

邻苯三酚自氧化法测定甲烷氧化菌素-铜配合物的超氧化物歧化酶活性

陈林林^{1*}, 张伟¹, 王振兴¹, 辛嘉英^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学省高校食品科学与工程重点实验室, 哈尔滨 150076; 2. 中国科学院兰州化学物理研究所
羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要: **目的** 建立甲烷氧化菌素(methanobactin, Mb)-铜配合物(Mb-Cu)模拟超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的邻苯三酚自氧化体系分析方法。**方法** 利用 HP 20 大孔树脂从甲基弯菌 IMV3011 发酵液中分离纯化得到 Mb, 制备 Mb-Cu 测定其具有的 SOD 活性, 利用紫外光谱分析对 SOD 邻苯三酚测定法进行系统研究。考察缓冲液浓度、邻苯三酚浓度、Mb-Cu 浓度、EDTA-Na₂ 浓度、pH 值和温度等对 Mb-Cu 模拟 SOD 活性的影响。**结果** 在 Mb-Cu 浓度为 0.8 mg/L, Tris-HAC 缓冲溶液为 0.05 mol/L(其中缓冲溶液的 pH 值为 8.2、EDTA-Na₂ 的浓度为 2 mmol/L), 邻苯三酚浓度为 0.363 mmol/L, 温度为 20 °C 时, 邻苯三酚的自氧化速率相对较低, 此时 Mb-Cu 对超氧阴离子自由基(O₂⁻)的抑制率较高, 以此建立 Mb-Cu 模拟 SOD 活性的邻苯三酚自氧化分析方法。发现 Mb-Cu 符合影响生物催化剂条件的一般规律, 但比生物酶具有更高的热稳定性。**结论** Mb-Cu 可作为清除 O₂⁻ 的 SOD 模拟酶, 本试验建立的分析条件是最佳反应体系。

关键词: 甲烷氧化菌素; 甲烷氧化菌素-铜配合物; 超氧化物歧化酶; 邻苯三酚自氧化法; 超氧阴离子自由基

Determination of superoxide dismutase activity in methanobactin-copper complexes by pyrogallol autoxidation

CHEN Lin-Lin^{1*}, ZHANG Wei¹, WANG Zheng-Xing¹, XIN Jia-Ying^{1,2}

(1. Local Key Laboratory of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;
2. State Key Laboratory of Oxo Synthesis & Selective Oxidation Lanzhou Institute of Chemical Physics,
Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of superoxide dismutase (SOD) activity in methanobactin (Mb)-copper complex (Mb-Cu) by pyrogallol autoxidation system. **Methods** Mb was isolated and purified by macroporous resin HP20 from *Methylosinus trichosporium* IMV3011 fermented fluid. Mb-Cu was prepared and its SOD activity was determined with the pyrogallol autoxidation system by ultraviolet spectrum analysis, systematically. The effects of buffer concentration, pyrogallol concentration, Mb-Cu concentration, EDTA-Na₂ concentration, pH value and temperature on the mimic of SOD were investigated. **Results** When the

基金项目: 国家自然科学基金项目(21573055)、哈尔滨市应用技术与开发项目(2014RFQXJ115)、哈尔滨商业大学研究生创新科研基金项目(YJSCX2017-461HSD)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21573055), Research and Development Project of Applied Technology of Harbin (2014RFQXJ115) and The Project for Graduate Students Innovative of Research Fund in Harbin University of Commerce (YJSCX2017-461HSD)

***通讯作者:** 陈林林, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为食品生物催化与转化。E-mail: chenlinl2013@126.com

***Corresponding author:** CHEN Lin-Lin, Associate Professor, School of Food Science and Technology, Local Key Laboratory of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China. E-mail: chenlinl2013@126.com

concentration of Mb-Cu was 0.8 mg/L, concentration of Tris-HAC buffer was 0.05 mol/L (the buffer pH value was 8.2 and the concentration of EDTA-Na₂ was 2 mmol/L), pyrogallol concentration was 0.363 mmol/L under temperature of 20 °C, the autoxidation rate of pyrogallol was relatively low and the inhibition rate on superoxide anion radical was higher. The method for determination of mimic of SOD of Mb-Cu based on the pyrogallol autoxidation system was established. It was found that Mb-Cu was in accordance with the general rule of the biocatalyst conditions influenced, but had higher thermal stability than other biological enzymes. **Conclusion** Mb-Cu can be used as mimic of SOD for scavenging O₂⁻, and the optimal reaction system suitable for the analysis conditions are established in this article.

KEY WORDS: methanobactin; methanobactin-copper complex; superoxide dismutase; pyrogallol autoxidation; superoxide anion radical

