

仙人掌SOD超声萃取与纯化工艺研究

王中凤

(合肥学院生物与环境工程系, 安徽合肥 230022)

摘 要:以新鲜仙人掌为材料,去表面刺和蜡质、清洗、打浆、过滤、超声波处理、离心,得仙人掌粗酶液,再经硫酸铵盐析和 Sephadex G-100 柱层析,对仙人掌 SOD 初步纯化。超声波处理能够提高仙人掌 SOD 的提取率,超声波功率 600W、温度 40℃ 与时间 20min 的组合,所得 SOD 活力最高,达到 215.6U/mL。硫酸铵饱和度 40% 和 85% 分别用于除杂质和沉淀 SOD 目标蛋白,有较好的纯化效果,Sephadex G-100 能使 SOD 得到一定程度的纯化。

关键词:仙人掌,超氧化物歧化酶(SOD),提取,纯化

Study on technology for extracting and purifying SOD from cactus by ultrasonic

WANG Zhong-feng

(Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei 230022, China)

Abstract: Taking fresh cactus as material, crude superoxide dismutase (SOD) liquid of cactus was obtained by removing prick and wax, cleaning, pulping, filtrating, and treated with ultrasonic and centrifuged. Ammonia sulfate and Sephadex G-100 gel chromatography columns were employed for primary purification of SOD. The ultrasonic could significantly increase SOD extraction rate. The highest activity of SOD (215.6U/mL cactus juice) was obtained by ultrasonic treatment of 600W, 20min and 40℃ to cactus pulp. Better effect for removing impurity protein and depositing SOD protein from crude solution was displayed separately by 40% and 85% of ammonia sulfate saturation. The SOD protein salted out from crude solution was further purified through Sephadex G-100 gel chromatography.

Key words: cactus; superoxide dismutase; extraction; purification

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)12-0281-03

大量研究发现,仙人掌提取物具有显著的抗氧化作用。仙人掌可有效地对抗 D-半乳糖所致小鼠衰老体征的出现^[1]。崔美芝等学者认为,仙人掌延缓机体衰老的作用与其具有的抗氧化作用有很大关系^[2]。超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内一种重要的超氧阴离子清除剂,具有抗氧化、抗衰老、抗辐射和消炎作用,对内风湿、关节炎、放射治疗后的皮肤炎有特别疗效,是生物体中不可缺少的保护酶。SOD在医药、食品、化妆品领域都有重要的应用价值^[3]。据报道,仙人掌具有很高的 SOD 活性。仙人掌中超氧化物歧化酶(SOD)活性与牛血红蛋白中 SOD 活性相当,仙人掌 SOD 的含量是牛血红蛋白 SOD 含量的 2 倍多、牛奶 SOD 含量的 7 倍多,具有明显的抗衰老和提高机体免疫力作用^[3]。冯艳伟等采用超声波破碎法提取大蒜 SOD,提高了 SOD 活性收率。笔者曾经报道过米邦塔仙人掌具有较高的 SOD 活性和较强的稳定性^[4]。本文主要研究了以新鲜仙人掌为材料,

直接榨汁与超声波处理相结合的优化提取条件和初步纯化工艺。

1 材料与方法

1.1 实验材料

食用仙人掌 采自寿县经济开发区仙人掌种植基地;SOD 检测试剂盒、考马斯亮蓝试剂盒:均为南京建成生物工程有限公司生产;Sephadex G-100 pharmacia 产品。

1.2 实验方法

1.2.1 仙人掌汁液制备 取新鲜仙人掌 250g,榨汁、带渣匀浆 15min,双层纱布过滤。将滤液用超声波处理,进行功率、温度、时间的单因素实验和在此基础上的 $L_9(3^4)$ 正交实验,10000r/min 离心 15min,去除沉淀,上清液即为仙人掌汁液。

1.2.2 硫酸铵盐析纯化 仙人掌汁液经 60℃ 水浴 20min 热处理,冷却,8000r/min 4℃ 离心 15min。取上清液,缓慢加入硫酸铵至不同饱和度,充分溶解,4℃ 静置过夜,4℃、10000r/min 离心 15min,去除上清液。沉淀中加入适量 pH7.8 的磷酸盐缓冲液溶解,得 SOD 粗酶液。

