



遏蓝菜硒蛋白的纯化、结构表征及抗氧化活性研究

向安妮¹, 许爽¹, 鞠红梅¹, 赵诗宇¹, 岳田利^{1,2}, 袁亚宏¹

(1. 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北大学 食品科学与工程学院, 西安 710069)

摘要 为探究遏蓝菜硒蛋白的结构特征及抗氧化活性, 采用超声辅助酶提法和 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱层析法, 从遏蓝菜中提取、分离和纯化出两种硒蛋白组分(PSP-2 和 PSP-3), 运用光谱法和扫描电镜等方法对其结构进行表征, 并检测其体外抗氧化活性。结果表明: PSP-2 和 PSP-3 各含有 15 种氨基酸, 包括 6 种必需氨基酸, 两种蛋白组分氨基酸组成合理, 具有良好的营养价值; PSP-2 和 PSP-3 具有典型的蛋白光谱特征, 均存在 Se=O 键、O-Se-O 键、氢键和二硫键, 结构不稳定并呈现出聚集体及碎片的外观形貌; 抗氧化活性检测表明, PSP-2 和 PSP-3 具有较强的自由基清除能力和总还原力。综上所述, 本研究证实遏蓝菜中存在具有优良抗氧化活性的天然硒蛋白, 为进一步研究遏蓝菜硒蛋白的构效关系和开发具有抗氧化功效的产品提供了依据, 可为遏蓝菜资源的综合利用提供参考。

关键词 遏蓝菜; 硒蛋白; 分离纯化; 结构表征; 抗氧化分析

中图分类号 TS201.2

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)03-0299-11

硒是维持人体健康必需的微量营养素, 在自然界中以无机硒和有机硒两种形态存在。无机硒主要包括硒化物、硒酸盐和亚硒酸盐, 有机硒主要包括硒多糖、硒代氨基酸、硒多肽和硒蛋白等^[1]。硒的功能与其赋存形态相关, 有机硒比无机硒能更好地被人体吸收且毒性更低^[2]。硒蛋白被认为是硒生理活性发挥的主要存在形式^[3], 具有抗氧化、提高免疫力和抗肿瘤等多种功效^[4]。其中, 硒蛋白的抗氧化功效被广泛研究, 已有关于茶叶硒蛋白^[5]、平菇硒蛋白^[6]和大米硒蛋白^[7]等抗氧化活性的报道。在自然界中, 无机硒可通过植物转化为安全性好和生物利用度高的有机硒, 因此, 研究植物中的硒蛋白具有重要意义。

从植物中提取硒蛋白的常见技术包括浸提、酶水解和超声提取等。酶法提取蛋白反应条件温和, 能够避免酸碱提取蛋白带来的负面影响, 且能更多地保留蛋白质的营养价值^[8]; 超声波则能加速提取的进程^[9]。提取的蛋白常含许多小分子杂质, 为了使蛋白在分析应用中具有较高的纯度, 有必要使用色谱技术对蛋白进行分离纯化。常用的

色谱技术为阴离子交换色谱法。样品中的杂质在流经交换柱时被吸附, 所需成分被洗脱下来从而达到纯化的目的。DEAE-Sepharose FF 是一种将琼脂糖凝胶与二乙胺基乙基键合形成的一种弱阴离子交换介质, 因其流动性优异, 被广泛用于蛋白的分离^[10-11]。光谱技术包括荧光光谱、核磁共振光谱(NMR)、圆二色谱、红外光谱(FT-IR)和紫外可见光谱(UV-vis)等, 通常用来表征蛋白结构。它们可以深入解析蛋白质的三维结构, 探索蛋白质分子之间形成的互补结构, 以及蛋白与其他物质结合的构象变化^[12]。此外, 透射电子显微镜(TEM)、扫描电子显微镜(SEM)、原子力显微镜(AFM)和超分辨率显微镜(SRM)等常被用来探测蛋白的微观形貌^[13]。

遏蓝菜(*Thlaspi arvense* L.)又名蔊菜、败酱草等, 在中国南方大部分地区多见, 常生长于路旁、山坡和田边等处。古时人们常食用遏蓝菜度荒充饥。目前, 关于遏蓝菜的研究多集中在研究其栽培技术^[14-17]、种子油理化性质^[18]和累积重金属的机理^[19-21]。邵树勋等^[22]在湖北渔塘坝硒矿

收稿日期: 2021-04-19 修回日期: 2021-11-12

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划(2019YFC1606702-02)。

第一作者: 向安妮, 女, 硕士研究生, 研究方向为食品功能化加工工程技术。E-mail: xianganni@nwfufu.edu.cn

通信作者: 袁亚宏, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品高新技术与食品质量安全控制。E-mail: yyh324@126.com

岳田利, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品安全识别控制工程及营养健康食品制造工程。E-mail: yuetl@nwfufu.edu.cn

区的调查中,发现遏蓝菜是一种硒超富集植物。然而,目前对遏蓝菜有效成分的结构和生理活性的研究鲜有报道,限制了其资源的开发和利用。为改变这一状况,本研究以遏蓝菜为原料,通过超声波辅助酶法提取硒蛋白,将其纯化后对其结构及抗氧化活性进行研究,旨在为遏蓝菜资源的综合利用提供试验依据和理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

遏蓝菜样品(50 kg)于2019年夏季从中国湖北省恩施市新塘镇双河鱼塘坝的人工种植基地采收。DEAE-Sephrose FF 购自上海源叶生物科技有限公司;透析袋购自北京索莱宝科技有限公司;考马斯亮蓝 G-250、盐酸、氢氧化钠和氯化钠等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 材料预处理 遏蓝菜用水洗净,将其根、茎和叶放置在 50 °C 烘箱中干燥 48 h,粉碎后过 80 目筛得遏蓝菜根、茎和叶等不同部位的干粉。将不同部位干粉用石油醚(料液比 1:10)脱色脱脂 30 min,静置澄清,倾出上层石油醚,重复此过程 3~5 次。后置于烘箱中烘干,储存于干燥器中备用。

1.2.2 遏蓝菜各部位蛋白含量和硒含量的测定

取遏蓝菜不同部位的干粉各 5 g,加入 100 mL 蒸馏水,50 °C 水浴振荡提取 4 h;4 500 r/min 离心 15 min,取上清液;采用考马斯亮蓝 G250 法测定各部位干粉上清液中的蛋白含量,并用原子荧光光谱法(AFS)对各部位干粉上清液中的硒含量进行测定^[23]。

