

研究简报

富硒螺旋藻中硒的有机化及其分布特性

李志勇¹ 龚华斐²

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

BIO-TRANSFORMATION AND DISTRIBUTION OF THE SELENIUM IN SELENIUM-ENRICHED SPIRULINA

LI Zhi-Yong¹ and GONG Hua-Fei²

(1. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240;

2. School of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

关键词: 硒; 螺旋藻; 有机化

Key words: Selenium; *Spirulina*; Bio-transformation

中图分类号: Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)04-0440-003

作者已对螺旋藻生物富集硒和铬(Ⅲ)的条件及相关技术进行了详细研究^[1,2]。本文重点针对目前富硒产品中最重要的硒有机化程度与具体分布两个问题进行了研究,以期有机硒保健产品的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 富硒螺旋藻胶囊制备 根据文献方法^[3],在江苏省农业科学研究院于 1999 年 8 月采用 6×20m 的敞开式跑道池培养钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)。藻种由南京永康微藻有限公司提供。在传统培养液中添加亚硒酸钠生产,未添加的作为参照。喷雾干燥后制成胶囊。

1.2 蛋白质提取 蛋白质总含量用凯氏定氮法测定^[4]。采用 0.1mol/L 的磷酸缓冲液(PBS, pH=7.0)液氮冻融,30%—70%硫酸铵沉淀的方法提取。用 Sephadex G-100 (16×50cm)层析柱以 0.5mL/s 的流速用 0.1mol/L PBS(pH=7.0)洗脱得蛋白质,对蒸馏水透析后用聚乙二醇($M_r=20000$)浓缩,冷冻干燥得到纯化的蛋白质。

1.3 多糖提取 热水抽提 2—3 次,每次 3h。Savage 法去蛋白质直到氯仿-丁醇不再沉淀出蛋白为止,离心分离得上清液。用 5 倍体积的工业酒精以及适量的乙酸钠沉淀 24h,离心分离,用无水乙醇洗涤,烘干冷藏。粗样品用 Sephadex G-50(2.0×92cm)层析柱分离,洗脱液为 0.1mol/L 的 NaCl 溶

液,流速为 15mL/h。

1.4 脂类 用室温下异丙醇浸泡 24h,离心得分离物,接着用 1:1(V/V)的氯仿-异丙醇浸泡 48h,离心,残余物再浸泡 24h,离心,合并得上清液。60℃下减压浓缩得固体残余物。在 3.5×15cm 的硅胶柱上先用氯仿把中性脂洗脱下来,再用甲醇洗脱极性脂,流速 15mL/h,然后再减压浓缩得成品^[5]。以上各种成分的分离提取均设三个平行样。

1.5 富硒螺旋藻总硒含量以及蛋白质、多糖、脂类中含硒量的测定 将藻粉或所制得的蛋白质、多糖、脂类样品用硝酸、高氯酸 60℃加热消化完全,再用 15%的盐酸使六价硒完全还原成四价硒。采用 850 型荧光光度计(上海第三分析仪器厂)测定硒含量^[4]。取三次测定的平均值。

1.6 硒的价态和含量分析 取在 65℃下烘干至恒重的富硒螺旋藻粉 0.5g,加适量水充分浸取,取 20mL 浸取液按照 1.5 方法测定四价硒;同样取上述的浸取液 20mL,加盐酸至盐酸浓度为 15%,在石棉网上加热回流 15min,冷却后按照 1.5 方法测定得到四价和六价硒的总量,减去四价硒的量即为六价硒的量。测定总硒,减去四价、六价硒即为有机硒含量。

2 结果与讨论

2.1 蛋白蛋、多糖、脂类的分离提取

采用冻融法提取富硒螺旋藻与普通螺旋藻中水溶性蛋

收稿日期:2002-02-10;修订日期:2002-05-30

基金项目:上海市博士后科研基金项目

作者简介:李志勇(1969—),男,河南省潢川县人;博士,副教授;研究方向:海洋生物技术、功能性食品,目前主要从事海洋微生物方面的研究。zyli@sjtu.edu.cn

白质,提取率基本一样,约占藻粉重量的 30%—31%。研究证实增加冻融次数有利于提高蛋白质的提取效率。实验还对比了机械破壁法的提取效果,结果比冻融法的平均提取率约降低 3%—6%。可见冻融法的效果要好于机械破壁法。