1.2.3 凝胶层析纯化 Sephadex G-100 柱,进样体

收稿日期:2009-10-19

作者简介:王中凤(1963-),女,教授,研究方向:农产品加工与保鲜。

基金项目:合肥学院人才基金(RC021)。

积 10%, 用 pH7.8 的磷酸盐缓冲液洗脱, 洗脱速度 0.3mL/min, 每管收集 4mL。测洗脱液 OD₂₈₀, 绘制洗脱曲线, 并测定洗脱峰区各接收管的 SOD 活性。

1.2.4 SOD 酶活测定 按照试剂盒说明书操作, 测定 550nm 吸光度值, 按下列计算公式:

SOD 活力 (U/mL) = (对照管吸光度 - 测定管吸光度) / 对照管吸光度 ÷ 50 × 反应体系的稀释倍数

1.2.5 蛋白质浓度测定 按照试剂盒说明书操作, 测定 550nm 吸光度值, 按下列计算公式:

蛋白含量 (g/L) = (测定管 OD 值 - 空白管 OD 值) / (标准管 OD 值 - 空白管 OD 值) × 标准管浓度 (g/L)

2 结果与分析

2.1 超声波功率与时间对出汁率和 SOD 提取率的影响

仙人掌浆经 600、800W 超声波处理, 出汁率分别为 86.67%、89.02%, 未处理为 82.11%, 由此看出, 超声波处理明显提高了出汁率。以 5000r/min 离心后, 未经超声处理的上清液明显比处理过的混浊。通过 SOD 活性测定, 单位体积的 SOD 活性也提高 18.78%, 80% 超声波处理的蛋白质浓度比未处理者增加 31.62%, 结果见表 1。

表 1 超声波对仙人掌出汁率和 SOD 提取率的影响

处理功率 (W)	出汁率 (%)	SOD 活性 (U/mL)	蛋白质浓度 (g/L)
对照	82.11	134.44	0.664
600	86.67	155.90	0.825
800	89.02	159.69	0.874

超声波处理对降低仙人掌组织黏稠度, 提高组织出汁率具有良好的功效。超声波通过机械效应和空化作用提高细胞破碎率, 使得 SOD 蛋白从细胞中游离出来。另一方面, 通过超声波处理, 由仙人掌多糖高度吸水所致的高度黏稠性也在超声波作用下得以破坏, 使得 SOD 蛋白的溶解及其杂质的分离效率提高。

2.2 超声波处理条件的优化结果

仙人掌浆液经不同功率和时间的超声波处理, 按 L₉(3⁴) 正交表设计和处理, 然后 10000r/min 离心 15min, 测定上清液 SOD 活性。超声波处理的结果见表 2。

表 2 超声波处理条件正交实验结果

实验号	A 功率 (W)	B 温度 (℃)	C 时间 (min)	SOD (U/mL)
1	1(300)	1(20)	1(10)	174.10
2	1	2(40)	2(20)	184.22
3	1	3(60)	3(30)	177.64
4	2(600)	1	3	206.49
5	2	2	2	215.60
6	2	3	1	203.96
7	3(900)	1	2	200.92
8	3	2	1	185.74
9	3	3	3	191.30
K ₁	535.96	581.51	563.80	
K ₂	626.50	585.56	600.74	
K ₃	572.40	572.90	575.43	
R	90.54	12.66	36.94	

由表 2 可以看出, 超声波功率 600W、温度 40℃ 与时间 20min 的组合, 所得 SOD 活力最高, 达到 215.6U/mL。其中, 不同超声波功率处理的极差最大, 不同温度的极差最小, 三个因素对 SOD 活性的极差顺序为功率 > 时间 > 温度。说明超声波功率对提高 SOD 提取率和 SOD 活性影响最大。适合的超声波功率可以提高 SOD 活性得率, 但过高的功率和过长的处理时间都可能使 SOD 活性受到破坏。

2.3 硫酸铵梯度盐析结果

为了探明硫酸铵使 SOD 蛋白沉淀的准确浓度, 以不同饱和度硫酸铵分别处理 SOD 粗酶液, 使样液中硫酸铵饱和度分别为 20%、30%、40%、50%、90%, 测得上清液和沉淀的 SOD 活性随饱和度变化的趋势如图 1。

