

酵母同化无机硒作用的研究

谢丽琪 欧阳政 谢秀祯

(暨南大学化学系, 广州)

本文报道了酵母在同化无机硒为有机硒的过程中, 培养基的种类、亚硒酸钠浓度以及蛋氨酸浓度与生成的硒酵母中的硒蛋氨酸量的某些规律。实验结果表明: 硒酵母中硒蛋氨酸的量与培养基的种类有关, 随培养基中亚硒酸钠浓度的增加而增加, 而随蛋氨酸浓度的增加而减少。提出了一个准确测定生物物质中硒代氨基酸的分析方法。

关键词 硒蛋氨酸; 硒代氨基酸; 硒酵母; 同化作用

硒是人体必需的微量元素, 其生物学作用是通过参与组成一种硒酶——谷胱甘肽过氧化物酶(用 GSH-Px 表示)来实现。这种硒酶具有清除对人体有害的自由基的作用, 因而具有抗病抑癌的功能。实验证明, 人体硒含量与癌症等的发病率呈负相关; 已证明为缺硒或低硒地区的居民补充适量硒对防病治病是有效的^[1]。有人对无机硒制剂和有机硒制剂作过比较, 确证后者的生物活性和毒性都远较前者好。目前最理想的有机硒制剂是价廉易得的硒酵母。美国于 80 年代初已有硒酵母商品出售。我国也已于近年制成了硒酵母并对它的抑癌作用进行了研究^[2]。

硒酵母是利用活酵母同化无机硒为有机硒制得的。但是过去的研究仅限于培养条件与硒酵母中的总硒量的关系, 而没有涉及与硒酵母中有机硒的形态和含量的关系, 硒酵母中含有何种硒代氨基酸及其相对含量, 国内外都还没有定论^[2,3], 原因在于硒代氨基酸在酸水解过程中易受破坏。本文提出的溴化氰—气相色谱法完满地解决了上述问题。这些方法也适用于其它生物物质中硒代氨基酸的分析。

材料和方法

(一) 材料

1. 酵母: 啤酒酵母, 由暨南大学生物系提供。

2. 培养基: 使用 No.1、No.2 和 No.3 培养基进行试验。

No.1 培养基: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100mg, NaCl 100 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mg, KH_2PO_4 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g, H_3BO_3 500 μg , KI 1mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 400 μg , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2mg, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, 葡萄糖 20g, 尼古酸 20 μg , 对氨基苯甲酸 10 μg , 吡哆醇 20 μg , 核黄素 10 μg , 维生素 H 0.1 μg , 泛酸钙 20 μg , 叶酸 0.1 μg , 环己六醇 100 μg , L-异亮氨酸 300 μg , L-酪氨酸 300 μg , L-亮氨酸 600 μg , L-苯丙氨酸 500 μg , L-缬氨酸 1.5mg, 硫酸腺嘌呤 200 μg , L-精氨酸 200 μg , L-组氨酸 200 μg , L-色氨酸 200 μg , 尿嘧啶 200 μg , 硫胺素 0.4 μg , L-赖氨酸 300 μg , 用水溶解并稀释至 1000ml, 调 $\text{pH} = 6.0$ 。

本文于 1988 年 10 月 20 日收到。

本课题为国家自然科学基金资助项目。

No.2 培养基: 葡萄糖 20g, 甘氨酸 10g, 酵母粉 1g, 用蒸馏水稀释至 1000ml。

No.3 培养基: 取干麦芽碎粒, 加入其四倍重量的水, 在 65—70℃ 下糖化, 用碘试剂检验直至糖化完全, 过滤得麦芽汁, 灭菌备用。

3. Na_2SeO_3 溶液: 配成 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液, 高压灭菌备用。

4. 仪器: 上海产 930 型荧光光度计; 102G 型气相色谱仪, 附氢火焰离子化检测器。

(二) 方法

1. 硒酵母的培养:

(1) 改变 Na_2SeO_3 的加入量: 将上述三种培养基各 150ml 分别放入 250ml 锥形瓶中, 加入不同浓度的 Na_2SeO_3 溶液, 接种, 于 30℃ 振荡培养两天, 离心分离, 水洗数次, 于 55—60℃ 真空干燥, 粉碎即得淡黄色粉状硒酵母。

(2) 改变蛋氨酸加入量: 固定 Na_2SeO_3 浓度为 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 改变蛋氨酸的加入量, 按前述方法培养。

2. 硒酵母中总硒、无机硒和有机硒的测定:

