

富硒对黄粉虫蛋白分布及其酶解多肽抗氧化活性的影响

林晏因¹, 闵甜¹, 赖富饶¹, 张晓元^{1,2}, 吴晖¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 韶关市华工高新技术产业研究院, 广东韶关 512027)

摘要: 本实验讨论了富硒对黄粉虫蛋白及其硒含量的影响; 按照溶解性依次提取水、盐、醇和碱四种可溶性蛋白, 通过原子荧光光谱仪进行硒含量的测定; 对富硒黄粉虫蛋白进行酶解来获得含硒多肽, 并以红细胞溶血为模型对比了富硒前后黄粉虫水解多肽的细胞抗氧化活性。结果发现, 富硒后黄粉虫蛋白所占干重比例由 53.86% 上升至 59.12%, 分子量对应 75 ku 和 37 ku 的蛋白电泳条带在富硒后变深; 富硒黄粉虫中 (Se-TM) 总硒含量为 573.32 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其中有机硒含量为 524.91 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 占总硒含量的 91.56%; 在可溶性蛋白中, 硒主要存在于碱溶蛋白中, 占总硒的 26.62%, 此外, 有 46.63% 的硒存在于不溶性组分中; 富硒黄粉虫水解得到的多肽 (Se-TMP) 对红细胞溶血的抑制率在样品浓度为 3 mg/mL 时为 87.32%, 在实验各样品浓度下 Se-TMP 对红细胞氧化溶血的抑制率均高于未富硒黄粉虫水解多肽 (TMP)。

关键词: 黄粉虫; 硒; 蛋白; 多肽; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2017)6-53-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.009

Effects of Selenium Enrichment on Protein Distribution in *Tenebrio molitor* and Antioxidative Activity of Enzymatically Hydrolyzed *Tenebrio molitor* Peptides

LIN Yan-yin¹, MIN Tian¹, LAI Fu-rao¹, ZHANG Xiao-yuan^{1,2}, WU Hui¹

(1. School of Food Sciences and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Research Institute of Shaoguan Huagong High-tech Industry, Shaoguan 512027, China)

Abstract: The effects of selenium-enrichment on *Tenebrio molitor* (mealworm) protein and its selenium concentration were evaluated. Based on solubility, water-, salt-, ethanol-, and alkali-soluble proteins from *T. molitor* were extracted, and the selenium concentration was measured using an atomic fluorescence spectrometer. Selenium-enriched mealworm protein was hydrolyzed by enzymes to obtain Se-containing *T. molitor* peptide (Se-TMP), and the cellular antioxidant activities of Se-TMP and TMP were determined and compared using erythrocyte hemolysis as a model. The results showed that the dry weight ratio of mealworm proteins after Se-enrichment increased from 53.86% to 59.12% and electrophoretic bands at 75 and 37 ku were darker in Se-enriched proteins. The total selenium concentration in Se-enriched *T. molitor* was 573.32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and organic selenium concentration was 524.91 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (91.56%). In soluble protein, selenium was mainly present in alkali-soluble protein, accounting for 26.62% of the total selenium. Furthermore, 46.63% of total selenium was found in the insoluble component. At a sample concentration of 3 mg/mL, the inhibition rate of Se-TMP on erythrocyte hemolysis was 87.32%. The inhibition rates of Se-TMP were all higher than those of TPM at various sample concentrations.

Key words: *Tenebrio molitor*; selenium; protein; peptides; antioxidant activity

黄粉虫是一种全变态昆虫, 分为卵、幼虫、蛹和

收稿日期: 2017-03-24

基金项目: 广东省科技项目 (2016A040402020); 广东省科技项目 (2016B010121014); 韶关市科技项目 (2014CX/N310)

作者简介: 林晏因 (1992-), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物化学

通讯作者: 吴晖 (1967-), 男, 博士, 研究方向: 食品安全与天然产物化学

成虫四个阶段, 因高蛋白、高脂肪及氨基酸组成全面的特点, 被称为“蛋白质饲料宝库”, 随着生长阶段的推移, 体内蛋白含量逐渐上升, 油脂含量逐渐下降^[17]。通过诱导和酶解等方式从其体内分离出了抗氧化肽、抗菌肽、降血压肽和抗肿瘤肽等生物活性肽^[6-8]。黄粉虫可以吸收微量元素并在体内富集转化为机体活性物

质,制成富含某些微量元素的保健食品,以补充人体中缺乏的某些微量元素^[6]。

硒是人体所必须的一种微量元素,主要以含硒氨基酸的形式存在于生物体内,硒作为20多种含硒蛋白的组成部分,与机体抗氧化作用、免疫应答、甲状腺激素代谢等密切相关^[9]。人们主要通过食物获取每天所需的硒,给定类型的植物性食物中的硒含量主要取决于土壤中硒含量,不同硒含量土壤中的植物被动物所取食,进而导致动物硒含量的不同^[10,12-15]。虽然近年来中国人的饮食结构中摄入含硒量相对较丰富的海产品、动物肝脏、肌肉所占比例增大^[9],但主食仍为谷物类植物性食物,加之中国粮食的主要种植地东北平原、长江三角洲和珠江三角洲多处于低硒地区,其粮食产量占全国的70%,从而造成中国人均硒摄入量偏低。硒有两种存在形式,无机硒(硒酸钠和亚硒酸钠)和有机硒(硒代甲硫氨酸和硒代半胱氨酸)^[10],两种硒都可以作为硒的饮食来源或硒的膳食补充剂^[11]。与无机硒相比,由于有机硒补剂特别是富含硒代氨基酸的产品在毒理安全性、生理活性和吸收率上得优越性^[10,12,13],也掀起了一股富硒热,加之人工合成有机硒成本高,目前难以投入生产,通过植物、微生物、动物等进行生物转化作用生产富有机硒产品为主要获取富硒食品的途径,其中有机硒主要以含硒蛋白的形式存在于富硒产品中^[1-5]。

因黄粉虫蛋白含量丰富,且能富集微量元素的性质,本实验选用富硒培养黄粉虫(*Se-enriched Tenebrio molitor*, Se-TM)幼虫为实验对象,研究富硒前后蛋白及硒含量的变化,并通过酶解获得含硒多肽(*Se-enriched Tenebrio molitor*peptides, Se-TMP)后对其细胞抗氧化活性进行初探。

