

16 种食用菌超氧化物歧化酶(SOD)活性、热稳定性及同工酶的研究

程光宇^{1,3}, 王晓炜², 吴京燕^{1,3}, 陶明煊², 夏纪凤²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

(2. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097)

(3. 江苏吴中大自然生物工程有限责任公司, 江苏 南京 210097)

[摘要] 对 16 种新鲜食用菌 SOD 活性、热稳定性及同工酶类型进行研究, 结果表明, 大多数食用菌有较高 SOD 活性, 其中以金顶侧耳的酶活性最高, 达 1 622 U/g, 比活性也有 366 U/mg, 酶活性超过 1 000 U/g 的有糙皮侧耳、蘑菇、草菇和柳松菇, 有 14 种食用菌 SOD 活性超过 500 U/g. 食用菌中主要含对氯仿-乙醇液敏感的 SOD, 占其总活性的 70% ~ 96%, 以金顶侧耳和糙皮侧耳的活性最高, 分别为 1 538 U/g 和 1 052 U/g. SOD 的热稳定性研究表明, 大多数食用菌 SOD 在 90 ℃ 加热 10 min 后, 能保留 40% 以上的活性, 金针菇、滑菇、毛头鬼伞和大球盖菇的菌盖在 90 ℃ 加热 10 min 后, 能保留 75% 以上的活性. 食用菌 SOD 类型为 Mn-SOD, 未发现有 Cu·Zn-SOD. 菌盖和菌柄的分析结果表明, 二者在 SOD 活性、热稳定性及同工酶谱带数方面存在一定的差异.

[关键词] 食用菌, 超氧化物歧化酶, 热稳定性, 同工酶

[中图分类号] S 646, TS 201.2 + 5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)04-0096-05

Study on the Activity, Thermostability and Isozymes of Superoxide Dismutase in 16 Species of Edible Fungi

Cheng Guangyu^{1,3}, Wang Xiaowei², Wu Jingyan^{1,3}, Tao Minxuan², Xia Jifeng²

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. Jinling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(3. Jiangsu Wuzhong Nature Biotech. Co., Ltd, Nanjing 210097, China)

Abstract: The results of the study on the activity, thermostability and isozymes of Superoxide Dismutase (SOD) in 16 species of edible fungi with the method of NBT photochemical reaction and gel concentration gradient electrophoresis indicated that most of edible fungi had high SOD activity, especially *Pleurotus citrinipileatus*, which contained 1 622 U/g, and 366 U/mg protein. In crude extracts of *P. ostreatus*, *Agaricus bisporus*, *Volvariella volvacea* and *Agrocybe aegerita*, they all contained SOD activity of more than 1 000 U/g and there was not less than 500 U/g of SOD activity in 14 species of edible fungi. In edible fungi, it contained mainly chloroform-ethanol sensitive SOD, and it occupied 70% ~ 96% of total activity. This type of SOD were found high in crude extracts of *P. citrinipileatus* and *P. ostreatus* of 1 538 U/g and 1 052 U/g respectively. Most SOD activity for the edible fungi were stable with heat and over 40% of activity was retained at 90℃ for 10 min. Especially for *Flammulina velutipes*, *Pholiota nameko*, the pileus of *Coprinus comatus* and *Stropharia rugoso-annulata*, it remained over 75% of the SOD activity after their crude extract had been incubated at 90℃ for 10 min. In this paper it was found that the type of SOD was Mn-SOD and not Cu·Zn-SOD on the electrophoresis gel of 16 species of edible fungi. The activity, thermostability and isozyme of SOD was analyzed in the pileus and stipe, both of them had the difference that, usually, the pileus had a higher activity and thermostability than the stipe and the number of bands of isozyme in the pileus was more than those of the stipe.

Key words: edible fungi, superoxide dismutase, thermostability, isozyme

0 引言

超氧化物歧化酶是存在于生物体内能有效清除超氧自由基的一类金属酶,它存在于靠氧呼吸的所有生物体中,近年的研究表明许多疾病的起因、发生和发展与机体自由基代谢失调密切相关,而 SOD 是细胞内能及时清除机体内的超氧自由基的主要保护酶,因而,在预防和治疗由氧自由基伤害导致的某些疾病,如肿瘤、糖尿病、心血管疾病及多种皮肤病^[1,2]等方面,正在起到越来越重要的作用。

