

甘油包埋绿豆 SOD 的稳定性研究

柯德森¹, 邓晓旭², 区炽清¹, 王正询^{1*}

(1. 广州大学生命科学学院生物工程系, 广州 510006; 2. 广州市执信中学, 广州 510050)

摘要: 用不同浓度的甘油包埋绿豆(*Phaseolus radiatus* L.)超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD),对不同条件下制备的甘油 SOD 的稳定性进行评估。结果表明:甘油包埋绿豆 SOD 的稳定性受甘油浓度影响明显,12.5%~25%为最适甘油浓度。在 10℃、pH 6.8、搅拌速度 1 000 r min⁻¹条件下包埋的甘油 SOD 在 55℃的平均半衰期为 25.1 d,为非包埋 SOD 的 5.1 倍。甘油浓度为 25%,温度分别为 5℃、10℃、25℃、45℃条件下, pH 3.8 中包埋的绿豆 SOD 耐酸性较好, pH 8.9 下包埋的绿豆 SOD 的抗碱能力较强。在包埋过程中添加一定浓度的 Zn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺有利于其热稳定性的提高。甘油包埋 SOD 对一些常见的化妆品添加剂也有一定的抗性。由此可见,甘油包埋技术可望作为一项有应用前景的 SOD 活性保持新技术,有利于极端温度和极端 pH 条件下的 SOD 的应用。

关键词: 甘油; SOD; 稳定性

中图分类号: Q946.546

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)05-0435-07

The Studies on Stability of Glycerin Entrapment SOD from Mungbean (*Phaseolus radiatus* L.) Seeds

KE De-sen¹, DENG Xiao-xu², OU Chi-qing¹, WANG Zheng-xun^{1*}

(1. Department of Bioengineering, College of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

2. The Zhixin Middle School of Guangzhou, Guangzhou 510050, China)

Abstract: Superoxide dismutase (SOD) extracted from mungbean (*Phaseolus radiatus* L.) seeds was entrapped with glycerin of various concentrations under various treatment conditions, then their stabilities were estimated. The results showed that the stability of SOD under hot stress, as well as, extreme acidic or alkaline stress was enhanced by glycerin entrapment. The concentration of glycerin was regarded as an essential factor for SOD stability, the optimum glycerin concentration was 12.5%~25%. It was demonstrated that 10℃, pH 6.8 and 1 000 r min⁻¹ of mix round was the optimum condition to improve the SOD stability under hot stress, the half life of glycerin entrapment SOD in hot stress at 50℃ was 25.1 d, which was 5 times of the natural SOD not glycerin entrapment. Entrapment at pH 3.8 was more effective to improve the endurance of SOD in acidic stress, whereas, pH 8.9 was more resultful to enhance the stability in alkaline stress. Adding of Zn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺ was favor to enhance the stability of glycerin entrapment SOD under hot stress. Glycerin entrapment SOD also showed a rather strong tolerance in some additives of cosmetics. So glycerin entrapment would be a promising way to improve SOD stability in various stress conditions, which might enhance its various applications effectively in the near future.

Key words: Glycerin; SOD; Stability

SOD 催化清除超氧阴离子自由基(Superoxide radical, O₂⁻)^[1],具有抗辐射、抗肿瘤和延缓机体衰

老的重要作用^[2-3]。SOD 无毒并很少副作用,应用于化妆品中是安全的^[4],目前市场上 SOD 化妆品

收稿日期: 2007-10-24 接受日期: 2008-02-19

基金项目: 广东省自然科学基金项目(06021574;04300677);广东省科技计划项目(2007B030701006;2006B36501008)资助

* 通讯作者 Corresponding author

不下数百种^[1],但其实际作用并不显著。原因是 SOD 在机体内的半衰期通常只有 6~20 min,另外化妆品在生产和应用过程中往往需要经过比较极端的温度和 pH 条件,使得 SOD 活性不易保持。解决 SOD 在极端温度和 pH 环境下的稳定性问题,是其能否广泛应用的前提^[5]。

