

钝顶螺旋藻分离纯化 SOD 的中试生产

谢婷玉, 张亚旗, 卢珍华, 苏国成, 张铃玉

(集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)干粉为实验原料, 经过超滤、两步盐析、DEAE 离子交换色谱柱层析和 Superdex™200 凝胶过滤柱层析, 逐步纯化超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)。结果表明, 在 90 L 粗藻液的中试放大体系中, 所得酶液的平均比活力为 4 131 U/mg, 纯化倍数为 238.96, 回收率为 8.3%。进一步利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)实验, 确定所得的 SOD 蛋白质分子质量约为 18.4 ku。此外, 3 次重复实验获得的 SOD 酶活力均大于 4 000 U/mg。

[关键词] 钝顶螺旋藻; 超氧化物歧化酶; 分离; 纯化; 中试生产

[中图分类号] TS 254

Pilot Scale Production of Superoxide Dismutase in *Spirulina platensis*

XIE Tingyu, ZHANG Yaqi, LU Zhenhua, SU Guocheng, ZHANG Lingyu

(College of Marine Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, superoxide dismutase (SOD) was isolated from *Spirulina platensis*, and then sequentially purified through ultrafiltration, two step salting-out method, DEAE ion exchange chromatography and Superdex™200 gel filtration chromatography. The results showed that the average specific of the enzyme was 4 131 U/mg, the purification multiple was 238.96 and the extraction recovery of this protein was 8.3% in a pilot scale system of 90 L crude algal extract. The result of SDS-PAGE analysis demonstrated that molecular mass of SOD was 18.4 ku. Repeat experiments showed similar results. In addition, the SOD activity of three repeated experiments was all greater than 4 000 U/mg.

Key words: *Spirulina platensis*; superoxide dismutase; separation; purification; pilot scale production

0 引言

螺旋藻起源于非洲和拉丁美洲^[1], 在地球上存在的时间超过 35 亿 a, 被称为自然界的活化石。螺旋藻中蛋白质含量丰富^[2-3], 是目前已知的理想蛋白质来源^[4], 螺旋藻的早期研究也集中于此。近年来, 研究发现, 螺旋藻内含有的酶具有抗氧化、抗炎以及抗肿瘤等多种生物活性^[5-6], 从螺旋藻中获得生物酶的工艺研究受到越来越广泛的关注^[7]。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一种重要的抗氧化剂, 它广泛存在于自然界的动物、植物以及一些微生物体内^[8-9]。SOD 按其所含金属辅基的不同可分为 Mn、Fe、Cu/Zn、Ni 4

[收稿日期] 2020-10-23

[基金项目] 福建省科技引导性项目(2020N0015)

[作者简介] 谢婷玉(1993—), 女, 硕士生, 从事天然产物分离纯化研究。通信作者: 张铃玉(1991—), 女, 讲师, 博士, 从事天然产物的分离与营养功效评价研究。E-mail: zhanglingyu@jmu.edu.cn

种类型^[10-11]。SOD 可有效清除体内的自由基，在抗氧化、抗肿瘤、抗辐射、抗炎症和抗衰老等方面发挥着重要作用，被广泛地应用于医药、食品及化妆品行业^[12-13]。在医药行业，SOD 可用来治疗多种由超氧阴离子自由基引发的疾病，比如类风湿关节炎^[14]、高血压^[15]等。在食品行业，SOD 可作为果汁、啤酒和罐头等食品的抗氧化剂，便于食品的保鲜、保藏^[16]。在化妆品行业，SOD 是防晒霜、面霜、眼霜等产品中重要的添加剂之一，在防晒、抗衰、祛斑等方面有明显的功效^[17]。此外，Carillon 等^[18]的实验结果表明，富含 SOD 的浓缩甜瓜汁可有效预防高血压的发生与发展。

目前，SOD 的来源主要有动物、微生物和植物 3 种。动物来源方面，比如羊血^[19]是目前 SOD 的主要来源，但是由于动物原料价格相对昂贵且易受污染，亟需寻找工业化生产 SOD 的替代方式^[20-21]。微生物来源方面，比如类球红细菌^[22]，该来源安全性欠佳且提取技术尚不成熟。植物来源方面，比如番茄^[23]、玉米^[24]等，该来源因具有安全可靠、原料广泛、适合大批量生产的特点，已成为最有潜力的生产方式，但目前尚停留在实验室阶段，有待进一步研究。为了建立一种从植物源中稳定获得高比活力 SOD 的中试生产方法，本文在韩文清等^[25]实验室研究的基础上，对钝顶螺旋藻（*Spirulina platensis*）来源的 SOD 进行中试放大生产，为植物来源 SOD 产业化的实现提供一定的理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

