

# 响应面法优化猪血超氧化物歧化酶的提取工艺

姚晓蕾, 熊双丽, 张晓娟

(西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621000)

**摘要:** 为了开发利用猪血资源, 采用猪血为原料, 以超氧化物歧化酶的比活力为指标, 对热变性提取过程中影响超氧化物歧化酶活力的水浴温度、水浴时间和硫酸铜加入量三个因素进行考察, 并在此基础上, 采用中心组合 (Box-Behnken) 试验设计及响应面分析对猪血超氧化物歧化酶 (SOD) 的热变性提取工艺进行优化, 将最优热变性条件下提取的上清液通过氯仿-乙醇处理, 丙酮沉淀提取粗酶液, 并采用 Sephadex G-100 对粗酶液进行纯化。最后采用聚丙烯酰胺凝胶电泳对纯化后的酶液进行纯度鉴定。结果表明: 水浴温度、硫酸铜加入量对猪血 SOD 活力影响显著 ( $P < 0.05$ ), 热处理最佳工艺为: 水浴温度为  $66^{\circ}\text{C}$ , 水浴时间为 25 min, 硫酸铜加入量为 3.10%, 此时粗酶液的比活力为  $167.74 \pm 0.38 \text{ U/mg}$ 。经 Sephadex G-100 纯化后酶液的比活力为  $6594.55 \pm 16.20 \text{ U/mg}$ , 活力回收率为  $62.15 \pm 0.02\%$ , 纯化倍数为  $39.14 \pm 0.36$ 。聚丙烯酰胺凝胶电泳分析酶纯度已达到电泳纯。

**关键词:** 猪血; 超氧化物歧化酶; 热变性; 响应面分析

文章编号: 1673-9078(2014)2-223-227

## Extraction of Superoxide Dismutase from Porcine Blood by Response Surface Methodology

YAO Xiao-lei, XIONG Shuang-li, ZHANG Xiao-juan

(School of Life and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China)

**Abstract:** The thermal denaturalization was applied to extract superoxide dismutase from porcine blood. On the basis of single-factor experiments, technological parameters were optimized by Box-Behnken central combination design and response surface methodology (RSM) with the specific activity of SOD as index. The crude enzyme was extracted by ethanol-chloroform and acetone, then purified by Sephadex G-100 gel column chromatography. The purified superoxide dismutase was identified by SDS-PAGE. The results showed that the specific activity of enzyme was significantly affected by bath temperature and copper sulfate content. The optimum conditions were bath temperature  $66^{\circ}\text{C}$ , bath time 25min and copper sulfate 3.10%, under which the special activity of crude enzyme was  $167.74 \pm 0.38 \text{ U/mg}$ . After purification, the special activity was increased to  $6594.55 \pm 16.20 \text{ U/mg}$ , with recovery rate of  $62.15 \pm 0.02\%$ . The purification of the enzyme was analyzed by poly acrylamide gel electrophoresis and the purified enzyme reached electrophoresis level.

**Key words:** porcine blood; superoxide dismutase; thermal denaturalization; response surface methodology

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 是一种广泛存在于动物、植物及微生物中的金属酸性蛋白酶<sup>[1]</sup>, 能够催化超氧阴离子发生歧化反应<sup>[2]</sup>, 具有抗氧化、抗辐射、抗肿瘤及抗衰老等功能<sup>[3-4]</sup>, 可以作为食品、药品及日用化工产品的添加剂。其酶分子上以共价键相结合的金属辅基, 使它对热以及某些理化性质都比一般的酶稳定<sup>[5]</sup>, 所以采用热变性法提取 SOD 具有一定的可行性, 同时热变性法具有成本低廉、环保、操作简单等优点。