1 材料与方法

1.1 原料

富硒黄粉虫幼虫购于广州生技能生物科技有限公司;普通黄粉虫幼虫购于广州市芳村虫鸟市场。

1.2 试剂与仪器

碱性蛋白酶(200000 U/g)、中性蛋白酶(60000 U/g)购自北京奥博星生物技术有限责任公司,胰蛋白酶(250 NF/mg)、风味蛋白酶(20 U/mg)购自源叶生物;30%过氧化氢、硝酸、盐酸均为AR级;PBS购于美国HyClone公司;2.5%戊二醛(电镜专用)购于广州硕恒生物科技有限公司;微量丙二醛(MDA)测试盒购于南京建成生物工程研究所。

主要仪器有:752S紫外可见分光光度计、SCIENTZ-18N冷冻干燥机、DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器、JW-1016低速离心机、1420酶标仪和LEO1530VP扫描电镜。

1.3 基本成分的测定

1.3.1 样品前处理

将经微波干燥的富硒黄粉虫幼虫和普通黄粉虫幼虫倒入搅拌机中粉碎,粉碎后经40目筛子过筛,收集备用。

1.3.2 蛋白含量的测定

总蛋白的测定参照GB 50095-2010,可溶性蛋白的测定采用考马斯亮蓝法。

1.3.3 脂肪含量的测定

油脂含量的测定参照GB/T 14772-2008。

1.3.4 水分含量的测定

水分的测定参照GB 50093-2010。

1.4 硒的测定

1.4.1 样品预处理

总硒测定的预处理:称取0.2 g富硒黄粉虫多肽于105℃烘干至恒重,混匀,备用。

无机硒测定的预处理:称取0.2 g样品(精确到0.001 g)于具塞刻度试管中,加50%盐酸溶液10 mL,超声波混匀30 min后,沸水浴30 min,冷却后用脱脂棉过滤。

有机硒的测定:通过总硒含量减去无机硒含量,得到有机硒的含量。

1.4.2 微波消解

称取样品0.2 g(精确到0.001 g)于消化管中,加入2 mL蒸馏水,2 mL、30%过氧化氢,4 mL硝酸,混合均匀,于微波消化仪中消化,消化条件如表1:

表1 微波消化条件参数

Nr	t/min	E/W	T/℃
1	5	1000	130
2	5	1000	180
3	25	1000	180
4	40	0	45

冷却后放置赶酸架赶酸,再加5 mL盐酸(6 mol/L),继续加热至溶液变为清凉无色并伴有白烟出现,将六价硒还原为四价硒。冷却,转移样品消化液于25 mL容量瓶中定容,混匀备用,同时做空白试验。

1.4.3 原子荧光光谱仪测定条件

负高压:270 V;灯电流:40 mA;原子化器温度:

200 ℃；炉温：203 ℃；载气流速：300 mL/min；屏蔽气流速：600 mL/min；测量方式：标准曲线法；读数方式：面积；延迟时间：3 s；读数时间：15 s；进样体积：1 mL；重复测量次数：3 次。

1.5 不同可溶性蛋白的分步提取

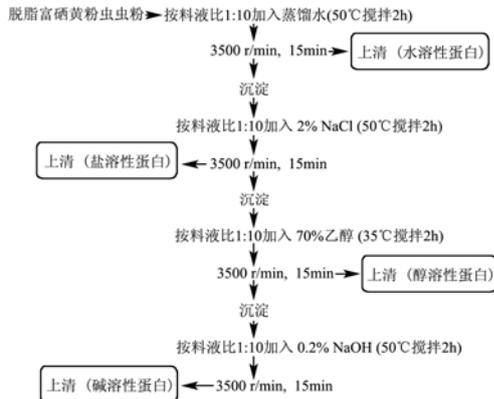


图 1 可溶性蛋白提取流程图

Fig.1 Flow chart of soluble protein extraction

按照图 1 制备 Se-TM 和 TM 不同蛋白组分，采用凯氏定氮法测定各组分提取液中的蛋白含量。通过硫酸铵沉淀法沉淀四种可溶性蛋白，3500 u 透析袋过夜透析后，收集透析袋内液体，冷冻干燥，备用。

1.6 SDS-PAGE

采用经典 Laemmli 法^[17]，浓缩胶 5%，分离胶 15%，80 V 电泳 5 min，120 V 电泳 2 h。将四种可溶性蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，用考马斯亮蓝 R-250 染色 20~30 min，过夜脱色。脱色完成后，与 marker 对照观察亚基条带组成。SDS-PAGE 电泳配方如下表 2 所示。

1.7 水解度的测定

因本实验的水解在中性及碱性条件下进行，因此

表 3 蛋白酶作用条件

Table 3 Enzymatic hydrolysis conditions

名称	酶活力	最适 pH	最适温度/℃	作用类型	酶切位点
碱性蛋白酶	200000U/g	8.5	50	内切	疏水氨基酸的 C 末端
中性蛋白酶	60000 U/g	7.5	55	内切	无特异性
胰蛋白酶	250 NF/mg	8.0	40	内切	Lys、Arg 残基
风味蛋白酶	20 U/mg	7.0	50	内切+外切	无特异性

1.9 富硒黄粉虫多肽 Se-TMP 和普通黄粉虫多

肽 TMP 对红细胞溶血的抑制作用

1.9.1 对 AAPH (2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐) 诱导红细胞氧化性溶血的保护作用

选用 pH-stat 法进行测定^[8]。水解度计算公式如下：

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

公式中， h ：单位质量蛋白中被裂解的肽键数 (mmol/g)； h_{tot} ：单位质量原料蛋白中肽键的总数 (mmol/g)，某一特定蛋白质的该值为一特定值，黄粉虫蛋白的 h_{tot} 参照代春华根据其蛋白质组成计算得出的 7.57^[8]。

