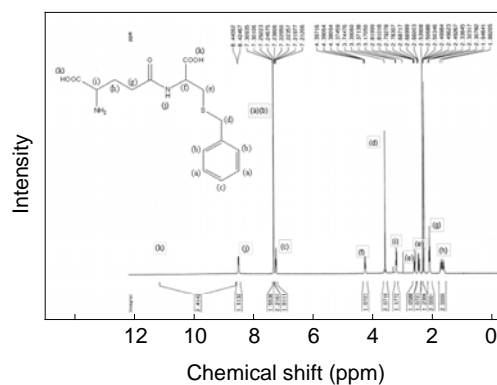


图7  $^1\text{H-NMR}$  对纯化的 S-Bzl-GGC 的分析  
Fig.7  $^1\text{H-NMR}$  analysis of purified S-Bzl-GGC

## 5 结论

以固定床吸附方式考察了实际反应体系中 S-苄基- $\gamma$ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸(S-Bzl-GGC)分离的各种操作参数,建立了一套基于离子交换法分离纯化 S-Bzl-GGC 的策略,由实验结果得出以下结论:

(1) S-Bzl-GGC 在阴离子交换树脂 Q Sephrose FF 树脂表面的吸附不满足单分子层吸附条件,在实验考察范围内树脂对 S-Bzl-GGC 的吸附符合 Sips 等温吸附模型。

(2) 确定适宜的分离条件为: A 相为 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液, B 相为 pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液+1 mol/L NaCl, 流速 2 mL/min, 洗脱梯度 0~30% B 12 mL, 进样浓度 1.68 mg/mL, 进样量 500  $\mu$ L。在此条件下可得到最佳的纯化效果。

(3) 纯化后的 S-Bzl-GGC 经 HPLC 分析纯度达到 98.5%, 且  $^1\text{H-NMR}$  分析结果正确。

### 参考文献:

- [1] Li Y, Wei G Y, Chen J. Glutathione: A Review on Biotechnological Production [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 66(3): 233-242.
- [2] Bridge W J, Zarka M H. Process for the Production of  $\gamma$ -Glutamylcysteine [P]. AU Pat.: 2006228996, 2006-10-05.
- [3] 汪前, 姚忠, 苟志金, 等.  $\gamma$ -L-谷氨酰转肽酶的酶学性质及其转肽反应机制 [J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(2): 288-293.
- [4] Keillor J W, Castonguay R, Lherbet C. Gamma-glutamyl

Transpeptidase Substrate Specificity and Catalytic Mechanism [J]. Methods Enzymol., 2005, 401: 449-467.

- [5] 赖进此, 李士瑛, 谢俊杰, 等. 用于高产谷胱甘肽与其前体的酿酒酵母菌株及其使用方法 [P]. 中国专利: CN101024818A, 2007-08-29.
- [6] 方怡, 李冰, 陈娟, 等. 腺病毒 E1A 蛋白抑制大鼠肺泡上皮细胞  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位表达的机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(12): 2382-2385.
- [7] Sharma S K, Banyal H S.  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase from *Plasmodium berghei* [J]. Parasitol. Int., 2009, 58(2): 145-153.
- [8] 王燕芹, 魏荣卿, 刘晓宁, 等. 一种新型的聚苯乙烯二乙醇胺树脂对铜离子的吸附性能 [J]. 过程工程学报, 2007, 7(1): 49-53.
- [9] Ahmet G, Ertan A, Ismail T. Lead Removal from Aqueous Solution by Natural and Pretreated Clinoptilolite: Adsorption Equilibrium and Kinetics [J]. J. Hazard. Mater., 2007, 146(1/2): 362-371.
- [10] Shihabudheen M M, Sanjay S, Ligy P, et al. Enhanced Fluoride Removal from Drinking Water by Magnesia-amended Activated Alumina Granules [J]. Chem. Eng. J., 2008, 140(1/3): 183-192.
- [11] Liu Y, Liu Y J. Biosorption Isotherm, Kinetics and Thermodynamics [J]. Sep. Purif. Technol., 2008, 61(3): 229-242.
- [12] 孙彦. 生物分离工程, 第2版 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 189-192.
- [13] 陈明杰, 沈波, 危凤. 奥美拉唑对映体在自制手性柱上的吸附等温线的测定 [J]. 离子交换与吸附, 2007, 23(1): 71-76.
- [14] Wan Ngah W S, Fatinathan S. Adsorption of Cu(II) Ions in Aqueous Solution Using Chitosan Beads, Chitosan-GLA Beads and Chitosan-Alginate Beads [J]. Chem. Eng. J., 2008, 143(1/3): 62-72.
- [15] 朱明华. 仪器分析, 第3版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004. 67.

## Separation of S-Benzyl- $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteine Using Ion-exchange Method

LIU Bu-yun, ZHOU Zhi, YAO Zhong, WU Ming-gang, SONG Xi-wen, SHE Wei-na, XIAO Yan-ling, WEI Ping

(State Key Lab. Material-oriented Chem. Eng., Col. Food Sci. & Light Ind., Nanjing Univ. Technol., Nanjing, Jiangsu 210009, China)

**Abstract:** The synthesized S-benzyl- $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteine (S-Bzl-GGC) with enzymatic methods was purified with ion-exchange method by using Q sepharose FF as adsorbent. The adsorption isotherm was investigated, and Sips equation provided the best fitting of experimental data. The influences of pH value, elution gradient, flow rate and sample quantity on the separation process were also discussed. The results showed that S-Bzl-GGC could be well separated at the conditions of pH 8.2, salt elution gradient of 0~30% B, 12 mL, flow rate of 2 mL/min and sample size of 500  $\mu$ L. Under the optimal conditions, the purity of product was 98.5% after one step purification and the structure of product was further identified by  $^1\text{H-NMR}$ .

**Key words:** S-benzyl- $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteine; adsorption isotherm; ion exchange; purification