动物血液是提取制备 SOD 的主要资源。中国猪

血资源丰富, 而且猪血相比其他动物血液, SOD 含量较高, 其提取过程具有投资少、见效快等优点。目前, 从牛血和猪血中提取 SOD 的主要工艺包括血球分离、溶血、有机溶剂除血红蛋白、沉淀、热变性、再沉淀, 以及柱层析分离得到成品<sup>[6-8]</sup>。该工艺使废弃物中有机溶剂含量较高, 不利于 SOD 外蛋白质类的活性物质的回收利用, 而且生产周期较长, 产率不高<sup>[1-2]</sup>。为了能够综合利用猪血红细胞, 本文主要利用热变性方式去除杂蛋白<sup>[9]</sup>, 使 SOD 外的蛋白质能够回收利用, 减少有机溶剂的使用, 缩短了生产周期, 提高产率。文章首先对热变性提取过程中影响超氧化物歧化酶活力的水浴温度、水浴时间和硫酸铜加入量三个因素进行考察分析, 在此基础上, 采用中心组合 (Box-Behnken) 试验设计及响应面分析对猪血超氧化物歧化酶

收稿日期: 2013-09-09

基金项目: 四川省科技厅项目 (11ZS2013)

作者简介: 姚晓蕾 (1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为食品应用化学

通讯作者: 熊双丽 (1977-), 女, 博士, 研究方向为碳水化合物与生物技术

(SOD)的热变性提取工艺进行优化,以最优的热变性工艺提取粗酶液,粗酶液经氯仿-乙醇沉淀去除杂蛋白,然后用丙酮沉淀, SephadexG-100 纯化。最后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳对 SephadexG-100 纯化后酶液的纯度及活性进行检验,旨在为猪血 SOD 的产业化绿色生产和应用,以及猪血综合利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 原料、试剂和设备

#### 1.1.1 原料

新鲜猪血 四川绵阳青义镇盛龙屠宰场。

#### 1.1.2 试验试剂

硫酸铜、柠檬酸三钠、三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸二钠、焦性没食子酸、考马斯亮蓝 G250、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺,考马斯亮蓝 R-250 等均为国产分析纯。

#### 1.1.3 设备

T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;离心机, Waters 公司;红外光谱仪 Nicolet-5700,美国尼高力仪器公司;MODULYOD 真空冷冻干燥机,美国 Thermo Electron 公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,郑州长城科工贸有限公司;UNICO-7200 分光光度计,上海尼龙柯仪器有限公司;HL-2B,数显恒流泵;HD-3 紫外检测仪,上海沪西分析仪器有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 工艺流程

新鲜抗凝猪血→离心,洗涤得干净红血球→破碎得红血球溶解液→热变性→上清液经氯仿乙醇混合溶液处理(氯仿:乙醇(V:V)=3:5)→上清液冷却,等量丙酮沉淀→SephadexG-100 柱层析→SOD

注:在热变性阶段进行响应面分析。

#### 1.2.2 检测方法

蛋白质的测定:考马斯亮蓝法<sup>[1]</sup>,以牛血清白蛋白为标准。

酶活性测定:微量邻苯三酚自氧化法<sup>[2]</sup>。活力单位定义:25℃、1 mL 反应液中每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率为 50% 时的酶量为一个活力单位。比活力,回收率等参照文献<sup>[2]</sup>,以热处理所得酶液回收率假定为 100%,提纯倍数为 1。

热变性的溶血液在 4000 r/min 离心 15 min 后,取上清液,分别测定蛋白质浓度和酶活力。

### 1.2.3 热变性法提取猪血 SOD 的单因素试验

采用破膜的红细胞液,分别以不同的水浴时间、水浴温度和硫酸铜添加量进行单因素试验,并每个水平重复 3 次取其平均值,分析各单因素对猪血 SOD 比活力的影响。

### 1.2.4 响应面法优化猪血 SOD 提取工艺

在单因素试验结果的基础上,运用 Design Expert 7.0 软件对水浴温度、水浴时间和硫酸铜添加量进行 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验设计,通过试验结果建立数学模型,进行方差分析及响应面分析,并选择最优条件。

### 1.2.5 猪血 SOD 纯化

SephadexG-100 预处理后装入 1.60×80 cm 封口层析柱中,用 pH 7.80、10 mmol/L 的磷酸缓冲液平衡层析柱并上样,以 pH 7.80, 10 mmol/L 的磷酸缓冲液进行洗脱,用微量邻苯三酚法和考马斯亮蓝法进行检测,收集活性吸收峰。