当溶液中 pH≥6 时候，蛋白的水解过程中断裂的肽键量与加入碱量的定量关系如下：

$$h = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p}$$

式中， B ：NaOH 消耗量，mL； N_b ：NaOH 浓度，mol/L； M_p ：被水解的蛋白质量，g； α ：不同条件下的校正系数^[8]。

表 2 SDS-PAGE 电泳配方

Table 2 SDS-PAGE formulation

贮液	5%浓缩胶/mL	15%分离胶/mL
蒸馏水	5.5	1.5
30% Acr-Bis	1.3	7.5
1 M Tris, pH 8.8	1	5.7
10% SDS	0.08	0.15
10% AP	0.08	0.15
TEMED	0.008	0.006

1.8 虫粉蛋白的酶解

取一定量的脱脂虫粉，加入适量蒸馏水制成底物浓度为 4% 的溶液，95 ℃ 下水浴灭酶 5 min，冷却至室温，准备开始进行酶解。加酶量为 40000 U/g 虫粉，调节温度和 pH 到各酶的最适条件下酶解 4 h，酶解过程中加入 0.2 mol/L 的 NaOH 维持水解 pH。酶解结束后，95 ℃ 水浴保持 5 min 灭酶，冷却至室温对酶解液 10000 g 离心力下离心 10 min，取上清液即为酶解粗提液，冷冻干燥后保存于 4 ℃ 冰箱。

通过红细胞氧化溶血模型，研究 Se-TMP 对 AAPH 诱导的细胞氧化溶血的抑制情况，从而评估其抗氧化活性。

将人血红细胞于 4 ℃ 下，1200 r/min 离心 10 min 去血浆，用 pH 7.4 的 PBS 洗涤 2~3 次，洗净的红细胞用 PBS 配置为 20% 细胞悬液。0.2 mL 细胞悬液加

入 0.2 mL 不同浓度样品溶液, 于 37 °C 预培养 30 min, 加入 0.4 mL、200 mM AAPH, 于 37 °C 避光培养 2 h, 加入 5 mL PBS 稀释, 1200 r/min 离心 10 min, 上清于 540 nm 下测吸光值; 正常组用 PBS 替代样品和 AAPH; 损伤组用 PBS 代替样品; 毒性实验组用 PBS 代替 AAPH, 全溶血组用蒸馏水代替样品和 AAPH。

溶血抑制率=(1-样品组吸光值/全溶血组吸光值)×100%

1.9.2 扫描电镜观察细胞形态

将 1.8.1 处理的细胞用 PBS 洗涤 2 次, 加入 30 倍体积的 2.5% 戊二醛, 4 °C 下固定 1 h, 将固定后的细胞薄薄地涂抹一层于盖玻片上, 依次用 50%、65%、75% 和 85% 酒精逐级脱水, 取出自然风干, 喷金, 电镜 (EM-1530) 下进行扫描, 观察细胞形态。

1.9.3 红细胞内 MDA 测定

表 4 富硒黄粉虫 (Se-TM) 与普通黄粉虫 (TM) 虫粉基本成分

Table 4 Basic components in powder of Se-enriched *T. molitor* and ordinary *T. molitor*

虫粉	水分/%	脂肪		蛋白	
		湿重/%	干重/%	湿重/%	干重/%
普通	2.74±0.46	36.29±0.48	37.31±0.49	52.39±0.60	53.86±0.62
富硒	8.04±0.04	30.39±0.66	33.05±0.72	54.37±1.54	59.12±1.67

由表 4 可知, TM 相比, Se-TM 蛋白含量略有上升, 脂肪含量相对减少; 采用独立样本 T 检验对两组数据进行显著性分析, 结果显示: 在 99% 的置信区间, Se-TM 与 TM 的蛋白及油脂含量具有显著性差异 ($\alpha=0.01$)。说明硒的加入可能对黄粉虫体内生物大分

将 1.8.1 处理的细胞用 PBS 洗涤 2 次, 1200 r/min 离心 5 min, 沉淀的细胞用 5 倍体积蒸馏水裂解细胞, 4 °C 下裂解 10 min, 1200 r/min 离心 5 min 收集清液用试剂盒测定 MDA 值。

1.10 统计分析

所有试验重复 3 次。结果以平均值±标准差表示, 统计分析采用 SPSS 处理, 差异显著性分析包括 SPSS 中的 Duncan's 法 (显著性差异以小写字母标注) 和独立样本 T 检验。

2 结果与分析

2.1 富硒对黄粉虫组成的影响

2.1.1 富硒对黄粉虫主要成分影响

表 5 Se-TM 与 TM 虫粉硒含量

Table 5 Selenium content in Se-enriched *T. molitor* and ordinary *T. molitor*

虫粉	总硒(μg/kg)	无机硒		有机硒	
		μg/g	%	μg/g	%
普通	220.10±24.06	174.61±11.81	79.33±3.02	45.51±8.89	20.67±4.04
富硒	573.32±24.89	48.43±9.40	8.44±1.64	524.91±33.80	91.56±5.90

对 Se-TM 与 TM 虫粉进行硒含量的测定, 结果如表 5, 相较于普通黄粉虫 (TM), 富硒培养的黄粉虫, 其总硒含量由 220.1 μg/kg 增大至 573.32 μg/kg, 有机硒含量由 TM 的 45.51 μg/kg 上升为 524.91 μg/kg。因黄粉虫杂食、高转化率的特点, 可以大量摄取并富集周围环境中的微量元素, 因此 MT 体内仍有一定量的硒, 其中 79.33% 以无机形式存在; 富硒后总硒含量增加了 1.6 倍, 其中有机硒含量提高了十倍以上, 近 92% 的硒以有机硒形态存在, 无机硒的含量由 TM 的 79% 降低至 8%, 说明富硒培养一定程度上能促进黄粉虫对无机硒向有机硒的生物转化。

关于富硒食品的标准, 目前仅有《富硒稻谷》国家标准及湖北省发布的《富有机硒食品含硒量要求》

子的代谢有一定影响, 其中蛋白含量增大可能是为了结合更多的硒^[3]。Se-TM 和 TM 的蛋白含量分别为 53.86% 和 59.12%, 均以干重计。

2.1.2 富硒对黄粉虫硒含量的影响

等少数地方标准; 其中湖北 DB《富有机硒食品硒含量要求》规定, 富硒食品中总硒含量最低要达到 200 μg/kg (固体) 或 100 μg/L (液体), 且有机硒含量大于其总硒含量 80%, 才可声称“富有机硒”食品; 而根据食品安全国家标准的规定, 食品中的硒, 不论是无机硒还是有机硒, 只要含量达到 150 μg/kg (固体) 或 75 μg/L (液体), 且强化的硒符合《食品营养强化剂使用标准》(GB 14880-2012) 的要求, 即可声称“富含硒”或“富硒”食品。