1 引言

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是生物体内的抗氧化酶,能够清除体内的超氧阴离子自由基,从而可以预防或治疗疾病,减缓衰老^[1]。但天然存在的SOD在体外存活时间短,较难被人体吸收利用^[2]。目前人工合成的SOD模拟酶通常以卟啉^[3]、酞菁^[4]或Schiff碱配合物^[5,6]作为配体,但由于天然酶结构的复杂性和SOD催化氧化酚类物质反应机理的复杂性,根据酶活性中心相似结构设计合成的模拟酶化合物通常存在活性低、专一性差、配合物溶解性差及污染环境等问题。甲烷氧化菌素(methanobactin, Mb)是由甲烷氧化菌产生的与捕获和吸收铜有关的生物螯合剂^[7]。Kim等^[8]在2004年首次从严格限制铜的甲基弯菌(*Methylosinus trichosporium*) OB3b培养物中分离纯化出了经验分子式为C₄₅H₁₂O₁₄H₆₂Cu,分子量为1200 Da左右的Mb。Choi等^[9]发现,Mb结合铜返回细胞后参与了颗粒性甲烷单加氧酶(particulate methane monooxygenase, pMMO)催化甲烷氧化,同时增加了流向pMMO中心Cu²⁺的电子量,并且具有催化O₂⁻为H₂O₂的SOD活性。2011年,辛嘉英等^[10]发现*M. trichosporium* 3011的Mb只有与铜结合时才能表现出SOD活性。

在酶模拟化学中,SOD的模拟已经引起了研究者的极大兴趣。相对超氧化物酶,甲烷氧化菌素-铜配合物(Mb-Cu)因具有SOD的活性,可以通过培养微生物获得,易大规模工业化生产,不受季节与自然条件限制,而且生产成本低,因此有着更广阔的应用前景^[11,12]。而且Mb是个小肽,分子量更小、结构更稳定、更易于吸收,可以替代SOD作为食品添加剂应用于食品领域。

本文以甲基弯菌*M. trichosporium* IMV 3011作为实验菌种进行培养,获得Mb-Cu,通过考察Mb-Cu模拟SOD抑制超氧阴离子产生的反应,评价Mb-Cu模拟SOD酶活性效果。利用紫外光谱分析Mb-Cu对邻苯三酚体系自氧化产生超氧阴离子的自氧化速率和抑制率,建立邻苯三酚自

氧化体系的Mb-Cu模拟SOD活力的分析条件,为Mb-Cu作为SOD模拟酶的应用提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); Z-16K 高速冷冻离心机(美国Sigma公司); 6507 5BG 全自动发酵罐(上海保兴生物工程设备有限公司); LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); DHG-9203A 电热恒温鼓风干燥箱(上海-恒科学仪器有限公司); SHB-IV 双A 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); HNY-100B 恒温培养振荡器(天津市欧诺仪器仪表有限公司); BLB10-HYG-J2 生物反应摇床(上海百仑生物科技有限公司); 2-16K 冷冻干燥机(日本东京理化公司)。

Diaion HP-20 大孔吸附树脂(北京飞美斯分析科技有限公司); 甲基弯菌 *M. trichosporium* IMV 3011 由俄罗斯科学院催化研究所提供; 超氧化物歧化酶(酶活力 3000 U/mg, 上海金穗生物科技有限公司)。

乙二醇四乙酸(分析纯,天津市天力化学试剂有限公司); 邻苯三酚(分析纯,天津市光复精细化工研究所); 三羟甲基氨基甲烷(分析纯, Solarbio 公司); 乙醇、硫酸铜、冰醋酸(分析纯,天津市天力化学试剂有限公司)。

2.2 试验方法

2.2.1 甲烷氧化菌的培养

以 *M. trichosporium* IMV3011 为实验菌种,培养于限铜无机盐培养基,培养基储备液分别为A液与B液,其组成成分参照文献^[13]方法配制。配制的培养基分装于带有换气胶管的丝口瓶中,置于121 °C、0.1 MPa 高压蒸汽灭菌锅中灭菌20 min。高压蒸汽灭菌后,将装有培养基的丝口瓶置于超净工作台,紫外杀菌20 min,冷却至室温。接种量为培养基10%(V/V)接种,控制培养温度为30 °C,发酵罐搅拌桨转速为180 r/min,空气流量为0.5~0.8 L/min。以甲

醇为碳源,通过甲醇流加控制监测器自动控制发酵培养基中甲醇浓度为 0.1%(V/V),培养周期为 5 d。

2.2.2 Mb-Cu 的制备

将甲烷氧化菌发酵液于 4 ℃下以 8000 r/min 转速离心,取上层清液,通过 CAS 分光光度法测定 Mb 含量^[14]。以摩尔比 Mb:Cu²⁺=1:1 的比例添加硫酸铜溶液,静置 24 h 以使 2 者完全缔合,采用动态吸附法使用活化的 Diaion HP-20 大孔吸附树脂(1.1 cm×80 cm 层析柱)进行吸附,用蒸馏水除去未被吸附的杂质,再用 60%乙醇洗脱吸附的 Mb-Cu。洗脱液于 40 ℃旋转蒸发后,经冷冻干燥后获得 Mb-Cu 并置于-20 ℃冰箱中储存备用。

2.2.3 Mb-Cu 模拟 SOD 活性

在 25 ℃恒温的环境下,向 Tris-HAc 溶液中加入邻苯三酚溶液,立即混匀,迅速倒入比色杯中,每 20 s 用紫外光谱检测 1 次在 318 nm 处的吸光值,记录该扫描曲线的斜率 k_0 ,此值为邻苯三酚的自氧化速率 V_0 。在另一试管中加入上述试剂,操作同上,只是在加入邻苯三酚前加入 Mb-Cu 溶液并减少同体积双蒸水,保持总体积不变,记录此曲线的斜率为 k_s 。进一步可以求出样品对邻苯三酚自氧化的抑制率 V_s ^[15,16]。Mb-Cu 与 SOD 的自氧化速率及抑制率测定加样见表 1。

