

牛肝菌胞外多糖体外抗氧化能力的研究*

阚国仕, 矫丽曼, 杨玉红, 陈红漫

(沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳, 110161)

摘 要 主要探讨美味牛肝菌胞外多糖(BeBEP)体外抗氧化作用。结果表明 BeBEP 具有一定的还原能力, 具有显著的清除超氧阴离子自由基、抑制羟基自由基能力, 能抑制小鼠肝组织丙二醛的生成, 可减少红细胞氧化溶血和肝组织自发性脂质过氧化。总之, BeBEP 具有显著的体外抗氧化作用。

关键词 美味牛肝菌, 胞外多糖, 体外抗氧化

多糖是生物有机体除蛋白质、核酸之外的第三大生物大分子。多糖作为信息分子广泛参与细胞间配体与受体的相互识别、细胞内信号转导等生理过程, 与细胞活化、增殖、分化及产生细胞因子等有关。加之多糖本身低毒、来源广泛, 使得多糖研究成为近年来的研究热点^[1]。美味牛肝菌(*Boletus edulis* Bull)属于担子菌纲伞菌目、牛肝菌科。该菌中含有人体所需的多种营养成分如蛋白质, 维生素, 氨基酸, 多糖及钙、铁等微量元素等, 因此美味牛肝菌具有极高的食用价值和药用价值^[2]。由于菌根共生等复杂原因, 牛肝菌至今未能实现人工栽培, 对发酵产生的胞外多糖进行研究具有十分重要的现实意义。本文主要对美味牛肝菌胞外多糖体外氧化能力进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

美味牛肝菌 5.504, 购自中科院微生物研究所菌种保藏中心。

昆明系小白鼠, 雄性, 8 周龄, 体重 20 ± 2 g, 购自沈阳药科大学试验动物中心。

1.1.2 试剂

葡萄糖、麦芽糖、酵母膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、 CuSO_4 、木瓜蛋白酶、三氯甲烷、正丁醇、活性炭、甲硫氨酸、NBT、DEAE、核黄素、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、邻二氮菲、 FeSO_4 、 H_2O_2 、无水乙醇、 NaCl 、 FeCl_3 、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、三氯乙酸、2-巯代巴比妥酸。

1.2 BeBEP 的发酵与提取

在无菌条件下, 用直径为 10 mm 的打孔器, 在长满美味牛肝菌菌丝的培养皿上打孔, 镊子夹取 2 片菌丝碟接种于盛有 100 mL 发酵培养基的三角瓶中, 28°C , 150 r/min 恒温振荡培养 6 天, 取出滤去菌丝, 合并上清液浓缩, 用 0.5% 的木瓜蛋白酶+Sevage[V(多糖溶液): V(三氯甲烷): V(正丁醇)=25: 5: 1]法脱去粗多糖溶液中游离的蛋白, 3% 活性炭, 50°C 脱色 2 h, 过滤离心, 浓缩, 用 3 倍体积 95% 乙醇沉淀 48 h, 沉淀冷冻干燥, 得到多糖的半纯品。

1.3 方 法

1.3.1 BeBEP 还原能力的测定

Oyaizu 方法^[3]。

1.3.2 BeBEP 清除超氧阴离子自由基能力测定

NBT 光化还原法^[4]。

1.3.3 BeBEP 清除羟基自由基能力测定

Fenton 反应^[5,6]。

1.3.4 BeBEP 对 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血作用的影响^[7,8]

小鼠眼球取血, 制成抗凝血, 3 000 r/min 离心 10 min 得到红细胞。冷生理盐水洗涤 3 次, 制成 0.5% 的红细胞悬液。各组取红细胞悬液 0.5 mL, 每组 2 个平行, 加不同浓度的 BeBEP 溶液 0.5 mL, 对照管以生理盐水代替, 混匀, 最后加入 0.3% H_2O_2 0.2 mL 启动反应, 37°C 温浴 1 h 后, 用 4 mL 生理盐水稀释, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定 415 nm 的吸光值 A, 计算抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$$

式中: A_0 表示对照组的吸光值, A_i 表示各处理组的吸光值。

1.3.5 BeBEP 体外抗肝组织自发性脂质过氧化的影响^[9]

第一作者: 硕士, 副教授(杨玉红为通讯作者)。

* 沈阳农业大学青年基金项目 项目编号 2005053

收稿日期: 2008-07-29, 改回日期: 2008-10-30

取 10% 肝匀浆液 1.5 mL, 加入各浓度 BeBEP 1 mL, 以生理盐水作对照, 充分混匀在 37℃ 水浴 3 h 后, 立即加入 20% 三氯乙酸 1.5 mL 沉淀蛋白, 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液 3 mL, 加入 0.67% 硫代巴比妥酸 1.5 mL, 沸水浴 15 min, 冷却离心, 于 532 nm 处测上清液吸光值, 以不加肝匀浆和 BeBEP 为空白样, 以加肝匀浆不加 BeBEP 为对对照, 计算脂质过氧化的抑制率。

