

文章编号:1001-6880(2017)8-1339-11

# 鄂尔多斯高原钝顶节旋藻 SOD 特性研究

包玉兰<sup>1,2</sup>, 敖恩宝力格<sup>1\*</sup>, 乔辰<sup>2</sup>, 巩东辉<sup>3</sup><sup>1</sup>内蒙古师范大学, 呼和浩特 010022; <sup>2</sup>鄂托克旗螺旋藻工程技术研究中心, 鄂尔多斯 016100;<sup>3</sup>内蒙古科技大学, 包头 014010

**摘要:**采用邻苯三酚自氧化法确定了鄂尔多斯高原钝顶节旋藻 SOD 特性。该 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;pH 值稳定性范围为 6~10;高于 40 °C 的条件下保温 20 min 酶活性开始下降, 高于 35 °C 条件下保温 60 min 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;超氧化物岐化酶;特性

中图分类号:Q513

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.014

## Characteristics of SOD in *Arthrosira platensis* from Erdos Plateau

BAO Yu-lan<sup>1,2</sup>, Aoenbaolige<sup>1\*</sup>, QIAO Chen<sup>2</sup>, GONG Dong-hui<sup>3</sup><sup>1</sup>Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China; <sup>2</sup>Etuoke Engineering Research Center for Spirulina, Ordos 016100, China; <sup>3</sup>Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China

**Abstract:** In this study, the pyrogallol auto-oxidation method was used to investigate the characteristics of superoxide dismutase (SOD) of *Arthrosira platensis* from the Erdos Plateau. The maximum absorption wavelength for SOD was 320 nm in the ultraviolet range. The optimal pH in a Tris-HCl buffer and the optimal temperature for SOD were 8.2 and 25 °C, respectively. The SOD activity was higher in a pH range of 6-10. Superoxide dismutase activity decreased at temperatures higher than 40 °C for more than 20 minutes and higher than 35 °C for more than 60 minutes. Similarly, SOD activity decreased at room temperature in light after a period of more than 2 days, almost not at all after seven days at room temperature in light, and exhibited absolutely no change at room temperature without light after nine days.

**Key words:** *Arthrosira platensis*; superoxide dismutase; characteristics

钝顶节旋藻(*Arthrosira platensis*)是一种光合自养的原核生物, 属于蓝藻门(*Cyanophyta*)、颤藻科(*Oscillatoriaceae*)、节旋藻属(*Arthrosira*)<sup>[1]</sup>, 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、超氧化物岐化酶(SOD)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品”<sup>[2]</sup>。

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, 为了防止氧自由基对细胞体的破坏, 几乎所有细胞都有一套完整的保护体系, SOD 具有清除细胞新陈代谢产生的各种活性氧的重要的作用<sup>[3]</sup>。该酶可以清除体内多余的超氧阴离子, 具有抗辐射、防衰老以及防治肿瘤和抗炎等药用功效<sup>[4]</sup>。钝顶节旋藻细胞内的 Fe-SOD 活性高, 其良好的开发利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。邻苯三酚自氧化过程为链式反应, 可产生超氧离子(O<sub>2</sub><sup>-·</sup>), 其自身氧化产物的含量可用分光光度仪检测, 在 pH 值 < 9.0 时, 邻苯三酚自氧化速率与生成的 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>的浓度呈正相关, 故可通过紫外可见光分光光度仪来定量测定抗氧化剂在此体系中对 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>的清除作用, 间接评价抗氧化剂的抗氧化能力<sup>[5]</sup>。本文采用邻苯三酚自氧化法测定了鄂尔多斯高原钝顶节旋藻粗酶液 SOD 的活性, 并对其适应

收稿日期:2017-03-10 接受日期:2017-06-06

基金项目:国家自然科学基金(30460104, 31660151); 内蒙古自然科学基金(MS20160334)

\*通信作者 E-mail:807534479@qq.com

性和稳定性进行了研究,以期对鄂尔多斯高原钝顶节旋藻 SOD 高效开发利用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验材料为从鄂尔多斯高原碱湖中采集的钝顶节旋藻,经分离纯化后用 Zarrouk 培养液<sup>[6]</sup>室温下进行通气培养,于对数生长期取材。