表 1 Mb-Cu 与 SOD 的自氧化速率及抑制率测定加样表

Table 1 Addition of sample for determination of the autoxidation rate and inhibition rate of Mb-Cu and SOD

试剂	空白组	自氧化组	对照组	样品组
Tris-HAc(mL)	6.0	6.0	6.0	6.0
邻苯三酚(mL)	—	0.02	—	0.02
Mb-Cu(mL)	—	—	0.04	0.04
SOD(mL)	—	—	0.04	0.04
双蒸水(mL)	0.2	0.18	0.16	0.16

Mb-Cu 对邻苯三酚自氧化的抑制率(percentage supperession, PS)可由公式(1)^[16]计算:

$$PS(\%) = 100 \times \frac{V_0 - V_s}{V_0}$$

(1)

其中: V_0 为邻苯三酚自氧化速率, s^{-1} ;
 V_s 为加入样品后自氧化速率, s^{-1} ;
 PS 为抑制率, %。

酶活力单位的概念: 在 25 ℃恒温的环境条件下, 每 1 mL 反应溶液中, 每分钟对邻苯三酚的自氧化的抑制率达 50% 的酶的含量为 1 个酶活单位^[16]。

$$\text{Mb-Cu 活力 } U = \frac{(PS - PS') \times 100\%}{50\% \times PS} \times 6.2 \times \frac{1}{V} \times D$$

(2)

式中: PS : 邻苯三酚自氧化速率;

PS' : 样液及 Mb-Cu 液抑制邻苯三酚自氧化速率;

V : 所加酶液或样液体积, mL;

6.2: 反应液总体积, mL;

D : 酶液或样液稀释倍数。

3 结果与分析

3.1 紫外光谱分析时间的确定

0.05 mol/L 的 Tris-HAc(pH 8.2)缓冲溶液 6 mL, 预热至 25 ℃, 加入 20 μ L 0.15 mol/L 的邻苯三酚, 充分摇匀, 以缓冲溶液为空白每隔 20 s 测定吸光值。其结果如图 1 所示。

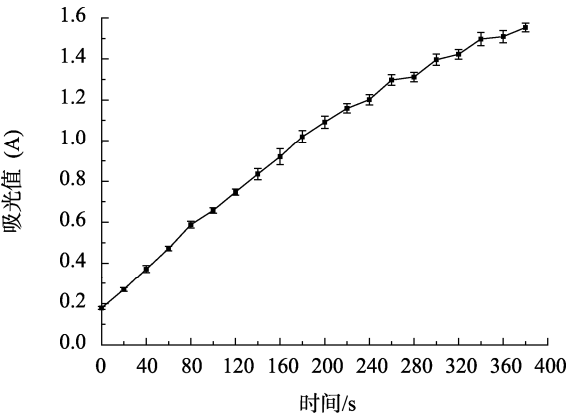


图 1 邻苯三酚自氧化紫外吸收变化曲线($n=3$)

Fig. 1 Ultraviolet absorption changes curve of pyrogallol autoxidation ($n=3$)

在一定的浓度范围内, 邻苯三酚自氧化反应会随着时间的积累, 产物逐渐增加, 到一定量后达到最大值, 然后反应中止。由图 1 知, 在 0~200 s 之内, 邻苯三酚所产生的对紫外光谱的吸收强度随着时间的增加而呈线性增大明显, 在 200~400 s, 其产物的吸光值呈曲线型变化, 吸光值波动, 自氧化体系不稳定, 无法确定其线性关系, 在此时间范围内测定会对实验数据的造成较大的误差。考虑到反应初期吸光值与时间具有较好的线性关系, 因此将邻苯三酚自氧化体系紫外光谱分析的时间控制到 0~80 s 之内, 由图 2 可知, 对其曲线图中呈线性的部分即(0~80 s)做线性回归: $A=0.03312t+0.92457$, $R^2=0.9805$, 线性关系显著。其斜率即为自氧化速率。

3.2 Mb-Cu 模拟 SOD 活性邻苯三酚自氧化体系的建立

3.2.1 缓冲溶液 pH 值对自氧化速率及抑制率的影响

溶液的 pH 值可以显著的影响邻苯三酚反应体系的碱性环境, 因此固定反应体系的其他条件为温度为 25 ℃、缓冲溶液浓度为 0.05 mol/L(其中 EDTA- Na_2 为 2 mmol/L)、

Mb-Cu 浓度为 1.0 mg/L、邻苯三酚浓度为 0.363 mmol/L, 测定不同 pH 值(7.8、8.0、8.2、8.4、8.6)下邻苯三酚自氧化速率及对超氧阴离子自由基的抑制率, 总体积固定为 6.2 mL。结果如图 2 所示。