作为一种多羟基化合物,甘油的亲水性强^[6],可对蛋白质有效脱水,降低蛋白水解作用而起到稳定蛋白质的作用,并且是化妆品中良好的保湿剂和抗冻剂^[7]。王伟等^[6]的实验结果表明,水溶性醇类对提高溶菌酶的稳定性有显著效果。李振华等^[8]和冯治平等^[9]的研究结果表明甘油是良好的蛋白膜增塑剂。本文探索了利用甘油包埋技术提高 SOD 稳定性的可能性,并就甘油包埋的最适工艺条件进行了研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

称取新鲜绿豆(*Phaseolus radiatus* L.)种子 50 g,洗涤,蒸馏水浸泡过夜。加入 250 ml 0.02 mol/L pH 6.8 的磷酸缓冲液,用 SS280-D 型惠能多功能食品搅拌机(惠能工贸,广州)匀浆,二层纱布过滤,4 500 ×g 离心 60 s 得上清液,缓慢加入硫酸铵使达 45% 的饱和度,5℃ 沉淀 8 h,取上清液于 5℃ 蒸馏水中透析 24 h。测量清液 SOD 活性,适当稀释使活性为 300~400 U ml⁻¹,每周配制新鲜 SOD 液备用。

1.2 包埋方法

50 ml 烧杯中加入 SOD 提取液和甘油(AR),总体积控制在 30 ml。用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液调节 pH 值,水浴调节包埋温度,用小型匀浆器以一定的转速持续搅拌一定时间,得到的 SOD 混合液即为甘油包埋 SOD 液,用于进一步的活性测定和稳定性评估。以未经甘油包埋的同样浓度的 SOD 液为对照。每实验均 4 次重复。

1.3 温度和酸碱稳定性评价

加入 8 ml pH 6.8 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液于试管中,分别于 22℃、35℃、50℃、70℃ 下平衡 20 min,然后加入一定体积的甘油包埋 SOD 液,以 0.05 mol/L Tris-HCl 补足体积至 10 ml,并使反应体系中的 SOD 活性为 30 U ml⁻¹,继续保温,每隔一段时间测量其活性。酸碱稳定性评价的 pH 设置 3.8、6.8、8.9 三个水平,于 25℃ 下平衡 20 min。其它条

件不变。以半衰期来衡量 SOD 的稳定性。半衰期计算公式: $t_{1/2} = 0.693/K_D$,式中 $K_D = -2.303/t \times \lg(E/E_0)$,其中 E/E_0 为时间 t 前后的酶活力残留百分比。

1.4 化妆品添加剂中稳定性评估

化妆品添加剂有卡松(5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和 2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮的混合物(m/m = 2~3:1),原液浓度 18%)、DMDMH(1,3-二羟甲基-5,5-二甲基乙内酰脲,原液浓度 50%)和 NP-10(脂肪醇壬基酚聚氧乙烯醚,原液浓度 100%)。实验处理同酸碱稳定性评价。

1.5 SOD 活性的测定

SOD 活性测量参照许申鸿等^[10]的邻苯三酚自氧化法。

1.6 数据统计处理

以上每组实验均设计 10 个平行实验,取其平均值,并计算每一数据的标准误差,数据表示为:平均数 ± 标准误差。

2 结果

2.1 不同浓度甘油包埋 SOD 的稳定性评价

图 1 包埋条件为 10℃,pH 6.8,1 000 r min⁻¹ 搅拌 10 h,结果显示:SOD 的热稳定性明显受甘油浓度的影响,不同浓度甘油包埋的 SOD 在 50℃ 下的半衰期均比对照长,12.5%~25% 甘油包埋的 SOD 具有最大的半衰期,其平均半衰期 25.1 d,约为非包埋天然酶的 5 倍。然而甘油包埋 SOD 在 pH 3.8 和 pH 8.9 的稳定性提高都不显著,但仍然以 12.5%~25% 为最佳甘油浓度。