食用菌资源丰富,营养价值高,含有许多生物活性物质,如多糖类、SOD 酶类等,利用这些生物活性物质制备抗癌新药或制备功能性食品,已成为当今生物医药界的研究发展新方向,但目前食用菌药用有效成分和药理研究中,涉及食用菌 SOD 的报道很少,特别是我国近年来选育、引进和开发的一些珍稀食用菌,如毛头鬼伞、大球盖菇、真姬菇等,其 SOD 的研究国内外尚未见报道,本文通过对 16 种食用菌 SOD 的活性、热稳定性及同工酶的研究,旨在为食用菌资源的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

香菇、杏鲍菇、金针菇、毛头鬼伞、平菇、蘑菇、草菇、姬菇、柳松菇、白灵侧耳、大杯伞、真姬菇 1(商品名为蟹味菇)分别购于南京市农贸市场及苏果超市,金顶侧耳、大球盖菇、滑菇、真姬菇 2 购于武夷山农贸市场,糙皮侧耳由本单位栽培。

考马斯亮蓝 G-250(Fluka)、牛血清白蛋白、甲硫氨酸(Sigma)、NBT(纯度>98%,南京卓尔生化有限公司),朱桔 Mn-SOD 和牛血 Cu·Zn-SOD(由本单位纯化至电泳纯),其它试剂为国产分析纯及生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备

取食用菌子实体,清洗后称量并剪碎,按每克鲜重加入 2~3 mL 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)进行研磨匀浆,再于冰浴中进行超声波破碎(400 W,20×2 s),10 000 r/min 离心 10 min,弃去沉淀,上清液即为 SOD 粗酶液,用于实验或分装于若干小离心管内冰冻保存备用。

1.2.2 SOD 活性测定

按 Stewert 和 Bewley 的 NBT 光化还原法测定 SOD 活性^[3]。酶活性均以 U/g(鲜重)表示,酶比活性以 U/mg 蛋白表示。对氯仿-乙醇液敏感的 SOD 活性,以对照酶液活性与经氯仿-乙醇液($v/v=2:3$)处理(按酶液:处理液=1:0.25 的体积比混合,于 37℃保温 1 h,离心后测定)后的酶活性之差表示。

1.2.3 蛋白质含量测定

按 Bradford 方法^[4]进行,以牛血清白蛋白(纯度>98%)为标准蛋白,测定粗酶液的蛋白含量。

1.2.4 SOD 的凝胶电泳分离及酶类型初步鉴定

采用聚丙烯酰胺浓度梯度胶电泳分离 SOD 同工酶^[5],利用 Cu·Zn-SOD 对氯仿-乙醇液不敏感,而 Mn-SOD 对氯仿-乙醇液敏感的特性,区分 Cu·Zn-SOD 和 Mn-SOD。

1.2.5 SOD 的热稳定性测定

将酶液分别在 60℃、70℃、80℃、90℃ 的温度中处理 10 min,取出立即冷却至室温,测定残存酶活性。以 25℃ 时测定的活性为 100%,测定不同温度下 SOD 相对活性,绘制温度-相对活性曲线图。

2 结果与分析

2.1 超声波处理对提取食用菌 SOD 活性的影响

结果见图 1。经超声波处理后,不论是菌盖、菌柄或子实体,酶活性都明显提高,可见超声波处理有助于食用菌 SOD 的提取,故对 16 种食用菌 SOD 的提取采用了超声波处理的方法。

2.2 食用菌 SOD 活性及比活性的比较

结果见图 2 和表 1、2。金顶侧耳活性最高达 1 622 U/g,活性超过 1 000 U/g 的有糙皮侧耳、蘑菇、草菇和柳松菇,14 种食用菌活性超过 500 U/g;比活性最高的为毛头鬼伞达 422.6 U/mg,超过 250 U/mg 的还有

金顶侧耳、柳松菇和真姬菇 2 的菌柄。同一品种中的菌盖 SOD 的活性和比活性一般都高于菌柄,二者相差约 1~2 倍,柳松菇和毛头鬼伞菌盖的酶活性超过菌柄 3 倍,但大球盖菇、滑菇菌盖和菌柄活性基本相等。金针菇比较特殊,无论是开伞还是未开伞,菌盖活性及比活性都低于菌柄 2 倍以上。

