

# 响应面法优化费菜 SOD 提取条件的研究

王美<sup>1</sup>, 武纪汝<sup>1</sup>, 刘艳芳<sup>1</sup>, 王文斗<sup>1,2\*</sup>

(1. 山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041000; 2. 山西师范大学现代文理学院, 山西临汾 041000)

**摘要** [目的]利用响应面法优化费菜 SOD 的提取条件。[方法]首先进行单因素优化试验, 单因素分别为时间、pH、液料比。经过单因素优化试验, 得出最优时间、最优 pH、最优料液比。通过 Design expert 8.0.5 软件设计出 17 种试验方案。通过试验, 得出每种方案的蛋白得率, 利用 Design expert 8.0.5 软件进行了方差分析, 各因素之间的交互作用分析, 并得出了相应的数学模型。[结果]单因素试验中, 最优时间为 1 h, 最优 pH 为 7.8, 最优料液比为 1:15 g/mL。各因素交互作用分析表明, 提取费菜 SOD 的最佳方案为提取时间 0.98 h、pH 7.79、料液比 1:13.71 g/mL。利用邻苯三酚自氧化法测得提取的 SOD 酶活为 12 U/g。[结论]该研究结果可为费菜资源的进一步利用与研究提供参考。

**关键词** 费菜; SOD; 响应面法

中图分类号 S567.23 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)20-063-03

## Study on Optimizing Extracting Conditions of SOD in *Sedum aizoon* by the Response Surface Method

WANG Mei<sup>1</sup>, WU Ji-ru<sup>1</sup>, LIU Yan-fang<sup>1</sup>, WANG Wen-dou<sup>1,2\*</sup> (1. School of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041000; 2. Modern College of Arts and Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041000)

**Abstract** [Objective] The aim was to optimize extracting conditions of SOD in *Sedum aizoon* by response surface method. [Method] First, the single factor optimization tests were carried out. Three single factors are time, pH and solid-to-liquid ratio respectively. By Design expert 8.0.5 software, 17 kinds of test scheme were designed. The protein yield of each scheme was obtained, Design expert 8.0.5 software was used to conduct variance analysis, interactive analysis among factors, corresponding mathematical model was obtained. [Result] The results showed that in single factor experiments, the optimal time is 1 hour, pH is 7.8, and solid-to-liquid ratio is 1:15 g/mL. Factors interactive analysis indicated that the optimal scheme for extracting SOD in *Sedum aizoon* is time 0.98 h, pH 7.79, solid-to-liquid ratio 1:13.71 g/mL. By the method of pyrogallol autoxidation, the extracted SOD enzyme activity was measured, that is 12 U/g. [Conclusion] The results can provide reference for further utilization and research of *Sedum aizoon* resources.

**Key words** *Sedum aizoon*; FSOD; Response surface method

费菜(*Sedum aizoon* L.)为景天科景天属多年生肉质草本植物<sup>[1]</sup>, 抗性极强, 在很多类型的土质环境中都能生长。费菜是一种药材, 药效与三七相近, 有扩张动脉血管、活血止血、安静定气等作用<sup>[2]</sup>。在日常生活中, 费菜又被视为保健蔬菜, 广受青睐<sup>[3]</sup>。

SOD 是一种蛋白酶, 由蛋白亚基与金属离子组成, 广泛存在于各种动植物以及一些微生物体内<sup>[4]</sup>。在生物体内, SOD 催化自由基发生歧化反应, 清除体内自由基, 是世界公认的具有抗氧化、抗衰老的活性物质, 常用于保健产品中<sup>[5-6]</sup>。

## 1 材料与方

### 1.1 试验材料

**1.1.1 植物材料。**费菜, 采于山西临汾尧都区, 采取鲜叶用于试验。

**1.1.2 化学试剂。**丙酮、无水乙醇、三氯甲烷、马斯亮蓝 G-250、95%乙醇、85%磷酸、浓盐酸、邻苯三酚、Tris-HCl、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠。

