

小米麸皮 SDF - Cr(Ⅲ) 螯合物的制备及 体外酶活抑制的分析

全志刚¹ 王维浩^{1,2} 赵姝婷¹ 刘德志¹ 王一飞¹
武云娇¹ 苏有韬¹ 曹龙奎^{1,2}

(黑龙江八一农垦大学食品学院¹, 大庆 163319)

(黑龙江八一农垦大学国家杂粮工程技术研究中心², 大庆 163319)

摘要 为生产具有较低毒性和较高生物活性的新型有机铬(Cr^{3+})补充剂,提高小米麸皮的附加值,本实验将小米麸皮 SDF 与铬(Cr^{3+})进行螯合,以螯合率为指标,采用单因素与响应面结合的方法,对螯合工艺进行优化;运用扫描电镜、红外光谱比较螯合前后的结构变化,并测定螯合前后 SDF 体外对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用。结果表明:制备 SDF - Cr(Ⅲ)最佳条件为 CrCl_3 质量浓度 7.2 mg/mL、质量比 2.2:1、反应 pH 8.6、反应温度 73 $^{\circ}\text{C}$,在此条件下螯合率达到 35.179%。通过扫描电镜图分析表明:SDF - Cr(Ⅲ)在表面微观结构均有显著改变;红外光谱分析表明:SDF 的—OH、C—O—C、—COOH 参与了反应。体外实验表明:改性前后小米麸皮 SDF 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性均有抑制作用,且 SDF - Cr(Ⅲ)螯合物较 SDF 显著。

关键词 小米麸皮 铬 螯合物 结构表征 抑制作用

中图分类号:TS231 文献标识码:A 文章编号:1003-0174(2021)09-0074-08

网络首发时间:2021-06-05 19:00:49

网络首发地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2864.TS.20210604.1008.002.html>

小米麸皮含有丰富的营养成分,尤其是膳食纤维。小米麸皮约占小米粒的 6%~8%。其中含有 50%~60% 的膳食纤维^[1,2]。膳食纤维(DF)被认为是一类碳水化合物聚合物或低聚物,它们不被小肠消化,进入大肠,然后被肠道菌群部分或完全发酵^[3]。

铬(Ⅲ)对改善 T_2DM 有益。铬(Ⅲ)是葡萄糖耐量因子的必需微量元素,在调节血糖水平和胰岛素抵抗^[4]改善系统性胰岛素敏感性和葡萄糖稳态方面起着重要作用^[5]。据报道铬(Ⅲ)可有效改善血糖和脂质体内稳态,因此可应用于抗糖尿病药^[6]。但是,铬在肠道的吸收和生物利用度在很大程度上取决于其在体内的化学形式。无机铬(Ⅲ)难以通过肠上皮吸收细胞并被哺乳动物利用^[7]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂和 α -淀粉酶抑制剂是目前应用较广泛的降血糖药物^[8]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂和 α -淀粉酶抑

制剂参与竞争性抑制小肠黏膜刷状缘上的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶,减缓碳水化合物快速分解成葡萄糖,从而达到调节糖尿病患者餐后血糖的作用^[9,10]。开发自然来源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂和 α -淀粉酶抑制剂已成为糖尿病治疗的热点。研究表明小米糠 SDF 在调节血糖、血脂,防止心血管疾病均有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用^[11-13]。本研究在具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的 SDF 主链上引入降糖活性因子—三价铬离子,制备了一种小米麸皮 SDF - Cr(Ⅲ)螯合物。

采用小米麸皮 SDF 为实验材料,与三价铬形成螯合物,同时对螯合后的小米麸皮 SDF 进行扫描电镜表征、红外光谱分析及物理性质研究。通过建立 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制剂模型,研究改性前后小米麸皮 SDF 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性的体外抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小米麸皮; α -耐高温淀粉酶(40 000 u/mL);

基金项目:国家重点研发计划(2018YFE0206300),黑龙江省优势特色学科资助项目([2018]4号),“三纵”基础教育(ZRCPY202006)

收稿日期:2020-10-06

作者简介:全志刚,男,1994年出生,硕士,食品科学与工程

通信作者:曹龙奎,男,1965年出生,教授,农产品加工

中性蛋白酶(60 000 u/mg);淀粉葡萄糖苷酶(100 000 u/mg); α -葡萄糖苷酶; α -淀粉酶;三氯化铬($\text{CrCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、石油醚、盐酸、氢氧化钠;分析纯。

