

植物硒蛋白不同提取方法的综述

梁潘霞, 刘永贤*

(广西农业科学院 农业资源与环境研究所, 广西 南宁 530007)

摘要: 硒(Se)是生物必需的一种微量元素,其生物学功能主要是以硒蛋白的形式表现的,植物硒蛋白具有抗氧化、抗癌、提高免疫力等功能.综述了硒在植物中的存在形态、硒蛋白的分类及提取方法,并提出今后的研究方向.参21.

关键词: 硒; 硒蛋白; 提取; 植物

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A

硒(Se)作为人体必需的微量营养元素之一,具有防癌、抗癌、提高免疫能力和生殖机能,预防和治疗心血管疾病、克山病和大骨节病多种地方性疾病等多重功效.全球目前有40多个国家及地区缺硒,我国大部分处于缺硒地带,从东北到西南跨越了22个省市自治区,有70%多的区域不同程度缺硒.土壤缺硒可能导致人类膳食结构中缺硒而产生相应病变^[1].大量研究表明有机硒比无机硒更安全、更易被机体吸收,其生理活性和吸收率要优于无机硒,尤其是蛋白硒及硒代氨基酸毒性小、生物利用率高,因此如何从植物中获取具有生物活性、高纯度的硒蛋白和硒代氨基酸,已成为人们研究的热点之一^[2-7].作者对硒蛋白的提取技术和方法的发展进行综述.

1 植物硒形态存在形式

硒被植物吸收到体内后形成无机硒和有机硒两大类化学形态.无机硒较少,占硒总量的8%,主要是硒酸、亚硒酸和其他一些无机形态,有机硒占硒总量80%以上,由大分子硒和以硒代氨基酸及其衍

生物形式存在的小分子硒化物组成.大分子硒主要包括硒蛋白、硒核酸和硒多糖等,其中硒蛋白是大分子硒的主要存在形态.小分子硒化物包括硒代胱氨酸、硒代蛋氨酸、硒甲基硒半胱氨酸、硒代高胱氨酸和硒肽等.在硒积蓄植物中硒结合蛋白很少,硒可能作为硒代胱硫醚和甲基硒代半胱氨酸等含硫氨基酸代谢中间产物类似物存在;在非积聚植物中,硒多与蛋白质结合,而且主要以硒代蛋氨酸存在,也有硒代半胱氨酸存在.硒代氨基酸是人类日常膳食中获取硒的主要来源^[8].

Rotruck在1973年首次证明细胞谷胱甘肽过氧化物酶是一种含硒酶,硒是该酶的活性组分,因此拉开了硒蛋白的研究序幕.硒蛋白是硒的生物学功能主要表现形式.目前对含硒蛋白有3种不同的分类方法:(1)按硒代谢形式分为:硒蛋白和含硒蛋白.硒蛋白是在基因密码子UGA编码下以硒代半胱氨酸形式特异进入蛋白质的那些蛋白,而把其它结合硒的蛋白质称为含硒蛋白,有时为表述方便也把一些含硒蛋白称为硒蛋白^[9].由于在有酶活性的硒蛋白中,硒代半胱氨酸往往参与构成酶的活性中心,故又称之为硒酶.由含硒氨基酸构成的硒蛋白因具

收稿日期:2016-12-16

基金项目:广西自然科学基金项目资助(编号:2014GXNSFBA118139);广西科学研究与技术开发计划项目资助(编号:桂科合15104001-22);南宁市科学研究与技术开发计划项目资助(编号:20152054-13);广西农科院基本业务专项资助(编号:桂农2014YD13);南宁市西乡塘区科学研究与技术开发计划项目资助(编号:2015312)

作者简介:梁潘霞(1979-),女,壮族,博士,助理研究员,研究方向:土壤环境生态、植物生理生化与生物技术.

* 通讯作者:liuyx27@163.com.