### 1.2 SOD 粗酶液的制备

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

### 1.3 邻苯三酚自氧化速率的测定

按李永利等<sup>[7]</sup>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 °C 保温 20 min 的 Tris-HCl 缓冲液(45 mmol/L、pH 8.2)4.5 mL,再加 25 °C 预热过的 0.01 mL 邻苯三酚溶液,迅速摇匀倒入比色皿中,空白对照用 0.01 mL、10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚,用岛津 UV-1800 紫外可见分光光度计在 320 nm 波长处每隔 0.5 min 测一次 A 值,连续测定 4 min。

**波长选择:**用分光光度计对邻苯三酚自氧化反应在 2、4、6、8、10 min 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 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.80 mmol/L,测其自氧化速率与时间的线性关系。

### 1.4 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 0.01 mL 粗酶液,再加 0.01 mL 预热过的邻苯三酚溶液,空白用蒸馏水代替粗酶液,在 320 nm 处测定 4 min。酶活力单位定义为:1 mL 反应液中 1 min 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)。

### 1.5 酶的动力学研究

#### 1.5.1 温度对酶活性的影响及其热稳定性研究

在 0~70 °C 范围内(间隔 5 °C),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 °C(间隔 5 °C)范围内分别保温 20 min 和 60 min,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。

#### 1.5.2 pH 对酶活性的影响及其稳定性

在 pH 6.8、pH 7.2、pH 7.4、pH 7.6、pH 7.8、pH 8.0、pH 8.2、pH 8.4、pH 8.6、pH 8.8、pH 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 3.0、pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0、pH 10.0、pH 11.0 的柠檬酸-磷酸二氢钾-巴比妥缓冲液<sup>[8]</sup>中保温 1 h,然后在 25 °C 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。

#### 1.5.3 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 °C, 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。

## 2 结果与分析

### 2.1 邻苯三酚自氧化速率的条件

#### 2.1.1 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。

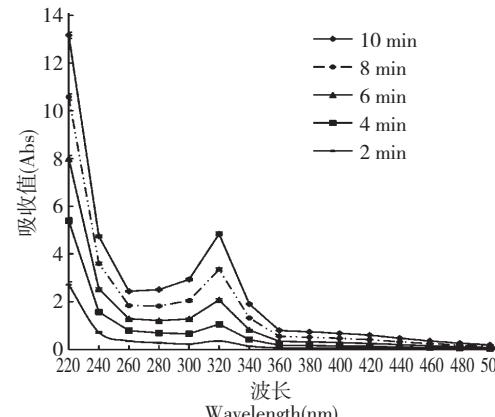


图 1 邻苯三酚自氧化中间产物的波长扫描

Fig. 1 Absorption wavelength of pyrogallol self-oxidizing intermediates

#### 2.1.2 邻苯三酚浓度选择

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  $< 0.2 \text{ mmol/L}$  时,其自氧化速率与时间呈线性关系 ( $R^2_{0.05} = 0.9979$ 、 $R^2_{0.10} = 0.9974$ 、 $R^2_{0.15} = 0.9950$ );终浓度  $> 0.2 \text{ mmol/L}$  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  $0.2 \text{ mmol/L}$ 。

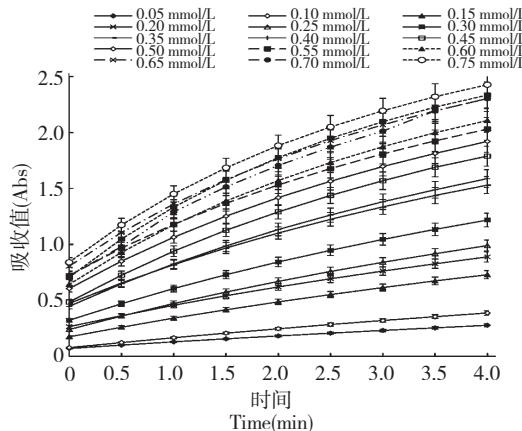


图 2 在不同终浓度下邻苯三酚自氧化速率

Fig. 2 The rate of pyrogallol autoxidation under different final concentrations

## 2.2 SOD 动力学研究

### 2.2.1 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  $162 \text{ U/mL}$ 。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  $0 \sim 35$  ℃( $40$  ℃)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  $60 \text{ min}$ (图 3C)与  $20 \text{ min}$ (图 3B)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。

