

# 硒在香菇体内的生物转化及硒蛋白的生物活性\*

孙中涛 王汉忠 孙凤鸣 姚良同

(山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

**摘 要** 采用香菇深层发酵对无机元素硒进行富集和转化, 获得了硒含量为  $225 \mu\text{g/g}$  的香菇菌丝体。硒参与蛋白质、多糖等大分子物质的合成, 被转化为有机硒, 有机化程度为 72.9%, 其中 68.2% 以硒蛋白的形式存在。硒对氨基酸和蛋白质的合成具有促进作用, 其含量分别比对照提高 15.96% 和 18.3%。与无机硒相比, 硒蛋白吸收利用率高, 生物活性强, 饲喂硒蛋白的大鼠体内硒水平和 GSH-Px 活性明显较高。将硒蛋白提取出来, 取代亚硒酸钠等无机硒作为补硒功能性食品或药品的基料, 具有广阔的开发前景。

**关键词** 香菇, 硒蛋白, 生物活性

硒(Se)是人体必需的微量营养元素, 具有重要的生理功能<sup>[2]</sup>, 补硒已成为营养学家关注的焦点之一<sup>[1~3]</sup>。

香菇菌丝体对无机硒具有较强的富集和转化作用<sup>[4]</sup>, 硒在香菇菌丝体内以与蛋白质、多肽等有机物相结合的状态存在, 称为生物源有机硒, 人体对其吸收利用率高, 生理、药理功能优于一般有机硒和无机硒, 无毒副作用, 是人体的最佳硒来源。

文中对硒在香菇菌丝体内的富集、转化与分布进行了研究, 对富硒香菇菌丝体的主要有效成分硒蛋白进行了初步分离提纯, 并对其保健功能进行了研究, 为硒蛋白在功能性食品基料和补硒药品中的开发应用奠定了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 种

香菇 L13, 由山东农业大学微生物学系菌种中心提供。

#### 1.1.2 主要试剂

亚硒酸钠: 用蒸馏水配制成含硒  $1 \text{ mg/mL}$  的溶液, 用 HCl 调 pH 值 6.5, 高压灭菌

备用。

#### 1.1.3 培养基

斜面培养基: PDA 培养基; 发酵培养基(%) : 葡萄糖 2, 蔗糖 2, 酵母粉 1, 玉米粉 2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.25, NaCl 0.1,  $\text{MgSO}_4$  0.1,  $\text{CaCO}_3$  0.02,  $\text{ZnCl}_2$  0.007,  $\text{CaCl}_2$  0.004,  $\text{MnSO}_4$  0.001,  $\text{V}_{\text{B}_1}$ 、 $\text{V}_{\text{B}_2}$  各 0.005, pH 5~6。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 富硒香菇菌丝体的制备

将香菇 L13 在硒含量  $10 \mu\text{g/mL}$  的发酵培养基中发酵培养, 装液量  $100 \text{ mL}/250 \text{ mL}$  三角瓶, 发酵条件为  $25^\circ\text{C}$ 、 $100 \text{ r/min}$ 、10 d, 然后将三角瓶菌种转接入 10 L 发酵罐,  $25^\circ\text{C}$ 、1:0.8 vvm 进行发酵, 接种量为 10%, 发酵 168 h 后, 发酵液 pH 值降至 3.2 时, 结束发酵。发酵液  $3500 \text{ g}$  离心 15 min 获得菌丝体, 用去离子水反复冲洗和再离心, 直至测定最后一次水洗液无无机硒为止。菌丝体经冷冻干燥后研磨即得富硒香菇菌丝粉,  $4^\circ\text{C}$  下保存备用。

### 1.2.2 硒蛋白的提取

将富硒香菇菌丝粉加 10 倍体积的含有 1% Triton X-100、 $0.02 \text{ mol/L}$   $\text{MgCl}_2$ 、pH 8.6 的  $0.05 \text{ mol/L}$  Tris-HCl 缓冲液,  $4^\circ\text{C}$  下静置

第一作者: 硕士, 讲师(王汉忠为本文通讯作者)。

\* 山东省教委科研基金项目(No. J00K52)