钝顶螺旋藻干粉，福建省神六保健食品有限公司提供。
磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和硫酸铵，西陇科学股份有限公司；离子交换树脂填料，苏州纳微科技有限公司；凝胶过滤层析填料，通用电气医疗集团；SOD 检测试剂盒，南京建成生物工程研究所；BCA 蛋白浓度测定试剂盒，碧云天生物技术。

1.2 仪器与设备

不锈钢反应釜（100 L），淄博盖亿化工设备有限公司；高速管式分离机，海宁市亚东过滤设备有限公司；卷式膜中试设备，三达膜科技；中空纤维膜中试设备，非标；三足离心机，江苏赛德力制药机械制造有限公司；高速冷冻连续流离心机，HITACHI，日本；GE ATKA Pure 蛋白纯化仪，GE Healthcare，瑞典；酶标仪，赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 SOD 的纯化工艺流程

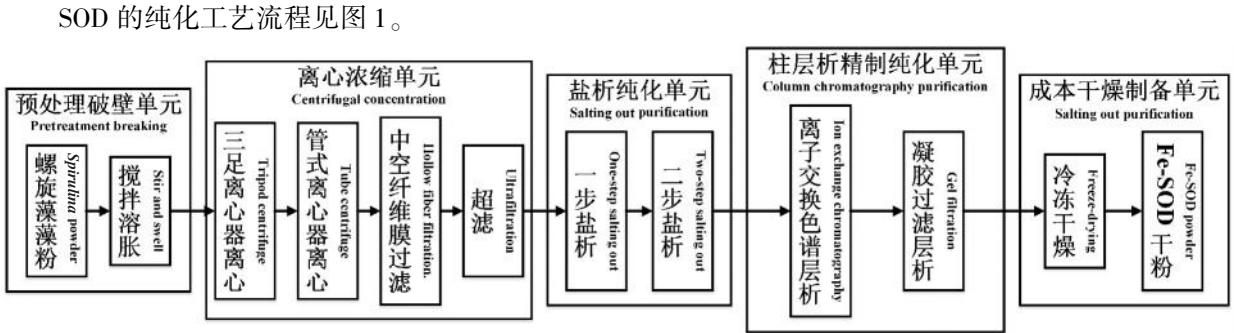


图 1 SOD 的工艺流程图
Fig.1 The process flow diagram of SOD

- 1) 螺旋藻破壁处理。在室温下，往反应釜中加入 100 L 的纯化水，然后投入 716 g 磷酸氢二钠、80 g 磷酸二氢钠，以 60 r/min 的速度搅拌 5 min。当 pH 值稳定在 7.8 左右时开始投料，加入螺旋藻干粉 5 kg，以相同速度搅拌 5 h。
- 2) 离心浓缩。首先，用三足离心机对处理好的料液反复离心 2 次；其次，用管式离心机以

14 000 r/min 的转速和 750 mL/min 的进料速度进行离心去渣并收集上清液;再次,用中空纤维膜按照 $V(\text{上清液}):V(\text{纯化水})=1:1$ 的比例反复处理上清液;最后,用分子截留量为 10 ku 的纳滤膜对 SOD 清液进行浓缩,得到浓缩液。按照 $V(\text{浓缩液}):V(\text{纯化水})=1:1$ 的比例对浓缩液进行 3 次重复除杂。

3) 两步盐析萃取。第一步盐析:粗 SOD 浓缩液倒入反应釜中并打开冷油。在反应釜中以 10 ℃、60 r/min 的转速搅拌 0.5 h,同时缓慢加入 17.55 kg 硫酸铵。0.5 h 后将料液放出,于 4 ℃ 下静置 2 h。用管式离心机对料液进行离心,收集上清液。第二步盐析:在硫酸铵饱和度为 40%~90% 范围内进一步盐析。将第一步盐析获得的上清液再次倒入反应釜,在反应釜中以 10 ℃、60 r/min 的转速搅拌 0.5 h,同时缓慢加入 3.105 kg 硫酸铵。硫酸铵饱和度分别调至 50%,60%,70%,80%,90%。0.5 h 后将料液放出,于 4 ℃ 下静置 2 h。用管式离心机对料液进行离心,收集沉淀,去除上清液。沉淀用 1 L、pH=7.8、20 mmol/L 的磷酸缓冲溶液复溶。用分子截留量为 200 u 的纳滤膜对 1 L 的 SOD 溶液进行脱盐,当 SOD 溶液的电导率为 3 ms/cm 时,第二步盐析结束。

