

# 高活性小白菜 SOD 口服液的研制

张海悦<sup>1</sup>, 李晓玲<sup>1</sup>, 张凤清<sup>1</sup>, 朱梅梦<sup>2</sup>, 姜海威<sup>2</sup>

(1. 长春工业大学生物工程学院, 长春 130012)

(2. 吉林粮食高等专科学校, 长春 130062)

**摘 要:** 以小白菜的绿叶为原料采用生物化学及物理化学方法提取出 SOD, 并对其进行了化学修饰和保护使其在胃中不被胃酸及胃蛋白酶破坏, 延长半衰期, 增强了酶的稳定性。更适合人体口服吸收, 它具有明显抗衰老效果, 经过科学配制, 清甜爽口, 是人们理想的延年益寿的功能保健食品。

**关键词:** 小白菜; 超氧化物歧化酶(SOD); 化学修饰; 功能食品

**Abstract:** With biochemical and physicochemical method, SOD was extracted from the green leaves of pakchoi. By chemical modification and protection SOD would not be destroyed by gastric acid and gastric protease in stomach. Its half life was prolonged and enzymic stability increased, so it would adapt for oral intake. SOD had apparent anti-senescence effect. By scientific formulation SOD oral liquid was sweet and nice. It was a perfect functional food for prolonging one's life.

**Key words:** pakchoi; SOD; chemical modification; functional food

中图分类号: TS218 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2003)04-0066-03

SOD 是超氧化物歧化酶的简称, 它是广泛存在于机体内的一种抗氧化酶, 是人体主要自由基清除剂, 自由基学说是英国 Harman 于 1956 年最早提出的, 该学说认为自由基攻击生命大分子造成组织细胞损伤, 是引起机体衰老的根本原因, 也是诱发肿瘤等恶性疾病的重要起因。自由基清除剂能够清除机体代谢过程中产生的过多自由基, 因此是一种可增进人体健康的重要活性物质, 也是一类重要的功能性食品基料。人类在长期进化过程中, 生命有机体内必然会产生一些物质能清除这些自由基, 然而随着年龄的增大, 机体内产生自由基清除剂的能力逐渐下降, 导致体内清除剂的含量逐渐减少, 其活性也逐渐降低, 从而削弱了人类对自由基损害的防御能力, 加速了生命衰老速度并引发了一系列病变, 添加些自由基清除剂, 从而达到抵抗疾病延缓衰老的目的, 这便是我们研究小白菜 SOD 口服液的目的和意义所在。本课题组从蒜、菠菜、芦荟、小白菜等大量植物中提取出了 SOD, 但从产品 SOD 的活性及产品风味和经济效益等方面考虑, 我们最终确定了从小白菜中提取 SOD, 从实验结果看小白菜 SOD 活性很高, 而且原料价格低廉, 生长周期短, 是我们理想的加工原料。

## 1 材料与设备

### 1.1 试验材料与试剂。

#### 1.1.1 原材料 取新鲜嫩绿的白菜叶

1.1.2 试剂 50mmol/L 的磷酸钾缓冲液 (含 1mmol/L 的 EDTA, 0.4mmol/L 蔗糖和 0.01% 巯基乙醇 pH = 7.8) 5mmol/L 的磷酸钾缓冲液 (pH = 7.8 含 1mmol/L 巯基乙醇) 硫酸铵 (AR) NaIO<sub>4</sub> (AR) 乙二醇 (AR) 6% 右旋糖苷 40 溶液 (AR) 0.1mol/L 的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (食品级) 甘氨酸 (食品级) 3mol/L 的邻苯三酚溶液, 用 1.0mol/L 的 HCl 配制。

Tris-HCl 缓冲液 (0.1mol/L pH = 8.2) 取 0.2mol/L Tris (三羟甲基氨基甲烷) 溶液 (含 4mmol/L 的 EDTA) 100ml 与 0.2mol/L HCl 44.76ml 混合加去离子水至 200ml 调至 pH = 8.2。

### 1.2 设备

捣浆机; 高速冷冻离心机: 型号 J2-21M; 超声波处理器: 型号 C0250H-54-1; 透析袋: 分子量 3 万; 岛津 UV-250 分光光度计; 电热恒温水浴锅; 微量进样器 5~500μl。

## 2 方法

### 2.1 工艺流程

原料→提取 SOD 粗酶→酶的修饰与提纯→口服液调配→灭菌→无菌灌装→成品

## 2.2 主要操作方法

### 2.2.1 SOD 的提取

2.2.1.1 小白菜去泥洗净,将嫩绿色的叶置于 50mmol/L 的磷酸钾缓冲液中,放入组织捣碎机中打至组织破碎状态,然后除渣取滤液。

2.2.1.2 将滤液放入离心机中,保温 4℃,6000r/min,离心 15min,去上清液得叶绿体。

2.2.1.3 将叶绿体用 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液冲洗,然后放入 5 mmol/L 的磷酸钾缓冲液中搅拌均匀,无颗粒状态沉淀,放入超声波处理器中处理 40min。

