

黑脉羊肚菌 SOD 的纯化及特性研究

侯玉艳¹, 吴素蕊², 张丽¹, 赵天瑞^{1,*}, 邵丽梅²

(1. 昆明理工大学 云南省食品安全研究院, 云南昆明 650500;

2. 中华全国供销合作总社昆明食用菌研究所, 云南昆明 650221)

摘要: 采用热击法和硫酸铵分级沉淀法对所提取的黑脉羊肚菌 SOD 进行纯化, 对纯化后酶的热稳定性、pH 稳定性、敏感性及同工酶类型等进行研究。结果表明: 热击法最佳热击温度为 60 °C, 最佳热击时间为 15 min; 硫酸铵分级沉淀法最佳盐溶条件是采用 40% 饱和度硫酸铵, 最佳盐析条件是采用 85% 饱和度硫酸铵; 所纯化的 SOD 表现出良好的热稳定性和 pH 稳定性, 在 60 °C 下保存 60 min, 其酶活保留超过 50%, pH 适应范围为 6~9; Mn^{2+} 对羊肚菌 SOD 有明显的激活作用, Fe^{2+} 对其有明显的抑制作用; 该 SOD 能耐受过氧化氢, 但对氯仿-乙醇和 SDS 较为敏感, 黑脉羊肚菌 SOD 属于 Mn-SOD 类型。

关键词: 黑脉羊肚菌, 超氧化物歧化酶(SOD), 纯化, 酶学性质

Purification and characteristics of SOD in *Morchella angusticeps*

HOU Yu-yan¹, WU Su-rui², ZHANG Li¹, ZHAO Tian-rui^{1,*}, TAI Li-mei²

(1. Yunnan Institute of Food Safety, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

2. Kunming Edible Fungi Institute of All China Federation of Supply of Marketing Cooperative, Kunming 650221, China)

Abstract: SOD in *Morchella angusticeps* was purified by heating and ammonium sulfate graded precipitation. Then, the thermal stability, pH stability, sensitivity and isozyme types of SOD were also studied. Results showed that the best temperature and time of heating method was 60 °C and 15 min, respectively. The optimum mass fraction of ammonium sulfate for salt-soluble and salting-out were 40% and 85%, respectively. The purified SOD showed good thermal stability and pH stability. SOD retained more than 50% when save 60 min at 60 °C and the accommodation pH was 6~9. Mn^{2+} could significantly activate purify SOD, while Fe^{2+} remarkably inhibit the activity of SOD. The SOD could tolerate hydrogen peroxide, however, it was sensitive to chloroform-ethanol and SDS. Therefore, this SOD belongs to Mn-SOD type.

Key words: *Morchella angusticeps*; superoxide dismutase(SOD); purification; enzymatic properties

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)15-0147-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.15.023

羊肚菌是一类名贵的珍稀食药菌^[1], 泛指羊肚菌属的多种真菌^[2]。羊肚菌品种较多, 主要包括羊肚菌(*M. esculenta*)、小羊肚菌(*M. deliciosa*)、高羊肚菌(*M. elata*)和黑脉羊肚菌(*M. angusticeps*)等 8 个种^[3]。黑脉羊肚菌营养成分十分丰富, 粗蛋白含量为 7.87~9.79 g/100 g, 粗脂肪含量 5.44~6.30 g/100 g, 粗纤维含量 17.93~24.81 g/100 g, 灰分含量 8.18~10.17 g/

100 g; 含有 K、Ca、Mg、Fe、Zn 等多种人体必需的矿物质元素^[4-5]。羊肚菌具有抗氧化、增强机体免疫力、保肝护肾、促进胃肠蠕动以及降血压等生物学功能^[6-9]。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一种生物体内防御氧化损伤的重要抗氧化剂, 广泛存在于动物、植物和微生物内, 是机体内唯一以超氧阴离子为底物的酶, 它能维持细胞内氧自由基处于

收稿日期: 2014-09-22

作者简介: 侯玉艳(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品科学研究, E-mail: 493601137@qq.com。

* 通讯作者: 赵天瑞(1964-), 男, 本科, 副教授, 主要从事食品科学与工程研究, E-mail: food363@163.com。

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2013BAD16B01)。

析、原核表达研究及真核表达载体构建[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006.

[21] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2005.

