

蜂蛹超氧化物歧化酶(SOD)的提取及理化性质研究

张海生¹, 陈锦屏¹, 武巧莉², 陈蕾³

(1. 陕西师范大学食品工程系, 陕西 西安 710062

2. 陕西师范大学化学与材料科学学院, 陕西 西安 710062 3. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510641)

摘 要: 对蜂蛹超氧化物歧化酶(SOD)的提取工艺及理化性质进行了研究。结果表明, 用磷酸盐缓冲液可以对蜂蛹 SOD 进行有效的提取, 最佳提取工艺条件为: 用 pH7.6 的磷酸盐缓冲液于室温下静置提取 4h 后于 55℃ 条件下加热 20min, 按该工艺条件进行提取, 蜂蛹 SOD 的活力为 110.41U/mg pro。蜂蛹 SOD 最适温度为 40~60℃, 最适 pH 为 pH7.0~9.0, 氰化钾和 H₂O₂ 是蜂蛹 SOD 的抑制剂, 可以有效地抑制蜂蛹 SOD 的活性。

关键词: 蜂蛹; SOD; 提取; 理化性质

Study on Extraction and Physical-chemical Properties of Superoxide Dismutase from Honeybee Pupae

ZHANG Hai-sheng¹, CHEN Jin-ping¹, WU Qiao-li², CHEN Lei³

(1. Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

3. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: The extraction technology and physical-chemical properties of honeybee pupae SOD were studied in this research. The results showed that SOD could be effectively extracted from honeybee pupae with phosphate buffer and the optimum extraction technology was showed as following: the pH of phosphate buffer pH7.6, the extraction time 4h, at room temperature, the heating temperature 55℃, and heating time 20 min. With this technology, the activity of honeybee pupae SOD was 110.41 U/mg pro. The optimum temperature of honeybee pupae SOD ranged from 40℃ to 60℃ and the optimum pH scope was pH7.0~9.0. Potassium cyanide and H₂O₂ were the inhibitor of honeybee pupae SOD and they could effectively prevent SOD activity.

Key words: honeybee pupae; SOD; extraction; physical-chemical property

中图分类号: Q814.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0192-04

超氧化物歧化酶(SOD)是一种广泛存在于动植物及微生物体内的金属酶, 基于金属辅基不同, 这些 SOD 分为 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD 三种类型^[1]。SOD 在生物体内催化超氧阴离子发生歧化反应, 从而清除体内超氧阴离子, 是一种具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗辐射和消炎作用的药用酶^[2], 在化妆品、食品、医药等领域有着广泛的应用^[3]。自从 1969 年 Mccord 和 Fridovich^[4]首次从牛血红细胞中分离出 SOD 以来, 至今国内外所用的 SOD 主要从人的血液或动物血液中提取。因受各种动物疾病的影响, 从动物血液中提取的 SOD 给人们带来了不少危险, 所以人们在不断寻求新的 SOD 源。

蜂蛹含有丰富的营养物质, 干物质中含蛋白质

44.01%、碳水化合物 20.34%、总糖 0.73%、几丁质 4.37%, 还含有丰富的矿物质、维生素、几丁质、黄酮类化合物、酶类和激素类等其他活性物质^[9], 是一种优质的昆虫资源。本实验对蜂蛹超氧化物歧化酶的提取工艺及理化性质进行研究, 不仅可以为蜂蛹的开发利用提供理论依据, 促进蜜蜂的产业化发展, 还可以为从昆虫中寻求 SOD 探索新路。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂及仪器设备

1.1.1 原材料

冷冻雄蜂蛹(22日龄意大利蜂) 武汉益民养蜂场。

收稿日期: 2007-06-23

作者简介: 张海生(1965-), 男, 副教授, 博士, 主要从事农产品加工及功能食品的研究。

1.1.2 试剂

SOD 检测试剂盒 南京建成生物工程研究所；
考马斯亮蓝试剂盒 南京建成生物工程研究所；其
他试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器与设备