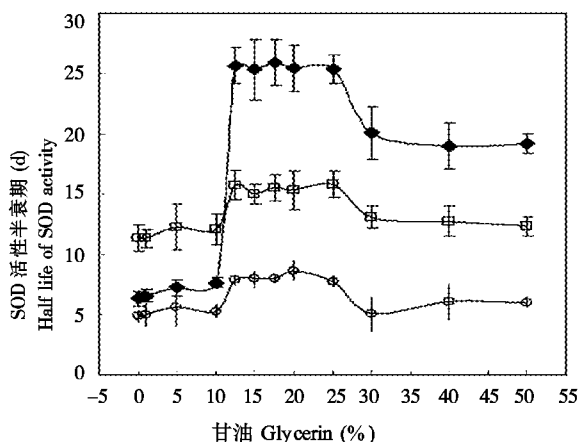


图 1 不同浓度甘油包埋 SOD 的热稳定性和酸碱稳定性
Fig. 1 The effects of different concentrations of glycerin on SOD stability under hot stress and the stress of extreme acidic or alkaline
◆: 5.0; □: pH 3.8; ○: pH 8.9

2.2 温度、pH 值的影响

表1中包埋甘油浓度为25%,1 000 r min⁻¹搅拌10 h,结果显示包埋温度和pH值对SOD的热稳定性有明显的影。在10℃以下包埋的甘油SOD于50℃下的半衰期明显高于在10℃以上包埋的甘油SOD,但不同温度下包埋的SOD在极端酸碱环境中的稳定性没有明显变化。包埋的酸碱环境对甘油SOD的稳定性却有明显的影响,pH 3.8中包埋的SOD在pH 3.8应用时的半衰期明显高于在pH 6.8和pH 8.9中包埋的甘油SOD,而pH为8.9中包埋的SOD在pH 8.9中的半衰期明显高于pH 6.8和pH 3.8中包埋的甘油SOD。

图2表示不同条件下包埋SOD活性得率的变化,在甘油浓度25%,pH值6.8,1 000 r min⁻¹搅拌10 h的包埋条件下,随着包埋温度的上升,SOD活性下降加快,显示低温包埋对SOD活性得率有利,10℃以下是甘油包埋SOD的合适温度。在甘油浓

度为25%,包埋温度为25℃,1 000 r min⁻¹搅拌10 h的包埋条件下,SOD活性得率受包埋时的pH值影响明显,中性或微碱性环境下包埋的SOD活性得率较高。

2.3 搅拌速度和搅拌时间的影响

从图3和图4可见,包埋过程中的搅拌速度和搅拌时间对甘油SOD的稳定性有一定的影响。在10℃、pH 6.8、25%甘油、1 000 r min⁻¹的包埋条件下,甘油SOD的热稳定性和酸碱稳定性均随搅拌时间的延长而增加,搅拌超过10 h则甘油SOD的稳定性不再增加;以2 000 r min⁻¹速度搅拌时,甘油SOD的稳定性也随搅拌时间而上升,但超过8 h,稳定性就不再升高。图4显示了搅拌速度与甘油SOD稳定性的关系,搅拌时间均为4 h,搅拌速度的增加对甘油SOD稳定性的提高有一定的作用,搅拌时间为12 h,搅拌速度的增加对甘油SOD稳定性没有明显的影响。

表1 温度、pH对甘油SOD的热稳定性和酸碱稳定性的影响

Table 1 The effects of temperature and pH on the glycerin SOD stability under hot stress and the stress of extreme acidic or alkaline

包埋条件 Conditions for glycerin entrapment		半衰期 Half life (d)		
pH	温度 Temperature(℃)	50℃, pH 6.8	25℃, pH 3.8	25℃, pH 8.9
3.8	5	24.5 ± 2.2 ^a	19.5 ± 1.7 ^b	10.7 ± 0.7
	10	25.6 ± 2.8 ^a	21.2 ± 1.5 ^b	9.9 ± 0.8
	25	16.7 ± 2.1	20.2 ± 2.1 ^b	9.1 ± 1.2
	45	15.5 ± 1.8	21.9 ± 0.9 ^b	10.8 ± 1.1
6.8	5	25.8 ± 1.8 ^a	11.5 ± 1.1	10.7 ± 0.2
	10	24.4 ± 2.1 ^a	12.4 ± 0.3	11.9 ± 0.4
	25	17.3 ± 2.3	9.7 ± 1.1	9.2 ± 0.9
	45	16.6 ± 1.1	8.8 ± 1.0	10.9 ± 1.0
8.9	5	26.1 ± 1.7 ^a	11.5 ± 1.1	21.7 ± 0.8 ^c
	10	25.8 ± 2.1 ^a	12.4 ± 2.0	23.9 ± 1.3 ^c
	25	16.7 ± 1.9	11.7 ± 1.4	23.2 ± 1.7 ^c
	45	17.4 ± 2.2	12.8 ± 1.3	22.1 ± 0.7 ^c

数据后的字母表示差异显著($P < 0.05$)。Data followed letters within same column present significantly different at 0.05 level.

