

Research of Determination Conditions and Enzyme Stability of *Arthrospira* SOD*

Yulan Bao¹, Shuyuan Li^{1,2}, Chen Qiao^{1,3}

¹Inner Mongolia Ordos Xinyuli *Spirulina* Industry Group, Ordos

²Inner Mongolia Normal University, Hohot

³Inner Mongolia Kasetsart University, Hohot

Email: bapyulan.happy@163.com

Received: Nov. 11th, 2011; revised: Dec. 3rd, 2011; accepted: Dec. 21st, 2011

Abstract: To obtain the basic data of extracting and purifying the SOD enzyme preparation from *Arthrospira*, the determination conditions and enzyme stability of *Arthrospira* SOD in alkaline lake in Erdos plateau were studied by the method of pyrogallol auto-oxidation. The results showed that SOD met its ultimate absorption at 320 nm in UV area. The optimum pH in Tris-HCl buffer was 8.2 and its optimum temperature is 25°C. This enzyme remained stable in the range of pH = 6 - 10. Its activity began to fall over 40°C when the enzyme was preserved at different temperature for 20 min, and to fall over 35°C for 60 min. Enzyme activity began to decline after 2 days and almost nothing at the seventh day at room temperature in light. Its activity lost absolutely at the ninth day when the enzyme was stored at room temperature without light.

Keywords: *Arthrospira*; SOD; Pyrogallol Auto-Oxidation; Determination Conditions; Enzymes Stability

钝顶节旋藻 SOD 活性测定条件及稳定性的研究*

包玉兰¹, 栗淑媛^{1,2}, 乔辰^{1,3}

¹鄂尔多斯市新宇力藻业集团有限公司, 鄂尔多斯

²内蒙古师范大学, 呼和浩特

³内蒙古农业大学, 呼和浩特

Email: baoyulan.happy@163.com

收稿日期: 2011 年 11 月 11 日; 修回日期: 2011 年 12 月 3 日; 录用日期: 2011 年 12 月 21 日

摘要: 采用邻苯三酚自氧化法研究了鄂尔多斯高原碱湖钝顶节旋藻 SOD 活性的测定条件以及酶的稳定性, 为进一步从钝顶节旋藻中提取、纯化 SOD 酶制剂提供可参考的基础数据。结果显示, SOD 在紫外光区 320 nm 处有最大吸收值; 在 Tris-HCl 缓冲溶液中最适 pH 值为 8.2, 最适温度为 25°C。该酶的 pH 值稳定性范围为 6~10; 在不同温度下保温 20 min 时, 高于 40°C 时酶活性开始下降, 保温 60 min 时, 高于 35°C 时酶活性开始下降; 室温下存放 2 d 后活性开始下降, 7 d 时活性基本丧失; 室温下避光保存 9 d 时 SOD 活性完全丧失。

关键词: 钝顶节旋藻; 超氧化物歧化酶(SOD); 邻苯三酚自氧化法; 测定条件; 酶稳定性

1. 引言

钝顶节旋藻(*Arthrospira plaensist*)是一种光合自养的原核生物, 属于蓝藻门(Cyanopyta)、颤藻科

(Oscillatoriaceae)、节旋藻属(*Arthrospira*)^[1], 习惯上又被称作钝顶螺旋藻。1996 年内蒙古农业大学螺旋藻课题组首次在鄂尔多斯高原碱湖发现了天然生长的钝顶节旋藻, 其形成的水华完全能够被螺旋藻产业利用, 打破了我国螺旋藻养殖业一直使用引进藻种的历

*基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30460104)。

史。节旋藻含有藻多糖、藻蓝蛋白、 γ -亚麻酸、胡萝卜素、多种氨基酸、超氧化物歧化酶等多种生理活性物质,因而被世界卫生组织和联合国粮农组织称为“21世纪人类最佳保健品和最理想的食物”^[2]。