### 2.2.2 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

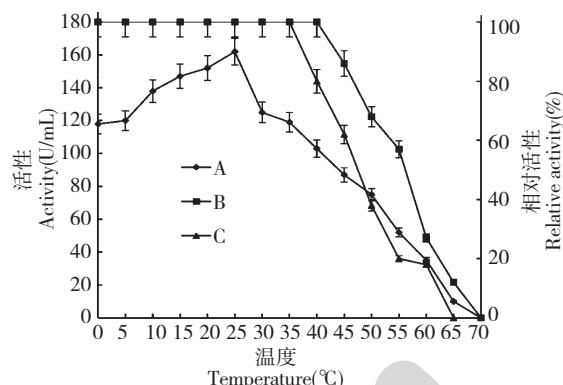


图 3 温度对 SOD 活性的影响(A)及其热稳定性(B,C)曲线

Fig. 3 Effects of temperature on SOD activity (A) and stability (B, C)

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  $6 \sim 10$  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。

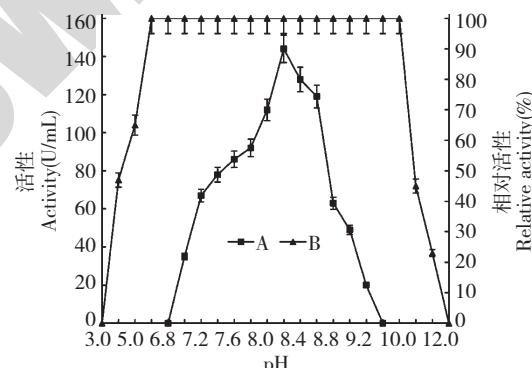


图 4 pH 对 SOD 活性的影响(A)及其 pH 稳定性(B)曲线

Fig. 4 Effects of pH on SOD activity (A) and stability (B, C)

### 2.2.3 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  $2 \text{ d}$  后 SOD 活性呈线性下降,第  $6 \text{ d}$  时 SOD 活性只剩  $20\%$ , $7 \text{ d}$  时其活性完全丧失;而室温、避光保存时,SOD 活性  $4 \text{ d}$  后才开始下降,第  $9 \text{ d}$  时 SOD 基本无活性。

## 3 讨论与结论

本研究中,鄂尔多斯钝顶节旋藻粗酶液的最适温度和最适 pH 分别为  $25$  ℃和  $8.2$ ,这与多数文献<sup>[4,7,9,10]</sup>报道的一致,因而将其作为测定邻苯三酚

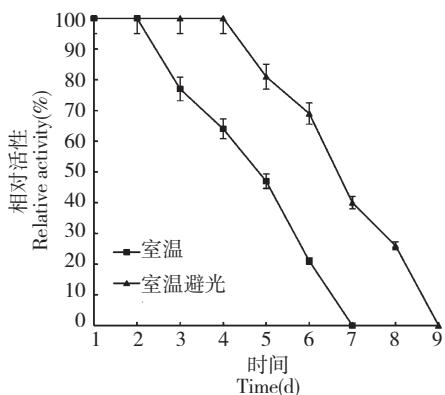


图 5 SOD 活性的时间稳定性

Fig. 5 SOD activity stability over time

自氧化速率的条件。另本研究中邻苯三酚 320 nm 的最大吸收波长,与史竞艳等<sup>[9]</sup>和孙雪奇等<sup>[10]</sup>报道的测定波长一致,比许亚娟等<sup>[4]</sup>和李永利等<sup>[7]</sup>报道的测定波长 325 nm 低,与杨明琰<sup>[11]</sup>等报道的 420 nm 差距更大,这可能和实验环境不同或与仪器的差异有关,也可能由鄂尔多斯钝顶螺旋藻 SOD 与其他物种 SOD 特性差异所致。

