

猕猴桃中 SOD 提取工艺研究

魏瑞锋, 魏桃英 (浙江工业职业技术学院, 浙江绍兴 312000)

摘要 [目的] 寻找一条从植物中提取出较纯净 SOD 的廉价工艺路线。[方法] 利用超氧化物歧化酶(SOD)耐热等性质, 对以猕猴桃为原料制备的 SOD 粗酶液分别进行热变性、等电点、丙酮沉淀处理, 以得到纯度较高的 SOD 酶液。[结果] 试验确定了热变性、等电点、丙酮沉淀处理猕猴桃中的 SOD 粗酶液的最佳提取参数分别为 65 °C 下 25 min、pH 5.0、 $V_{\text{丙酮}}:V_{\text{SOD 酶液}}=1:1$, 并且依次用 3 种方法下的最佳参数进行提取, 得到的蛋白样品经分析达到了电泳纯。[结论] 研究可为植物中 SOD 的廉价提取提供参考依据。

关键词 猕猴桃; SOD; 提取参数; 工艺路线

中图分类号 S663.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)32-12716-02

Preliminary Exploration of Extracting Technology on SOD in Kiwifruits

WEI Rui-feng et al (Zhejiang Industry Polytechnic College, Shaoxing, Zhejiang 312000)

Abstract [Objective] To find a cheap technique route for extracting SOD from plants. [Method] Taking advantage of the heat-resistant nature and some other natures of superoxide dismutase, the crude enzyme of SOD from kiwifruits which were the raw material, was processed under the conditions of thermal denaturation, isoelectric point and precipitation by acetone. [Result] and these optimal extraction parameters were respectively determined as 25 min under 65 °C, pH = 5.0, $V_{\text{acetone}}:V_{\text{SOD enzyme}}=1:1$. Moreover, these optimal extraction parameters under the conditions were in turn used for extraction, and the sample of protein extracted reached the purity of electrophoresis. [Conclusion] A simple and cheap extraction process route of SOD was determined.

Key words Kiwifruits; SOD; Extraction parameters; Process route

超氧化物歧化酶(SOD), 是一种具有清除体内超氧自由基的金属酶类, 在需氧原核生物和真核生物中广泛存在, 是活性氧清除系统中第一个发挥作用的抗氧化酶^[1]。作为生物体内自由基清洁剂, 具有抗辐射、抗肿瘤及延缓机体衰老等功能, 药用价值极高, 价格昂贵。多数已知的 SOD 不是提取路线昂贵, 就是提取出来的 SOD 应用时有副作用(如从动物血液中提取出来的 SOD)^[2]。虽然对 SOD 模拟物也有所研究^[3], 但离实际的应用还有一定的距离, 因此, 寻找一条从植物中提取出较纯净 SOD 的廉价工艺路线就显得比较重要。由于近年来发现猕猴桃中含有一定量的超氧化物歧化酶^[4], 因此, 笔者在该研究中选择猕猴桃作为试验原材料。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 原材料与试剂。供试原材料为中华猕猴桃。主要试剂: Tris、HCl、SDS、KCl、NaCl、NaOH、EDTA、TEMED、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O})$ 、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸胺、丙酮、磷酸、巯基乙醇、溴酚兰、蔗糖、考马斯亮蓝-R250、甲醇、乙醇、甘氨酸、邻苯三酚。

1.1.2 仪器与设备。DK-98-1 电热恒温水浴锅, 天津泰斯特仪器有限公司; KDC-160HR 台式高速冷冻离心机; UV1102 型紫外分光光度计; AUY220 型电子天平; 漩涡振荡仪, 海门市其林贝尔仪器厂; 电泳仪, 北京六一仪器厂; 通风橱, 微波炉, 锥形瓶, 培养皿, 容量瓶, 滤纸, 漏斗, 纱布, 烧杯。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程。猕猴桃→研磨→对研磨物浸提→过滤、离心→粗酶液→热变性处理→离心取上清液→等电点沉淀处理去除杂蛋白→丙酮沉淀处理去除杂蛋白→蛋白酶。

1.2.2 酶液的制取。称取 400 g 猕猴桃, 在冰浴环境下用研钵研磨充分, 将汁和残渣一并倒入 1 000 ml 烧杯中, 用 0.5 mol/L NaCl 溶液于 4 °C 下浸泡过夜^[5], 4 层纱布过滤, 然后将滤液在 10 000 r/min^[6] 的条件下高速冷冻离心(4 °C) 15 min, 最后将离心液通过滤纸过滤, 制成 SOD 粗酶液。

