

玉米胚芽超氧化物歧化酶提取及对酒精发酵的影响

赵 华,陶 静

(天津科技大学生物工程学院,天津 300222)

摘 要: 从玉米胚芽提取 SOD 的最佳工艺条件为:100 g 玉米中加入 200 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液,40 ℃浸泡玉米 36 h,淋干后分离胚芽与胚乳,再加入胚芽质量 2 倍的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液破碎后浸提 1 h,离心得 SOD 提取液,总酶活为 22549.0 u;然后添加硫酸铵依次达到饱和度 40 %和 90 %,进行除杂蛋白和盐析,离心后将沉淀冷冻干燥即得到 SOD 粗酶制剂,其比活为 334.6 u/mg 蛋白。将分离后的胚乳和提取 SOD 后的胚芽残渣混合进行酒精发酵,淀粉出酒率达到 53.16 %,证明胚芽 SOD 提取不影响酒精发酵,且可降低酒精的生产成本。

关键词: 玉米;胚芽;超氧化物歧化酶;酒精发酵

中图分类号: TS262.2 ;Q55 ;TS261.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2005)06-0054-04

Extraction of Superoxide Dismutase (SOD) from Maize Embryo and Its Effects on Alcohol Fermentation

ZHAO Hua and TAO Jing

(Bioengineering College of Tianjing Science & Technology University, Tianjing 300222, China)

Abstract: The best technical conditions for the extraction of SOD from maize embryo presented as follows: addition of 200 mL 0.05 mol/L phosphate buffer in 100 g maize, 36 h maize steeping at 40 ℃, then separation of embryosperm and embryo bud, addition of 0.05 mol/L phosphate buffer twofold quantity of embryo bud quantity for 1 h lixiviating, then SOD extracting solution obtained by centrifugation, total enzyme activity as 22549.0 u, then addition of ammonia sulfate until saturation percentage reached 40 % and 90 % in sequence for protein removal and salting out, then after centrifugation and freezing and drying of precipitate, coarse SOD zymyn produced with its specific activity as 334.6 u/mg protein. Alcohol fermentation by mixing separated embryosperm and embryo bud residual after extraction of SOD could achieve 53.16 % liquor yield, which proved that SOD extraction would not influence alcohol fermentation and it could reduce alcohol production cost. (Tran. by YUE Yang)

Key words: maize; germ; superoxide dismutase (SOD); alcohol fermentation

玉米是最具有农业综合经济效益的谷物之一,因此,发展玉米精深加工技术对农业增效、农民增收和提高农业生产整体效益有重要的意义。超氧化物歧化酶(SOD)是广泛存在于动物、植物和微生物中的一种酸性蛋白酶,能催化细胞内超氧化物阴离子(O_2^-)的歧化反应,使 O_2^- 转化为 H_2O_2 和 $O_2^{[1]}$ 。可广泛应用于医药、保健品、化妆品和食品等许多领域^[2],治疗人类多种炎症、放射病、自身免疫性疾病^[3]和抗衰老^[4],对生物体起保护作用。而用玉米生产的酒精作为石油的替代品,拥有广阔的市场前景^[5],值得进一步研究。但是由于产品较单一,综合利用率低,生产成本较高,严重限制了其发展。

本文研究了玉米胚芽提取 SOD 的工艺条件,并考察了利用其玉米残渣进行酒精发酵的可行性,为有效提高玉米综合利用价值,降低玉米燃料酒精生产成本提供了一条可能途径。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米 购于天津市场。

1.2 菌种

耐高温酒精活性干酵母(AADY) 湖北安琪酵母股份有限公司。

1.3 玉米 SOD 粗酶制剂制备

收稿日期 2005-01-18

作者简介 赵华(1963-),男,天津人,天津科技大学生物工程学院,博士,副教授,主要从事微生物发酵。

称取 100 g 玉米,用 pH7.8 的磷酸缓冲液浸泡,淋干后分离胚芽与胚乳,胚芽中加入相同的缓冲液破碎,浸提、离心得上清液,即为 SOD 提取液;然后添加硫酸铵分别达到饱和度 40 % 和 90 % 进行盐析,离心后将沉淀冷冻干燥,即得到 SOD 粗酶制剂。