**1.1.3 仪器设备。**电子天平、冷冻离心机、水浴锅、4℃冰箱、723N 可见分光光度计、PHS-3C 酸度计、微量移液器、离心管、容量瓶、量筒、烧杯等。

### 1.2 方法

**1.2.1 提取与纯化。**采摘费菜鲜叶, 洗净, 吸干水分, 称取 1

g 鲜叶, 置于预冷研钵中, 加入 5 mL 磷酸缓冲液充分研磨, 提取 SOD 粗酶液。将所得粗酶液加入等体积预冷的丙酮, 混匀, 静置 15 min, 冷冻离心 20 min, 弃上清, 用磷酸缓冲液溶解沉淀, 得 SOD 酶液<sup>[7-8]</sup>。

**1.2.2 含量测定。**取 1 mL SOD 酶液与 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液混合, 染色 5 min, 595 nm 波长测 OD 值。通过标准曲线计算蛋白含量<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 酶活测定。**利用邻苯三酚自氧化法测 SOD 活性<sup>[10]</sup>。

**1.2.4 试验设计。**首先进行单因素的优化试验, 确定单因素的最优水平, 利用 Design expert 8.0.5 软件设计试验方案<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

**2.1.1 提取时间。**经反复试验, 抽提时间小于 1 h, 所得酶液的蛋白浓度随抽提时间的增加而上升, 1 h 时蛋白浓度达最大值(为 4.275 μg/mL); 1 h 后, 随着时间的增加蛋白浓度逐渐变小。得出最适抽提时间为 1 h。

**2.1.2 pH。**7.2 < pH < 7.8 时, 蛋白浓度呈缓慢上升趋势; pH 为 7.6 时, 蛋白浓度稍稍下降; pH 为 7.8 时, 蛋白浓度达最大值, 1.695 μg/mL; pH > 7.8 时, 随着 pH 的增高蛋白浓度呈下降趋势。得出最适 pH 值为 7.8。

**2.1.3 料液比。**经过反复试验, 得到最优料液比为 1:15 g/mL。

### 2.2 各因素间的交互作用

**2.2.1 设计方案与试验结果。**在单因素试验基础上, 根据响应面法核心对称策划理论<sup>[12]</sup>, 运用 3 因素 3 水平的响应曲面分析方法, 共设计试验方案 17 个, 见表 1。

**作者简介** 王美(1991-), 女, 山西朔州人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。\* 通讯作者, 农业推广硕士, 副教授, 从事园林植物、园林设计研究。

**收稿日期** 2016-06-06

表1 Design expert8.0.5 软件设计方案及试验结果

Table 1 Design expert8.0.5 software design scheme and experimental results

| 试验号<br>Test<br>No. | A<br>时间<br>Time<br>h | B<br>pH | C<br>料液比<br>Solid-to-liquid<br>ratio//g/mL | Y<br>蛋白得率<br>Protein<br>yield// $\mu\text{g/g}$ |
|--------------------|----------------------|---------|--|---|
| 1                  | 0.250                | 7.600   | 1:15                                       | 16.243  |
| 2                  | 0.250                | 7.800   | 1:5  | 19.774  |
| 3                  | 1.000                | 8.000   | 1:5  | 19.068  |
| 4                  | 1.750                | 7.600   | 1:15                                       | 17.655  |
| 5                  | 0.250                | 8.000   | 1:15                                       | 19.774  |
| 6                  | 1.000                | 7.600   | 1:5  | 17.655  |
| 7                  | 1.750                | 8.000   | 1:15                                       | 7.768   |
| 8                  | 1.750                | 7.800   | 1:5  | 14.124  |
| 9                  | 1.000                | 7.800   | 1:15                                       | 29.661  |
| 10                 | 1.000                | 7.800   | 1:15                                       | 29.661  |
| 11                 | 1.000                | 8.000   | 1:25                                       | 16.243  |
| 12                 | 1.750                | 7.800   | 1:25                                       | 7.062   |
| 13                 | 1.000                | 7.800   | 1:15                                       | 29.661  |
| 14                 | 1.000                | 7.600   | 1:25                                       | 15.537  |
| 15                 | 1.000                | 7.800   | 1:15                                       | 29.661  |
| 16                 | 0.250                | 7.800   | 1:25                                       | 16.949  |
| 17                 | 1.000                | 7.800   | 1:15                                       | 29.661  |