生物体代谢活动中会产生活性氧,活性氧过多的累积会引起人体包括癌症等许多疾病,正常情况下,人体内活性氧的产生和清除处于一种动态平衡,SOD是生物体内抗氧化系统的重要酶。该酶可以清除体内多余的超氧阴离子,具有抗辐射、抗衰老以及防治肿瘤和抗炎等药用功效^[3]。钝顶节旋藻细胞内的Fe-SOD活性高,其良好的开发应用前景激发了人们广泛的研究热情。测定SOD活性的方法很多,目前邻苯三酚自氧化法因仪器简单、操作简便被广泛应用,但其测定条件对测定结果影响很大。本文采用邻苯三酚自氧化法不仅测定了鄂尔多斯高原碱湖钝顶节旋藻粗酶液SOD的活性,并对其测定条件进行了摸索,建立了稳定的测定系统,同时对该酶的稳定性进行了研究,以期进一步对鄂尔多斯高原碱湖钝顶节旋藻SOD的开发利用提供可参考的基础数据。

2. 实验材料与方法

2.1. 材料

实验材料为钝顶节旋藻,从鄂尔多斯高原察汗淖尔碱湖中采集,经分离纯化后用Zarrouk培养液于室温下每间隔1h通空气15min进行培养,于对数生长期取材。

2.2. 方法

2.2.1. SOD粗酶液的制备

捞取新鲜节旋藻样品,用蒸馏水冲洗数次,滤纸吸取多余水分。按每克鲜藻加入50mmol/L、pH 7.8磷酸缓冲溶液4mL,在冰浴中超声波破碎,破碎条件为功率60w,超声1s,间隔2s,共超声15min。再将破碎液在4℃、10000×g下离心20min,取上清液备用。

2.2.2. 邻苯三酚自氧化速率的测定

按李永利等^[4]的方法测定邻苯三酚自氧化速率,略有改动。在试管中加入25℃保温20min的Tris-HCl缓冲液(45mmol/L、pH 8.2)4.5mL,再加25℃预热过的0.01mL邻苯三酚溶液,迅速摇匀倒入比色皿中,

空白对照用0.01mL、10mmol/L HCl代替邻苯三酚,用岛津UV-1800紫外可见分光光度计在320nm波长处每隔0.5min测一次A值,连续测定4min。

波长选择:用分光光度计对邻苯三酚自氧化反应在2min、4min、6min、8min、10min时的初始中间产物进行波长扫描,确定吸收峰。

浓度选择:通过控制加样量使反应体系的邻苯三酚溶液终浓度达到0.05mmol/L、0.10mmol/L、0.15mmol/L、0.20mmol/L、0.25mmol/L、0.30mmol/L、0.35mmol/L、0.40mmol/L、0.45mmol/L、0.50mmol/L、0.55mmol/L、0.60mmol/L、0.65mmol/L、0.70mmol/L、0.75mmol/L、0.80mmol/L,测其自氧化速率与时间的线性关系。

2.2.3. 酶活性的测定

按邻苯三酚自氧化速率测定方法测定酶活性。先加入0.01mL粗酶液,再加0.01mL预热过的邻苯三酚溶液,空白对照用蒸馏水代替粗酶液,在320nm处测A值,共测定4min。酶活力单位定义为:1mL反应液中1min抑制邻苯三酚自氧化速率达50%时的酶量为一个活力单位(U)。单位体积中的酶活力(U/mL)按下式计算:

$$\text{单位体积活力} = \frac{A_{320\text{nm}}/\text{min} - B_{320\text{nm}}/\text{min}}{A_{320\text{nm}}/\text{min}} \div 50\% \\ \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{酶样液稀释倍数}}{\text{酶样液体积}}$$

($A_{320\text{nm}}/\text{min}$ 为邻苯三酚自氧化速率, $B_{320\text{nm}}/\text{min}$ 为SOD抑制下的邻苯三酚自氧化速率,邻苯三酚自氧化速率需控制在0.07OD/min左右)。

2.2.4. 酶的动力学研究

2.2.4.1. 温度对酶活性的影响及其热稳定性研究

在0℃~70℃范围内(间隔5℃),于不同温度下分别测定SOD活性,观察温度对酶的影响,确定酶的最适温度。

将酶液在0℃~70℃(间隔5℃)范围内分别保温20min和60min,再在最适温度下测其活性,确定酶的热稳定性,每项测定至少重复3次。

2.2.4.2. pH对酶活性的影响及其稳定性

在pH 6.8、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0的磷酸盐-Tris-HCl缓冲液中分别测定

SOD 活性, 观察 pH 对酶的影响, 确定其最适 pH。

酶液分别在 pH 3、pH 4、pH 5、pH 6、pH 7、pH 8、pH 9、pH 10、pH 11 的柠檬酸 - 磷酸二氢钾 - 巴比妥缓冲液^[5]中保温 1 h, 然后在 25℃ 下测定其酶活性, 确定酶的 pH 稳定性, 每项测定至少重复 3 次。