4) 柱层析精制纯化。采用 GE AKTA Pure 半制备型蛋白纯化仪系统将两步盐析后获得的 SOD 溶液进一步纯化。主要填料为 Uni Gel DEAE 50XS 和 Superdex™200。

DEAE 离子交换色谱柱层析:将两步盐析获得的 SOD 沉淀用 pH=7.8、20 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶解后,用 AKTA Pure 进行 Uni Gel DEAE 50XS 柱层析(柱尺寸 $\varphi 15\text{ mm} \times 310\text{ mm}$,柱体积 54.5 mL)。利用波长 280 nm 进行监测,每 10 mL 流份收集 1 管,共收集 50 管。测定每管的酶活力,将酶活力大于 500 U/mg 的部分收集、浓缩。

Superdex™200 凝胶过滤柱层析:将 DEAE 柱层析纯化后的 SOD 浓缩液再用 Superdex™200 凝胶过滤柱层析进一步纯化(柱尺寸 $\varphi 10\text{ mm} \times 300\text{ mm}$,柱体积 26.4 mL)。利用波长 280 nm 进行监测,每 0.5 ml 流份收集 1 管,共收集 50 管。测定每管的酶活力,将酶活力大于 4 000 U/mg 的部分收集,最终得到目标产品。

5) 成品干燥制备。将收集到的活力大于 4 000 U/mg 的 SOD 溶液进行冷冻干燥,制成干粉。

6) 纯化倍数与回收率的计算。纯化倍数=对照组的比活力/实验组的比活力,其中:对照组的比活力为粗藻液比活力(U/mg);实验组的比活力为每道纯化工序后的比活力(U/mg)。纯化顺序为超滤、盐析、DEAE 柱层析、凝胶过滤柱层析。回收率/%=(实验组总活力/对照组总活力)×100,其中:实验组总活力为每道纯化工序后的总活力(IU);对照组总活力为粗藻液总活力(IU)。纯化顺序为超滤、盐析、DEAE 柱层析、凝胶过滤柱层析。

1.3.2 SOD 活力及蛋白质浓度测定

采用南京建成生物工程研究所的 SOD 测定试剂盒 WST-1 法对 SOD 活力进行测定;采用碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010)对 SOD 蛋白质浓度进行测定。SOD 活力测定计算见以下公式:
$$\text{SOD 抑制率}/\% = [(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)/(A_1 - A_2)] \times 100, \text{SOD 活力}/(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}) = (\text{SOD 抑制率} \div 50\% \times (\text{反应体系}/\text{稀释倍数})/\text{待测样本蛋白质浓度},$$
其中: A_1 为对照(20 μL 双蒸水、20 μL 酶工作液、200 μL 底物应用液)的吸光度值; A_2 为对照空白(20 μL 双蒸水、20 μL 酶稀释液、200 μL 底物应用液)的吸光度值; A_3 为测定(20 μL 待测样品、20 μL 酶工作液、200 μL 底物应用液)的吸光度值; A_4 为测定空白(20 μL 待测样品、20 μL 酶稀释液、200 μL 底物应用液)的吸光度值。

1.3.3 SDS-PAGE 分析

用 SDS-PAGE 方法^[25-26]对分离提纯得到的 SDS 进行分子质量分析。将样品用 5% 的堆积凝胶在恒压 80 V 的条件下分离 20~30 min 后,再用质量分数为 12% 的分离凝胶在恒压 100 V 的条件下分离 1.5 h。

2 结果与分析

2.1 螺旋藻 SOD 的提取纯化

螺旋藻经超滤、分段盐析、DEAE 柱层析、凝胶过滤柱层析后,总活力、酶比活力、提纯倍数、

回收率结果如表 1 所示。由表 1 可见, 从螺旋藻中最终获得的 SOD 的比活力为 4 131.00 U/mg, 纯化倍数达到了 238.96, 回收率为 8.30%。这与韩文清等^[25]获得的结果 (SOD 比活力为 2 078.20 U/mg, 纯化倍数为 126.50, 回收率为 19.90) 相比, 酶的比活力和纯化倍数均显著提高, 回收率有所降低。推测原因是本实验对提取工艺进行了优化, 确定了最适的沉淀梯度并采取了二步盐析, 在提纯 SOD 的同时也损失了部分目标产品。结果表明, 本实验将体系放大为 90 L 后, 依然可以从钝顶螺旋藻中获得 SOD, 且通过优化工艺, 显著提高了 SOD 的比活力。该结果也证明, 本实验所建立的 SOD 中试生产方法是可行的。