脂质过氧化抑制率/% = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$

式中 A_0 表示对照组的吸光值, A_1 表示各处理组的吸光值

1.3.6 BeBEP 抗 H_2O_2 引起的小鼠肝组织丙二醛的生成^[10]

小鼠禁食 16 h 后眼球取血处取肝脏, 置于 4℃ 生理盐水中, 洗去表面残血, 在冰浴下匀浆, 制成 10% 的肝匀浆。稀释成 1% 的肝组织匀浆液, 取 1 mL, 加不同浓度的 BeBEP 溶液 0.5 mL 和 6 mmol/L $FeSO_4$ 0.2 mL, 最后加 60 mmol/L H_2O_2 0.1 mL, 37℃ 下水浴 1 h 后, 加入 1 mL 15% TCA 终止反应, 再加入 1 mL 0.7% 硫代巴比妥酸, 沸水浴显色 15 min, 冷却后离心, 测 532 nm 上清液的吸光值, 吸光值表示丙二醛含量的多少, 吸光值越大, 丙二醛含量越高。

2 结果与分析

2.1 BeBEP 还原能力的研究

采用不同浓度的 BeBEP 溶液, 对其还原能力进行测定, 吸光值越大表明还原能力越强。以多糖浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制曲线见图 1。

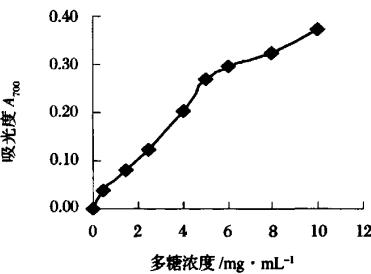


图 1 BeBEP 还原能力

由图 1 知, BeBEP 具有较高的还原能力, 还原能力随着 BeBEP 浓度的增加而增大。BeBEP 还原能力的存在说明 BeBEP 具有表现抗氧化作用的可能性。

2.2 BeBEP 清除超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)能力

自由基损伤机体的心、脑、肝等细胞组织, 是机体

产生某些疾病和衰老等的重要原因, 特别是超氧阴离子自由基对机体的损伤尤为严重。采用不同浓度的 BeBEP 溶液, 用 NBT 光还原法对超氧阴离子自由基清除率进行测定。以多糖的浓度为横坐标, 清除率为纵坐标绘制曲线见图 2。

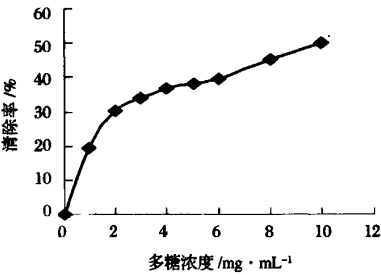


图 2 BeBEP 对超氧阴离子自由基的清除效果

由图 2 可知, BeBEP 具有清除超氧阴离子自由基的能力。清除率随着 BeBEP 浓度的增大而增加, 当 BeBEP 浓度在 0~4 mg/mL 时其增加较快, 大于 4 mg/mL 则增加缓慢, 当浓度为 10 mg/mL 时清除率达到 50.3%。

2.3 BeBEP 清除羟基自由基($\cdot OH$)能力

在人体内, 羟基自由基对细胞的危害最大, 可直接损伤各种生物大分子和生物膜, 导致多种疾病的发生。采用 Fenton 反应, 对不同浓度的 BeBEP 溶液进行清除羟基自由基能力测定, 以多糖浓度为横坐标, 清除率为纵坐标绘制曲线见图 3。

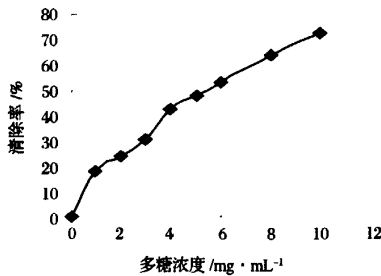


图 3 BeBEP 对清除羟基自由基的清除效果

由图 3 可知, BeBEP 具有很强的清除羟基自由基的能力, 清除率随着 BeBEP 浓度的增大而增加, 当 BeBEP 浓度在 0~3 mg/mL 时其增加缓慢, 大于 4 mg/mL 则上升加快, 当浓度为 10 mg/mL 时清除率达到 72.9%。