高速冷冻离心机(TD30) 德国Sigma公司；电热恒
温水浴锅(HHW-21) 上海福码实验设备有限公司；可见
分光光度计(WFJ-2000) 上海尤尼卡公司；电子天平
(JA2003) 上海精科天平仪器厂；紫外分光光度计(U-
3010型) HITACHI 公司。

1.2 方法

1.2.1 蜂蛹 SOD 提取工艺流程

冷冻鲜蜂蛹→解冻→研磨→静置提取→加热→离心
(4℃条件下, 8500r/min, 离心 20min)→SOD 提取液(上
清液)^[6]。

1.2.2 蜂蛹杂蛋白的去除方法

利用不同蛋白等电点不同的性质, 通过调整溶液
pH 值纯化目标蛋白^[7]。

1.2.3 测定方法

蜂蛹 SOD 活力用 SOD 测试盒测定；蜂蛹蛋白质用
考马斯亮蓝测试盒测定。

2 结果与分析

2.1 蜂蛹 SOD 磷酸盐缓冲液提取工艺研究

2.1.1 缓冲液 pH 值对蜂蛹 SOD 提取效果的影响

采用不同 pH 的磷酸盐缓冲液对蜂蛹 SOD 进行了提
取, 结果见图 1。

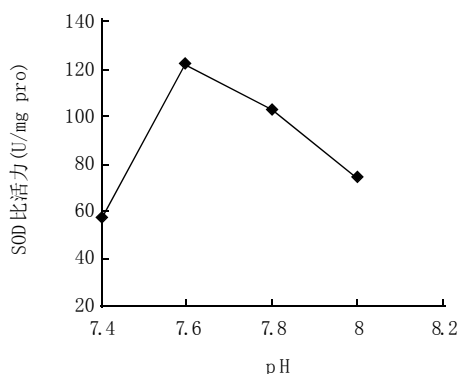


图1 缓冲液 pH 值与蜂蛹 SOD 比活力的关系

Fig.1 Relationship between phosphate buffer pH and honeybee pupae SOD activity

由图 1 可以看出, 缓冲液的 pH 值对蜂蛹 SOD 的活
性影响较大, pH7.6 以下时, SOD 的比活力随缓冲液 pH
值的升高而增大; pH7.6 时, 蜂蛹 SOD 的比活力最高,

在该 pH 值下, 可以有效去除其他杂蛋白; pH 超过 7.6
时, SOD 的比活力又随缓冲液 pH 值的升高逐渐下降。
因此提取蜂蛹 SOD 的最佳缓冲液 pH 值为 7.6。

2.1.2 加热温度对蜂蛹 SOD 比活力的影响

蜂蛹 SOD 的耐热性比较高, 而其他杂蛋白的热稳
定性则较差, 因此, 在适当的温度下加热, 可以除去
杂蛋白, 达到初步纯化的目的。在 55℃以下时, SOD
的比活力随温度的上升而增高(图 2), 杂蛋白的去除也呈
上升趋势; 加热温度超过 55℃时, 虽然杂蛋白的去除
效果好, 但蜂蛹 SOD 的比活力下降幅度较大; 而 55℃
的加热温度, 不仅所提取的蜂蛹 SOD 活力最高, 还能
有效去除杂蛋白。所以 55℃为提取蜂蛹 SOD 的最佳加
热温度。

