

猪血中过氧化氢酶提取及其性质研究

田荟琳, 张坤生*

(天津商学院生物技术与食品科学学院, 天津 300134)

摘要: 过氧化氢酶是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的末端氧化酶, 其功能是催化细胞内过氧化氢分解。本研究以猪血为原料, 采用 sephadex G-100 层析和 PEG-6000 分子筛层析法纯化了过氧化氢酶。在 pH7.4 粗酶液的酶活最大。20~40 范围内酶的活力最大。不同金属离子对过氧化氢酶活性有不同的影响。

关键词: 过氧化氢酶; 猪血; 提取

Study on Extraction of Hydrogen Peroxidase from Pig Blood and Its Properties

TIAN Hui-lin, ZHANG Kun-sheng*

(School of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: As one kind of oxidases, catalases can be found in almost all animals, plants and microorganisms. Catalases can catalyze the decomposition of the cellular hydrogen-peroxide and thus protect membrane lipid against peroxidation. A catalase from pig blood has been purified by the use of sephadex G-100 and PEG-6000 chromatography. It has biggest activity at pH7.4, and 20~40. There were different effect on for different metal ions.

Key words: hydrogen peroxidase(catalase); pig blood; extraction

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)12-0311-04

过氧化氢酶(hydrogen peroxidase)又称触酶(catalase, CAT)。其系统名称是 $H_2O_2 : H_2O_2$ 氧化还原酶, 国际酶学委员会的编号为 EC1.11.1.6^[1]。过氧化氢酶是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的末端氧化酶, 酶分子结构中含有铁卟啉环, 1 个分子酶蛋白中含有 4 个铁原子。过氧化氢酶是在生物演化过程中建立起来的生物防御系统的关键酶之一^[2], 其生物学功能是催化细胞内过氧化氢分解。过氧化氢酶的研究可追溯到 19 世纪初, 迄今它已经成为农业, 以及与之相关的食品与乳制品业、纸浆和造纸业、以及农业环保产业中有应用价值的酶之一。CAT 主要以与细胞器, 如线粒体和过氧化物酶体结合的形式存在, 而在红细胞中则以可溶状态存在。

原核 CAT 主要来源于微生物, 研究发现, 几乎所有需氧微生物中都存在 CAT, 但也有少数好氧菌, 如过氧化醋杆菌(*A. peroxydas*) 不存在 CAT^[3]。1989 年, Goldberg and Hochman 按照不同理、化特性, 将 CAT 划分为典型性(typical)、非典型性(atypical)和 CAT-过

氧化物酶(catalase-peroxidases, CAT-POD), 通常认为这也是一种符合进化关系的划分。按催化中心结构差异可分为两类, (1) 含铁卟啉结构 CAT, 又称铁卟啉酶, 典型性 CAT 和 CAT-POD 属于此类; (2) 含锰离子替代铁的铁卟啉结构, 又称为锰过氧化氢酶(MnCat)^[4], 非典型性 CAT 属于此类。CAT 作为生物体内重要物质, 其最为主要的功能就是参与活性氧代谢过程。一旦氧分子的电子分布发生改变, 就变成活性氧。活性氧的种类包括 H_2O_2 、羟自由基($\cdot OH$)、超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)等。在活性氧代谢过程中, CAT 可以使 H_2O_2 发生歧化生成水和氧分子。

目前市售的过氧化氢酶来源有 3 个: 通过牛肝、猪肝提取纯化而得; 由变种黑曲霉在通风搅拌等控制下培养而得; 由纤维蛋白小球菌经深层发酵提取精制而得。在国内, 发酵法提取过氧化氢酶仅处于实验室研究阶段, 尚无工业化生产。而从动物原料中提取过氧化氢酶的研究也是在近几年才引起重视。近年来畜禽加工中的安全问题一直受到全世界各国的普遍关注, 很多国家

收稿日期: 2006-08-01

* 通讯作者

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金项目(2004BA02); 天津市自然科学基金资助项目(043611911)

作者简介: 田荟琳(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。

只食用畜禽肉体,其他加工副产品常常被废弃掉。本实验采用从猪血中提取过氧化氢酶,一方面是因为猪血的过氧化氢酶含量较高,另一方面就是利用畜禽加工的副产物生产附加值高的非食品类产品,既达到了使用安全,又实现了资源的充分利用。

1 材料与方法

1.1 材料

H₂O₂ 基质液(65mmol/L)、95%乙醇、三氯甲烷溶液、丙酮溶液、磷酸盐缓冲液(PB液, pH7.4, 0.06mol/L)、钼酸铵溶液(32.4mmol/L)、PEG-6000、Sephadex G-100 凝胶。原料猪血采自当地肉类加工厂。