1.2.3 SOD 酶活性的测定。用改进的邻苯三酚自氧化法(325 nm 法)^[7]测定: 先加入 pH 为 8.2 的 50 mmol/L tris-HCl 缓冲液(内含 1 mmol/L EDTA), 然后在(25.0 ± 0.5) °C 恒温水浴锅保温 20 min, 最后加入邻苯三酚和待测样液, 迅速摇匀后, 以加入蒸馏水的空白作对照, 在 325 nm 波长下, 每隔 0.5 min 打印一次光密度值, 共测 3 min。此时邻苯三酚的自氧化速率记作 $\Delta A(A/\text{min})$, 自氧化速率变化在 3 min 内有效。SOD 酶活性单位定义为: 在 1 ml 反应液中, 1 min 抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 时的酶量定义为一个酶活力单位^[7]。

酶活性(U/ml) = $[(0.064 - \Delta A)/0.064 \times \text{反应液总体积} \times \text{稀释倍数}] / (50\% \times \text{定义体积} \times \text{加入的酶体积})$

1.2.4 热变性处理。由于 SOD 热稳定性极好, 80 °C 以下短暂加热对其活性影响不大, 而一般蛋白质却在温度高于 55 °C 时便变性沉淀^[8], 故可考虑用热变性的方法。为确定最佳的热变性温度和时间, 该试验取 45、50、55、60、65、70 °C, 时间 15、20、25、30 min 进行二因素多水平 3 次重复热变性试验, 通过对所测得酶活性的方差分析, 确定该步的最佳提取参数。取 72 支试管, 分别加入初酶原液 3 ml, 将恒温水浴锅依次调至 45、50、55、60、65、70 °C, 各温度条件下 15、20、25、30 min 时分别拿出 3 支, 倒入离心管中进行 10 000 r/min 冷冻离心 20 min 后, 去除沉淀杂蛋白, 将上清液放于 25 °C 恒温水浴锅中 20 min 后进行酶活性测定, 每次操作重复 3 次。

1.2.5 等电点沉淀处理。取 SOD 粗酶液, 分别加入以

NaOH 和磷酸配制成 pH 3~7 的溶液,然后各加入粗酶液 2 ml,迅速摇匀后一起放于 4 °C 冰箱中沉淀 30 min,倒入离心管中进行 10 000 r/min 冷冻离心 20 min 后,去除沉淀杂蛋白,将上清液放于 25 °C 恒温水浴锅中 20 min 后进行酶活性测定,每次操作重复 3 次。

1.2.6 丙酮沉淀处理。由于蛋白质溶液中加入一些弱极性的有机溶剂可改变溶液介电常数,使不同种类的蛋白质产生不同程度的沉淀,因此,可用来纯化蛋白质^[5]。采用毒性较小、易挥发的丙酮作为有机溶剂。取 6 支试管分别加入 3 ml 猕猴桃粗酶液,然后向这 6 支试管中依次加入 0、1、2、3、4、5 ml 丙酮,摇匀后立即放于 4 °C 冰箱中沉淀 30 min,倒入离心

管中进行 10 000 r/min 冷冻离心 20 min 后,去除沉淀杂蛋白,将上清液放于 25 °C 恒温水浴锅中 20 min 后进行酶活性测定,每次操作重复 3 次。

1.2.7 电泳。所用方法为 SDS 配制胶电泳,所用 Marker 为 Blue Plus II Protein Marker。

1.2.8 显著性分析。该研究中所有数据的显著性分析均采用 SPSS 12.0 中的 Duncan 模型。

2 结果与分析

2.1 热变性处理 表 1 为酶液在 45、50、55、60、65、70 °C 条件下分别处理 15、20、25、30 min 的活性值,通过对表 1 数据的方差分析,得到了如表 2 所示的结果。

表 1 不同时间温度下的酶反应活性值

U/ml

时间 min	温度//°C					
	45	50	55	60	65	70
15	372.33 ± 6.51	392.33 ± 3.51	422.33 ± 3.06	366.67 ± 2.08	428.00 ± 5.29	379.00 ± 6.56
20	422.00 ± 3.00	442.67 ± 5.51	387.00 ± 4.58	379.33 ± 6.66	449.00 ± 3.00	362.00 ± 4.58
25	355.00 ± 10.15	370.67 ± 5.03	448.00 ± 3.61	402.33 ± 3.06	473.67 ± 7.57	388.33 ± 3.51
30	421.00 ± 3.60	427.67 ± 2.52	421.33 ± 3.21	420.00 ± 2.64	446.33 ± 6.66	361.00 ± 4.36

