

超氧化物歧化酶微胶囊的制备及微囊结构的表征

赵有玺, 冀颐之, 张慧娟, 龚平* (北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

摘要 [目的] 优化超氧化物歧化酶微胶囊的制备工艺, 并对该微胶囊的结构进行初步的分析。[方法] 采用水中干燥法制备超氧化物歧化酶微胶囊, 并对其工艺进行优化。利用扫描电镜技术, 分析超氧化物歧化酶微胶囊的表面形态及大小分布; 并采用 X 射线光电子能谱和示差扫描热量技术, 初步研究超氧化物歧化酶微胶囊的结构。[结果] 在最佳工艺条件下, 超氧化物歧化酶微胶囊形状规则, 粒径分布均匀。超氧化物歧化酶微胶囊是由乙基纤维素包裹超氧化物歧化酶成囊的, 乙基纤维素与超氧化物歧化酶呈囊后, 乙基纤维素与超氧化物歧化酶分子间形成很强的分子间相互作用。[结论] 超氧化物歧化酶微胶囊的结构分析, 对进一步研究微胶囊的控制释放机制和改进微囊性能具有一定的意义。

关键词 超氧化物歧化酶; 微胶囊; X 射线光电子能谱; 示差扫描热量

中图分类号 S188; Q55 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)12-03483-03

Preparation and in vitro Characterization of Superoxide Dismutase Microcapsules

ZHAO You-xi, GONG Ping et al (College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023)

Abstract [Objective] The major purpose of this research is to characterize the structure of SOD microcapsules in vitro. [Method] First, the preparation of SOD microcapsules was carried out using ethylcellulose by the method of drying in water. With the scanning electron microscope, the morphologies of superoxide dismutase microcapsules were investigated. And then, with the X-ray photoelectron spectroscopy and different scanning calorimetry technology, the structures of SOD microcapsules was further characterized. [Result] Our results showed that the SOD microcapsules exhibited regular shapes and uniform particle size distribution. The results showed that strong inter-molecular interactions between ethylcellulose and SOD existed in the microcapsules when the SOD microcapsules were wrapped by ethylcellulose. This was the first report of the structure of SOD microcapsules. [Conclusion] Thus, this study has great meanings to understand the controlled release mechanism of the microcapsules and further improve the performances of SOS microcapsules in the future.

Key words Superoxide dismutase; Microcapsules; X ray photoelectron spectroscopy; Different scanning calorimetry

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)是一类金属蛋白酶类, 在生物体内专一的清除氧自由基, 保持生物体内氧自由基的平衡, 减少其对生物体的损害^[1-2]。SOD 广泛存在于各种植物、微生物和动物组织中。根据金属辅因子的不同, SOD 可以分为 3 类: Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD^[3-5]。SOD 在医药领域, 食品工业, 农业上都有巨大的应用潜力, 是目前的研究热点之一^[6-13]。SOD 在体外稳定性差, 受温度、氧气等因素影响容易失活, 而且具有一定的免疫原性, 这限制了其应用^[14-16]。微胶囊可以保护对氧、热等因素敏感的组分, 并具有控制释放的功能^[17-18]。因此, SOD 的微胶囊化是解决上述问题的有效途径之一。

关于 SOD 微囊化的研究很少, 文献报道的只有龚平和朱俊晨开展了 SOD 的微囊化研究, 但只是关于微囊制备工艺的优化研究, 并未深入研究 SOD 微囊的结构^[16, 19]。研究 SOD 微囊的结构, 对于了解微囊的控释机制, 进一步改进微囊的性能具有重要的意义。因此, 笔者采用乙基纤维素在水中干燥法制备 SOD 微囊, 对微囊的制备工艺进行优化, 同时采用 SEM、XPS 和 DSC 等技术对制备的微囊进行表征和分析, 以期分析微囊的表面和内部结构提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 研究对象。植物 SOD 干粉, 购自湖南沅江洪元植物叶蛋白开发有限公司。