1.2 仪器与设备

Aldpha1-2LDplus 真空冷冻干燥机, RE-52A 旋转蒸发器, DELTA320 精密 pH 计, 透析袋(Viskase MW:3 500Da), GDE-CSF6 意大利 VELD 膳食纤维测定仪, TGL16B 型台式离心机, HJ25-SCT-02 型索氏提取器, 傅里叶红外光谱(FTIR)仪, SU1510 型扫描电镜。

1.3 方法

1.3.1 小米麸皮 SDF 提取

称取 5.0 g 脱脂小米麸皮, 按照 1:50(g/mL)的料液比加入蒸馏水, 加入 250 mL 磷酸盐缓冲溶液, 调节 pH 至 6.0, 加入 100 μL 耐高温 α -淀粉酶于 GDE 酶培养消化器中水浴培养 25 min, 样品温度保持在 95~100 $^{\circ}\text{C}$ 。调节 pH 至 7.0, 加入 100 μL 中性蛋白酶溶液于 GDE 中 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 30 min。调节 pH 至 4.5, 加入 100 μL 淀粉葡萄糖苷酶于 GDE 中 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 30 min, 用碘液检测直至不变蓝为止。灭酶(大于 100 $^{\circ}\text{C}$ 10 min), 将酶解后反应物转移至 CSF6 过滤装置中, 滤液经离心(4 000 r/min, 20 min), 浓缩到原液的 1/4~1/5, 后用 4 倍体积的 95% 乙醇醇沉 12 h(4 $^{\circ}\text{C}$), 4 000 r/min 离心 20 min, -108 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥 8 h 得 SDF, 滤渣用热水洗涤、35 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 10 h 得 IDF^[14,15]。

1.3.2 小米麸皮 SDF 的纯化

准确称取小米麸皮 SDF 0.5 g, 加蒸馏水溶解至 100 mL, 采用 Sevag 法脱蛋白, 按照正丁醇:三氯甲烷=1:5 比例配制 Sevag 试剂, 以浓缩液体积的 1/4 加入 Sevag 试剂, 振摇 10 min, 离心弃去蛋白层, 反复 10 次以上^[16]。用氨水调节小米麸皮 SDF 溶液 pH 8.5 左右, 加入 30% 双氧水 50 mL, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 60 min, 脱色后小米麸皮 SDF 溶液用旋转蒸发器除去有机试剂, 装入 14 000 u 透析袋, 自来水透析 48 h, 蒸馏水透析 24 h。透析后, 浓缩至一定体积, 加无水乙醇使醇沉浓度达到 80%, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中醇沉过夜, 再离心分离(9 000 r/min, 5 min), 沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗涤 2 次, 冷冻干燥(真空度 0.095 MPa)至恒重, 即得精制小米麸皮 SDF, 备用^[17]。

1.3.3 SDF-Cr(Ⅲ)配合物合成

根据 Wang 等^[18]的方法合成了 SDF 铬螯合物。在碱性条件下, SDF 与 CrCl_3 反应合成 SDF-Cr(Ⅲ)螯合物, 然后通过乙醇沉淀和离心纯化。取 5 g

SDF, 用 200 mL 蒸馏水溶解, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴溶解(约 20 min), 向 SDF 溶液中滴加一定浓度的 CrCl_3 溶液, 用 2 mol/L HCl 溶液或 2 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 6.0~10.0。在 50~90 $^{\circ}\text{C}$ 下继续反应 120 min。冷却后, 离心(5 000 r/min 10 min), 浓缩上清液为原体积 1/4, 加入 3 倍体积 95% 乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 纯沉 6 h, 离心取沉淀加入少量蒸馏水, 透析和冷冻干燥, 制备 SDF-Cr(Ⅲ)螯合。

沉淀溶解在 50 mL 蒸馏水中, 然后使用分光光度法(600 nm)定量铬(Ⅲ)的含量^[19]。用六水氯化铬标准溶液在蒸馏水中得到了校准曲线。SDF-Cr(Ⅲ)螯合物的螯合率按公式计算:

$$\text{螯合率} = \frac{\text{初始铬(g)} - \text{非螯合铬(g)}}{\text{初始铬(g)}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 单因素实验

将 5 g SDF 溶解在 200 mL 去离子水中, 考察 CrCl_3 质量浓度(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mg/mL)、质量比(1:1、2:1、3:1、4:1、5:1)、pH(6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)和温度(50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$)对螯合速率的影响, 进行单因素实验, 并持续反应 120 min。