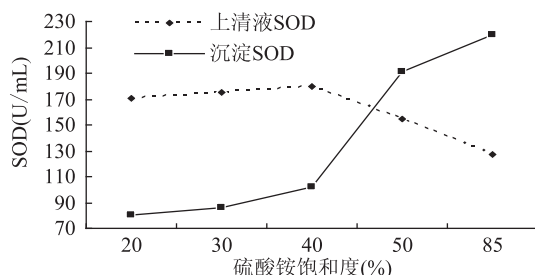


图 1 硫酸铵饱和度与 SOD 活性的关系

从图 1 可以看出, 在 20%~40% 硫酸铵饱和度范围, 沉淀中 SOD 活性缓慢增加; 饱和度达到 40% 以上, 随着饱和度提高, 沉淀中 SOD 活性快速增加, 而上清液中 SOD 活性迅速下降。硫酸铵饱和度增加到 85%, 上清液中仍然有较高的 SOD 活性, 进一步提高硫酸铵饱和度会出现硫酸铵结晶, 说明在这种粗提液中 85% 饱和度已是硫酸铵的最大溶解度。沉淀中 SOD 活性检测结果, 尽管是随着饱和度提高, 沉淀 SOD 活性提高, 但 20% 硫酸铵饱和度的沉淀仍有少量的 SOD 活性。由此说明, 采用分段盐析法, 低饱和度盐溶液在去除杂蛋白的同时也可能去除部分 SOD 蛋白, 而完全饱和的硫酸铵也不能将 SOD 蛋白全部沉淀。硫酸铵盐析法分离 SOD 难以达到全部回收。

2.4 Sephadex G-100 层析结果

收集硫酸铵饱和度在 40% 以上, 85% 以下的盐析沉淀, 以 pH7.8 磷酸盐缓冲液溶解, 经 Sephadex G-100 柱层析纯化, 以 pH7.8 磷酸盐为缓冲液洗脱, 每管收集 4mL 洗脱液, 测得 OD₂₈₀ 洗脱曲线如图 2。

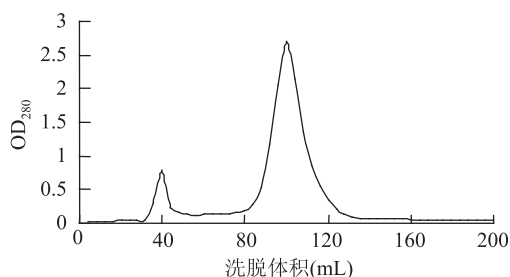


图 2 Sephadex G-100 柱层析洗脱曲线

仙人掌硫酸铵盐析后收集的 SOD 粗酶液经 Sephadex G-100 层析柱分离, 得到了 2 个蛋白质峰, 分别在洗脱体积 36、100mL 处, 其中第 2 个峰的峰高

和峰面积显著高于第1峰。根据 OD₂₈₀ 吸收曲线,测定了两个吸收峰面积内各点的 SOD 酶活性,结果只有第二个吸收峰内有 SOD 活性峰,峰值在洗脱体积为 112mL 处(图3),SOD 活性峰滞后于蛋白洗脱峰。许平采用 Sephadex G-100 分离芦荟 SOD,得到的蛋白质峰与 SOD 活性峰重叠。而本实验的蛋白质峰与酶活性峰不能重合,说明仙人掌粗酶液中存在与 SOD 蛋白分子量相近的杂蛋白,还需要通过其它方式进一步纯化 SOD。

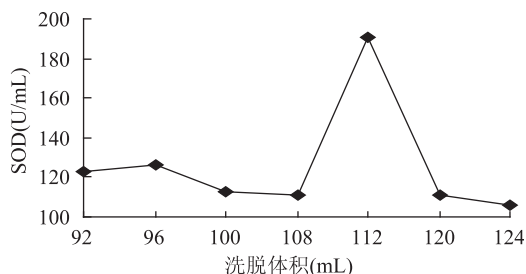


图3 Sephadex G-100 柱层析洗脱液中 SOD 活性曲线

3 结论

3.1 仙人掌浆液经超声波 600W、40℃,处理 20min,

(上接第 189 页)

进行了分析。实验结果表明,模型拟合程度高,实验误差小。乙醇浓度 45% 下优化的提取工艺参数为:提取时间 35.3min、液料比 64.6mL/g、提取温度 52.3℃、pH4.7。在此条件下,荷叶多酚得率可达 19.83mg/g·干粉。荷叶多酚提取物清除 DPPH· 的 IC₅₀ 为 125 μg/mL。

