

## 富硒绿茶硒蛋白的提取工艺研究

余芳<sup>1</sup>, 汪社英<sup>2</sup>, 方勇<sup>1</sup>, 王飞飞<sup>1</sup>, 谢伟<sup>1</sup>, 王茹<sup>1</sup>, 胡秋辉<sup>1\*</sup>

(1. 南京农业大学食品科学技术学院, 江苏 南京 210095; 2. 芜湖职业技术学院园林园艺系, 安徽 芜湖 241000)

**摘要:** 采用不同提取液从富硒绿茶茶渣中提取富硒绿茶硒蛋白, 以正交试验确定最佳提取条件, 并分析了富硒绿茶硒蛋白含量和氨基酸组成。结果表明, 以  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 提取富硒绿茶茶渣, 得到的蛋白质和硒含量最高。硒蛋白的最佳提取条件为: 料液质量体积比 1:30 (g/mL), 提取时间 16 h, 提取温度 40 °C。另外, 试验还表明, 喷施生物硒肥可以显著提高富硒绿茶中总蛋白和硒蛋白的含量, 富硒绿茶中有 30.3% 的硒与碱溶性蛋白质结合; 除蛋氨酸外, 硒肥处理对绿茶中其他氨基酸组成和含量的影响不显著。

**关键词:** 富硒绿茶; 硒蛋白; 提取工艺; 氨基酸

中图分类号: TS201.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 04-0140-04

## Study on extraction of selenium-containing protein from selenium-enriched green tea

YU Fang<sup>1</sup>, WANG She-ying<sup>2</sup>, FANG Yong<sup>1</sup>, WANG Fei-fei<sup>1</sup>, XIE Wei<sup>1</sup>, WANG Ru<sup>1</sup>, HU Qiu-hui<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;  
2. Department of Garden and Horticulture, Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241000, China)

**Abstract:** The extraction of Selenium (Se) -containing protein from Se-enriched green tea residue was optimized by several different solutions and an orthogonal test. Moreover, the content of Se-containing protein and amino acid compositions were analyzed. The results showed that the best extraction condition was extracting solution  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH at material-solvent ratio 1:30 (g/mL), and incubating for 16 h at 40 °C with continuous stirring. In addition, the content of total protein and Se-containing protein in Se-enriched tea could be increased by application of Se-enriched biofertilizer. About 30.3% of total selenium was incorporated with alkali-soluble protein in Se-enriched green tea. Se-enriched biofertilizer did not significantly affect the content and component of amino acids except methionine in green tea.

**Key words:** Se-enriched green tea; Se-containing protein; extraction technology; amino acid

硒是人和动物的必需微量元素之一, 在防癌、抗癌, 预防和治疗心血管疾病、克山病和大骨节病等方面的重要作用已为世人所公认, 硒能显著降低乳腺癌、皮肤癌、结肠癌、肝癌等多种癌的发生率, 并具有解除重金属中毒等特殊生理功能<sup>[1-2]</sup>。美国科学家最新研究还证明艾滋病人体内血浆硒普遍低于正常人<sup>[3]</sup>。

茶叶中的蛋白质含量占茶叶干重的 15% ~ 30%, 其中 82.05% 为谷蛋白, 13.6% 为醇溶蛋白, 3.47% 为清蛋白, 约 0.87% 为球蛋白, 能溶于水直接被利用的主要是清蛋白<sup>[4]</sup>。李燕等<sup>[5]</sup>用小鼠进行了茶叶蛋白预防辐射的研究并发现茶叶蛋白具有清除超氧阴离子功能, 可抵抗电离辐射所引起的致突变效应。活泼等<sup>[6]</sup>证明非水溶性碱提茶叶蛋白有明显的降血脂效果, 对抗动脉粥样硬化及冠心病可能有一定的预防作用。近年来, 硒的研究方向逐渐从总硒转移到有机硒, 其中, 硒蛋白已成为最大的研究热点。王莲芳等<sup>[7]</sup>通过响应面分析法优化出富硒食用菌硒蛋白的提取工艺, 蛋白得率为 30.17%。吴永尧等<sup>[8]</sup>从富硒大米中提取硒蛋白, 并证明硒主要是以硒代蛋氨酸和硒代半胱氨酸形式与蛋白结合。但是, 从富硒茶叶中提取硒蛋白的报道较少<sup>[9-10]</sup>, 且提取方法简单。最近, 富硒绿茶的抗氧化活性和抗肿瘤活性逐渐被人们关注, 然而其机制及贡献因子还不清楚<sup>[11-12]</sup>。因此, 优化富硒绿茶硒蛋白的提取工艺有利于富硒绿茶有机硒的形态分析及进一步明确其功能。

