

富硒螺旋藻、酵母、平菇的培养及其含硒蛋白的提取分离纯化

赵雪梅^① 张正钊 郭静成
(山东农业大学食科系) (生物学院)

摘 要 用含不同浓度硒的 Zarrouk 培养液培养螺旋藻,用含不同浓度硒的豆芽汁葡萄糖培养酵母、并用含不同浓度硒的棉子皮培养基培养平菇。试验结果表明:在适宜的培养条件下,螺旋藻、酵母及平菇生长最适宜硒浓度分别为 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 硒富集系数分别为 19.2, 14.4 和 22.6。将 3 种植物的蛋白质提出,经柱层析及电泳分离,分别得到多种含硒蛋白。试验证明,3 种植物吸收的硒绝大部分都转化为含硒蛋白。

关键词 硒; 螺旋藻; 酵母; 平菇; 硒蛋白

中图分类号 O657.32

The Culture of Spirillum Yeast and Mushroom High in Selenium and Fractionation Purification of Their Selenoprotein

Zhao Xuemei Zhan Zhengfang Guo Jingcheng
(Dept. of Food Science, Shandong Agricultural University) (College of Biological Science)

Abstract The optimal concentration of Na_2SeO_3 respectively for spirillum, yeast and mushroom cultivation was $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The eutrophication coefficient of selenium was 19.2, 14.4 and 22.6. Selenoproteins in spirillum, yeast and mushroom. When three kind of protein were frationated using polyacrylamide gel electrophoresis and sephadex G-150 gel chromatography, they were purified. The result shows the majority of celenium that was absorbed by three microbes can be tranformed to the celenium-content protein.

Key words slenium; selenoprotein; spilillum; yeast; mushroom

硒是动植物、微生物营养中重要的微量元素,自 1817 年瑞典化学家 J. J. Berlins 和 J. G. Ganin 发现以来,一直倍受重视,人们经过近 40 多年来深入研究^[1,2],证实硒主要有提高机体免疫能力,抑制肿瘤,延缓衰老,降低某些重金属毒性的生理功能。1973 年联合国卫生组织正式宣布硒是动物体的必需元素。针对目前人类普遍缺硒的现状,补硒是人类防病治疗维护健康的重要措施。研究指出,以无机硒作为硒源^[3]补充硒营养不足,除存在一定的毒性

收稿日期: 1996-01-04

①赵雪梅,山东农业大学食科系,泰安,271018

外其生物利用率也低。有机态硒更有利于机体吸收利用,生物活性较高而毒性明显降低^[4,5]。生物体内有机态硒主要以硒蛋白形式存在。目前国内外对动物硒蛋白的提取分离纯化及其生理功能等方面的研究较多,而对植物硒蛋白研究很少尚未见文献报导,本实验主要对螺旋藻、酵母、平菇为材料,探索植物硒蛋白的提取分离及纯化方法,并探索培养富硒螺旋藻、酵母、平菇的最适硒浓度。

1 材料与方法

1.1 材料

所用试验植物为钝顶螺旋藻(Spirillum)酵母(yeast)平菇(Mushroom)。螺旋藻用 Zarrouk 氏培养液培养,酵母用豆芽汁葡萄糖培养液,平菇用棉子皮培养基,除对照组外,均加入不同浓度的亚硒酸钠(Na_2SeO_3),经过一定时间培养后,收集样品,洗涤数遍除去游离的亚硒酸钠,备分析用。

1.2 方法

1.2.1 柱层析及电泳样品制备 取试验材料 6 g 置细胞匀浆器(或研钵)中,加入 3 mL $0.125\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液(样品提取液),研成匀浆,15 000 $\times g$ 离心 20 min,上清液于 4℃ 透析 48 h,聚乙二醇浓缩,备用。

1.2.2 柱层析分离纯化 (1)DEAE-纤维素柱层析分离,层析柱规格为 $2\times 30\text{ cm}^3$,加样后分别用 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH6.0)和 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液(pH6.0)进行梯度洗脱,洗脱速度为 20 mL/h 分部收集洗脱液,备用。(2)Sephadex G-150 凝胶柱层析分离。柱体积为 $1.5\times 50\text{ cm}^3$,上样后用 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH6.0 磷酸缓冲液洗脱,洗脱速度为 1.0 mL/min,分部收集洗脱液备用。

1.2.3 电泳分离纯化 (1)聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(PAGE)。浓缩胶为 2.5%,分离胶为 7.0%,电泳后用考马斯亮兰 R-250(CBBR-250)染色。(2)5%~10%PAGE 梯度电泳分离。按 Ornstein-Davis 系统^[6],胶厚 3 mm 用 CBBR-250 染色。

1.2.4 硒含量测定 (1)样品制备,准确称取干样品置 50 mL 烧杯中,加入 10 mL 优级纯混合酸(浓硝酸:高氯酸=4:1),置电热砂盘上缓慢加热(200~300℃)消化至清亮,稍冷,加入 10 mL 浓盐酸继续加热煮沸 5~10 min,冷却,定容至 25 mL 待测。(2)硒含量测定,采用日本 SAS-727 型原子吸收分光光度计测定。