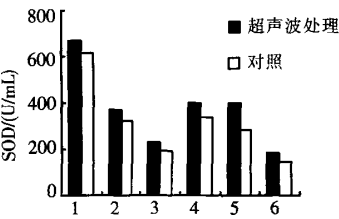


图 1 超声波处理对酶活性的影响

1、2 为柳松菇; 3、4 为金针菇; 5 为白灵侧耳; 6 为香菇; 1、3 为菌盖; 2、4 为菌柄; 5、6 为子实体

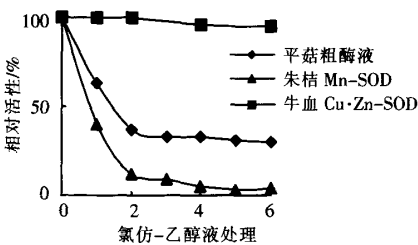


图 2 氯仿-乙醇液处理对酶活性的影响

0:对照, 1~6 分别表示氯仿-乙醇液与酶液比例分别为 1:0.1; 1:0.15; 1:0.2; 1:0.25; 1:0.3; 1:0.4

2.3 氯仿-乙醇液对食用菌 SOD 活性的影响

图 2 和表 1、2 结果还表明,当酶液与氯仿-乙醇液之比为 1:0.25 时,Mn-SOD 已丧失 95% 以上的活性,而 Cu·Zn-SOD 活性不受影响。平菇粗酶液经氯仿-乙醇液处理后,与 Mn-SOD 相似,可见当酶液与氯仿-乙醇液之比为 1:0.25 时,能完全抑制对氯仿-乙醇液敏感的 Mn-SOD 活性。在食用菌中,对氯仿-乙醇液敏感 SOD 活性占总活性的 70% 以上,其中金顶侧耳、糙皮侧耳的活性都在 1 000 U/g 以上。同一品种菌盖和菌柄 SOD 活性测定表明,菌盖的活性一般都高于菌柄,如真姬菇、白灵侧耳、杏鲍菇和毛头鬼伞等,以柳松菇菌盖的活性最高,达 834 U/g,菌柄的活性也达 692.4 U/g,达 500 U/g 以上的还有真姬菇 2、杏鲍菇和毛头鬼伞的菌盖。

表 1 食用菌 SOD 活性及比活性的比较

名称	分科	拉丁文名称	子实体 SOD		子实体 SOD1*	
			U/g	U/mg	U/g	占总 SOD/%
蘑菇	蘑菇科	<i>Agaricus bisporus</i>	1098.9	164.0	991.9	90.3
大杯伞	白蘑科	<i>Clitocybe maxima</i>	968.0	120.4	888.0	91.7
香菇	侧耳科	<i>Lentinus edodes</i>	573.6	191.2	412.6	71.9
平菇	侧耳科	<i>Pleurotus ostreatus</i>	256.9	130.3	192.9	75.1
糙皮侧耳	侧耳科	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1123.6	156.8	1052.4	93.7
金顶侧耳	侧耳科	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	1622.1	366.0	1537.8	94.8
草菇	光柄菇科	<i>Volvariella volvacea</i>	1063.8	130.8	952.9	89.6
姬菇	侧耳科	<i>Pleurotus cornucopiae</i>	529.8	131.2	477.3	90.1

表 2 食用菌 SOD 活性及比活性的比较(续表)

名称	分科	拉丁文名称	菌盖 SOD		菌盖 SOD1*		菌柄 SOD		菌柄 SOD1*	
			U/g	U/mg	U/g	比例/%	U/g	U/mg	U/g	比例/%
柳松菇	粪锈伞科	<i>Agrocybe aegerita</i>	1018.3	400.0	834.0	81.9	272.6	188.8	692.4	86.6
毛头鬼伞	鬼伞科	<i>Coprinus comatus</i>	833.3	422.6	645.8	77.5	274.0	228.3	194.0	70.8
金针菇	白蘑科	<i>Flammulina</i> (开伞)	160.0	49.2	-	-	410.2	100.8	-	-
		<i>velutipes</i> (未开伞)	114.0	41.7	88.7	77.8	296.3	123.2	191.0	64.4
真姬菇 1	白蘑科	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	305.1	161.2	240.9	79.0	164.3	125.2	118.4	72.1
真姬菇 2			840.5	213.4	773.9	92.1	556.2	272.6	505.7	90.9
大球盖菇	球盖菇科	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	472.1	80.0	397.7	84.2	500.1	76.2	434.7	86.9
滑菇	球盖菇科	<i>Pholiota nameko</i>	463.2	172.4	381.3	82.3	572.5	125.2	489.3	85.5
白灵侧耳	侧耳科	<i>Pleurotus nebrodensis</i>	527.7	231.0	477.0	90.4	310.3	156.1	271.1	87.4
杏鲍菇	侧耳科	<i>Pleurotus eryngii</i>	764.8	137.4	731.5	95.6	514.8	148.2	438.5	85.2

