

小米硒化水溶性膳食纤维的抗氧化活性及对小鼠肠道菌群产色氨酸能力的影响

王娟¹, 曹龙奎^{1,2,*}, 魏春红¹, 王维浩^{1,2}, 赵姝婷¹, 刘德志¹, 全志刚¹, 王一飞¹, 武云娇¹, 苏有韬¹, 张东杰^{1,*}
(1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319; 2.国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为研究硒化修饰小米水溶性膳食纤维(soluble dietary fiber, SDF)最优工艺及硒化修饰对小米SDF的结构、抗氧化活性及肠道菌群产色氨酸能力的影响,以小米为原料,采用硝酸-亚硒酸钠法对小米SDF进行硒化修饰,并利用正交试验对硒化修饰条件进行优化,采用凝胶渗透色谱法、傅里叶变换红外光谱仪、X射线衍射仪分别测定硒化修饰前后的小米SDF分子质量、官能团、结晶度,采用扫描显微镜观察硒化修饰前后的小米SDF的微观结构,比较修饰前后小米SDF的抗氧化活性,并分析以小米Se-SDF为碳源的小鼠粪便稀释液体外发酵液中色氨酸含量变化。结果表明:修饰最佳条件为反应温度40℃,反应时间6h,质量浓度5mg/mL亚硒酸钠溶液添加量3mL,氯化钡添加量0.65g,该条件下所得小米硒化水溶性膳食纤维(selenium modified soluble dietary fiber, Se-SDF)得率为10.56%,硒含量为2.69mg/g;修饰后小米Se-SDF分子质量增加,表面多孔且孔径较大,呈蜂窝状,聚合度降低,出现Se=O、Se-OH、Se-O-C等官能团,结晶结构类型无明显变化,结晶指数减小;修饰后小米Se-SDF羟自由基清除能力、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力、总抗氧化能力及促进小鼠肠道菌群产色氨酸能力增强。综上,利用硝酸-亚硒酸钠法成功地修饰了小米SDF,最优工艺下得到的硒化修饰小米SDF具有含硒量较高、抗氧化能力强及促进小鼠肠道菌群产色氨酸能力较强的特点,可用于富硒、补充色氨酸食品的开发。

关键词:小米;水溶性膳食纤维;修饰;结构;色氨酸

Antioxidant Activity of Selenium-Modified Soluble Dietary Fiber from Millet and Its Effect on the Tryptophan-Producing Capability of Mouse Intestinal Flora

WANG Juan¹, CAO Longkui^{1,2,*}, WEI Chunhong¹, WANG Weihao^{1,2}, ZHAO Shuting¹, LIU Dezhi¹, QUAN Zhigang¹,
WANG Yifei¹, WU Yunjiao¹, SU Youtao¹, ZHANG Dongjie^{1,*}

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China)

Abstract: The present study was undertaken with two aims: 1) to determine the optimal preparation process for selenium-modified soluble dietary fiber from millet and 2) to explore the influence of selenium modification on the structure and antioxidant activity of millet water-soluble dietary fiber (SDF) and on its effect on the ability of intestinal flora to produce tryptophan. SDF was modified by a nitric acid-sodium selenite method, and the selenization conditions were optimized by the Taguchi method. The molecular mass, particle morphology, functional groups and crystallinity of the native and modified SDF were determined by gel permeation chromatography (GPC), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction. In addition, their antioxidant activity was compared with each other, and the change of the tryptophan content in the culture broth of mouse intestinal microbes utilizing Se-SDF as a carbon source was analyzed. The results showed that the optimal conditions of modification were as follows: reaction temperature of 40℃,

收稿日期: 2020-07-09

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFE0206300); 黑龙江省优势特色学科资助项目([2018]No.4号);

黑龙江省杂粮现代农业产业技术协同创新推广体系“品质改良与深加工”岗位;

教育部粮食副产物加工与利用工程技术研究中心建设项目

第一作者简介: 王娟(1995—)(ORCID: 0000-0002-1364-2921), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。

E-mail: wangjuan061226@163.com

*通信作者简介: 曹龙奎(1965—)(ORCID: 0000-0002-1842-5854), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工技术。

E-mail: caolongkui2013@163.com

张东杰(1966—)(ORCID: 0000-0003-3536-8422), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全。

E-mail: byndzdj@126.com

reaction time of 6 h, 3 mL of 5 mg/mL Na_2SeO_3 , and 0.65 g of BaCl_2 . Under these conditions, the yield of Se-SDF was 10.56% with a selenium content of 2.69 mg/g. The relative molecular mass of the Se-SDF was increased compared with the native SDF, and the surface showed a porous honeycomb-like structure with large pore size. The degree of polymerization was reduced relative to that of the native SDF, and functional groups such as Se=O, Se-OH and Se-O-C were appeared in the Se-SDF. Despite no obvious change in the crystal structure, the crystallinity of SDF was decreased after the modification. The hydroxyl and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity and total antioxidant capacity of SDF as well as its promoting effect on the tryptophan-producing capability of the mouse intestinal flora were enhanced after the modification. In summary, the Se-SDF prepared using the optimized process can be used to produce dietary selenium and tryptophan supplements.

Keywords: millet; soluble dietary fiber; modification; structure; tryptophan

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200709-132

中图分类号: TS201

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2021)11-0144-10

引文格式:

王娟, 曹龙奎, 魏春红, 等. 小米硒化水溶性膳食纤维的抗氧化活性及对小鼠肠道菌群产生色氨酸能力的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 144-153. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200709-132. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Juan, CAO Longkui, WEI Chunhong, et al. Antioxidant activity of selenium-modified soluble dietary fiber from millet and its effect on the tryptophan-producing capability of mouse intestinal flora[J]. Food Science, 2021, 42(11): 144-153. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200709-132. <http://www.spkx.net.cn>

小米作为我国的传统谷物, 营养价值高、易消化, 且对人体胃肠疾病具有较强的调养作用^[1]。膳食纤维作为小米中一种较强的功能性成分, 具有助消化、抗脂肪肝、预防肥胖等功效^[2]。根据美国谷物化学家协会的定义, 膳食纤维是一种在人体小肠抗消化、吸收, 在大肠完全或部分发酵的植物可食用组织或相似碳水化合物^[3]。根据其溶解性, 膳食纤维可分为水溶性膳食纤维(soluble dietary fiber, SDF)和水不溶性膳食纤维(insoluble dietary fiber, IDF)^[4], 其中SDF在促进肠道蠕动、减少肥胖、胃肠疾病预防等方面均优于IDF^[5-6]。但由于膳食纤维具有黏滞性、结合有机化合物的特点, 因此若胃肠病患者不能掌握适当的摄入量, 则容易对肠黏膜产生不良刺激, 引起腹胀, 导致人体某些营养素(如无机盐中的钙、铁、锌以及脂溶性维生素VA等)的不足甚至缺乏^[7], 某些疾病例如糖尿病患者需适量补充膳食纤维^[8], 但若患者胃肠功能较弱则不宜食用膳食纤维^[9]。