2.1.3 富硒对黄粉虫蛋白组成的影响

由表 6 可以看出, 不溶组分和可溶组分中蛋白含量占总蛋白比例趋势为: 残渣蛋白>碱溶蛋白>水溶蛋白>盐溶蛋白>醇溶蛋白, Se-TM 和 TM 均有一半以上

的蛋白存在于残渣中，未能溶出。相较于 TM 蛋白，Se-TM 水溶蛋白比例增加，盐溶、醇溶、碱溶蛋白的比例相对降低，通过独立样品 T 检验分析显示：TMP 和 Se-TMP 的水溶蛋白含量在 99% 的置信区间有显著性差异 ($\alpha=0.01$)，醇溶蛋白含量在 95% 的置信区间有显著性差异 ($\alpha=0.05$)。说明富硒对黄粉虫体内蛋白的合成代谢可能有一定影响，导致不同溶解性蛋白组成的变化；而四种可溶性蛋白在总蛋白中所占比例的趋势没有变化。

表 6 Se-TM 和 TM 中各可溶性蛋白和残渣蛋白占总蛋白比例

Table 6 Proportions of four soluble proteins of Se-TM and TM in total protein

名称	TM 蛋白含量/%	Se-TM 蛋白含量/%
水溶蛋白	14.50±0.42 ^c	19.29±1.53 ^c
盐溶蛋白	2.71±0.17 ^d	2.43±0.34 ^d
醇溶蛋白	2.51±0.38 ^d	1.66±0.11 ^d
碱溶蛋白	33.52±6.14 ^b	24.81±0.29 ^b
残渣蛋白	50.99±2.02 ^a	50.61±1.56 ^a

注：采用 Duncan's 法，a~d 不同字母表示同一列数据间有显著性差异 ($p<0.05$)。

2.1.4 富硒对黄粉虫蛋白分布的影响

从图 2 可以进一步看到，相较于 TM，Se-TM 碱溶性蛋白中，分子量在 75 ku 左右的条带变浅，约 50 ku 的条带加深；水溶性蛋白和盐溶性蛋白中，分子量约在 37 ku 左右 (32~40 ku) 的条带明显变深；此外，TM 盐溶蛋白中 27 ku 处的条带，在 Se-TM 盐溶蛋白中不存在，新出现一条 20 ku 分子量对应的条带；Se-TM 与 TM 醇溶蛋白的 SDS-PAGE 电泳条带变化不明显，进一步说明硒的加入可能影响了黄粉虫体内蛋白质的合成代谢，导致蛋白种类分布的改变。

表 7 Se-TM 可溶组分和不溶组分蛋白含量及硒含量

Table 7 Protein content and selenium content in Se-enriched *T. molitor* (Se-TM)

富硒样品	蛋白含量			硒含量		
	mg/g	g	%	μg/kg	μg	%
40 g 脱脂虫粉	736.09±13.45	29.44±0.54	100	573.32±24.89	22.93±1.00	100
水溶蛋白	142.02±11.25	5.68±0.45 ^c	19.29±1.53 ^c	630.33±83.55	3.69±0.49 ^c	16.11±2.14 ^c
盐溶蛋白	17.89±2.51	0.72±0.1 ^d	2.43±0.34 ^d	877.51±99.80	0.63±0.07 ^d	2.76±0.31 ^d
醇溶蛋白	12.20±0.84	0.49±0.03 ^d	1.66±0.11 ^d	371.39±69.14	0.18±0.03 ^d	0.79±0.15 ^e
碱溶蛋白	182.64±2.13	7.31±0.09 ^b	24.81±0.29 ^b	835.04±72.89	6.10±0.53 ^b	26.62±2.32 ^b
残渣	372.53±11.45	14.74±0.23 ^a	50.61±1.56 ^a	725.51±62.74	10.69±0.92 ^a	46.63±4.03 ^a

注：采用 Duncan's 法，a~d 不同字母表示同一列数据间有显著性差异 ($p<0.05$)。

由表 7 数据显示，Se-TM 脱脂虫粉中总蛋白含量高达 736.09 mg/g，Se 含量为 573.32 μg/kg。Se-TM 的可溶性蛋白中以碱溶性蛋白为主，占总蛋白的 24.81%，硒含量为 835.04 μg/kg，占总硒的 26.62%；

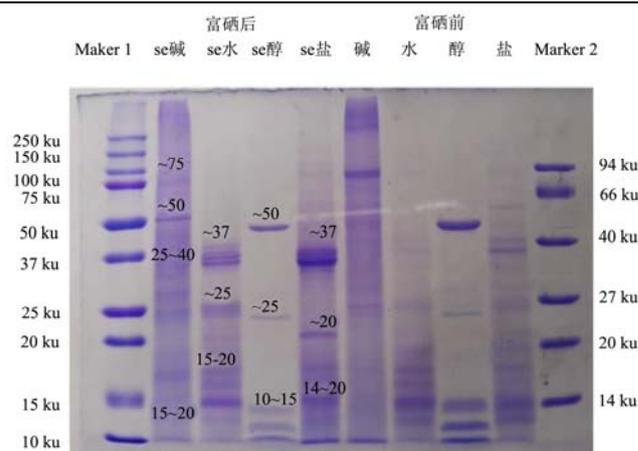


图 2 Se-TM 和 TM 中四种可溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE image of four soluble proteins in Se-TM and TM

通过比对黄粉虫蛋白数据库，对其四种可溶性蛋白进行归纳分析，Se-TM 与 TM 的蛋白条带分布主要发生变化的分子量为：75 ku、50 ku 和 37 ku (32~40 ku)；变化条带对应的蛋白分别可能为原肌球蛋白 1， α -淀粉酶，精氨酸激酶和原肌球蛋白 2；其中， α -淀粉酶、精氨酸激酶是文献报道过的黄粉虫体内含有的过敏原，在加热或水解处理后可显著降低其致敏性^[4]，而酶解过程包括了高温灭酶和蛋白的水解，因此，考虑到直接对黄粉虫蛋白进行利用的安全性，选择对富硒黄粉虫蛋白酶解得到的产物多肽进行下一步的研究。