2.2.4.3. 酶的时间稳定性

将酶液分别放置在室温、自然光照下和室温、避光条件下保存, 每天定时在 25℃, pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲体系测其活力, 每项测定至少重复 3 次, 观察其时间稳定性。

3. 结果与分析

3.1. 邻苯三酚自氧化速率的条件

3.1.1. 波长

图 1 显示, 邻苯三酚反应初始中间产物吸收值随时间的增加而增大, 但吸收峰一直在 320 nm 处, 故测定邻苯三酚自氧化速率时波长应选择为 320 nm。

3.1.2. 邻苯三酚浓度的选择

从图 2 看出, 邻苯三酚自氧化速率随着反应体系终浓度的增加而变大, 终浓度 < 0.2 mmol/L 时, 其自氧化速率与时间呈线性关系 ($R_{0.05}^2 = 0.9979$ 、 $R_{0.10}^2 = 0.9974$ 、 $R_{0.15}^2 = 0.9950$); 终浓度 > 0.2 mmol/L 时, 其自氧化速率与时间的线性相关程度降低, 随时间的延长逐渐趋于抛物线 ($R^2 \leq 0.9937$), 且终浓度越大这种变化趋势越明显。因此, 用邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性时终浓度应不超过 0.2 mmol/L。

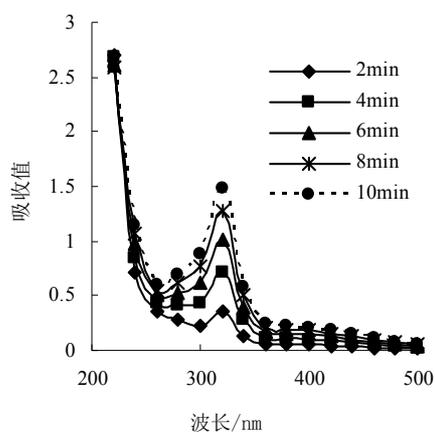


Figure 1. Scan on the wavelength of the Intermediate from the pyrogallol autoxidation
图 1. 邻苯三酚自氧化中间产物的波长扫描

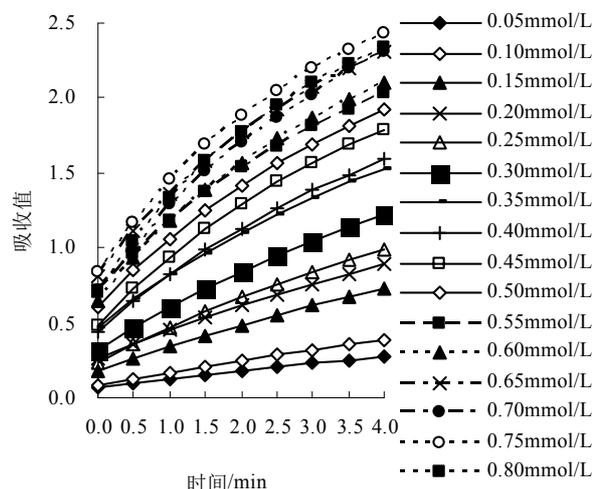


Figure 2. The pyrogallol autoxidation rate at different final concentrations
图 2. 在不同终浓度下邻苯三酚自氧化速率

3.2. SOD 动力学研究

3.2.1. 温度对 SOD 活性的影响及其热稳定性

温度对钝顶节旋藻 SOD 的影响呈钟罩形曲线(图 3A)。0℃ 时, SOD 活性维持较高水平; < 25℃ 时, SOD 活性随温度的升高而增加; > 25℃ 时, 随温度的升高 SOD 活性减小; 25℃ 时 SOD 活性达到最高, 为 162 U/mL。低于 25℃ 时 SOD 活性的变化比高于 25℃ 时 SOD 活性变化较为缓慢, 说明较高温度对 SOD 影响比较明显。

图 3B 和图 3C 呈半梯形图, 在 0~35℃ (40℃) 范围内, SOD 的活性较稳定; > 35℃ (或 40℃) 时 SOD 活性开始几乎呈线性下降, 65℃ (或 70℃) 时 SOD 活性丧失; 其中, 保温 60 min 与 20 min 相比, SOD 活性开始下降点和活性消失点均低 5℃。表明, 酶在高温水浴里保温的时间越长, SOD 稳定性越差。