有重要的生理功能从而得到了广泛的研究;(2)按硒在蛋白质中的存在形式分为:含硒代半胱氨酸蛋白、含硒代蛋氨酸蛋白、键合硒蛋白、其他硒蛋白等;(3)按硒蛋白的生物化学功能分为:氧化还原蛋白、运硒蛋白、结构蛋白、甲基受体蛋白等。

2 硒蛋白提取的研究

硒蛋白的提取与分离,是深入研究其生物与化学形态的前提。由于硒形态具有不稳定性,在硒蛋白提取的过程中应保证其生物与化学形态不发生变化,这比仅仅检测硒元素复杂得多,因此需要寻找合适的提取方法。目前硒蛋白提取方法有溶剂提取法、柱分离技术、生物学方法等、辅助提取技术等。

2.1 水提法

称取一定量的富硒样品脱脂干粉,加入适量双蒸水,室温下搅拌提取。离心后取上清液。再在残渣中分别加入一定量水搅拌重复提取2次,合并3次所得提取液,即得水溶性硒蛋白溶液。在硒蛋白提取中pH、温度、浸提时间、料液比(w/v)、提取次数等因素都会影响水溶性硒蛋白提取效果。同时,由于样品不同所得水溶性蛋白中硒含量也不相同。文献[10]用蒸馏水作为富硒大蒜含硒蛋白提取溶剂,蛋白提取率达19.42%,并通过正交试验确定提取富硒蒜粉最佳水溶性蛋白浸提条件为:提取时间为4 h、pH为7.0、料液比为1:35、温度为4℃。文献[11]用水提法提取黑木耳水溶性蛋白,其中水溶性蛋白质中硒的质量分数可高达79.07 mg/kg,说明水溶性蛋白质中含有较多的微量元素硒。文献[12]从荸荠中提取的水溶性蛋白质中硒的含量最低,只有17.16 $\mu\text{g/g}$ 。文献[13]从魔芋中提取的水溶性蛋白中的硒含量仅为0.164 $\mu\text{g/g}$ 。文献[13]从蛹虫草提取的水溶性蛋白占总蛋白硒的20.47%~24.60%。文献[14]采用蒸馏水、pH8.5和6.0的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{—NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液、稀盐、乙醇、稀碱分别依次提取富硒萝卜叶中不同种类的蛋白质,其中水溶性蛋白结合硒含量最高,占样品含硒量的26.78%。水提取法对硒甲基硒代半胱氨酸、谷氨酰基硒甲基、硒代半胱氨酸等一些非结合蛋白形式的硒形态较适合,但对以蛋白形式结合的硒回收率较差。

2.2 盐提法

此法适用于盐溶性硒蛋白的提取。在提取水溶性硒蛋白后的残渣中加一定浓度NaCl溶液,室温下搅拌提取,离心后取上清液。再在残渣中分别加入一定量相同浓度的NaCl重复提取2次,合并3次所得提取液,即得盐溶性硒蛋白溶液。武芸等用盐提法提取黑木耳盐溶性蛋白,其中盐溶性蛋白质中硒的含量可高达35.32 mg/kg。文献[14]从荸荠中提取的盐溶性蛋白质中硒的含量达871.62 $\mu\text{g/g}$ 。文献[15]用0.5 M NaCl提取富硒绿茶中盐溶性蛋白质,得到的硒含量为1.53 $\mu\text{g/g}$ 。文献[13]从蛹虫草提取的水溶性蛋白占总蛋白硒的55.13%~56.80%。

2.3 酸提法

在提取盐溶性硒蛋白质后的残渣中加入一定浓度的pH6.0的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{—NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液,搅拌提取,离心后取上清液。再在残渣中分别加入一定量相同浓度的pH6.0的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{—NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液重复提取2次,合并3次所得提取液,即得弱酸性硒蛋白溶液。文献[11]用酸提法提取黑木耳酸性多糖硒占黑木耳总硒的12.65%,酸性蛋白中硒的含量可高达78.32 mg/kg。酸提取法回收率很高,但酸易使硒形态发生转变,在0.1 mol/L HCl强酸条件下,蛋白质提取率低,且蛋白活性丧失高。

2.4 醇提法

此法适用于醇溶性硒蛋白的提取。在盐溶性蛋白硒提取后的残渣中加适量一定浓度的乙醇室温下提取。离心,取上清液(保留沉淀),加一定量的双重蒸馏水,4℃静置过夜。离心,转速同上。取沉淀,冻干,一定浓度的乙醇溶解,降低乙醇浓度对蛋白质沉淀分级,用一定浓度的乙醇定容。文献[14]从荸荠中提取的醇溶性蛋白质中硒的含量高达3709.3 $\mu\text{g/g}$ 。文献[13]从蛹虫草提取的醇溶性蛋白占总蛋白硒的15.30%~16.49%。

2.5 碱提法

在提取弱酸或者醇溶性硒蛋白后的残渣中加入一定浓度的pH8.5的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{—NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液,搅拌提取,离心后取上清液。再在残渣中分别加