[22] 龚钢明, 何婷婷, 高能. 植物乳杆菌亚硝酸盐还原酶基因

在大肠杆菌中表达[J]. 中国酿造, 2012, 11: 135-137.

[23] 马鹏飞, 马林, 孙君社, 等. 减少食品中亚硝酸盐危害的研究进展[J]. 食品科学, 2005, S1: 170-172.

[24] 龚钢明, 吕玉涛, 管世敏, 等. 乳酸菌亚硝酸盐还原酶制备及酶学性质[J]. 中国酿造, 2011, 01: 58-60.

无害低水平状态^[10-11]。目前,国内外关于羊肚菌化学成分研究较多的是氨基酸成分、无机元素以及多糖,而酶类的研究相对较少。本文以黑脉羊肚菌为研究对象,对其子实体中SOD的纯化效果及酶学性质进行考察,旨在为黑脉羊肚菌的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑脉羊肚菌 由昆明食用菌研究所提供;石英砂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸二氢钾、邻苯三酚、无水乙醇、EDTA·Na₂ 均购自天津市津东天正精细化学试剂厂;氯仿、盐酸 均购自重庆川东化工有限公司;过氧化氢、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、NaOH、CaCl₂、MgSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O、FeSO₄·7H₂O、BaCl₂、NaCl、CuSO₄·5H₂O、ZnSO₄·7H₂O等其他试剂 均为国产分析纯。

AL204型分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-4型恒温水浴锅 市杰瑞尔电器有限公司;SHZ-D(Ⅲ)型循环多用真空泵 巩义市英峪予华仪器厂;TU1901型双光束紫外可见光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;FE20型pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;TGL-16G飞鸽牌冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;79-1数显恒温加热磁力搅拌器 天津市工兴电器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 粗酶液的提取 采用磷酸盐缓冲液提取法。将黑脉羊肚菌子实体打磨成粉过40目筛,准确称取5g置于研钵中,加入石英砂少许,预冷的150mmol/L、pH7.8的磷酸钠缓冲液150mL,然后冰浴研磨匀浆4h,六层纱布过滤,4℃、8000r/min离心20min,上清液即为粗酶液。4℃保存,待测。

1.2.2 粗酶液的纯化

1.2.2.1 热击法纯化SOD粗酶液 参照张丽^[12]等的方法并稍作修改:取五份10mL粗酶液,分别于50、55、60、65、70℃下对其进行加热处理20min,而后立即放入冰水混合物中冷却20min,在4℃、8000r/min下冷冻离心20min,测定上清液酶活力和蛋白质含量。再分别量取三份10mL体积的粗酶液,将其置于最适热击温度下水浴,分别在10、15、20min时取出,冷却、离心后,测定酶活力。

1.2.2.2 硫酸铵分级沉淀纯化 参照武金霞^[13]等的方法并稍作修改:取六份25mL经热击法纯化后的粗酶液,缓慢加入(NH₄)₂SO₄使其饱和度分别为30%、35%、40%、45%、50%、55%,置于层析柜中4℃下缓慢搅拌3h,在4℃、8000r/min下离心20min,取上清液透析后测定酶活力。同样方法,使其饱和度分别为70%、75%、80%、85%、90%、95%时,测定酶活力。

1.2.3 黑脉羊肚菌SOD酶学性质研究

1.2.3.1 温度稳定性 超氧化物歧化酶是一种金属蛋白酶,分子中的金属辅基使其具有短暂的耐热性,为考察SOD的热稳定性,实验量取六份1mL纯化后的酶液于60℃下分别保温30、60、90、120、150、

180min后,以未处理的酶活力作为对照(100%),测定酶活性,重复3次。

1.2.3.2 pH稳定性 溶液pH因改变酶蛋白与金属辅基的结合状态从而影响其活性,为了考察SOD的酸碱稳定性,实验量取十份1mL的酶液,分别加入pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0的缓冲液4mL,其中pH3.0~5.0为0.1mol/L的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,pH6.0~8.0为0.2mol/L的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液,pH9.0~10.0为1/15mol/L的磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液,pH11.0~12.0为0.05mol/L磷酸氢二钠-0.1mol/L氢氧化钠缓冲液。混合均匀后,置于4℃下放置24h后,以最适pH8.0时的酶活力作为对照(100%),测定酶活性,重复3次。