2.2.2 回归方程的建立与方差分析。根据试验结果,利用 Design expert8.0.5 软件,得到蛋白得率(Y)对时间(A)、pH(B)、料液比(C)的二次多项方程:

$$Y = 29.66 - 3.27A - 0.53B - 1.85C - 3.35AB - 1.06AC - 0.18BC - 8.47A^2 - 5.83B^2 - 6.71C^2$$

$R^2 = 0.9611$ , 拟合程度良好。

方差分析结果见表2。

由表2可看出,模型显著性水平为极显著,拟合度好,能较好地描述时间、pH、料液比3因素及其交互作用对蛋白得率的影响。根据F数值判断3因素对响应面的影响为:时间 > 料液比 > pH。

2.2.3 响应面分析。

(1)时间与pH的交互作用。由图1可看出,蛋白得率对时间与pH交互作用的响应呈开口向下的凸面,响应值约在1h,pH7.8处存在最高值。

(2)时间与料液比的交互作用。由图2可看出,蛋白得率对时间与料液比交互作用的响应呈开口向下的凸面,响应值约在1h、料液比为1:15g/mL处存在最高值。从左图看出等高线颜色变化不太明显,表明时间与料液比交互作用对蛋白得率的影响不显著(与方差分析结果一致)。

表2 方差分析结果

Table 2 Variance analysis results

| 来源<br>Sources     | 平方和<br>Sum of<br>square | 自由度<br>Degree of<br>freedom | 均方<br>Mean<br>square | F值<br>F value | P值<br>P value | 显著性<br>Significance |
|-------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------|---------------|---------------------|
| 模型 Model          | 871.680                 | 9.000                       | 96.850               | 44.940        | <0.0001       | **                  |
| A                 | 83.350                  | 1.000                       | 83.350               | 39.600        | 0.0004        | **                  |
| B                 | 2.240                   | 1.000                       | 2.240                | 1.040         | 0.3415        |                     |
| C                 | 27.490                  | 1.000                       | 27.490               | 12.750        | 0.0091        | **                  |
| AB                | 45.010                  | 1.000                       | 45.010               | 20.880        | 0.0026        | **                  |
| AC                | 4.490                   | 1.000                       | 4.490                | 2.080         | 0.1922        |                     |
| BC                | 0.120                   | 1.000                       | 0.120                | 0.058         | 0.8166        |                     |
| A <sup>2</sup>    | 302.400                 | 1.000                       | 302.400              | 140.310       | <0.0001       | **                  |
| B <sup>2</sup>    | 142.930                 | 1.000                       | 142.930              | 66.310        | <0.0001       | **                  |
| C <sup>2</sup>    | 189.520                 | 1.000                       | 189.520              | 87.930        | <0.0001       | **                  |
| 残差 Residual       | 15.090                  | 7.000                       | 2.160                |               |               |                     |
| 失拟值 Missing value | 15.090                  | 3.000                       | 5.030                |               |               |                     |
| 纯误差 Pure error    | 0.000                   | 4.000                       | 0.000                |               |               |                     |
| 总差 Total error    | 886.770                 | 16.000                      |                      |               |               |                     |

注:\*\* 差异极显著( $P < 0.01$ ); \* 差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: \*\*. Extremely significant difference( $P < 0.01$ ); \*. Significant difference( $P < 0.05$ ).