### 1.2.6 猪血 SOD 纯度及活性鉴定

采用不连续系统的垂直板电泳,胶浓度为 7.50%,电泳缓冲液为 pH 8.20 的 Tris-Gly 缓冲液,蛋白质染色用考马斯亮蓝 R-250<sup>[10]</sup>。活性染色采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法<sup>[11]</sup>。

### 1.2.7 数据分析

实验中所有结果都是三次测定的平均值,计算标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 热变性法提取猪血 SOD 的单因素试验

#### 2.1.1 水浴时间对 SOD 比活力的影响

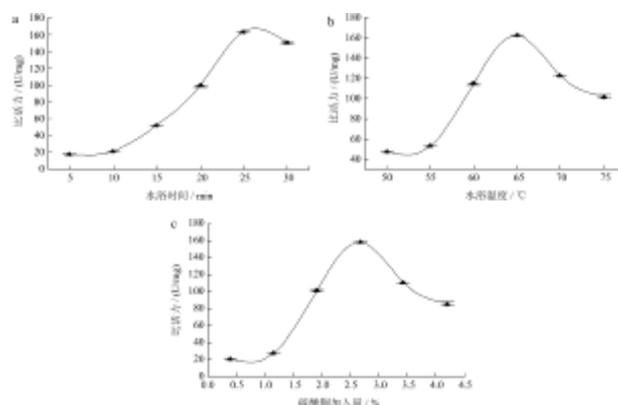


图 1 各因素对 SOD 比活力的影响(上述三图已添加误差线)

Fig.1 Effects of each factors on the special activity of SOD from porcine blood

注: a.水浴时间对 SOD 比活力的影响, b.水浴温度对 SOD 比活力的影响, c.硫酸铜添加量对 SOD 比活力的影响。

在水浴温度为 65 °C, 硫酸铜添加量为 3% 的条件下, 考察水浴时间分别为 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min 时, 粗酶液中 SOD 比活力的变化, 结果表明 (图 1a): 随着水浴时间的延长, SOD 比活力不断增加。当水浴时间小于 25 min 时, SOD 比活力逐渐增加。主要原因在于水浴时间延长, 更多的杂蛋白发生变性, 蛋白质浓度降低, 比活力增加。但当时间大于 25 min 时, 少量 SOD 的活性部位遭到破坏, 导致比活力降低。因此选择 25 min 为最佳时间。

### 2.1.2 水浴温度对 SOD 比活力的影响

在水浴时间为 25 min, 硫酸铜添加量为 3% 的条件下, 考察水浴温度分别为 50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C、75 °C 时, 粗酶液中 SOD 比活力的变化, 试验结果表明 (图 1b): 大多数蛋白质从 55 °C 开始发生热变性, 随着水浴温度的升高, 更多的杂蛋白发生变性, 蛋白质浓度降低, 致使 SOD 比活力不断增加。但当温度超过 65 °C 以后, 比活力降低, 可能是由于温度过高, SOD 也逐渐失活。因此, 当水浴温度为 65 °C 时, SOD 比活力最大, 选择 65 °C 为最佳温度。

### 2.1.3 硫酸铜添加量对 SOD 比活力的影响

硫酸铜不仅具有沉淀杂蛋白的作用, 而且对 SOD 具有一定的保护作用<sup>[12]</sup>。在水浴时间 25 min, 水浴温度 65 °C 的条件下, 考察硫酸铜添加量为 0.50%、1.00%、2.00%、3.00%、4.00% 时, 粗酶液中 SOD 比活力的变化, 试验结果表明 (图 1c): 随着粗酶液中硫酸铜添加量的增加, SOD 比活力不断增加。但当加入量大于 3.00% 时, SOD 比活力降低。原因是随着硫酸铜浓度的增加, 更多的杂蛋白发生变性, 蛋白质浓度降低, SOD 比活力增加, 硫酸铜添加量大于 3.00% 时, 抑制作用逐渐增强, SOD 比活力降低。因此, 选择 3.00% 为硫酸铜的加入量。