收稿日期: 2007-07-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671461)

作者简介: 余芳, 博士, 副教授, 研究方向为食品营养与化学。\* 通讯作者: 胡秋辉, 教授, 博导, 主要从事食品营养与安全方面的研究, E-mail: qiuhuihu@njau.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

富硒绿茶按照 Xu 等<sup>[12]</sup>的方法制备。实验茶园设在江苏省宜兴市富坤富硒茶叶有限公司, 茶园面积 2 000 m<sup>2</sup>, 平均分为 6 个小区。2005 年 4 月 25 日叶面喷施生物硒肥 (硒含量 60 mg · L<sup>-1</sup>, 使用量 75 g · hm<sup>-2</sup>) 于 3 个小区的茶树上, 另 3 个小区作为对照喷施清水。于 2005 年 5 月 6 日按小区采摘茶叶样品, 采摘茶叶为一叶一芽, 加工成商品茶叶, 粉碎后过 100 目筛, -20 °C 冻藏备用。

### 1.2 主要仪器及试剂

JY98-III 超声波细胞粉碎机 (上海新芝生物技术研究所); Alpha-2 冷冻干燥机 (Christ); Centrifuge 5804 R 冷冻离心机 (Eppendorf); 日立 835-50 氨基酸自动分析仪; AFS-3100 型双通道原子荧光光度计 (北京海光仪器有限公司)。乙醇、氢氧化钠、氯化钠等主要试剂均为国产分析纯。

### 1.3 方法

**1.3.1 富硒茶中茶多酚的去除** 5.00 g 富硒绿茶粉用 40% 乙醇 (料液质量体积比为 1:12 (g/mL)) 浸提 10 min, 抽滤, 弃去滤液, 重复 3 次, 得茶渣。

**1.3.2 富硒绿茶硒蛋白提取液的筛选及提取工艺** 在富硒绿茶茶渣中分别加入去离子水、0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaOH、0.5 mol · L<sup>-1</sup> NaCl、0.05 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0) 和 0.2 mol · L<sup>-1</sup> PBS (pH 8.0) 提取液, 然后进行细胞破壁 (800 W, 180 s), 再以磁力搅拌提取后离心 (10 000 r · min<sup>-1</sup>, 20 min); 取上清液, 缓慢加入硫酸铵至 50% 饱和度以沉淀含硒蛋白, 4 °C 静置 12 h, 离心 (10 000 r · min<sup>-1</sup>, 20 min), 沉淀物用提取液溶解, 透析 24 h, -40 °C 冻干, 得粗蛋白, 测定硒含量。

**1.3.3 正交试验设计** 选取不同的料液比、提取时间、提取温度进行三因素三水平 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交试验 (表 1), 并对硒含量进行测定, 通过对试验结果的极差分析确定其最佳提取工艺条件。

**1.3.4 测定项目** 采用微量凯氏定氮法, 按照 GB/T 5009.5—2003 中的方法测定蛋白质含量。取茶叶粗蛋白提取物 25 mg, 在 6 mol · L<sup>-1</sup> HCl、110 °C 下水解 22 h, 用日立 835-50 氨基酸自动分析仪测定氨基酸组成。采用氢化物原子荧光光谱法, 按照 GB/T 5009.93—2003 中的方法测定硒含量。