(1) 总硒的测定: 采用苯硒脑-荧光法或气相色谱法^[1,3]。

(2) 无机硒的测定: 将一定量的硒酵母悬浮在约相当于其 6 倍重量的含 10% 甘油、20mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、pH 为 8.6 的三(羟甲基)氨基甲烷-HCl 缓冲溶液中, 超声破碎, 直至镜检表明硒酵母已被破碎完全。搅拌提取 2h, 静置一天, 1200r/min 离心 10min。上层清液含无机硒和含硒蛋白质。然后按每 ml 上层清液加入 600mg 固体硫酸铵, 1600r/min 离心 10min 以沉降硒蛋白。取上层清液按测定总硒的方法测定无机硒含量。

(3) 硒酵母中硒蛋氨酸的测定: 按我

们提出的溴化氰-气相色谱法测定^[6-8]。这是一种非水解的间接测定方法。它是基于在一定条件下, 溴化氰 (CNBr) 与硒蛋氨酸反应定量生成硒氰酸甲酯, 然后用气相色谱法测定硒氰酸甲酯的含量。此法准确快速, 蛋氨酸不干扰测定。

(4) 硒酵母中四种硒代氨基酸的测定: 四种主要的硒代氨基酸为硒蛋氨酸、硒胱氨酸、硒半胱氨酸和甲基硒半胱氨酸。由于硒代氨基酸在酸水解中易被破坏, 所以测定普通氨基酸的方法——酸水解-离子交换色谱法对它不适用。我们提出了一种改良酸水解法, 即在低酸度 (4mol/L HCl)、低温度 (50℃)、长时间 (50h) 和在氮气中进行水解。按照我们对水解破坏机理的研究, 前三个条件有助于抑制硒蛋氨酸中 Se-C 键的断裂, 而后一个条件能阻止硒蛋氨酸被氧化成亚砷。因此这种方法是比较理想的硒蛋白水解方法。

准确称取 150mg 硒酵母置于 15ml 玻璃管中, 加入 4mol/L HCl, 用氮气赶出试管中的空气并立即封管, 在 50℃ 恒温箱进行改良酸水解 50h。冷却后滤去残渣。将上述水解液以每分钟 1ml 的速度移入 $1 \times 60\text{cm}$ 氢型事先用蒸馏水洗至中性的国产 732 型阳离子交换树脂柱上。用 150ml 蒸馏水洗柱, 然后分别用 1.1、2.5、4 和 5mol/L HCl 进行阶段洗脱, 流速控制在 3ml/min, 各收集 500ml 左右。将上述洗脱液分别减压浓缩至 20ml 左右, 再分别定容至 50ml。吸取一定量的浓缩液进行消化, 按测定总硒的方法测定硒, 再分别乘以换算因子即可求出上述四种硒代氨基酸的含量^[9]。

结果和讨论

实验结果分别列于表 1、表 2、表 3 中。由上述实验结果可得以下结论:

表 1 不同培养基对硒酵母中的总硒和硒蛋氨酸含量的影响

Table 1 The effect of different culture medium on the content of total Se and selenomethionine (SeMet) in selenium yeast

培养基 Culture medium Na_2SeO_3 ($\times 100\mu\text{g}/150\text{ml}$) Se and SeMet(ppm)		0	4.0	8.0	12.0	16.0	20.0
No. 1	Se	0	471.0	810.0	922.5	1015.3	1087.5
	SeMet	0	3.6	28.5	35.5	42.7	14.2
No. 2	Se	0	583.0	833.0	1033.1	1028.0	1125.0
	SeMet	0	78.9	103.8	179.5	254.0	249.0
No. 3	Se	0	13.1	21.7	23.5	23.0	21.9
	SeMet	0					

表 2 蛋氨酸的浓度对硒酵母中的总硒和硒蛋氨酸含量的影响

Table 2 The effect of the concentration of methionine (Met) on the content of total Se and SeMet in selenium yeast

[Na_2SeO_3] = $1600\mu\text{g}/150\text{ml}$)

Se and SeMet (ppm) 蛋氨酸 Met ($\mu\text{g}/150\text{ml}$)		0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
No. 1	Se	1015.3	850.0	825.0	750.3	760.0	775.0
	SeMet	42.7	36.3	33.3	32.3	32.3	34.8
No. 2	Se	1228.0	890.0	860.0	852.5	870.0	845.0
	SeMet	254.0	242.1	244.7	240.5	232.2	240.5

表 3 硒酵母四种硒代氨基酸的分析结果

Table 3 The analytical results of the four kinds of seleno amino acid in selenium yeast