2 试验结果

2.1 不同浓度硒处理下螺旋藻、酵母及平菇生长情况比较

螺旋藻用不同含硒量的 Zarrouk 溶液培养,其生长速度、含硒量及硒富集倍数见表 1。表 1 说明,培养液硒含量为 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时生长最好,硒富集倍数最高,为 19.2。酵母用含不同硒浓度的豆芽汁葡萄糖培养液培养,当菌体繁殖出一定密度时离心收集。其生长量、硒含量、硒富集倍数见表 2、表 2 说明,当硒为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时生长最佳,硒富集倍数最好为 14.4。

表 1 不同浓度亚硒酸钠处理下螺旋藻的生长情况

处 理	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	鲜重 [*] /g	样品中硒含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	利用系数
CK	0	0.174	0.883	—
1	10	0.264	83.040	8.3
2	20	0.254	298.031	14.9
3	30	0.841	327.586	10.9
4	40	0.845	506.347	12.7
5	50	0.718	663.928	13.3
6	60	0.975	1150.205	19.2
7	70	0.225	582.000	8.3
8	80	0.218	1016.743	12.7
9	100	0.313	798.722	8.0

* 为 1 000 mL 培养液中收获的螺旋藻量

表 2 不同浓度亚硒酸钠处理下酵母的生长情况

处 理	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	鲜重 [*] /g	样品中硒含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	利用系数
CK	0	0.429	0.482	—
1	2	0.400	14.739	7.4
2	4	0.405	35.415	8.9
3	8	0.408	81.296	10.2
4	10	0.432	140.421	14.4
5	12	0.406	119.313	9.9
6	16	0.408	150.176	9.4

* 为 100 mL 培养液中收获的酵母量

表 3 为平菇生长情况,在本试验中,平菇对硒的吸收、生长及硒富集倍数与培养基中的硒浓度正相关。

表 3 不同浓度亚硒酸钠处理下平菇的生长情况

处 理	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	鲜重 [*] /g	样品中硒含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	利用系数
CK	0	82.3	0.464	—
1	25	101.1	104.800	4.2
2	50	100.6	275.495	5.5
3	100	93.2	1412.310	14.1
4	200	108.9	4525.780	22.6

* 为 500 克培养基收获的平菇量

2.2 不同浓度硒处理下供试材料中不同组分的含硒量

取一定量的供试材料置研钵中,加一定量的样品提取液研磨抽提,离心,所得沉淀为细胞残渣部分。上清液中加入等体积的冷丙沉淀蛋白质,离心,得蛋白组分和上清液,3 部分分别消化后用原子吸收法测硒含量,各部分的硒含量见表 4。表 4 说明上清液及残渣中含均有一定量的硒,但以蛋白质中含硒最多,说明已形成了大量的硒蛋白。

表4 三种供试材料中不同组分的含硒量比较

样品	蛋白中硒浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	上清液中硒量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞残渣中硒含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
螺旋藻培养在含硒量为 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Zarrouk 溶液中	286.533	0.438	71.471
酵母培养在含硒量为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的豆芽汁葡萄糖溶液中	49.324	0.337	27.565
蘑菇培养在含硒量为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 棉子皮培养基中	101.556	0.011 4	6.204