入一定量的 pH8.5 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{—NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液重复提取 2 次,合并 3 次所得提取液,即得弱碱性硒蛋白溶液.文献[16]采用水提、碱提、醇提和酶提 4 种提取法对富硒灵芝子实体的总糖、硒及蛋白质进行提取,结果表明提取率依次为碱提法、酶提法、水提法、醇提法.文献[15]用 0.1 mol/L 氢氧化钠为提取液对富硒茶叶中硒蛋白进行提取,确定料液比 1 : 30 g/mL、提取时间 16 h、提取温度 40 °C 时为最佳提取条件.文献[11]用碱提法提取黑木耳碱性多糖占黑木耳总硒的 4.78%,酸性蛋白中硒的含量可高达 44.17 mg/kg.文献[13]从蛹虫草提取的碱性蛋白占总蛋白硒的 2.99%~3.35%.文献[17]确定富硒食用菌中硒蛋白提取的最佳工艺条件为:NaOH 浓度为 0.069 2 mol/L,温度为 60.62 °C,料液比 (w/v) 为 1 : 24.69,提取时间为 8 h,提取次数为 2 次,在此条件下,蛋白的得率为 30.17%.虽然蛋白质在强碱条件下的提取率较好,但是强碱容易引起赖氨酸损失,产生不良副产物,使蛋白质发生变性和水解.

2.6 有机溶剂萃取法

文献[18]用甲苯萃取分离了富硒样品中的有机硒.方法如下:取富硒样品 0.3~0.5 g 于烧杯中,加 30 mL 水搅匀,用 5% NaOH 溶液调节 pH 为 6.0~7.5.将调好 pH 的样品溶液倒入 100 mL 的分液漏斗中,并加入 10 mL 甲苯,萃取 2 min,取有机相.同样方法再萃取 1 次,将两次有机相溶液合并于密闭消解罐中,沸水浴挥干甲苯.利用甲苯萃取两次后,在有机相中加入 15% 半胱氨酸溶液 1 mL.摇匀后静置,加入 1~2 滴亚甲蓝溶液并开始计时,有机硒作用下的亚甲蓝的褪色时间为 5~10 min,无机硒作用下的亚甲蓝的褪色时间为 30~60 s.根据褪色时间判断有机相中是否含无机硒.

2.7 生物学方法

酶提取法在硒蛋白提取中应用较广,它是一种温和的样品处理技术,一般在 37 °C, pH7.0 条件下进行,其提取率高,对样品的破坏性较小,但此法提取的速度较慢,一般需 24~48 h.常用的酶有蛋白酶 K,蛋白酶 XIV,胰蛋白酶,胃蛋白酶和链霉菌蛋白酶等.通过多种方法比较提取富硒酵母中硒化合物的效率,结果表明用蛋白酶水解,硒的回收率最高可达 85%,而用水和甲醇浸提得到的主要为 SeMet 和

SeIV 等 8 种硒化合物,回收率仅为 10~20%,用崩溃酶分解可以释放 20% 的 SeMet,用 SDS 提取回收率为 85%,主要形态是 SeMet.文献[19]用纤维素酶法提取富硒灵芝菌丝体多糖,将 1.0 g 富硒灵芝菌丝体加入 50 mL 水(浸提剂)中,加入 0.5% 的纤维素酶,酶解 2 h,然后升温至 85 °C 灭酶,4 000 r/min 离心 15 min,测定提取液中多糖含量.纤维素酶法工艺简单且价格便宜,因此具有较高的应用价值.

2.8 柱分离技术

文献[20]首先采用氯仿分离麻叶千里光有机态和无机态;然后选择正己烷、乙酸乙酯、甲醇等 3 种不同极性溶剂作洗脱剂,以硅胶柱进行洗脱;其中有机态洗脱后,硒元素含量分别为:51 142、31 329、21 011 $\mu\text{g/g}$.

2.9 辅助提取技术

为了更高效地提取生物样品中的硒蛋白,通常采用加热、搅拌、微波和超声波等辅助提取技术中的一种或多种.微波辅助提取技术是让待测样品内部受热,通过加入的介质对微波能的吸收,加速待测样品分子与介质分子之间的相互作用,从而显著提高提取效率.它可以克服常规分解技术中耗时、低效、耗试剂及污染等缺点.超声辅助提取技术是在有固体试样的溶液中,通过强而高频率的超声波使两者充分混合发生物理或化学反应,从而使固体试样的预处理过程大大加速,显著提高了提取效率.因此,超声技术与常规的提取技术相比,是一个被优先考虑的辅助提取技术.