1.2.3.3 金属离子对SOD活性的影响 在最适条件下,将适量的酶液与金属盐溶液(Ca²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Ba²⁺、Na⁺、Cu²⁺、Zn²⁺)混合,使金属离子的最终浓度分别为0.001、0.003、0.005、0.01、0.03、0.05、0.1mol/L,4℃下放置3h,以不加金属离子的SOD的酶活性为100%计,测定酶的残余活力并计算相对活力。

1.2.3.4 SOD的敏感性实验 在2.0mL酶液中分别加入1.5%的过氧化氢溶液5、10、15、20、25μL,4℃下反应30min后取样,以未处理的酶活力作为对照(100%),测定酶的残余活力并计算相对活力。在2.0mL酶液中分别加入2:3(v/v)氯仿-乙醇溶液10、20、30、40、50μL,4℃下反应30min后取样,以未处理的酶活力作为对照(100%),测定酶的残余活力并计算相对活力。在2.0mL酶液中分别加入0.1、0.5、1.0、3.0、5.0mmol/L的SDS溶液1.0mL,4℃下反应30min后取样,以未处理的酶活力作为对照(100%),测定酶的残余活力并计算相对活力。

1.2.4 SOD比活力的测定

1.2.4.1 SOD酶活性测定 SOD酶活性测定采用改进的邻苯三酚自氧化法^[14]。

邻苯三酚自氧化速率测定:在25℃左右,于10mL离心管中依次加入pH8.0 0.1mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)-盐酸缓冲溶液(内含1mmol/L EDTA·2Na)2.25mL,蒸馏水2.1mL,4.5mmol/L邻苯三酚盐酸溶液0.15mL。加入邻苯三酚盐酸溶液后立即混合并倾入比色皿,分别测定在325nm波长条件下的吸光值,每30s记录1次OD随时间的变化的值,读取至330s。计算线性范围内每分钟吸光度值的增加(ΔA),即为邻苯三酚自氧化速率ΔA₃₂₅/min。

SOD酶液抑制邻苯三酚自氧化速率测定:按邻苯三酚自氧化速率测定所述步骤,加入0.05mL粗酶液抑制邻苯三酚自氧化,测定在325nm波长条件的吸光值,每30s记录1次OD随时间的变化的值,读取至330s。计算每分钟吸光值的变化率即为酶液对邻苯三酚自氧化速率的抑制ΔA'₃₂₅/min。以缓冲液代替酶液做空白。每组实验重复3次。酶活定义为25℃时抑制邻苯三酚自氧化速率50%时所需的SOD的量为一个活力单位。

表1 测定蛋白含量标准曲线的试剂用量表

Table 1 Determination of the protein content of the standard curve reagent scale

试剂/管号(mL)	0	1	2	3	4	5	6
牛血清白蛋白标准液(200 μg·mL ⁻¹)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
碱性硫酸铜溶液	5	5	5	5	5	5	5
Folin-酚试剂	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

$$\text{SOD 活力 (U/mL)} = \frac{\frac{\Delta A_{325} - \Delta A'_{325}}{\Delta A_{325}} \times 100\%}{50\%} \times 4.5 \times \frac{1}{V} \times D$$

式中:ΔA₃₂₅为邻苯三酚自氧化速率;ΔA'₃₂₅样液或SOD酶液抑制邻苯三酚自氧化速率;V为所加酶液或样液体积,单位为毫升(mL);D为酶液或样液的稀释倍数;4.5为反应液总体积,单位为毫升(mL)。

1.2.4.2 蛋白含量的测定 标准曲线的制作:取6支试管编号,按表1依次加入试剂。注意:加入碱性硫酸铜溶液后将溶液混匀,室温放置10 min,然后加入Folin-酚试剂,此时要求迅速将溶液混匀。从加入第一管Folin-酚试剂开始计时,计时30 min后于500 nm处比色,测光密度值,用0号管作空白,其余每管重复三次,取平均值。以蛋白质浓度为横坐标,光密度值为纵坐标,绘制标准曲线为定量依据。