2.2 Se-TM 蛋白含量及硒含量

富硒黄粉虫经过粉碎、脱油处理后，对其不同溶解性的蛋白进行分步依次提取，各蛋白的含量、硒含量如表 7 所示。

其次为水溶性蛋白 (142.02 mg/g)，占总蛋白的 19.29%，硒含量占总硒的 16.11%；盐溶性和醇溶性组分中蛋白含量及其硒含量所占比率均较低；可溶蛋白组分中的硒含量占总硒的 46.28%，占有有机硒的

50.55%；此外，有 50.61%的蛋白存在于残渣中未能溶出，相应的有 46.63%的硒存在于残渣中，硒含量达 725.51 μg/kg。

硒的分布情况为：残渣>碱溶蛋白>水溶蛋白>盐溶蛋白>醇溶蛋白，与蛋白含量的分布趋势一致，说明硒在富硒黄粉虫中的分布与其蛋白的分布有一定相关性；前人对富硒茶叶^[2]、富硒灵芝^[3]和富硒螺旋藻^[1]进行研究，发现其中硒主要以含硒蛋白形式存在，与本实验的结论相符。可溶和不溶组分中的蛋白质量之和占总蛋白的 98.80%，测定的硒含量之和占总硒的 92.91%，实验操作可能导致部分硒在蛋白提取、处理及硒的测定前处理过程中损失掉，除了与蛋白结合，有部分硒可能与其他生物分子结合，如多糖和核酸等生物大分子^[2]。

考虑到有一半以上的蛋白及硒仍存在于残渣中，为了最大限度的获得富硒多肽，之后的实验直接对过 40 目筛后的脱脂虫粉进行酶解。

2.3 富硒黄粉虫蛋白的酶解

通过前期的实验探索发现富硒黄粉虫中大量硒存在于不溶性组分中，因此这里直接对过 40 目筛后的脱脂虫粉进行酶解。选用碱性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶和中性蛋白酶酶解 Se-TM 脱脂虫粉蛋白，加入相同活力酶量，在各自最适条件下酶解 2 h，分别得到含硒多肽 Se-TMP-J、Se-TMP-Y、Se-TMP-F 和 Se-TMP-Z，对酶解产物进行硒含量的测定。

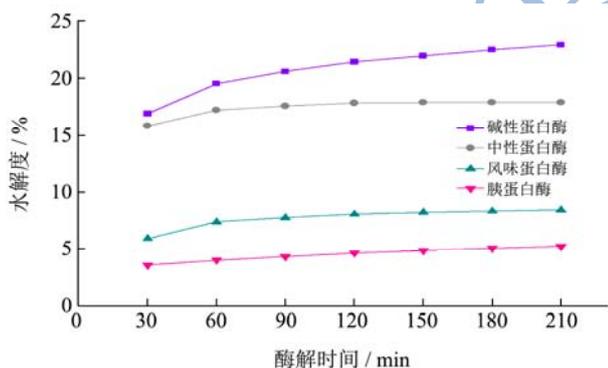


图3 不同蛋白酶处理的水解度

Fig.3 Degree of hydrolysis by four protease treatments of Se-TM

从图3可知，在酶解时间内，不同的蛋白酶酶解相同时间对底物的水解度不同，水解效率依次为：碱性蛋白酶>中性蛋白酶>风味蛋白酶>胰蛋白酶，其中碱性蛋白酶在水解各时间段内，对底物的水解程度均大于其他三种酶，在酶解 60 min 即可达到近 20%水解度，此后水解度随时间变化逐渐减慢，水解至 13 h 后达到 30%水解度（因时间太久图中未作出）。

从图4可以看出，酶解相同的时间，不同蛋白酶水解得到的含硒多肽的硒含量有显著性差异 ($p<0.05$)，依次为 Se-TMP-J>Se-TMP-Y>Se-TMP-F>Se-TMP-Z。其中，碱性蛋白酶的酶切位点为疏水氨基酸的 C 末端，胰蛋白酶主要作用于精氨酸和赖氨酸，风味蛋白酶和中性蛋白酶是非特异性酶，没有特定识别的酶切位点，除了风味蛋白酶的作为类型为内切+外切，其余三种蛋白酶均为内切酶。可能是由于有机硒在生物体中主要以硒代蛋氨酸 (SeMet) 和硒代半胱氨酸 (SeCys) 的硒代氨基酸形式存在，而四种蛋白酶的作用方式、酶切位点不同，导致切下的可溶性肽段中，含有的 SeMet 和 SeCys 的比例组成不同所致。

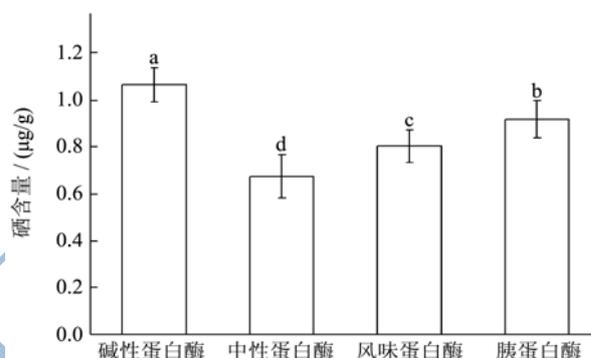


图4 不同蛋白酶处理后的含硒多肽硒含量

Fig.4 Selenium content of Se-TMP-J, Se-TMP-Y, Se-TMP-F, and Se-TMP-Z

注：a~d 不同小写字母表示组间有显著性差异 ($p<0.05$)。

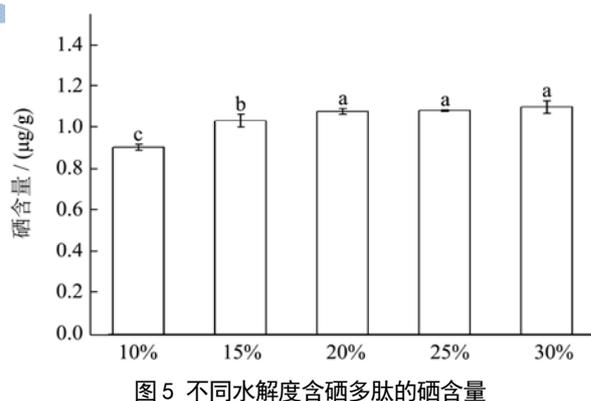


图5 不同水解度含硒多肽的硒含量

Fig.5 Selenium content of Se-TMP with different DHs

注：不同小写字母表示组间有显著性差异 ($p<0.05$)，相同小写字母表示无显著性差异。

从图5可知，用碱性蛋白酶酶解不同时间得到不同水解度的含硒多肽，在水解度达到 20%之前，随水解度的增加硒含量逐渐增加，水解度达到 20%之后，硒含量没有显著性的差异。可能是因为碱性蛋白酶作用下，Se-TM 的蛋白中含硒氨基酸所在肽段主要在水解的前期被酶切下来，当水解度达 20%，含硒氨基酸已较充分酶切出来。