1.2.3 4 种含硒蛋白的提取 选取遏蓝菜蛋白得率及含硒量均较高部位的干粉,进行蛋白的分级提取,并分析不同蛋白组分的蛋白含量及硒含量^[24]。

遏蓝菜水溶性含硒蛋白的提取:首先,按 1:20(W/V)的比例将样品与蒸馏水混合,50 °C 水浴震荡提取 4 h,将提取液以 4 500 r/min 离心 15 min,取上清液并收集残渣 1;往上清液中加入 $w=80\%$ 的硫酸铵溶液沉淀蛋白,4 °C 下过夜,离心(4 500 r/min,15 min)取沉淀。沉淀用去离子水透析(截留分子量 3.5 ku)72 h 以除去杂质,冻干后得水溶性含硒蛋白。

遏蓝菜盐溶性含硒蛋白的提取:将残渣 1 按

1:20(W/V)的比例与 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液混合,后续实验操作与水溶性含硒蛋白的提取一致,最后得到残渣 2 和盐溶性含硒蛋白。

遏蓝菜醇溶性含硒蛋白的提取:将残渣 2 用蒸馏水洗涤 2~3 次后,按 1:20(W/V)的比例与 75%乙醇混合,后续实验操作参照水溶性含硒蛋白的提取,沉淀蛋白前,先通过 40 °C 减压蒸馏以除去上清液中的乙醇,最后得到残渣 3 和醇溶性含硒蛋白。

遏蓝菜碱溶性含硒蛋白的提取:将残渣 3 用蒸馏水洗涤 2~3 次后,按 1:20(W/V)的比例与 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液混合,后续实验操作与水溶性含硒蛋白的提取一致,最后得到碱溶性含硒蛋白。

1.2.4 超声辅助酶法提取硒蛋白 采用超声辅助酶法提取遏蓝菜中蛋白纯度和硒含量均较高的粗硒蛋白。取遏蓝菜干粉 5 g,加入酶(1%酶添加量,纤维素酶:果胶酶=6:4)及超纯水 100 mL,50 °C 超声(300 W)辅助提取 60 min。离心(6 000 r/min,10 min)得上清液,后续试验操作与沉淀水溶性含硒蛋白的方法一致,沉淀经透析、冻干后得粗硒蛋白。

1.2.5 硒蛋白的纯化 使用蛋白纯化仪^[25](AKTA Purifier 100,General Electric,瑞典)和 DEAE-Sephrose FF 层析柱对粗硒蛋白进行纯化。将粗硒蛋白 20 mg 溶于 10 mL 去离子水中,加入 1% H_2O_2 溶液于 40 °C 下反应 1 h 以脱色,结束后将样品溶液冷却至室温过 0.22 μm 水性滤膜。将滤液加样于 DEAE-Sephrose FF 层析柱,以含 0、0.2、0.4、0.6 和 0.8 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲盐(pH 8.0,25 mmol/L)作为洗脱液,控制洗脱速度为 1 mL/min,每 5 min 收集一管。以对应梯度的缓冲盐为空白,于 280 nm 处检测洗脱液的紫外吸收值并绘制洗脱曲线。收集单一峰位洗脱组分,去离子水透析(截留分子量 3.5 ku)72 h,浓缩、冻干以备用。

1.2.6 硒蛋白的光谱分析 将纯化后的蛋白组分溶于去离子水中,配制成 0.5 mg/mL 的溶液,采用紫外分光光度计(UV-2550,Shimadzu,日本)测定样品在 190~800 nm 的紫外吸收光谱。并用压片法制备红外光谱仪(FT-IR)测量所用的样品,即将样品(1 mg)与 KBr 粉末(100 mg)混合后压片,采用 FT-IR (Vetex70, Bruker, 德国)在 400~4 000 cm^{-1} 下进行分析。

1.2.7 氨基酸组成分析 硒蛋白水解氨基酸含量的测定参照 GB 5009.124-2016 食品安全国家标准进行,即将氨基酸标准品及样品溶于浓盐酸溶液(6 mol/L)中水解,采用全自动氨基酸分析仪(L-8900,Hitachi,中国)进行分析。

1.2.8 扫描电镜分析 根据尹仁文等^[26]的方法,取适量的样品放置于导电胶上,固定后喷金,采用场发射扫描电子显微镜(Nano SEM-450,FEI,美国)对样品形貌进行观察和拍照。

1.2.9 抗氧化活性测定 DPPH 自由基清除活性:采用 Teng 等^[27]的方法,测定硒蛋白清除 DPPH 自由基的活性。将各蛋白组分配制成不同浓度(2、4、6、8 和 10 mg/mL)的溶液。取 0.5 mL 样品溶液和 150 μ L 0.1 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液混合,避光孵育 30 min。以维生素 C 溶液作阳性对照,于 517 nm 处测量吸光度。计算硒蛋白清除 DPPH 自由基的能力:

$$\text{DPPH 清除率} = (1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}) \times 100\%$$

式中, A_0 为 150 μ L DPPH-乙醇溶液和 0.5 mL 水的吸光度; A_1 为 150 μ L 乙醇和 0.5 mL 样品溶液的吸光度; A_2 为 150 μ L DPPH-乙醇溶液和 0.5 mL 样品溶液的吸光度。

羟基自由基清除活性:采用水杨酸法^[28]测定硒蛋白清除羟基自由基的活性。将不同浓度(2、4、6、8 和 10 mg/mL)的样品溶液、硫酸亚铁溶液(20 μ L,9 mmol/L)、水杨酸(20 μ L,9 mmol/L)溶液和过氧化氢溶液(20 μ L,20 mmol/L)混合,于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min。以维生素 C 溶液作阳性对照,于 510 nm 处测量吸光度。计算硒蛋白清除羟基自由基的能力:

$$\text{羟基自由基清除率} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_c}) \times 100\%$$

式中, A_2 为无水乙醇代替水杨酸乙醇测得的反应体系的吸光度; A_c 为去离子水代替样品溶液测得的反应体系的吸光度; A_1 为样品溶液的吸光度。

超氧自由基清除活性:在 96 孔板中,将 150 μ L 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液、10 μ L 3 mmol/L 邻苯三酚溶液和 40 μ L 样品溶液(2、4、6、8 和 10 mg/mL)混合。以维生素 C 作阳性对照,5 min 内每隔 30 s 在 325 nm 处测量反应体系的吸光度。计算硒蛋白的超氧自由基清除率:

$$\text{超氧自由基清除率} = (1 - \frac{K_1 - K_{10}}{K_0}) \times 100\%$$

式中, K_0 为空白管(蒸馏水代替样品)的吸光度变化的斜率; K_1 为样品管吸光度变化的斜率; K_{10} 为背景管(盐酸代替邻苯三酚)吸光度变化的斜率。

总还原力测定:采用铁氰化钾比色法^[29]测定硒蛋白的总还原力。取样品溶液(2、4、6、8 和 10 mg/mL)4 mL 与 1 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L,pH 6.6)及 1 mL 1%铁氰化钾溶液混合,置 50 $^{\circ}$ C 水浴加热 20 min,冷却后加入 1 mL 10%三氯乙酸溶液混合并振荡。4 000 r/min 离心 5 min 得上清液,取 2 mL 上清液和 2 mL 蒸馏水及 0.4 mL 三氯化铁溶液混合,于 50 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min。以维生素 C 作阳性对照在 700 nm 处测定吸光度,吸光度越高表示硒蛋白的还原能力越强。

