

玉米酒精发酵前提取超氧化物歧化酶的研究

赵 华, 陶 静

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300222)

摘 要: 该文研究了在不影响玉米制取燃料酒精的情况下, 先从玉米中提取超氧化物歧化酶(SOD)的工艺, 从而提高了玉米综合利用的价值。试验表明: 提取 SOD 时玉米浸泡的最佳条件为添加玉米质量 2 倍的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.8), 在 40℃ 浸泡 36 h。SOD 提取浸提工艺采用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.8), 以液料比 2:1(v/m)加入, 粉碎, 浸提 1 h。浸提液离心后添加硫酸铵至 40% 饱和浓度去除杂蛋白, 再添加硫酸铵至 90% 饱和浓度盐析, 得到 SOD 粗酶制剂, 比活为 168.3 U/mg。

关键词: 超氧化物歧化酶; 提取; 玉米; 酒精发酵

中图分类号: Q554.6; S513

文献标识码: B

文章编号: 1002-6819(2005)06-0176-04

赵 华, 陶 静 玉米酒精发酵前提取超氧化物歧化酶的研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(6): 176-179

Zhao Hua, Tao Jing. Extraction of superoxide dismutase from maize before ethanol fermentation processing [J]. Transactions of the CSAE, 2005, 21(6): 176-179. (in Chinese with English abstract)

0 引言

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD; EC1.15.1.1)广泛存在于细菌、原生动植物、藻类、霉菌、植物、昆虫、鸟类、鱼类和哺乳动物等各种生物体内, 是细胞内催化超氧化物阴离子(O₂⁻)歧化反应的金属酶类, 能使 O₂⁻ 转化为 H₂O₂ 和 O₂²⁻[1], 对机体具有显著保护作用。因此, SOD 在保健品、医药、食品和化妆品行业中有较高的应用价值[2], 具有抗衰老、治疗炎症和氧中毒以及防治自身免疫疾病的功能[3,4]。

目前, SOD 制品主要是从动物血液或肝脏中获得[5], 但是由于受到资源和安全性的限制, 人们正逐渐转向通过微生物发酵[6]和从植物的茎(如芦荟)、叶(如韭菜)和种子(如大蒜)中提取[7-9]。玉米作为三大粮食作物之一, 主要被用来作为饲料, 生产淀粉和淀粉衍生物及燃料酒精, 产量大且较其它植物易于保存。由于燃料酒精生产成本大部分来源于原料玉米中[10], 玉米酒精发酵前提取 SOD, 可有效抵消燃料酒精的生产成本。本研究主要探讨采用磷酸盐缓冲液浸泡玉米诱导产生 SOD, 既不影响玉米淀粉酒精产率, 又避免了玉米发芽等复杂工艺条件[11], 其 SOD 提取工艺具有操作简单、易于工业化生产等特点, 对降低以玉米为原料生产燃料酒精的成本, 提高玉米综合利用率具有重要意义。

1 材料与试验方法

1.1 材料与试剂

玉米, 购自天津市场。
邻苯三酚(Pyrogallol)(P2923, Sigma 公司); 牛血清蛋白(BSA)(A2153, Sigma 公司); 超氧化物歧化酶(SOD)(S2515 3000U, Sigma 公司); 硫酸铵(分析纯, 天津天大化工试验厂); 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(分析纯, 天津市化学试剂六厂)。

1.2 主要仪器与设备

多功能食物搅拌机(SS230-A, 顺德市容桂区家成电器厂); 低速离心机(LD-10, 北京医用离心机厂); 紫外可见分光光度计(SP-2102UV 型, 上海光谱仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 SOD 提取工艺

收稿日期: 2004-07-22 修订日期: 2005-03-29

作者简介: 赵 华(1963-), 男, 天津人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事微生物发酵。天津 天津科技大学生物工程学院, 300222。

Email: hzhaotj@163.com

称取 100 g 玉米, 加入 pH 7.8 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液浸泡后粉碎打浆, 经浸提、过滤、离心得到上清液; 加入 (NH₄)₂SO₄ 至饱和浓度 40% 除杂蛋白, 静置后离心, 取上清液, 再加入 (NH₄)₂SO₄ 至饱和浓度 90% 盐析, 离心取沉淀, 冷冻干燥即得到 SOD 粗酶制剂。