酶提取法虽提取效果不错,但耗时,可结合微波和超声波方法来加速酶分解速度,克服其耗时的缺点.文献[21]将酶解法和微波辅助技术结合应用于提取富硒酵母标准样品,这两种方法结合定量标准品硒蛋氨酸的回收率达 100.1%,且提取时间由原来常规酶解的 20 h 缩短至 30 min.超声波提取技术在样品前处理中可起到细胞破碎、团聚物分解、乳化和匀质等作用.目前在富硒芥菜、富硒大蒜、富硒马铃薯、富硒酵母和鸡组织的硒形态研究中,超声波探针辅助酶法提取技术已被广泛应用,其快速简便,提取时间缩短到 30 s~180 s,仍能达到传统 48 h 酶解相近的效果,同时可以防止长时间提取导致的硒形态转变.

3 结束语

植物有机硒作为高效低毒优质硒源,在人和动物的健康保健领域有广阔的应用前景.自然富硒植物资源少,有机硒资源出现世界性严重短缺,供求矛盾比较突出,尤其在我国表现更甚.虽然我们在有机硒资源的提取工艺方面已取得了很大的进步,但天然有机硒的用途非常广泛,在很多方面天然有机硒资源开发还远远不够,不能满足市场日益发展的需要.因此,研究植物的富硒特点、植物硒的存在形态及鉴定.寻找、开发更加方便有效的天然有机硒提纯工艺,将极大促进富硒资源的开发、利用和该研究领域的深入,以缓解有机硒资源的供求矛盾.

参考文献:

- [1] Rayman M P, Infante H G, Sargent M. Food-chain selenium and human health; spotlight on speciation [J]. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100: 238-253.
- [2] Cann S A, van Netten J P, van Netten C. Hypothesis: Iodine, selenium and the development of breast cancer [J]. *Cancer Causes and Control*, 2000, 11(2), 121-127.
- [3] Panigati M, Falciola L, Mussini P. Determination of selenium in Italian rices by differential pulse cathodic stripping voltammetry [J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(3): 1 091-1 098.
- [4] Moon J K, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(5): 1 655 - 1 666.
- [5] 张俊杰. 硒的生理功能及富硒强化食品的研究进展 [J]. *微量元素与健康研究*, 2006, 23(3): 58-60.
Zhang Jun-jie. The Biological Functions of selenium and research development of se-enriched foodstuff [J]. *Studies of Trace Elements and Health*, 2006, 23(3): 58-60.
- [6] 况冲, 郭晓玲, 张永忠, 等. 富硒大豆蛋白的研制 [J]. *食品工业科技*, 2008, 6(3): 192-194.
Kuang Chong, Guo Xiao-ling, Zhang Yong-zhong. Research on preparation of protein of selenium-enriched soybean [J]. *Science and Technology of Food Industry*. 2008, 6(3): 192-194.
- [7] 王庆华, 黄伟, 李前勇, 等. 中国富硒食品的生产现状及趋势 [J]. *广东微量元素学*, 2008, 15(3): 7-10.
Wang Qing-hua, Huang Wei, Li Qian-yong, et al. Application and development of selenium-accumulating food in China [J]. *Trace Elements Science*. 2008, 15(3): 7-10.
- [8] 程建中, 杨萍, 桂仁意. 植物硒形态分析的研究综述 [J]. *浙江农林大学学报* 2012 29(2): 288-295.
Cheng Jian-zhong, Yang Ping, Gui Ren-yi. Research progress on speciation of selenium compounds in plants [J]. *Journal of Zhejiang Forestry College*. 2012 29(2): 288-295.
- [9] 黄峙, 向军俭, 郭宝江. 硒酶及硒化合物生理功能研究的新进展 [J]. *生理科学进展*, 2001, 32(4): 293-297.
Huang Shi, Xiang Jun-jian, Guo Bao-jiang. Research progress in physiological functions of seleno enzyme and other seleno compounds [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2001, 32(4): 293-297.
- [10] 岳晶念. 富硒大蒜含硒蛋白提取分离、初步纯化及抗氧化活性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
Yue Jing-nian. Study on SeParation, Preliminary purification and antioxidant activity of selenium-containing Protein from se-enriched Garli. Master degree dissertation [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.
- [11] 武芸. 富硒黑木耳中硒的分布规律及赋存形态的初探 [J]. *食用菌*, 2008, (5): 5-6.
Wu Yun. Study on the distribution and morphology of selenium in selenium enriched black fungus [J]. *Edible Fungi*, 2008, (5): 5-6.
- [12] 张驰, 刘信平, 周大寨, 等. 荸荠中硒的赋存形态及分布研究 [J]. *食品科学*, 2007, 28(10): 93-95
Zhang Chi, Liu Xin-ping, Zhou Da-zhai, et al. Study on distribution and combined forms of selenium in water chestnut [J]. *Food Science*, 2007, 28(10): 93-95.
- [13] 钟鸣, 王丽贺. 蛹虫草中硒的赋存形态及蛋白硒分析 [J]. *广东微量元素科学*, 2008, 15(3): 35-40.
Zhong Ming, Wang Li-he. Analysis on speciation of selenium and se-protein in cordyceps militaris [J]. *Trace Elements Science*, 2008, 15(3): 35-40.
- [14] 张驰, 刘信平, 周大寨, 等. 富硒萝卜叶中的硒的赋存形态及分布研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 100-102.
Zhang Chi, Liu Xin-ping, Zhou Da-zhai, et al. Study on distribution and combined forms of selenium in selenium-enriched radish leaves [J]. *Food Science*, 2008, 29(8): 100-102.
- [15] 余芳, 汪社英, 方勇, 等. 富硒绿茶硒蛋白的提取工艺研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(4): 140-143.
Yu Fang, Wang She-ying, Fang Yong, et al. Study on extraction of selenium-containing protein from selenium-enriched green tea [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2008, 31(4): 140-143.
- [16] 赵镭, 高海燕, 张美莉, 等. 4种提取法对富硒灵芝主要功效成分的提取效果 [J]. *中国农业大学学报*, 2006, 11(1): 125.
Zhao Lei, Gao Hai-yan, Zhang Mei-li, et al. Effect of