由图 2 可知, 随着 pH 值的逐渐增大, 自氧化组邻苯三酚的自氧化速率明显加快, 这可能与 pH 值增大时, 邻苯三酚的酚羟基中 H 离子更易解离, 形成的带电基团能量较高不稳定, 而易被氧化有关。与自氧化组相比, Mb-Cu 样品组的邻苯三酚自氧化速率波动较大, pH 值在 7.8~8.0 之间 Mb-Cu 样品组的邻苯三酚自氧化速率开始上升, 但 pH 值为 8.2 时, 邻苯三酚的自氧化速率明显降低。而 Mb-Cu 样品组对超氧阴离子自由基的抑制率是先随着 pH 值增大而降低, 在 8.0~8.6 之间, 抑制率平缓上升后下降。在 pH 值为 7.8 时, 虽然 Mb-Cu 样品组的抑制率很高, 但是邻苯三酚自氧化速率过低, 不便吸光值的读数, 检测的灵敏度较低; pH 值为 8.6 时, 虽然邻苯三酚的自氧化速率很高, 但抑制率较低, 导致检测的灵敏度也较低; 当 pH 值为 8.2 时, Mb-Cu 对邻苯三酚抑制率为 32%, 是该范围内的峰值。综合考虑选择 pH 值为 8.2 的 Tris-HAC 缓冲溶液。

3.2.2 EDTA-Na₂ 的加入量对自氧化速率及抑制率的影响

由于 Fe²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Zn²⁺等金属离子可明显催化邻苯三酚的自氧化, 其中 Fe²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺会使邻苯三酚自氧化产物的信号增加^[17], 所以需要加入 EDTA 消除金属离子的干扰, 固定反应体系其他条件, 测定不同 EDTA-Na₂ 加入量(0、0.5、1.0、2.0、3.0 mmol/L)对邻苯三酚自氧化速率及抑制率的影响, 结果如图 3 所示。

由图 3 可知, 由于金属离子会使邻苯三酚自氧化产物的信号增强约 1.3 倍^[17], 而 EDTA 的加入可消除此影响。随着 EDTA-Na₂ 浓度的逐渐增大, 自氧化组邻苯三酚的自氧化速率有所增加, 但变化不明显, 在 EDTA-Na₂ 大于 2 mmol/L 时自氧化速率变化趋于平缓, 说明自氧化组中自氧化速率受 EDTA-Na₂ 浓度的变化影响较小。在 EDTA-Na₂

浓度较低时, Mb-Cu 样品组的邻苯三酚自氧化速率及对超氧阴离子自由基的抑制率都较低, 这是因为 EDTA-Na₂ 浓度较低时, 体系里全部的金属离子并没有全部被络合, 残余的金属离子的催化作用与 Mb-Cu 的抑制作用产生拮抗作用使得邻苯三酚的自氧化速率和 Mb-Cu 对超氧阴离子自由基抑制率偏低。且 EDTA-Na₂ 的浓度在 0~1.0 mmol/L 之间, 邻苯三酚的自氧化速率和 Mb-Cu 对邻苯三酚抑制率波动较大, 这样会使测定方法的灵敏度下降。随着 EDTA-Na₂ 浓度的上升, Mb-Cu 样品组的邻苯三酚的自氧化速率及对超氧阴离子自由基抑制率都有所升高, 这是在高浓度 EDTA-Na₂ 情况下, Mb-Cu 样品组体系中的全部金属离子被络合, 此时邻苯三酚的自氧化速率下降, 从而 Mb-Cu 对超氧阴离子自由基的抑制率上升。但当 EDTA-Na₂ 浓度 2.0 mmol/L 时, 由于 Mb-Cu 中的 Cu 离子与 Mb 结合过程中构型方式改变, 在此过程中的 Cu 离子与过量的 EDTA-Na₂ 络合, 致使 Mb 与 Cu 的构型从四构型转化成二构型, 进而 Mb-Cu 的 SOD 酶活性降低。从大体上看, 该反应体系偏差在测定值的 0.2% 左右, 重现性较好 ($P < 0.05$)。同时, EDTA-Na₂ 浓度为 2.0 mmol/L 时, Mb-Cu 模拟 SOD 对超氧阴离子自由基的抑制率最高。故选择 EDTA-Na₂ 浓度最佳浓度为 2.0 mmol/L。

3.2.3 缓冲溶液浓度对自氧化速率及抑制率的影响

为了让邻苯三酚自氧化反应能够在弱碱环境中持续有效的进行, 必须加入缓冲溶液。若选用 Tris-HCl, 其中的 Cl⁻ 会与 Cu²⁺ 结合而影响实验的测定, 因此选用对 Cu²⁺ 无影响的冰醋酸^[18]。因不同浓度的缓冲溶液的反应体系的酸碱程度不同, 配制含 50 mol/L 邻苯三酚 0.1 mL、1.0 mg/L Mb-Cu 10 mL 和不同浓度(0.01、0.05、0.10、0.20、0.30 mol/L)Tris-HAc 缓冲溶液(pH 8.2, 含有 2 mmol/L EDTA-Na₂)50 mL 的系列溶液, 考察改变缓冲溶液浓度对邻苯三酚自氧化速率及抑制率的影响, 结果如图 4 所示。

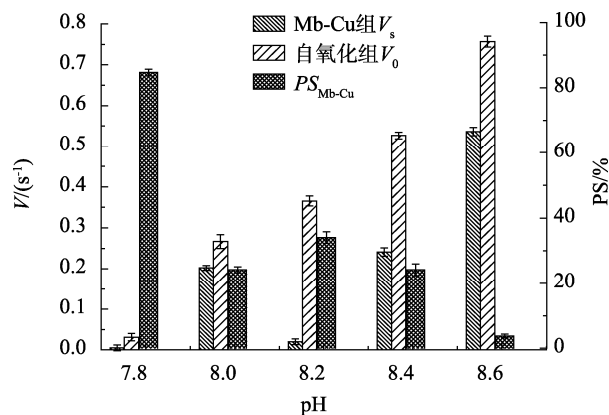


图2 pH 值对自氧化及抑制率的影响($n=3$)