方法 Method	硒代氨基酸 Seleno amino acid	硒蛋氨酸 Seleno- methionine	硒胱氨酸 Seleno- cystine	硒半胱氨酸 Seleno- cysteine	甲基硒半胱氨酸 Se-methylseleno- cysteine
改良酸水解法 Modified acid hydrolysis		*218.3 (88.0)	172.0 (81.0)	248.2 (116.7)	53.2 (20.0)
溴化氰-气相色谱法 Cyanogen bromide gas chromatography		*254.0 (102.3)	—	—	—

(括号内的数字表示硒代氨基酸中的硒含量)

(The numerals in the parenthesis denote the Se content in selenoamino acids)

* 两种方法所得的结果偏差较大是由于改良酸水解法还不可能避免硒蛋氨酸的破坏。对硒胱氨酸和硒半胱氨酸,回收率可达 93% 以上。

(一) 酵母同化无机硒作用的一般规律

1. 与培养基种类的关系: 从表 1 可知, 在一定条件下, 硒酵母中的总硒和硒蛋氨酸含量与培养基的种类有关。以 No. 2 培养效果最好, 总硒可达 1028ppm, 硒蛋氨酸可达 254ppm。No. 2 培养基虽可达到 1015ppm 总硒, 但其中的硒蛋氨酸含量仅有 42.7ppm。No. 3 培养基效果差。以上说明培养基中的某些组分有促进酵母同化无机硒为有机硒的作用, 而某些组分则会抑制这一作用。

2. 与培养基中 Na_2SeO_3 浓度的关系: 从表 1 可知, 硒酵母中的总硒量和硒蛋氨酸量随培养基中的 Na_2SeO_3 浓度的增加而增加, 但其增加幅度逐渐减弱, 最后几乎不再增加, 到达某一高峰后明显下降。以上事实说明 Na_2SeO_3 浓度越大, 对酵母生长的抑制作用也越大。适宜的 Na_2SeO_3 浓度约为 $1600\mu\text{g}/150\text{ml}$ 。

3. 与培养基中蛋氨酸浓度的关系: 我们根据前人提出的在某些生物体中硒能部分地取代硫的作用^[10], 设想向培养基加入一定量的蛋氨酸以增加硒蛋氨酸的产量。从表 2 看出, 实验未成功, 说明这种取代作用是有条件的。

(二) 硒酵母中硒氨基酸的种类和含量

我们成功地使用改良酸水解-离子交换色谱法和溴化氰-气相色谱法解决了此问题。如表 3 所示, 总硒为 1028ppm, 其中的无机硒仅占总硒的 3% 左右, 大部分的硒以有机硒形态存在, 其中以硒代氨基酸存在的硒约占总硒的 30%。其余 67% 左右的硒以何种有机形态存在, 还有待继续探讨。我们推测这些硒可能进入硒核酸以及其它有机硒化合物中。实验表明, 硒酵母中的总硒、无机硒和有机硒的组成及其相对含量随培养条件的不同而改变。

参 考 文 献

- [1] 孔祥瑞: 必需微量元素的营养、生理及临床意义, 安徽科学技术出版社, p.296—317, 1982。
- [2] 徐辉碧等: 华中工学院学报, 12(3): 81, 1984。
- [3] 刘曼西等: 华中工学院学报, 13(3): 115, 1985。
- [4] Poole, C. F. et al.: *J. Chromatogr.*, 73:136, 1977。
- [5] 王顺荣等: 分析化学, 8(3): 233, 1980。
- [6] 吴 江等: 色谱, 5(4): 236, 1987。
- [7] Ouyang, Z. et al.: *Biomedical Chromatogr.*, 2(6): 258, 1988。
- [8] 吴 江等: 色谱, 6(4): 198, 1988。
- [9] Catherine, H. B. et al.: *Phytochem.*, 23(11): 2445, 1984。
- [10] 徐辉碧: 生物微量元素—硒, 华中工学院出版社, p.77, 1983。

STUDIES ON THE ASSIMILATION OF INORGANIC SELENIUM BY YEAST

Xie Liqi Ouyang Zheng Xie Xiuzhen

(Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou)

In the process of assimilation of inorganic selenium by yeast to the organic-selenium, some rules on the relation of the kinds of culture medium, concentration of sodium selenite and methionine to the total selenium and selenomethionine content in the yeast formed have been found; and a new, accurate procedure—modified acid hydrolysis-ion ex-

change chromatography for determining the content of selenoamino acid in biological materials has been established.

Key words

Selenomethionine; Selenoamino acid; Selenium yeast; Assimilation