## 2.2 响应面分析法优化猪血 SOD 提取工艺

### 2.2.1 响应面分析法试验因素及水平的选择

表1 因素水平编码表

Table 1 Experimental code and correspondingly origin level

试验因素	水平		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> (水浴温度/°C)	60	65	70
X <sub>2</sub> (水浴时间/min)	20	25	30
X <sub>3</sub> (硫酸铜加入量/%)	2	3	4

根据单因素试验结果, 选取 SOD 比活力为考察的响应值。进行水浴温度 (X<sub>1</sub>, °C), 水浴时间 (X<sub>2</sub>, min) 和硫酸铜添加量 (X<sub>3</sub>, %) 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 试

验设计。对水浴温度、水浴时间和硫酸铜添加量作如下变换: X<sub>1</sub>=(T-65)/5, X<sub>2</sub>=(t-25)/5, X<sub>3</sub>=(Z-3%)/1%, 利用 Design-Expert 软件, 对试验结果进行响应面分析<sup>[13]</sup>, 优化 SOD 的提取工艺。

### 2.2.2 响应面分析法试验设计方案与结果分析

以 SOD 比活力作为响应值, 采用响应面回归 (RSREG) 进行数据分析。SOD 提取优化试验设计和结果见表 2。

表 2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Program and experimental results of response surface methodology (RSM)

实验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	SOD 比活力/(U/mg)
1	0	0	0	165.43
2	1	-1	0	131.48
3	0	0	0	165.82
4	-1	-1	0	109.29
5	1	1	0	145.87
6	0	1	1	124.20
7	-1	1	0	97.84
8	1	0	-1	127.73
9	0	-1	-1	107.63
10	-1	0	1	105.21
11	0	0	0	165.32
12	-1	0	-1	84.10
13	0	-1	1	150.29
14	0	0	0	166.30
15	0	1	-1	135.53
16	1	0	1	137.32
17	0	0	0	164.36

### 2.2.3 数学模型的建立和方差分析

以 SOD 比活力为响应值, 经过回归拟合后的二次多项回归方程  $Y=165.54+18.25X_1+0.59X_2+7.75X_3+6.46X_1X_2-2.88X_1X_3-13.50X_2X_3-30.12X_1^2-14.30X_2^2-21.83X_3^2$  对该模型进行方差分析, 结果见表 3。

由表 3 可知, 失拟检验  $P=0.0903>0.05$ , 差异不显著, 总回归方程 F 检验  $P<0.0001$ , 差异极显著, 说明该模型与实际试验拟合较好, 可以用于猪血 SOD 提取工艺中 SOD 比活力的理论预测。方程一次项的影响中 X<sub>1</sub> 和 X<sub>3</sub> 的  $P<0.01$ , 差异极显著, X<sub>2</sub> 的  $P=0.0923$ , 差异较显著; 二次项的影响中 X<sub>1</sub><sup>2</sup>、X<sub>2</sub><sup>2</sup> 和 X<sub>3</sub><sup>3</sup> 的  $P<0.01$ , 差异极显著; X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>、X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>、X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> 的交互作用  $P<0.01$ , 差异极显著。三个因素对 SOD 比活力影响大小依次为: 水浴温度>硫酸铜添加量>水浴时间。