相关研究表明, 对多糖进行适当的分子修饰会使多糖产生新的活性或者增强其原有的生物活性^[10]。硒元素作为人体的必需微量元素, 对人体健康起着重要的作用, 具有抗氧化、抗衰老、提高机体免疫以及抗癌的能力^[11]。适量地摄入硒有益人体健康, 但我国很多地区存在硒摄入不足的问题, 富硒食品的开发有益国民健康。自然界中的硒大多以无机硒存在, 其对人体具有一定的毒副作用, 且吸收率低, 而有机硒毒性小、安全指数高、体内转化率高^[12], 但有机硒种类少、含量低, 且稳定性差^[13]。硒多糖作为一种良好的有机硒来源, 可根据

人体需求进行动态的储存和缓释, 以达到机体补硒的目的^[14], 但是天然硒多糖在自然界中存在较少, 而且它的硒含量通常较低^[15], 通过生物转化生产硒多糖的方法又耗时较长^[16]。Huang Shiyu^[17]和Kaleta^[18]等研究发现硒元素与多糖的结合不仅可以降低无机硒的毒性, 还可以增加多糖的生物活性, 所以高效、高硒含量的硒多糖人工合成方法越来越受到瞩目。

色氨酸作为人体必需氨基酸^[19], 在各种生物过程中起着重要作用^[20-21]。膳食纤维在胃肠道炎症治疗方面具有一定的作用效果^[22], 有研究表明, 色氨酸是炎症和免疫的重要调节因子, 同样对炎症性肠道疾病具有一定的治疗作用^[23-24]。Islam等^[25]通过在饮食中添加色氨酸研究其是否对葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎有保护作用, 研究结果表明色氨酸可作为一种有前途的预防剂治疗溃疡性结肠炎。因为人体不能自身合成色氨酸, 主要通过膳食摄入或者药物补充^[26], 但膳食摄入所提供的色氨酸含量较低, 药物补充会产生一定的副作用^[27]。色氨酸和膳食纤维均对炎症性胃肠病有一定治疗作用, 故以膳食纤维为原料生产色氨酸或将膳食纤维与色氨酸联合用于改善或治疗炎症性胃肠疾病具有一定的研究价值。

本实验以小米为原料, 对其中的SDF进行研究, 膳食纤维属于多糖中的一种, 可利用硝酸-亚硒酸钠法对SDF进行修饰, 得到小米硒化水溶性膳食纤维(selenium modified soluble dietary fiber, Se-SDF), 并对其修饰工艺进行优化; 采用凝胶渗透色谱法、扫描电子显微镜、傅里叶变换红外光谱仪、X射线衍射仪分别测定修饰前后分子质量、颗粒形态、官能团、结晶度的变化;

以SDF、IDF、Se-SDF等为碳源进行体外发酵实验,考察其促进肠道菌群产色氨酸的能力及修饰前后SDF的体外抗氧化活性,为今后的工业生产及功能性食品的研究开发提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、材料与试剂

小鼠为5~6周龄、体质量18~20 g的SPF级雌性昆明小鼠,由长春易思实验动物科技有限公司提供。

小米为‘东方亮’,由山西省东方亮生命科技有限公司提供,其颗粒饱满均匀、色金黄、无霉烂碎米。

中性蛋白酶(水解酶类,活力 6×10^4 U/mL)、耐高温 α -淀粉酶(水解酶类,活力 4×10^4 U/mL)、淀粉葡萄糖苷酶(水解酶类,活力 10×10^4 U/mL) 美国Sigma-Aldrich公司;色氨酸标准品 上海楚定分析仪器有限公司;透析袋 天津市大茂化学试剂厂;抗坏血酸(分析纯) 北京索莱宝科技有限公司;其他试剂均为分析纯;羟自由基测定试剂盒、总抗氧化能力试剂盒、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率测定试剂盒 南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

GDE-CSF6膳食纤维测定仪 意大利VELP公司; Nicolet 6700傅里叶变换红外光谱仪 美国Thermo Fisher公司; LC20+RID20A凝胶渗透色谱仪 日本岛津公司; D8 ADVANCE X射线粉末衍射仪 德国布鲁克公司; SU8020场发射扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM) 日本日立公司; Specord 210 plus紫外可见分光光度计 德国DeChem-Tech.GmbH公司; DB-1A数显恒温电加热板 常州市英格尔仪器制造有限公司; 真空冷冻干燥机 基因有限公司。

1.3 方法

1.3.1 小米SDF的制备

称取10 g的小米,经粉碎后过60目筛,得到小米粉。用滤纸将小米粉包成小药包,用100 mL石油醚于60℃条件下冷凝回流4 h进行脱脂处理,脱脂结束后放入通风橱自然干燥,得到脱脂小米粉,备用。

称取5 g脱脂小米粉加入125 mL蒸馏水、250 mL磷酸盐缓冲液(pH 6、0.08 mol/L),依次经耐高温 α -淀粉酶(95℃、30 min)、中性蛋白酶(60℃、30 min)、淀粉葡萄糖苷酶(60℃、30 min)进行酶解,灭酶(100℃、20 min),过滤,滤渣为小米IDF,得到的滤液浓缩后,用4倍体积的95%(体积分数)乙醇溶液醇沉、离心、干燥得粗小米SDF。

1.3.2 粗小米SDF的纯化

采用Sevag法去除蛋白,按照V(正丁醇):V(三氯甲烷)=1:5配制Sevag试剂。准确称取粗小米SDF 0.50 g,加蒸馏水溶解、定容至100 mL,加入20 mL Sevag试剂,振摇10 min,离心(5 000 r/min、10 min),收集水相。向水相中加入20 mL Sevag试剂,再次进行上述振摇、离心、收集水相操作,上述步骤反复10次以上。将最后一次收集的水相用体积分数5%的氨水调节pH值8.5左右,加入50 mL质量分数30%双氧水,40℃保温60 min脱色,然后60℃条件下旋转蒸发除去有机试剂,得到约20 mL小米SDF溶液。将小米SDF溶液装入截留分子质量为3 500 Da透析袋,自来水透析48 h,蒸馏水透析24 h。透析后,将溶液旋转蒸发浓缩至原溶液体积的1/3,加入4倍体积的体积分数95%的乙醇溶液,于4℃冰箱中醇沉过夜,弃去上清液,再离心分离(5 000 r/min、10 min),沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗涤两次,冷冻干燥至恒质量,即得小米SDF,备用^[28]。

1.3.3 小米Se-SDF的制备

1.3.3.1 单因素试验

参考文献[29]进行小米Se-SDF的制备。称取500 mg小米SDF加入三角瓶中,缓慢滴加50 mL体积分数0.5%的HNO₃溶液,边加边搅拌,使之完全溶解。加入不同质量(0.5、0.65、0.75、0.9、1.2、1.5 g)氯化钡,滴加不同体积(2、4、6、8、10 mL)5 mg/mL亚硒酸钠溶液,于不同温度(20、30、50、70、90℃)下搅拌反应不同时间(2、4、6、8、10 h)。反应液冷却后,用质量分数20%的碳酸钠溶液调节pH值至5~6,加入一定量硫酸钠固体粉末除去钡离子,5 000 r/min离心10 min,取上清液用流水透析除去亚硒酸钠。每6 h取少量透析液,加入抗坏血酸固体粉末检测游离亚硒酸钠残留量,无红色时停止透析。将透析袋内溶液减压蒸馏至10~20 mL,用蒸馏水透析24 h除盐,透析液经真空冷冻干燥得小米Se-SDF,并测定Se-SDF得率和硒含量。进行单因素试验时,固定的条件为:氯化钡质量0.65 g、亚硒酸钠溶液体积4 mL、反应温度50℃、反应时间6 h。