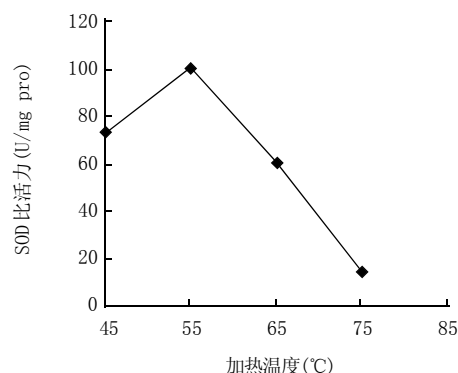


图2 加热温度与蜂蛹 SOD 比活力的关系

Fig.2 Relationship between heating temperature and honeybee pupae SOD activity

2.1.3 加热时间对 SOD 比活力的影响

由图 3 可知, 在 55℃下加热, 随着加热时间的延
长, SOD 的比活力在不断下降, 杂蛋白的去除效果在
不断提高。加热时间在 20min 以下时, 虽然 SOD 的活
性较高, 但杂蛋白的去除效果较差; 加热时间 20min
时, 可以有效去除杂蛋白, SOD 活力虽然有所下降,

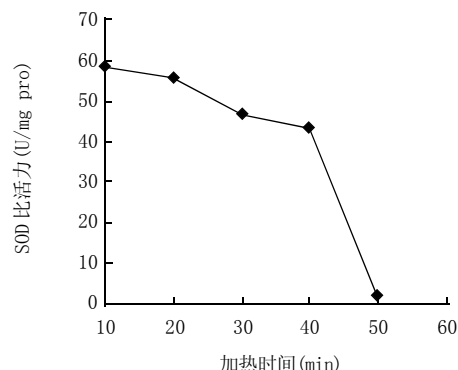


图3 加热时间与蜂蛹 SOD 比活力的关系

Fig.3 Relationship between heating time and honeybee pupae SOD activity

但降幅不大;加热时间超过20min时,虽然可以有效去除杂蛋白,但SOD活力降幅过大。因此,去除杂蛋白的最佳加热时间是20min。

2.1.4 蜂蛹SOD磷酸盐缓冲液提取工艺的优化

在上述单因素试验的基础上,采用正交试验对SOD的提取工艺进行了优化,正交试验结果见表1。

表1 正交试验结果
Table 1 Results of orthogonal test

试验号	A pH	B 加热温度(°C)	C 加热时间(min)	D 空列	SOD比活力 (U/mg pro)
1	1(7.4)	1(45)	1(20)	1	38.01
2	1	2(55)	2(30)	2	67.88
3	1	3(65)	3(40)	3	19.22
4	2(7.6)	1	2	3	38.29
5	2	2	3	1	108.44
6	2	3	1	2	43.20
7	3(7.8)	1	3	2	28.65
8	3	2	1	3	96.12
9	3	3	2	1	38.80
k ₁	41.70	34.98	59.11		
k ₂	63.31	90.81	48.32		
k ₃	54.52	33.74	52.10		
K ₁	125.11	104.95	177.33		
K ₂	189.93	272.44	144.97		
K ₃	163.57	101.22	156.31		
R	21.61	57.07	10.79	15.17	

由正交试验结果的级差分析可知,加热温度对蜂蛹SOD比活力的影响最大,各因素对蜂蛹SOD活力影响的主次次序为:加热温度>提取液pH值>加热时间,因素间的交互作用对蜂蛹SOD活力也有较大影响。实验结果分析表明,蜂蛹SOD提取工艺的最优组合是A₂B₂C₁,即提取液pH值7.6,加热温度55℃,加热时间20min。按该工艺条件进行提取,蜂蛹SOD比活力为110.41U/mg pro。

2.2 蜂蛹SOD的理化性质

2.2.1 蜂蛹SOD紫外吸收波长

用U-3010型紫外分光光度计对蜂蛹SOD提取液进行扫描,结果显示蜂蛹SOD的紫外最大吸收波长为234.56nm。

2.2.2 pH值对蜂蛹SOD活力的影响

由图4可以看出,pH对蜂蛹SOD活性的影响较大,pH5.0以下时,SOD活力较低,随着pH值的升高,SOD活力逐渐增高,且增幅较大,pH8.0时活力最高;当pH值超过8.0后,SOD活力随着pH值的升高又迅速降低。在pH7.0~9.0的范围内,蜂蛹SOD具有较高的活力,表明蜂蛹SOD的最适pH范围是pH7.0~9.0。