2 结果与分析

2.1 硒蛋白的提取

遏蓝菜不同部位干粉中蛋白含量和硒含量:遏蓝菜各部位干粉的蛋白含量和硒含量如表 1 所示,可见各部位蛋白含量为叶>茎>根,硒含量为叶>根>茎,表明硒和蛋白均在叶部位累积。这可能是由于植物根部通过硫酸盐转运蛋白从土壤中吸收无机硒后,无机硒从根部迅速转移到叶片中,在叶绿体中转化为有机态硒^[30],使得植物叶部位的硒蛋白含量最多。

表 1 遏蓝菜不同部位中的蛋白含量和硒含量($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Protein content and selenium content in different positions of *Thlaspi arvense* L.

部位 Position	蛋白含量/% Protein content	硒含量/(μ g/g) Selenium content
叶 Leaf	0.20 $\pm$ 0.004	15.36 $\pm$ 2.30
茎 Stem	0.19 $\pm$ 0.002	7.97 $\pm$ 0.40
根 Root	0.14 $\pm$ 0.006	13.56 $\pm$ 1.87

粗硒蛋白制品的蛋白含量和硒含量:取硒含量和蛋白含量均较高的叶部位为原料进行蛋白的分级提取,采用考马斯亮蓝 G250 法测定蛋白含量,AFS 法测定硒含量。如表 2 所示,4 种蛋白粗制品的蛋白含量和硒含量的次序均为:碱溶性含硒蛋白>水溶性含硒蛋白>盐溶性含硒蛋白>醇溶性含硒蛋白。但是由于碱法提取的硒蛋白品质较差^[31],所以在后续试验中采用水溶性含硒蛋白提取法进行提取。为了提高硒蛋白的得率,在水提法的基础上设计超声辅助酶提法,发现超声辅助酶法提取的蛋白得率为 3.75%,比热水浸提法(得率仅为 0.33%)提高 3.42%,表明超声辅助酶

法能显著提高蛋白得率。综上,本研究采用超声辅助酶法提取遏蓝菜叶中的水溶性含硒蛋白,具有较高的含硒蛋白得率,所得硒蛋白品质较好,在

后续的纯化和表征试验中均以此法提取遏蓝菜含硒蛋白。

表 2 4 种粗硒蛋白制品的蛋白含量和硒含量($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Protein content and selenium content in four crude selenoproteins

项目 Item	水溶性含硒蛋白 Water-soluble selenoprotein	盐溶性含硒蛋白 Salt-soluble selenoprotein	醇溶性含硒蛋白 Alcohol-soluble selenoprotein	碱溶性含硒蛋白 Alkali-soluble selenoprotein
蛋白含量/% Protein content	0.33±0.02	0.28±0.00	0.03±0.00	0.95±0.02
硒含量/(μg/g) Selenium content	7.97±0.40	7.03±0.28	5.84±0.06	12.87±0.57

2.2 硒蛋白的纯化

硒蛋白洗脱曲线如图 1 所示,蛋白粗品经 DEAE-Sepharose FF 层析柱洗脱后得到 5 个级分(PSP-1、PSP-2、PSP-3、PSP-4、PSP-5)。其中,PSP-2 和 PSP-3 的吸光值比较高,提示它们的蛋白含量比较高。因此,选取这两个级分进行后续 AFS 硒含量检测,检测结果表明 PSP-2 和 PSP-3 级分的含硒量分别为 2.456 μg/g 和 2.569 μg/g。

2.3 氨基酸组成分析

由表 3 可知,PSP-2 和 PSP-3 级分分别由 15 种不同的氨基酸组成,包含 6 种必需氨基酸,且必需氨基酸含量占比高,说明 PSP-2 和 PSP-3 氨基酸种类齐全、组成合理。其中亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸和异亮氨酸合并的含量较高,这 4 种氨基酸合并量分别占 PSP-2 和 PSP-3 氨基酸总量的 42% 和 34%。这 4 种氨基酸可参与机体对蛋白

质代谢的调控,与人体肝脏功能密切相关^[32]。因此,遏蓝菜硒蛋白具有作为保肝产品原料的潜力。

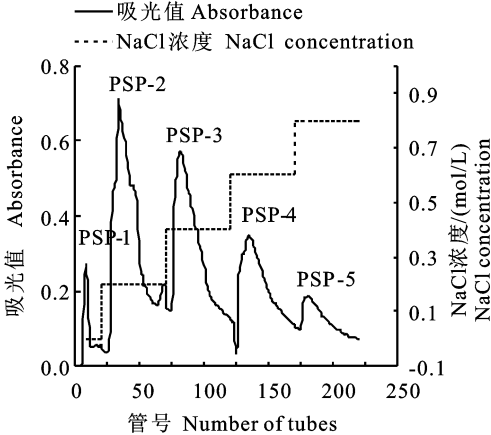


图 1 PSP 在 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱上的色谱图
Fig. 1 Anion-exchange chromatogram of PSP on DEAE-Sepharose FF

表 3 PSP-2 和 PSP-3 的氨基酸组成与含量
Table 3 Composition and content of amino acids of PSP-2 and PSP-3

氨基酸种类 Amino acid type	氨基酸含量/% Amino acid content	
	PSP-2	PSP-3
天门冬氨酸 Asp	0.137 0	0.136 5
苏氨酸 * Thr	—	0.824 2
丝氨酸 Ser	0.469 7	0.469 9
谷氨酸 Glu	0.214 0	0.234 3
甘氨酸 Gly	0.699 8	0.691 4
异亮氨酸 * Ile	1.485 1	1.486 7
亮氨酸 * Leu	1.585 7	1.587 3
酪氨酸 Tyr	1.098 8	1.238 5
苯丙氨酸 * Phe	1.514 2	1.515 9
丙氨酸 Ala	0.940 5	1.098 9
胱氨酸 Cys	1.209 5	1.291 2
缬氨酸 * Val	1.290 5	1.324 9
蛋氨酸 * Met	1.345 2	—
精氨酸 Arg	0.824 3	0.940 1
脯氨酸 Pro	0.231 0	3.400 6
赖氨酸 * Lys	1.537 0	1.538 8
氨基酸总量 Total amino acid	14.582 3	17.779 2
必需氨基酸 Essential amino acid	8.757 7	8.277 8
E/T 必需氨基酸/总氨基酸 Essential amino acid/Total amino acid	0.600 5	0.465 5
E/N 必需氨基酸/非必需氨基酸 Essential amino acid/Non-essential amino acid	1.503 3	0.871 1

注: * 表示必需氨基酸; — 表示未检测出。
Note: * Essential amino acids; — Amino acids not detectable.