1.3.3.2 正交试验

根据单因素试验的结果,选择不同反应温度、反应时间、5 mg/mL亚硒酸钠溶液添加量、氯化钡添加量这4个因素进行进一步优化,每个因素选取3个水平进行L₉(3⁴)正交试验,试验因素水平设计如表1所示。以Se-SDF得率和硒含量为指标,每组试验重复3次。

表1 正文试验因素水平表

Table 1 Code and level of independent variables used for orthogonal array design

水平	因素			
	A反应温度/℃	B反应时间/h	C 5 mg/mL亚硒酸钠溶液添加量/mL	D氯化钡添加量/g
1	40	5	3	0.65
2	50	6	4	0.75
3	60	7	5	0.85

1.3.4 小米Se-SDF中硒含量的测定

1.3.4.1 硒标准曲线的绘制

参考文献[30-31], 精确量取100 μg/mL硒标准溶液(Se单质溶液)0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL于10 mL离心管中, 每管均加入质量分数为37%的浓盐酸1 mL, 定容至10 mL, 混匀。取2 mL待测溶液, 加入6 mL蒸馏水, 用1.0 mol/L盐酸溶液调至pH值2~3, 然后加入4 mL质量分数2%的邻苯二胺溶液, 放置暗处反应20 min; 用质量分数5%的NaOH溶液调节至中性, 加入5 mL甲苯振荡2 min, 静置分层, 吸取甲苯层测定其在334 nm处吸光度, 绘制标准工作曲线。标准曲线回归方程为 $y=0.0436x+0.0062$, $R^2=0.9945$, y 为标准溶液在334 nm处吸光度, x 为硒质量浓度/(μg/mL)。

1.3.4.2 小米Se-SDF硒含量的测定

参考文献[32], 进行小米Se-SDF硒含量的测定。称取50 mg小米Se-SDF放入三角瓶中, 加入3 mL混合酸(质量分数68%浓硝酸和质量分数70%高氯酸体积比为4:1)浸泡12 h, 然后用电热板加热消解至消化液出现浅棕色, 冷却至室温; 加入0.50 mL质量分数为30%的双氧水, 加热至出现白烟后, 冷却至室温; 加入10 mL蒸馏水冲洗瓶壁, 加热溶液至剩余体积为1~2 mL, 再用混酸(6 mol/L的硝酸和质量分数70%高氯酸体积比为4:1)定容至10 mL待测。取2 mL待测溶液, 加入6 mL蒸馏水, 用1.0 mol/L盐酸溶液调至pH值2~3, 然后加入4 mL质量分数2%的邻苯二胺溶液, 放置暗处反应20 min; 用质量分数5%的NaOH溶液调节至中性, 加入5 mL甲苯振荡2 min, 静置分层, 吸取甲苯层测定其在334 nm波长处的吸光度, 按照1.3.4.1中标准曲线回归方程计算甲苯层中硒的质量浓度, 按公式(1)计算样品中硒含量。

$$\text{硒含量}/(\text{mg/g}) = \frac{\rho \times V_2 \times V_1}{V_3 \times m \times 1000} \quad (1)$$

式中: ρ 为甲苯层中硒的质量浓度/(μg/mL); V_1 为定容后待测溶液体积(10 mL); V_2 为甲苯层的总体积(5 mL); V_3 为用于络合反应的待测溶液体积(2 mL); m 为准确称取的小米Se-SDF质量/g。

1.3.4.3 小米Se-SDF得率的计算

按公式(2)计算小米Se-SDF得率。

$$\text{Se-SDF得率}/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (2)$$

式中: m_1 为小米Se-SDF质量/g; m_2 为小米SDF质量/g。

1.3.5 硒化修饰前后小米SDF结构的测定

1.3.5.1 傅里叶变换红外光谱测定

参照张艳荣等^[33]的方法进行傅里叶变换红外光谱测定。称取2 mg干燥样品与200 mg KBr粉末于研钵中, 充分混匀, 研磨, 制片。在4 000~500 cm⁻¹波数范围内进行红外光谱扫描。

1.3.5.2 微观结构的观察

参照Park等^[34]的方法, 采用SEM观察微观硒化修饰前后小米SDF微观结构。将样品干燥至恒质量, 取适量进行黏台、镀金后进行微观结构观察。

1.3.5.3 相对分子质量分布的测定

采用LC20+RID20A凝胶渗透色谱仪进行硒化修饰前后小米SDF相对分子质量分布的测定, 用岛津Lab solution GPC色谱工作站进行分析计算。将样品用流动相溶解得到质量分数0.1%的溶液。色谱条件: TOSOH TSKGEL GMPWXL凝胶色谱柱(7.8 mm×300 mm, 13 μm); 流动相: 含质量分数0.06%叠氮化钠的0.1 mol/L硝酸钠水溶液; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL。

1.3.5.4 X射线衍射图谱测定

参考文献[35], 取适量干燥后的SDF于样品槽中用玻璃板压平, 将其置于自动X射线衍射仪中。参数设置: 波长 $\lambda=0.156$ 、管压36 kV、管流20 mA、Cu靶、扫描速率2(°)/min、衍射角度 2θ 扫描范围2°~40°、步宽0.02°。

1.3.6 硒化修饰前后小米SDF的体外抗氧化活性的测定

1.3.6.1 羟自由基清除能力测定

羟自由基清除能力采用羟自由基测定试剂盒测定。实验重复3次。

1.3.6.2 DPPH自由基清除率测定

参考文献[36], 取3 mL质量分数为5%样品溶液于试管中, 加入3 mL 0.1 mmol/L DPPH溶液(用体积分数95%乙醇溶液配制), 振荡混合后, 在26 ℃下避光放置30 min, 然后在517 nm波长处测定吸光度(A_1); 同时用3 mL蒸馏水替代样品溶液, 测定混合溶液的吸光度(A_0), 用3 mL 95% (体积分数) 乙醇溶液代替DPPH溶液, 测定混合溶液的吸光度(A_2)。平行测定3次。按公式(3)计算DPPH自由基清除率。

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

1.3.6.3 总抗氧化能力测定

总抗氧化能力采用总抗氧化能力试剂盒测定。实验重复3次。

1.3.7 小米Se-SDF体外发酵液色氨酸质量浓度的测定

1.3.7.1 色氨酸标准曲线的绘制

参考文献[37-38], 配制100 mL质量浓度1 g/L的色氨酸母液, 再分别用蒸馏水稀释成20、40、80、100、120、150 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准液。分别量取1 mL色氨酸系列标准液和4 mL质量浓度3 g/L的对二甲氨基苯甲醛溶液(用9 mol/L的硫酸溶液溶解)于比色管中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴20 min, 然后加入30 μL 质量分数0.5%的亚硝酸钠溶液混匀, 继续水浴5 min, 取出冷却, 测定590 nm处测吸光度(以9 mol/L的硫酸溶液作空白对照)。色氨酸标准曲线回归方程为 $y=0.013x+0.0036$, $R^2=0.9996$ (y 为吸光度, x 为色氨酸质量浓度/ $\mu\text{g/mL}$)。