1.4 分析方法

1.4.1 玉米淀粉含量测定

斐林试剂滴定法^[6]。

1.4.2 酒度的测定

将 500 mL 三角瓶中的成熟发酵醪全部转移入 1000 mL 蒸馏瓶中,再用 100 mL 蒸馏水冲洗三角瓶,洗液全部倒进蒸馏瓶一起蒸馏。接馏出液 100 mL,用酒精计和温度计同时测定酒精度和温度,并查表换算为 20 °C 时的酒精度。

1.4.3 原料出酒率的测定

95 % (v/v) 酒精原料出酒率 (%)

$$= \frac{D \times 0.81144}{95} \times \frac{100}{W} \times 100$$

式中 D ——试样在 20 °C 时的酒精度, % (v/v);

0.81144——95 % (v/v) 酒精 (20 °C) 的比重;

W ——原料重量, g。

1.4.4 淀粉出酒率的测定^[7]

淀粉出酒率 (%)

$$= \text{原料出酒率} (\%) \div \text{淀粉含量} (\%) \times 100 \%$$

1.4.5 SOD 酶活性的测定

改良的邻苯三酚自氧化法^[8]。以 SOD 标准样作酶活标准曲线,测定 $OD_{325 \text{ nm}}$ 的值,得到样品 SOD 活力 (u/mL)。SOD 比活力 (u/mg) = SOD 活力 (u/mL) $\div$ 蛋白质含量 (mg/mL)。

1.4.6 蛋白质含量的测定

Folin-酚测定法^[9]。

2 结果与讨论

2.1 玉米 SOD 提取浸泡条件的确定

2.1.1 浸泡对玉米胚芽提取 SOD 的影响

浸泡过程为玉米提供适宜的 pH 值,诱导 SOD 的产生,对玉米 SOD 提取有较大的影响。根据文献^[10],^[11]用 pH7.8 磷酸缓冲液浸泡玉米,然后将胚芽与胚乳分离,从胚芽中提取 SOD。运用响应面分析方法^[12]考察磷酸缓冲液浓度 (X_1)、添加量 (X_2) 及浸泡温度 (X_3)、时间 (X_4) 对玉米胚芽提取 SOD 总酶活 (Y) 的影响,实验方案设计及实验结果见表 1。

根据表 1 结果,运用 SAS 软件进行回归分析,结果显示磷酸缓冲液的添加量和浸泡时间对 SOD 提取的影响很显著,浸泡液浓度和浸泡温度的影响较显著,因变

表1 浸泡条件实验方案设计及实验结果

RUN	X_1 磷酸 缓冲液浓度 (mol/L)	X_2 液 料比 (mL:g)	X_3 浸泡 温度 (°C)	X_4 浸泡 时间 (h)	Y总 酶活 (u)
1	0.05	1:1	40	36	13121
2	0.05	3:1	40	36	7161
3	0.2	1:1	40	36	10002
4	0.2	3:1	40	36	4810
5	0.125	2:1	25	12	4873
6	0.125	2:1	25	60	1683
7	0.125	2:1	55	12	3884
8	0.125	2:1	55	60	1342
9	0.05	2:1	40	12	8748
10	0.05	2:1	40	60	4100
11	0.2	2:1	40	12	7144
12	0.2	2:1	40	60	3096
13	0.125	1:1	25	36	4869
14	0.125	1:1	55	36	3902
15	0.125	3:1	25	36	2435
16	0.125	3:1	55	36	1951
17	0.05	2:1	25	36	11922
18	0.05	2:1	55	36	9773
19	0.2	2:1	25	36	9433
20	0.2	2:1	55	36	7561
21	0.125	1:1	40	12	4233
22	0.125	1:1	40	60	1757
23	0.125	3:1	40	12	2116
24	0.125	3:1	40	60	879
25	0.125	2:1	40	36	17905
26	0.125	2:1	40	36	17905
27	0.125	2:1	40	36	17905