PSP-2 和 PSP-3 氨基酸成分的评分:为了进一步分析遏蓝菜硒蛋白的营养价值,依照关海宁等^[33]的方法,将 PSP-2 及 PSP-3 的必需氨基酸含量与联合国粮农组织/世界卫生组织 (FAO/WHO) 提出的理想蛋白质中对应氨基酸参考值^[34]作比较,得到表 4 所示结果。可知,PSP-2 的含硫氨基酸(蛋氨酸+胱氨酸)的氨基酸评分最

高,PSP-3 的缬氨酸与酪氨酸的氨基酸评分最高。另外,根据 FAO/WHO 推荐的模式,E/T 比应不少于 0.40,E/N 比值应不少于 0.60,PSP-2 及 PSP-3 的 E/T 和 E/N 比值均高于上述标准(表 3)。说明遏蓝菜硒蛋白的必需氨基酸模式接近 FAO/WHO 的推荐模式,具有较好的营养价值。

表 4 PSP-2 和 PSP-3 的氨基酸评分
Table 4 Hydrolyzed amino acid score in PSP-2 and PSP-3

氨基酸 Amino acid	参考值 Reference pattern	AA		AAS	
		PSP-2	PSP-3	PSP-2	PSP-3
异亮氨酸 Ile	40	14.851	14.867	37.13	37.17
亮氨酸 Leu	70	15.857	15.873	22.65	22.68
蛋氨酸+胱氨酸 Met+ Cys	35	25.547	12.912	72.99	36.89
赖氨酸 Lys	55	15.370	15.388	27.95	27.98
苏氨酸 Thr	40	0	8.242	0	20.61
缬氨酸+酪氨酸 Val+ Tyr	50	23.893	25.634	47.79	51.27
苯丙氨酸 Phe	60	15.142	15.159	25.24	25.27

注:参考值来自于 WHO/FAO 1973 年提出的理想蛋白质中的氨基酸值模式;AA 表示氨基酸含量(mg/g);AAS(氨基酸评分)=某种必需氨基酸测定值×100/对应必需氨基酸参考值。
Note:Reference pattern is derived from amino acid reference pattern of protein proposed by WHO/FAO in 1973; AA means amino acid content (mg/g); AAS (amino acid score)=Test essential amino acid×100/Reference essential amino acid.

2.4 紫外光谱分析

PSP-2 和 PSP-3 的紫外扫描图谱如图 2 所示。PSP-2 在 240 nm 附近的吸收峰和 PSP-3 在 260 nm 附近的吸收峰来源于两种蛋白中所含的肽键^[35],两个峰的强度均较高,提示两种样品均含有较多的肽键,且 PSP-2 中的肽键更多。280 nm 附近的吸收峰对应 PSP-2 和 PSP-3 中芳香族氨基酸(酪氨酸和苯丙氨酸)中存在的共轭双键吸收区^[36]。以上两处的吸收峰证明了纯化后的样品主要成分为蛋白质。另外,PSP-2 和 PSP-3 在 350 nm 附近有一较弱肩峰,源于蛋白中二硫键的吸收。二硫键具有稳定蛋白分子肽链空间结构的能力,从图 2 可以看出此肩峰强度较小,说明 PSP-2 和 PSP-3 中二硫键数目少^[37],结构不稳定。

2.5 红外光谱分析

PSP-2 和 PSP-3 的红外图谱如图 3 所示。两组分在酰胺 I、II、III 带均有明显的特征峰,说明遏蓝菜硒蛋白具有典型的蛋白红外光谱特征。其中,3 400~3 440 cm⁻¹ 的吸收峰对应蛋白酰胺 A 带的特征峰,PSP-2 和 PSP-3 的酰胺 A 带在 3 408 cm⁻¹ 及 3 412 cm⁻¹ 处,由 N-H 的伸缩振动引起。

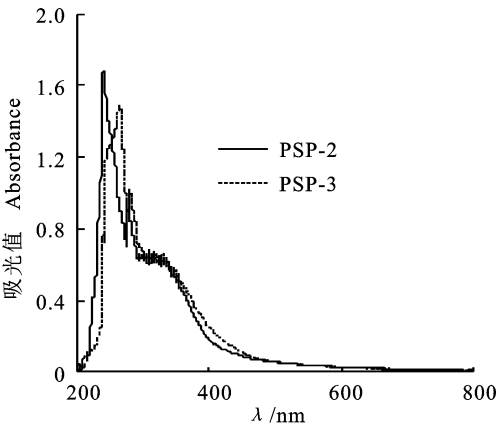


图 2 PSP-2 和 PSP-3 的紫外扫描光谱
Fig. 2 UV scanning spectra of PSP-2 and PSP-3

1 690~1 630 cm⁻¹ 对应于蛋白酰胺 I 带的吸收峰,由 C=O 的伸缩振动引起,PSP-2 和 PSP-3 的酰胺 I 带在 1 622 cm⁻¹ 及 1 628 cm⁻¹ 处,吸收峰发生蓝移,可能是由于硒与蛋白结合所致。1 650~1 590 cm⁻¹ 对应于蛋白酰胺 II 带的吸收峰,主要由-COO-的伸缩振动导致,PSP-2 和 PSP-3 的酰胺 II 带在 1 468 cm⁻¹ 处,吸收峰发生蓝移,证明 PSP-2 和 PSP-3 的肽链中存在氢键^[38]。1 335~1 200 cm⁻¹ 对应于蛋白酰胺 III 带

的吸收峰, PSP-2 和 PSP-3 的酰胺Ⅲ带在 $1\,298\text{ cm}^{-1}$ 与 $1\,294\text{ cm}^{-1}$ 处, 由 C-N 伸缩振动引起。此外, $3\,018\text{ cm}^{-1}$ 附近对应 PSP-2 和 PSP-3 酰胺 B 带的 C-H 的特征峰, $1\,067\text{ cm}^{-1}$ 及 $1\,063\text{ cm}^{-1}$ 处的峰对应于 PSP-2 和 PSP-3 中氨基的特征峰。

在 Na_2SeO_3 红外光谱中(图 3), 746 cm^{-1} 处的吸收峰为 $\text{Se}=\text{O}$ 特征峰。而在 PSP-2 和 PSP-3 红外光谱中, 775 cm^{-1} 与 773 cm^{-1} 处的峰分别对应于 $\text{Se}=\text{O}$ 特征峰, 推测这可能是蛋白中其他官能团影响的结果。另外, PSP-2 $1\,067\text{ cm}^{-1}$