(3)pH与液料比的交互作用。由图3可知,pH与液料比交互作用的响应面也呈开口向下的凸面,响应值约在pH7.8、液料比为1:15g/mL附近存在最高值。等高线颜色变化不明显,pH与料液比交互作用对蛋白得率的影响不显著(与方差分析结果一致)。

2.2.4 最适提取方案。由 Design expert8.0.5 软件得到了费菜SOD提取最佳提取方案:时间0.98h,pH7.79,料液比为1:13.71g/mL,蛋白得率为29.88 $\mu\text{g/g}$ 。

2.3 酶活力测定 利用邻苯三酚自氧化法测定所提取的SOD酶活力,酶液浓度为2.372 $\mu\text{g/mL}$ 时,酶活力为12U/g。

### 3 讨论

目前SOD提取方法主要有热变性的、硫酸铵分级盐析法、超声波破碎提取法、丙酮沉淀法。其中丙酮沉淀法方法简单,成本低廉。响应面法是一种较为简单的寻找最佳试验方案的科学方法,考虑了试验的随机误差,简单的多项式拟合模型,适用于试验方案的设计与优化,具有用时短、精确度高、显著性强的特点。该试验选择兼具食用、药用及园林观赏价值的景天科植物费菜为试验材料,采取丙酮沉淀法提取其超氧化物歧化酶,利用响应面法设计并优化提取方案,试验结果可为费菜资源的进一步利用与研究提供参考。

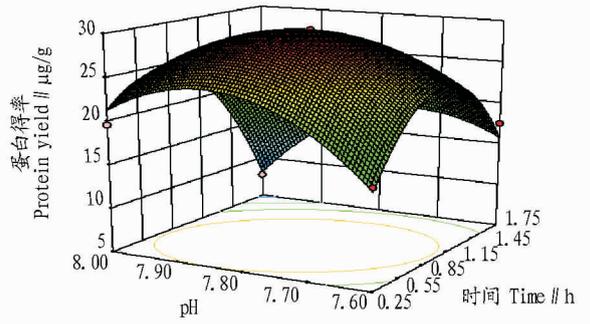
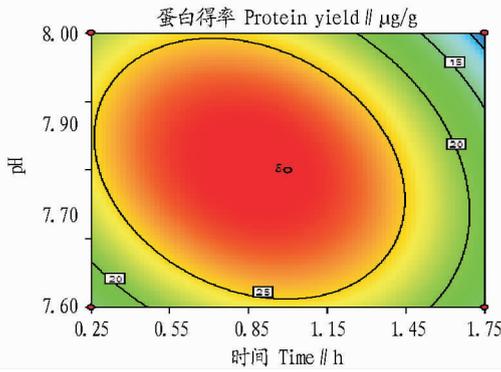


图1 时间与 pH 交互作用对蛋白得率的影响

Fig.1 Effects of time and pH interaction on protein yield

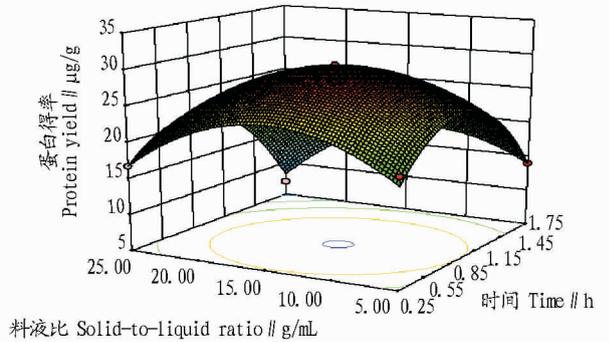
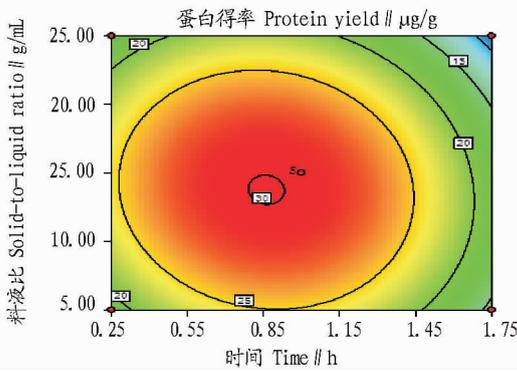