由此,以经碱性蛋白酶酶解至水解度 20%的虫蛋白水解多肽为原料,来进行后续的富硒前后活性对比试验。

2.4 富硒对黄粉虫水解多肽抗氧化活性的影响

2.4.1 Se-TMP 和 TMP 对 AAPH 诱导的红细胞溶血的保护作用对比

红细胞氧化模型是通过添加抗氧化剂来抑制自由基诱发的红细胞损伤,测定反应终体系中溶血抑制率来评价保护剂细胞内抗氧化活性的一种方法,由于其氧化响应灵敏,代谢机制简单,是建立抗氧化评价方法的理想模型^[18]。

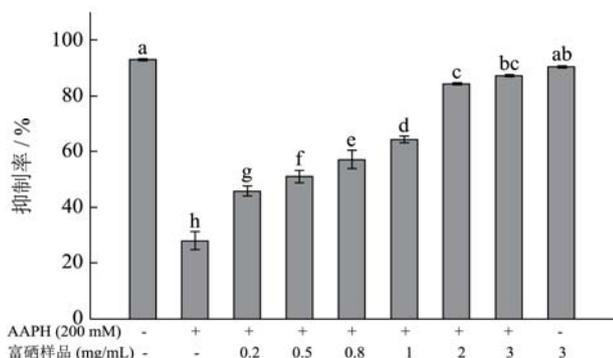


图 6 Se-TMP 对红细胞溶血的抑制作用

Fig.6 Inhibitory effects of Se-TMP on AAPH-induced erythrocyte hemolysis

注: a-h 不同小写字母表示组间有显著性差异 ($p < 0.05$)。

图 6 中,正常细胞组红细胞溶血抑制率为 92.89%,Se-TMP 毒性实验组的抑制率为 90.56%,接近正常组;通过差异显著性分析 ($p < 0.05$),显示 Se-TMP 自身对红细胞溶血有一定影响,但不显著 ($p > 0.05$),可能是由于样品为粗多肽,未经纯化,含有酶解过程带入的杂质而对红细胞造成影响;AAPH 损伤组的红细胞溶血抑制率为 27.77%,经不同浓度 Se-TMP 保护,AAPH 引发的红细胞溶血情况得到了不同程度的抑制,抑制率与样品浓度间成正相关关系。在低浓度和中浓度区间,不同浓度 Se-TMP 对红细胞溶血的保护效果差异显著 ($p < 0.05$),高浓度区间的样品对红细胞的保护作用无显著性差异 ($p > 0.05$);即样品浓度由 0.2 mg/mL 升至 2 mg/mL,对红细胞溶血的抑制率由 45.58% 提高到 84.03%,继续增大样品浓度达到 3 mg/mL,对细胞的溶血抑制率为 88.32%;经差异分析显示,在对红细胞溶血抑制率的表现上,浓度为 2 mg/mL 与 3 mg/mL 的样品保护组间无显著性差异 ($p > 0.05$)。

进一步对比 Se-TMP 与 TMP 对 AAPH 诱导红细

胞溶血的保护作用,如图 7 所示,各浓度下的 Se-TMP 与 TMP 均能显著减小红细胞的溶血率;在样品浓度达 3 mg/mL 前,Se-TMP 与 TMP 对红细胞溶血的保护作用表现出了显著性差异 ($p < 0.05$);当样品浓度达到 3 mg/mL,富硒组与普通组样品对红细胞的保护作用的差异不再显著 ($p > 0.05$),抑制率分别为 88.32% 和 86.10%。说明 Se-TMP 与 TMP 均能有效的保护受 AAPH 诱导损伤的人血红细胞,且在 0.2~2 mg/mL 浓度下,Se-TMP 的保护作用显著高于 TMP。

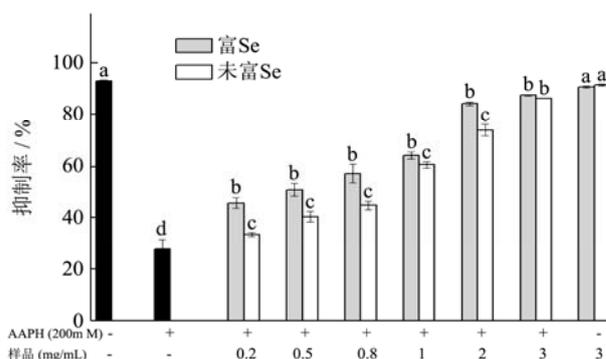


图 7 Se-TMP 和 TMP 对红细胞溶血抑制率的对比

Fig.7 Comparison of inhibitory effects between Se-TMP and TMP on AAPH-induced erythrocyte hemolysis

注: 差异分析对象为各浓度下,正常组、损伤组、富硒多肽 (Se-TMP) 和未富硒多肽 (TMP) 对红细胞溶血抑制率的差异 ($p < 0.05$)。

2.4.2 Se-TMP 与 TMP 对人血红细胞膜的保护作用对比

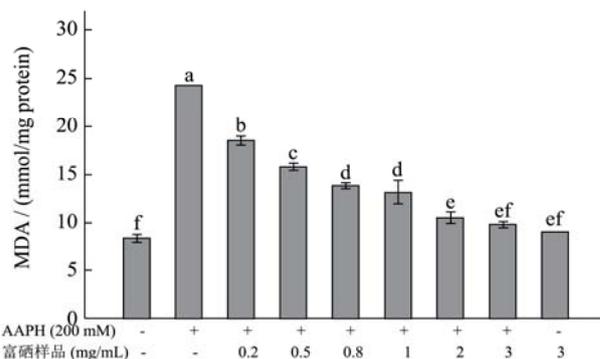


图 8 不同浓度 Se-TMP 保护下 AAPH 氧化损伤红细胞内 MDA 变化

Fig.8 Changes in MDA content in AAPH-induced oxidative damaged red blood cells under protections of Se-TMP at different concentrations