表 1 螺旋藻 SOD 的中试纯化结果
Tab.1 Purification results of *Spirulina* SOD

纯化步骤 Purification steps	总体积 Total volume/L	蛋白质含量 Protein content /(g · L ⁻¹)	蛋白质总量 Total protein /g	总活力 Total vitality /IU	比活力 Specific activity /(U · mg ⁻¹)	纯化倍数 Purification times	回收率 Recovery rate /%
粗藻液	90.00	3.66	328.95	5 686 559	17.29	—	100.00
超滤	45.00	6.53	294.03	5 190 805	17.65	1.02	91.28
分段盐析	1.00	13.50	13.56	1 396 525	103.01	5.96	24.56
DEAE 柱层析	3.40	0.16	0.54	1 165 965	2 156.00	124.72	20.51
凝胶过滤柱层析	0.20	0.12	0.02	96 665	4 131.00	238.96	8.30

2.2 不同饱和度硫酸铵盐析对螺旋藻中 SOD 酶活力的影响

SOD 溶液在饱和度为 40%~90% 范围内的硫酸铵中每隔 10% 梯度进行盐析, 获得沉淀。对沉淀进行复溶后脱盐, 再测定其 SOD 活力, 结果如图 2 所示。由图 2 可见, 在饱和度为 40%~70% 的范围内, 随着硫酸铵溶液饱和度的增加, SOD 活力不断提高, 在饱和度为 61%~70% 的硫酸铵中, SOD 活力达到最高。此后, SOD 活力随硫酸铵溶液饱和度的增加而降低。因此, 在第一步盐析中, 选择饱和度为 0~60% 的硫酸铵对 SOD 溶液进行盐析除杂; 在第二步盐析中, 选择饱和度为 61%~70% 的硫酸铵对 SOD 溶液再次进行盐析, 然后取沉淀复溶, 再使用柱层析对其进行脱盐, 最后得到活力最强的 SOD。

2.3 DEAE 离子交换色谱柱层析

使用 GE AKTA Pure 半制备型蛋白纯化仪系统对活力最强的 SOD 进行 DEAE 柱层析, 结果如图 3 所示。根据 SOD 活力曲线, 合并 SOD 活力大于 500 U/mg 的试管中溶液, 即合并第 23~39 管, 得到 SOD 活力的平均值大于 2 156 U/mg 的溶液。

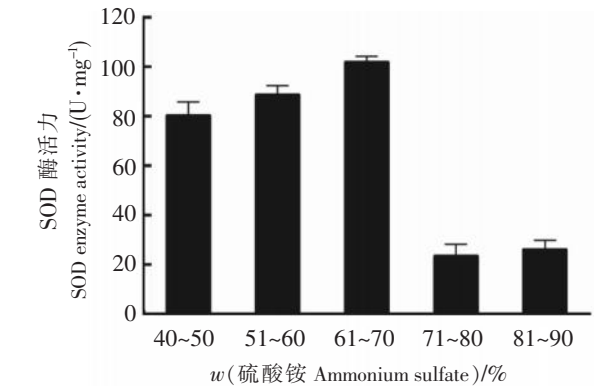


图 2 不同饱和度硫酸铵沉淀 SOD 酶活力分布图
Fig.2 SOD enzyme activity in different concentrations of ammonium sulfate

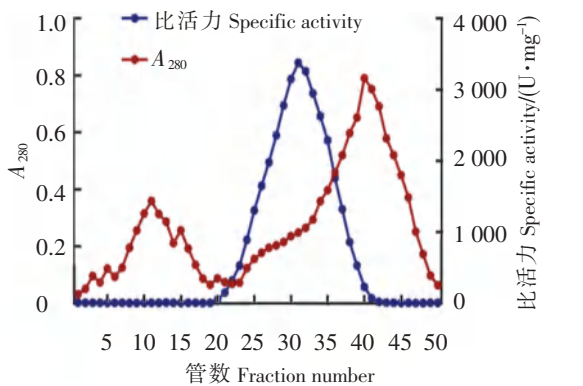


图 3 DEAE 离子交换色谱柱层析洗脱曲线
Fig.3 Elution profile of SOD protein using DEAE ion exchange chromatography