- different methods on the extracting of main nutritional components from se-enriched *Genoderme lucidum* [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2006, 11(1):125.
- [17] 王莲芳, 窦春霞, 张连富, 等. 富硒食用菌中硒蛋白提取工艺研究[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(1):122-126. Wang Lian-fang, Dou Chun-xia, Zhang Lian-fu, et al. Study on selenium containing protein extracting technology from selenium-enriched Edible Fungi [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2007, 33(1):122-126.
- [18] 李四生, 董晓根, 李家涛. 甲苯萃取-微波消解-原子荧光光谱法测定富硒保健品中有机硒和总硒[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(1):87-89. Li Si-sheng, Dong Xiao-gen, Li Jia-tao. Determination of organic and total selenium contents in selenium-enriched health food by methylbenzene extraction-microwave-assisted digestion-atomic fluorescence spectrometry [J]. *Chineses Journal of Health Laboratory Technology*, 2008, 18(1):87-89.
- [19] 靳挺, 沈波, 吴天星. 纤维素酶法提取富硒灵芝菌丝体多糖的研究[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(4):33-36. Jin Ting, Shen Bo, Wu Tian-xing. Studies on the extraction of mycelium polysaccharides from selenium-rich *ganoderma lucidum* by cellulase [J]. *Journal of Chinese Institute Of Food Science and Technology*, 2007, 7(4):33-36.
- [20] 高淑云, 陈露, 蒋芳芹. 层析分离-原子吸收法测定麻叶千里光有机态和无机态中微量元素硒[J]. *广东微量元素科学*, 2008, 15(7):39-43. Gao Shu-yun, Chen Lu, Jiang Fang-qin. The column chromatographic separation and determination of trace element selenium in organic and inorganic of *Senecio cannabifolius* Less [J]. *Trace Elements Science*, 2008, 15(7):39-43.
- [21] 方勇. 外源硒在水稻籽中的生物强化和化学形态研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010. Fang Yong. Studies on selenium biofortification and chemical speciation in rice grain [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.

Comparison of Extraction Technologies for Selenoproteins from Plant

LIANG Pan-xia, LIU Yong-xian*

(1. Resources and Environment Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: Selenium (Se) is an essential trace element in many organisms, its biological function is mainly in the form of selenoproteins performance, plant selenoproteins can antioxidant, anti-cancer, enhance immunity. Review of the existing forms of selenium in plants, selenoproteins classification and extraction method selenoproteins and propose future research directions. 21 refs.

Keywords: Selenium; selenoproteins; extraction; plant

Biography: LIANG Pan-xia, female, born in 1979, Ph.D., assistant researcher, plant physiology and biochemistry of soil environmental biotechnology.