2.2.3 温度对蜂蛹SOD活力的影响

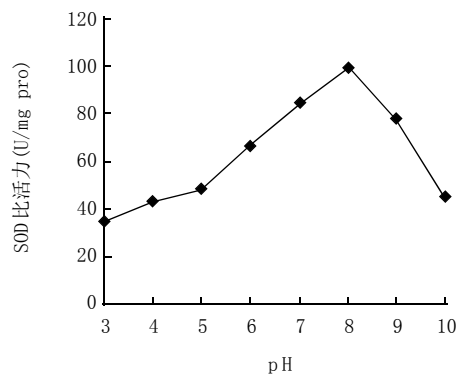


图4 pH与蜂蛹SOD活力的关系

Fig.4 Relationship between pH and honeybee pupae SOD activity

本实验考察了不同温度以及同一温度不同时间蜂蛹SOD活力的变化情况,结果如图5、6所示。

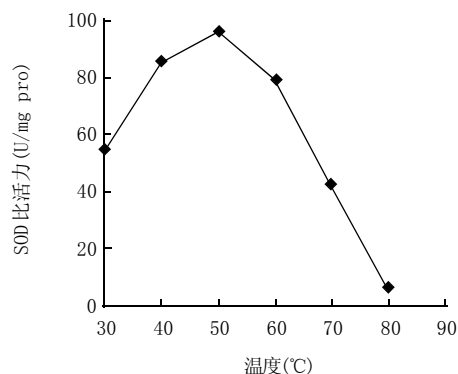


图5 温度与蜂蛹SOD活力的关系

Fig.5 Relationship between temperature and honeybee pupae SOD activity

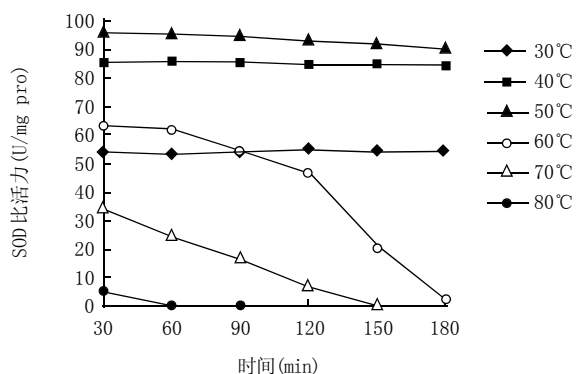


图6 热处理时间与蜂蛹SOD活力的关系

Fig.6 Relationship between heating time and honeybee pupae SOD activity

由图5可以看出,50℃以下时,蜂蛹SOD的活力随温度的升高而增高,50℃时,蜂蛹SOD的活力最高,当温度超过60℃后,SOD的活力随着温度的升高迅速下降,降幅较大($p < 0.01$)。另外,由图6可以看出,温

度 60、70、80℃时, SOD 的活力随时间的增加而逐步丧失, 40、50℃时, 保温 180min, SOD 的活性基本不变, 在 60℃保温 120min, SOD 保留约 60% 的活力。由此可以看出, 蜂蛹 SOD 是一种热稳定性较好的酶^[8], 其最适温度范围是 40~60℃。