**1.3.5 统计分析** 数据采用软件 SAS 8.0 进行统计分析, 差异显著性检验采用 *t* 测验方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 富硒绿茶中硒蛋白提取液的筛选及提取条件优化

由表 2 可知, 用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaOH 提取硒蛋白效果最好, 所得蛋白质和硒含量都最高, 硒含量为 7.85 μg · g<sup>-1</sup>, 蛋白质含量为 100.6 g · kg<sup>-1</sup>, 表明用碱法提取茶叶蛋白效率较高, 这与张晓晖等<sup>[13]</sup>提取茶叶蛋白的研究结果一致。Gergely 等<sup>[14]</sup>、赵镭等<sup>[15]</sup>在富硒蘑菇和富硒灵芝的研究中也表明硒主要存在于碱溶性提取物中。

以 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaOH 为提取液, 硒为考察指标, 对提取硒蛋白的条件进行 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交试验分析。在表 3 结果中, 极差分析表明,  $R_{\text{提取温度}} >$

$R_{\text{料液比}} > R_{\text{提取时间}}$ , 即提取温度为最主要因素, 其次是料液比。在本试验中, 确定料液质量体积比 1:30 (g/mL)、提取时间 16 h、提取温度 40 °C 为最佳提取条件。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>)

水平 Levels	料液比 (g/mL) Material solution rate	提取时间/h Extraction time	提取温度/°C Extraction temperature
1	1:20	16	20
2	1:30	20	30
3	1:40	24	40

表 2 富硒绿茶硒蛋白提取液的筛选

Table 2 Selection of extraction solvents of extracting Se-containing protein from Se-enriched green tea

提取液 Extracting solution	蛋白质含量/g · kg <sup>-1</sup> Protein content	硒含量/μg · g <sup>-1</sup> Selenium content
去离子水 Deionized water	38.8	1.31
0.1 mol · L <sup>-1</sup> NaOH	100.6	7.85
0.5 mol · L <sup>-1</sup> NaCl	25.5	1.53
0.2 mol · L <sup>-1</sup> PBS (pH 8.0)	56.2	1.68
0.05 mol · L <sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0)	24.8	4.34

表 3 富硒绿茶中硒蛋白提取的正交试验结果

Table 3 The orthogonal experiment results of extraction of Se-containing protein from Se-enriched green tea

处理号 No.	料液比 (g/mL) Material solution rate	提取时间/h Extraction time	提取温度/°C Extraction temperature	硒含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Selenium content
1	1:20	16	20	3.05
2	1:20	20	30	0.76
3	1:20	24	40	5.90
4	1:30	16	30	5.40
5	1:30	20	40	3.50
6	1:30	24	20	5.90
7	1:40	16	40	5.60
8	1:40	20	20	5.70
9	1:40	24	30	1.20
$k_1$	9.71	14.05	14.65	
$k_2$	14.80	9.96	7.36	
$k_3$	12.50	13.00	15.00	
$R$	5.09	4.09	7.64	

注: 1)  $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$  代表各因素水平的富硒绿茶提取物平均硒含量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )。  $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$  represents the average Se content of Se-enriched green tea extract at each factor level.

2)  $R$  值代表不同水平下富硒绿茶提取物平均硒含量的极差 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )。  $R$  value means the range of average Se content of Se-enriched green tea extract at different level.

## 2.2 生物硒肥对富硒绿茶蛋白质和硒蛋白含量的影响

田间试验表明, 叶面喷施生物硒肥不仅可以显著提高茶叶硒含量, 而且显著提高蛋白质含量 ( $P < 0.05$ , 表 4), 这与我们以前的研究结果一致<sup>[16]</sup>。按照本试验中茶叶硒蛋白的提取工艺, 在最佳提取条件下提取绿茶粗蛋白, 富硒绿茶粗蛋白和硒含量显著高于普通绿茶 ( $P < 0.05$ ), 其中富硒绿茶粗蛋白含量是普通绿茶的 1.32 倍 (表 4), 表明喷施生物硒肥可以显著提高富硒绿茶中硒蛋白的含量。