1.3.7.2 小鼠粪便稀释液体外发酵液中色氨酸质量浓度的测定

参考文献[39], 选取5只健康小鼠粪便作为菌种源, 为了防止粪便污染, 小鼠粪便利用代谢笼每天上午9点钟进行收集, 将小鼠粪便放入灭菌环氧树脂管, 立即用1 mol/L pH 7磷酸盐缓冲液按照体积比1:9稀释。分别以质量浓度1.55 g/L的小米SDF(2 mL)、小米IDF(2 mL)、小米Se-SDF(低、中、高3个剂量组分别为1、2、3 mL)和质量浓度9.15 mg/L的亚硒酸钠(2 mL)作为碳源(空白为2 mL蒸馏水), 加入10 mL粪便稀释液进行体外发酵实验。将样品混匀后在37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧工作站中发酵, 并在发酵的0、6、12、24 h取样测定色氨酸的质量浓度。

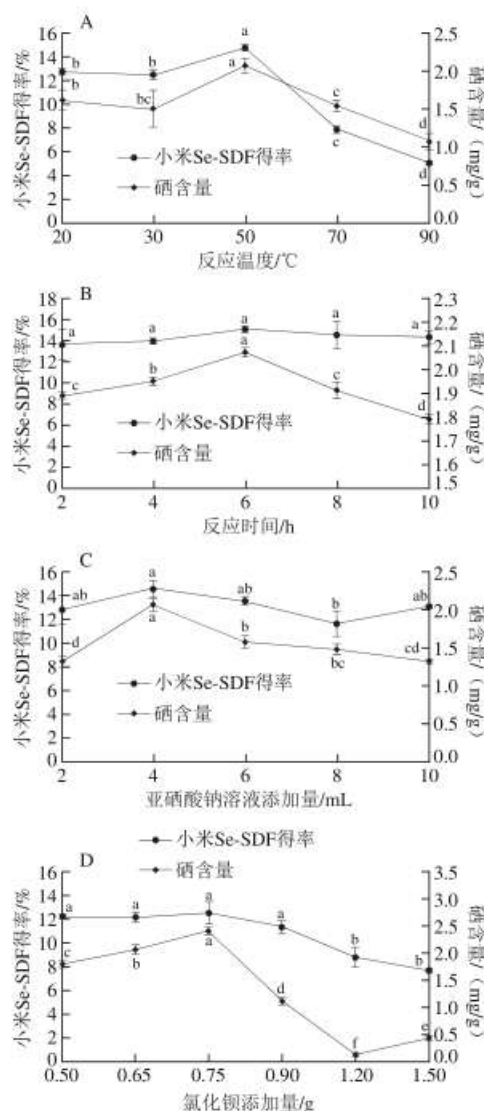
1.4 数据处理与分析

所有实验均设置3组平行, 数据用平均值 $\pm$ 标准差表示, 采用SPSS 22软件及Excel 2019软件对数据进行统计分析, 采用Duncan检验进行单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 表示差异显著, 用Origin 8.0软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 硒化修饰小米SDF条件的单因素试验结果

如图1A所示, 随着反应温度的升高, 小米Se-SDF得率及硒含量呈现先增加后降低的趋势, 两者在50 $^{\circ}\text{C}$ 达到峰值, 此时小米Se-SDF得率为14.85%, 硒含量为2.07 mg/g; 随着反应温度进一步升高, 小米Se-SDF得率及硒含量迅速降低, 这可能是由于温度对SDF结构造成一定程度的破坏, 使其发生降解, 导致硒不能与SDF很好地结合, 因而降低了Se-SDF得率和硒含量。任广明^[40]研究发现, 反应温度达到60 $^{\circ}\text{C}$ 以上时会使得硒化修饰过程中香菇多糖硒含量及硒结合力明显降低, 并分析这是由于反应液温度过高时, 反应溶液中的多糖分子运动增强, 离子振动剧烈, 阻碍了香菇多糖与硒之间的结合。



同一指标小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图1 反应温度(A)、时间(B)、亚硒酸钠溶液添加量(C)、氯化钡添加量(D)对小米SDF硒化修饰的影响

Fig. 1 Effect of reaction temperature (A), time (B), amount of sodium selenite solution (C) and amount of barium chloride (D) on the selenium modification of millet SDF

反应时间对硒化修饰结果的影响如图1B所示。随着反应时间的延长, 小米Se-SDF得率及硒含量呈现上升后下降的趋势, 在反应时间为6 h时, 小米Se-SDF得率及硒含量达到最大, 分别为15.1%、2.07 mg/g; 实验开始时反应时间太短而导致SDF与亚硒酸钠反应不充分, 两者不能有效结合, 所以得率及硒含量较低; 而在反应6 h后, 随着反应时间过长, SDF在高温、强酸条件下产生降解, 导致小米Se-SDF得率降低^[41]。

如图1C所示, 5 mg/mL亚硒酸钠溶液添加量为4 mL时小米Se-SDF得率及硒含量达到最大, 分别为14.56%、2.07 mg/g。当继续增加亚硒酸钠溶液添加量时, 小米Se-SDF

得率降低, 硒含量降低, 这与任广明^[40]的研究结果一致。这可能是由于溶液中硒的结合位点有限, 当亚硒酸钠溶液添加量不断增加时, 亚硒酸根离子之间的竞争增加, 而催化剂含量不足, 催化作用降低, 从而降低了反应效率, 导致硒结合率下降, 使得小米Se-SDF得率、硒含量降低。

如图1D所示, 氯化钡添加量为0.75 g时小米Se-SDF得率达到最大, 为12.53%, 此时硒含量也达到峰值, 为2.41 mg/g; 当氯化钡添加量大于0.75 g时, 小米Se-SDF得率和SDF的硒结合量均降低。这可能是因为随着氯化钡添加量的增加, 其对亚硒酸钠和小米SDF的反应起到催化作用, 所以两者的结合能力增强, 但当继续加入时, 氯化钡阻碍了硒与SDF之间的结合, 因而导致小米Se-SDF得率和硒含量降低^[41]。

2.2 硒化修饰小米SDF正交试验结果及方差分析

表2 硒化修饰小米SDF条件正交试验设计及结果
Table 2 Design and results of orthogonal experiments on the condition of selenochemically modified millet

试验号	A反应温度/℃	B反应时间/h	C 5 mg/mL亚硒酸钠溶液添加量/mL	D氯化钡添加量/g	小米Se-SDF得率/%	硒含量/(mg/g)
1	40	5	3	0.65	16.29	0.81
2	40	6	4	0.75	15.86	1.50
3	40	7	5	0.85	10.92	1.10
4	50	5	4	0.85	11.22	1.63
5	50	6	5	0.65	14.75	1.78
6	50	7	3	0.75	11.80	1.92
7	60	5	5	0.75	10.17	1.66
8	60	6	3	0.85	10.35	2.51
9	60	7	4	0.65	10.43	2.32
小米Se-SDF得率/%						
k_1	14.36	12.56	12.81	13.82		
k_2	12.59	13.65	12.50	12.61		
k_3	10.32	11.05	11.95	10.83		
R	4.04	2.60	0.87	2.99		
硒含量/(mg/g)						
k_1	1.14	1.37	1.75	1.64		
k_2	1.78	1.93	1.82	1.69		
k_3	2.16	1.78	1.51	1.74		
R	1.02	0.56	0.31	0.11		