Fig. 2 Effect of pH value on autoxidation and inhibition rates ($n=3$)

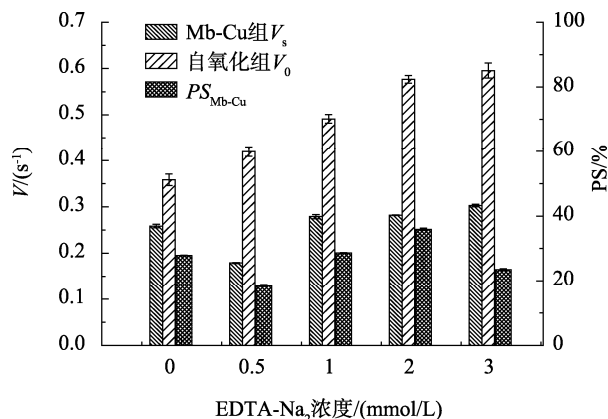


图3 EDTA-Na₂ 浓度对自氧化及抑制率的影响($n=3$)

Fig. 3 Effect of EDTA-Na₂ concentration on autoxidation and inhibition rates ($n=3$)

由图4可知,随着缓冲溶液浓度的升高,自氧化组的自氧化速率呈先增后减的趋势,而Mb-Cu样品组的自氧化速率呈逐渐增大趋势,Mb-Cu对邻苯三酚自氧化抑制率逐渐降低。缓冲浓度从0.01 mol/L到0.05 mol/L时自氧化速率变化明显,说明在缓冲溶液浓度增加的过程中邻苯三酚自氧化受到的限制不明显;同时,抑制率虽然下降但是相对于自氧化速率并不明显,且在缓冲溶液浓度发生改变时,未加入Mb-Cu的空白样品中邻苯三酚自氧化程度也在相应下降。当缓冲溶液浓度为0.01 mol/L时Mb-Cu对超氧阴离子自由基的抑制率最大,但此浓度下的邻苯三酚的自氧化速率太小,此时的反应比较弱,所产生的中间产物发出的紫外光谱强度弱,测定时反应灵敏度不高。因此,综合上述考虑,缓冲溶液浓度选择0.01 mol/L为宜。

3.2.4 邻苯三酚的浓度对自氧化速率及抑制率的影响

邻苯三酚浓度可对其自氧化产物的浓度产生影响,从而影响紫外光谱分析的灵敏度。因此固定缓冲溶液0.05 mol/L Tris-HAC pH=8.2、2 mmol/L EDTA- Na_2 、Mb-Cu浓度为0.8 mg/L,通过改变邻苯三酚的浓度(0.242、0.363、0.484、0.544、0.726 mmol/L),比较其对自氧化速率及抑制率的影响。结果如图5所示。

从图5可以看出,自氧化组不同的邻苯三酚浓度对自氧化速率有影响,Mb-Cu样品组的自氧化速率及受Mb-Cu的抑制情况也与其浓度直接相关,在其浓度较低时,随着浓度的升高,自氧化速率下降明显;但当浓度过高时,自氧化速率不再下降。当邻苯三酚浓度为0.242 mmol/L时,其自氧化速率最低,且Mb-Cu对超氧阴离子自由基的抑制率最高,但邻苯三酚在此浓度下时自氧化速率波动较大,测定的灵敏度下降。所以选择邻苯三酚浓度为0.363 mmol/L,该浓度相当于向反应体系中加入0.05 mol/L邻苯三酚40 μL 。

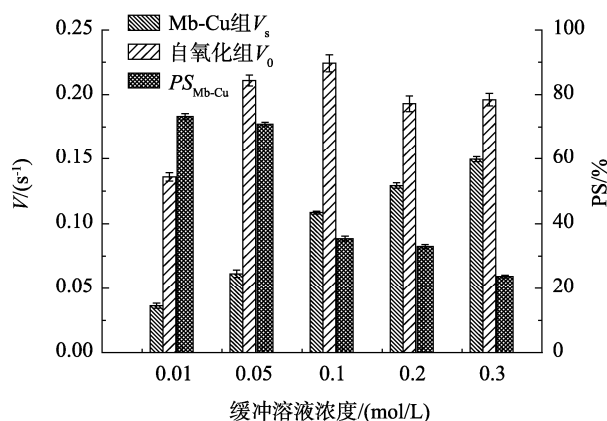


图4 Tris-HAc浓度对邻苯三酚自氧化速率及抑制率的影响($n=3$)

Fig. 4 Effect of Tris-HAc concentration on autoxidation and inhibition rates of pyrogallol ($n=3$)

3.2.5 温度对自氧化速率及抑制率的影响

温度可影响Mb-Cu模拟SOD的活性,在以确定好的最佳反应条件下,分别选择15、20、25、30、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 作为每一个反应的不同启动温度,考察不同启动温度下邻苯三酚的自氧化速率和Mb-Cu的抑制率。结果如图6所示。