1.2 主要仪器与设备

冷冻离心机;磁力搅拌器;pH计;分光光度计;紫外检测仪。

1.3 方法

1.3.1 猪血处理及过氧化氢酶提取

新鲜猪血,加入抗凝剂,充分搅拌,之后离心取红细胞,磁力搅拌下溶血后离心。于上清液中加入约80%的预冷丙酮,4℃下静置15min,用pH7.4, 0.06mol/L的磷酸盐缓冲液将沉淀洗出。在4℃下通过PEG-6000沉淀蛋白后,通过装有pH7.6, 2.5mol/L磷酸盐缓冲液的Sephadex G-100柱层析,透析24h后冷冻干燥。

1.3.2 酶纯度的检测

考马斯亮蓝蛋白标准曲线的绘制:取11支试管,按表1的数据配制0~1000μg/ml牛血清白蛋白溶液各1ml。准确吸取所配各管溶液0.1ml,分别放入10ml试管中,再加入5ml考马斯亮蓝G250蛋白试剂,摇匀,放置2min后在595nm下比色,做出标准曲线。

1.3.3 样品中蛋白质含量的测定

准确称取10mg成品酶蛋白粉末,用蒸馏水充分溶解后定容至25ml,即为成品酶蛋白溶液。吸取0.1ml成品酶蛋白溶液放入试管中,加入5ml考马斯亮蓝G250蛋白试剂,摇匀,放置2min后在595nm下比色(以座标准曲线时的零样为空白),测其吸光度值。

1.3.4 酶活性测定

基质液:取市售的过氧化氢用磷酸缓冲液稀释,使其浓度为每毫升磷酸缓冲液中含65μmol H₂O₂。

标准曲线的制作:将基质液按0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5ml的梯度分别与3ml钼酸铵混合,静置2min后定容至10ml,405nm处测定吸光度值,制作成标准曲线。

酶活性测定方法:在试管、样品管中分别加入基质液、待测液,于37℃水浴保温3min后,加入3ml钼酸铵,充分混匀,2min后用蒸馏水定溶至10ml,于

表1 蛋白标准曲线的制作
Table 1 Making curve of standard protein

编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
蛋白原液 (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
蒸馏水 (ml)	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2
蛋白质浓度 (μg/ml)	0	100	200	300	400	500	600	700	800

405nm 调零比色。记录吸光度值(A),利用标准曲线所得的回归方程计算活力。定义每1min分解1mmol的过氧化氢即为1个过氧化氢酶活性单位。

2 结果与分析

2.1 猪血过氧化氢酶的分离

猪血过氧化氢酶粗酶经磷酸盐缓冲液洗提,PEG-6000沉淀及Sephadex G-100柱层析纯化,得到猪血CAT样品。经不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果呈现单一蛋白区带,表明该酶已纯化到均一程度;同时酶的活性染色结果呈现一条亮黄透明的活性带,且与酶蛋白染色带位置一致。糖染色实验中,染色后蛋白带呈桃红色,表明猪血CAT为糖蛋白;苯酚-硫酸法测定其中性糖含量约为9.24%。

通过测得的吸光光度值,可推得成品酶蛋白溶液中蛋白质浓度为373.35μg/ml,从而算出成品酶蛋白粉末中蛋白质含量为962μg/mg,即蛋白质所占比例为96.2%,近似于100%,与期望值较接近,此结果比较理想。猪血红细胞中总酶活性为109037mmol/min·ml,粗酶液酶活性为29796mmol/min·ml,纯化后酶活性为87448mmol/min·ml。

2.2 纯化工艺选择

本实验在乙醇氯仿溶液浸提离心的基础上,采用了PEG-6000沉淀蛋白再经Sephadex G-100层析最后透析的方法,与单纯乙醇氯仿溶液浸提离心相比,提取的过氧化氢酶纯度提高很大。

在提取过程中,比较了乙醇:氯仿为5:3,1:1,3:5不同比例下的提取效果,发现在5:3条件下提取时第一次离心后的上清液较清澈(血红素去除较为充分)。

在整个提取纯化过程中,温度对实验的影响很大,控制在4℃最佳。

2.3 酶活性研究

2.3.1 波长的选择

本实验采用全波长扫描分析仪,对过氧化氢与钼酸铵所形成的淡黄色络合物(钼黄)进行了吸收峰的扫描,最大吸收波长在380nm处,405~410nm是最大吸收的侧峰,均在可见光区。采用405nm其优点在于405nm较