收稿时间 2003-01-02

24 h, 80 MPa 高压均质破壁, 搅拌提取 3 h, 静置 24 h, 10 000 g 离心 15 min, 然后边搅拌边向上清液中加入固体  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至 90% 的饱和度, 4℃ 静置过夜, 15 000 g 离心 15 min, 收集沉淀, 用少量缓冲液溶解, 在蒸馏水中透析除去  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 收集蛋白质溶液, 冷冻干燥 4℃ 下保存备用。

### 1.2.3 硒蛋白生物活性的动物实验

将 30 只发育良好, 体重均匀的雄性成年鼠分为饲喂基础饲料(组成为: 豆粉 40%, 玉米粉 40%, 麸皮 14%, 混合盐 5%、混合维生素 1%。含硒量  $< 0.01 \mu\text{g/g}$ ) 基础饲料加亚硒酸钠(含硒量为  $3.31 \mu\text{g/g}$ ) 基础饲料加硒蛋白(含硒量为  $3.22 \mu\text{g/g}$ ) 3 组, 每组 10 只。实验共 60 d, 实验期间实验鼠足量饲喂, 自由摄食, 但只提供蒸馏水。30 d 后, 测每组实验鼠体重及硒的摄入量, 收集实验鼠 48 h 的排泄物并测定硒含量。60 d 后采集实验鼠的血液和肝组织, 分别测定硒含量和 GSH-Px 的活性。

### 1.2.4 分析测定方法

总硒含量的测定 称取定量样品, 用硝酸和高氯酸  $V(\text{HNO}_3): V(\text{HClO}_4) = 1:4$  消化后, 以二氨基联苯胺为显色剂, 采用分光光度法测定<sup>[5]</sup>。

无机硒含量的测定 样品不经消化处理, 研碎后放入蒸馏水中小火煮沸 30 min, 抽滤得到滤液, 然后按总硒含量的测定方法进行

测定。

有机硒含量的计算:

有机硒含量 = 总硒含量 - 无机硒含量

蛋白质的测定 凯氏定氮法。

氨基酸的测定 样品水解后用氨基酸自动分析仪分析。

GSH-Px 活性测定 DNTB 比色法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 香菇对硒的富集与转化

从表 1 可以看出, 香菇对硒有较强的富集能力, 随着培养基硒含量的增加, 菌丝体总硒含量增加, 但生物量有所降低。在培养基硒含量达  $10 \mu\text{g/mL}$  时, 仍有较高的生物量; 达  $50 \mu\text{g/mL}$  时, 香菇菌丝体的生长受到强烈抑制; 为  $10 \mu\text{g/mL}$  时, 香菇菌丝体内有机硒含量高达  $164 \mu\text{g/g}$ , 硒的有机化程度为 72.9%, 这说明硒进入香菇菌丝体后, 并不是被简单的吸附, 而是参与了蛋白质等大分子物质的合成代谢, 被转化为有机硒。同时, 随着培养基硒含量的增加, 硒的有机化程度降低, 这说明香菇对硒的转化能力有一定限度, 当环境硒浓度过高时, 不但生长受到抑制, 而且进入香菇体内被简单吸附的硒数量相对增加, 参与合成代谢转化为有机硒的数量相对减少, 硒源质量降低。综合考虑生物量、菌丝体总硒含量、硒的有机化程度等指标,  $10 \mu\text{g/mL}$  为最佳硒添加量。

表 1 香菇对硒的富集与转化

培养基含硒量	生物量(干重)	菌丝体总硒含量	有机硒含量	硒的有机化程度	总硒含量	硒富集回收率
$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$\%$	提高倍数	$\%$
CK(0)	12.60	1.9	1.7	89.5	—	—
5	1.058	55	42	76.4	28.9	11.6
10	10.25	225	164	72.9	118.4	23.0
50	4.56	640	198	30.9	336.8	5.8

### 2.2 富硒香菇菌丝体蛋白质含量和氨基酸组成分析

由表 2 和表 3 可知, 富硒香菇菌丝体的总蛋白含量和可溶性蛋白含量均高于对照组, 但培养基硒浓度过高时, 可溶性蛋白和总

蛋白含量均有所降低。培养基含硒量为  $10 \mu\text{g/mL}$  时, 菌丝体总蛋白含量高达  $254.6 \text{ mg/g}$ , 比对照提高 18.3%, 可溶性蛋白提取量为  $91.0 \text{ mg/g}$ , 收得率为 35.7%, 菌丝体的 16 种氨基酸含量均比对照有所提高, 其中