富硒螺旋藻与普通螺旋藻中多糖的平均提取率相差不大,基本都在 9%左右。同样条件下富硒螺旋藻的脂类提取率都低于普通螺旋藻,前者为 11%,后者为 13%。这可能是富硒螺旋藻中脂类含量比普通螺旋藻低的缘故,这可能是硒的介入改变了脂类的代谢途径,具体机理有待深入研究。对比实验证实,采用的氯仿-异丙醇抽提的方法要优于传统的仅用氯仿-丁醇的抽提方法,平均提取率约增加 2%—4%。

2.2 硒的有机化

硒价态分析结果表明,富硒螺旋藻中硒主要以有机态硒以及无机的四价和六价硒的形式存在(表 1),前者占总硒的 85.13%,其次为四价硒占 13.7%。由此看出,富硒螺旋藻中硒的有机化程度非常高。根据该结果可以认为培养液里添加的无机硒在螺旋藻培养过程中大多数实现了生物转化,转化成了有机形式的硒。

表 1 富硒螺旋藻中硒价态分布

Tab.1 The different Se forms in Se-enriched <i>S. platensis</i>		
	Se content (mg/kg)	Percent (%)
Se (IV)	0.94	13.70
Se (VI)	0.08	1.17
Organic Se	5.84	85.13

2.3 硒的分布特性

经分析富硒螺旋藻与普通螺旋藻中的总硒含量分别为 6.86mg/kg 和 0.26mg/kg,前者是后者的 26.38 倍,可见螺旋藻对硒的吸收效率是比较高的。分别测定 2.1 中提取的各有机组分的硒含量与具体分布情况,结果如下。

2.3.1 硒与蛋白质、多糖、脂类的结合 由表 2 可知,螺旋藻体内的生物大分子结合硒的能力从大到小依次为脂类、水溶性蛋白质、多糖。但从结合硒的总量的角度,根据文献^[5]对于钝顶螺旋藻而言,水溶性蛋白占总蛋白的比例约为 42.63%。由此可以估算到富硒样品中总蛋白质结合硒的能力约为 7.25mg/kg。凯氏定氮法测得富硒螺旋藻样品的总蛋白质含量约为 560g/kg,由此可知,总蛋白质结合的硒约占总

表 2 水溶性蛋白质、多糖、脂类中的含硒量(mg/kg)

Se in water-soluble proteins		Se in polysaccharides		Se in lipids	
Se sample	Control	Se sample	Control	Se sample	Control
3.09	0.02	1.51	0.00	6.47	0.02

硒的 59.18。可见,富硒螺旋藻中有机硒主要是以蛋白质结合的形式存在。其次为脂类-硒和多糖-硒。

2.3.2 硒在水溶性蛋白质、多糖、脂类各组分中的具体分布 从螺旋藻中提取的水溶性蛋白经过 Sephadex G-100 柱层析,得到图 1 中从左至右三个组分 A、B 和 C。根据紫外可见光谱检测分析,组分 A 是叶绿素结合蛋白质,组分 B 的特征吸收峰是藻蓝蛋白质,组分 C 是无色蛋白质,可能是一些分子量较小的多肽。这三个组分中的硒含量依次为 5.47mg/kg, 2.36mg/kg 和 1.03mg/kg。可见蛋白质中硒主要与叶绿素结

合蛋白质结合,其次是与藻蓝蛋白小分子量的多肽。

图 2 显示螺旋藻多糖主要可分为两部分,从左至右为 A 和 B,硒结合能力分别为 2.60mg/kg 和 3.26mg/kg。此外,一些单糖和其他小分子糖上也结合有少量的硒。