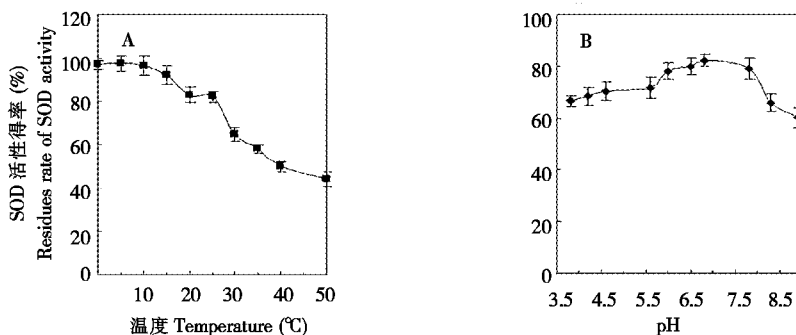


图2 包埋时的温度和pH值对SOD活性得率的影响

Fig. 2 The effects of temperature and pH during entrapment process on the residue activity of glycerin SOD

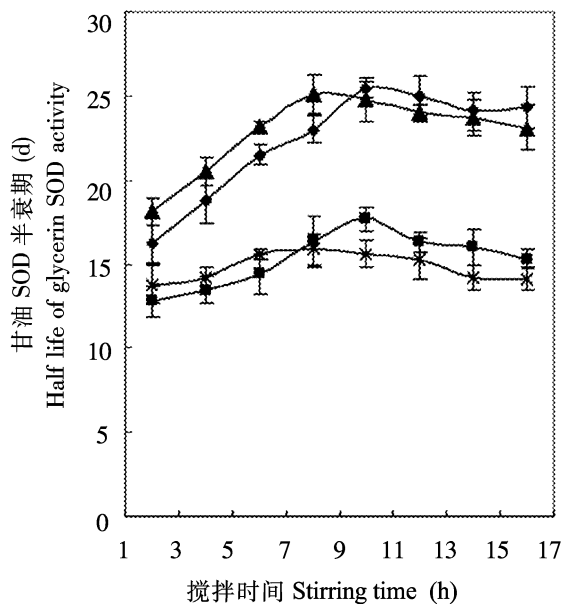


图 3 搅拌时间对甘油包埋 SOD 稳定性的影响

Fig. 3 The effect of stirring time on the stability of SOD

●: 1 000 r min⁻¹, 50°C; ▲: 2 000 r min⁻¹, 50°C;
 ■: 1 000 r min⁻¹, pH 3.8; ×: 2 000 r min⁻¹, pH 3.8