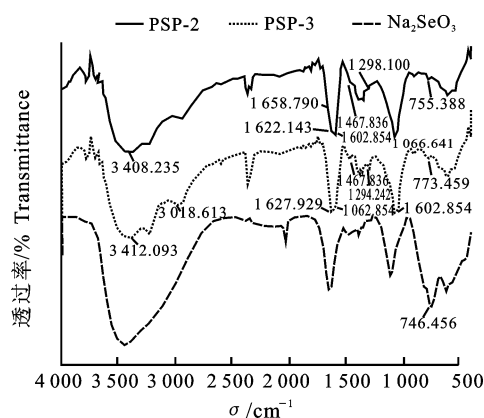


图 3 PSP-2、PSP-3 和 Na_2SeO_3 的红外光谱图

Fig. 3 FT-IR spectra of PSP-2, PSP-3 and Na_2SeO_3

处的峰和 PSP-3 $1\,063\text{ cm}^{-1}$ 处的峰分别对应于 O-Se-O 键^[39]。这些结果进一步证实硒化蛋白存在于 PSP-2 和 PSP-3 中。

2.6 扫描电镜分析

PSP-2 和 PSP-3 在不同放大倍数下的 SEM 图(图 4)显示:在 8 000 倍的放大倍数下, 硒蛋白呈现出碎片和大小不一聚集体的表面形态, 聚集体表面有不规则的凸起结构;在 30 000 倍的放大倍数下, 硒蛋白具有球状结构, 球状表面凹凸不平。以上观察结果表明遏蓝菜硒蛋白结构不稳定, 易于通过氢键和疏水作用形成复杂的空间结构^[40]。另外, SEM 结果显示有大量表面光滑的小碎片分布在 PSP-2 及 PSP-3 中, 这些碎片的产生可能是超声处理所致, 因为超声波产生的较高的剪切力和空化作用会引起蛋白质解折叠^[41], 导致蛋白质的颗粒尺寸减小^[42]。SEM 结果还显示两种蛋白组分的球状结构中都存在孔洞, 推测该孔洞为硒与蛋白结合的位点^[43]。上述 SEM 观察结果从微观形貌方面证明了 PSP-2 及 PSP-3 中存在含硒蛋白。此外, PSP-2 中小片段之间连接松散, 而与 PSP-2 片段相比则 PSP-3 连接比较紧密, 这种蛋白表面形貌的差异可能与它们具有不同的生物活性有关。

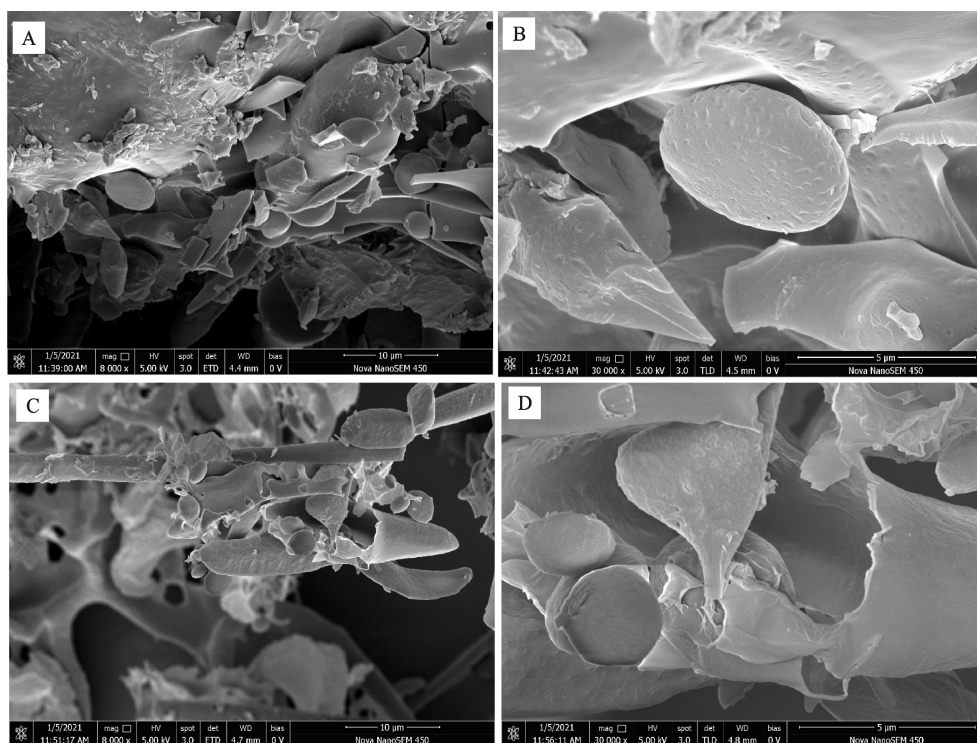


图 4 PSP-2(A:8 000 $\times$;B:30 000 $\times$)和 PSP-3(C:8 000 $\times$;D:30 000 $\times$)的扫描电镜图

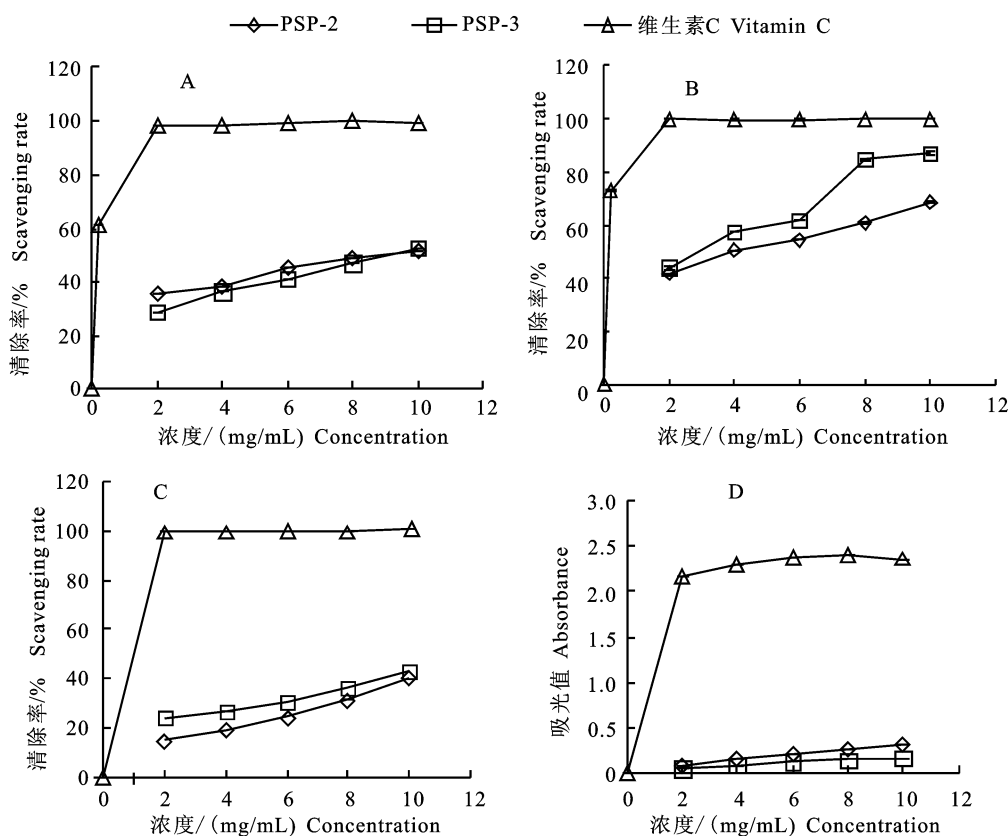
Fig. 4 Scanning electron micrographs of PSP-2(A:8 000 $\times$;B:30 000 $\times$) and PSP-3(C:8 000 $\times$;D:30 000 $\times$)