注:表 1 和表 2 中的 SOD1* 为对氯仿-乙醇液敏感的 SOD 活性。

2.4 食用菌 SOD 的热稳定性比较

从图 3 可看出食用菌 SOD 热稳定性大概可分为 3 种类型,即热稳定性高的类型,在 60~90℃ 范围内酶活性降低较少,90℃ 时可保留 75% 以上活性,如滑菇、金针菇、大球盖菇和毛头鬼伞的菌盖;热稳定性低的类型,一般随温度升高而活性很快呈线性降低,在 60℃ 时活性为 60% 左右,到 90℃ 时活性一般都在 40% 以下,如姬菇、大杯伞、白灵侧耳和真姬菇的菌盖等;而大多数品种为稳定性较好的中间类型,在 60℃

时活性在 80% 左右,90℃时活性一般都在 40%~80% 间。

与菌柄和子实体 SOD 热稳定性比较,菌盖 SOD 的耐热性明显分为耐温和不耐温两种。耐温型菌盖 SOD 热稳定性一般好于菌柄,不耐温型则相反,如大球盖菇和毛头鬼伞菌盖 SOD 在 90℃能保留 88% 和 75% 活性,菌柄 SOD 仍有 59% 和 61% 活性;真姬菇 2 和白灵侧耳菌盖 SOD 在 90℃只保留 10% 活性,菌柄 SOD 有 45% 和 30% 活性。同一品种菌盖与菌柄 SOD 热稳定性也有较大差别,一般菌盖 SOD 热稳定性好于菌柄,对于金针菇而言,开伞后菌盖和菌柄 SOD 热稳定性均好于未开伞的。

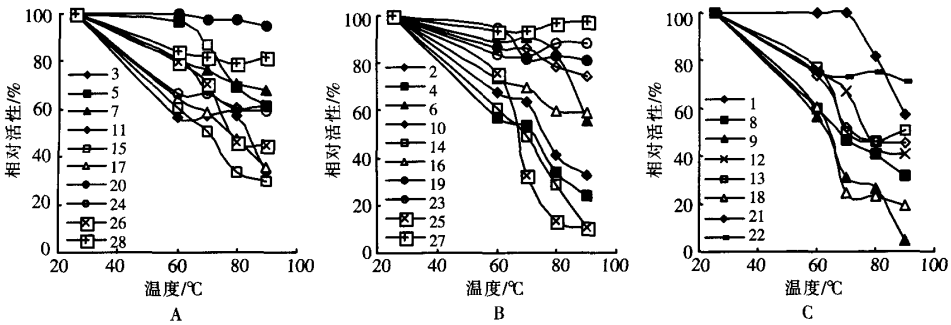


图 3 温度对食用菌 SOD 活性的影响

A: 温度对菌柄 SOD 活性影响;B: 温度对菌盖 SOD 活性影响;C: 温度对子实体 SOD 活性影响

1: 香菇; 2,3: 杏鲍菇; 4,5: 真姬菇 1; 6,7: 金针菇 (未开伞); 8 平菇; 9 姬菇; 10,11: 毛头鬼伞; 12 磨菇; 13 草菇; 14,15: 白灵侧耳; 16,17: 柳松菇; 18 大杯伞; 19,20: 金针菇 (开伞); 21 糙皮侧耳; 22: 金顶侧耳; 23,24: 大球盖菇; 25,26: 真姬菇 2; 27,28: 滑菇

2.5 食用菌 SOD 同工酶谱比较

图 4 结果表明,食用菌 SOD 经氯仿-乙醇液处理后,谱带都消失,与活性测定结果较相似,未观察到有对氯仿-乙醇液不敏感 CuZn-SOD 存在,说明食用菌主要为锰型 SOD。同一品种菌盖和菌柄的同工酶谱带数明显存在差异,一般菌盖的谱带数都多于菌柄,如杏鲍菇、毛头鬼伞、真姬菇等,其中 Rf 值较大的谱带在菌盖和菌柄都有,而 Rf 值较小的谱带为菌盖特有。滑菇和大球盖菇菌盖和菌柄的 SOD 同工酶基本相同,柳松菇和金针菇的菌盖和菌柄同工酶存在较大的差别,两种真姬菇菌盖的同工酶基本相同,但菌柄却相差较大,是取样造成的还是本身就存在,还有待实验证实。