图2 时间与料液比交互作用对蛋白得率的影响

Fig.2 Effects of time and solid - liquid ratio interaction on protein yield

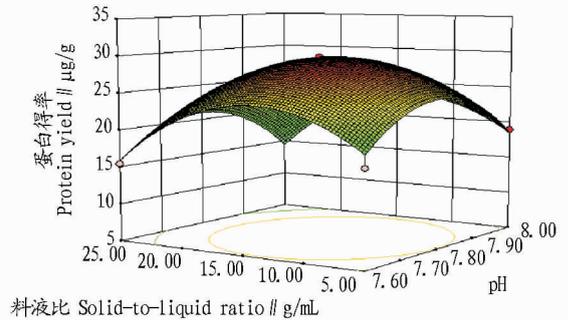
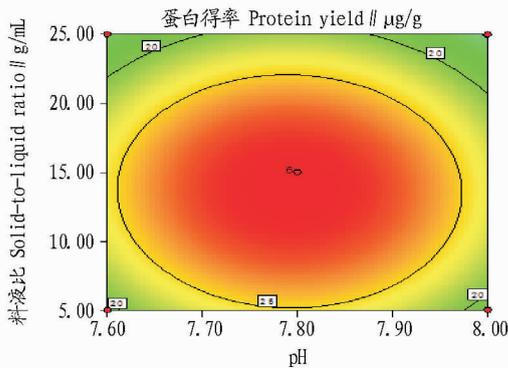


图3 pH 与料液比交互作用对蛋白得率的影响

Fig.3 Effects of pH and solid - liquid ratio interaction on protein yield

参考文献

[1] 衣艳君. 费菜的利用价值及栽培[J]. 特种蔬菜, 2000(4): 38.  
 [2] 李宋香. 费菜的栽培技术及其药用价值[J]. 海峡药学, 2001(4): 63 - 65.  
 [3] 张贵生, 王桂萍. 费菜对鲤鱼肝脏抗氧化酶活性及 MDA 含量的影响[J]. 四川动物, 2012(6): 909 - 911.  
 [4] 陈鸿鹏, 谭晓风. 超氧化物歧化酶(SOD)研究综述[J]. 经济林研究, 2007(1): 59 - 65.  
 [5] 魏瑞锋, 魏桃英. 猕猴桃中 SOD 提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2013(32): 12716 - 12717 + 12757.  
 [6] 李祖明, 霍笑靓, 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(1): 47 - 51.

[7] 孔祥智, 黄雪松. 硫酸铵盐析法分步分离大蒜 SOD 和蒜氨酸酶的研究[J]. 食品工业科技, 2008(1): 165 - 166.  
 [8] 陈莉, 申小蓉, 赵红洋, 等. 佛甲草中 SOD 提取条件的优化[J]. 草原和草坪, 2009(1): 1 - 6.  
 [9] 李志江. 考马斯亮蓝 G250 染色法测定啤酒中蛋白质含量[J]. 酿酒, 2008(1): 70 - 72.  
 [10] 张文军, 葛超. NBT 光还原法、邻苯三酚自氧化法测定 SOD 酶活性的比较(简报)[J]. 河北职业技术师范学院学报, 2000(2): 68 - 70.  
 [11] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录, 等. Box-Behnken 响应面优化冷棒花生粕酶解制备花生肽工艺[J]. 中国粮油学报, 2014(29): 45 - 46.  
 [12] 邓仕任, 夏林波, 李博. 响应面法优化芫花总黄酮的提取工艺[J]. 中国食品添加剂, 2012(1): 70 - 75.