2.7 硒蛋白的抗氧化活性

PSP-2 和 PSP-3 的抗氧化活性的检测结果(图 5)显示:随着样品浓度的不断提高,PSP-2 和 PSP-3 的抗氧化活性也随之增加。在 4 个体外抗氧化试验中,当样品浓度均为 10 mg/L 时,PSP-2 和 PSP-3 的 DPPH 自由基清除率分别为 52.79% 和 51.09%,羟基自由基清除率分别为 68.61% 和 86.52%,超氧自由基清除率分别为 40.53% 和 42.84%,总还原力检测在 700 nm 处的吸光度为 0.33 和 0.18。表明 PSP-2 和 PSP-3 具有较强的自由基清除能力和总还原力。在测试范围内的同一质量浓度下,PSP-2 的 DPPH 自由基清除能力和总还原力略强于 PSP-3,而羟基自由基清除能

力和超氧自由基清除能力略弱于 PSP-3。

对比两种蛋白含硒量及抗氧化活性,可得出蛋白含硒量越高,其羟基自由基和超氧自由基清除能力越强的结论。胡振瀛等^[44]研究发现灵芝硒蛋白的超氧自由基和羟基自由基清除能力随蛋白硒含量的增加而增强,杜明等^[45]研究发现富硒菜籽粕蛋白比普通菜籽粕蛋白具有更强的抗氧化活性,均与本研究结果基本一致。此外,有研究报道蛋白的抗氧化活性与其疏水性氨基酸的含量密切相关。由氨基酸分析可知,PSP-2 的疏水性氨基酸含量多于 PSP-3 的疏水性氨基酸含量,这可能是 PSP-2 的 DPPH 自由基清除能力及总还原力强于 PSP-3 的原因。



A. PSP-2 和 PSP-3 对 DPPH 自由基的清除能力; B. PSP-2 和 PSP-3 对羟基自由基的清除能力; C. PSP-2 和 PSP-3 对超氧阴离子自由基的清除能力; D. PSP-2 和 PSP-3 的还原力作用曲线

A. DPPH radical scavenging ability of PSP-2 and PSP-3; B. Hydroxyl radical scavenging ability of PSP-2 and PSP-3; C. Superoxide anion scavenging ability of PSP-2 and PSP-3; D. Reducing power of PSP-2 and PSP-3

图 5 PSP-2 和 PSP-3 的抗氧化活性

Fig. 5 Antioxidant activity of PSP-2 and PSP-3

3 结论与讨论

深入研究和开发硒蛋白,具有重要意义。中国是缺硒大国,约有 72% 的地区缺硒^[46],发现和

研究富硒食品和其他补硒剂对于提高国民身体健康水平具有格外重要的作用。硒蛋白是有机硒的主要载体,膳食中的硒蛋白在十二指肠发生水解,被机体吸收。因此,深入研究硒蛋白的生物学特

性,开发更多适合人体利用的硒蛋白产品,将有助于促进国民身体健康水平的提高。硒蛋白是微量元素硒发挥其生物活性的主要功能形态,具有多种功效。研究和开发具有优良生物学活性的硒蛋白,对相关疾病的防治将具有积极的作用。综上,硒蛋白具有食补和药用两方面的价值,具有良好的市场潜力,对其进行深入研究十分重要。遏蓝菜的元素富集功能,使得对其与硒补充和硒利用关联的研究显得更为重要。研究表明在遏蓝菜中,硒主要以有机硒形式赋存,蛋白硒是主要的赋存状态。但是,遏蓝菜硒蛋白的性状和特性如何,至今仍没有相关报道,亟待深入研究。

本研究以遏蓝菜为原料,获得具有较高营养价值及优良抗氧化能力的硒蛋白。并证明遏蓝菜硒蛋白既可以作为绿色植物硒补充剂,应用于食疗保健领域,也具有作为抗氧化剂应用于相关疾病防治的潜力。总体而言,研究结果对遏蓝菜资源的合理深加工和改良具有促进作用,也为进一步研究遏蓝菜硒蛋白的构效关系以设计出具有强大抗氧化活性的定制富硒蛋白提供了基础。

参考文献 Reference:

