文章编号:1673-1689(2007)05-0066-05

玉米秸秆 *Lentinula edodes* 发酵液清除·OH 主效物质分析

余洪波， 李 莉， 黄慧艳， 张晓昱
(华中科技大学 生命科学与技术学院,湖北 武汉 430074)

摘 要: 对 *Lentinula edodes* 在玉米秸秆木质纤维素基质中液体培养的胞外液清除羟自由基(·OH)主效物质及其清除能力进行了研究。结果表明:*L. edodes* 在木质纤维素基质上的培养胞外液具有较高的·OH 清除作用,其清除率最高达 69.32%;粗多糖为最主要的胞外·OH 清除物质,其清除率最高可达 54.19%,占整个胞外液·OH 清除效率的作用比例为 78.17%;粗蛋白为另一重要的胞外·OH 清除物质,其清除率最高可达 27.17%,占整个胞外液·OH 清除效率的作用比例为 39.38%。粗多糖及粗蛋白成分共同构成 *L. edodes* 胞外清除·OH 的主效物质。

关键词: *Lentinula edodes*;羟自由基清除;粗多糖;粗蛋白;白腐菌
中图分类号:TQ 920.1 **文献标识码**: A

The Main Extracellular Hydroxyl Radical Scavengers from Submerged Culture of *Lentinula edodes* on Cornstalk

YU Hong-bo, LI Li, HUANG Hui-yan, ZHANG Xiao-yu
(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: The production and effect of extracellular hydroxyl radical scavengers from submerged culture of *Lentinula edodes* on lignocellulose substance were studied in this paper. Results showed that the supernatant of lignocellulose has remarkable OH scavenging ability, and the maximum scavenging efficiency reached 69.32%. Crude exopolysaccharides were the main OH scavenger. Its maximum scavenging efficiency reached 54.19%, which accounted for 78.17% of the total OH removal. Furthermore, crude protein also played important roles in OH scavenging. Its maximum scavenging efficiency reached 27.17%, which accounted for 39.38% of the total OH removal.

Key words: *Lentinula edodes*; ·OH scavenging; exopolysaccharide; protein; white-rot fungus

Lentinula edodes 是一种香菇属白腐菌。白腐菌是目前已知对木质素降解最有效、最彻底的微生物,其通过分泌胞外木质素降解酶系而介导自由基链式反应,氧化降解木质素,因此降解体系内含有

收稿日期:2007-04-10.
基金项目:湖北省科技攻关计划重大项目.
作者简介: 余洪波(1977-),男,湖北武汉人,生物化学与分子生物学博士研究生. Email:hongbo.fish@gmail.com
通讯作者: 张晓昱(1957-),女,湖北恩施人,教授,理学博士,硕导,主要从事环境源微生物技术领域中生物降解与生物转化方向的研究. Email:imerhust@mail.hust.edu.cn

万方数据

大量活性氧自由基(ROS)，羟自由基(·OH)是其中最重要的一类，它能腐蚀木质细胞壁，从而提升白腐菌胞外酶系对木质细胞壁成分的可溶性，促进降解完成得更快、更彻底[1-2]。

但·OH 自由基的反应具有高度非特异性，这使其在攻击木质素的同时，必然对白腐菌自身造成一定伤害[3]。食、药用菌种类白腐菌的相关研究已证实，其子实体、菌丝体抽提物均具有·OH 清除能力[4-6]。然而，对白腐菌降解木质素的动态过程中的胞外·OH 清除能力却鲜少关注。理论上，自由基链式反应过程中的还原剂或能接收自由电子的物质都具有潜在的自由基清除能力，那么这些物质主要是什么成分，其作用又如何呢？这是个值得探讨的问题。作者以香菇属白腐菌 *L. edodes* 为例，采用玉米秸秆粉木质纤维素基质，对上述问题进行了研究。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株　香菇属白腐菌 *Lentinus edodes*，编号 AX，作者所在实验室筛选保藏。