表 2 虽然表明时间、温度以及双因素互作都对酶活性有显著性影响,但在数理统计学中,当双因素互作存在显著差异时,其中的单一因素的显著性比较并无大的实际意义,也就是说双因素互作时得到的最佳提取参数占决定作用,因此只用考虑温度和时间双因素互作时的最佳提取参数。经过进一步的多重比较,发现 65 °C 下处理 25 min 的酶活性要显著大于其他条件下的,即对酶液热变性处理时的最佳提取参数为 65 °C 下 25 min。

表 2 不同时间、温度下酶活性的方差分析

变异来源	F 值	显著性
时间(A)	62.74	*
温度(B)	406.46	*
互作(A × B)	83.07	*

2.2 等电点沉淀处理 等电点沉淀处理结果如表 3 所示,pH 为 5 时的 SOD 酶活值显著大于其他水平下的,故该步最佳的提取参数为 pH 5。

表 3 不同 pH 下的酶反应活性平均值

pH	酶活值//U/ml	pH	酶活值//U/ml
3	444.94 ± 21.19 d	6	783.94 ± 22.38 b
4	817.64 ± 10.26 b	7	544.06 ± 26.23 c
5	1 101.08 ± 20.01 a		

注:不同小写字母表示在 0.05 水平下差异显著。

2.3 丙酮沉淀处理 丙酮沉淀处理结果如表 4 所示,当丙酮的加入量与酶液的体积比为 1:1 时,提取效果最好,故该步最佳的提取参数为 $V_{\text{丙酮}}:V_{\text{SOD酶液}} = 1:1$ 。

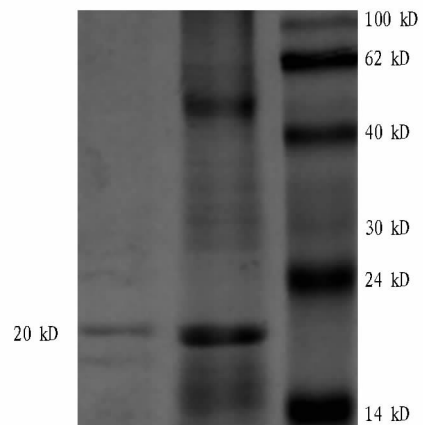
2.4 三步联合提取 在分别得出热变性处理、等电点沉淀处理、丙酮沉淀处理下的最佳提取参数后,依次应用这些参数处理粗酶液,每步处理后都在 10 000 r/min 冷冻离心 20

min,去除沉淀杂蛋白,然后将得到的酶溶液进行电泳处理,结果如图 1 所示。

表 4 不同丙酮处理下的酶反应活性平均值

丙酮 ml	酶活值 U/ml	丙酮 ml	酶活值 U/ml
0	317.81 ± 7.06 e	3	842.79 ± 23.15 a
1	460.79 ± 9.48 c	4	368.03 ± 21.47 d
2	631.70 ± 6.80 b	5	236.04 ± 24.22 f

注:不同小写字母表示在 0.05 水平下差异显著。



注:右边的泳道为 Marker,中间的泳道为酶溶液。

图 1 电泳条带

图 1 中根据右边泳道显示的 Marker 蛋白大小,可以看到中间泳道中出现 2 个条带,一个是在约 50 kD 的位置,比较模糊,说明含量较少;另一个是在 20 kD 附近,比较清晰,说明含量较多。由跑电泳时用的上样 buffer (Tris-HCl 3 ml, 99% β -巯基乙醇 2 ml, 10% SDS 贮液 20 ml, 溴酚兰 0.125 g, 99% 甘油) 中的 β -巯基乙醇可打开 SOD 酶亚基之间的二硫

(下转第 12757 页)

市场各个角落的创意,往往与消费需求有着更紧密的联系,使得研发工作能够有的放矢,研发成果能够更迅速、更广泛地被市场接纳,大大提高研发的成功率,获取更多的创新利润。

(3) 规模竞争力对国际竞争力也有着比较明显的影响。这从其 0.8025 的较高关联度可见一斑。纵观世界上拥有强大国际竞争力的各国产业,无一不拥有庞大的产业规模。只有产业规模达到一定水平,才能产生相应的规模效应,才能进行有效的产业集群,进而创造更强的产业竞争力。其相应的 3 个二级指标的关联度彼此之间差异不大,这说明,提高工业增加值、出口交货值及从业人员的数量对于扩大产业规模有着基本相当的重要性。湖南应该利用我国建设社会主义新农村的契机,将农产品加工业的发展作为实现农业现代化的一个必要途径,加强对农产品加工业的扶持力度与合理引导,培育大规模的龙头企业,发展有特色的产业集群,力求实现农产品加工业规模的跨越式发展。