2.4 Superdex™200 凝胶过滤柱层析

使用 GEAKTA Pure 半制备型蛋白纯化仪系统对 SOD 活力平均值大于 2 156 U/mg 的溶液进行 Superdex™200 凝胶过滤柱层析, 结果如图 4 所示。根据 SOD 活力曲线, 合并 SOD 活力大于 4 000 U/mg

的试管中溶液，即合并第 16~23 管，得到 SOD 活力的平均值大于 4 131 U/mg 的溶液。

2.5 SDS-PAGE 分析

将最终得到的 SOD 酶液进行 SDS-PAGE 电泳分析，结果如图 5 所示。由图 5 可见，螺旋藻中 SOD 的分子质量约为 18.4 ku，有且仅有唯一一条条带，为仅含有一种亚基的 SOD。

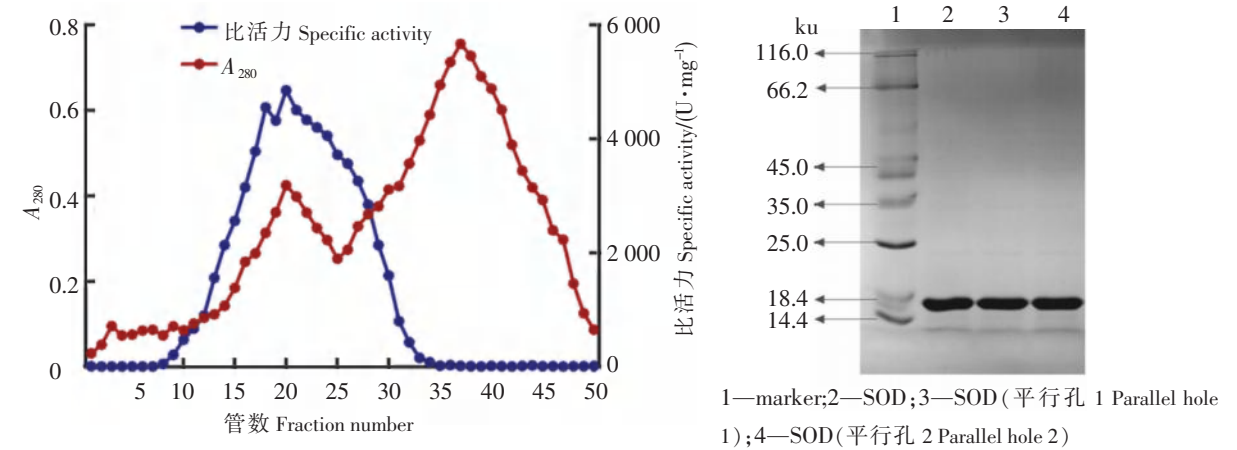


图 4 Superdex™200 凝胶过滤柱层析洗脱曲线
Fig.4 Elution profile of SOD protein using Superdex™200 gel filtration chromatography

图 5 SDS-PAGE 电泳分析 SOD 蛋白质
Fig.5 SDS-PAGE electrophoresis analysis of SOD protein

2.6 重复实验验证

如表 2 所示，3 次重复实验均可从螺旋藻中分离提纯得到 SOD，且平均酶活力均大于 4 000 U/mg。

表 2 3 次重复实验的结果
Tab.2 Results of three repeated tests

实验批次 Experiment batch	螺旋藻干粉投料量 Feeding amount of <i>Spirulina</i> powder /kg	样品质量 Sample weight/mg	比活力 Specific activity /($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
1	5.00	22.50	4 131
2	5.00	24.30	4 080
3	5.00	20.80	4 150
平均 Average	5.00 ± 0.00	22.53 ± 1.75	4 120.33 ± 36.20

3 结论

本实验按照两步盐析法、DEAE 离子交换色谱柱层析和 Superdex™200 凝胶过滤柱层析法的分离纯化顺序，从螺旋藻中分离纯化获得高比活力的 SOD，且通过 3 次重复实验证实了本文方法的稳定性和可靠性。实验所得的 SOD 酶液平均比活为 4 131 U/mg，回收率为 8.3%，纯度提高了 238.96 倍。由 SDS-PAGE 电泳分析可知，纯化所得 SOD 蛋白质的分子质量约为 18.4 ku，为仅含一种亚基的 SOD。

[参 考 文 献]

[1] COSTA J A V, FREITAS B C B, ROSA G M, et al. Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery [J]. Bioresource Technology, 2019, 292: 121946. DOI:10.1016/j.biortech.2019.121946.