1.1.2　木质纤维素基质　玉米秸秆粉来自湖北武汉市郊，当年生玉米秸秆晾干粉碎即得，使用前过 40 目筛，取筛下部分 105 ℃烘干备用。

1.1.3　培养基　种子培养基为常规土豆液体摇瓶培养基；玉米秸秆粉液体培养基(每 100 mL 三角摇瓶)：1 g 玉米秸秆粉，50 mL 水，封装灭菌备用。

1.2　方法

1.2.1　培养与样品制备　培养好的 *L. edodes* AX 土豆液体种子按体积分数 10%接种量接入玉米秸秆粉液体培养基，置 26～27 ℃、150 r/min 摇床培养，定时取样，每次取 3 个。取样时，将 AX 摇瓶培养物先以 200 目尼龙滤布过滤，滤液经 3 500 r/min 离心 20 min，所得上清液即为备测试分析用胞外液样品。

1.2.2　羟自由基清除率(E)测试　邻二氮菲法[7]，采用 UNICO UV-2000 分光光度计测试，经最大吸收波长自扫描，调整测试波长至 510 nm。醇沉多糖上清液及盐析蛋白上清液的·OH 自由基清除率测试，分别在相应的醇析液、盐析液体系下进行。

1.2.3　*L. edodes* AX 胞外粗多糖提取　取 30 mL 胞外液样品，边搅拌边加入 4 倍体积无水乙醇(乙醇终体积分数 80%)即有粗多糖沉淀产生；4 ℃冰箱静置过夜，11 000 r/min 离心 15 min，分别收集沉淀及上清液；沉淀即为粗多糖样品，复溶于 30 mL 蒸馏水中，与上清液一起待测·OH 清除率。

1.2.4　*L. edodes* AX 胞外粗蛋白提取　取 30 mL 胞外液样品，边搅拌边加入硫酸铵药品至体系达预试验确定的 40%饱和度；4 ℃冰箱静置过夜，8 000 r/min 离心 20 min，分别收集沉淀及上清液；沉淀即粗蛋白样品，复溶于 30 mL 蒸馏水中，与上清液一起待测·OH 清除率。

2　结果与分析

2.1　*L. edodes* AX 胞外液的·OH清除作用

图 1 显示，*L. edodes* AX 胞外液具有较强的·OH清除作用，自培养第 3 天开始，其·OH 清除能力达到并维持在较高水平，最大·OH 清除率为 69.32%(第 5 天)。

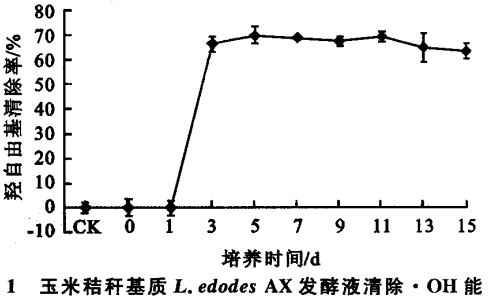


图 1　玉米秸秆基质 *L. edodes* AX 发酵液清除·OH 能力

Fig. 1　·OH scavenging efficiency of the supernatant of *L. edodes* AX on cornstalk

生物的活性功能均以一定的物质为相应基础，*L. edodes* AX 培养胞外液清除·OH 自由基的作用显示，其中存在着具有·OH 清除能力的物质。根据食、药用菌及中药类相关文献报道，真菌多糖普遍具有抗自由基活性[10]，而生物体胞外多糖更具有抗重金属离子、抗病毒、抗自由基伤害等多种防御作用[8-9]，同时生物体蛋白质具有抗氧化、抗畸变、提高机体免疫力和抑制肿瘤细胞生长等作用[16-18]。作者考察了 *L. edodes* AX 胞外液样品中粗多糖成分(Crude exopolysaccharides，Crude EPS)及粗蛋白成分(Crude proteins，Crude P)的·OH 清除能力及特点。

2.2　*L. edodes* AX 胞外粗多糖·OH 清除能力

实验证明：*L. edodes* AX 培养胞外液中粗多糖含量较高且具有显著的·OH 清除作用，其清除率最高达 54.19%(第 11 天)(见图 2)。同时 *L. edodes* AX 培养胞外液整体·OH 清除效应中所起的作用比例最高可达 78.17%(第 11 天)(见图 3)，为最主要的胞外·OH 清除物质。图 2 同时显示，