2.2.1.4 超声波处理的液体,经离心机 4℃ 下离心,15min 取上清液。

2.2.1.5 将上清液中加入硫酸铵使其饱和浓度为 55% (0℃),在 0℃ 静置过夜后,经离心处理 30min 取上清液,再加入硫酸铵使其饱和浓度为 95% (0℃),在 0℃ 静置过夜后,再经离心处理 40min,所得沉淀物即为粗制 SOD 酶,粗制 SOD 酶经 5 mmol/L 的磷酸钾缓冲液洗脱后备用。

### 2.2.2 SOD 的修饰

2.2.2.1 取 1L 6% 的右旋糖苷溶液,加  $31\text{NaIO}_4$  使其终浓度为 0.3 mol/L,在室温下搅拌氧化 30min,氧化液呈黄绿色。

2.2.2.2 加入乙二醇使其终浓度为 0.85mol/L,室温下搅拌 30min,中止氧化反应。

2.2.2.3 将氧化液移入透析袋中,用 0.1mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液在 40℃ 条件下透析过夜,除去多余的  $\text{NaIO}_4$ 。

2.2.2.4 将透析后含活性醛基化合物的氧化液与等体积的小白菜提取粗酶液混合,在冰浴中连续搅拌 8h,使醛基化合物在 SOD 上形成一层保护膜,SOD 就被修饰保护了。

2.2.2.5 加入甘氨酸使其终浓度达到 10 mg/ml 搅拌 30min 后中止反应,将反应液移入透析袋,于 0.1mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$  的溶液中 4℃ 透析过夜,去除小分子物质,得被修饰保护的 SOD。

### 2.2.3 口服液的调配

将修饰后的 SOD 加蛋白糖、蜂蜜、饴糖等原料用无菌水调配成淡绿色,具有清淡蜂蜜味道的口服液。此口服液中 SOD 活性  $\geq 100\text{U/ml}$ 。

### 2.2.4 调配液的灭菌

120℃ 瞬间灭菌。

### 2.2.5 无菌灌装及检验得成品

## 3 SOD 的检测方法——邻苯三酚 (PR) 自氧化法

### 3.1 原理

用邻苯三酚 (PR) 自氧化法测量 SOD 活性,是利用邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化,释放出  $\text{O}_2^-$ ,生成有色的中间产物,可用分光光度法进行测定。PR 自氧化的初始阶段,中间产物的累积在滞后 30 ~ 40s 后与时间成线性关系,中间产物在 320nm 有强烈光吸收。当有抑制剂存在时,可清除  $\text{O}_2^-$ ,从而阻止中间产物的积累,据此可求出抗氧化剂 SOD 的活性。

### 3.2 操作方法

3.2.1 将修饰保护的 SOD 用 5mmol/L 的磷酸钾缓冲液稀释 5 倍后,取一定体积的样品待测。

3.2.2 用移液管分别吸取 Tris - HCl 缓冲液 2.8ml 和 2.9ml 置于两支干净的试管中,分别标号为 A 和 B,取适量的 PR 置于标号为 C 的试管中,取稀释后待测的 SOD 溶液 100ml 置于 A 试管中,各试管中量如下:

A 2.8ml Tris + 100ml SOD

B 2.9ml Tris

C 2ml PR

将试管置于试管架上,放入 25℃,恒温水浴锅中保温 10min。

3.2.3 取 100ml PR,置于 B 试管中,开始计时,并不断振荡,倒入石英比色皿中,在  $\lambda = 320\text{nm}$ ,30s 后测定曲线如图 A 所示,此为 SOD 口服液的抑制曲线。

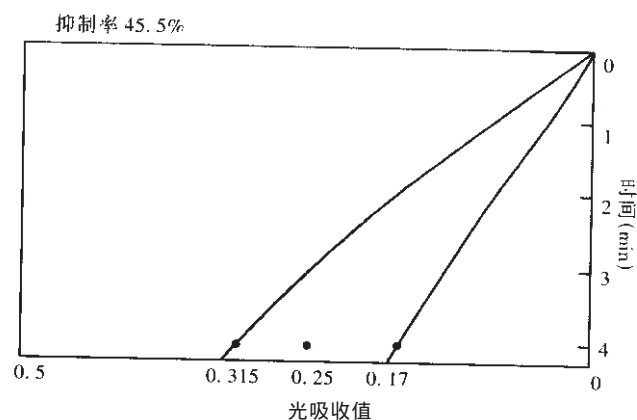


图 A SOD 口服液的抑制曲线

### 3.3 抑制率及活力单位计算

$$\frac{0.315}{4} = 0.078 \quad \frac{0.17}{4} = 0.0425$$

则 SOD 的自氧化抑制率为:

$$\frac{0.078 - 0.0425}{0.078} \times 100\% = 45.5\%$$

活力单位的计算为:

$$U = \frac{\frac{0.078 - V}{0.78} \times 100\%}{50\%} \times V \times \frac{n}{V_1}$$