由图6可知,随着反应温度的升高,自氧化组的自氧化速率大大增加,但Mb-Cu样品组自氧化速率变化不明显,且Mb-Cu对超氧阴离子自由基的抑制率当温度高于20 $^{\circ}\text{C}$ 有所降低,原因可能与过高的温度使Mb-Cu内部结构破坏,导致其活性降低有关,且超氧阴离子自由基在高温情况下不稳定,与此同时此反应的伴随产物—带色中间产物也会因为超氧阴离子含量的变化而产生变化。当温度为20 $^{\circ}\text{C}$ 时,此时Mb-Cu对超氧阴离子自由基的抑制率较高,自氧化速率的水平较低。因此选择最适温度为20 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.2.6 Mb-Cu与SOD对自氧化速率及抑制率影响的比较

为考察Mb-Cu的SOD酶活情况,本试验分别使不同浓度的Mb-Cu和SOD参与到邻苯三酚自氧化反应的抑制过程,通过对比同种条件下的自氧化速率以及抑制率的差异,可反映出Mb-Cu的SOD酶活大小。结果如图7、图8所示。

据相关报道可知^[19],SOD与Mb-Cu对邻苯三酚自氧化都有一定抑制作用。由图7可知,在低浓度范围内,随着样品的浓度增加,SOD对邻苯三酚自氧化速率起促进作用,此时SOD的添加量还不能起到抑制邻苯三酚自氧化速率的作用。在SOD浓度在0.6 mg/L时,邻苯三酚自氧化速率最高,当SOD大于0.6 mg/L,SOD对自氧化速率起抑制作用;Mb-Cu配合物也是随着浓度增加对其自氧化速率先是促进作用,而后发挥其抑制作用。在Mb-Cu浓度大于0.2 mg/L时,对邻苯三酚的自氧化的抑制作用逐渐加强,当浓度大于或等于0.8 mg/L时,对邻苯三酚自氧化的抑制

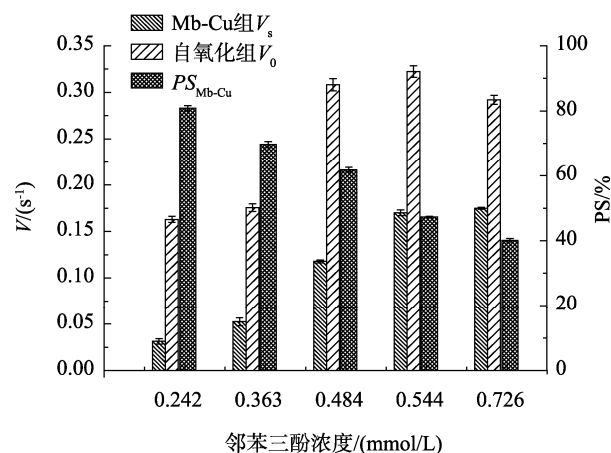


图5 邻苯三酚浓度对自氧化及抑制率的影响($n=3$)

Fig. 5 Effect of pyrogallol concentration on autoxidation and inhibition rates ($n=3$)

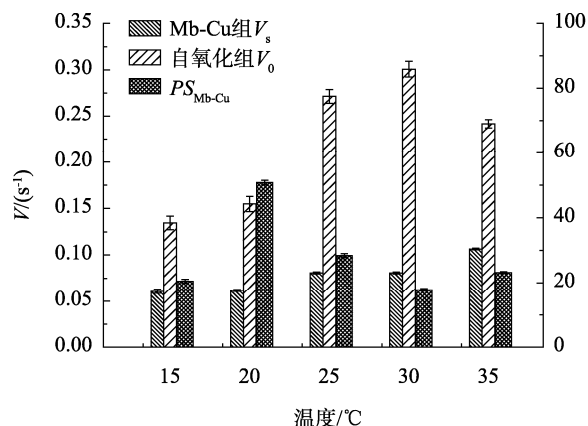
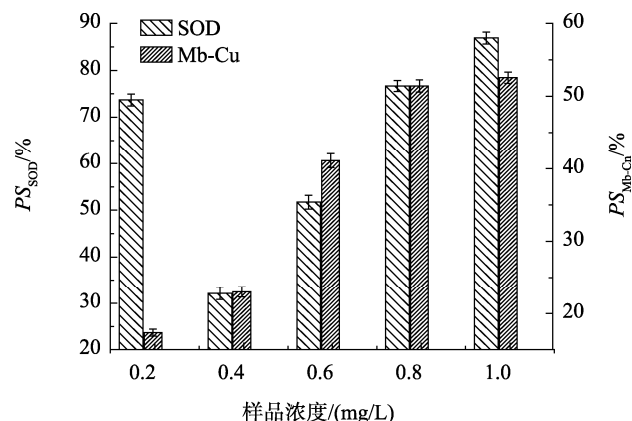
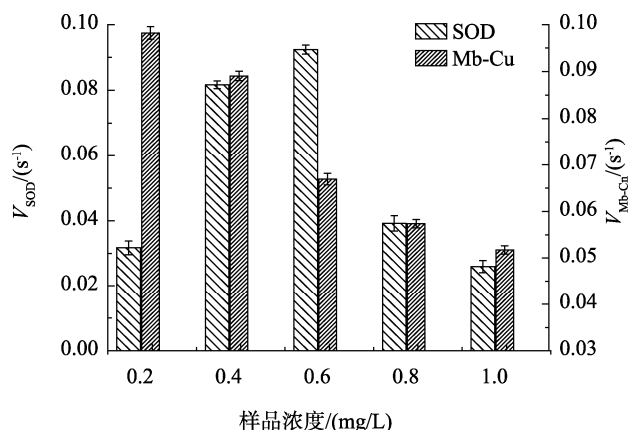
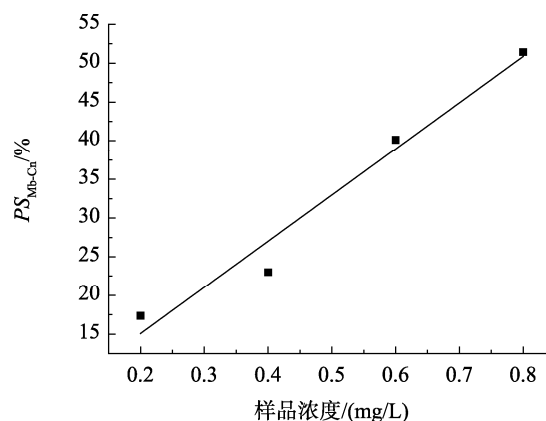
图 6 温度对自氧化及抑制率的影响($n=3$)Fig. 6 Effect of temperature on autoxidation and inhibition rates ($n=3$)图 8 Mb-Cu 与 SOD 酶对邻苯三酚自氧化抑制的对比($n=3$)Fig. 8 Comparison of inhibition rate of Mb-Cu and SOD on pyrogallol autoxidation ($n=3$)图 7 Mb-Cu 与 SOD 酶对邻苯三酚自氧化速率影响的对比($n=3$)Fig. 7 Comparison of the effect of Mb-Cu and SOD on the autoxidation rate of pyrogallol ($n=3$)