1.3.5 响应面实验

在单因素实验的基础上以 SDF-Cr(Ⅲ)螯合物的螯合速率为响应值, 采用 Design-Expert 10.0.3 统计分析软件且以 CrCl_3 的加入量、SDF 与三价铬的质量比、反应 pH、反应温度为自变量建立 Box-Behnken 模型, 对 SDF-Cr(Ⅲ)螯合反应进行响应面优化设计。响应面实验设计因素与水平如表 1 所示。

表 1 响应面实验因素与水平

因素	CrCl_3 质量浓度 A /mg/mL	B 质量比	C 反应 pH	D 反应温度/ $^{\circ}\text{C}$
-1	6	1:1	7	60
0	7	2:1	8	70
1	8	3:1	9	80

1.3.6 扫描电子显微镜(SEM)分析

使用扫描电子显微镜进行 SDF 和 SDF-Cr(Ⅲ)样品的形貌和微观结构研究。将冻干的 SDF 和 SDF-Cr(Ⅲ)样品放在双面胶带上, 并涂上薄金层。在 50.0 kV 的加速电压下收集图像。显微照片以 1 000 倍放大倍数记录^[20]。

1.3.7 傅里叶变换红外(FTIR)光谱分析

使用傅里叶变换红外光谱仪进行 FTIR 光谱分析, SDF 和 SDF-Cr(Ⅲ)(2 mg)将它们分别与 200 mg 溴化钾(KBr)粉末混合并压片, 在 4 000~400

cm⁻¹波长下红外光谱测定^[21]。

1.4 体外降血糖活性分析

1.4.1 改性前后小米麸皮 SDF 对 α - 葡萄糖苷酶抑制作用

改性前后小米麸皮 SDF 对 α - 葡萄糖苷酶抑制作用参照 Liu^[22]的方法适当修改。

1.4.2 改性前后小米麸皮 SDF 对 α - 淀粉酶抑制作用

改性前后小米麸皮 SDF 对 α - 淀粉酶抑制作用参照 Li^[23]的方法适当修改。

1.5 数据统计与分析

所有数据通过 3 次测定后取得平均值,实验分析数据采用 Excel 2010,绘图用 Origin 2018,方差分析用 SPSS V19.0,响应面分析采用 Box - Behnken 模型。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

如图 1 所示,整合率随 CrCl₃ 浓度增加而增加(最高可达 7.0 mg/mL),整合率为 30.12%。之后稍微有所降低,SDF - Cr(Ⅲ) 螯合物中铬含量的稳定可能是由于 SDF 分子与无机铬之间的平衡^[24]。也可能是 SDF 与三价铬离子发生配位反应,或者过量的 CrCl₃ 可能导致反应 pH 降低,最终降低整合率^[25]。这与尹红力等^[26]的研究结果一致,说明水溶性膳食纤维的整合反应和多糖的类似。在 SDF 与 Cr³⁺ 的质量比为 2:1 的范围内时,随着比例增加,整合率有所上升,且在质量比 2:1 时整合率达到最大,为 23.9%。此后,随质量比的增加,整合率降低。可能由于 SDF 逐渐增加,去质子化的 SDF 使 Cr³⁺ 竞争消耗,溶液显酸性。

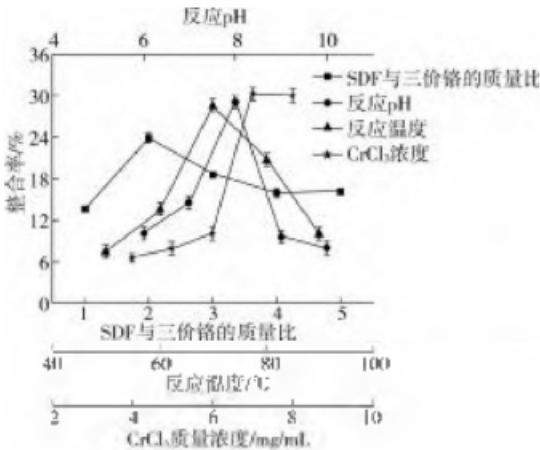


图 1 单因素对 SDF 整合的影响

随着反应 pH 的增加,整合率逐渐增加,在 pH 为 8.0 时达到最大值 29.15%,说明反应 pH 是影响 SDF - Cr(Ⅲ) 配合物整合率的重要因素。但是,过高的 pH 会使整合率降低,这与 Chen 等^[27]和 Shibakami 等^[28]研究一致,小米麸皮 SDF 含有大量的羧基(- COOH)和羟基(- OH)^[29]在弱碱性溶液中与阳离子有很强的负电荷亲和力。