表3 以硒化修饰小米粉SDF得率为指标的正交试验方差分析结果

因素	偏差平方和/%	自由度	均方/%	F/%	显著性
A	28.87	2	14.43	14.53	**
B	1.04	2	0.52	0.52	—
C	2.66	2	1.33	1.34	—
D	12.43	2	6.22	6.26	*
误差	8.94	9			

注: *, 影响显著 ($P < 0.05$); **, 影响极显著 ($P < 0.01$); —, 无显著性影响 ($P > 0.05$)。表4同。

表4 以硒化修饰小米粉SDF硒含量为指标的正交试验方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	均方	F	显著性
A	3.057	2	1.528	16.577	**
B	1.751	2	0.876	9.497	**
C	0.592	2	0.296	3.211	—
D	0.17	2	0.085	0.925	—
误差	0.83	9			

由表2~4可知, 反应温度对小米SDF硒化结果影响最为显著 ($P < 0.01$), 由表2可知, 各因素对小米Se-SDF得率的影响大小为: 反应温度 > 氯化钡添加量 > 反应时间 > 亚硒酸钠溶液添加量; 各因素对产物中硒含量的影响大小为: 反应温度 > 反应时间 > 亚硒酸钠溶液添加量 > 氯化钡添加量。由表3、4可知, 亚硒酸钠溶液添加量对硒化结果影响不显著, 结合表2结果得到最优组合为: 反应温度40 ℃、反应时间6 h、质量浓度5 mg/mL亚硒酸钠溶液添加量3 mL、氯化钡添加量0.65 g, 通过最优组合进行实验, 得小米Se-SDF的得率为10.56%, 硒含量为2.69 mg/g。后续实验在最优组合下进行。

2.3 硒化修饰前后小米SDF的结构

2.3.1 硒化修饰前后小米SDF的傅里叶变换红外光谱

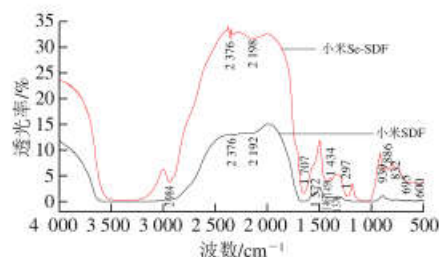
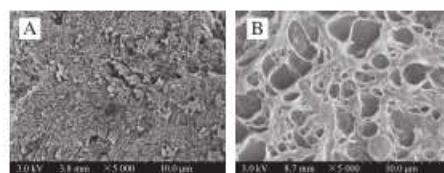


图2 硒化修饰前后小米SDF的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 2 Fourier transform infrared spectra of millet SDF before and after modification

如图2所示, 硒化修饰前后小米SDF的主体结构并未改变, 但硒化修饰后出现了新的特征吸收峰 (1434、1297、886、832、695、600 cm^{-1})。相关研究表明, 1434 cm^{-1} 处为糖环上与Se=O相邻的C-H的特征吸收峰^[28]; 1297 cm^{-1} 处为C-H的弯曲振动峰^[41], 也可能是O-Se-O的拉伸振动引起的^[42]; 886 cm^{-1} 处为Se=O键的特征吸收峰^[43]; 832 cm^{-1} 处为Se=O键的特征吸收峰^[41]; 695、600 cm^{-1} 处出现的吸收峰分别为Se-OH、Se-O-C的特征吸收峰^[44-45]。硒化修饰前后小米SDF的傅里叶变换红外光谱表明, 硒与SDF的结合是通过O-Se-O、Se-OH、Se-O-C和Se=O键完成的。

2.3.2 硒化修饰前后小米SDF微观结构



A. 小米SDF; B. 小米Se-SDF。

图3 修饰前后小米SDF的SEM图

Fig. 3 SEM images of millet SDF before and after modification

由图3可以清晰地看出修饰前后小米SDF微观形态的差异。小米Se-SDF表面多孔且孔径较大, 呈蜂窝状,

而未经修饰的小米SDF为不规则片状,且结构致密,这与曹龙奎等^[46]的研究结果一致。小米SDF表面颗粒较聚集,可能是由于其分子间相互作用力强,使分子间产生强烈的吸引力;而小米Se-SDF表面多孔,聚合度小,这种变化可能是由于硒与SDF之间的相互作用改变了分子间的相互作用及范德华力的作用^[47]。

2.3.3 硒化修饰前后小米SDF相对分子质量分布

图4为硒化修饰前后小米SDF的凝胶渗透色谱图,可以看出硒化修饰前后小米SDF各有两个组分,相对分子质量分别为 $0.57 \times 10^4 \sim 33.25 \times 10^4$ 、 $0.05 \times 10^4 \sim 0.56 \times 10^4$ 和 $2.75 \times 10^4 \sim 686.79 \times 10^4$ 、 $157 \sim 20.98 \times 10^4$ 。如表5和图4所示,小米SDF重均相对分子质量 $M_w = 2.67 \times 10^4$,数均相对分子质量 $M_n = 1.32 \times 10^4$,分散系数为2.02,相对分子质量 $20 \times 10^4 \sim 30 \times 10^4$ 、 $10 \times 10^4 \sim 20 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ 、小于 1×10^4 的分布占比分别为1.202 0%、14.187 7%、55.348 5%、29.261 8%;小米Se-SDF重均相对分子质量 $M_w = 1.09 \times 10^4$,数均相对分子质量 $M_n = 2.72 \times 10^3$,分散系数为4,相对分子质量在 $100 \times 10^4 \sim 750 \times 10^4$ 、 $50 \times 10^4 \sim 100 \times 10^4$ 、 $10 \times 10^4 \sim 50 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ 、小于 1×10^4 的分布占比分别为75.256 2%、10.010 2%、2.791 5%、8.684 9%、3.257 2%,两种SDF分散系数均小于10,说明样品纯度较高^[48]。由以上数据知,硒化修饰后小米SDF重均相对分子质量下降,分散范围较广,推测这可能是因为酸性条件使得SDF发生降解,这与图3所测得的结果一致。

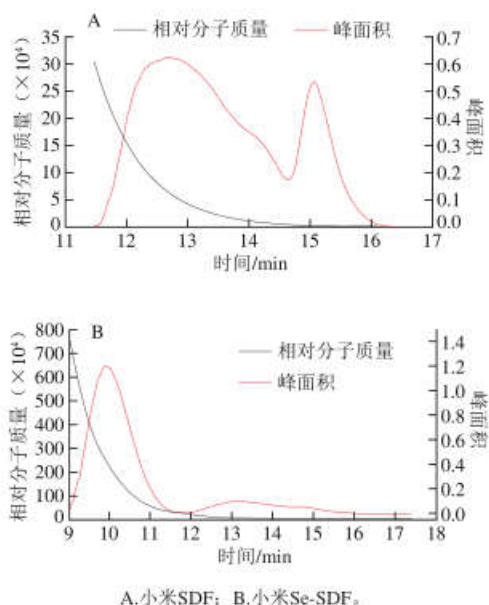


图4 硒化修饰前后小米SDF的凝胶渗透色谱图

Fig. 4 Gel permeation chromatograms of millet SDF before and after modification

表5 硒化修饰前后小米SDF的相对分子质量

指标	小米SDF	小米Se-SDF
M_n	$(1.32 \pm 0.82) \times 10^4$	$(2.72 \pm 0.34) \times 10^3$
M_w	$(2.67 \pm 1.16) \times 10^4$	$(1.09 \pm 0.2) \times 10^4$
M_w/M_n (分散系数)	2.02 ± 1.41	4.00 ± 0.59

