

# 响应面法优化马血中 SOD超声波提取工艺研究

热孜耶·喀日,米丽班·霍家艾合买提\*,热合满·艾拉,许铭强  
(新疆农业大学食品科学与药学学院,新疆乌鲁木齐 830052)

**摘要:**以SOD比活力为响应值,在单因素实验的基础上,筛选出超声时间、超声功率、超声温度三个对提取影响较大的因素,利用响应面法进行优化,并验证优化方案。结果表明,SOD超声波提取的优化参数为:超声时间15min、超声功率220W、超声温度31℃。在此条件下,SOD比活力为77.5U/mg,与模型高度拟合。

**关键词:**马血,SOD,超声波提取,响应面法

## Optimization of ultrasonic extraction technique of SOD from horse blood by response surface methodology

Reziye·Kari, Miliban·Huojiiaihemaiti\*, Rehe-man·Aila, XU Ming-qiang

(College of Food Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** Based on single factor experiment, three main factors were screened out, including the ultrasonic time, ultrasonic power, ultrasonic temperature. Optimization of these factors by using response surface methodology was studied. Results of response surface analysis showed that the optimum ultrasonic extraction conditions of SOD were as follows: ultrasonic time 15min, ultrasonic power 220W, the ultrasonic temperature 31℃. Under these conditions, specific activity of SOD was 77.5U/mg and which was in good agreement with the predicted value.

**Key words:** horse blood; SOD; ultrasonic extraction; response surface methodology

中图分类号: TS251.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)02-0249-03

超氧化物歧化酶(SOD)是广泛存在于生物体内的一类金属酶<sup>[1]</sup>,它能催化超氧阴离子自由基发生歧化反应,从而能有效清除机体内超氧阴离子自由基,是生物体重要的细胞防御系统之一<sup>[2]</sup>,有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗辐射和消炎作用<sup>[3]</sup>。SOD主要存在于血细胞中,因此要提取SOD,必须使细胞膜破碎,通常使用的方法有:溶胀法<sup>[4]</sup>、机械破碎法、酶溶法、有机溶剂法。目前,SOD用于延缓人体衰老,防止色素沉着,并治疗慢性多发性关节炎等症,也被广泛地应用于生产日用化工品,如SOD化妆护肤品,对抗衰老、去除脸部雀斑等有明显的效果。随着日用化工产品的发展及SOD在临床上的应用,SOD的需求量越来越大<sup>[5]</sup>。我国是一个传统养马大国,有15个地方品种和11个培育品种,约占世界马品种的十分之一。目前,存栏马匹达到790万匹,居世界之首<sup>[6]</sup>。马血是一种宝贵的蛋白质资源,具有很高的药用价值,但对其提取方面的系统研究还很少。目前,一般从动物血中提取SOD的工艺多为正交设计,但此方法精确度不

高,且不能考虑因素之间的交互作用。响应面分析法是一种优化工艺条件的高效方法,可确定各因素及其交互作用在工艺过程中对指标(响应值)的影响,精确地反映因素与响应值之间的关系<sup>[7]</sup>。本研究从食品安全的角度考虑,以响应面方法优化超声波提取马血中SOD,考察超声条件对提取SOD比活力的影响,以期对动物血资源的综合开发利用奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

马血 华菱屠宰场;柠檬酸三钠、氯化钠、邻苯三酚、盐酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、考马斯亮蓝G-250、牛血清蛋白、乙醇 以上皆是分析纯。

HH-54数显恒温水浴锅 金坛市医疗仪器厂;KQ-250DE型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;TD5A-WS台式低速离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;TU-1810紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;PL203电子天平 梅特勒托利仪器有限公司;DZKW-D-2型电热恒温水浴锅 北京市光明医疗仪器厂。

#### 1.2 实验方法

**1.2.1 红细胞的制备** 取新鲜马血与0.38%柠檬酸三钠体积比为1:7的溶液,搅拌均匀,以3000r/min的速度离心15min,除去血浆,收集红细胞,用2倍体

收稿日期:2012-05-23 \* 通讯联系人

作者简介:热孜耶·喀日(1987-),女,在读硕士,研究方向:农产品加工技术。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21245003)。

积的0.9% NaCl溶液洗涤3次,在-15℃条件下保存备用。

1.2.2 响应面法优化提取条件 为了优化超声波提取工艺条件,选取超声时间、超声功率、超声温度做单因素实验;在单因素实验的基础上,根据Box-Behnken中心组合实验设计原理,采用三因素三水平的响应面分析法进行实验设计,确定马血中SOD超声波提取的最佳工艺条件,实验因素与水平见表1。

表1 响应面实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A 超声时间(min)	10	15	20
B 超声功率(W)	200	220	240
C 超声温度(℃)	15	30	45