图 9 Mb-Cu 浓度与抑制率的线性关系

Fig. 9 Linear relationship between Mb-Cu concentration and inhibition rate

作用保持在一个较高的稳定数值, 且邻苯三酚的自氧化水平也比较高, 且与 SOD 对超氧阴离子的抑制作用比较接近。通过图 8 对抑制率的影响也可以验证上述观点。

综上所述, 可确定当反应体系控制为以下条件时, 即 Tris-HAC 缓冲溶液为 0.05 mol/L (其中缓冲溶液的 pH 值为 8.2, EDTA- Na_2 的浓度为 2 mmol/L), 邻苯三酚浓度为 0.363 mmol/L, 温度为 20 °C, Mb-Cu 浓度为 0.8 mg/L, Mb-Cu 对邻苯三酚的自氧化速率及其抑制率的影响与 SOD 标准液对超氧阴离子的清除效果最为接近, 以此建立的 Mb-Cu 模拟 SOD 活性的分析可用上述反应条件。

3.3 线性与重现性分析结果

在 0.02~0.22 mL 之间准确量取 5 份相同浓度的 Mb-Cu 溶液分别加入到上述标准条件下的反应体系中, 同时减少双蒸水的用量, 保持总体积为 6.2 mL, 测定不同 Mb-Cu 溶液浓度下的抑制率变化。

以抑制率 $PS(\%)$ 为纵坐标, Mb-Cu 浓度 (C) 为横坐标时, 得到较好的线性关系如图 9 所示, 回归方程为: $PS=59.635C+3.1558$ ($r=0.9843$), 线性范围为 0.2~0.8 mg/L, 对应的 PS 在 17.36%~51.42% 范围内, 其中 PS 为 50% 时所对应的 C 为 0.785 mg/L。

在最优实验条件下, 对加入了 0.1 mL 浓度为 80 mg/L 的 Mb-Cu 溶液的样品重复测定 6 次, 并根据公式 2 计算酶活力, 得到 Mb-Cu 的酶活力为 (46.4419 ± 0.80) U/mL, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 3.46%。

4 结 论

通过对甲烷氧化菌进行发酵培养获得甲烷氧化菌素, 建立了甲烷氧化菌素-铜配合物的 SOD 活性邻苯三酚自氧化体系的分析方法。利用紫外光谱分析, 通过研究发现当

Tris-HAC缓冲溶液为0.05 mol/L, 缓冲溶液的pH值为8.2、EDTA-Na₂的浓度为2 mmol/L, 邻苯三酚浓度为0.363 mmol/L, 温度为20 ℃时, 浓度为0.8 mg/L的Mb-Cu表现出良好的SOD活性, 对超氧阴离子(O₂⁻)的抑制率较高。此时建立的模拟SOD活性的邻苯三酚自氧化分析体系稳定, 说明Mb-Cu在此分析条件下可以作为SOD的模拟酶进行应用。