1.3.2 SOD 酶活力的测定

SOD 的酶活力测定采用改进邻苯三酚自氧化法[12,13]。以 1 mL 反应液中每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 时的酶量作为一个酶活力单位(U); 以每毫克蛋白所含酶活力单位为酶的比活(U/mg)。

1.3.3 蛋白质含量的测定

Folin-酚试剂法[14]。

1.3.4 酒精发酵试验

酒精发酵试验参照参考文献[15]。

2 结果与分析

2.1 玉米 SOD 提取浸泡条件的选择

浸泡玉米可以诱导玉米产生 SOD, 是玉米 SOD 提取过程中十分关键的因素。选择 pH 7.8 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液[16], 按照试验设计浸泡玉米, 并添加玉米质量 2 倍的相同缓冲液粉碎玉米, 浸提 1 h 后离心, 分别测定各上清液 SOD 总酶活, 结果见表 1。

表 1 响应面试验设计与结果

Table 1 Experimental design and results of response surface

序号	X ₁ 浸泡时间/h	X ₂ 浸泡温度/℃	X ₃ 液料(v/m)	Y 总酶活/U
1	24	30	2	11513
2	24	50	2	1688
3	48	30	2	10513
4	48	50	2	1453
5	36	30	1	25364
6	36	50	3	20632
7	36	50	1	1658
8	36	50	3	1463
9	24	40	1	17241
10	48	40	1	14414
11	24	40	3	10099
12	48	40	3	8443
13	36	40	2	37155
14	36	40	2	37155
15	36	40	2	37155

根据表 1 试验结果,用 SAS 软件进行回归分析,结果显示提取 SOD 总酶活与浸泡工艺各参数的回归方程为:

$$Y = 37155 - 714.75X_1 - 7720X_2 - 2255X_3 - 15296.63X_1^2 - 15566.63X_2^2 - 9309.125X_3^2 + 191.25X_1X_2 + 292.75X_1X_3 + 1134.25X_2X_3$$

由标准方差分析可知,此模型的多重相关系数 R 为 0.9821, $R^2 = 0.9646$, P 值为 0.003539 (< 0.01)。说明浸泡玉米条件对

SOD 提取影响很显著,所得模型与试验结果的重合度为 96.46% [17]。同时得到校正 R^2 为 0.9059,因此,运用此模型考察浸泡玉米各工艺参数对提取 SOD 的影响是可信的。