2.3.4 硒化修饰前后小米SDF的X射线衍射图谱

由图5可知,小米SDF在 2θ 为 $21.840 \sim 29^\circ$ 处出现较弱的结晶衍射峰,衍射峰较宽,说明小米SDF为不规则且无定型态^[49],与SEM图观察到的结果一致;小米Se-SDF在 $21.684 \sim 37^\circ$ 处有明显的结晶衍射峰,这说明硒化修饰在一定程度上会使小米SDF结构呈现微晶态^[40],通过对比发现修饰对SDF的XRD衍射峰位置无明显影响,因此认为硒化修饰并未使其结晶结构类型发生改变^[50]。根据Segal^[51]的计算方法,可计算得到小米SDF的结晶指数为11.23%,小米Se-SDF的结晶指数为9.51%,说明硒化修饰使小米SDF结晶度降低,结晶区域变小^[52],或是由于物理结构的破坏和内部结构的暴露,促进了结晶中酶解的增强,导致结晶度降低^[53]。

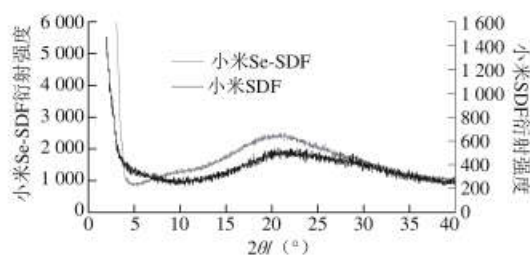


图5 修饰前后小米SDF的X射线衍射图谱

Fig. 5 X-ray diffraction spectra of millet SDF before and after modification

2.4 小米Se-SDF体外抗氧化活性

表6 硒化修饰前后小米SDF的体外抗氧化活性测定结果

样品	羟自由基清除能力/(U/mL)	DPPH自由基清除率/%	总抗氧化能力/(U/mL)
小米SDF	40.46 ± 0.04	29.54 ± 1.31	6.05 ± 0.36
小米Se-SDF	41.35 ± 0.44	$68.00 \pm 1.68^{**}$	$9.22 \pm 0.10^*$

注:对于同一指标,*不同样品差异显著($P < 0.05$);**不同样品差异极显著($P < 0.01$)。

如表6所示,与小米SDF相比,小米Se-SDF羟自由基清除能力提高了2.20%,DPPH自由基清除率提高了130.18%,总抗氧化能力提高了52.40%。罗敏等^[54]研究发现,硒化前后米胚多糖对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、DPPH自由基均有不同程度的清除能力,且硒化的米胚多糖效果更佳显著。Xiao Heng等^[55]通过比较马尾藻多糖硒化前后抗氧化活性,发现经过硒化的多糖表现出更高的活性。膳食纤维是一种非淀粉多糖,其抗氧化活性与其分子量、糖醛酸含量等有关^[56]。有研究表明,多糖清除自由基的能力

与其羟基的供氢能力呈正相关^[55-57]。由图2可知,小米Se-SDF在 1459 cm^{-1} 附近的吸收峰显示羟基的存在,这可能是其抗氧化能力较强的原因。此外,糖醛酸含量较高的多糖容易解离出氢原子,抗氧化活性更强^[58],由图2可知,小米Se-SDF在 1707 cm^{-1} 附近的吸收峰显示醛基或羧基的存在,说明小米Se-SDF中富含糖醛酸,这可能是其抗氧化能力较强的另一个原因。多糖中硒基或硒酸酯基的存在也能激活异位碳^[59]的氢原子,这也与图2的结果相一致。修饰前后小米SDF的体外抗氧化活性测定结果表明,硒化修饰在提高SDF的抗氧化活性方面发挥了关键的作用,与Lee等^[60]报道的结果一致。

2.5 小鼠粪便稀释液体外发酵液中色氨酸质量浓度的变化

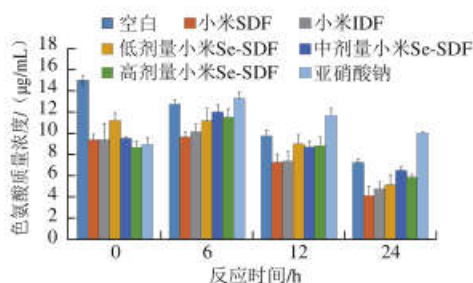


图6 小鼠粪便稀释液体外发酵液中色氨酸质量浓度的变化

Fig. 6 Changes in tryptophan content in fermentation broth of mouse intestinal flora utilizing different carbon sources

由图6可知,随着发酵时间的延长,发酵液中色氨酸质量浓度呈现先增加后降低的趋势。在发酵6 h时,各组发酵液中色氨酸质量浓度达到峰值,这可能是因为当各种碳源加入到发酵液中后,为发酵液中菌类提供营养物质来源,发酵液中有一部分菌类利用这些营养物质产生色氨酸,从而增加了发酵液中色氨酸质量浓度^[61];随着发酵时间的继续延长,色氨酸质量浓度降低,这可能是因为碳源被利用导致发酵液葡萄糖浓度增高,进而导致发酵液黏度增大,造成溶氧量下降,使菌体的生长代谢受到影响,产生色氨酸能力下降^[62],而色氨酸代谢反应仍在进行,所以导致色氨酸质量浓度降低。不同时间不同碳源发酵液中色氨酸质量浓度均低于空白组,这可能是因为碳源的加入改变了发酵液中微生物数量及种类,增加了可以利用色氨酸的微生物数量,也可能是由于微生物对碳源选择的差异性,导致实验组中色氨酸质量浓度更较空白组低。从图6中可知,反应6 h后,亚硒酸钠发酵液中色氨酸质量浓度最高,这可能是因为亚硒酸钠发酵液中产生色氨酸的微生物较活跃,而利用色氨酸的微生物部分被抑制,而被抑制的原因可能是亚硒酸钠对利用色氨酸微生物具有一定的毒副作用。反应6 h后,以小米Se-SDF为碳源的发酵液中色氨酸质量浓度均高于以