1.1.2 主要仪器。日立 S4800 型扫描电镜, 购自 HITACHI 公司; Thermo VG ESCALAB 250XPS, 购自 Thermo VG 公司; Pyris 1 DSC, 购自 Perkin Elmer 公司。

1.1.3 主要试剂。SDS, 购自北京化学试剂公司; 乙基纤维素(化学纯)和二氯甲烷(分析纯), 市售。

1.2 方法

1.2.1 微胶的制备。微囊的制备工艺见参考文献^[16]。

1.2.2 SOD 微囊的表征。采用扫描电子显微镜(SEM)对 SOD 微胶囊的微囊表面形貌、圆整度和孔性能进行表征。

1.2.3 SOD 微囊的 XPS 分析。采用张华安的方法^[20]。

1.2.4 SOD 微囊的 DSC 分析。采用 Perkin Elmer 公司的 Pyris 1 型示差扫描量热分析仪对 SOD 微囊、SOD 和 EC 样品进行玻璃化转变温度的热分析。试验条件, 在氮气保护下进行, 样品质量为 13 mg, 升温速率 10 °C/min, 测试温度 40 ~ 200 °C, 气体流量 20 ml/min。

2 结果与分析

2.1 SOD 微胶囊的表征 对制备好的 SOD 微囊, 采用扫描电子显微镜(SEM)对 SOD 微胶囊的微囊表面形貌、圆整度和孔性能进行表征。图 1 表明, SOD 微囊, 微囊圆整度均比较好, 粒径分布较为均一, 微囊表面平滑, 分布有相对均匀的小孔。

2.2 X 射线光电子能谱(XPS)对 SOD 微胶囊表面结构的分析 对囊芯物 SOD、囊材物 EC 和 SOD 微囊进行 XPS 全谱定性扫描, 结果见图 2。通过谱图可以看出, 3 个样品中, 被 XPS 检出的主要元素是 C 和 O。SOD 微囊和 SOD、EC 的谱图都不相同。这说明, 微囊表面的元素及分布与 SOD 和 EC 都不相同。

基金项目 北京市教委面上项目(KM201311417003)。

作者简介 赵有玺(1979-), 男, 山东日照人, 讲师, 硕士, 从事工业微生物和酶制剂研究开发工作。* 通讯作者。

收稿日期 2014-04-04

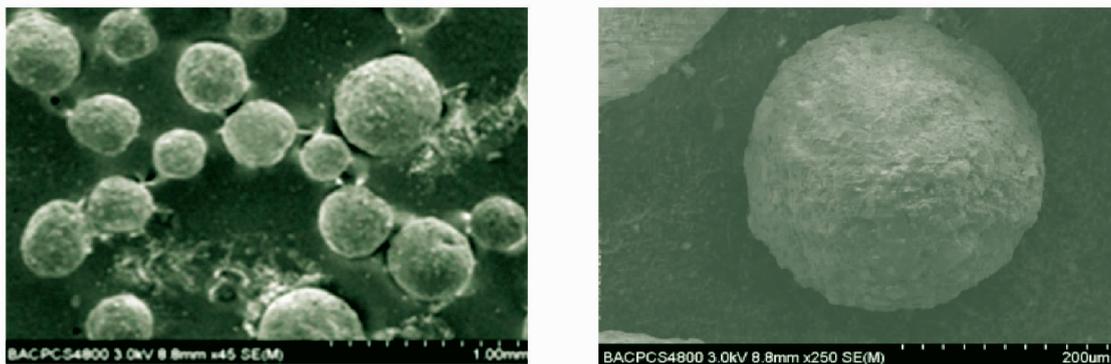
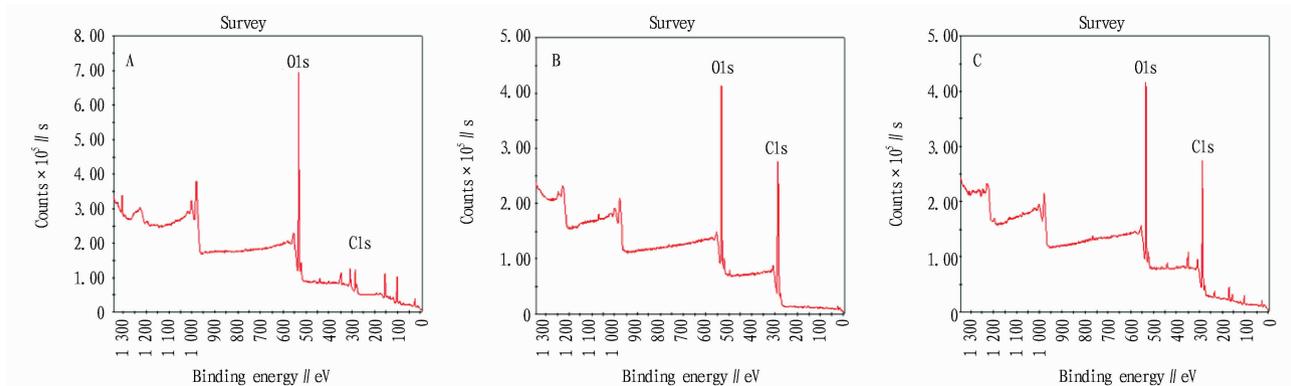