以提取玉米 SOD 总酶活为响应值,三个工艺参数两两组合,得到玉米 SOD 提取浸泡条件的等高线图(图 1)和响应面图(图 2)。

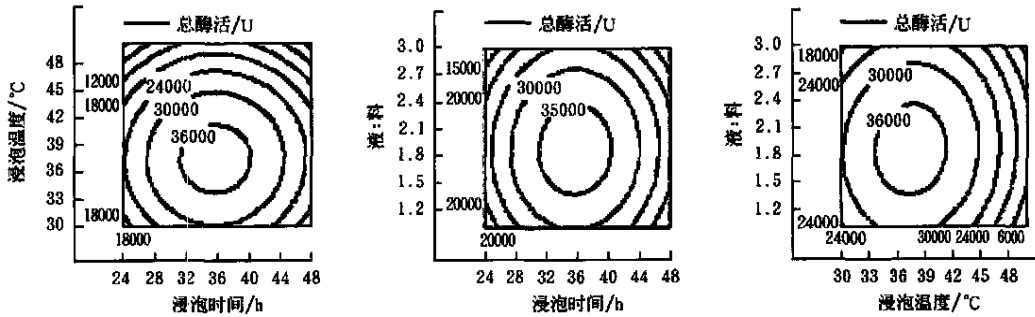


图 1 玉米浸泡条件的等高线图

Fig 1 Contour plots of the steeping conditions for maize

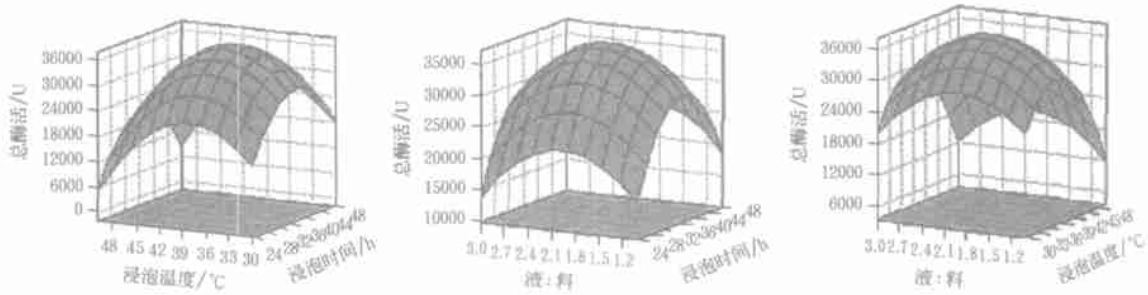


图 2 玉米浸泡条件的响应面分析图

Fig 2 Response surface plots of steeping conditions for maize

由图 1 可知,提取玉米 SOD 时,其总酶活沿着等高线由外向里逐渐增加,且变化趋势较均匀。由图 2 可知,其响应面曲面弧度较大,且结果在很大范围内变化 [18],由此可知,浸泡工艺的参数任意固定一个后,其余两个参数对提取 SOD 酶活都有较大的影响。浸泡玉米最佳工艺条件由 SAS 软件根据所得回归方程给出,即浸泡时间 36 h,浸泡温度 40 °C,液料比 2 : 1。根据试验结果,在此条件下提取得到的 SOD 总酶活最高,为 37155 U/(100 g) 玉米,且符合等高线图和响应面分析图的趋势,因此,确定此条件为最佳浸泡条件。

2.2 玉米 SOD 浸提条件的确定

2.2.1 浸提液浓度对玉米 SOD 提取的影响

玉米 SOD 在中性偏碱的溶液中较稳定,浸提时为了充分将 SOD 从玉米中溶解出,同时又保持 SOD 的活性,选择 pH 7.8 磷酸盐缓冲液为浸提液。将用磷酸盐缓冲液在 40 °C 浸泡 36 h 的玉米湿法粉碎后,采用液料比为 2 : 1 的 pH 7.8 磷酸盐缓冲液浸提 1 h 后离心,测定上清液中的 SOD 酶活,结果见图 3。

由图 3 可知,随着磷酸盐缓冲液浓度的增加,提取 SOD 酶活逐渐降低,且从 0.05 mol/L 到 0.1 mol/L 下降速度较快,而从 0.1 mol/L 到 0.2 mol/L 下降的较慢。由此可知,低浓度的磷酸盐缓冲液有利于 SOD 的浸提。但当磷酸盐缓冲液浓度低于 0.05 mol/L,则不利于维持浸提液的 pH 值。因此,确定加入磷酸盐缓冲液的最佳浓度为 0.05 mol/L。

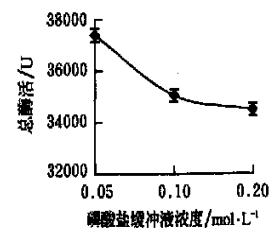


图 3 磷酸盐缓冲液浓度对玉米 SOD 提取的影响

Fig 3 Effect of the concentration of phosphate buffer on extraction of superoxide dismutase (SOD) from maize

2.2.2 浸提液添加量对玉米 SOD 提取的影响

浸提液添加量会影响提取玉米 SOD 酶活,试验按不同液料比添加 pH 7.8 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液,分别浸提 1 h 后离心,测定上清液中的 SOD 酶活,考察浸提液添加量对玉米 SOD 提取的影响,结果见图 4。

由图 4 可知,浸提时当磷酸盐缓冲液添加量与玉米的液料比 (v/m) 为 2 时,提取得到玉米 SOD 酶活最高,达到 37800 U/(100 g) 玉米。当磷酸盐缓冲液添加量与玉米的液料比为 1.5 时,提取得到 SOD 的总酶活明显低于液料比为 2 时的总酶活,可见此时的 SOD 提取率较低,SOD 无法充分溶解在溶液中。当磷酸盐缓冲液添加量与玉米的液料比为 3 时,溶液中 SOD 的浓度

较低,缓冲液中磷酸盐含量增多,磷酸盐对SOD活性的影响不断增加,所以总酶活又开始降低。因此,磷酸盐缓冲液添加量与玉米的最佳液料比(v/m)为2。

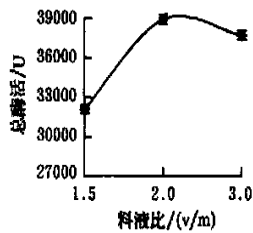


图4 磷酸盐缓冲液添加量对玉米SOD提取的影响

Fig 4 Effect of the volume of phosphate buffer on extraction of SOD from maize

2.2.3 浸提时间对玉米SOD提取的影响

SOD酶活易受氧的影响,因此,浸提时间不宜过长,但浸提时间太短又不利于玉米SOD渗透到磷酸盐缓冲液中。因此,采用液料比为2:1, pH 7.8的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液,分别浸提不同时间,考察浸提时间对玉米SOD提取的影响,结果见图5。