注: a-f 不同小写字母表示组间有显著性差异 ($p < 0.05$)。

AAPH 引发的自由基链式反应开始后,迅速进攻细胞膜中的不饱和脂肪酸 (LH),诱导磷脂层发生脂质过氧化反应,细胞内 MDA 含量随之增加,并且与膜蛋白游离氨基交联,逐步氧化改变细胞膜的结构^[19]。

图 8 显示,较正常对照组的 8.35 nmol/mg, AAPH

损伤组 MDA 含量显著增高至 24.14 nmol/mg, 而在不同浓度 (0.2~3 mg/mL) Se-TMP 保护下, MDA 的含量则由 18.48 nmol/mg 不断下降至 9.80 nmol/mg, 接近正常对照组。

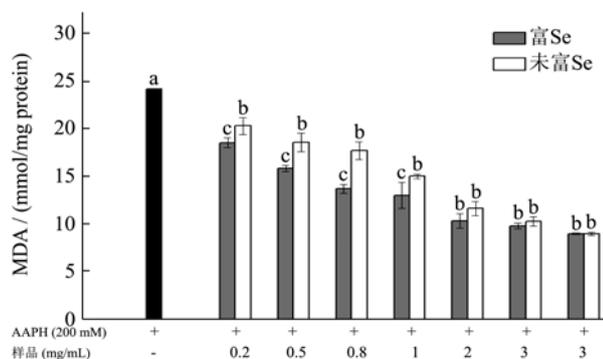


图9 不同浓度 Se-TMP、TMP 保护下的 AAPH 氧化损伤红细胞内 MDA 对比

Fig.9 Comparison of the MDA content in AAPH-induced oxidative damaged red blood cells under protection of Se-TMP and TMP

注: 差异分析对象为各浓度下, Se-TMP、TMP 保护下与损伤组氧化损伤红细胞内 MDA 含量差异 ($p < 0.05$)。

进一步对比 Se-TMP 与 TMP 保护下 AAPH 氧化损伤的红细胞内 MDA 的产生情况, 结果如图 9, 表明在实验的各浓度下, Se-TMP 保护下的受损红细胞内产生的 MDA 均低于 TMP 保护组, MDA 的产生趋势与红细胞溶血抑制率结果相似, 说明 Se-TMP 与 TMP 均能一定程度保护人血红细胞膜免受自由基的氧化攻击, 减少细胞内 MDA 的产生; 0.2~1 mg/mL 浓度范围内, Se-TMP 的保护作用显著高于 TMP。

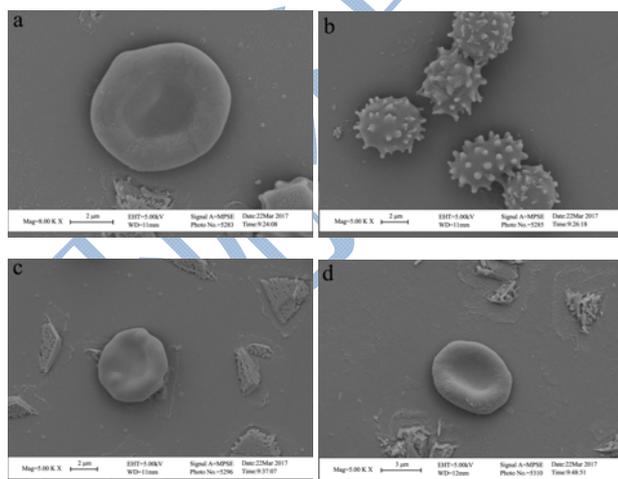


图 10 几种不同处理的人血红细胞电镜图

Fig.10 Scanning electron micrographs of human red blood cells with different treatments

注: a 表示正常人血红细胞; b 表示 AAPH 损伤红细胞; c 表示 TMP (2 mg/mL) 保护下的 AAPH 损伤红细胞; d 表示

Se-TMP (2 mg/mL) 保护下的 AAPH 损伤红细胞。

图 10a 为正常红细胞在扫描电镜下的形态, 呈双面凹的圆饼状, 中间薄, 边缘厚, 表面平滑。图 10b 为 AAPH 损伤处理后的细胞, 细胞膜皱缩、棘突明显, 呈星芒状。图 10c、10d 分别为 TMP、Se-TMP 保护下的损伤红细胞, 两图中的红细胞仍呈中间凹陷的圆饼状, 基本形态均得以保持; 此外, TMP 保护组的红细胞表面略有皱缩, 边缘有棘突趋势, 而 Se-TMP 保护组的细胞膜表面略有皱缩, 无棘突趋势, 十分接近正常红细胞形态。

MDA 测定和扫描电镜结果表明, Se-TMP 和 TMP 均可保护人血红细胞膜免受自由基的氧化攻击; 同样浓度下, Se-TMP 对红细胞膜的保护效果较 TMP 更好, 说明硒的加入可以一定程度提高 TMP 对人血红细胞膜的保护作用。

