论著

文章编号:1000-5404(2008)06-0514-03

木瓜超氧化物歧化酶粗提物颗粒的加工及生物学效应研究

赵 靖,糜漫天,唐 勇,张 婷,王 建 (第三军医大学预防医学院营养与食品卫生教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究木瓜超氧化物歧化酶粗提物颗粒的加工工艺,并评价其生物学效应。**方法** 1%纤维素酶酶解木瓜匀浆,β-环糊精和γ-环糊精包埋,制得超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)粗提物,50只小鼠分为5组:空白对照组、模型对照组、3个试验组(样品剂量分别为1 000、2 000、3 000 U/kg)。对照组予同质量基础饲料,除空白对照组外,各组给予5 Gy ^{60}Coγ射线全身照射1次,3 d后处死,测定血清和各组织MDA含量及SOD活性。**结果** 酶解后单位体积的上清液中SOD的活力比酶解前降低了7.8%,但是由于出汁率大大提高,使得单位质量木瓜所得上清液中SOD总活力提高近10.65%。采用3%的γ-环糊精包埋木瓜SOD,并运用喷雾造粒技术制备PC-SOD,其SOD活性保留率为67.8%。动物实验显示:各剂量组中小鼠血清和组织中的MDA含量均低于模型对照组,各剂量组中小鼠血清和组织中的SOD活性均高于模型对照组。**结论** 木瓜的本方法SOD粗提物颗粒(PC-SOD)的加工工艺效果好。产品PC-SOD对降低小鼠血清和组织中的MDA有显著作用,且对提高小鼠血清和组织中的SOD活性也有明显的效果。

关键词: 木瓜;超氧化物歧化酶;粗提物颗粒;加工工艺;生物学效应

中图法分类号: R151.2;TS201.1 **文献标识码:** A

Preparation and biological function of particle product of crude extract of superoxide dismutase in *Chaenomeles chinensis*

ZHAO Jing, MI Man-tian, TANG Yong, ZHANG Ting, WANG Jian (Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish the technics of preparing the particle product of *Chaenomeles chinensis* superoxide dismutase extract (PC-SOD) and investigate the biological function of PC-SOD. **Methods** Enzymatic technique was applied to improve extraction rate. The activity of SOD during the process of preparing PC-SOD was explored by adopting γ-dextrin and β-dextrin for packing. The biological function of PC-SOD was studied by detecting MDA contents and SOD activity in blood serum, liver and kidney of mice treated with PC-SOD product. **Results** In enzymatic process, juice recovery was higher and the total SOD activity was 10.65% higher than non-enzymatic procedure. Using 3% γ-dextrin to pack SOD and prepare PC-SOD, the activity rate of SOD in PC-SOD was 67.8%. In mice fed with PC-SOD product, the MDA content in blood serum, liver and kidney was lower, while the SOD activity was higher than the control animals. **Conclusion** This technique of preparing the particle product of Chaenomeles chinensis PC-SOD is effective. PC-SOD reduces MDA content in blood serum and organs of mice, and increases the SOD activity.

Key words: *Chaenomeles chinensis*; superoxide dismutase; particle product of extract; process technology; Technology of preparing; biological function

人体细胞内活性氧与人的衰老有密切的关系。酶类的化妆品主要以添加超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)为主。国际上最近以大蒜、韭菜、玉米淀粉等为原料提取纯化SOD,在动物实验中取得了与动物来源的SOD相同的营养功效[1]。

木瓜(*Chaenomeles chinensis*)果实含有丰富的营养物质和活性成分。国内外有少量关于木瓜中多酚类物质和抗氧化能力的报道[2],而木瓜SOD的相关研究甚少。通过本实验室前期初步研究,发现木瓜提取物中不但含有很高的黄酮类物质、酚类物质,还含有较高的SOD[3]。

基金项目: 重庆市科技攻关项目(2005AC1023);重庆市重点学科建设(CSTC2006CA1003)
Supported by the Sci & Tech Research Project of Chongqing (2005AC1023) and the Project for the Key Subject Construction of Chongqing (CSTC2006CA1003)

作者简介: 赵 靖,男,河南省上蔡县人,硕士研究生,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291,E-mail:zhaolan-104@163.com

通信作者: 糜漫天,电话:(023)68752292

收稿日期: 2007-09-27;**修回日期:** 2007-10-18

随着微胶囊技术的发展,其在食品工业中的应用越来越广泛,特别在保护多肽、蛋白质、酶类等活性物质的生物活性、提高稳定性、延长半衰期、延缓释放方面起到巨大的作用。以木瓜为原料开发植物 SOD 复合保健品,运用食品微胶囊技术保持产品生物活性、提高口服性,可以为木瓜产品的开发开辟一条新的途径[4]。本研究对木瓜 SOD 粗提物颗粒进行加工并评价其生物学效应。