Lys 和 Arg 提高最为显著,分别比对照提高 26.94%、96.80%;氨基酸总量达 270.73 mg/g,比对照提高了 15.96%,其中人体必需氨基酸总量比对照提高 16.44%。由此可见,硒在香菇菌丝体内富集转化的同时,参与合成代谢,促进了氨基酸和蛋白质合成,提高了菌丝体的氨基酸和蛋白质含量,但培养基硒浓度过高时,这种促进作用反而减弱,甚至抑制氨基酸和蛋白质合成,这可能是无机硒的毒害作用所致。

表 2 富硒香菇菌丝体蛋白质含量

培养基硒含量	可溶性蛋白	菌丝体总蛋白	收得率
$/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$/\%$
CK(0)	74.0	215.1	34.4
5	80.1	231.3	34.6
10	91.0	254.6	35.7
50	76.7	216.0	35.5

表 3 富硒香菇菌丝体的氨基酸组成

氨基酸	CK $/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	富硒菌丝体 $/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	提高 $/\%$
Val	22.50	25.02	11.20
Ile	13.85	16.21	17.04
Phe	13.54	15.60	15.21
Thr	12.44	14.56	17.04
Lys	11.32	14.37	26.94
Leu	20.67	23.87	15.48
Glu	28.75	31.34	9.08
Asp	28.34	31.78	12.14
His	6.43	7.59	18.04
Cys	8.76	10.54	20.30
Ser	14.34	15.57	8.57
Arg	5.32	10.47	96.80
Gly	12.36	13.75	11.25
Ala	14.54	17.05	17.26
Pro	9.64	11.73	21.68
Tyr	10.67	11.28	5.72
总量	233.47	270.73	15.96

注:Try、Met 含量未进行测定。

### 2.3 富硒香菇菌丝体内有机硒的分布

由表 4 可知,硒在香菇菌丝体内主要分布在蛋白质中,占菌丝体有机硒总量的 68.2%,所以,硒蛋白是富硒香菇菌丝体的主要功能性成分,提取精制后,可以作为补硒功能性食品或药品的基料。据文献报道,硒主要是以硒蛋氨酸和硒半胱氨酸的形式参与蛋白质合成<sup>[7]</sup>。另外,有 9.7% 的有机硒分布在硒多糖中,但文献中鲜有关于硒与多糖结

合的报道,在多糖的提取过程中,蛋白质去除得是否彻底,是否还有其他杂质存在,硒是与多糖结合还是与多糖纯化精制过程中未能除尽的蛋白质等杂质相结合,值得进一步研究。

表 4 香菇菌丝体内有机硒的分布

	菌丝体 总有机硒	硒蛋白中 有机硒	硒多糖中 有机硒	其他成分中 有机硒
硒含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	164	111.8	15.9	36.7
占总有机硒的 百分含量/ $\%$	100	68.2	9.7	22.3

### 2.4 饲料硒对大鼠血及肝硒水平和 GSH-Px 活性的影响

由表 5 可知,饲喂亚硒酸钠和硒蛋白的 2 组大鼠血与肝硒水平和 GSH-Px 活性明显比对照组高。而且,饲喂硒蛋白的大鼠与饲喂亚硒酸钠的大鼠相比血与肝硒含量分别提高 86% 和 70.6%,血与肝 GSH-Px 活性分别提高 12.4% 和 13.2%。这说明,硒蛋白的吸收利用率和生物活性均高于亚硒酸钠,具有较好的补硒效果。

表 5 饲料硒对大鼠血及肝 GSH-Px 活性和硒水平的影响

处 理	硒含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		GSH-Px 活性 $/\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{g})^{-1}$	
	血	肝	血	肝
基础饲料	0.039	0.041	62.31	67.89
基础饲料加亚硒酸钠	0.721	0.915	531.24	768.36
基础饲料加硒蛋白	1.343	1.561	597.35	869.54