参考文献

- [1] Lin T C, Hsu F L, Cheng J T. Antihypertensive activity of corilagin and chebulinic acid, tannins from *Lumnitzera racemosa* [J]. Journal of Natural Product, 1993, 56: 629-632.
- [2] Yoshiki K, Nonaka G, Nishioka I, et al. Antitumor agents, 129 tannins and related compounds as selective cytotoxic agents [J]. Journal of Natural Product, 1992, 55: 1033-1043.
- [3] 齐典金, 哲雄. 植物多酚在保健食品方面的应用 [J]. 黑龙江医药, 2006, 19(2): 120-128.
- [4] Ruf J C. Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis [J]. Drugs Under Experimental and Clinical Research, 1999, 25(2-3): 125-131.
- [5] Hertog M G L, Feskens E J M, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk [J]. The Lancet, 1997, 3(8): 699-706.
- [6] 李志诚, 左春旭, 杨尚军, 等. 荷叶化学成分的研究 [J]. 中草药, 1996, 27 (supple): 50-53.
- [7] 王玲玲, 刘斌, 石任兵. 荷叶的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21: 416-419.
- [8] Box G P, Behnken D W. Some new three level design for the study of quantitative variables [J]. Technometrics, 1960 (2): 456-475.
- [9] Maria Leonora Lotis D, Francisco A V A. Total phenolics and

可以提高 SOD 提取率。

3.2 40% 和 85% 硫酸铵饱和度分别用于除杂质和沉淀 SOD 目标蛋白,有一定的纯化效果。

3.3 硫酸铵盐析后收集的 SOD 粗酶液,在 Sephadex G-100 凝胶层析柱中可以得到进一步纯化,SOD 酶活性存在于最大洗脱峰中。

参考文献

- [1] 路新国, 居玲玲. 仙人掌营养保健作用的研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2005(12): 45-47.
- [2] 崔美芝, 刘浩, 李春艳. 仙人掌粉延缓衰老的实验研究 [J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(11): 23-25.
- [3] 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.
- [4] 杨洋, 任红, 肖克宁, 等. 仙人掌超氧化物歧化酶的制备研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(11): 133-136.
- [5] 冯艳伟, 于琳琳, 艾勇. 超声波破碎在植物 SOD 提取中的应用 [J]. 大连民族学院学报, 2005, 17(1): 5.
- [6] 许平. 芦荟超氧化物歧化酶 (SOD) 的分离纯化研究 [J]. 重庆工商大学学报: 自然科学版, 2007, 24(1): 22-25.
- antioxidant capacity of heat-treated peanut skins [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22: 16-24.
- [10] 刘嵩. 荷叶黄酮提取工艺及其药理作用的研究 [D]. 中国科学院, 2006.
- [11] Dorman H J D, Kosar M, Kahlos K, et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* Species, hybrids, varieties and cultivars [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(16): 4563-4569.
- [12] 彭长连, 陈少薇, 林植芳, 等. 用清除有机自由基 DPPH· 法评价植物抗氧化能力 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 658-661.
- [13] 韩丙军, 彭黎旭. 植物多酚提取技术及其应用开发现状 [J]. 华南热带农业大学学报, 2005, 11(1): 21-25.
- [14] Karl J S. Nature of polyphenol-protein interaction [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44: 80-85.
- [15] 冯丽, 宋曙辉, 赵霖, 等. 植物多酚种类及其生理功能的研究进展 [J]. 江西农业学报, 2007, 19(10): 105-107.
- [16] 赵谋明, 刘晓丽, 崔春, 等. 余甘子多酚响应面法优化提取及其抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(6): 117-121.
- [17] 胡军. 莲藕中多酚氧化酶的特性及莲藕的护色 [J]. 食品与发酵工业, 1989(3): 47-51.
- [18] Shoji T. Polyphenols as natural pigments: changes during food processing [J]. American Journal of Food Technology, 2007, 2(7): 570-581.
- [19] 黄娟, 李沛生, 吴青. 几种农业和食品工业副产物中植物多酚的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(12): 177-181.
- [20] 许中鸿, 杭湖. 溶剂及 pH 对 1,1-二苯基-2-苦肼基自由基分析法的影响 [J]. 分析测试学报, 2000, 19(3): 50-52.