表 4 生物硒肥对富硒绿茶蛋白质和硒含量的影响

Table 4 Effect of application of Se-enriched biofertilizer on the content of the protein and selenium in Se-enriched green tea

样品 Samples	原料 Material		提取物 Extract	
	总蛋白质含量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Total protein content	硒含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Selenium content	粗硒蛋白含量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Crude Se-containing protein content	硒含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Selenium content
富硒绿茶 Se-enriched green tea	345.23 ± 7.15 *	4.60 ± 0.10 *	624.87 ± 26.79 *	5.62 ± 0.08 *
普通绿茶 Regular green tea	330.87 ± 4.15	0.12 ± 0.01	488.23 ± 15.76	0.11 ± 0.02

注: \* 表示与对照 (普通绿茶) 相比,  $P < 0.05$ 。 \* Compared with regular green tea  $P < 0.05$ .

用本试验提取工艺, 富硒茶叶原料 5.00 g, 其硒含量为  $4.60 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 而得到的粗蛋白提取物冻干粉质量为 1.24 g, 硒含量为  $5.62 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 表明富硒绿茶中有 30.3% 的硒与碱性蛋白质结合。赵镭等<sup>[17]</sup>对富硒灵芝硒的赋存形态研究结果表明, 56.0% ~ 61.2% 的硒与蛋白质结合, 其中碱性蛋白质是硒结合的主要形式之一, 占总蛋白硒的 19.0% ~ 26.4%, 本研究结果与此基本一致。本试验通过提取溶剂筛选和条件的优化, 证明用碱法提取硒蛋白效率更高, 为富硒绿茶有机硒的形态分析打下良好的基础。

## 2.3 生物硒肥对富硒绿茶氨基酸含量的影响

从表 5 可见, 富硒绿茶粗蛋白提取物中至少含有 17 种氨基酸, 而且人体必需氨基酸含量丰富。参照赵镭等<sup>[15]</sup>的统计方法, 除蛋氨酸外, 在富硒绿茶粗蛋白中氨基酸含量  $y$  与普通绿茶粗蛋白氨基酸含量  $x$  间建立直线回归方程  $y = ax$ , 得出  $a = 0.966$ , 接近于 1。采用  $t$  检验进行分析表明, 除蛋氨酸外, 施用生物硒肥基本不影响茶叶蛋白中各氨基酸组分和含量 ( $t = 425.2$ ,  $t_{0.01} = 2.977$ )。富硒绿茶粗蛋白提取物中蛋氨酸含量减少 35.4%, 胱氨酸含量略有降低, 这一结论与周遗品<sup>[18]</sup>的研究结果相一致, 即硒在提高水稻籽粒硒含量的同时, 含硫氨基酸有一定程度的减少。这可能与硒取代蛋氨酸中的硫生成硒代蛋氨酸有关, 硒和硫属于同一主族, 性质相似, 植物对硫和硒的吸收存在相互竞争, 硒沿着硫代谢途径取代含硫氨基酸中的硫生成硒代氨基酸。

表5 富硒绿茶和普通绿茶粗蛋白的氨基酸含量

Table 5 Amino acids content of Se-enriched green tea protein

g · 100 g<sup>-1</sup>

氨基酸 Amino acids	普通绿茶 Regular green tea	富硒绿茶 Se-enriched green tea	氨基酸 Amino acids	普通绿茶 Regular green tea	富硒绿茶 Se-enriched green tea
总氨基酸 Total amino acids	7.31	7.04	蛋氨酸 Methionine	0.91	0.56
天门冬氨酸 Aspartic acid	0.69	0.77	异亮氨酸 Isoleucine	0.33	0.39
苏氨酸 Threonine	0.20	0.24	亮氨酸 Leucine	0.22	0.35
丝氨酸 Serine	0.15	0.21	酪氨酸 Tyrosine	0.35	0.30
谷氨酸 Glutamic acid	0.57	0.69	苯丙氨酸 Phenylalanine	0.72	0.64
甘氨酸 Glycine	0.31	0.33	赖氨酸 Lysine	0.33	0.30
丙氨酸 Alanine	0.41	0.40	组氨酸 Histidine	0.13	0.19
胱氨酸 Cystine	0.33	0.27	精氨酸 Arginine	0.21	0.30
缬氨酸 Valine	0.87	0.72	脯氨酸 Proline	0.71	0.57