样品的测定:取1 mL样品溶液,按表2加入碱性硫酸铜溶液和Folin-酚试剂,测定光密度值,具体方法同上。

表2 测定样品中蛋白质含量的试剂用量表

Table 2 Determination of protein content in the sample with a reagent Scale

样品溶液	蒸馏水	碱性硫酸铜溶液	Folin-酚试剂
0.5 mL	0.5 mL	5 mL	0.5 mL

1.2.4.3 SOD的比活力的计算方法 SOD的比活力按下面公式计算:

$$\text{SOD 比活性 (U/mg)} = \frac{\text{SOD 酶液活力 (U/mL)}}{\text{酶液蛋白含量 (mg/mL)}}$$

2 结果与讨论

2.1 SOD粗酶液的纯化

2.1.1 热击法纯化SOD粗酶液

2.1.1.1 热击温度对SOD纯化的影响 由图1可以得出,随着加热温度的升高,黑脉羊肚菌中SOD提取液中的酶活损失率和蛋白去除率均呈上升趋势,说明加热可以去除SOD粗提液中的杂蛋白,同时酶也属于蛋白质,所以温度的上升,酶活性也会相应的有损失。低于60℃时,SOD的比活性随着温度的升高呈上升趋势,因大部分蛋白质的变性温度为55℃,而SOD对温度具有一定的稳定性,所以当温度升至60℃时,酶的比活力达到最大值,而此后随着温度的上升,SOD比活性有所下降,此时酶活损失的幅度大于杂蛋白的去除,说明温度的进一步升高加速了对SOD活性的破坏。因此,选取60℃为最佳热击温度。

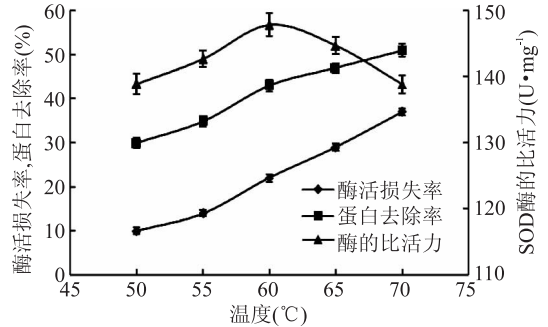


图1 热击温度对SOD酶纯化效果的影响

Fig.1 The effect of heating temperature on SOD purification

2.1.1.2 热击时间对SOD纯化的影响 由图2可以得出,在60℃下,随着热处理时间的延长,黑脉羊肚菌提取液中SOD酶活损失率和蛋白去除率均呈上升趋势。在热处理15 min前,SOD的比活力随着热处理时间的延长呈上升趋势,当15 min时,SOD比活力达到最大。热处理时间小于15 min时,纯化效果不理想,虽然酶活损失率较小,但杂蛋白的去除率也不大;热处理时间大于15 min时,蛋白去除率增大的幅度减小了,但酶活损失率增大的幅度反而增大。因此,选取15 min为最佳热击时间。

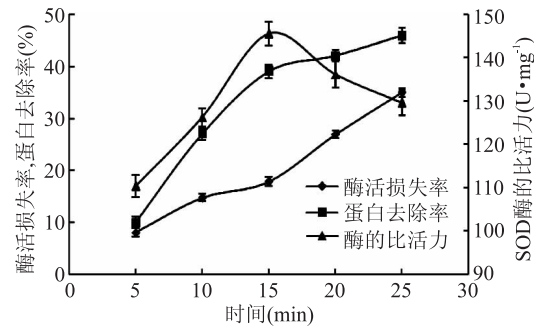


图2 热击时间对SOD酶纯化效果的影响

Fig.2 The effect of heating time on SOD purification

2.1.2 硫酸铵分级沉淀纯化SOD

2.1.2.1 最佳盐溶硫酸铵饱和度 蛋白质是亲水性大分子,在水溶液中有双电层结构,以此来保证分子的溶解度平衡并稳定存在。在蛋白质的水溶液中,加入少量的中性盐,会增加蛋白质分子表面的电荷,增强蛋白质分子与水分子的作用,从而使蛋白质在水溶液中的溶解度增大,这种现象称为盐溶。利用此性质可除去提取液中的不溶性蛋白,达到除杂的目的。由图3可知,选择40%的硫酸铵饱和度进行盐溶。