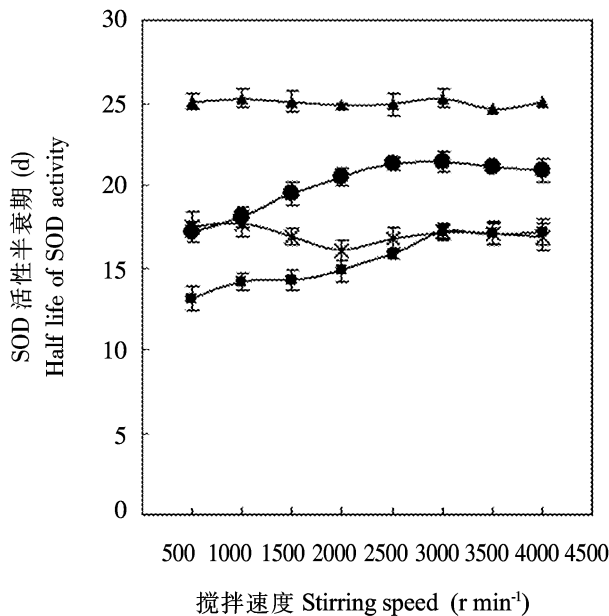


图 4 搅拌速度对甘油包埋 SOD 稳定性的影响

Fig. 4 The effect of stirring speed on the stability of glycerin SOD

●: 4 h, 50°C; ▲: 10 h, 50°C;
 ■: 4 h, pH 3.8; ×: 10 h, pH 3.8

图 5 显示了包埋过程中搅拌速度及时间对 SOD 活性得率的影响。在甘油浓度为 25%，pH 为 6.8 时，搅拌速度为 1 000 r min⁻¹ 时 SOD 的活性得率随搅拌时间的延长没有发生明显的变化，而在 2 000 r min⁻¹ 时则随搅拌时间的增加活性得率明显下降，显示甘油 SOD 具有耐受一定剪切力的能力，超过一定程度的剪切力，SOD 受到破坏而导致活性下降。

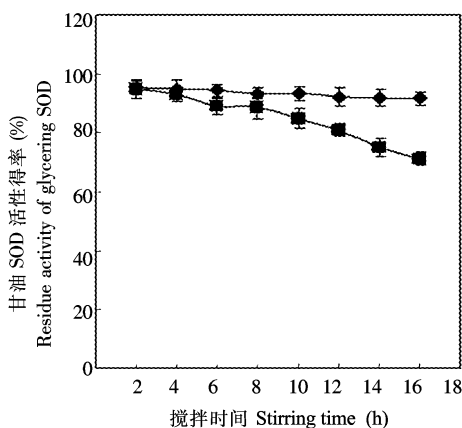


图 5 搅拌速度和搅拌时间对甘油 SOD 活性得率的影响

Fig. 5 The effects of stirring speed and time on the residues activity of SOD

●: 1 000 r min⁻¹; ■: 2 000 r min⁻¹

2.4 金属离子的影响

Zn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺ 均是 SOD 活性中心的金属离子^[11-12]。从表 2 看出，温度 25°C、pH 6.8、1 000 r min⁻¹ 搅拌 10 h 的包埋条件下，各种浓度的 Zn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺ 的加入均能明显地延长甘油 SOD 在 50°C 下的半衰期。Na₂SO₄ 处理对甘油 SOD 的热稳定性及在 pH 3.8 和 pH 8.9 环境中的稳定性均没有明显的影响，说明 ZnSO₄、CuSO₄、FeSO₄ 处理对甘油 SOD 稳定性的影响并非由 SO₄²⁻ 所引起的。除了 Zn²⁺ 能在一定程度上提高甘油 SOD 在 pH 3.8 下的稳定性外，其他金属离子对甘油包埋 SOD 的酸碱稳定性均没有明显的影响。

2.5 化妆品添加剂的影响

实验选用一种常用的化妆品表面活性剂 (DMDMH) 和二种防腐剂 (NP-10 及卡松)，由表 3、4 可以看到，在 3 种化妆品添加剂的作用下，10°C、pH 6.8、1 000 r min⁻¹ 10h 条件下包埋的甘油 SOD 在 0.1% NP-10 及 0.15% DMDMH 中的稳定性保持最明显，而在 0.02% 卡松中，甘油包埋的效果并不显著，说明甘油包埋 SOD 能有效提高 SOD 在部分化妆品添加剂中的稳定性。

表 2 不同金属离子对甘油 SOD 稳定性的影响

Table 2 The effects of metal ions on the stability of glycerin SOD

	浓度 ($\mu\text{mol/L}$) Concentration	半衰期 Half life (d)		
		50 $^{\circ}\text{C}$	pH 3.8	pH 8.9
对照 Control		18.5 \pm 1.9	10.3 \pm 1.5	9.5 \pm 1.4
ZnSO ₄	0.1	23.3 \pm 2.1 ^a	11.8 \pm 1.1	10.1 \pm 0.8
	1	25.1 \pm 1.7 ^a	13.3 \pm 0.8 ^a	9.7 \pm 0.3
	10	20.3 \pm 2.2 ^a	14.9 \pm 0.3 ^a	9.5 \pm 0.6
CuSO ₄	0.1	25.2 \pm 2.7 ^a	10.9 \pm 0.1	9.0 \pm 0.2
	1	25.8 \pm 3.1 ^a	9.8 \pm 0.2	8.9 \pm 0.4
	10	21.1 \pm 1.9 ^a	11.2 \pm 0.8	9.3 \pm 0.3
FeSO ₄	0.1	24.2 \pm 2.2 ^a	10.8 \pm 0.2	9.6 \pm 0.9
	1	23.7 \pm 1.8 ^a	10.5 \pm 0.9	9.1 \pm 0.3
	10	24.8 \pm 3.3 ^a	9.9 \pm 0.5	9.1 \pm 0.3
Na ₂ SO ₄	0.1	17.5 \pm 1.2	10.2 \pm 0.6	9.3 \pm 0.7
	1	18.9 \pm 1.9	9.8 \pm 0.2	9.7 \pm 0.6
	10	18.1 \pm 1.1	10.9 \pm 0.2	8.9 \pm 0.8