图1 SOD微胶囊扫描电镜结果



注:A为SOD;B为EC;C为SOD微囊。

图2 XPS全谱分析

SOD的活性中心-Cu,是确定SOD微胶囊表面结构的一个重要元素。为了进一步确定微胶囊表面结构,试验进行了Cu元素窄谱分析,结果见图3。只有SOD表面有铜元素检

出,EC和SOD微胶囊几乎不含铜元素,这说明在SOD微胶囊中,SOD的活性中心是由EC包裹而不外露在微胶囊的表面。

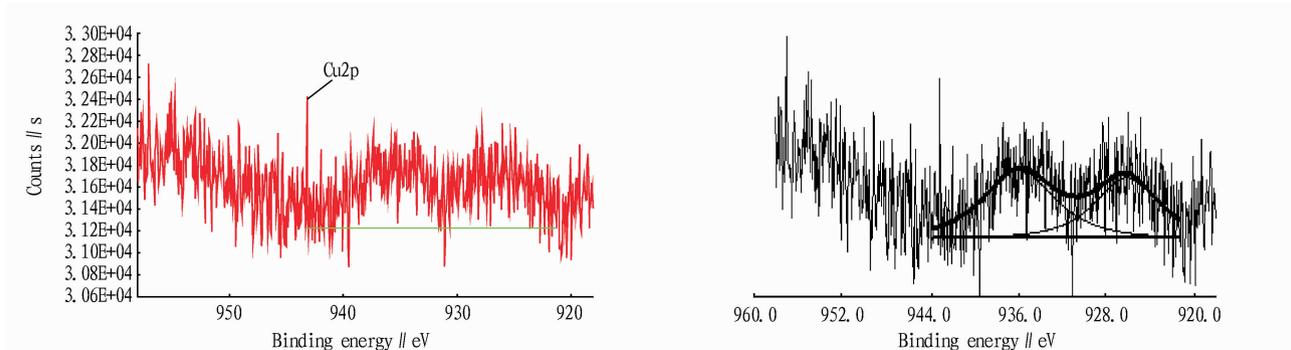


图3 SOD的Cu2p能图谱

对XPS分析得到的数据进一步分析,结果如表1~2所示。表中主要列出了主要元素C、O、Cu的相对光电子流强度(cps)、结合能和结合能差值的数据。分析发现,微胶囊表面的氧元素与SOD表面的氧元素结合能值相差非常小,而与EC表面的氧元素结合能值相差较大,这表明其微胶囊表面氧的结构与SOD近似。