2.1.2.2 最佳盐析硫酸铵饱和度 蛋白质在水溶液中的溶解度是由蛋白质周围亲水基团与水形成水化

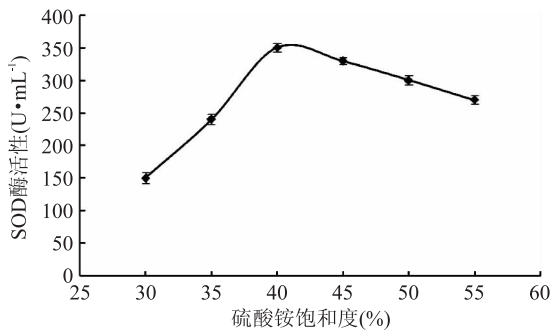


图3 SOD的盐溶曲线

Fig.3 The salt-soluble curve of SOD

膜的程 度,以及蛋白质分子带有电荷的情况决定的。向蛋白质溶液中加入高浓度的中性盐时,高浓度的盐离子有很强的水化力,其对水分子的亲和力大于蛋白质,可夺取蛋白质分子的水化层,即蛋白质分子周围的水化膜层减弱乃至消失,使之“失水”,从而破坏蛋白质的胶体性质,使蛋白质的溶解度降低而从水溶液中析出,同时,中性盐加入蛋白质溶液后,由于离子强度发生改变,蛋白质表面电荷大量被中和,更加导致蛋白质溶解度降低,使蛋白质分子之间聚集而沉淀。由图4可知,选择85%的硫酸铵饱和度进行盐析。

2.1.3 纯化的结果 将热击法和硫酸铵分级沉淀法对SOD粗酶液纯化的结果比较见表3。

由表3可知,在最佳提取条件下收集到的粗酶液依次经过热击处理、硫酸铵分级沉淀法对其进行初步纯化,得到的黑脉羊肚菌SOD比活力达306.29 U/mg。

2.2 黑脉羊肚菌SOD酶学性质测定

2.2.1 SOD的热稳定性 由图5看出,60℃下随着保温时间的增加,SOD残留相对酶活性逐渐减小,在加热60 min后,酶活仍保留了一半以上,证明SOD的热稳定性较好。

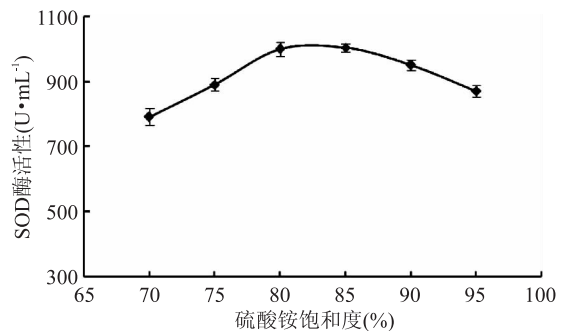


图4 SOD的盐析曲线

Fig.4 The salting-out curve of SOD

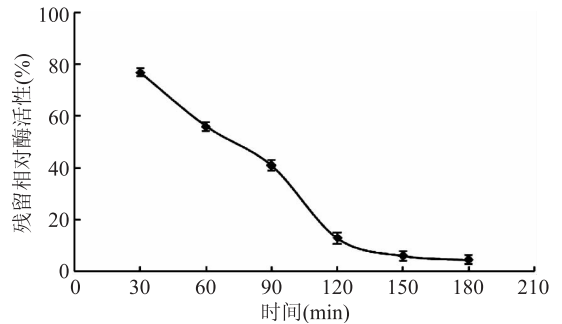


图5 SOD的热稳定性

Fig.5 Thermal stability of SOD

2.2.2 SOD的pH稳定性 由图6可以看出,在pH6~9的范围内,SOD的活性损失很少,残留相对活性较高,可以认为SOD对pH的适应范围较宽,是一种对pH比较稳定的酶。

2.2.3 金属离子对SOD活性的影响 由表4可知,当向反应体系中加入不同的金属离子后,多种金属离子对SOD的酶活性均有一定的影响,并且随着金属离子浓度的不同,作用程度有所不同。Mn²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺随着离子浓度的增大,对SOD的激活作用

表3 黑脉羊肚菌SOD纯化的结果

Table 3 Purification results of SOD in Morchella angusticeps

纯化步骤	总酶活力(U)	总蛋白质(mg)	酶的比活力(U·mg ⁻¹)	回收率(%)	纯化倍数
粗酶液	116620	1053	110.75	100	1
热击纯化	85364.4	549.8	155.25	73.2	1.40
硫酸铵分级纯化	62016	202.5	306.29	53.2	2.77