数据后的字母表示差异显著($P < 0.05$)。Data followed letters within same column present significantly different at 0.05 level.

表 3 化妆品添加剂中的甘油 SOD 半衰期

Table 3 The half life of glycerin SOD in cosmetic additives

	浓度 (%) Concentration	半衰期 Half life (d)		
		50 $^{\circ}\text{C}$	pH 3.8	pH 8.9
对照 Control		17.1 \pm 1.2	11.1 \pm 2.2	10.3 \pm 1.5
DMDMH	0.015	15.1 \pm 1.2 ^a	10.5 \pm 1.4	9.3 \pm 0.7
	0.15	16.2 \pm 1.3	11.3 \pm 0.4	10.7 \pm 0.6
	1.5	15.8 \pm 1.3	10.1 \pm 0.3	10.1 \pm 0.2
NP-10	0.01	16.5 \pm 1.9	11.5 \pm 1.3	9.3 \pm 0.7
	0.1	15.9 \pm 1.2	10.6 \pm 0.9	10.7 \pm 0.8
	1	15.3 \pm 1.6 ^a	10.8 \pm 0.5	11.2 \pm 0.5
卡松	0.0015	15.4 \pm 2.1 ^a	11.9 \pm 1.2	10.5 \pm 0.6
	0.02	15.52 \pm 1.2	10.5 \pm 0.8	11.1 \pm 0.7
	0.2	17.1 \pm 1.4	10.3 \pm 0.4	10.3 \pm 0.6

数据后的字母表示差异显著($P < 0.05$)。Data followed letters within same column present significantly different at 0.05 level.

表 4 不同浓度化妆品添加剂中天然 SOD 的半衰期

Table 4 The half life of natural SOD in cosmetic additives

	浓度 (%) Concentration	半衰期 Half life (d)		
		50 $^{\circ}\text{C}$	pH 3.8	pH 8.9
对照 Control		17.1 \pm 1.2	11.1 \pm 2.2	10.3 \pm 1.5
DMDMH	0.015	11.4 \pm 1.8 ^a	10.5 \pm 1.4	9.6 \pm 0.6
	0.15	12.1 \pm 1.4 ^a	11.3 \pm 0.4	8.8 \pm 0.55 ^a
	1.5	11.3 (\pm 1.2 ^a)	10.1 \pm 0.3	8.7 \pm 0.8 ^a
NP-10	0.01	14.1 \pm 1.3 ^a	9.4 \pm 1.5 ^a	8.8 \pm 0.6 ^a
	0.1	14.1 \pm 1.6 ^a	9.9 \pm 0.3 ^a	9.6 \pm 0.6
	1	14.3 \pm 1.8 ^a	9.6 \pm 0.7 ^a	8.3 \pm 0.5 ^a
卡松	0.0015	15.4 \pm 2.1 ^a	10.9 \pm 1.7	9.5 \pm 0.4
	0.02	14.94 \pm 1.2 ^a	8.5 \pm 0.6 ^a	10.1 \pm 0.8
	0.2	17.1 \pm 1.4	9.1 \pm 0.8 ^a	11.2 \pm 0.5

数据后的字母表示差异显著($P < 0.05$)。Data followed letters within same column present significantly different at 0.05 level.