410nm 更接近最大吸收峰, 405nm 波长不仅适用于一般分光光度计, 也同样可用于带滤光片的比色计。

2.3.2 pH 值对酶活性的影响

pH 值对酶活性的影响测定结果见图 1 所示。

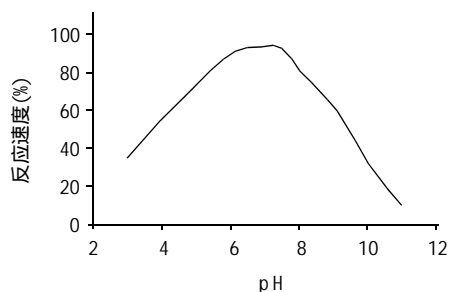


图1 反应体系 pH 对酶反应速度的影响
Fig.1 Effect on rate of reaction by pH

从图 1 中可以看出, 同一浓度的酶液在 pH6.0 ~ 7.4 范围内酶活性较平稳, 反应速度基本一致。低于或高于此范围, 反应速度均有不同程度下降。在 pH7.4 处, 吸光度值最小, 即过氧化氢被催化分解的量最多。可见, 过氧化氢酶粗酶液在此 pH 值下酶活最大。另外, 可明显看出, 体系 pH 对过氧化氢酶催化活性影响较大, 过酸或过碱都会显著降低过氧化氢酶的催化活性。故本实验中测定酶活时均在 pH7.4 条件下进行。

2.3.3 反应时间对酶反应速度的影响

本实验采用的测定过氧化氢酶活性方法中, 过氧化氢酶作用于 H_2O_2 时应选择在时间和速度呈较好的线性范围内, 否则结果就不准确。经过多次测定, 确定反应时间为 3min 较好, 具体情况见图 2 所示。

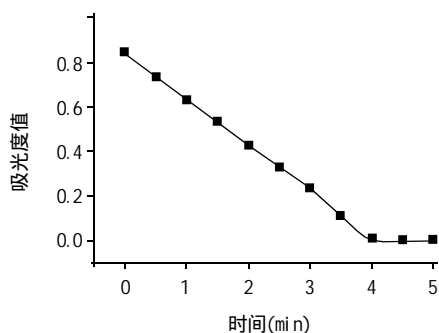


图2 反应时间和反应速度的关系
Fig.2 Relationship between reaction time and reaction rate

2.3.4 钼酸铵加入量对吸光度测定的影响

随着钼酸铵浓度的增大, 其吸光度值也相应增加。低浓度的钼酸铵达不到迅速终止反应的效果, 与过氧化氢反应不够完全, 呈色较浅, 不利于比色分析。有文献报道, 采用 32.4mmol/L 的钼酸铵浓度, 不仅可以迅速终止其反应, 又增加了络合物的呈色, 且生成的氧

气泡很少, 不影响比色结果。

2.4 猪血过氧化氢酶的性质

将纯化的猪血过氧化氢酶进行 SDS-PAGE 实验, 以次高分子量标准蛋白质作参照, 测得过氧化氢酶的亚基分子量约为 68000。

pH 值对过氧化氢酶活性的影响见图 1 所示, 在 pH7.4 处, 过氧化氢酶粗酶液在此 pH 值下酶活最大。

2.4.1 温度对酶活性的影响

取同一浓度的过氧化氢酶酶液试验, 分别在 20、25、30、35、37、40、45、50、55、60 水浴中准确反应 3min, 用钼酸铵溶液终止反应, 此酶活力变化见图 3 所示。

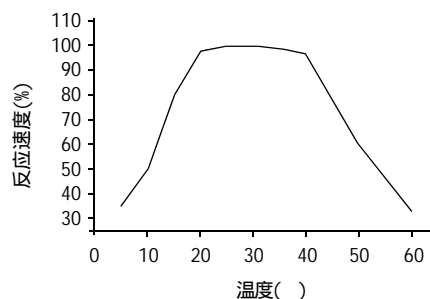


图3 温度对酶反应速度的影响
Fig.3 Effect on reaction rate by temperature

由此看出, 过氧化氢酶在 20 ~ 40 范围内活力最大, 反应速度最快。低于此范围酶作用能力不能充分发挥, 高于此范围酶活性损失。随着温度的升高, 酶的活性逐渐降低, 这是由于温度升高, 部分酶蛋白变性, 从而降低了其活性。

2.4.2 过氧化氢酶的热稳定性

猪血过氧化氢酶在不同温度(15 ~ 60)下, 测定其酶活, 结果见图 4 所示。保温不同时间后冷却至室温, 测定其酶活, 结果见图 5 所示。

由实验结果可以看出, 猪血过氧化氢酶的最适温度为 25 , 在此温度下其酶活达到最大值。此酶对热较

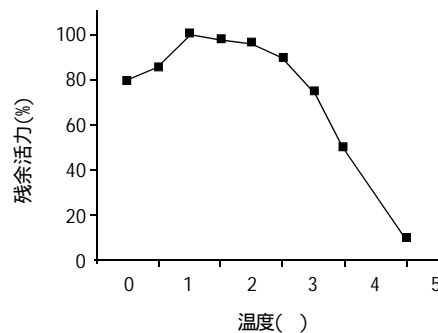


图4 不同温度下保温 15min 酶活力变化
Fig.4 Change of enzyme activity in different temperature at same keeping temperature