1　材料与方法

1.1　试验材料

木瓜(*Chaenomeles chinensis*)购自綦江县打通镇木瓜基地;纤维素-果胶复合酶、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒:南京建成生物工程研究所;丙二醛(MDA)试剂盒:南京建成生物工程研究所;三蒸水(实验室自制);γ-环糊精、β-环糊精、卵磷脂等试剂均为分析纯;实验动物:昆明种小白鼠,为 BALB/C 纯系小鼠,雄性,8 ~ 10 周龄,体质量 18 ~ 20 g,由第三军医大学实验动物中心提供,置于标准动物房喂养,喂养基础饲料,自由进食和饮水。

1.2　主要仪器与设备

超微粉碎设备:甘肃天水解放军 6913 超微细设备厂;电子分析天平;磁力搅拌器;数显恒温水浴锅;pH-3C 酸度计;日立 SCR20BC 高速冷冻离心机:SIGMA laborzentrifugen ZK15;viva-Flow50 超滤膜组件:USA;电脑核酸蛋白检测仪 MODEL HD-4:上海青浦沪西仪器厂;喷雾造粒机:重庆英格尔医药设备制造厂。

1.3　实验方法

1.3.1　SOD 粗提物的加工工艺研究　　木瓜洗净、去核、切成小块。称取 100 g 加入 200 ml 去离子水打浆,得匀浆,向其中加入 1% 纤维素酶,放入摇床中震摇酶解(45 ℃,30 min),酶解后冷冻离心(-5 ℃,5 000 r/min,20 min)得酶解上清液,用对上清液进行超滤浓缩,用环糊精包合后喷雾干燥制粒。

1.3.1.1　生物酶解工艺在木瓜 SOD 提取上的效果研究　　试验显示采用酶解工艺可以提高单位体积木瓜浆液离心所得上清液的体积,即提高了木瓜的出汁率,从而可以提高提取 SOD 的总酶活。故采用纤维素 - 果胶复合酶对木瓜打浆液进行酶解应用研究。通过试验选择酶解最佳参数为:酶解 pH 值为 3,纤维素-果胶复合酶添加量为 1.2%,酶解温度为 40 ℃,酶解时间为 50 min。

1.3.1.2　木瓜 SOD 的环糊精包埋修饰研究初探　　β-环糊精和 γ-环糊精包埋:木瓜 SOD 浓缩液分别加入 1%　2%　3%　4% 的 β-环糊精或 γ-环糊精,在 25 ℃,真空搅拌 3 h,4 ℃冷藏10 h,离心分离上清液及沉淀,分别测定 SOD 活性。

包埋材料的选择和添加量主要考查包埋率。包埋率 = 沉淀物 SOD 总活性/(沉淀物 SOD 总活性 + 上清液 SOD 总活性)。

选择包埋率较高的材料和工艺制备木瓜 SOD 包埋物,探究其对热(70 ℃,15 min)、酸(pH = 1.7,15 min)和模拟胃液(15 min)处理的稳定性,考查其 SOD 活性的残留率。

残留率 = (处理后 SOD 总活性/ 处理前 SOD 总活性) × 100%

1.3.1.3　SOD 粗提物制备过程 SOD 活性变化　　实验显示,以 γ-环糊精包埋,其木瓜 SOD 保留活性和稳定性较好,并以 γ-环糊精为母核,以包埋浆液为喷液进行喷雾造粒,料液比为 2∶1,喷雾造粒是物料温度为 45 ℃。考查 SOD 粗提物制备过程 SOD 活性变化。

1.3.2　SOD 粗提物生物学效应研究

1.3.2.1　辐照模型　　将 50 只小鼠分为 5 个组,空白对照组、模型对照组和 3 个受试样品剂量实验组。3 个实验组灌胃每日给予 0.1 g/kg 受试样品(受试样品用基础饲料稀释为 1 000 U/kg、2 000 U/kg、3 000 U/kg),对照组给予同重量的基础饲料,30 d 后,除空白对照组外,各组给予 5 $Gy^{60}Co\gamma$ 射线全身性照射 1 次,照射后第 3 天处死各组动物,摘眼球取血,分离血清,剖腹取肝脏和肾脏,测定血清和组织中的 MDA 含量和 SOD 活性。