量与全体自变量之间的线性关系显著 ($p < 0.05$, $R^2 = 0.9643$), 所得回归方程为:

$$Y = -74743.1 + 87730.74X_1 + 27446.83X_2 + 2255.115X_3 + 1052.062X_4 - 407718.5X_1^2 - 7247.792X_2^2 - 24.6613X_3^2 - 15.48683X_4^2$$

预测最佳浸泡条件为: 磷酸缓冲液浓度为 0.05 mol/L, 添加量为玉米质量的 2 倍, 浸泡温度 40 °C, 浸泡时间 36 h, 最终从 100 g 玉米的胚芽中提取 SOD 总酶活为 22076 u。由此可见, 用 pH7.8 磷酸缓冲液浸泡玉米有利于诱导玉米产生 SOD, 但高浓度缓冲液中含较多的磷酸盐, 又会对玉米 SOD 的诱导有一定的抑制作用。缓冲液添加量较小时, 玉米浸泡不充分, 不利于诱导 SOD 的生成, 也无法维持浸泡液 pH 值的稳定, SOD 酶活较低。但又由于 SOD 会渗透到浸泡液中, 造成损失, 因此添加量不宜过大。温度过高可能会加速 SOD 的失活, 降低 SOD 的提取量。

2.1.2 浸泡时间对玉米淀粉含量及浸泡液 pH 值的影响

浸泡时间对玉米胚芽 SOD 提取的影响非常显著,

而且浸泡时间的长短直接决定了生产周期的长短。同时淀粉含量直接影响酒精发酵出酒率,用于酒精发酵的胚乳中的淀粉损失主要在浸泡阶段,因此,分别考察不同浸泡时间下的玉米淀粉含量和浸泡液 pH 值,结果见图 1。

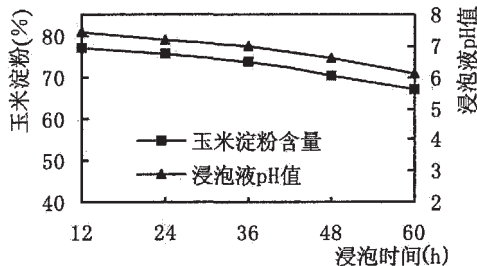


图 1 浸泡时间对玉米淀粉含量及浸泡液 pH 值的影响

由图 1 可知,随着浸泡时间的延长,浸泡液的 pH 值呈下降趋势。浸泡 36 h 后,pH 值下降速度较快,浸泡液呈酸性,SOD 易失活。其主要原因可能是随着浸泡时间的延长,浸泡液中杂菌的数量不断增加,从而产生一定量的酸,使溶液的 pH 值不断降低。而玉米淀粉含量也随着浸泡时间的延长不断降低,且在 36 h 后下降速度加快,说明 36 h 后玉米淀粉损失较多。根据 2.1.1 的结果,36 h 时玉米胚芽 SOD 提取量最大,因此,确定 36 h 为最佳浸泡时间。

2.2 浸提条件对玉米胚芽提取 SOD 的影响

浸提条件影响玉米胚芽提取 SOD 的主要因素包括浸提液的浓度、添加量和浸提时间等,选用 pH7.8 磷酸缓冲液作为浸提液,采用正交实验设计确定浸提的最佳条件,实验结果以玉米胚芽提取 SOD 总酶活表示,结果见表 2。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

实验号	A 磷酸缓冲液浓度(mol/L)	B 料液比	C 浸提时间(h)	SOD 总酶活(u)
1	0.05	1:1.5	1	14549
2	0.05	1:2	2	16740
3	0.05	1:3	3	13139
4	0.1	1:1.5	2	10896
5	0.1	1:2	3	13719
6	0.1	1:3	1	18575
7	0.2	1:2	1	19621
8	0.2	1:1.5	3	14793
9	0.2	1:3	2	9922
K_1	14809	15022	15972	
K_2	14397	15084	12519	
K_3	14778	13878	15493	
R	413	1205	3453	

由表 2 可知,R 值的大小分别为 $C>B>A$,浸提时间对 SOD 提取的影响很显著,浸提液添加量的影响较显著,各因素的最佳组合为 $A_1B_2C_1$,即磷酸缓冲液浓度