2.4 BeBEP 对 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血作用的影响

生物膜的流动性与它的重要功能(信号传导、能量转换等)有密切关系, 维持膜的正常结构是维持细

胞正常生理功能的必要条件。机体内的 H_2O_2 可诱发转变为羟基自由基,这种物质可引发氧化作用,使红细胞损伤,胞内物质外流。BeBEP 对 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血作用的影响见表 1。

表 1 BeBEP 对 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血作用的结果

试验组	BeBEP /mg · mL ⁻¹	A ₄₁₅	溶血率 /%	抑制率 /%
对照	0	0.732±0.010	100	0
处理 1	1	0.632±0.006*	86.5	13.7
处理 2	3	0.506±0.021*	69.1	30.9
处理 3	5	0.447±0.026*	61.1	38.9
处理 4	7	0.373±0.023*	51.0	49.0
处理 5	9	0.252±0.020*	34.4	65.6

n=3, $\bar{x} \pm s$, *, P<0.01 对比对照组

由表 1 可知,随着 BeBEP 浓度的增加,其对 H_2O_2 诱导红细胞氧化溶血抑制率也随之增大,当 BeBEP 浓度为 9 mg/mL,抑制率可达到 65.5%,说明 BeBEP 对 H_2O_2 引起的红细胞溶血有显著的抑制作用。表明 BeBEP 在体外可以抑制自由基损伤,保护红细胞的结构和功能。

2.5 BeBEP 体外抗肝组织自发性脂质过氧化的影响

脂质过氧化是氧化损伤中重要的危害之一。BeBEP 体外抗肝组织自发性脂质过氧化的结果见表 2。

表 2 BeBEP 体外抗肝组织自发性脂质过氧化的结果

试验组	BeBEP/mg · mL ⁻¹	A ₅₃₂	抑制率/%
对照	0	1.572±0.013	0
处理 1	2	1.318±0.021*	18.6
处理 2	4	1.045±0.019*	42.0
处理 3	6	0.846±0.008*	53.5
处理 4	8	0.731±0.018*	58.2
处理 5	10	0.657±0.024*	68.4

n=3, $\bar{x} \pm s$, *, P<0.01 对比对照组。

由表 2 可知,随着 BeBEP 浓度的增加,BeBEP 体外抗肝组织自发性脂质过氧化的抑制作用也随之增强,BeBEP 浓度为 10 mg/mL 时,抑制率可达到 68.4%。说明 BeBEP 能抗肝组织自发性脂质过氧化作用。

2.6 BeBEP 抗 H_2O_2 引起的小鼠肝组织丙二醛(MDA)的生成

MDA 是生物体内不饱和脂质发生过氧化的产物,它可反映出过氧化反应的程度。BeBEP 抗 H_2O_2 引起的小鼠肝组织丙二醛的生成的结果见图 4。

由图 4 可知,有 BeBEP 时,丙二醛的生成量明显减少,且随着 BeBEP 浓度的增加而减少,当多糖浓度

为 40 mg/mL,吸光值减为 0.103。说明 BeBEP 能强烈抑制脂质过氧化反应。

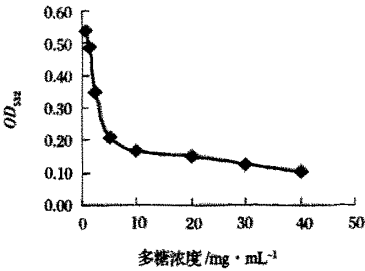


图 4 BeBEP 对丙二醛生成的影响

3 结论与讨论

BeBEP 具有很强的体外抗氧化能力,表现为有一定的还原能力,具有显著的清除超氧阴离子自由基、抑制羟基自由基能力,能抑制小鼠肝组织 MDA 的生成,可减少红细胞氧化溶血和肝组织自发性脂质过氧化。将 BeBEP 作为药用成分或抗氧化剂应用于临床,可以治疗不少疾病;用于食品工业则具有保健作用,所产生的社会效益从实践中得到了论证。对 BeBEP 抗氧化活性的研究,可为其在临床、保健品方面的开发应用提供合理的科学理论基础。对 BeBEP 抗氧化在各种体系下最佳的浓度范围以及 BeBEP 纯化分离组分的抗氧化作用有待进一步研究。