3 讨论

不同介质中酶活力的变化可能与酶分子结构和构象的变化有关。酶作为蛋白质,它在水溶液中以具有一定构象的三级结构状态存在,这种结构和构象是酶发挥催化功能所必需的“紧密”而又有“刚性”的状态^[13]。紧密程度主要取决于蛋白质分子内的氢键,当溶液中水分子与蛋白质分子之间所形成的氢键使蛋白质分子内氢键受到破坏时,蛋白质结构会变得松散,呈一种“开启”状态,酶活力降低。而在有机溶剂中,与蛋白质分子形成分子间氢键的水分子减少,蛋白质分子内氢键起主导作用,导致蛋白质结构变得“刚硬”,活动的自由度变小。蛋白质的这种动力学刚性限制了疏水环境下的蛋白质构象向热稳定状态转化,能保持整体结构和活性中心的结构的完整。同时,增强了蛋白质中的疏水作用,从而达到稳定蛋白质的作用^[14]。这可能是酶在甘油溶液中比较容易稳定的原因之一。

酶遇热失活通常是由酶的可逆热伸展使其反应基团和疏水区域暴露导致的。甘油 SOD 的热稳定性比水溶液中的高,可能是在有机溶剂中存在着较少的可使 SOD 热失活的水分子^[15],使由水引起的酶分子中天冬酰胺、谷氨酰胺的脱氨基作用,天冬氨酸肽键的水解,二硫键的破坏,半胱氨酸的氧化及脯氨酸和甘氨酸的异构化等过程难以进行。

从图 1 看,甘油 SOD 的稳定性受甘油浓度的影响,一定浓度的甘油有利于甘油 SOD 在高温下的稳定。甘油对酶活性中心的维持作用与酶蛋白分子表面结合的氢键数量密切相关^[16],要保持酶蛋白表面一定密度的氢键,则甘油与酶蛋白分子的比例是一个关键因素,因此甘油的浓度必须保持在一定的水平上。当酶蛋白分子表面的结合位点都被甘油的氢键饱和之后,再增加甘油浓度则对 SOD 稳定性的提高就不明显了,且包埋甘油的浓度增加可能造成一定的传质效应,从而导致酶的表现活力的降低。

酶的酸碱变性主要是因为当溶液远离蛋白质的等电点时,蛋白质分子内相同电荷间的静电斥力会导致蛋白质伸展,从而使埋藏在蛋白质内部的非电离残基电离引起的^[13]。当 pH 值改变时,由于甘油的多羟基的存在抵消了部分分子内电荷的相斥作用,从而提高了甘油包埋对 SOD 的稳定作用。在有机溶液中酶分子表面的必需水只有在特定的

pH 和离子强度下,酶分子活性中心周围的基团才能处于最佳的离子状态,有利于酶活性的表现。

温度、pH 值、搅拌速度和搅拌时间对甘油 SOD 的稳定性有明显的影响,显示甘油对 SOD 活性的稳定作用是一个依赖于作用条件的渐进过程。从实验的结果看,10℃ 以下包埋不仅对提高 SOD 的稳定性有利(表 1),而且有利于酶活性得率的保持;酸性条件下包埋对 SOD 的抗酸性是有利的,而在碱性条件下包埋则对于碱性环境中的稳定性有利(表 1),但无论酸性或碱性条件下包埋,甘油 SOD 的活性得率明显下降;因此在包埋条件的选择方面,10℃ 以下是合适的选择,而 pH 值的选择则应根据应用的目的和成本加以综合考虑(图 3)。一定范围内的搅拌速度和搅拌时间的增加往往有利于提高甘油 SOD 的稳定(图 4),虽然搅拌速度的增加可以较快地提高甘油 SOD 的稳定性,但也容易损失 SOD 的活性(图 5),显示搅拌不应太激烈,以 1 000 r min⁻¹ 的效果较好。

Zn²⁺ 和 Cu²⁺ 对蛋白质的稳定作用,是因为它们能增加溶液的离子强度,降低蛋白质分子上疏水基团的溶解度,同时还能增加蛋白质周围的水簇,引起系统总自由能的损失^[13],这两种效应结合起来,通过盐析疏水基团,使蛋白质分子更稳定。同时,Zn²⁺、Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 也是 SOD 活性中心所必需的金属离子,它与维持 SOD 的活性中心的催化能力有关^[2,12],因此,甘油 SOD 在有 Zn²⁺、Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 存在时稳定性有明显的提高(表 2)。