1.2.3 蛋白质含量测定<sup>[8]</sup> 考马斯亮蓝G-250法测定蛋白质含量。

1.2.4 SOD活性测定<sup>[9]</sup> 邻苯三酚自氧化法测定SOD活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

2.1.1 超声时间对SOD提取的影响 准确取15mL自然解冻的红细胞置于试管中,加入以3:1的蒸馏水,搅拌15min后,在超声功率200W,温度40℃条件下分别处理5、10、15、20、25min,测定蛋白质的浓度和酶的活性。重复三次实验,确定合适的超声时间,结果见图1。

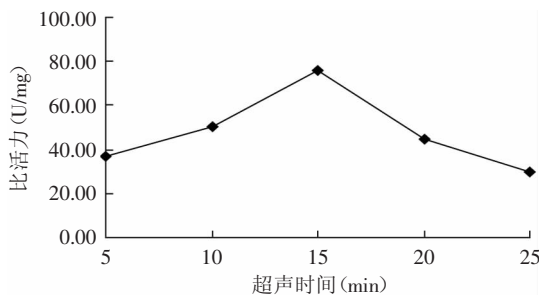


图1 超声时间对SOD比活力的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic time on the SOD specific activity

由图1可知,随着超声时间的延长,SOD比活力也增加,当超声时间为15min时,提取液中SOD比活力为76.1U/mg。继续延长超声时间,SOD比活力随之降低,这可能是由于超声波的高强度机械作用和空化作用使SOD变性失活,因此,确定最佳超声时间为15min。

2.1.2 超声功率对SOD提取的影响 准确取15mL自然解冻的红细胞置于试管中,加入以3:1的蒸馏水,搅拌15min后,在超声功率分别为:160、180、200、220、240W温度40℃条件下处理15min,测蛋白质的浓度和酶的活性,结果见图2。

通常超声功率越高,越容易获得较大的声强,但超声功率对SOD比活力的影响不能一概而论,而要

考虑超声波与介质相互作用的程度和提取物的性质。由图2可知,随着超声功率的增加,SOD比活力不断增加,当超声功率在220W时,提取液中SOD比活力为81.1U/mg;而继续增加超声功率,SOD比活力随之降低,因此,选择超声功率为220W。

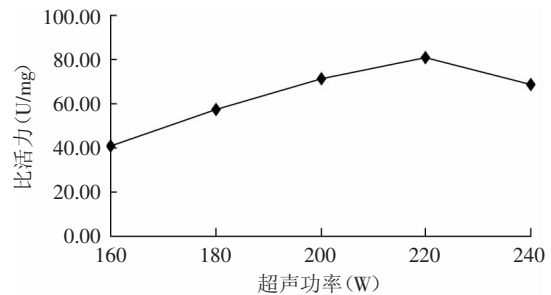


图2 超声功率对SOD比活力的影响

Fig.2 Effects of ultrasonic power on the SOD specific activity

2.1.3 超声温度对SOD提取的影响 准确取15mL自然解冻的红细胞置于试管中,加入以3:1的蒸馏水,搅拌15min后,在超声功率220W,超声温度分别为:15、30、45、60、75℃下分别处理15min,测蛋白质的浓度和酶的活性,结果见图3。

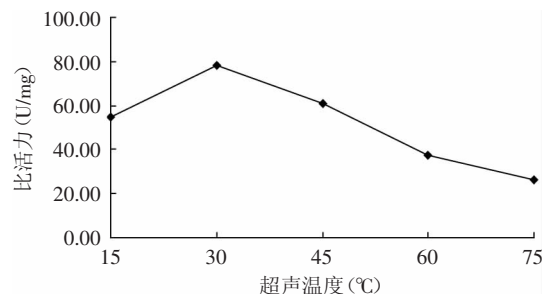


图3 超声温度对SOD比活力的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic temperature on the SOD specific activity

从图3可知,超声温度在30℃时,SOD比活力为78.2U/mg,高于30℃后SOD比活力缓慢下降,因为温度高,细胞膜在未破碎、SOD未溶出时,细胞已经变性,导致了溶液中SOD含量下降,比活力降低,另外,高温也会导致SOD变性,从而使SOD的比活力降低。

### 2.2 以SOD比活力为响应值的响应面实验

利用统计分析Design-Expert软件进行Box-Behnken实验,结果见表2。

2.2.1 数学模型的建立<sup>[10]</sup> 根据表2所得的实验数据,采用响应面统计方法对实验数据拟合,建立SOD比活力与超声时间、超声功率、超声温度三因子的二次多项数学回归方程:

$$Y=78.36+0.26A+0.075B+0.69C-1.90AB-3.83AC-0.20BC-10.99A^2-3.22B^2-8.89C^2。$$

回归模型方差分析见表3,模型的 $p=0.0003<0.01$ ,说明对马血中SOD建立的回归模型是极显著的,失拟项 $p=0.0971>0.05$ 不显著,相关系数 $R^2=0.9639$ ,表示模型的拟合度良好,实验误差较小。三因素对SOD比活力的影响顺序为:超声温度>超声时间>超声功