- [1] FANG Y, XU Z, SHI Y, *et al.* Protection mechanism of se-containing protein hydrolysates from se-enriched rice on Pb^{2+} -induced apoptosis in PC12 and RAW264. 7 cells[J]. *Food Chemistry*, 2017, 219: 391-398.
- [2] JASTRZEBSKI Z, CZYZEWSKA-SZAFRAN H, FIJATEK Z, *et al.* Toxicity studies of a new selenium compound, selol, in rats[J]. *Drugs Under Experimental & Clinical Research*, 1995, 21(6): 217.
- [3] STEINBRENNER H, SIES H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1790(11): 1478-1485.
- [4] SCHOMBURG L. Dietary selenium and human health [J]. *Nutrients*, 2017, 9(1): 22-29.
- [5] 杨旭, 谢盈. 茶渣硒蛋白的分离纯化及其性质研究[J]. *食品与机械*, 2018, 34(11): 152-156.
YANG X, XIE Y. Isolation, purification and characterization of selenium-protein from selenium-enriched tea residue[J]. *Food & Machinery*, 2018, 34(11): 152-156.
- [6] 马玲, 赵亚娜, 张乐, 等. 富硒平菇水溶性蛋白提取及抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(24): 148-151.
MA L, ZHAO Y N, ZHANG L, *et al.* Extraction of water soluble protein from selenium contained pleurotus ostreatus and antioxidant activity in vitro[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(24): 148-151.
- [7] 唐雅园, 何雪梅, 孙健, 等. 富硒大米中不同溶解性硒蛋白理化特性和抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(9): 7.
- TANG Y Y, HE X M, SUN J, *et al.* Physicochemical properties and antioxidant activities of different se-proteins from selenium-enriched rice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(9): 7.
- [8] RUSZCZYŃSKA A, KONOPKA A, KUREK E, *et al.* Investigation of biotransformation of selenium in plants using spectrometric methods [J]. *Spectrochimica Acta*, 2017, 130: 7-16.
- [9] XIAO ZH M, LI SH, GUO J P, *et al.* Application of enzymatic probe sonication for selenium speciation in animal feeds[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1530: 51-58.
- [10] YU L, GONG L, BAI S, *et al.* Surface DEAE groups facilitate protein transport on polymer chains in DEAE-modified-and-DEAE-dextran-grafted resins[J]. *Aiche journal*, 2016, 62 (10): 3812-3819.
- [11] 马伏宁, 谭琳, 郭刚, 等. 海南方格星虫纤溶酶分离纯化及部分基因克隆[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(2): 698-703.
MA F N, TAN L, GUO G, *et al.* Separation, purification and partial gene clone of fibrinolytic enzyme from sipunculus nudus from hainan[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(2): 698-703.
- [12] GÜLER G, VOROBEOV M M, VOGEL V, *et al.* Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy[J]. *Spectrochimica Acta*, 2016, 161: 8-18.
- [13] 赖婵娟, 吴磊燕, 胡林芳, 等. 不同溶剂中玉米醇溶蛋白的聚集状态和结构性质[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(6): 9.
LAI CH J, WU L Y, HU L F, *et al.* Aggregation state and structural properties of zein in different solvents[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2021, 37(6): 9.
- [14] 毛学文, 毛沛. 遏蓝菜的价值与栽培[J]. *特种经济动植物*, 2003, 6(10): 37-37.
MAO X W, MAO P. The value and cultivation of pennycress [J]. *Special Economic Animal and Plant*, 2003, 6(10): 37-37.
- [15] VARSHNEY R K, NAYAK S N, MAY G D, *et al.* Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding [J]. *Trends Biotechnol*, 2009, 27: 522-530.
- [16] CLEMENTE T E, CAHOON E B. Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151: 1030-1040.
- [17] WESELAKE R J. Increasing the flow of carbon into seed oil[J]. *Biotechnol*, 2009, 27: 866-878.
- [18] MOSER B R, KNOTHE G, VAUGHN S F, *et al.* Production and evaluation of biodiesel from field pennycress (*Thlaspi arvense* L.) oil[J]. *Energy & Fuels*, 2009, 23 (8): 4149-4155.
- [19] EVANGELISTA R L, ISBELL T A, CERMAK S C. Ex-

- traction of pennycress (*Thlaspi arvense* L.) seed oil by full pressing [J]. *Industrial Crops and Products*, 2012, 37(1): 76-81.
- [20] MONTEIRO M S, SOARES A M V M. Physiological and biochemical effects of Cd stress in *Thlaspi arvense* L-a non-accumulator of metals[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2021, 81(2): 285-292.
- [21] MARTIN S R, LLUGANY M, BARCEL J, *et al.* Cadmium exclusion a key factor in differential Cd-resistance in *Thlaspi arvense* ecotypes[J]. *Biologia Plantarum*, 2012, 56(4): 729-734.
- [22] 邵树勋, 郑宝山, 苏宏灿, 等. 湖北渔塘坝硒矿区发现超富集硒植物[J]. *矿物学报*, 2007, 27(3): 567-570.
- SHAO SH X, ZHENG B SH, SU H C, *et al.* A new species of selenium hyperaccumulator identified in yutangba se deposit area[J]. *Acta Mineralogica Sinica*, 2007, 27(3): 567-570.
- [23] 王 鹏, 张耀中, 阮向阳, 等. 外源施硒对酿酒葡萄产量、品质及硒富集的影响[J]. *西北农业学报*, 2020, 29(1): 97-104.
- WANG P, ZHANG Y ZH, RUAN X Y, *et al.* Effects of foliar spraying with selenium on yield, quality and selenium accumulation and growth of wine grape[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2020, 29(1): 97-104.
- [24] CHUNHIENG T, K PÉTRITIS, ELFAKIR C, *et al.* Study of selenium distribution in the protein fractions of the Brazil nut, *bertholletia excelsa* [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2004, 52(13): 4318.
- [25] 余少琼, 许妍妍, 袁艳秋, 等. 重组大豆 7S 球蛋白 α' -亚基的分离纯化[J]. *西北农业学报*, 2017, 26(12): 1853-1859.
- YU SH J, XU Y Y, YUAN Y Q, *et al.* Isolation and purification of recombinant α' -subunit of 7S globulin[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2017, 26(12): 1853-1859.
- [26] 尹仁文, 陈正行, 李 娟, 等. 大米蛋白与米渣蛋白对镉结合能力的对比研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(10): 43-49, 56.
- YIN R W, CHEN ZH X, LI J, *et al.* Comparison of the binding ability to cadmium between rice protein and rice dreg protein [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(10): 43-49, 56.
- [27] TENG C, QIN P, SHI Z, *et al.* Structural characterization and antioxidant activity of alkali-extracted polysaccharides from quinoa[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 113: 106392.
- [28] XIE L, SHEN M, WEN P, *et al.* Preparation, characterization, antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of phosphorylated polysaccharide from cyclocarya paliurus[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 145: 111754.
- [29] 林 捷, 郑 华, 田秀秀, 等. 鸡肉寡肽与香菇多糖协同增效抗氧化活性[J]. *食品工业*, 2019(9): 15-19.
- LIN J, ZHENG H, TIAN X X, *et al.* Synergistic and antioxidant activities of chicken oligopeptide and lentinan [J]. *The Food Industry*, 2019(9): 15-19.
- [30] PILON-SMITS E A H, QUINN C F. Plant Cell Monographs [M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 17: 225-241.
- [31] 程利增. 茶叶硒蛋白的分离纯化、结构、有机硒形态及其抗氧化活性研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2007.
- CHENG L Z. Study on separation and purification, structure, organic se speciation, and antioxidant activity of tea selenoproteins[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2007.
- [32] 冯笑笑, 李 娟, 陈侨侨, 等. 翅果油树种仁蛋白氨基酸组成分析及营养价值评价[J]. *食品科学*, 2016, 37(22): 160-165.
- FENG X X, LI J, CHEN Q Q, *et al.* Amino acid composition and nutritional evaluation of proteins extracted from elaeagnus mollis diels seed kernels [J]. *Food Science*, 2016, 37(22): 160-165.
- [33] 关海宁, 迟殿忠, 刁小琴, 等. 基于 FAO/WHO 相对氨基酸新评分模式的建立及其应用探讨[J]. *粮油加工*, 2008(12): 114-116.
- GUAN H N, CHI D ZH, DIAO X Q, *et al.* The establishing of new opposite score mode about amino acids basing on FAO/WHO and discussing of its application[J]. *Cereals and Oils Processing*, 2008(12): 114-116.
- [34] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Energy and protein requirements. Report of Joint FAO/WHO [R]. Geneva: WHO, 1973: 62-64.
- [35] 张琬悦, 王诗瑶, 杨 平, 等. 草鱼鱼鳞胶原蛋白肽及其肽-钙螯合物的结构表征[J]. *现代农业研究*, 2019, 48(12): 100-102.
- ZHANG W Y, WANG SH Y, YANG P, *et al.* Structural characterization of collagen peptide and its peptide-calcium chelate in grass carp scales [J]. *Modern Agriculture Research*, 2019, 48(12): 100-102.
- [36] 吴汶飞, 吴佳南, 孙 娜, 等. 鲑鱼皮明胶硒螯合肽的酶解制备[C]//营养研究与临床实践-第十四届全国营养科学大会暨第十一届亚太临床营养大会、第二届全球华人营养科学家大会. 南京: 南京国际博览中心, 2019: 20-22.
- WU W F, WU J N, SUN N, *et al.* Preparation of cod skin gelatin selenium chelating peptide by enzymatic hydrolysis [C]//Nutrition Research and Clinical Practice-The 14th National Nutrition Science Conference and the 11th Asia-Pacific Clinical Nutrition Conference, the 2nd Global Chinese Nutrition Scientist Conference. Nanjing: Nanjing International Expo Center, 2019: 20-22.
- [37] 张 静, 韦玉春, 王国祥, 等. 太湖水体中藻蓝蛋白的紫外-可见吸收光谱特征分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2014, 34(5): 1297-1301.
- ZHANG J, WEI Y CH, WANG G X, *et al.* UV-Vis spec-