小米SDF ($9.61\text{ }\mu\text{g/mL}$)和小米IDF ($10.11\text{ }\mu\text{g/mL}$)为碳源的发酵液中色氨酸质量浓度,中剂量的小米Se-SDF组发酵液中色氨酸质量浓度最高,为 $12.01\text{ }\mu\text{g/mL}$,说明小米Se-SDF可以很好地被微生物利用,这可能是因为小米SDF经过硒化修饰后,其自身生物活性得到提高,而且硒的毒性也在一定程度上被降低,所以使其产生色氨酸的能力增强。综合上述实验结果可知,以中剂量小米Se-SDF为碳源的小鼠粪便稀释液体外发酵液产生色氨酸的效果最佳。Park等^[22]证明膳食纤维可以通过肠道菌群对胃肠疾病有改善的作用,但Gibson等^[63]的研究表明SDF与部分结肠炎症状如腹痛、腹胀、腹泻的发生或恶化有关,而相关研究指出胃肠道炎症患者摄入色氨酸可以缓解炎症^[23-24],修饰后的水溶性膳食纤维在微生物的作用下可以产生一定量的色氨酸,因此,小米Se-SDF可能比小米SDF更适合胃肠功能较弱的人群食用。

3 结论

在最佳硒化修饰条件下,小米Se-SDF得率为10.56%,硒含量为 2.69 mg/g ;修饰后小米Se-SDF分子质量增加,表面多孔且孔径较大,呈蜂窝状,聚合度降低,出现 $\text{Se}=\text{O}$ 、 $\text{Se}-\text{OH}$ 、 $\text{Se}-\text{O}-\text{C}$ 等官能团,结晶结构类型无明显变化,结晶指数降低,且修饰后小米Se-SDF抗氧化活性得到提高,促肠道菌群产生色氨酸能力增强。目前,缺硒人数逐年升高,体外补硒引起广泛关注,本研究不仅为SDF与亚硒酸钠生产有机硒食品提供理论依据,还可为后续小米在功能性食品加工领域中的应用奠定基础。小米SDF具有一定的保健功效,本研究仅对小米Se-SDF的体外抗氧化活性进行检测,未进行体内的功能性研究,后续可通过体内实验进一步探究小米Se-SDF的功能特性,为开发富硒食品提供理论依据。

参考文献:

- [1] 郑红艳. 小米麸皮膳食纤维的提取及成分和功能性质研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010: 1-8.
- [2] 李慕男, 兰凤英. 小米的营养成分及保健功能研究进展[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2017, 33(7): 56-60. DOI:10.3969/j.issn.1673-1492.2017.07.011.
- [3] HOWLETT J F, BETTERIDGE V A, CHAMP M, et al. The definition of dietary fiber: discussions at the Ninth Vahouny Fiber Symposium: building scientific agreement[J]. Food Nutrition Research, 2010, 54(1): 1-5. DOI:10.3402/fnr.v54i0.5750.
- [4] 张小强. 膳食纤维的定义、分类和理化特性[J]. 科技展望, 2016, 26(20): 285. DOI:10.3969/j.issn.1672-8289.2016.20.243.
- [5] 吕秉霖, 袁尔东. 膳食纤维的改性及应用[J]. 粮食科技与经济, 2019, 44(3): 78-81. DOI:10.16465/j.gste.cn431252ts.20190318.
- [6] O'GRADY J, SHANAHAN F. Dietary fiber and gastrointestinal disease: an evolving story[J]. Current Gastroenterology Reports, 2018, 20(12): 59. DOI:10.1007/s11894-018-0667-0.

- [7] 韩浩晨. 过量摄入膳食纤维会怎样[J]. 中华养生保健, 2019, 7(7): 75.
- [8] 沈蒙, 王维浩, 康丽君, 等. 黑豆皮可溶性膳食纤维对糖尿病小鼠抗炎因子的调节作用[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 81-85. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20190512-124.
- [9] 薛萌, 王新民. 糖尿病胃病的诊治进展[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2010, 30(2): 100-102. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2010.02.009.
- [10] MA X, GUO Z H, WANG Deyun, et al. Effects of sulfated polysaccharides and their prescriptions on immune response of ND vaccine in chicken[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(1): 9-13. DOI:10.1016/j.carbpol.2010.04.013.
- [11] 曹鼎鼎, 孟田田, 舒绪刚, 等. 硒元素在动物体内的吸收代谢研究进展[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2017, 30(4): 66-70. DOI:10.3969/j.issn.1674-5663.2017.040.
- [12] 肖再利. 硒元素的功能作用及其在畜禽中的研究进展[J]. 湖南饲料, 2018(4): 41-45. DOI:10.3969/j.issn.1673-7539.2018.04.014.
- [13] 李华, 赵素云, 铁梅. 富硒金针菇对羟自由基的清除作用[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 18-21. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-201017004.
- [14] 薛玲, 付思雨, 刘祥东, 等. 硒多糖药理作用的研究进展[J]. 中国医学创新, 2019, 16(10): 169-172. DOI:10.3969/j.issn.1674-4985.2019.10.044.
- [15] LI Jing, SHEN Bingxiang, NIE Songliu, et al. A combination of selenium and polysaccharides: promising therapeutic potential[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 206(2): 163-173. DOI:10.1016/j.carbpol.2018.10.088.
- [16] ZHU Zhenyuan, LIU Fei, GAO Hui, et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity of selenium polysaccharide from *Cordyceps militaris*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93(12): 1090-1099. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.076.
- [17] HUANG Shiyu, YANG Wenjian, HUANG Gangliang. Preparation and activities of selenium polysaccharide from plant such as *Grifola frondosa*[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 242(8): 116409. DOI:10.1016/j.carbpol.2020.116409.
- [18] KALETA B, GÓRSKI A, CIEŚLAK R, et al. Selenium-containing polysaccharides from *Lentinula edodes*: biological activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 223(11): 115078. DOI:10.1016/j.carbpol.2019.115078.
- [19] DADOK I, TYSZCZUK-ROTKO K, MROCZKA R, et al. Simultaneous voltammetric analysis of tryptophan and kynurenine in culture medium from human cancer cells[J]. Talanta, 2020, 209(3): 120574. DOI:10.1016/j.talanta.2019.120574.
- [20] LE FLOCH N, OTTEN W, MERLOT E. Tryptophan metabolism: from nutrition to potential therapeutic applications[J]. Amino Acids, 2011, 41(5): 1195-1205. DOI:10.1007/s00726-010-0752-7.
- [21] FRIEDMAN M. Analysis, nutrition, and health benefits of tryptophan[J]. International Journal of Tryptophan Research, 2018, 11(9): 1-12. DOI:10.1177/1178646918802282.
- [22] PARK J, FLOCH M H. Prebiotics, probiotics, and dietary fiber in gastrointestinal disease[J]. Gastroenterology Clinics of North America, 2007, 36(1): 47-63. DOI:10.1016/j.gtc.2007.031.
- [23] SHIZUMA T, MORI H, FUKUYAMA N. Protective effect of tryptophan against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis[J]. Turkish Journal of Gastroenterology, 2013, 24(24): 30-35. DOI:10.4318/tjg.2013.0558.
- [24] HISAMATSU T, OKAMOTO S, HASHIMOTO M, et al. Novel, objective, multivariate biomarkers composed of plasma amino acid profiles for the diagnosis and assessment of inflammatory bowel disease[J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e31131. DOI:10.1371/journal.pone.0031131.
- [25] ISLAM J, SATO S, WATANABE K, et al. Dietary tryptophan alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through aryl hydrocarbon receptor in mice[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2017, 42(4): 43-50. DOI:10.1016/j.jnutbio.2016.12.019.
- [26] MAITRE M, KIEIN C, PATTE-MENSAH C, et al. Tryptophan metabolites modify brain A β peptide degradation: a role in Alzheimer's disease[J]. Progress in Neurobiology, 2020, 190(7): 101800. DOI:10.1016/j.pneurobio.2020.101800.
- [27] PIANESSO D, RADÜNZ NETO J, DA SILVA L P, et al. Determination of tryptophan requirements for juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) and its effects on growth performance, plasma and hepatic metabolites and digestive enzymes activity[J]. Animal Feed Science and Technology, 2015, 210(12): 172-183. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2015.09.025.
- [28] 谢建华. 青钱柳多糖的分子修饰及其生物活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014: 21-22; 50-51.
- [29] 陈清华. 黄芪多糖的硒化修饰及其体外抗氧化作用的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010: 32.
- [30] 刘飞. 硒化蛹虫草多糖的制备、结构与活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017: 15.
- [31] 王瑞红. 硒化多糖的制备及其表征[D]. 武汉: 华中师范大学, 2012: 11.
- [32] 张昊, 魏跃伟, 姬小明, 等. 烟叶多糖硒化衍生物制备及其体外抗氧化活性研究[J]. 生物技术通报, 2019, 35(10): 89-94. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2019-0323.
- [33] 张艳荣, 魏春光, 崔海月, 等. 马铃薯膳食纤维的表征及物性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 19-23. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-201311005.
- [34] PARK K H, LEE K Y, LEE H G. Chemical composition and physicochemical properties of barley dietary fiber by chemical modification[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60(9): 360-365. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.024.
- [35] ULLAH I, YIN T, XIONG S B, et al. Structural characteristics and physicochemical properties of okara (soybean residue) insoluble dietary fiber modified by high-energy wetmedia milling[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 82(9): 15-22. DOI:10.1016/j.lwt.2017.04.014.
- [36] 魏明, 王晨, 杨超英, 等. 酶法协同超声波提取米糠多糖及其抗氧化活性研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(1): 78-82. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2015.01.022.
- [37] 张婷婷, 杨生玉. 可见分光光度法快速检测发酵液中L-色氨酸[J]. 食品科技, 2016, 41(5): 284-287. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2016.05.054.
- [38] 张剑, 杨新妮, 高冰. 分光光度法在色氨酸定量中的应用[J]. 中国酿造, 2012, 31(6): 166-169. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2012.06.046.
- [39] 王津, 茹鑫, 邹妍, 等. 茶叶膳食纤维作为益生元对肠道菌群的影响[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(11): 76-82. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2019.11.014.
- [40] 任广明. 香菇多糖的硒化及其对慢性胰腺炎小鼠肠道菌群的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016: 35-37; 46-47.
- [41] 胡成, 刘雅萌, 戴士杰, 等. 硒化肿节风浸膏残渣多糖的制备、工艺优化及抗肿瘤活性研究[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(1): 109-116. DOI:10.11665/j.issn.1000-5048.20180116.
- [42] WANG Lu, LI Xiaoyu, WANG Binbin. Synthesis, characterization and antioxidant activity of selenium modified polysaccharides from *Hohenbuehelia serotina*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120(12): 1362-1368. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.139.
- [43] 邱树磊. 硒化大蒜多糖和硒化枸杞多糖的增强免疫和抗氧化活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014: 24-25.