U——SOD 单位体积活力的实测值(U/ml);

V——加入 SOD 后,邻苯三酚的自氧化速率(约 0.035A/min);

V——反应总体积 (ml) 即 Tris 缓冲液, PR 液及 SOD 混合后体积;

V<sub>1</sub>——SOD 的进样量 ml;

n——SOD 的稀释倍数;

$$U = \frac{\frac{0.078 - 0.0425}{0.78} \times 100\%}{50\%} \times 3 \times \frac{5}{0.1}$$

注:酶的活性单位 U 单位定义:

在 1ml 反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量定为一个单位。即在  $\lambda = 325\text{nm}$  时, 0.035A/min 为一个活力单位。

#### 4 产品标准

4.1 产品质量标准 淡绿色透明, 口感纯正, 无杂质。

4.2 理化指标 SOD 活性  $\geq 100\text{U/ml}$ ; 铅、砷、铜按 GB10792-89 执行。

4.3 微生物指标

细菌总数  $< 86$  个/ml;

大肠菌群数  $< 3$  个/ml;

致病菌不能检出。

#### 5 讨论与分析

5.1 从小白菜中提取 SOD 具有原料来源丰富, 价格低廉, 操作简单, 所制得的 SOD 纯度较高, 经济价值可观。

5.2 关于不同浓度磷酸钾缓冲液的使用, 使用 50mmol/L 的磷酸钾缓冲液主要是更好的使叶绿体从破碎的组织中分离出来, 同时疏基乙醇能够保护 -SH, 使其避免氧化, 在超声波处理时使用 5mmol/L 的磷酸钾缓冲液主要是使细胞胀润, 以便于超声波对细胞的破坏, 使胞内酶 SOD 更好的溶出。

5.3 硫酸铵不同饱和浓度的使用。主要依据是不同饱和浓度的硫酸铵沉淀不同分子量的蛋白质。第一次使硫酸铵的饱和浓度达到 55% 主要是沉淀制品中大分子的蛋白质。第二次使硫酸铵饱和浓度达到 95% 主

要是沉淀分子量约为 3 万的蛋白质分子, 我们所提取的 SOD 的分子量就是 3 万, 所以所得的沉淀就是 SOD 粗酶。

5.4 对 SOD 制品的修饰是十分必要的, 天然 SOD 作为药用酶用于临床在体内停滞时间短, 半衰期只有 6~10min, 易被蛋白酶及胃酸破坏, 经修饰后的 SOD 在模拟胃液中半衰期可长达 45min, 且不被破坏, 易为人体吸收。因此对 SOD 分子进行改造和修饰是十分必要的。本口服液采用右旋糖苷溶液, 使其氧化后形成的醛基化合物在 SOD 上形成一层保护膜, SOD 就被修饰了。通过修饰后的 SOD 不仅保留天然酶活性, 而且在耐热, 耐极端 pH 和抗蛋白酶水解能力方面均优于天然酶。

#### 6 经济效益分析

由小白菜中提取 SOD 制成口服液经济效益十分可观, 厂房生产线投资约 500 万元人民币, 年产 131 万盒, 每盒 30 元 (年生产 300d, 每天两班共 16h, 日产 4368 盒)。

##### 年效益测算

131 万盒/年 30 元/盒

年产值  $131 \times 30 = 3930$  万元

项 目	支出(万元)
原材料	1650
生产费用(10%)	$3930 \times 10\% = 393$
设备及厂房	500
税收(20%)	$3930 \times 20\% = 786$
其 它	51
纯利	$3930 - 1650 - 393 - 500 - 786 - 51 = 550$ 万,

可见一年内可将所有投入的资本全部收回, 还收入 550 万元。

如果将破碎的组织综合利用, 那么还有一笔不小收入。

所以可以看出投资 SOD 口服液的项目是相当可靠的, 一经投资马上见效。

##### 参考文献:

- [1] 郑健仙. 功能性食品[J]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- [2] 金宗濂. 功能食品评价原理及方法[M]. 北京: 北京入学出版社, 1995.
- [3] 杜宝贤等. 绿豆 SOD 口服液的研制[J]. 食品科学, 1997.