万方数据

L. edodes AX 胞外粗多糖的醇沉上清液·OH 清除率基本为零，进一步表明 *L. edodes* AX 胞外清除·OH 的物质成分基本为粗多糖醇沉复合物，包括醇沉的粗多糖及可与粗多糖复合醇沉的其他物质，如 *L. edodes* AX 胞外蛋白质成分及发酵液中其他具·OH 清除能力的活性成分，*L. edodes* AX 粗多糖醇沉上清液中则几乎不剩余·OH 清除物质。

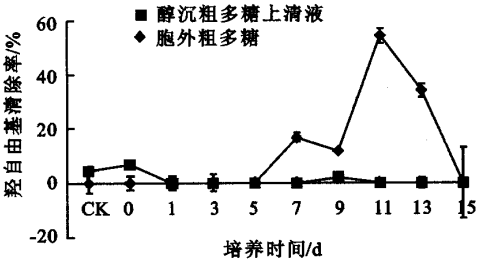


图 2 *L. edodes* AX 胞外粗多糖及醇沉粗多糖上清液·OH 清除能力

Fig. 2 ·OH scavenging efficiency of crude EPSs and ethanol supernatant

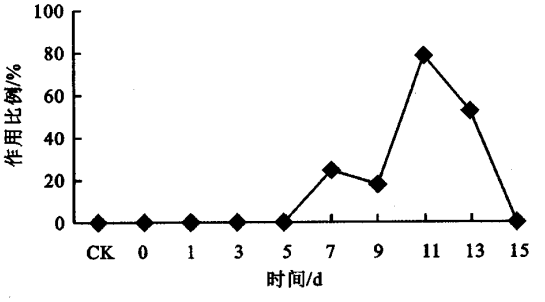


图 3 *L. edodes* AX 胞外粗多糖占胞外液·OH 清除效率的作用比例

Fig. 3 Action rate of crude EPSs in whole ·OH scavenging of supernatant

实验也显示，*L. edodes* AX 胞外粗多糖的·OH清除能力与其菌株生长情况存在内在联系，这可能与 AX 生长主代谢中胞外粗多糖的合成量相关[11]。即，培养前期，AX 合成胞外粗多糖尚少，胞外液·OH 清除能力相应很低；随着培养时间的延续，菌株生长良好，AX 胞外粗多糖的合成逐渐旺盛，其·OH 清除能力也逐渐增强，至培养中后期，胞外粗多糖对·OH 清除能力达到峰值；培养末期培养基营养成分消耗将尽、菌体生长衰减时，中后期合成的多糖又可能被菌体分解利用[11]，从而导致体系胞外粗多糖被消耗，其·OH 清除能力减弱或消失。

2.3 *L. edodes* AX 胞外粗蛋白对·OH 清除能力

L. edodes AX 培养胞外液中的粗蛋白成分也具有良好的·OH 清除作用，培养第 5 天及之后较长时间，其·OH 清除率达到并维持在 25%左右，最大·OH 清除率达 27.17%(第 11 天)(见图 4)，于同天 *L. edodes* AX 培养胞外液整体·OH 清除效应中所起的作用比例最高达 39.38%(第 9 天)(见图 5)，为另一重要的胞外·OH 清除物质。粗蛋白的·OH 清除能力与其菌株生长趋势的相关性更明显，可能在于蛋白质成分的合成与 AX 菌体生长的主代谢关系更为紧密的缘故。