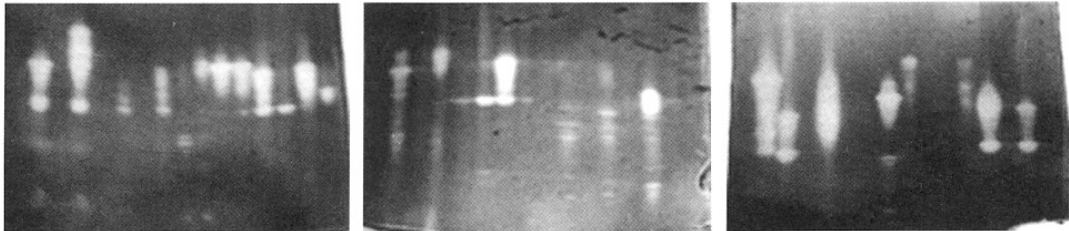


图 4 食用菌 SOD 同工酶谱比较

1~4: 杏鲍菇; 5~8: 毛头鬼伞; 9~10: 柳松菇; 11~12: 白灵侧耳; 13,14, 21~24: 真姬菇 2; 15, 32: 草菇; 16, 33: 香菇; 17~20: 金针菇; 25~28: 滑菇; 29~30: 金顶侧耳; 31, 34: 磨菇; 35,36, 45~48: 真姬菇 1; 37,38: 大杯伞; 39,40: 糙皮侧耳; 41~44: 大球盖菇。1, 3, 5, 7, 17, 19, 21, 24, 25, 27, 29, 31, 32, 33, 36, 38, 39, 42, 43, 46, 48 为氯仿-乙醇液处理; 1, 2, 5, 6, 10, 12, 14, 17, 18, 21, 22, 25, 26, 35, 36, 43, 44, 47, 48 为菌柄; 3, 4, 7, 8, 9, 11, 13, 19, 20, 23, 24, 27, 28, 41, 42, 45, 46 为菌盖。加样量为 20 μL 或相当 20 μL 的粗酶液。

3 讨论

本研究测定了分属 7 个科的 16 种食用菌 SOD 活性及比活性,结果表明,大部分食用菌都具有较高 SOD 活性,酶比活性也较高。SOD 有 3 种类型:Mn-SOD、Cu·Zn-SOD 和 Fe-SOD,近年还发现有 Ni-SOD。真核生物有 Mn-SOD 和 Cu·Zn-SOD 两种类型,真菌属真核生物同样具有这两种类型 SOD^[6],未发现 Fe-SOD^[7],食用菌 SOD 亦然。由于 Cu·Zn-SOD 活性不受氯仿-乙醇液抑制,Mn-SOD 对氯仿-乙醇液敏感,因此,经氯仿-乙醇液处理后所抑制的活性就可以代表 Mn-SOD 活性^[8]。食用菌中对氯仿-乙醇液敏感的 SOD 占总活性的 70% 以上,同时结合凝胶电泳的酶染色定位结果可认为是 Mn-SOD。已有报

道食用菌主要类型为 Mn-SOD 且占总活性 60% 以上,或仅有 Mn-SOD,与本文结果是一致的^[9-12]. Mn-SOD 具有半衰期长,毒副作用小,在歧化超氧自由基过程中不会产生中间产物羟自由基,并且定位于线粒体中,被认为是潜在的新型肿瘤抑制因子,因而在活性氧代谢中的地位更加引人注目.

在近年 SOD 研究中,发现以前认为只存在于原核生物中的 Fe-SOD,也在少数种子植物中有陆续报道,由于 Fe-SOD 对氯仿-乙醇液亦敏感,它若也存在于食用菌中的某些种中,用氯仿-乙醇液处理就很难将它与 Mn-SOD 分开,在 16 种食用菌中是否可能有 Fe-SOD,有待进一步实验证实.