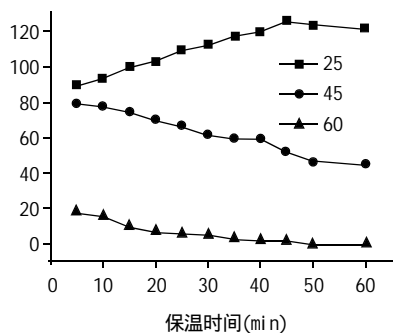


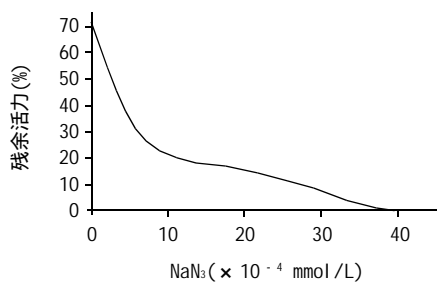
图5 不同温度下保温不同时间酶活力变化

Fig.5 Change of enzyme activity in different time and at different keeping temperature

不稳定, 45℃ 保温 15min, 酶活下降 25%; 60℃ 保温 15min, 此酶的残余活力仅为 10%, 保温 50min, 酶活全部丧失。

2.4.3 NaN₃ 和 KCN 对猪血过氧化氢酶的抑制作用

NaN₃ 和 KCN 对猪血过氧化氢酶有强烈的抑制作用。4 × 10⁻³ mmol/L NaN₃ 以及 1 mmol/L KCN 即能使猪血过氧化氢酶活性 100% 丧失。结果见图 6、7 所示。

图6 NaN₃ 对猪血过氧化氢酶活性的影响Fig.6 Effect on activity of catalase from pig blood by NaN₃

2.4.4 不同金属离子对过氧化氢酶活性的影响

不同金属离子对过氧化氢酶活性的影响见表 2 所

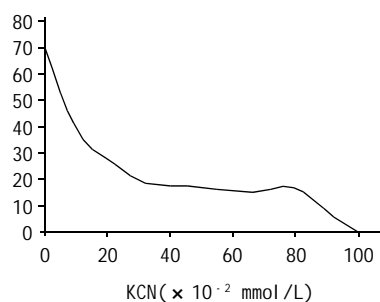


图7 KCN 对猪血过氧化氢酶活性的影响

Fig.7 Effect on activity of catalase from pig blood by KCN

表2 不同金属离子对猪血过氧化氢酶活性的影响

Table 2 Effect on activity of catalase from pig blood by different metal ions

金属离子 M ⁿ⁺	相对活性(%)	金属离子 M ⁿ⁺	相对活性(%)
Pb ²⁺	52.8	Mn ²⁺	58.9
Cd ²⁺	60.2	Hg ²⁺	68.7
Ni ²⁺	87.6	Cu ²⁺	98.9
Fe ²⁺	104.9	Mg ²⁺	109.2
Zn ²⁺	118.9		

示。

研究结果表明, 在相同浓度下, 不同的金属离子对过氧化氢酶活性有不同的影响。其中, Pb²⁺、Mn²⁺、Cd²⁺、Hg²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺ 对过氧化氢酶的催化活性有抑制作用, 而 Fe²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺ 则有促进作用。

参考文献:

- [1] 刘昌玲, 王国庆. 细菌过氧化氢酶的分离、结晶及性质[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(5): 380-383.
- [2] 黄永洪, 花慧, 沈国强, 等. 猪肝过氧化氢酶提取条件的研究[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(1): 40-42.
- [3] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 223-232.
- [4] 张闻, 罗勤慧. 锰过氧化氢酶及其模型物研究进展[J]. 化学通报, 2000, (10): 4-7.



美国研究称: VE 可降低烟民死亡率

根据最新一期《美国临床营养学杂志》月刊发表的一份研究报告, 维生素 E 可降低烟民死亡率, 包括他们死于癌症和心脏病的几率。

美国国家癌症研究所的玛格丽特·赖特博士和同事在长达 19 年时间里, 跟踪调查了大约 3 万名芬兰男性中年烟民, 结果发现这些烟民中血液里 VE 含量最高的人死亡率最低。

研究人员发现, 在这 19 年中, 血液里 VE 含量最高的人群死亡率比血液里维生素 E 含量最低的人群低大约 18%, 前者死于癌症和心脏病的几率也分别比后者低约 21% 和约 19%。

研究人员说, VE 可以增强免疫系统功能, 防止血管瘤生成, 通过多种方式促进人体健康。

研究表明, 人体中每升血液里 VE 最佳含量为 13 ~ 14 mg, 更高含量不会带来更多好处。

坚果、全麦食品和绿叶蔬菜等均富含 VE。