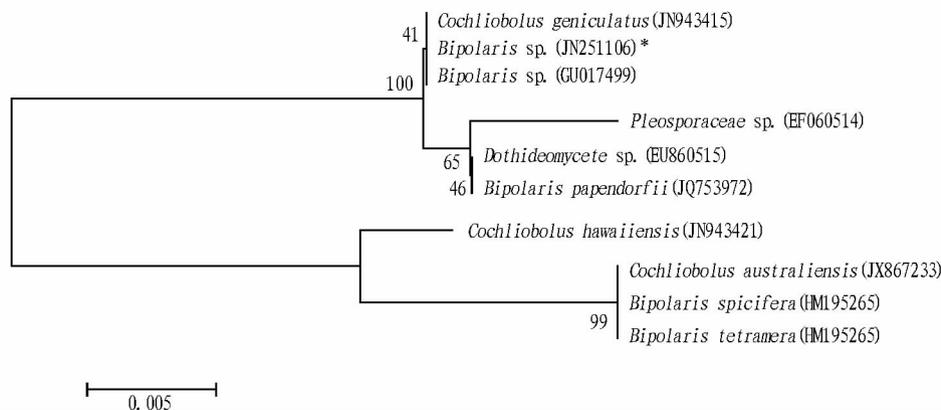
由XPS的数据可知,SOD微胶囊表面几乎不含铜元素,SOD的活性中心是由EC包裹在内,而SOD微胶囊的表面氧的结构与SOD近似。这说明微胶囊内的SOD的活性中心被EC包裹在内,而极性基团(羟基氧)会从微孔伸出,裸露在微胶囊表面,从而被XPS检测出来。

2.3 示差扫描热量法(DSC)对SOD微囊内部结构分析 为了分析SOD内部结构,对SOD,EC,SOD进行DSC分析(图4)。SOD没有放热峰,不存在玻璃化温度 T_g 。EC在140.252℃有放热峰,玻璃化温度为177.846℃(图4B)。SOD微囊在175.444℃存在一个平缓的放热峰。

乙基纤维素由于带有大量的极性基团(羟基),通常以物理吸附或键合型式与水分子间产生相互作用。乙基纤维素在140.252℃有放热峰,这是由于乙基纤维素与水结合的氢键被破坏所释放出的热量^[21]。微胶囊形成过程中,乙基纤维素羟基是极性基团,极性基团之间会发生分子内或分子间的相互作用,从而形成大量的氢键,同时SOD与乙基纤维素

提供种属鉴定的部分分类鉴定信息,最终的种属鉴定有必要结合形态学和生理学方面的数据支持。

结合形态学,生理学和 rDNA-ITS 序列分析结果及文献信息^[14],菌株 HD-1 被鉴定为 *Bipolaris australiensis*。



注:标“*”为研究提交序列;括号内字母及数字为基因登录号;标尺代表序列间差异为0.5%;节点处数字为自展值。

图10 邻接法建菌株 HD-1 系统发育树

3 结论

试验从患病玉米叶片中分离出 1 株产胆红素氧化酶的真菌菌株,通过形态学、生理学和 rDNA-ITS 序列分析,该菌株被鉴定为 *Bipolaris australiensis*,命名为 *B. australiensis* HD-1,属于囊菌门格孢腔菌目格孢腔菌科(Pleosporaceae)平脐蠕孢属(*Bipolaris*)澳大利亚平脐蠕孢霉(*Bipolaris australiensis*),亦称澳洲双孢霉,是一株没有被报道过的具有胆红素氧化酶活性的新菌株,该菌物在无诱导剂存在下,28℃、150 r/min 恒温摇床培养 6 d 后,酶活可达 1 000 U/L,为胆红素氧化酶的产生菌提供了新的微生物来源。