2.2.4 H₂O₂ 对蜂蛹 SOD 活力的影响

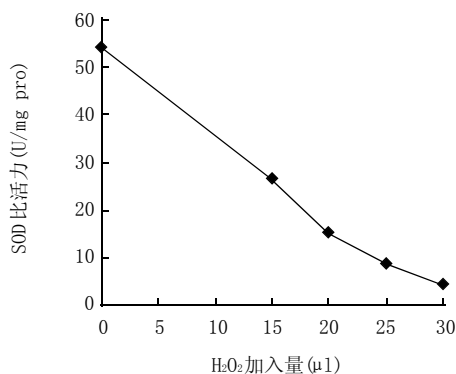


图7 H₂O₂加入量与蜂蛹 SOD 活力的关系

Fig.7 Relationship between H₂O₂ concentration and honeybee pupae SOD activity

由图 7 可以看出, H₂O₂ 对蜂蛹 SOD 的活性具有明显的抑制作用, 是 SOD 的抑制剂。

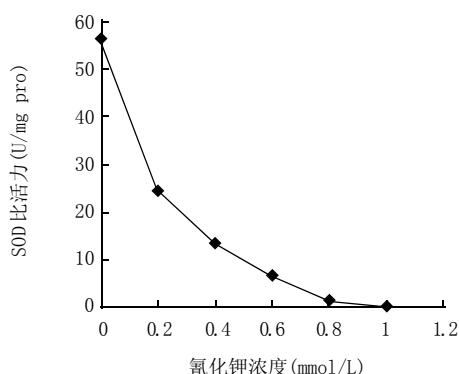


图8 氰化钾浓度与蜂蛹 SOD 活力的关系

Fig.8 Relationship between potassium cyanide concentration and honeybee pupae SOD activity

2.2.5 氰化钾对蜂蛹 SOD 活力的影响

由图 8 可以看出, 氰化钾对蜂蛹 SOD 的活性具有明显的抑制作用, 1.0mmol/L 的氰化钾就可使蜂蛹 SOD 的活力完全丧失。

3 讨论与结论

SOD 是一种含金属的酶, 按金属辅基不同可分成 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD。Cu/Zn-SOD 对氰化物敏感, 只要 1~2mmol/L 的氰化物即使其活性完全丧失, 而 Mn-SOD 和 Fe-SOD 却不被氰化物抑制; Cu/Zn-SOD 和 Fe-SOD 对过氧化氢敏感, 而 Mn-SOD 不受影响^[8]。本实验结果表明, 氰化钾和过氧化氢均能使蜂蛹 SOD 活性丧失, 提示蜂蛹 SOD 可能为 Cu/Zn-SOD。

采用磷酸盐缓冲液可以对蜂蛹 SOD 进行有效的提取, 最佳提取工艺条件为: 用 pH7.6 的磷酸盐缓冲液于室温下静置提取 4h 后于 55℃条件下加热时间 20min, 按该工艺条件进行提取, 蜂蛹 SOD 的活力为 110.41U/mg pro。蜂蛹 SOD 的最适温度范围为 40~60℃, 最适 pH 范围为 pH7.0~9.0, 氰化钾和 H₂O₂ 是蜂蛹 SOD 的抑制剂, 可以有效地抑制蜂蛹 SOD 的活性。

参考文献:

- [1] 黎瑞珍, 杨庆建, 陈贻锐. 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定及其应用研究[J]. 琼州大学学报, 2004, 11(5): 34-36.
- [2] 迟玉杰, 王明丽, 孙艳红. SOD对人体的营养保健作用[J]. 中国乳品工业, 2000, 28(4): 27-29.
- [3] ZHOU Jiang-yan, PROGNON P. Raw material enzymatic activity determination: A specific case for validation and comparison of analytical methods—The example of superoxide dismutase (SOD) [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 40(5): 1143-1148.
- [4] 田春美, 钟秋平. 超氧化物歧化酶的现状研究进展[J]. 中国热带医学, 2005, 5(8): 1730-1731.
- [5] 张海生, 陈锦屏. 蜂蛹蛋白酶解工艺及其氨基酸口服液对小鼠强壮作用的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(1): 110-115.
- [6] 俞纯方. 兔血SOD提取及活性研究[J]. 西南大学学报, 1995(5): 13.
- [7] 段玉峰. 中华稻蝗SOD的提取、分离及理化性质研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2005.