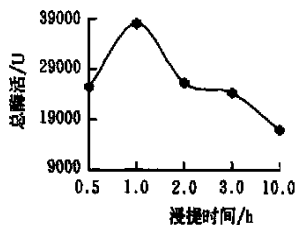


图5 浸提时间对SOD提取的影响

Fig 5 Effect of the extracting time on extraction of SOD from maize

由图5可知,随着浸提时间的延长,提取得到玉米SOD的酶活先上升,1h时其SOD酶活达到最高值,为38078.4 U/(100g)玉米,随后开始不断下降,且从1h到2h酶活降低速度较快。可见,SOD作为一种具有抗氧化作用的酶,在空气中暴露时间不宜过长。长时间将其暴露在空气中,SOD会与空气中的氧反应,降低SOD的回收率。因此,确定玉米浸提的最佳时间为1h。

2.3 玉米SOD提取对酒精发酵的影响

将提取SOD后玉米渣,平均分两份,按照1:3~4加入70%水和0.01 mL耐高温淀粉酶(30000 U/mL)90~95℃液化90 min,冷却到60℃加入150 U/g原料的糖化酶保温45 min,然后冷却至32℃,按0.08%加入酒精活性干酵母保温培养12 h后将温度提高至37℃,继续发酵60 h,最后采用蒸馏法测定发酵醪液中的酒精浓度,换算成95%(v/v)酒精的淀粉出酒率为53.51%,与对照试验的53.56%基本一致。由此可知,在酒精发酵前提取玉米SOD是可行的。

2.4 玉米SOD粗酶制剂的制备

酶制剂的制备常采用硫酸铵盐析法。先用低饱和浓度的硫酸铵溶液,除去粗酶液中的杂蛋白,再添加至高饱和浓度的硫酸铵溶液,使SOD沉淀^[19]。按照25%时硫酸铵溶液饱和浓度添加量,分别测定室温下放置6h后,离心得上清液及沉淀的SOD比活,考察添加硫酸铵对除杂蛋白及盐析效果的影响,结果见图6和图7。

由图6可知,采用40%饱和浓度硫酸铵溶液除杂蛋白效果最好。硫酸铵溶液饱和浓度低于40%时,沉淀的杂蛋白较少,因此得到的SOD比活较低;而当硫酸铵溶液饱和浓度高于40%时,不仅将大部分杂蛋白去除,而且会造成部分SOD的沉淀,

SOD比活也降低。由图7可知,再添加硫酸铵至硫酸铵溶液饱和浓度达到90%时,盐析得到的SOD比活最高,为168.3 U/mg,此时其回收率达到55.7%,纯化倍数达到6.4。而添加硫酸铵较少时,SOD沉淀不完全;添加量太大,又会使杂蛋白沉淀。因此,确定盐析时硫酸铵溶液的最佳饱和浓度为90%。

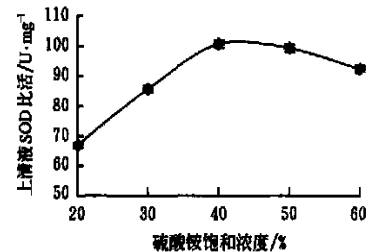


图6 硫酸铵饱和浓度对除杂蛋白效果的影响

Fig 6 Effect of the concentration of ammonium sulfate on removal of impurities

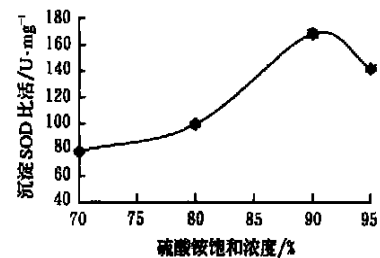


图7 硫酸铵饱和浓度对盐析效果的影响

Fig 7 Effect of the concentration of ammonium sulfate on salting out

3 结论

1) 从玉米中提取SOD,浸泡对提取SOD酶活的影响较大,运用响应面分析方法优化浸泡工艺参数,得到最佳浸泡条件为浸泡时间36h,浸泡温度40℃,液料比2:1。

2) 玉米SOD浸提条件为添加浸泡后的玉米粒2倍的0.05 mol/L的pH 7.8磷酸盐缓冲液,浸提1h离心。在上清液中加入饱和浓度40%的硫酸铵去杂蛋白,再加至饱和浓度90%,离心得沉淀,冷冻干燥,即为SOD粗酶制剂,SOD比活达到168.3 U/mg。