参考文献

- [1] MURAO S, TANAKA N. A New enzyme bilirubin oxidase produced by *Mycrothecium verrucaria* Mt-1 [J]. Agric Biol Chem, 1981, 45 (10): 2383 - 2384.
- [2] MANO N. Features and applications of bilirubin oxidases [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96 (2): 301 - 307.
- [3] PERRY B, DOUMAS B T, BUFFONE G, et al. Measurement of total bilirubin by use of bilirubin oxidase [J]. Clin Chem, 1986, 32 (2): 329 - 332.
- [4] YUNO T, YAMAMOTO Y, NAKAMURA H. Determination of unbound bilirubin by the new enzyme “bilirubin oxidase” [J]. Rinsho Byori, 1986, 34 (3): 297 - 302.
- [5] DOUMAS B T, PERRY B, JENDRZEJCZAK B, et al. Measurement of direct

bilirubin by use of bilirubin oxidase [J]. Clin Chem, 1987, 33 (8): 1349 - 1353.

- [6] ECKMANN C M, DE LAAF R T, VAN KEULEN J M, et al. Bilirubin oxidase as a solution for the interference of hyperbilirubinemia with AD-AMTS-13 activity measurement by FRETS - VWF73 assay [J]. J Thromb Haemost, 2007, 5 (6): 1330 - 1331.
- [7] DURAND F, GOUNEL S, KJAERGAARD C H, et al. Bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*: an attractive new enzyme for biotechnological applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96 (6): 1489 - 1498.
- [8] DURAND F, KJAERGAARD C H, SURANITI E, et al. Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells [J]. Biosens Bioelectron, 2012, 35 (1): 140 - 146.
- [9] EDEMBE L, GOUNEL S, CADET M, et al. A highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* operating in serum [J]. Electrochem Commun, 2012, 23: 80 - 82.
- [10] SURANITI E, ABINTOU M, DURAND F, et al. Heat and drying time modulate the O₂ reduction current of modified glassy carbon electrodes with bilirubin oxidases [J]. Bioelectrochemistry, 2012, 88: 65 - 69.
- [11] CADET M, BRILLAND X, GOUNEL S, et al. Design of a highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae* [J]. Chemphyschem, 2013: 2097 - 2100.
- [12] 刘小勇, 田素忠. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS - CTAB 改进法 [J]. 北京林业大学学报, 1997, 19 (3): 100 - 103.
- [13] 刘春来, 文景芝, 杨明秀, 等. rDNA - ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用 [J]. 东北农业大学学报, 2007, 38 (1): 101 - 106.
- [14] 邓晖, 张天宇. 中国平脐蠕孢属的分类研究 I [J]. 菌物系统, 2002 (3): 327 - 333.

(上接第 3485 页)

- [16] 龚平, 俞军, 赵立晶. 超氧化物歧化酶微胶囊的两种制备方法的研究 [J]. 食品工业, 2008 (4): 62 - 63.
- [17] HAN L L, BI L W, ZHAO Z D, et al. Preparation and characterization of microcapsules containing squalene [J]. Bioenerg Res, 2013, 6: 1243 - 1251.
- [18] SATIT P, NALENA P, WORAWADEE C, et al. Ethyl cellulose microcapsules for protecting and controlled release of folic acid [J]. AAPS Pharm

Sci Tech, 2009 (6): 1243 - 1251.

- [19] 朱俊晨, 廖广进. 大豆蛋白和鱼油双层微囊化 SOD 优化条件的研究 [J]. 食品发酵工业, 2004, 30 (11): 23 - 27.
- [20] 张华安, 包德才, 任东文, 等. 微胶囊膜表面化学组成的 XPS 分析 [J]. 化学通报, 2006 (8): 586 - 590.
- [21] 袁传勋, 潘见, 胡学桥, 等. 利用 FTIR 研究银杏内酯 B 与水的关系 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27 (2): 270 - 274.