参 考 文 献

1 刘博,徐德昌. 真菌多糖研究进展[J]. 中国甜菜糖业, 2007,(3),26~29

2 张华山,许剑秋. 美味牛肝菌液体深层培养工艺条件的探索[J]. 氨基酸和生物资源,1999,21(3):23~25

3 Oyaizu M. Studies on products of browning reaction; antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine [J]. Jpn J Nutr,1986,44:307

4 吕淑霞. 基础生物化学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2003.15~16

5 金鸣,蔡亚欣,赵辉,等. 邻二氮菲-亚铁氧化法检测双氧水/亚铁产生的羟基自由基[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(6):553~536

6 李志洲. 美味牛肝菌多糖的抗氧化性[J]. 食品与发酵工业,2007,33(4):49~51

7 吴晓鹏,王一飞,刘秋英,等. 苦丁茶多糖抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业,2008,34(2):34~36

8 Wu YJ, Li WG, Zhang ZM, et al. Antioxidative activity of 4-oxy-and-hydroxy-nitroxides in tissues and erythrocytes from rats[J]. Acta Pharmacol Sin,1997,18:150

9 Beauchap C, Fridovich I. Superoxide disutase improved assays applicable Acrylaid gels[J]. Anal Biochem, 1971, 44:276~287

10 向荣,王鼎. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(3):241~242

Study on the Antioxidative Activities of Extracellular Polysaccharide of *Boletus edulis* Bull

Kan Guoshi, Jiao Liman, Yang Yuhong, Chen Hongman

(Biology Science and Technology Institute ,Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

ABSTRACT This article focused on *Boletus edulis* Bull extracellular polysaccharide (BeBEP) in vitro antioxidant. The results showed that BeBEP has a reduction capacity with significant removal of superoxide free radicals. It also has hydroxyl radical capacity to suppression and the ability to inhibit the mouse liver tissue MDA generation. It was seen that BeBEP can reduce oxidation of red blood cell hemolysis and liver spontaneous lipid oxidation. In short, BeBEP is a significant *in vitro* antioxidant.

Key words *Boletus edulis* Bull, extracellular polysaccharide, *in vitro* antioxidation

(上接第 56 页)

Protoplast Fusion Between *Streptomyces clavuligerus* B71-14 and B71-50

Zuo Zhihan¹, Zhang Yang², Wang Yanping²

1(College of Chemical & Life Science, Tianjin normal university. Tianjin 300387, China)

2(Department of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT Protoplast fusion between glycerol resistant mutants *S. clavuligerus* B71-14 and sulbactam sodium resistant mutant *S. clavuligerus* B71-50 were made. Fusants were selected by the resistant markers. A glycerol and sulbactam sodium resistant fusant *S. clavuligerus* F-11 was selected from 98 morphology difference fusants. The clavulanic acid yield of *S. clavuligerus* F-11 could reach 742. 71mg/L, which was 1. 38 times compared with *S. clavuligerus* B71-14(538. 20mg/L), 1. 55 times compared with *S. clavuligerus* B71-50 (479. 91mg/L).

Key words *Streptomyces clavuligerus*, protoplast fusion, clavulanic acid, glycerol resistant, sulbactam resistant.

会
讯

德国国际烘焙、糖果、巧克力及糕点博览会

德国国际烘焙、糖果、巧克力及糕点博览会将于 2009 年 10 月 3~10 日在德国慕尼黑举办。慕尼黑国际烘焙、糖果、巧克力及糕点博览会每 3 年举办一届,自从 1949 年首届 IBA 博览会开幕以来,它就成为这些行业最为重要的国际性贸易博览会,该展会每 3 年在杜塞尔多夫和慕尼黑各交替举办一次。在 iba——这个国际焙烤业盛会上,来自五大洲的参展商们将为大中小型企业及专业人士展示他们的焙烤机械、设备和产品,以及最新的技术和制作过程。在 2006 年杜塞尔多夫举办的上届 IBA 展会上,的参展面积吸引了来自 36 个国家的参展商加盟,其中有国际展商 94 家;参观观众共有 72 000 人,其中共有国际观众 32 400 人。

展品范围: 烤炉与附件、面包与点心机械、发酵、冷藏与空调机械设备与技术、烘焙代理与原材料供应、部分烘焙制成品、冰激凌生产技术、糕点生产技术、咖啡店与糕饼店的家具与装修设计、冰淇淋、休闲食品与糖果甜点机械、产品包装设备与包装材料、烘焙附件、卫生与洁净设施、实验与计量设备、计算机 EDP 硬件与软件、相关服务。

中国联系人: 李敏;联系电话: 010-66122877-8008;联系地址: 北京市西直门南大街 6 号 A 座 4308;

传真: 010-66122877-8005;推广网址: www.silkroad2000.com。