### 2.2.4 响应面分析

固定一个因素在 0 水平, 求另外两个因素的交互效

应方程, 根据这些方程得到三个因子(水浴温度 $X_1$ , 水浴时间 $X_2$ , 硫酸铜添加量 $X_3$ )的交互效应曲面图。

表3 SOD比活力回归方程的方差分析

Table 3 Variance Analysis for SOD special activity regression equations

参数	平方和	df	均方	F值	P值	显著性
模型	11462.56	9	1273.62	1717.44	<0.0001	significant
$X_1$	2663.22	1	2663.22	3591.28	<0.0001	**
$X_2$	2.82	1	2.82	3.80	0.0923	
$X_3$	480.80	1	480.80	648.35	<0.0001	**
$X_1X_2$	167.00	1	167.00	225.19	<0.0001	**
$X_1X_3$	33.21	1	33.21	44.78	0.0003	**
$X_2X_3$	728.76	1	728.76	982.71	<0.0001	**
$X_1^2$	3820.52	1	3820.52	5151.89	<0.0001	**
$X_2^2$	861.06	1	861.06	1161.12	<0.0001	**
$X_3^2$	2006.73	1	2006.73	2706.03	<0.0001	**
残差	5.19	7	0.74			
失拟项	4.00	3	1.33	4.49	0.0903	Not significant
误差项	1.19	4	0.30			
总变异	11467.75	16				

注: \*\*极显著水平 ( $P < 0.01$ ), \*显著 ( $P < 0.05$ )。

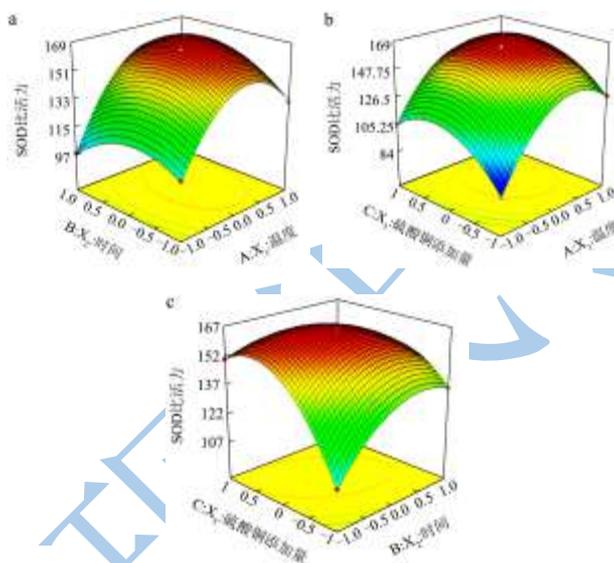


图2 各因素交互效应对猪血SOD比活力影响的曲面图

Fig.2 Contour and surface plot of the combined effects of each factors on the special activity of SOD from porcine blood

注: a 水浴温度和水浴时间交互效应, b.水浴温度和硫酸铜添加量交互效应, c.水浴时间和硫酸铜添加量交互效应。

图2a、图2b、图2c直观地反映了各因素对响应值的影响, 比较上述三个图可知: 随着因素水平的提高, SOD比活力呈现先升后降的明显趋势。其中水浴温度( $X_1$ )对SOD比活力的影响最为显著, 表现为曲线相对较陡; 其次为硫酸铜添加量( $X_3$ ), 而水浴时间( $X_2$ )

表现为曲线较为平滑, 随其数值的增加或减少, 响应值变化较小。

运用Design Expert7.0的响应面分析软件对试验结果进行响应面优化, 得到模型的最优解: 水浴温度为66.49  $^{\circ}\text{C}$ , 水浴时间为25.08 min, 硫酸铜添加量为3.12%。此条件下, 得SOD比活力理论可达168.13 U/mg。

### 2.2.5 验证试验

为了检验试验结果是否与真实情况相一致, 根据上述结构进行近似验证试验, 考虑到实际操作的便利, 将最佳工艺修正为水浴温度66  $^{\circ}\text{C}$ , 水浴时间为25 min, 硫酸铜添加量为3.10%, 在此条件下进行3次平行实验, 得到SOD酶液的平均比活力为167.74 U/mg, 理论预测值为168.13 U/mg, 与理论预测值相比, 其相对误差为0.23%。说明了回归方程的预测值与试验值之间具有较好的拟合度。因此, 基于响应面法所得的优化工艺参数准确可靠, 具有实用价值。