表4 金属离子对SOD活性的影响

Table 4 Effect of metal ions on the activity of SOD

金属离子浓度 (mol·L ⁻¹)	相对酶活性(%)							
	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Fe ²⁺	Ba ²⁺	Na ⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺
0.001	114.4 ^{eE}	102.6 ^{bA}	101.3 ^{bA}	94.7 ^{aE}	122.5 ^{dF}	127.5 ^{dG}	153.3 ^{eC}	123.3 ^{dB}
0.003	135.5 ^{eF}	106.0 ^{bB}	112.1 ^{cC}	98.1 ^{aF}	111.6 ^{eE}	124.9 ^{dF}	164.1 ^{gD}	137.4 ^{dD}
0.005	104.5 ^{eC}	115.0 ^{dE}	123.4 ^{fF}	97.6 ^{aF}	101.6 ^{bC}	117.5 ^{eD}	168.7 ^{hE}	145.3 ^{gE}
0.01	86.9 ^{aA}	116.2 ^{dE}	136.1 ^{fG}	91.4 ^{bD}	108.3 ^{eD}	122.9 ^{eE}	184.1 ^{hF}	147.1 ^{gF}
0.03	112.2 ^{dD}	119.0 ^{eF}	117.3 ^{eE}	75.0 ^{aC}	92.5 ^{bA}	100.8 ^{eC}	125.8 ^{gB}	132.4 ^{gC}
0.05	89.1 ^{bB}	111.1 ^{dD}	116.0 ^{dD}	47.9 ^{aB}	94.9 ^{bB}	90.8 ^{bB}	110.8 ^{dA}	117.0 ^{eA}
0.1	86.0 ^{eA}	109.0 ^{eC}	109.0 ^{eB}	0 ^{aA}	93.5 ^{dA}	83.3 ^{bA}	110.6 ^{eA}	116.9 ^{fA}

注:小写字母表示同一浓度下不同种类金属离子对SOD活性的影响,小写字母不同表示差异性显著($p < 0.05$);大写字母表示同一金属离子不同浓度下对SOD活性的影响,大写字母不同表示差异性显著($p < 0.05$)。

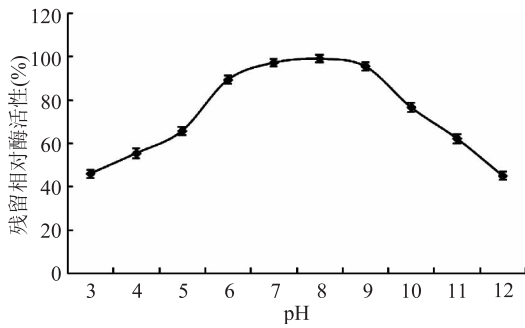


图6 SOD的pH稳定性
Fig.6 pH stability of SOD

先增大后减小,相对酶活性保持在100%~150%的范围内。而Ba²⁺、Na⁺随着离子浓度的增大,对SOD的激活作用逐渐减小,甚至当离子浓度大于0.03 mol·L⁻¹时,对其起到了抑制作用。Mn²⁺的激活作用最为明显,相对酶活达到了184.1%。而Fe²⁺则对其具有非常明显的抑制作用,当金属离子浓度达到0.1 mol/L时,检测不到酶活性。

2.2.4 SOD 敏感性测定 由图7可知,SOD能耐受过氧化氢,但对氯仿-乙醇和SDS非常敏感,随着溶液加入量的增加,SOD的酶活逐渐降低。当SDS溶液浓度达到5.0 mmol/L时,酶的活性被抑制了65%。根据SOD酶的敏感性实验:Cu、Zn-SOD对H₂O₂敏感,但能耐受SDS和氯仿-乙醇;Fe-SOD对SDS、H₂O₂和氯仿-乙醇均较敏感;Mn-SOD对SDS和氯仿-乙醇敏感,但能耐受H₂O₂^[15-16]。由此可以推断黑脉羊肚菌SOD属于Mn-SOD。