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<sup>[12]</sup>和韩文清<sup>[13]</sup>等人对乍得湖钝顶螺旋藻测定的结果一致,表明这两藻种虽然原产地不同,但属同一物种,其 SOD 温度和酸碱性特性趋于相近。鄂尔多斯钝顶节旋藻 pH 在 6~7 时 SOD 活性较高,这也与宋金耀等<sup>[14]</sup>报道的邻苯三酚在酸性条件非常稳定这一结果相一致。

鄂尔多斯高原碱湖钝顶节旋藻是纯天然耐低温、广温型藻种<sup>[15]</sup>,现已建立了年产 3000 吨干粉的鄂托克旗螺旋藻产业园区,开发螺旋藻 SOD 对于延伸产业链条、推进精深加工有重要意义,这些研究结果可为高效分离纯化该藻种 SOD 提供重要参考。

## 参考文献

- Fott B (福迪), Translated by Luo DA (罗迪安). *Phycology*. Shanghai: Shanghai Science Technology Press 1981:1-350.
- Shang ST(商树田). The rising star-Spirulina. *Plants* (植物杂志), 1995, 2:2-3.
- Dong L(董亮), He YZ(何永志), Wang YL(王远亮), et al. Research progress on application superoxide dismutase (SOD). *J Agric Sci Technol* (中国农业科技导报), 2013, 15 (5):53-58.
- Xu YJ(许雅娟), Zhao YJ(赵艳景), Hu H(胡虹). Research on the measurement of the SOD activity via pyrogallol auto-oxidation. *J Southwest Univ National* (西南民族大学学报), 2006, 32:1207-1209.
- Han SH(韩少华), Zhu JB(朱靖博), Wang YY(王妍妍). Measurement of the antioxidant activity by pyrogallol autoxidation. *China Brew Anal Examin* (中国酿造-分析与检测), 2009, 6:155-157.
- Pomeroy MK, Siminovitch D. Seasonal cytological changes in secondary phloem parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia* in relation to cold hardiness. *Can J Botan*, 1971, 49:787-795.
- Li YL(李永利), Zhang Y(张焱). SOD activity was determined with the method of pyrogallol autoxidation. *Chin J Health Labor Technol* (中国卫生检验杂志), 2000, 6:673.
- Tao MX(陶明煊), Wu GR(吴国荣), Lu CH(陆长海). Purification and properties of iron-containing superoxide dismutase from *Spirulina maxim*. *J Lake Sci* (湖泊科学), 1999, 11:63-69.
- Shi JY(史竞艳), Luo XR(罗辛茹), Bao JH(鲍江鸿), et al. Determination of superoxide dismutase (SOD) activity. *J Hubei Univ, Nat Sci* (湖北大学学报), 2012, 34:373-377.
- Sun XQ(孙雪奇), Chen QY(陈齐英), Bie XL(别小琳). The choice of the wavelength in determination of superoxide dismutase (SOD) activity with the method of pyrogallol autoxidation. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2004, 19:404-405.
- Yang MY(杨明琰), Zhang XQ(张晓琦), Shen J(沈俭), et al. SOD activity determination comparison between two pyrogallol autoxidation. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2006, 3: 40-42.
- Xia WC(夏文超), Li SX(李素霞), Fan LQ(范立强), et al. Purification and properties of Fe-SOD in *Spirulina platensis*. *J East China Univ Sci Technol, Nat Sci* (华东理工大学学报), 2003, 29(1):20-22.
- Han WQ(韩文清), Li SY(栗淑媛), Qiao C(乔辰). Purification and properties of SOD in *Spirulina platensis* from Ordos Plateau alkaline lake. *J Inner Mongolia Norm Univ* (内蒙古师范大学学报), 2008, 37:780-784.
- Song JY(宋金耀). Studies of the assay of superoxide dismutase by pyrogallol autoxidation. *J Hebei Agrotech Teachers Coll* (河北农业技术师范学院学报), 1992, 6(2):30-35.
- Qiao C(乔辰), Li BS(李博生), Zeng ZQ(曾昭琪). Alkaline lakes and Spirulina (Arthospira) resources in sandy land of Ordos. *J Arid Land Resou Environ* (干旱区资源与环境), 2001, 15(4):86-91.