3.2.2. pH 对 SOD 活性的影响及其 pH 稳定性

pH 对钝顶节旋藻 SOD 的影响曲线也呈钟罩形(图 4A)。由图可知, SOD 的活性在 Ph 8.2 时达到最大值, 缓冲溶液的 pH 值在 8.2 以下时酶的活性随着 pH 的增大而升高, 大于 8.2 时随着 pH 的增大而降低, 确定此酶的最适 pH 为 8.2。

图 4B 显示, pH 6~10 之间 SOD 活性基本稳定, pH < 6 时, 随着缓冲溶液的 pH 增大 SOD 活性逐渐增加, pH > 10 时酶活力呈线性下降, pH 13 时 SOD 活性完全丧失。

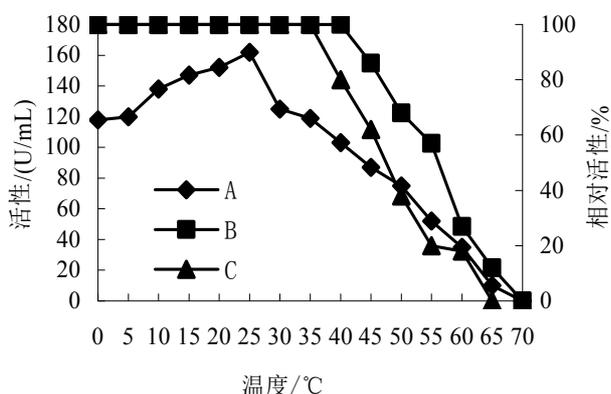


Figure 3. Effect of temperature on SOD activity and thermal stability
图 3. 温度对 SOD 活性的影响(A)及其热稳定性(B、C)曲线 B: 保温 20 min; C: 保温 60 min

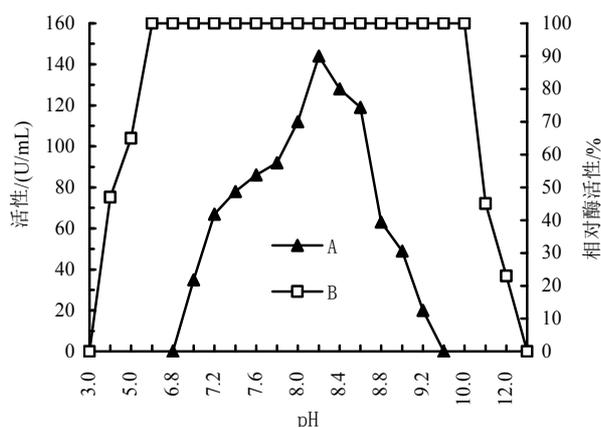


Figure 4. Effect of pH on SOD activity and pH stability
图 4. pH 对 SOD 活性的影响(A)及其 pH 稳定性(B)曲线

3.2.3. 酶的时间稳定性

图 5 显示, 钝顶节旋藻 SOD 活性的时间稳定性曲线是半梯形图, 粗酶液在室温、自然光照下放置 2 d 后 SOD 活性呈线性下降, 第 6 d 时 SOD 活性只剩 20%, 7 d 时其活性完全丧失; 而室温、避光保存时, SOD 活性 4 d 后才开始下降, 第 9 d 时 SOD 基本无活性。

4. 讨论

SOD 活性的测定是建立在邻苯三酚自氧化的基础上, 对 SOD 粗酶液性质的测定结果显示其最适温度为 25°C、最适 pH 为 8.2, 因而测定邻苯三酚自氧化速率条件选择了 25°C 和 pH 8.2, 这与多数文献^[3,4,6,7]报道的一致。但波长扫描结果显示, 邻苯三酚的最大吸收波长为 320 nm, 这与刘华等^[6]和孙雪奇等^[7]报道的测定波长一致, 比许亚娟等^[3]和李永利等^[4]报道的