研究还表明大多数食用菌 SOD 经 90℃ 处理 10 min 后保留了 40% 以上的酶活性,而豆类 SOD 在 80℃ 处理 10 min 后只保留了 10% 左右活性^[13],花生 SOD 在 90℃ 处理 10 min 后保留了 22%~41% 活性^[14],相比之下,食用菌 SOD 热稳定性尤为突出.食用菌 SOD 热稳定性,一方面由于金属辅基的存在,使它成为热稳定性较高的酶蛋白之一,失去金属辅基后酶蛋白热稳定性只有天然酶的一半^[15],已有报道莲胚轴提取液经 100℃ 处理 60 min 后,SOD 只丧失原有活性的 1/3,是由于存在 4 条耐高温的 Fe-SOD 带^[16,17];另一方面,与食用菌中 Mn-SOD 有关,我们研究发现花生 Mn-SOD 比 Cu·Zn-SOD 稳定^[14],何首乌、香橼和枸杞提取液经 75℃ 处理 12 min 后电泳,只有 Mn-SOD 的谱带(待发表).

梯度胶电泳用于食用菌 SOD 同工酶的分离国内外尚未见报道,它具有灵敏度高,分离效果好,谱带清晰的特点,16 种食用菌 SOD 同工酶分离未发现干扰现象,优于普通胶电泳,从它们相对 Rf 值的分布看,其主谱带都在一定的范围内,符合较高分子量的 Mn-SOD 的特性.

对 16 种食用菌 SOD 活性、热稳定性及同工酶进行研究揭示,人们经常食用的侧耳、蘑菇、草菇等食用菌不仅 SOD 活性高,而且热稳定性好,且主要为 Mn-SOD,作为食品功能因子,它在预防和治疗由自由基引发的一系列疾病方面,在延缓人类衰老、提高生存质量方面,将有很好的应用前景.

[参考文献]

- [1] 丁克祥主编. SOD 临床研究[M]. 北京:原子能工业出版社,1992:1-12.
- [2] 袁勤生. 我国 SOD 的应用研究热点和问题[J]. 中国医药工业杂志,1994,25(5):227-231.
- [3] Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. Plant Physiol, 1980, 65(2):245-248.
- [4] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72:248-254.
- [5] 程光宇,魏锦城,吴国荣. SOD 的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离和酶活性显示[J]. 植物生理学通讯,1994,30(4):248.
- [6] Daniel J, Kliebenstein, Rita-Ann Monda, Robert L. Last. Superoxide dismutase in arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization[J]. Plant Physiol, 1998, 118:637-650.
- [7] Kenichi Murao, Masayuki Takamiya, Kanji Ono, et al. Copper deficiency induced expression of Fe-superoxidedismutase gene in Matteuccia struthiopteris[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42:143-148.
- [8] 罗广华,王爱国,付爱根. 鉴别超氧化物歧化酶类型的定位染色法[J]. 生物物理与生物化学进展,1996,23(4):356-359.
- [9] 吴国荣,程光宇,陶明煊,等. 佛州侧耳子实体锰型 SOD 的纯化及性质研究[J]. 菌物系统,1998,17(2):169-173.
- [10] 吴国荣,邹玉珍,程光宇,等. 猴头子实体锰型超氧化物歧化酶的纯化及其性质鉴定[J]. 植物资源与环境,1996,5(2):9-14.
- [11] 陆玲,袁生,秦怀兰,等. 发酵产金针菇菌丝体中超氧化物歧化酶特性研究[J]. 食用菌学报,1997,4(3):27-32.
- [12] Belinky PA, Goldberg D, Krinfeld B, et al. Manganese-containing superoxide dismutase from the white-rot fungus phanerochaete chrysosporium: its function, expression and gene structure[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31:754-764.
- [13] 吴国荣,程光宇,陆长梅,等. 豆类种子的超氧化物歧化酶活性、同工酶及热稳定性[J]. 南京师大学报:自然科学版,2000,23(4):88-92.
- [14] 程光宇,吴国荣,陆长梅,等. 花生种子 SOD 活性及热稳定性研究[J]. 中国油料作物学报,1999,21(2):41-44.
- [15] Forman H J, Fridovich I. On the stability of superoxide dismutase[J]. J Biol Chem, 1973, 248(8):2645-2649.
- [16] 黄上志,汤学军,张玲,等. 莲种子的耐热性及抗氧化酶活性[J]. 植物生理与分子生物学学报,2003,29(5):421-424.
- [17] 黄上志,汤学军,芦春斌,等. 莲子超氧化物歧化酶的特性分析[J]. 植物生理学报,2000,26(6):492-496.

[责任编辑:孙德泉]