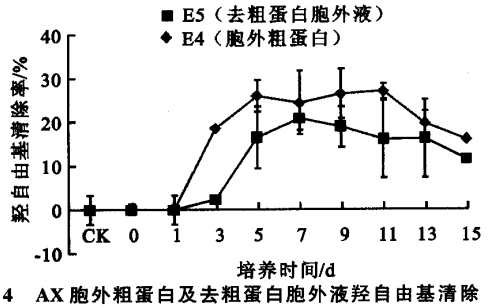


图 4 AX 胞外粗蛋白及去粗蛋白胞外液羟自由基清除能力变化曲线

Fig. 4 ·OH scavenging efficiency of crude proteins and salting-out supernatant

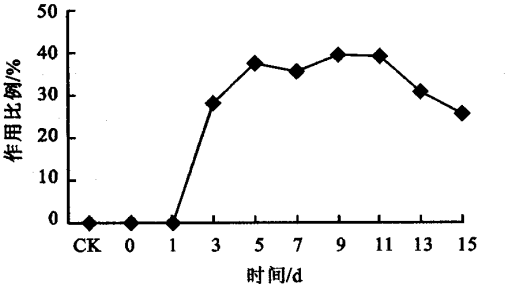


图 5 AX 胞外粗蛋白占胞外液·OH 清除效率的作用比例

Fig. 5 Action rate of crude proteins in whole ·OH scavenging of supernatant

但滤除 *L. edodes* AX 培养胞外液中盐析得的粗蛋白成分后，其上清液仍具有较强的·OH 清除能力，最大清除率在第 7 天达 20.90%(见图 4)。这一现象表明，*L. edodes* AX 培养胞外液的盐析上清液中仍保留着较多未能与蛋白质复合盐析的具有·OH 清除活性的物质，这些物质可能包括多糖、木质纤维素降解中间产物、终产物以及一些小分子物质等，由于这类物质的结构特性，它们可与自由基反应，从而使 *L. edodes* AX 的粗蛋白盐析上清液的·OH 清除能力也具有较高的水平。

3 讨 论

对 *L. edodes* AX 胞外粗多糖及粗蛋白成分的

万方数据

研究显示：AX 培养胞外液中的·OH 清除物质基本均可与多糖成分复合醇沉，则其中的蛋白质成分推测为多糖结合蛋白质或糖肽，或可与多糖相包裹夹杂的蛋白质成分；胞外液·OH 清除物质中有部分不能与蛋白质成分复合盐析，则表明其中除小分子类物质外，含有不与蛋白质相结合或混杂的多糖，或部分蛋白质成分被盐析去除的粗多糖。张尔贤等人发现多糖去蛋白质后，其清除自由基能力有较大下降，认为这是由于结合蛋白或糖肽去除后，多糖的立体结构受影响所致[12-13]。研究发现，粗多糖的·OH 清除率高于粗蛋白及其上清液的·OH 清除率之和，也证实了多糖的活性可能与其它生物活性一样，受二、三级结构影响较大[14-15]，分离多糖与结合其上的糖肽、结合蛋白等可能降低体系的整体·OH 清除能力。

参考文献(References)：

[1] Gierer J. Formation and involvement of superoxide $O_2\cdot^-/HO_2\cdot$ and hydroxyl OH· radicals in TCF bleaching processes: a review[J]. **Holzforschung**, 1997, 51: 34-46.

[2] Tanaka H, Itakura S, Hirano T, et al. An extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferric iron[J]. **Holzforshung**, 1996, 50: 541-548.

[3] Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, et al. Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi[J]. **Fungal Genetics and Biology**, 1999, 27(2-3):175-185.

[4] Yoon S J, Yu M A, Pyun Y R. Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia[J]. **Food Chem**, 1997,86: 25-31.

[5] Mau J L, Lin H C, Chen C C. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms[J]. **J Agric Food Chem**, 2002, 50: 6072-6077.

[6] Hseu Y Ch, Chang W Ch, Hseu Y T, et al. Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes[J]. **Life Sci**,2002,71: 469-482.

[7] 金鸣，蔡亚欣，李金荣，等. 邻二氮菲-Fe^{2+}氧化法检测 H_2O_2/Fe^{2+} 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展，1996，23(6)：553-555.
JIN Ming, CAI Ya-xin, LI Jin-rong, el al. 1, 10-Phenanthroline- Fe-(2+) oxidative assay of hydroxyl radical produced by $H_2O_2/Fe-(2+)$[J]. **Progress In Biochemistry and Biophysics**, 1996, 23(6): 553-555. (in Chinese)

[8] 钟颜麟，彭志英，赵谋明. 乳酸菌胞外多糖的研究[J]. 中国乳品工业，1999，27(4)：7-10.
ZHONG Yan-lin, PENG Zhi-ying, ZHAO Mou-ming. The studies on exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria [J]. **China Daily Industry**, 1999, 27(4): 7-10. (in Chinese)

[9] 符移才，魏少敏，金锡鹏. 透明质酸与皮肤的关系及其在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业，1999，(6)：27-29.
FU Yi-cai, WEI Shao-min, JIN Xi-peng. Hyaluronic Acid(HA) in skin and use in cosmetics[J]. **China Surfactant Detergent and Cosmetics**, 1999, (6): 27-29. (in Chinese)