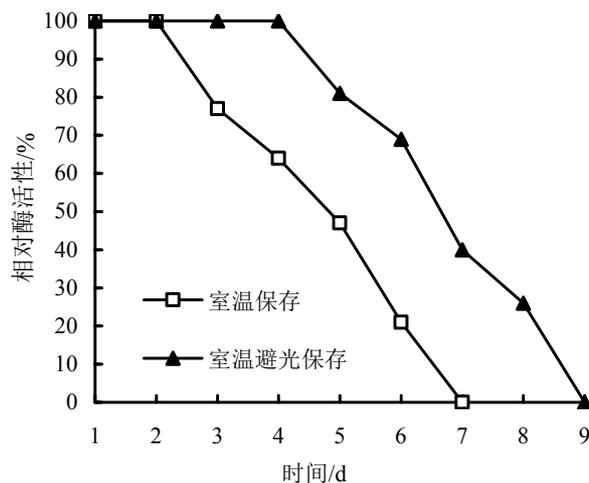


Figure 5. Time stability of SOD activity
图 5. SOD 活性的时间稳定性

测定波长 325 nm 要低, 可能和实验环境不同或与仪器的差异有关。

本文对鄂尔多斯高原碱湖钝顶节旋藻 SOD 的最适温度和 pH 值的测定与夏文超^[8]和韩文清^[9]等人对乍得湖钝顶螺旋藻(严格讲也是钝顶节旋藻)测定的结果一致, 表明这两种藻虽然原产地不同, 但毕竟属同一物种, 其 SOD 的很多性质如最适温度和 pH 是一致的。

夏文超等在测定乍得湖钝顶螺旋藻纯酶液的温度稳定性提出, 酶活性在不同温度下保温 10 min 时, 55°C 以下活性基本稳定, 温度升高至 60°C 时酶活力开始下降。本文研究结果显示, 将粗酶液在 55°C 保温 20 min 和 60 min 时 SOD 活性仅剩 57% 和 20%。分析结果不同的原因: 一是 SOD 活性除了与保温温度有关以外还与保温时间的长短有关, 在较高温度下保温的时间越长其活性消失的会越快; 其次乍得湖钝顶螺旋藻原产地属于亚热带, 其耐热性要比鄂尔多斯高原碱湖钝顶节旋藻强; 还可能与所用 SOD 样品有关, 提纯的酶液含杂质少, 热稳定性比粗酶液强。

测定 pH 对 SOD 活性影响时(图 4A), 在 pH 6.8 时, 测出的 SOD 的活性几乎为 0, 而从 SOD 的 pH 稳定性曲线(图 4B)可看出, pH 在 6~7 时 SOD 活性较高, 由此推测, pH 6.8 的偏酸环境下 SOD 仍具有活性, 只是邻苯三酚的自氧化受到影响, 导致测定结果为 0。这也与文献^[10]报道的邻苯三酚在酸性条件非常稳定这一结果相符。

鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻是纯天然耐低温、

广温型藻种^[11]，为北方节旋藻产业的发展奠定了基础，本文的实验结果为进一步分离纯化 SOD 提供了可参考的基础资料。

参考文献 (References)

- [1] B. 福迪, 罗迪安, 译. 藻类学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 24.
- [2] 商树田. 藻类新星 - 节旋藻[J]. 植物杂志, 1995, 2: 2-3.
- [3] 许雅娟, 赵艳景, 胡虹. 邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的研究[J]. 西南民族大学学报, 2006, 32(6): 1207.
- [4] 李永利, 张焱. 邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(6): 673.
- [5] 陶明焯, 吴国荣, 陆长海. 极大螺旋藻铁型超氧化物歧化酶的纯化及性质[J]. 湖泊科学, 1999, 11(1): 63-69.
- [6] 刘华, 王江, 徐向荣等. 金华养态素测定方法的研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 488-489.
- [7] 孙雪奇, 陈齐英, 别小琳. 邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性中测定波长的选择[J]. 华西药学杂志, 2004, 19(5): 404-405.
- [8] 夏文超, 李素霞, 范立强等. 钝顶螺旋藻 Fe-SOD 的纯化性质[J]. 微生物学通报, 2003, 29(1): 20-24.
- [9] 韩文清, 栗淑媛, 乔辰. 鄂尔多斯高原碱湖钝顶螺旋藻 SOD 的纯化与性质研究[J]. 内蒙古师范大学学报, 2008, 37(6): 780-784.
- [10] 宋金耀. 超氧化物歧化酶——邻苯三酚自氧化测活方法的改进[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1992, 6(2): 30-35.
- [11] 乔辰, 李博生, 曾昭琪. 鄂尔多斯高原碱湖与螺旋藻资源[J]. 干旱区资源与环境, 2001, 15(4): 86-91.