0.05 mol/L、添加量为玉米胚芽质量的 2 倍、浸提时间 1 h,根据最优组合提取 SOD,最终从 100 g 玉米中得到 SOD 的总酶活为 22549 u。由此可见,玉米 SOD 在低浓度的缓冲液中有较高的溶解度,利于从玉米胚芽中分离,而磷酸缓冲液用量大时,浸提液中 SOD 浓度降低,造成磷酸盐对 SOD 的影响增大,使 SOD 回收率降低。同时 SOD 在空气中暴露的时间不宜过长,不然 SOD 会与空气中的氧反应,使 SOD 提取量减少。

2.3 玉米胚芽 SOD 的提取

在玉米胚芽 SOD 提取液中依次添加硫酸铵至饱和度 40 %和 90 %,进行除杂蛋白和盐析,离心后的沉淀冷冻干燥,即得到 SOD 粗酶制剂。测定 SOD 的酶活力和蛋白质含量,结果见表 3。

表 3 玉米胚芽 SOD 提取

项目	总酶活(u)	总蛋白(mg)	纯化倍数	回收率(%)
提取液	22549.0	385.9	1.0	100
除杂蛋白液	20206.5	91.41	3.8	89.6
盐析 SOD 粗酶产品	16889.2	50.48	5.7	74.9

由表 3 可知,从玉米胚芽中提取 SOD 的比活达到 334.6 u/mg 蛋白,活力回收率 74.9 %。从提取结果看出,胚芽虽只占玉米的 11.86 %,但其 SOD 的含量为整粒提取 SOD(酶活 38078 u)的 60 %左右。与用整粒玉米提取 SOD 相比,用胚芽提取 SOD 投资小,辅料用量少,可有效降低玉米胚芽 SOD 提取的生产成本。

2.4 玉米胚芽 SOD 提取对酒精发酵的影响

2.4.1 SOD 提取对酒精发酵的影响

玉米胚芽 SOD 提取过程中,使用了大量的磷酸缓冲液,胚乳及提取 SOD 后的胚芽残渣中均有一定的残留,考察其对酒精发酵的影响,并以淀粉出酒率衡量其发酵程度,与对照样比较,结果见图 2。

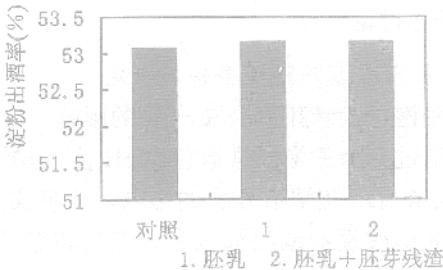


图 2 玉米胚芽 SOD 提取对淀粉出酒率的影响

由图 2 可知,用分离后的胚乳及提取 SOD 后的胚芽残渣进行酒精发酵,其淀粉出酒率与对照样基本一致,而且略有提高。说明玉米胚芽 SOD 提取对酒精发酵没有影响。而且浸泡后玉米易于粉碎和糖化酶对淀粉的水解,有利于提高酒精发酵的淀粉利用率。

2.4.2 玉米胚芽 SOD 提取对原料出酒率的影响

玉米胚芽 SOD 提取过程中,玉米中淀粉含量会有一定的损失。以 50 g 玉米为基准,考察 SOD 提取对原料出酒率的影响,结果见表 4。

表 4 玉米胚芽 SOD 提取对原料出酒率的影响

项 目	酒度 (20℃)	原料出酒率 (%)
对照	20.8	35.53
胚乳	19.9	34.00
胚乳+胚芽残渣	20.6	35.19

由表 4 可知,对照样原料出酒率为 35.53 %,只用分离后的胚乳进行酒精发酵的原料出酒率仅为 34.00 %,相差 1.53 %,而将提取 SOD 后的胚芽残渣与胚乳混合进行酒精发酵,原料出酒率达到 35.19 %,只比对照样低 0.34 %。以年处理 10 万吨玉米的酒精厂计算,每年虽然少生产 95 % (v/v) 的酒精 340 t,但能副产比活为 334.6 u/mg 蛋白的 SOD 酶制剂 760 t。由此可以证明,将玉米胚芽 SOD 提取与现行酒精发酵耦联是可行的。