(上接第 12717 页)

键,加之 SOD 酶的亚基都是同源二聚体或四聚体^[9-10],因此可以推测,50 kD 附近的模糊条带为杂蛋白,20 kD 附近的条带为 SOD 的亚基,亚基大小在相关报道范围之内^[11]。

3 结论

各步处理提取 SOD 时除用到的高速冷冻离心机较贵外,其他仪器都比较廉价,所用的试剂也较便宜,因此该试验所确定的提取路线不失为一条较为廉价的提取纯化 SOD 的工艺路线,即先将猕猴桃冰浴下研磨并在 0.5 mol/L NaCl 中浸提过夜后经 10 000 r/min 高速冷冻离心制成粗酶液,然后依次用热变性处理(65 °C 下 25 min)、等电点沉淀处理(pH 5.0)、丙酮沉淀处理($V_{\text{丙酮}}:V_{\text{下液}} = 1:1$),最终制成纯度较高的 SOD 酶液。

参考文献

- [1] SHANE R W, RADHIKA S P, MARTIN C T, et al. Functional characterization of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei* [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40(2): 198-209.
- [2] 王中凤, 肖厚荣, 杨江, 等. 仙人掌 SOD 提取条件及提取过程活性稳定

(4) 环境竞争力的关联度相对较低。这说明与上述 3 个因素相比,区域经济的总体发展水平对农产品加工业国际竞争力的影响相对次要。但这并不意味着经济发展环境不重要,相反,发达的经济环境才能为农产品加工业的发展提供更有力的产业支撑。开放竞争力的关联度最低,和其他因素相比,它对农产品加工业国际竞争力的影响力是最小的,这反映出湖南农产品加工业中外资的参与程度不高,贡献度也相对偏小,这与湖南外资利用整体水平不高的事实一致。

参考文献

- [1] 金碚. 中国工业国际竞争力——理论、方法和实证研究 [M]. 北京: 经济管理出版社, 1997: 114-118.
- [2] 裴长洪. 试论国际竞争力的理论概念与分析方法 [J]. *中国工业经济*, 2002(4): 41-43.
- [3] 张金昌. 用出口数据评价国际竞争力的方法研究 [J]. *经济管理*, 2001(20): 17-25.
- [4] 邱苑华. 管理决策与应用数学 [M]. 北京: 机械工业出版社, 2002: 202-209.
- [5] 杜栋, 庞庆华, 吴炎. 现代综合评价方法与案例精选 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2008: 111-113.
- [6] 性研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(7): 156-158.
- [7] 孙力. Prion 蛋白 SOD 活性研究进展 [J]. *国际病毒学杂志*, 2006, 13(3): 68-71.
- [8] 张兰杰, 辛广, 张维华, 等. 软枣猕猴桃超氧化物歧化酶的分离纯化与特性的研究 [J]. *中国生化药物杂志*, 2003, 24(1): 38-40.
- [9] 邓旭, 李清彪, 孙道华, 等. 从大蒜细胞中分离纯化出超氧化物歧化酶 [J]. *食品科学*, 2001, 22(9): 47-49.
- [6] 郭勇. 离心分离技术 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1996: 81-86.
- [7] 张宏, 谭行钧. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较 [J]. *内蒙古大学学报: 自然科学版*, 2002, 33(6): 677-681.
- [8] 王建华, 刘鸿先, 区阳雕, 等. 超氧化物歧化酶 (SOD) 在植物逆境和衰老生理中的作用 [J]. *植物生理学通报*, 1989(1): 1-7.
- [9] LIN C T, LIN M T, CHEN Y T, et al. Subunit interaction enhances enzyme activity and stability of sweet potato cytosolic Cu/Zn - superoxide dismutase purified by a His-tagged recombinant protein method [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28(2): 303-311.
- [10] RYAN C F, SCANDALIOS J G. Molecular evolution and structure - function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 399(1): 19-36.
- [11] 林庆斌, 廖升荣, 熊亚红, 等. 超氧化物歧化酶 (SOD) 的研究和应用进展 [J]. *化学世界*, 2006(6): 378-381.