### 3 结论

1) 碱法提取富硒绿茶中硒蛋白效率更高, 硒主要存在于碱溶性蛋白质中, 且有 30.3% 的硒与碱性蛋白质结合。

2) 通过正交试验优化, 用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaOH 作为提取液, 料液质量体积比 1:30 (g/mL), 提取时间 16 h, 提取温度 40 °C 为富硒绿茶硒蛋白最佳提取条件。

3) 富硒绿茶粗蛋白提取物的蛋白质和硒含量显著高于普通绿茶粗蛋白提取物的, 其中富硒绿茶粗蛋白含量是普通绿茶的 1.32 倍。

4) 富硒绿茶粗蛋白提取物中至少含有 17 种氨基酸, 与普通绿茶粗蛋白氨基酸含量相比, 富硒绿茶中除蛋氨酸含量降低 35.4% 外, 对其他氨基酸含量的影响不大。

#### 参考文献:

- [1] Gupta U C, Gupta S C. Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and human; implications for management [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2000, 31: 1791-1807
- [2] Rayman M P. The importance of selenium to human health [J]. The Lancet, 2000, 356: 233-241
- [3] Bogden J D, Oleske J M. The essential trace minerals, immunity and progression of HIV-1 infection [J]. Nutrition Research, 2007, 27(2): 69-77
- [4] 严鸿德, 汪东风, 王泽农, 等. 茶叶深加工技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 69-70
- [5] 李燕, 蔡东联, 夏雪君, 等. 茶蛋白液预防辐射引起的突变效应 [J]. 癌变·畸变·突变, 2001, 13(1): 32-35
- [6] 活泼, 黄光荣, 张晓晖, 等. 非水溶性茶叶蛋白降血脂作用的研究 [J]. 茶叶科学, 2005, 25(2): 95-99
- [7] 王莲芳, 窦春霞, 张连富, 等. 富硒食用菌中硒蛋白提取工艺研究 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 122-126
- [8] 吴永尧, 罗泽民, 陈建英, 等. 水稻硒蛋白及其硒结合形态研究 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2000, 34(2): 223-225
- [9] 钟颜麟, 刘勤晋. 茶硒赋存形态的研究 [J]. 茶叶科学, 1992, 12(2): 94
- [10] 杜琪珍, 沈星荣, 方兴汉. 茶叶中硒蛋白提取技术的研究 [J]. 中国茶叶, 1991(2): 20-21
- [11] Xu J, Yang F M, An X X, et al. Anticarcinogenic activity of selenium-enriched green tea extracts *in vivo* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 5349-5353
- [12] Xu J, Yang F M, Chen L C, et al. Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of tea leaves harvested during the early spring tea producing season [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 1081-1084
- [13] 张晓晖, 章克昌, 活泼, 等. 非水溶性茶蛋白的提取工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2005, 26(3): 64-67
- [14] Gergely V, Kubachka K M, Mounicou S, et al. Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1101: 94-102
- [15] 赵镭, 高海燕, 张美莉, 等. 4种提取法对富硒灵芝主要功效成分的提取效果 [J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(1): 1-5
- [16] 胡秋辉, 潘根兴, 朱建春, 等. 硒提高茶叶品质效应的研究 [J]. 茶叶科学, 2000, 20(2): 137-140
- [17] 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
- [18] 周遗品. 硒对水稻蛋白质和氨基酸含量影响的初步研究 [J]. 石河子农学院学报, 1995(3): 19-22