### 2.5 饲料硒在大鼠体内的存留率

表 6 表明,硒蛋白中有机硒在大鼠体内的存留率比亚硒酸钠中无机硒的存留率高 12.93%。硒在体内的代谢十分复杂,在体内的存留率虽然不能全面反映大鼠对硒的吸收与利用情况,但从某种意义上可以反映出大鼠对生物源有机硒的吸收利用率优于无机硒。

表 6 饲料硒在大鼠体内的存留率

处 理	摄入硒	尿与粪硒	存留率
	$/\mu\text{g}$	$/\mu\text{g}$	$/\%$
基础饲料	2.12	0.87	58.75
基础饲料加亚硒酸钠	251.16	112.22	55.32
基础饲料加硒蛋白	245.74	78.02	68.25

## 2.6 饲料硒对大鼠体重的影响

由表 7 可知,补硒对大鼠的生长有一定影响,饲喂亚硒酸钠和硒蛋白的大鼠体重分别比对照提高 10.0% 和 26.4%。而且,饲喂硒蛋白的大鼠比饲喂亚硒酸钠的大鼠体重提高 14.9%。

表 7 饲料硒对大鼠体重的影响

处 理	平均摄食量/g	平均体重/g
基础饲料	784.53	177.82
基础饲料加亚硒酸钠	763.25	195.56
基础饲料加硒蛋白	874.66	224.75

## 3 结 论

香菇菌丝体对硒具有较强的富集能力,培养基础含量为  $10 \mu\text{g/mL}$  时,香菇菌丝体硒含量可达  $225 \mu\text{g/g}$ 。硒在香菇菌丝体内并非被简单吸附,而是参与蛋白质、多糖等大分子物质的合成代谢,被转化为有机硒,有机化程度为 72.9%,其中 68.2% 与蛋白质相结合,以硒蛋白的形式存在。硒对氨基酸和蛋白质的合成具有促进作用,富硒香菇菌丝体的氨基酸和蛋白质含量分别比对照提高 15.96%

和 18.3%。动物实验表明,与无机硒相比,硒蛋白吸收利用率高,生物活性强,大鼠体内硒水平和 GSH-Px 活性明显较高,大鼠强壮,体重较大。因此作为补硒材料,蛋白硒明显优于无机硒。目前补硒材料多为亚硒酸钠,不但吸收利用率低、毒性大,而且生理活性也不高。实验中将香菇菌丝体中的硒蛋白提取出来,取代亚硒酸钠等无机硒作为补硒功能性食品或药品的基料,具有重要的意义和广阔的开发前景。

## 参 考 文 献

- 1 郑建仙.功能性食品.北京:中国轻工业出版社,1997.461~482
- 2 Ge K, Yang G. Am J Clin Nutr, 1993, 57: 259
- 3 葛可佑,常素英.营养学报,1999(3):322~327
- 4 林琳,谢必峰,施巧琴.福建师范大学学报,1998(3):77~81
- 5 吴丹,王红鹰.广东微量元素科学,1998(7):66~68
- 6 曾勤,陈耿,冯池.四川卫生管理干部学院学报,1997,16(4):202~203
- 7 王世平,周玉岩,滕冰.东北农业大学学报,1997,28(4):378~383

## Study on Biotransformation of Selenium in and Bio-activity of Se-protein in *Lentinus edodes* Mycelia

Sun Zhongtao Wang Hanzhong Sun Fengming Yao Liangtong

(College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, 271018)

**ABSTRACT** Selenium was enriched and bio-converted by *Lentinus edodes* mycelium which was submerged fermented. The content of selenium in mycelium was  $225 \mu\text{g/g}$ , and its existing state was converted from inorganic substance to organic substance in the anabolism of protein and polysaccharide. The organic degree of selenium was 72.9% and 68.2% was Se-protein. Selenium can increase the biosynthesis of amino acid and protein. The content of amino acid and protein was higher than that of contrast by 15.96% and 18.3%. The absorbitivity and bio-activity of Se-protein were higher than  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . The selenium content and GSH-Px activity in the rats fed with Se-protein were higher than that in rats fed with  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Se-protein can be used as base material in functional food and medicine replacing  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  because of its high absorbitivity and bio-activity.

**Key words** *Lentinus edodes*, Se-protein, bio-activity