1.4　统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行,独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　SOD 粗提物的加工工艺研究结果

2.1.1　酶解前后效果比较　　以最优试验组合进行酶解试验,比较了木瓜浆液酶解前后的出汁率、单位体积上清液所含 SOD 酶活以及总酶活(以 100 g 木瓜,即 300 g 木瓜浆液汁)的变化。结果见表 1。

表 1　酶解前后效果比较结果

项目	出汁率(%)	上清液(U/ml)	上清液所含 SOD 总酶活(U)
酶解前	45.0 ± 0.2	180.0 ± 3.0	$4.32 \times 10^4 \pm 0.007\ 2$
酶解后	92.0 ± 0.3	166.0 ± 2.2	$4.78 \times 10^4 \pm 0.006\ 3$

2.1.2　木瓜 SOD 的修饰初探结果

2.1.2.1　环糊精包埋对 SOD 包埋率的影响　　环糊精包埋试验可以看出,当环糊精的添加量由 1% 到 4% 变化时,γ-环糊精的添加量从 1% 提高到 3% 时包埋率提高迅速,达到 75.5%,而当增加至 4% 时,包埋率仅提高到 76.1%,因此,γ-环糊精作为包埋物的合理添加量可选择 3%;而 β-环糊精的添加量为 2% 时,包埋率已达到 75.3%,与添加 3% 的 γ-环糊精的包埋率接近,而随着 β-环糊精的添加量进一步增加其包埋率并没有明显提高。故添加 2% 的 β-环糊精和 3% 的 γ-环糊精均可使木瓜 SOD 的包埋率达到 75%。γ-环糊精和 β-环糊精的添加量对木瓜 SOD 包埋率的影响见图 1。

2.1.2.2　包埋物稳定性研究　　将木瓜 SOD 环糊精包埋物分别通过加热(70 ℃,15 min),加酸(pH = 1.7, 15 min),人工胃液(15 min)处理后发现(-环糊精包埋物中 SOD 活性残留率分别为 12%、0%、0%,β-环糊精包埋物中活性残留率分别为 40%、52%、34%。

2.1.3　SOD 粗提物制备过程中 SOD 活性的变化　　从 100 g 木瓜原料制备的 SOD 粗提物中含 SOD 活性为 3.24×10^4 U,活性保留率为 67.8%。

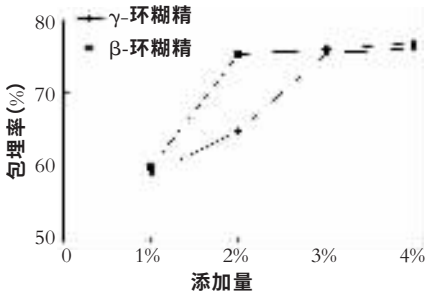


图1 环糊精包埋对包埋率的影响

2.2 SOD 粗提物生物学效应研究

2.2.1 SOD 粗提物对小鼠体内 MDA 水平的影响(表3) 与模型对照组相比,1 000 U/kg 剂量组中,血清中的 MDA 含量有极显著性差异($P<0.01$),肝匀浆中的 MDA 含量有显著性差异($P<0.05$),肾匀浆未见显著性差异($P>0.05$);2 000 U/kg 剂量组中,血清中、肝匀浆含量有极显著性差异($P<0.01$),肾匀浆组有显著性差异($P<0.05$);3 000 U/kg 剂量组中,血清和各组织有 MDA 含量有非常显著的差异($P<0.01$)。

表3 小鼠血清和组织中的 MDA 含量($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血清 (nmol/ml)	肝匀浆 (nmol/mg)	肾匀浆 (nmol/mg)
空白对照组	2.581 ±0.205	5.247 ±0.682	2.558 ±0.436
模型对照组	2.822 ±0.265	6.914 ±0.141	2.748 ±0.199
实验组			
1 000 U/kg	2.370 ±0.276[b]	6.678 ±0.329[a]	2.687 ±0.150
2 000 U/kg	2.058 ±0.138[b]	6.016 ±0.344[b]	2.626 ±0.093[a]
3 000 U/kg	1.794 ±0.154[b]	5.426 ±0.286[b]	2.322 ±0.322[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与模型组比较