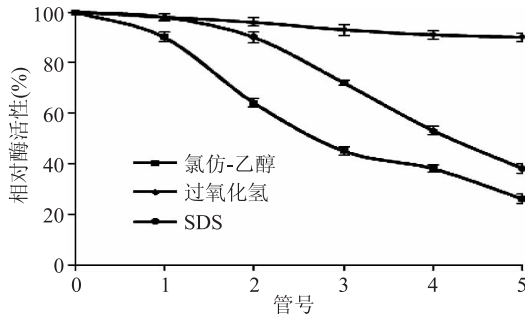


图7 SOD的敏感性实验
Fig.7 Sensitive experiment of SOD

3 结论

本实验以黑脉羊肚菌子实体为研究对象,研究了SOD的初步纯化方法,并对纯化后SOD酶的热稳定性、pH稳定性及敏感性进行研究,推断出该SOD属Mn-SOD。

热击法纯化中,随着加热温度的升高以及时间的延长,酶活损失率和蛋白去除率均呈上升趋势,酶的比活力先增大后减小。这说明加热能一定程度的去除杂蛋白,但是过高的温度和过长的加热时间也会加速酶活性的损失,因此选取最佳热击温度为60℃,热击时间为15 min。硫酸铵分级沉淀法的实验中将硫酸铵饱和度调至40%,发生盐溶现象,此步骤可除去不溶性蛋白,再将硫酸铵饱和度调至85%,此时蛋白质的溶解度降低导致盐析,以此纯化SOD。

稳定性实验结果显示,SOD的热稳定性较好,在60℃下加热30 min,酶活性能保留80%左右。在pH6~9的范围内,SOD的活性损失很少,残留相对活性较高,可以认为SOD对pH的适应范围较宽,是一种对pH比较稳定的酶。多种金属离子对SOD的酶活性均有一定的影响,其中Fe²⁺对其具有非常明显的抑制作用,当Fe²⁺浓度达到0.1 mol/L时,检测不到酶活性。敏感性实验表明该SOD能耐受过氧化氢,但对氯仿-乙醇和SDS较为敏感,为黑脉羊肚菌SOD类型的推断提供重要依据。

参考文献

- [1] 兰进,曹文苓,徐锦堂.中国羊肚菌属真菌资源[J].资源科学,1999,21(2):56-61.
- [2] 余梦瑶,许晓燕,江南,等.尖顶羊肚菌菌丝体胞外多糖的分离纯化及结构研究[J].四川大学学报:自然科学版,2013,50(6):1373-1378.
- [3] 胡克兴,董雪,范黎.羊肚菌属分子系统学研究进展[J].微生物学通报,2004,31(6):115-119.
- [4] 吴素蕊,侯波,郭相,等.黑脉羊肚菌营养成分分析比较[J].食品科技,2011,36(7):65-66.
- [5] 王元忠,李涛,李兴奎,等.黑脉羊肚菌元素测定[J].中国食用菌,2006,25(2):42-43.
- [6] 孙晓明,张卫明.羊肚菌免疫调节作用研究[J].中国野生植物资源,2001,20(2):12-13.
- [7] 贲建民.羊肚菌发酵液对小鼠抗疲劳作用实验研究[J].卫生研究,1997,(26):330-333.
- [8] 周丽伟,陈彦,孙玉军.羊肚菌水提取物对急性肝损伤的干预作用[J].中国食用菌,2006,25(6):36-37.
- [9] 刘敏莉,富力,董然,等.羊肚菌等四种野生食用菌无机元素的分析[J].中国野生植物资源,1994,13(2):42-44.
- [10] 陆玲,袁生,秦怀兰,等.发酵产金针菇菌丝中超氧化物歧化酶特性研究[J].食用菌学报,1997,4(3):27-32.
- [11] 苏昕,闫浩林,梁丽莉.酵母SOD分离纯化及其酶学性质的研究[J].沈阳药科大学学报,2005,22(1):67-70.
- [12] 张丽,罗丽萍,谷力.大蒜SOD的分离纯化及其低温胁迫下的酶活性[J].吉首大学学报:自然科学版,2003,24(4):53-55.
- [13] 武金霞,肖炜.双孢蘑菇子实体超氧化物歧化酶(SOD)的分离纯化及部分性质[J].河北大学学报:自然科学版,2002,22(3):264-267.
- [14] 邹国林,桂兴芬,钟晓凌.一种SOD的测活方法-邻苯三酚自氧化法的改进[J].生物化学与生物物理进展,1986,4(4):71-73.
- [15] Vyas D, Kumar S. Purification and partial characterization of a low temperature responsive Mn-SOD from tea (Camellia sinensis (L.) O.Kuntze) [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2005, 329(3): 831-838.
- [16] Babitha M P, Prakash H S. Purification and partial characterization of manganese superoxide dismutase from downy mildew resistant pearl millet seedlings inoculated with Sclerospora graminicola [J]. Plant Science, 2002, 163(4): 917-924.