- [44] 姚万玲. 党参多糖的硒化修饰及其抗氧化和增强免疫活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 39.
- [45] 刘婕. 黄芪多糖和白术多糖及其硒化衍生物增强免疫和抗氧化活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015: 44-46.
- [46] 曹龙奎, 康丽君, 寇芳, 等. 改性前后小米糠膳食纤维结构分析及体外抑制 α -葡萄糖苷酶活性[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 46-52. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201811008.
- [47] ZHU Jiangxiong, YU Chuang, HAN Zi, et al. Comparative analysis of existence form for selenium and structural characteristics in artificial selenium-enriched and synthetic selenized green tea polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154(7): 1408-1418. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.11.022.
- [48] 于鹏. 富硒甘薯中性硒多糖的分离纯化和组成研究[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2019: 38-39.
- [49] 于阔. 富硒方式对茶多糖的影响研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2018: 49.
- [50] ZHAO Xiaoyan, CHEN Jun, CHEN Fengliang, et al. Surface characterization of corn stalk superfine powder studied by FTIR and XRD[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 104(4): 207-212. DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.123.
- [51] SEGAL L. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer[J]. Textile Research Journal, 1959, 29(10): 786-794. DOI:10.1177/004051755902901003.
- [52] 陈玲, 温其标, 颜盛发. 羧甲基化对淀粉结晶结构的影响[J]. 郑州粮食学院学报, 1997, 18(3): 95-100.
- [53] WEN Ya, NIU Meng, ZHANG Binjia, et al. Structural characteristics and functional properties of rice bran dietary fiber modified by enzymatic and enzyme-micronization treatments[J]. LWT-Food Science & Technology, 2017, 75: 344-351. DOI:10.1016/j.lwt.2016.09.012.
- [54] 罗敏, 陈德经, 韩豪, 等. 硒化米胚多糖的抗氧化性[J]. 食品科学, 2018, 39(19): 58-63. DOI:10.7506/spkx1002-6630-2018190010.
- [55] XIAO Heng, CHEN Chun, LI Chao, et al. Physicochemical characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of selenized polysaccharides from *Sargassum pallidum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 308-315. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.03.138.
- [56] LI Chao, HUANG Qiang, FU Xiong, et al. Characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Prunella vulgaris* Linn[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 298-305. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.01.010.
- [57] WANG Junlong, ZHAO Baotang, WANG Xiaofang, et al. Synthesis of selenium-containing polysaccharides and evaluation of antioxidant activity *in vitro*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(5): 987-991. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2012.08.011.
- [58] LIAO Ningbo, CHEN Shiguo, YE Xingqian, et al. Structural characterization of a novel glucan from *Achatina fulica* and its antioxidant activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(11): 2344-52. DOI:10.1021/jf403896c.
- [59] WEI Dongfeng, CHEN Tong, YAN Mingfei, et al. Synthesis, characterization, antioxidant activity and neuroprotective effects of selenium polysaccharide from *Radix hedysari*[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 125: 161-168. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.02.029.
- [60] LEE J H, LEE Y K, CHANG Y H. Effects of selenylation modification on structural and antioxidant properties of pectic polysaccharides extracted from *Ulmus pumila* L.[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 104(Part A): 1124-1132. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.06.121.
- [61] 刘子强, 张震, 蔡萌萌, 等. 稀糖分罐发酵对L-色氨酸发酵的影响[J]. 中国酿造, 2018, 37(4): 132-136. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2018.04.025.
- [62] 张婷婷. 微生物法生产L-色氨酸的检测及发酵过程优化[D]. 开封: 河南大学, 2017: 29-32.
- [63] GIBSON P R, SHEPHERD S J. Personal view: food for thought-western lifestyle and susceptibility to Crohn's disease. The FODMAP hypothesis[J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2005, 21(12): 1399-1409. DOI:10.1111/j.1365-2036.2005.02506.x.