## 2.3 SOD的分离纯化与纯度鉴定

### 2.3.1 SOD的活力回收

经 Sephadex G-100 凝胶柱层析后洗脱曲线见图 3, 通过酶活性检测, 其中第一个峰为活性峰, 收集部分为36管至47管。

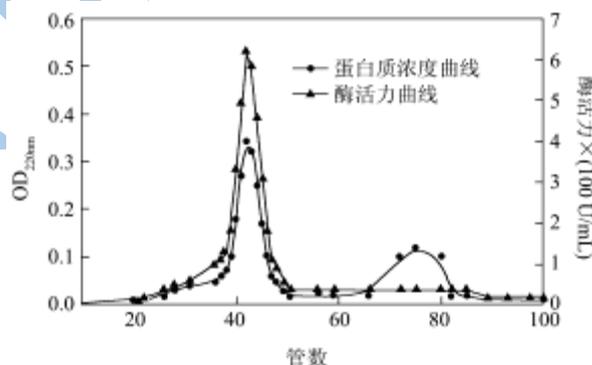


图3 猪血红细胞 Cu, Zn-SOD 在 Sephadex G-100 色谱中的纯化

Fig.3 The purification of Cu, Zn-SOD in Sephadex G-100 chromatography from porcine blood

200 mL 血液纯化过程中酶液的总活力、总蛋白、比活力和酶活力回收率的变化见表 4。与相关文献比较<sup>[6]</sup>, 经热处理后, 酶比活力增加了 2 倍。经一次丙酮沉淀后 SOD 活力为 2840.41 U/mg, 与文献中两次丙酮沉淀所得酶活相比<sup>[2]</sup>, 减少了有机溶剂的多次使用。

### 2.3.2 SOD 的纯度及活性鉴定

经 Sephadex G-100 纯化后的酶液在 SDS-PAGE 染色后显示一条带, 表明其达到电泳级。(如图 4a、图 4b), 同时活性染色在蛋白带对应的位置均呈现出表示活性的亮斑, 表明该蛋白带为猪血红细胞 Cu、Zn-SOD

(见图 4c、图 4d)。

表 4 猪血红细胞中 SOD 的纯化结果

Table 4 Purification of Cu, Zn-SOD from porcine blood

步骤	总活力/( $\times 10^4$ U)	总蛋白/mg	比活力/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
热变性	11.81 $\pm$ 0.07	704.06 $\pm$ 2.40	167.74 $\pm$ 0.38	1.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
乙醇-氯仿处理	10.13 $\pm$ 0.72	250.01 $\pm$ 1.23	405.04 $\pm$ 9.00	2.42 $\pm$ 0.18	85.77 $\pm$ 5.55
丙酮沉淀	8.85 $\pm$ 0.44	31.16 $\pm$ 1.35	2840.41 $\pm$ 20.24	16.93 $\pm$ 0.08	74.94 $\pm$ 3.28
SephadexG-100纯化	7.34 $\pm$ 0.26	11.13 $\pm$ 0.37	6594.55 $\pm$ 16.20	39.14 $\pm$ 0.36	62.15 $\pm$ 0.02

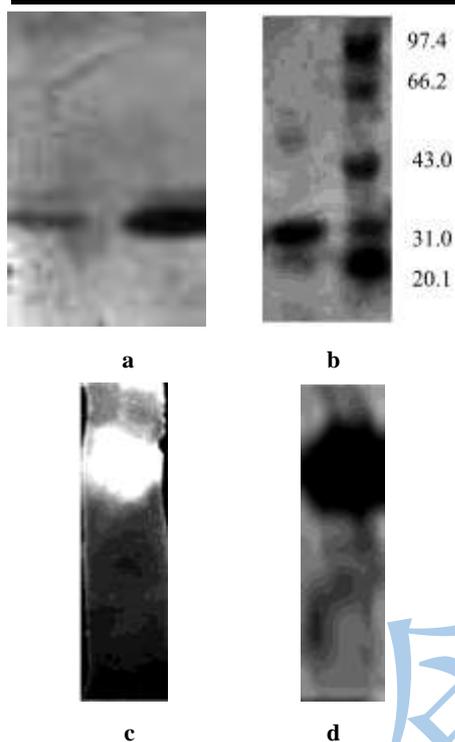


图4 猪血Cu, Zn-SOD的 SDS-PAGE图谱

Fig.4 SDS-PAGE of Cu, Zn-SOD from porcine blood

注：a.SephadexG-100 纯化后两种不同浓度的 SOD，b.SephadexG-100 纯化后的 SOD 与低分子量标准蛋白质，c.NBT 和核黄素染色，d.考马斯亮蓝染色。