[10] 雷学军. 清除氧自由基的功能性食品[J]. 食品工业，2002，(3)：41-44.
LEI Xue-jun. The scavenging of funtional food[J]. **The Food Industry**, 2002, (3): 41-44. (in Chinese)

[11] 黄丽萍，白凤武，云战友，等. 小刺猴头菌液体深层培养过程中多糖积累及其特征的研究[J]. 生物技术，1998，8(3)：30-33.
HUANG Li-ping, BAI Feng-wu, YUN Zan-you, el al. Study on the accumulation and characteristics of polysaccharides of hericium caput-medusae during the submerged culture[J]. **Microbiology**, 1998, 8(3): 30-33. (in Chinese)

[12] 李贵荣，杨胜圆. 党参多糖的提取及其对活性氧自由基的清除作用[J]. 化学世界，2001，8：421-422.
LI Gui-rong, YANG Sheng-yuan. Extraction of codonopsis pilosula polysaccharide and its effects of anti-active oxygen free radicals[J]. **Chemical Word**, 2001, 8: 421-422. (in Chinese)

[13] 张尔贤，俞丽君，肖湘. 多糖类物质对 $O_2\cdot^-$ 和·OH 的清除作用[J]. 中国生化药物杂志，1995，16(1)：9-11.
ZHANG Erxina, YU Li-jun, XIAO Xiang. The Scavenging Action to O_(2～·)～- and OH～· of polysaccharides [J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**, 1995, 16(1): 9-11. (in Chinese)

[14] 黄益丽，廖鑫凯. 香菇多糖的生物活性[J]. 生命的化学，2001，21(5)：371-373.
HUANG Yi-li, LIAO Xin-kai. The activety of Lentinula edodes exopolysaccharide[J]. **Chemistry of life**, 2001, 21(5): 371-373. (in Chinese)

[15] 黄卉，王弘，刘欣. 多糖的构效关系研究进展[J]. 广州食品工业科技，2004，20(3)：159-161.

万方数据

HUANG Hui, WANG Hong, LIU Xin. Studys advances in the structure activity relationship of polysaccharide[J]. **Guangzhou Food and Science**, 2004,20(3):159－161. (in Chinese)

[16] 陈美珍,张永雨,余杰,等. 龙须菜藻胆蛋白的分离及其清除自由基作用的初步研究[J]. 食品科学,2004,25(3):159－162.

CHEN Mei-zhen, ZHANG Yong-yu, YU Jie, et al. Studies on separation and scavenging activities on free radicals of phycobiliproteins from *Gracilaria lemaneiformis*[J]. **Food Science**,2004,25(3):159－162. (in Chinese)

[17] 张永雨,陈美珍,余杰,等. 龙须菜藻胆蛋白抗突变与抗肿瘤作用的研究[J]. 中国海洋药物,2005,24(3):36－39.

ZHANG Yong-yu, CHEN Mei-zhen, YU Jie, et al. Studies on the antimutagenic and antitumour effects of phycobiliproteins from Gracilaria lemanei formis[J]. **Chinese Juornal of Maring Drugs**,2005,24(3):36－39. (in Chinese)

[18] 陈美珍,余杰,钟秋玲,等. 龙须菜藻胆蛋白免疫功能和抗氧化作用的研究[J]. 食品科学,2005,26(7):456－459.

CHENG Mei-zhen, YU Jie, ZHONG Qiu-ling, et al. Study on the immunity function and anti-oxidation activity of phycobiliproteins from *Gracilaria lemaneiformis*[J]. **Food Science**,2005,26(7):456－459. (in Chinese)

（责任编辑：李春丽）

《食品与生物技术学报》2008 年征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品、生物工程及其相关研究的专业性学术期刊，为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊，目前被美国化学文摘(CA)等国内外 10 余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程，食品营养学，粮食、油脂及植物蛋白工程，制糖工程，农产品及水产品加工与贮藏，微生物发酵，生物制药工程等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文、试验报告、反映学科前沿研究动态的高质量综述文章，同时兼发动物营养与饲料工程、环境生物技术等方面的最新研究成果。

本刊读者对象：相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员，专业管理人员以及有关院校师生。本刊热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》，A4(大 16K)开本，128 页，每册定价 15.00 元，全年 6 期；本刊邮发代号：28－79，全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部

万方数据