- trum characteristics of phycocyanin in water from taihu lake [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2014, 34(5): 1297-1301.
- [38] ACKSON M, CHOO L P, WATSON P H, *et al.* Beware of connective tissue proteins; assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1270(1): 1.
- [39] LI Q, WANG W, ZHU Y, *et al.* Structural elucidation and antioxidant activity a novel se-polysaccharide from se-enriched grifola frondosa [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 161: 42-52.
- [40] LI Z Y, WANG J Y, ZHENG B D, *et al.* Impact of combined ultrasound-microwave treatment on structural and functional properties of golden threadfin bream (*Nemipterus virgatus*) myofibrillar proteins and hydrolysates [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2020, 65: 105063.
- [41] DABBOUR M I, ALENYOREGE E A, MINTAH B, *et al.* Proteolysis kinetics and structural characterization of ultrasonic pretreated sunflower protein [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 94: 198-206.
- [42] CAA C, KMA D, PZA B, *et al.* Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality [J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 108(3): 463-472.
- [43] 秦修远, 刘文颖, 陈立城, 等. 豌豆低聚肽硒螯合物制备及结构特征研究[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(3): 32-37.
- QIN X Y, LIU W Y, CHEN L CH, *et al.* Preparation and structure characterization of selenium-chelating pea oligopeptides [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(3): 32-37.
- [44] 胡振瀛, 史卿, 熊华, 等. 富硒及普通菜籽粕蛋白的抗氧化作用比较[J]. *南昌大学学报(工科版)*, 2014, 36(1): 7-10.
- HU ZH Y, SHI Q, XIONG H, *et al.* Compared antioxidant properties selenium-rich rapeseed meal protein and ordinary rapeseed meal protein [J]. *Journal of Nanchang University (Engineering & Technology)*, 2014, 36(1): 7-10.
- [45] 杜明, 赵镭, 李朝睿, 等. 富硒灵芝中一种新含硒蛋白的纯化、性质及其自由基清除活性研究[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(1): 75-78.
- DU M, ZHAO L, LI ZH R, *et al.* Purification and properties of a novel se-containing protein from se-enriched ganoderma lucidum and its antioxidant activity [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2007, 28(1): 75-78.
- [46] 赵君, 张哲寰, 穆华一, 等. 克山病高发区土壤-农作物硒元素特征研究[J]. *西北地质*, 2021, 54(4): 250-258.
- ZHAO J, ZHANG ZH H, MU H Y, *et al.* Study on selenium in soil and crops in the high incidence areas of Keshan disease [J]. *Northwestern Geology*, 2021, 54(4): 250-258.

Research on Purification, Structure Characterization and Antioxidant Activity of Selenoproteins in *Thlaspi arvense* L.

XIANG Anni¹, XU Shuang¹, JU Hongmei¹, ZHAO Shiyu¹,
YUE Tianli^{1,2} and YUAN Yahong¹

(1. College of Food Science & Engineering, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. College of Food Science and Technology, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract To explore the structure characteristics and antioxidant activity of selenoproteins in *Thlaspi arvense* L. two selenoprotein components of PSP-2 and PSP-3, were extracted and purified from *Thlaspi arvense* L. by ultrasonic-assisted enzyme extraction and DEAE Sepharose FF anion exchange column chromatography. The structure was characterized and the antioxidant activity in vitro was evaluated by analysis methods such as spectroscopy and scanning electron microscopy. The results showed that PSP-2 and PSP-3 contained 15 amino acids, in which 6 were essential amino acids. The amino acids of the two protein components were reasonably composed and had good nutritional values. PSP-2 and PSP-3 had typical protein spectral characteristics, both of which had Se=O bond, O-Se-O bond, disulfide bond and H-bond, and the unstable structures showed the appearance of aggregates and fragments. This study on antioxidant activity showed that PSP-2 and PSP-3 had strong free radical scavenging ability and total reducing power. In summary, the selenoproteins with excellent antioxidant activity existed in *Thlaspi arvense* L. Furthermore, this experiment provided a basis for further study on the structure-activity relationship of selenoproteins in *Thlaspi arvense* L. and developing products with antioxidant effect, and also provided a reference for the comprehensive utilization of *Thlaspi arvense* L.

Key words *Thlaspi arvense* L.; Seleno protein; Extraction and purification; Structure characterization; Antioxidant activity analysis

Received 2021-04-19

Returned 2021-11-12

Foundation item National Key R&D Program of China during the “13th Five-Year Plan” Period(No. 2019YFC1606702-02).

First author XIANG Anni, female, master student. Research area: functional food processing technology. E-mail: xianganni@nwafu.edu.cn

Corresponding author YUAN Yahong, female, professor, doctoral supervisor. Research area: high and new technology of food and food quality and safety control. E-mail: yyh324@126.com

YUE Tianli, male, professor, doctoral supervisor. Research area: food safety identification and control engineering and nutritional and healthy food manufacturing engineering. E-mail: yueltl@nwafu.edu.cn

(责任编辑: 史亚歌 Responsible editor: SHI Yage)