DMDMH、卡松和 NP-10 等化妆品添加剂能不同程度地改变 SOD 的稳定性,可能与这些添加剂改变了蛋白质内部的疏水性和蛋白质表面的亲水程度有关^[13]。甘油可提高化妆品添加剂中 SOD 的稳定性的作用机制至今未被阐明,但甘油作为一种多羟基的醇类,可影响蛋白质的疏水性及其与周围水分子的相互作用,这也是甘油包埋有利于 SOD 在化妆品中的稳定性的可能原因。

综上所述,利用甘油包埋技术提高 SOD 的稳定性是可行的,结合稳定性的提高及活性得率的保持来考虑,在 10℃ 以下,pH 6.8,以 1 000 r min⁻¹ 搅拌 10 h 是甘油包埋 SOD 的合适条件。

参考文献

- [1] Xu K Y, Kuppusamy P. Dual effects of copper-zinc superoxide dismutase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336: 1190-1193.

- [2] Keithley E M, Canto C, Zheng Q Y, et al. Cu/Zn superoxide dismutase and age-related hearing loss [J]. *Hear Res*, 2005, 209: 76–85.
- [3] Yang D S(杨东升). Researching and application of superoxide dismutase [J]. *Chem Bioeng(化学与生物工程)*, 2004(3): 7–9.
- [4] Yuan Q S(袁勤生). Focal points and key problems in application of SOD in China [J]. *Chin J Pharmac(中国医药工业杂志)*, 1994, 25(50): 227–231.(in Chinese)
- [5] Tie C J(铁翠娟), Zhang H(张怀), Zhang B R(张博润). The comparison of the stability of molecular modified and unmodified superoxide dismutase [J]. *Microbiol Commun(微生物学通报)*, 1999, 26(2): 96–98.(in Chinese)
- [6] Wang W(王玮), Bai S(白姝), Dong X Y(董晓燕), et al. Effect of soluble alcohols on conformational changes and refolding of lysozyme [J]. *J Chem Ind Engin(化学通报)*, 2006, 57(1): 74–78.(in Chinese)
- [7] Timasheff S N, Arakawa T. Mechanisms of protein precipitation and stabilization by cosolvents [J]. *J Cryst Growth*, 1998, 90: 39–46.(in Chinese)
- [8] Li Z H(李振华), Wang J S(王金水), Zhao M M(赵谋明), et al. Studies of glycerol (plasticizer) on properties of wheat gluten protein films [J]. *Grain Process(粮食加工)*, 2005(6): 50–54.(in Chinese)
- [9] Feng Z P(冯治平), Liu Q B(刘清斌). Study on preservative properties of peanut - protein - isolate film [J]. *Food Techn(食品技术)*, 2004(9): 16–19.(in Chinese)
- [10] Xu S H(许申鸿), Hang H(杭瑚), Li Y P(李运平). A study to improving the measuring method for SOD activity by pyrogallol autoxidation [J]. *Chem Mag(化学通报)*, 2001, 8: 516–519.(in Chinese)
- [11] Quint P, Reutzel R, Mikulski R, et al. Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: Mechanism of inactivation [J]. *Free Radical Biol Med*, 2006, 40: 453–458.
- [12] Ishimoto N, Nemoto T, Nagayoshi K, et al. Improved anti-oxidant activity of superoxide dismutase by direct chemical modification [J]. *J Contr Release*, 2006, 111: 204–211.
- [13] Luo G M(罗贵民), Cao S G(曹淑桂), Zhang J(张今). *Enzyme Engineering [M]*. Beijing: Chemistry Industry Press, 2002: 121–161.(in Chinese)
- [14] Xia Q C(夏其昌), Zeng R(曾嵘). *Protein Chemistry and Proteome [M]*. Beijing: Science Press, 2005: 6–70.(in Chinese)
- [15] Goodall C P, Bender R C, Brooks J K, et al. *Biomphalaria glabrata* cytosolic copper/zinc superoxide dismutase (*SOD1*) gene: Association of *SOD1* alleles with resistance/susceptibility to *Schistosoma mansoni* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2006, 147: 207–210.
- [16] Dai J J(戴京晶), Liu F(刘奋), Liang W(梁伟), et al. Analysis on preservatives and content of heavy metal in cosmetic [J]. *Mod Preven Med(现代预防医学)*, 2006, 33(1): 36–38.(in Chinese)