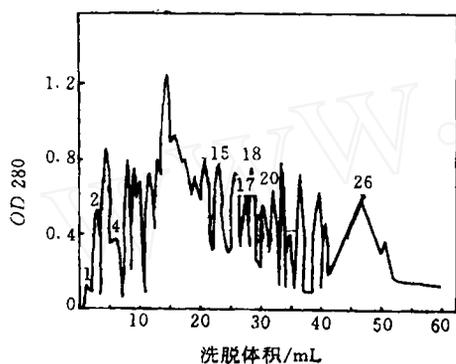


图1 DEAE-纤维素离子交换层析分离纯化螺旋藻中硒蛋白峰图谱

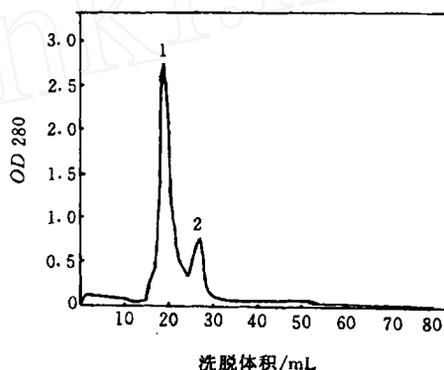


图2 Sephadex G-150 凝胶层析分离纯化螺旋藻中硒蛋白(数字所示)图谱

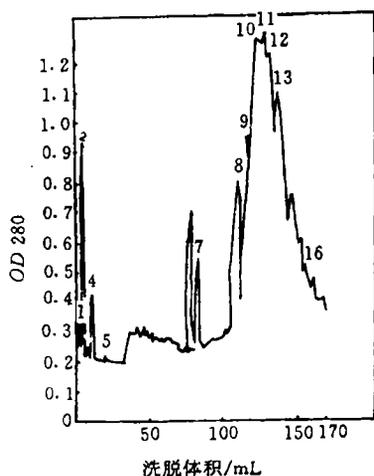


图3 Sephadex G-150 凝胶层析分离纯化酵母中硒蛋白(数字所示)图谱

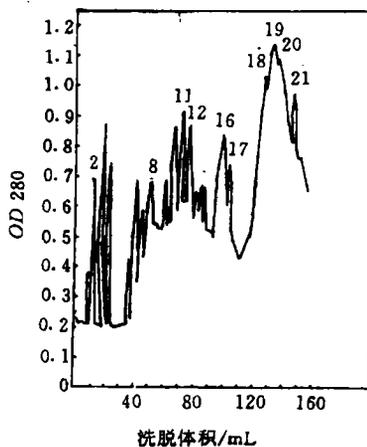


图4 Sephadex G-150 凝胶层析分离纯化平菇中硒蛋白(数字所示)图谱

2.3 柱层析分离纯化硒蛋白

我们用 DEAE-纤维素离子交换柱层析及 Sephadex G-150 凝胶柱层析分离纯化硒蛋白的结果见图 1, 2, 3, 4。图 1 说明, 在洗脱体积 15~30 mL 之间出现两个洗脱峰, 均为含硒蛋白。图 2 说明, 在 60 mL 洗脱体积之内出现 27 个洗脱峰, 其中峰 1, 2, 4, 15, 17, 18, 20, 26 为蛋白峰。图 3 说明, 在 170 mL 洗脱体积之内出现 18 个洗脱峰, 其中峰 1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16 为含硒蛋白峰。图 4 说明, 在 160 mL 洗脱体积之内共出现 21 个洗脱峰, 其中峰 2, 8, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21 为含硒蛋白峰。

2.4 螺旋藻、酵母及平菇中蛋白质的电泳分离

图 5-A 为螺旋藻蛋白电泳图。电泳后, 将电泳胶带依次切下, 经浓硝酸高氯酸消化后用原子吸收分光光度计测硒, 发现 S_1, S_2, S_3, S_4 为含硒蛋白带。图 5-B 为酵母蛋白电泳图, 其中 Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 为含硒蛋白带。图 5-C 为平菇蛋白电泳图, 其中 C_1, C_2, C_3, C_4 为含硒蛋白带。

3 结果讨论

含硒螺旋藻、酵母及平菇在市场上已有出售, 在报刊杂志上也有广告宣传, 但在学术刊物上详细报导其硒蛋白的含量及种类的尚少, 通过本研究可初步得出以下几点印象: (1) 经分析可知, 用不同浓度硒培养螺旋藻、酵母及平菇等 3 种植物, 进入机体内的无机硒(亚硒酸钠)大部分的硒蛋白形式存在。

(2) 根据柱层析及电泳分析结果证实, 3 种植物中均存在多种硒蛋白组分。(3) 用适宜浓度无机硒培养螺旋藻、酵母及平菇是大量获取有机硒化物的较好方法, 因为这 3 种植物均可工业化生产, 且繁殖快产量高成本低。

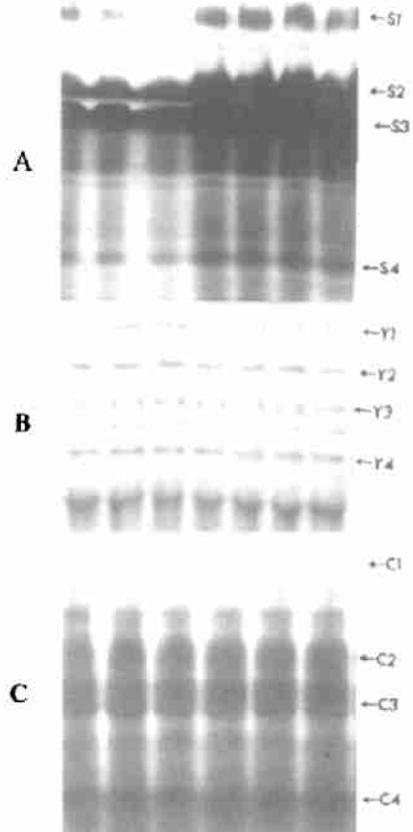


图 5 蛋白电泳图

参 考 文 献

- 1 Rosenfeld I, Beath O A. Selenium geobotany, biochemistry, toxicity and butrition. Academic Press, New york, 1964.411
- 2 张天锡等. 人体硒代谢与疾病. 微量元素, 1983, (3): 1~4
- 3 杨光圻等. 补充硒预防克山病的途径和方法的研究. 营养学报, 1982, 4(1): 1~7
- 4 杨泳元, 杜宝珍. 陕西省粮田作物含硒量及农作物喷硒提高粮食硒含量的试验研究. 中国环境科学, 1982, (3): 41~46
- 5 谢丽琪等. 酵母同化无机硒作用的研究. 微生物学报, 1990, 30(1): 36~40
- 6 哈密斯 B D 等著. 刘毓秀等译. 蛋白质凝胶电泳实验方法. 北京: 科学出版社, 1986: 18~30