[2] BROWN K W, DONNELLY K C, DEUEL L J. Effects of mineral nutrients, sludge application rate, and application frequency on biodegradation of two oily sludges [J]. Microb Ecol, 1983, 9(4): 363-373. DOI:10.1007/bf02019025.

[3] CLEMENT G, GIDDEY C, MENZI R. Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima* [J]. J Food Agric, 2010, 18(11): 497-501. DOI:10.1002/jsfa.2740181101.

- [4] 潘子康, 胡丽莉. 螺旋藻的化学成分、生物学活性和应用范围的研究概述 [J]. 生物学教学, 2020, 45(2): 2-3.
- [5] BIXENMANN L, HE J, LIANG M, et al. Functional superoxide dismutase mimics become diverse: from simple compounds on prebiotic earth to nanozymes [J]. Prog Biochem Biophys, 2018, 45(2): 148-169.
- [6] YAN G, HE Y F, LI G, et al. Bovine serum albumin metal complexes for mimic of SOD [J]. Journal of Chemical Sciences, 2016, 128(11): 1783-1788. DOI:10.1007/s12039-016-1184-z.
- [7] QIN X R, ZHANG M J, QIN J, et al. Two-step purification of Cu, Zn-superoxide dismutase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) pulp [J]. Separation and Purification Technology, 2012, 87: 79-83.
- [8] 徐颖溪. 超氧化物歧化酶综合利用研究进展 [J]. 园艺与种苗, 2014(8): 59-62.
- [9] 董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶 (SOD) 的应用研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 53-58.
- [10] DESAI K, SIVAKAMI S. Purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from the soluble fraction of the cyanobacterium, *Spirulina platensis* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(12): 1661-1666. DOI:10.1007/s11274-007-9413-8.
- [11] KIM B M, RHEE J S, PARK G S, et al. Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: molecular cloning and expression in response to environmental pollutants [J]. Chemosphere, 2011, 84(10): 1467-1475. DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.04.043.
- [12] 张宇婷, 高建民, 张琼琳, 等. 植物超氧化物歧化酶的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2016, 37(9): 28-31.
- [13] 张欣. 超氧化物歧化酶 (SOD) 及其研究进展 [J]. 内蒙古石油化工, 2010, 36(16): 14-15.
- [14] 刘莲, 蒋红梅, 费樱, 等. 类风湿性关节炎患者血清超氧化物歧化酶和血管性血友病因子水平变化及意义 [J]. 中国全科医学, 2014, 17(23): 2754-2756.
- [15] 余舒杰, 王敏, 周彬, 等. 高血压及合并糖尿病患者血浆内脂素与 SOD 的相关性 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2015, 36(5): 699-703.
- [16] 钱沁瑜, 杨芸, 彭名善, 等. 超氧化物歧化酶的应用 [J]. 新教育时代电子杂志 (学生版), 2017(7): 123, 145.
- [17] 岳爱国, 刘纲勇. SOD 在食品和化妆品行业中的应用研究进展 [J]. 广东化工, 2014, 41(19): 117-118.
- [18] CARILLON J, RIO D D, TEISSÈDRE P, et al. Antioxidant capacity and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of a melon concentrate rich in superoxide dismutase [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1298-1302. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.05.064.
- [19] 杨学山, 付文力, 孔志亮, 等. 铜盐-热变性法分离提取羊血超氧化物歧化酶工艺条件优化 [J]. 食品科学, 2012, 33(20): 42-45.
- [20] HE N, LI Q B, SUN D H, et al. Isolation, purification and characterization of superoxide dismutase from garlic [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 38(1): 33-38. DOI:10.1016/j.bej.2007.06.005.
- [21] 周轩, 张天, 任晓敏, 等. SOD 提取工艺研究进展 [J]. 粮食与食品工业, 2015, 22(4): 57-62.
- [22] 李祖明, 霍笑靥, 高丽萍, 等. 酶法辅助超声波法提取类球红细菌 SOD 工艺研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2014, 45(1): 47-51.
- [23] 李珺, 马力通, 高书良. 番茄中超氧化物歧化酶提取工艺的优化 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(7): 3997-3998.
- [24] 刘杰凤, 张峰培, 杜丽明. 玉米超氧化物歧化酶的提取与纯化工艺 [J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 48-51.
- [25] 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 (自然科学汉文版), 2008, 37(6): 780-784.
- [26] 邢佳毅, 雷慧, 程继鸿, 等. 番茄幼苗根系总蛋白 SDS-PAGE 方法的优化 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2): 675-677.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)