3) 酒精发酵前提取玉米SOD不影响玉米淀粉酒精产率。

参考文献

- [1] Bielski B H J, Aude R L, Sutherland M W. A study of the reactivity of H_2O_2/O_2 with unsaturated fatty acids [J]. *J Biol Chem*, 1983, 258: 4759-4763.
- [2] Tomasoff J M, Ono T, Cutler R G. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1980, 77: 2777-2781.
- [3] Flohe L, Gierth H, Beckman R. *Handbook of Inflammation* [M]. New York: Elsevier Science, 1985.
- [4] Oberley L W, Buettner G R. Role of superoxide dismutase in cancer: a review [J]. *Cancer Res*, 1979, 39: 1141-1149.
- [5] Raziye Öztürk Ürek, Leman Tarhan. Purification and characterization of superoxide dismutase from chicken liver [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2001, 128: 205-212.
- [6] 杨光礼, 泰克亮, 杨节非, 等. 微生物超氧化物歧化酶的分离纯化及

- 其理化性质研究[J]. 药物生物技术, 1996, 3(3): 137- 141.
- [7] 孙焕顷, 沈洪国, 黄 毅, 等. 芦荟超氧化物歧化酶同功酶的分离纯化及部分性质[J]. 西南师范大学学报, 2003, 28(5): 784- 787.
- [8] 邹国林, 翟颂华. 韭菜叶绿体超氧化物歧化酶纯化及性质研究[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20(2): 5- 8.
- [9] 谢岩黎, 李元瑞. 大蒜细胞质中超氧化物歧化酶的分离纯化[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(2): 34- 37.
- [10] Dickey L C. Corn coproduct cuts ethanol production costs[J]. Agricultural Research, 2002, (4): 20- 21.
- [11] 文才艺, 张艳红. 凝胶过滤及离子交换层析法纯化玉米 CuZn-SOD 的研究[J]. 襄樊学院学报, 2001, 22(2): 88- 92.
- [12] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 邻苯三酚氧化法测定 SOD 活性[J]. 医药工业, 1988, 19(5): 217- 219.
- [13] 邹国林, 陈东明, 程 林, 等. 超氧化物歧化酶活力测定曲线的线性研究[J]. 武汉大学学报, 1996, 42(6): 779- 782.
- [14] Lowry D H. Protein measurement with Folin Phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265- 275.
- [15] 肖冬光, 赵 华, 赵树欣, 等. 酒用酸性蛋白酶在酒精生产中应用技术的研究[J]. 酿酒科技, 2000, (2): 35- 38.
- [16] 任大明, 迟乃玉, 刘少霞. 玉米超氧化物歧化酶(SOD)同功酶研究[J]. 玉米科学, 2001, 9(1): 78- 79.
- [17] Myers R H, Montgomery D C. Response Surface Methodology [M]. New York: John Wiley and Sons, 1995.
- [18] Jayati Ray Dutta, Pranab Kumar Dutta, Rintu Banerjee. Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models [J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 2193- 2198.
- [19] Helga Schinkel, Steffen Streller, Gunnar Wingsle. Multiple forms of extracellular superoxide dismutase in needles stem tissues and seedlings of Scots pine [J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49: 931- 936.

Extraction of superoxide dismutase from maize before ethanol fermentation processing

Zhao Hua, Tao Jing

(College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract In order to improve the value of the multiple use, the processes of extracting superoxide dismutase (SOD) from maize without affecting ethanol fermentation were studied. The results showed the optimum conditions for steeping maize were as follows: 0.05 mol/L phosphate buffer (pH 7.8) added with 2:1 solvent-to-solid ratio (v/m), temperature 40 °C, time 36 h. The best technological parameters of SOD extraction were adding 2:1 solvent-to-solid ratio 0.05 mol/L phosphate buffer (pH 7.8), extracting for 1 h. Then 40% and 90% of saturated ammonium sulfate were added to remove impurities and cause SOD to precipitate, respectively. Eventually, the crude SOD was obtained, whose specific activity reached 168.3 U/mg.

Key words: superoxide dismutase; extraction; maize; ethanol fermentation