2.2.2 SOD 粗提物对小鼠体内 SOD 活力的影响(表4) 与模型对照组相比,1 000 U/kg 剂量组中,血清、肝匀浆中 SOD 活性有极显著性差异($P<0.01$),肾匀浆中 SOD 活性未见显著性差异($P>0.05$);2 000 U/kg 剂量组中,血清、肝匀浆和肾匀浆中的 SOD 活性均有非常显著性差异($P<0.01$);3 000 U/kg 剂量组中,血清、肝匀浆和肾匀浆中的 SOD 活性均有非常显著性差异($P<0.01$)。

表4 小鼠血清和组织中的 SOD 活性($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血清 (nmol/ml)	肝匀浆 (nmol/mg)	肾匀浆 (nmol/mg)
空白对照组	61.834 ±5.479	41.843 ±1.953	50.671 ±1.284
模型对照组	60.077 ±1.446	38.729 ±2.526	49.843 ±1.413
实验组			
1 000 U/kg	69.707 ±2.600[a]	48.245 ±3.273[a]	51.260 ±1.642
2 000 U/kg	72.806 ±1.660[b]	61.406 ±3.110[b]	60.832 ±3.869[b]
3 000 U/kg	80.399 ±2.576[b]	62.18 ±6.223[b]	66.204 ±2.538[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与模型组比较

3 讨论

通过酶解工艺处理,出汁率提高了近 100%,为 SOD 较为充分的从木瓜果肉组织中的游离出来提供了条件。从酶解前后上清液中 SOD 的变化也不难发现,虽然酶解后单位体积的上清液中 SOD 的活力比酶解前降低了 7.8%,但是由于出汁率大大提高,使得单位质量木瓜所得上清液中 SOD 总活力提高近 10.65%。通过用纤维素-果胶复合酶进行酶解处理,大大降解了木瓜浆液中的纤维素和果胶物质及其对 SOD 的包裹或附着作用,同时也提高了 SOD 的提取总量。因此,酶解工艺运用于木瓜 SOD 的提取上是有理论和实际意义的。

作为一种酶制剂,SOD 的应用受许多因素的限制,如在机体内易于降解,生物半衰期短,常温保存易于失活等常用的解决方法之一是用化学修饰,环糊精、聚乙二醇、右旋糖酐、免疫球蛋白 FC 片段、聚烯属化合物等都曾经用于 SOD 的化学修饰[5]。对环糊精包合木瓜 SOD 的工艺和效果作初步探讨。

从稳定性试验可以看出,添加 2% 的 β-环糊精的包埋物在经过特定的处理后,除了经过加热其 SOD 活性残留率还有 12% 外,经过酸处理和人工胃液后,均不能检测到 SOD 活性;而 3% 的 γ-环糊精包埋物 SOD 活性残留率分别为 40%、52% 和 34%。可见,采用 3% 的 γ-环糊精包埋木瓜 SOD,在包埋率和 SOD 稳定性方面都相对好。经喷雾造粒技术制备 SOD 粗提物,其 SOD 活性保留率为 67.8%。

本实验室前期对木瓜中多酚类物质及其抗氧化作用进行了研究,而关于木瓜中 SOD 的生物学效应国内外少见报道。本研究采用了超滤浓缩的工艺排除了多酚类等小分子抗氧化物的影响,并采用环糊精修饰和喷雾造粒技术制备木瓜 SOD 粗提物颗粒产品。通过生物学实验结果可以看出,各剂量组中小鼠血清和组织中的 MDA 含量均低于模型对照组,而血清和组织中的 SOD 活性均高于模型对照组。表明木瓜 SOD 提取物颗粒能够有效降低小鼠体内 MDA 含量,可有效提高小鼠体内 SOD 活性,并呈现一定剂量效应关系。

由于木瓜 SOD 的相关研究还很少,本研究对其粗提物的修饰和生物学效应作了初步研究,显示木瓜 SOD 粗提取物颗粒能够有效降低小鼠体内 MDA 含量并提高小鼠体内 SOD 活性,为进一步开发利用木瓜拓宽了新的途径,同时也为大力开发植物 SOD 提供了新的思路。

参考文献:

[1] 柳 蔚, 杨兴海, 钱京萍. 资木瓜乙醇提取物镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 四川中医, 2004, 22(8): 7-8.
[2] 于 平. 超氧化物歧化酶研究进展[J]. 生物学通报, 2006, 41(1): 4-6.
[3] 张 婷, 糜漫天, 唐 勇, 等. 光皮木瓜多酚粗提物的体内外抗氧化效应[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(20): 1954-1957.
[4] 吴克刚, 柴向华. 食品微胶囊技术[M]. 北京:中国轻工出版社, 2006: 72-75.
[5] 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, 47(6): 378-381.

(编辑 栾 嘉)