参考文献

- [1] 袁牧, 王昌留, 王一斐, 等. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(6): 550-558.
Yuan M, Wang CL, Wang YF, *et al.* Progress in the research of superoxide dismutase [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2016, 25(6): 550-558.
- [2] 陈佳乐, 高飞, 易喻, 等. 超氧化物歧化酶化学修饰的研究进展及展望[J]. 浙江化工, 2008, 39(7): 22-26, 32.
Chen JL, Gao F, Yi Y, *et al.* The Development of superoxide dismutases chemical modification [J]. Zhejiang Chem Ind, 2008, 39(7): 22-26, 32.
- [3] 殷晓春, 李刚, 王荣民, 等. 金属卟啉蛋白结合体模拟SOD酶性能研究[J]. 中国科学(化学), 2013, 43(2): 171-177.
Duan XC, Li G, Wang RM, *et al.* Antioxidant activity of conjugation of metalloporphyrin combining with bovine serum albumin [J]. Sci Sin (Chim), 2013, 43(2): 171-177.
- [4] 李晨, 杨征, 庠梦尧, 等. 超氧化物歧化酶化学模拟的新进展[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(9): 2046-2061.
Li C, Yang Z, Ku MY, *et al.* Recent progress in superoxide dismutase mimics [J]. Chem J Chin Univ, 2011, 32(9): 2046-2061.
- [5] 袁泽利, 吴庆, 杨兴变, 等. 新型水溶性大环席夫碱锰(II)配合物的合成及其模拟超氧化物歧化酶的活性研究[J]. 合成化学, 2011, 19(4): 446-449.
Yuan ZL, Wu Q, Yang XB, *et al.* Synthesis and activity study of sod novel water-soluble schiff base macrocyclic Mn(II) compounds [J]. Chin J Synth Chem, 2011, 19(4): 446-449.
- [6] 李唤民, 高楠, 刘磊, 等. 新型兼具GPX, SOD, CAT活性的水杨醛Schiff碱衍生物的合成[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(7): 1353-1356.
Li HM, Gao N, Liu L, *et al.* Novel trifunctional salicylaldehyde schiff base derivative with GPX, SOD and CAT activities [J]. Chem J Chin Univ, 2009, 30(7): 1353-1356.
- [7] Choi DW, Zea CJ, Do YS, *et al.* Spectral, kinetic and thermodynamic properties of Cu(I) and Cu(II) binding by methanobactin from methylosinus trichosporium OB3b [J]. Biochemistry, 2006, 45(5): 1442-1453.
- [8] Kim HJ, Graham DW, DiSpirito AA, *et al.* Methanobactin, a copper-acquisition compound from methanobactin-oxidizing bacteria [J]. Science, 2004, 305(5690): 1612-1615.
- [9] Choi DW, Semrau JD, Antholine WE, *et al.* Oxidase, superoxide dismutase, and hydrogen peroxide reductase activities of methanobactin from types I and II methanotrophs [J]. J Inorg Biochem, 2008, 102(8): 1571-1580.
- [10] Xin JY, Zhang YX, Dong J, *et al.* Production, purification and SOD-like activity of methanobactin from *M. trichosporium* 3011 [J]. Ad Mater Res, 2011, 160-162: 19-23.
- [11] Vincent CHY, Kenkel I, Delsuc N, *et al.* Bioinspired superoxide-dismutase mimics: The effects of functionalization with cationic polyarginine peptides [J]. J Inorg Biochem, 2016, 160: 172-179.
- [12] Shearer J. Dioxygen and superoxide stability of metalloprotein based mimics of vs. bis-amidate ligation nickel containing superoxide dismutase: The influence of amine/amidate [J]. J Inorg Biochem, 2013, 129: 145-149.
- [13] 邢海丽. 甲烷氧化菌素抗菌性的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2016.
Xing HL. Antibacterial activity of methanobactin from *Methylosinus trichosporium* 3011 [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2016.
- [14] 闫超泽, 张帅, 辛嘉英, 等. 铬天青S分光光度法测定甲烷氧化菌素的研究[J]. 分析测试技术与仪器, 2011, 17(2): 69-73.
Yan CZ, Zhang S, Xin JY, *et al.* Study on determination of methanobactin by spectrophotometry using chrome azure S [J]. Anal Test Technol Instrum, 2011, 17(2): 69-73.
- [15] 程德竹, 杜爱玲, 李成帅, 等. 生姜提取物对邻苯三酚自氧化生成超氧自由基的清除[J]. 中国调味品, 2014, 39(11): 35-39.
Cheng DZ, Du AL, Li CS, *et al.* Antioxidant capacity of ginger active ingredients by pyrogallol auto-oxidation action [J]. China Condiment, 2014, 39(11): 35-39.
- [16] 张锁慧, 王改香, 唐晓军, 等. 邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性研究[C]. 第十届中国化妆品学术研讨会论文集, 2014: 260-264.
Zhang SH, Wang GX, Tang XJ, *et al.* Study of pyrogallol autooxidation method to determine SOD activity [C]. Proceedings of the Tenth Symposium on Chinese Cosmetics, 2014: 260-264.
- [17] 王炳娟, 李玲霞, 邹洪. 邻苯三酚自氧化法测定SOD活性的电化学研究[J]. 现代仪器, 2008, 2: 29-30, 38.
Wang BJ, Li LX, Zou H. Determination the activity of superoxide dismutase enzyme by electrochemical method based on the reaction of pyrogallol autooxidation [J]. Mod Instrum, 2008, 2: 29-30, 38.
- [18] 杨磊. 厚朴提取物抗氧化药物动力学研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
Yang L. The pharmacokinetic study of antioxidation of extracts of magnolia officinalis [J]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2008.
- [19] 周叶峰. 甲烷氧化菌的分离及氧化活性的影响因子研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
Zhou YF. Studies on the influential factors of oxidation activities and isolation of methane oxidizing bacteria [J]. Changsha: Agricultural University of Hunan, 2008.

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介

陈林林, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品生物催化与转化。
E-mail: chenlinl2013@126.com