经过硅胶纯化所取得的中性脂和极性脂的含硒量分别为 9.50mg/kg 和 3.45mg/kg。可以看出,极性脂的含硒量远远超过中性脂。

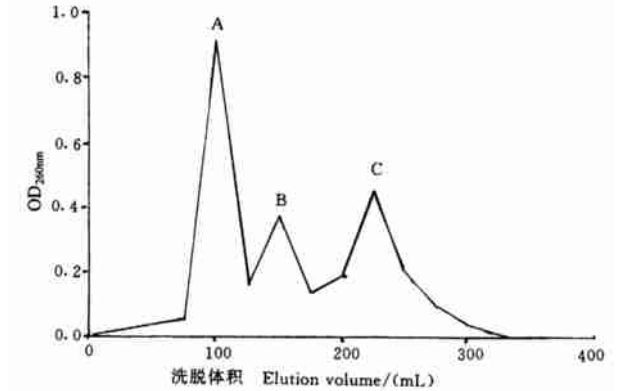


图 1 蛋白质组分洗脱图

Fig.1 The elution curve of proteins

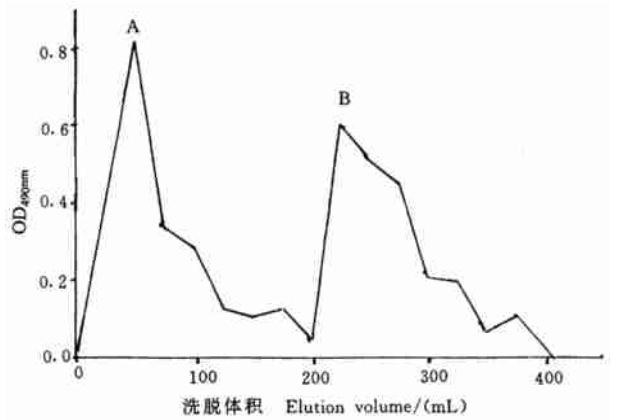


图 2 多糖组分洗脱图

Fig.2 The elution curve of polysaccharides

2.4 硒有机化的可能机制

从富硒螺旋藻含硒量、价态及其分布特性可知, 硒主要和螺旋藻中的蛋白质结合, 其次为脂类和多糖。通过与这些或其他生物配体结合, 总硒的 85.13% 实现了生物转化, 从无机形式转化成了有机形式。

蛋白质含硒量约占总硒的 59.18%, 是硒的主要结合位。其中硒又主要是与叶绿素结合蛋白结合。在相当多的情况下, 硒在植物或微生物中的代谢基本上是沿着硫代谢的途径进行。硒可以通过取代含硫氨基酸, 如半胱氨酸的巯基以及甲硫氨酸中的甲硫基中的硫生成硒代氨基酸, 从而形成含硒的多肽和蛋白质。目前硒原子被结合于硒代氨基酸的机理还不是非常清楚。

螺旋藻含硒多糖主要集中在细胞壁以及其周围, 可以推测硒主要通过细胞壁的肽聚糖而被螺旋藻多糖吸收。这可能是因为细胞壁附近的氧化环境使多糖-金属离子-亚硒酸根离子容易生成配合物。硒也可能取代多糖结构中的硫, 以糖苷键的形式与多糖结合。

基于硒主要与极性脂结合的实验结果, 由此可认为, 硒偏向于以离子的形态与脂类结合。途径可能是通过脂类中的双键或三键与硒结合。在实验中, 作者发现富硒螺旋藻的脂类含量明显低于普通螺旋藻, 这可能是由于硒的积聚对脂类的合成产生了轻微抑制的缘故。具体机制需要进一步研究证实。

致谢: 本研究是在上海市科委博士后基金的支持下完成的, 特此致谢。感谢江苏省农业科学研究院土肥所常知州副

教授等为富硒螺旋藻样品生产所提供的帮助; 同时也感谢华东理工大学生物工程学院王永红、李元广、沈国敏等老师对实验进行给予的一些建议和实验条件上的帮助。

参考文献:

- [1] Li Z Y, Guo S Y, Li L. A study of the Se-rich cultivation technology of *Spirulina platensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(4): 386—391. [李志勇, 郭祀远, 李琳. 富硒螺旋藻培养技术研究. 水生生物学报. 2001, **25**(4): 386—391]
- [2] Li ZY, Li Y G, Guo S Y et al. Study of the factors of Cr (Ⅲ) bioaccumulation on *Spirulina Platensis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, **16**(1): 108—112. [李志勇, 李元广, 郭祀远等. 钝顶螺旋藻生物富集 Cr (Ⅲ) 影响因素的研究. 生物工程学报. 2000, **16**(1): 108—112]
- [3] Li ZY. Mechanism and technology of *Spirulina*'s bioaccumulation and cultivation with magnetic treatment [D]. Doctoral degree thesis, South China University of Technology, Guangzhou, 1998. [李志勇. 螺旋藻的生物高富集与磁处理培养技术及其机理. 华南理工大学博士学位论文, 广州, 1998]
- [4] Mi X, Niu W M. Quality analysis of health food [M]. Nanjing: Jiangsu Science & Technology Press, 2000. [必晓黎, 钮伟民. 保健食品质量分析技术. 南京: 江苏科学技术出版社, 2000]
- [5] Zhou Z G Li PF, Liu Z L. Studies of Se binding to three kinds *Spirulina* and its proteins, polysaccharides and lipids [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*. 1997, **28**(4): 363—370. [周志刚, 李朋富, 刘志礼. 三种螺旋藻及其蛋白质、多糖和脂类结合硒的研究. 海洋与湖沼. 1997, **28**(4): 363—370]