3 结论

为了提高玉米综合利用率,选择从玉米胚芽中提取 SOD,并将提取 SOD 后的胚芽残渣与胚乳一起进行酒精发酵是可行的。从玉米胚芽提取 SOD 的最佳工艺条件为:用玉米质量 2 倍的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 40 ℃浸泡玉米 36 h,淋干后分离胚芽与胚乳,再加入胚芽质量 2 倍的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液破碎后浸提 1 h,离心得 SOD 提取液;然后添加硫酸铵依次达到饱和度 40 %和 90 %,进行除杂蛋白和盐析,离心后将沉淀冷冻干燥,即得到 SOD 粗酶制剂,其比活为 334.6 u/mg 蛋白。将分离后的胚乳和提取 SOD 后的胚芽残渣进行酒精发酵,淀粉出酒率为 53.16 %。

参考文献:

[1] Joe M. McCord and Irwin Fridovich. Superoxide Dismutase:

An Enzymic Function for Erythrocyte[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1969, 244(22) 6049-6065.

[2] Gartner A, Haitmann HJ, Weses U. A Simple, Rapid and Efficient Isolation of Erythrocyte Cu,Zn-superoxide Dismutase [J]. Biochem. J., 1984, 221 549-551.

[3] Fridovich, I. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant. Annu. Rev[J]. Pharmacol. Toxicol, 1983, 23 239-257.

[4] Tolmasoff, J.M., Ono, T., Cutler, R.G. Superoxide Dismutase: Correlation with Life-span and Specific Metabolic Rate in Primate Species[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77: 2777-2781.

[5] 高寿清. 燃料酒精发展的国际情况与分析[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(12) 59-62.

[6] 肖冬光, 赵华, 赵树欣, 等. 酒用酸性蛋白酶在酒精生产中应用技术的研究[J]. 酿酒科技, 2000, (2) 35-38.

[7] 天津轻工业学院, 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.

[8] Raffaele Cannio, Anna D'Angelo, Mosè Rossi et al. A Superoxide Dismutase from the Archaeon Sulfolobus Solfataricus is an Extracellular Enzyme and Prevents the Deactivation by of Superoxide Cell-bound Proteins[J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(1) 235-243.

[9] Marklund, S. & Marklund, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase[J]. Eur. J. Biochem, 1974, 47: 469-474.

[10] 谢岩黎, 李元瑞. 大蒜细胞质中超氧化物歧化酶的分离纯化[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(2) 34-37.

[11] Mingyi Jiang, Jianhua Zhang. Effect of Abscissic Acid on Active Oxygen Species, Antioxidative Defence System and Oxidative Damage in Leaves of Maize Seedlings[J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42(11): 1265-1273.

[12] Myers R H, Montgomery D C. Response Surface Methodology[M]. New York: John Wiley and Sons, 1995.

酿酒科技杂志社邮购书刊

书刊名	邮购价	书刊名	邮购价
《酿酒科技精选 (1980~1985)》	20 元/册	《酿酒科技》2005 年 (月刊)	96 元/年
《酿酒科技》1999 年合订本	60 元/册	《酿酒活性干酵母的应用与生产技术》	12 元/册
《酿酒科技》2000 年合订本	65 元/册	《世界蒸馏酒的风味》	6 元/册
《酿酒科技》2001 年合订本	70 元/册	《中国酒曲》	35 元/册
《酿酒科技》2002 年合订本	75 元/册	《生料酿酒技术》	42 元/册
《酿酒科技》2003 年合订本	80 元/册	《酿酒技术》世纪光盘 (1980~2000 年)	380 元/套
《酿酒科技》2004 年合订本	80 元/册		

需订阅以上书刊者, 请直接汇款到本刊社邮购。地址: 贵州省贵阳市沙冲中路 58 号 (550002); 电话: (0851) 5796163; 传真: (0851) 5776394; 联系人: 吴萍