3 结论

本文讨论了富硒黄粉虫体内蛋白及硒含量的变化情况, 并对其蛋白进行酶解获得含硒多肽 Se-TMP, 进一步研究 Se-TMP 对 AAPH 诱导的细胞氧化溶血的抑制情况, 从而评估其抗氧化活性。结果显示, 富硒黄粉虫的蛋白含量较未富硒虫粉高, 而其油脂所占比例降低, 分子量对应 75 ku 和 37 ku 的蛋白电泳条带在富硒后变深, 对应的蛋白分别可能为原肌球蛋白 1 和精氨酸激酶, 其中精氨酸激酶是文献报道过的黄粉虫体内的过敏原, 在加热或水解处理后可降低其致敏性^[20], 因此对富硒黄粉虫蛋白进行酶解制成含硒多肽能更好的对其进行利用。经过富硒培养, 黄粉虫能有效的将无机硒生物转换为有机形态, 大大提高了有机硒在总硒含量中的比例。经碱性蛋白酶酶解制成的水解度为 20% 的 Se-TMP 和 TMP, 均表现出较强细胞抗氧化活性, 同浓度下 Se-TMP 的活性明显高于 TMP, 其保护机理可能是: 通过直接清除 AAPH 引发的自由基, 以减少细胞膜收到的氧化进攻^[21], 也可能是在细胞膜周围形成一层保护膜阻断自由基对细胞膜的进攻途径^[22], 具体机理仍需进一步实验探索。此前, 已有人对富硒螺旋藻、富硒茶叶、富硒灵芝和富硒花生^[1-4]等植物进行硒蛋白、含硒多肽的制备及研究, 但以动物蛋白作为富硒对象的研究仍很少见。相较于植物蛋白, 动物蛋白更易被人体消化吸收, 其蛋白质种类和结构更接近人体的蛋白结构和数量, 有着植物蛋白不能替代的营养价值, 本实验为以动物蛋白为原料进行有机硒的富集及对其含硒活性多肽的研究提供实验依据。

参考文献

- [1] 黄峰,单雪风,张水妹,等.螺旋藻富硒转化含硒蛋白质的鉴定及其抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2015,31(7):99-104
HUANG Feng, SHAN Xue-feng, ZHANG Shui-mei, et al. Identification of selenoproteins formed via biotransformation of selenium-enriched streptomyces platensis and their oxygen free radical scavenging activities [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 99-104
- [2] 高柱,蔡荟梅,彭传毅,等.富硒茶叶中硒的赋存形态研究[J].中国食物与应用,2014,20(1):31-33
GAO Zhu, CAI Hui-mei, PENG Chuan-yi, et al. Distribution rule and combined forms of selenium in selenium-enriched tea [J]. Food and Nutrition in China, 2014, 20(1): 31-33
- [3] 赵镭,杜明,张美莉,等.硒在富硒灵芝中的分布[J].中国食品学报,2005,5(4):119-123
ZHAO Lei, DU Ming, ZHANG Mei-li, et al. Selenium distribution in se-enriched lucid ganoderma [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2005, 5(4): 119-123
- [4] 程祥,熊华,胡居吾.富硒花生油和富硒花生蛋白的基本性质研究[J].中国油脂,2013,38(7):95-97
CHENG Xiang, XIONG Hua, HU Ju-wu. Basic properties of selenium enriched peanut oil and protein [J]. China Oils and Fats, 2013, 38(7): 95-97
- [5] 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
- [6] 张建新,孙长江.黄粉虫抗菌肽的分离纯化及生物活性研究[J].现代食品科技,2016,32(1):116-121
ZHANG Jian-xin, SUN Chang-jiang. Separation, purification and biological activity evaluation of antimicrobial peptides from *tenebrio molitor* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(1): 116-121
- [7] 张莉莎,张建新,欧晓锋,等.黄粉虫抗氧化活性肽的分离纯化研究[J].食品科学,2009,30(22):180-183
ZHANG Li-sha, ZHANG Jian-xin, OU Xiao-feng. Separation and purification of antioxidant peptides from yellow mealworm [J]. Food Science, 2009, 30(22): 180-183
- [8] 代春华.黄粉虫幼虫蛋白酶解制备降血压肽的研究[D].无锡:江南大学,2012
DAI Chun-hua. Study on antihypertensive peptides from *Tenebrio molitor* larva protein htdrolysate [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012
- [9] Sunde R A. Selenium. In: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. Modern nutrition in health and disease. 11th ed [M]. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2012
- [10] Sunde R A. Selenium. In: Bowman B, Russell R, eds. Present knowledge in nutrition. 9th ed [M]. Washington, D C: International Life Sciences Institute, 2006
- [11] Terry E N, Diamond A M. Selenium. In: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, eds. Present knowledge in nutrition. 10th ed [M]. Washington, DC: Wiley-Blackwell, 2012
- [12] Sunde R A. Selenium. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, et al. Encyclopedia of dietary supplements. 2nd ed [M]. London and New York: Informa Healthcare, 2010
- [13] Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes: vitamin c, vitamin e, selenium, and carotenoids [M]. Washington, DC: National Academy Press, 2000
- [14] Rayman M P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake [J]. Br. J. Nutr., 2008, 100(2): 254-68
- [15] Rayman M P. Selenium and human health [J]. Lancet, 2012, 379: 1256-68
- [16] Verena Nowak, DiedelindePersijn, Doris Rittenschober, et al. Review of food composition data for edible insects [J]. Food Chemistry, 2016, 193: 39-46
- [17] 柯根林 J E.精编蛋白质科学实验指南[M].北京:科学出版社,2007
Ke Genlin J E. Guide to refined protein science experiment [M]. Beijing: Science Press, 2007
- [18] 张虹,张猛猛,赖富饶,等.甜菜碱保护细胞免受 AAPH 损伤的研究[J].现代食品科技,2016,32(6):18-24
ZHANG Hong, ZHANG Meng-meng, LAI Fu-rao, et al. Protective effects of betaine on 2,2-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress in cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 18-24
- [19] Clemens M R, Waller H D. Lipid peroxidation in erythrocytes [J]. Chemistry and Physics of Lipids, 1987, 45: 251-268
- [20] Sarah van Broekhoven, Shanna Bastiaan-Net, Nicolette W De Jong, et al. Influence of processing and *in vitro* digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species [J]. Food Chemistry, 2016: 1075-1083
- [21] 任尧.宽体金线蛭/东亚钳蝎分离蛋白中抗凝血、抗疲劳活性肽的酶法制备及其结构鉴定研究[D].广州:华南理工大

学,2015

REN Yao. Study on enzymatic preparation and identification of anticoagulant peptides from whitmaniapigra and buthusmartensii kirsch protein isolation hydrolysates and their antifatigue effect *in vivo* [D]. Guangzhou: South China

University of Technology, 2015

[22] Meng-meng Zhang, Guang Wang, Hui Wu, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidiumeyenil* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(9): 1921-1931

现代食品科技