表2 响应面设计方案与实验结果

实验号	A	B	C	Y SOD比活力(U/mg)
1	1	-1	0	65.4
2	0	0	0	79.6
3	0	0	0	77.9
4	0	0	0	80.3
5	-1	0	-1	53.6
6	-1	0	1	60.1
7	0	1	1	68.6
8	-1	1	0	66.7
9	1	1	0	60.7
10	1	0	-1	64.5
11	1	0	1	55.7
12	0	0	0	76.8
13	0	-1	-1	63.5
14	0	0	0	77.2
15	0	1	-1	65.1
16	0	-1	1	67.8
17	-1	-1	0	63.8

表3 回归模型方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方差	F值	p值
模型	1044.14	9	116.02	20.77	0.0003
A	0.55	1	0.55	0.099	0.7626
B	0.045	1	0.045	8.056E-003	0.9310
C	3.78	1	3.78	0.68	0.4378
AB	14.44	1	14.44	2.59	0.1519
AC	58.52	1	58.52	10.48	0.0143
BC	0.16	1	0.16	0.029	0.8704
A <sup>2</sup>	508.78	1	508.78	91.09	<0.0001
B <sup>2</sup>	43.59	1	43.59	7.80	0.0268
C <sup>2</sup>	332.95	1	332.95	59.61	0.0001
失拟项	29.81	3	9.94	4.28	0.0971
纯误差	9.29	4	2.32		
总和	1083.24	16			

注:p<0.01,表示极显著;p<0.05,表示显著。

率。因此可以选用此模型对SOD的超声波提取工艺进行分析和预测,能确定所得到的二次回归方程模型是合适的。

2.2.2 响应面分析与优化 图4是以SOD比活力为响应值的响应曲面图,通过对相应的等高线及响应曲面分析,由Design-Expert软件给出响应图的预测值,SOD比活力78.3739U/mg,其对应的工艺参数是:超声时间15.02min、超声功率220.17W、超声温度30.56℃。

对回归模型进行数学分析,交互项AC对SOD比活力的影响显著。随着超声时间和超声温度的上升,SOD比活力呈现先上升后下降的趋势。

在模型给出的条件下,按实际条件确定:超声时间15min、超声功率220W、超声温度31℃,在此条件下做3组平行实验,以检验模型的准确性。所得的SOD

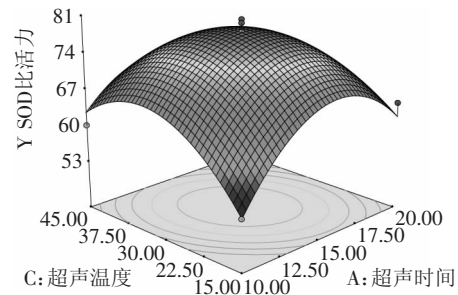


图4 以SOD比活力为响应值的响应面图

Fig.4 Response surface plot in response to specific activity of SOD

比活力分别为77.5、76.9、78.1U/mg,平均值为77.5U/mg。验证值77.5U/mg和预测值78.3739U/mg非常接近,说明回归方程可以较真实的反映各筛选因素的影响,建立的模型与实际情况比较吻合,再次证明该回归模型的可行性。

### 3 结论

采用超声波萃取法从马血中提取SOD,利用实验设计软件Design-Expert,通过响应面分析法建立马血SOD超声波提取工艺的数学回归模型,并对各因子对SOD比活力的影响进行了分析,得出影响马血SOD提取的各因素顺序依次为:超声温度>超声时间>超声功率;马血SOD超声波提取工艺的最佳参数为:超声时间15min、超声功率220W、超声温度31℃,在此条件下,SOD比活力为77.5U/mg。

### 参考文献

- [1] 张良,薛刚,张彩莹,等.牛血铜锌超氧化物歧化酶分离提取新工艺[J].食品科学,2004,25(8):121-123.
- [2] 徐桂花,于颖.羊血中超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定[J].肉类工业,2009(1):31-33.
- [3] 于颖,王小丽,徐桂花.响应面分析法优化羊血中SOD的热变性提纯工艺条件[J].肉类研究,2009(11):25-30.
- [4] 邱玉华,杨艳芳,何颖,等.等电点沉淀-超滤提取猪血SOD[J].科技资讯,2008,14:23.
- [5] 金应世,金晓玲.从动物血液提取SOD的工艺流程及技术[J].中国资源综合利用,2000(11):13-14.
- [6] 韩国才.我国马业的新趋势[J].中国动物保健,2005(10):26.
- [7] 邓莉,刘章武,杜金平.响应面法优化鹅血中SOD热变性提纯工艺条件[J].食品工业科技,2011(7):270-273.
- [8] 乌云达来,孙振钧,王冲,等.牛血铜锌超氧化物歧化酶规模化生产工艺研究[J].家畜生态学报,2006,27(5):46-52.
- [9] 许娟娟,赵艳景,胡虹,等.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):1207-1209.
- [10] Douglas C Montgomery,等. Design and Analysis of Experiments [M]. 傅珏生译. 6th Edition. 北京:人民邮电出版社,2009,347-389.