### 3 结论

3.1 采用热变性方式对猪血 SOD 进行提取，通过单因素试验和 Box-Behnken 试验设计以及响应面分析对猪血 SOD 提取工艺进行优化，得出热处理工艺条件为水浴温度为 66  $^{\circ}$ C，水浴时间为 25 min，硫酸铜加入量为 3.10%，并得到猪血 SOD 比活力与热变性各因素变量的二级方程模型，该模型回归极显著，对于试验拟合较好。

3.2 相关文献报道传统方法纯化后所得酶比活力约在 3000~4500 U/mg，此试验纯化后比活力为 6594.55 $\pm$ 16.20 U/mg，活力回收率为 62.15 $\pm$ 0.02%，纯化倍数为 39.14 $\pm$ 0.36。相比传统方法都有较大提高，该方法

省去了二次丙酮沉淀，减少了有机溶剂的使用，而且有利于 SOD 外蛋白质的回收利用。

3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析提取物，已达到电泳纯。

### 参考文献

- [1] 王玉田.动物性副产品加工利用[M].北京:化学工业出版社,2009  
WANG Yutian.Processing and Utilization of Animal By-products[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009
- [2] 张丽萍,李开雄.畜禽副产物综合利用技术[M].北京:中国轻工业出版社,2009  
ZHANG Liping, LI Kaixiong. Fine Processing Technologies of Livestock By-products [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009
- [3] Stefan L, Linochev, Lrwin F. Mechanism of the Peroxidase Activity of Cu, Zn-superoxide Dismutase [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2010, 48: 1565-1569
- [4] 张俊艳,贺阳.超氧化物歧化酶研究与应用[J].食品工业, 2012,3:119-121  
ZHANG Junyan, HE Yang. Literature review of research and application on superoxide dismutase [J] Food Industry, 2012, 3: 119-121
- [5] Amit B, Som D, Arun K, et al. The Basic and Applied Aspects of Superoxide Dismutase [J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2011, 68: 129-138
- [6] LIN Chinwen, YANG Jenghuh, SU Liehchi. The Extraction and Properties of Superoxide Dismutase from Porcine Blood [J]. Meat Science, 1997, 46: 303-312
- [7] Raziye Ozturk-Urek, Leman Ttarhan. Purification and Characterization of Superoxide Dismutase from Chicken Liver [J]. Comparative biochemistry and physiology, 2001, 128: 205-212
- [8] Trayana Nedeva, Pavlina Dolashka-Angelova, Veosela Moshtanska, et al. Purification and Partial Characterization of Cu/Zn Superoxide Dismutase from Kluyveromyces Marxianus yeast [J]. Journal of Chromatography B, 2009,

- 877: 3529-3536
- [9] 刘静波,刘婧,张杰,等.多元线性回归设计优化热变性病提取猪血 SOD 的最佳条件研究[J].食品研究与开发, 2010, 5(31): 19-21
- LIU Jing-bo, LIU Jing, ZHANG Jie, et al. Best Condition on Purifying Superoxide Dismutase in Swine Blood by Heating Multiple Linear Regression. [J]. Food Research and development, 2010, 5(31): 19-21
- [10] Aguilera JM, Food Material Science [M]. New York:Springer Science, Business Media, 2008: 221-225
- [11] Friedman M Biochemistry and safety of acrylamide [J]. Journal of Agricultural and Food Science, 2003: 1295- 1319
- [12] Sandra M L, wILfredo C. Dominant Role of Copper in Kinetic of Cu,Zn-superoxide Dismutase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 340: 457-461
- [13] SUN Yong xu, LI Tian bao, YAN Ji wei, et al. Technology Optimization for Polysaccharide s (POP) Extraction from the Fruiting Bodies of Pleurotus Ostereatus by Box-Behnken Statistical Design. [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80: 242-247