随温度的升高,SDF - Cr(Ⅲ) 络合物的整合率先升高后降低。较高的反应温度导致 SDF 与溶液体系中铬离子的运动过快而不能相互结合,或改变 SDF 分子之间或分子内的化学基团^[30]。

2.2 响应面实验结果与分析

2.2.1 响应面实验设计

基于 Box - Behnken 采样原理,选择 4 个影响整合率的因素:CrCl₃ 浓度、质量比、反应 pH、反应温度进行四因素三水平响应面分析实验。响应面实验因素水平和结果见表 1 和表 2。

表 2 实验设计与结果

序号	CrCl ₃ 质量浓度 A /mg/mL	B 质量比	C 反应 pH	D 反应 温度/℃	整合率 /%
1	0	-1	0	1	14.53
2	-1	0	0	1	12.02
3	0	1	-1	0	28.65
4	0	0	0	0	35.01
5	1	1	0	0	25.10
6	0	-1	-1	0	16.65
7	1	-1	0	0	15.49
8	0	-1	1	0	25.26
9	0	1	0	-1	22.88
10	-1	0	1	0	22.38
11	1	0	0	1	23.32
12	1	0	0	-1	18.43
13	0	0	0	0	34.64
14	-1	0	-1	0	12.12
15	0	1	0	1	21.19
16	0	0	-1	1	16.67
17	-1	1	0	0	11.46
18	0	0	1	1	31.73
19	1	0	-1	0	23.29
20	0	0	-1	-1	21.01
21	0	-1	0	-1	13.23
22	0	0	0	0	33.48
23	-1	0	0	-1	11.07
24	0	0	1	-1	19.13
25	-1	-1	0	0	14.64
26	0	1	1	0	25.45
27	1	0	1	0	27.06
28	0	0	0	0	33.80
29	0	0	0	0	33.07

2.2.2 响应面实验结果及方差分析

利用 Design - Expert 10.0.3 软件对实验数据进行分析,得到二次多项回归方程:螯合率 = 34 + 4.08A + 2.91B + 2.72C + 1.14D + 3.20AB - 1.62AC + 0.99AD - 2.95BC - 0.75BD + 4.24CD - 9.65A² - 7.38B² - 3.02C² - 8.55D²。

对回归方程进行方差分析如表 3 所示。其中,模型的 F 值为 39.62,对应的 P < 0.000 1,达到极显著水平。从表 3 可以看出,工艺条件对螯合率影响大小顺序为:A > B > C > D,即 CrCl₃ 质量浓度 > 质量比 > 反应 pH > 反应温度。模型的决定系数 R² 为 0.975 6,说明模型具有较高显著性,同时 R²_{adj} = 0.951 1,能够解释实验 95.11% 的响应值变异,且与预测相关系数 Pred R² 也接近,说明此实验模型与真实数据拟合程度良好,可用该模型分析和预测螯合率最优提取工艺。

表 3 响应螯合率拟合回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	显著性
回归模型	1 618.92	14	115.64	39.92	<0.000 1	**
A	200.08	1	200.08	69.08	<0.000 1	**
B	101.68	1	101.68	35.10	<0.000 1	**
C	88.67	1	88.67	30.61	<0.000 1	**
D	15.66	1	15.66	5.41	0.035 6	*
AB	40.90	1	40.90	14.12	0.002 1	**
AC	10.53	1	10.53	3.64	0.077 3	
AD	3.88	1	3.88	1.34	0.266 4	
BC	34.87	1	34.87	12.04	0.003 8	**
BD	2.24	1	2.24	0.77	0.394 5	
CD	71.74	1	71.74	24.77	0.000 2	**
A ²	604.14	1	604.14	208.59	<0.000 1	**
B ²	353.48	1	353.48	122.04	<0.000 1	**
C ²	59.29	1	59.29	20.47	0.000 5	**
D ²	473.85	1	473.85	163.60	<0.000 1	**
残差	40.55	14	2.90			
失拟项	37.94	10	3.79	5.83	0.052 0	
纯误差	2.60	4	0.65			
合计	1 659.47	28				

2.2.3 螯合率优化提取工艺各因素响应曲面分析

通过三维响应面图和二维等高线图分析显示,由回归系数的显著性检验可知,CrCl₃ 浓度与质量比、质量比与反应 pH、反应 pH 与反应温度的交互作用达到显著水平(P < 0.05)。响应面越陡,各因素之间的两两交互作用越显著。CrCl₃ 质量浓度在 7.0 ~ 7.5 mg/mL、质量比 2 ~ 2.5 的范围内存在极值,即两者之间存在较好的交互作用。螯合率随反应 pH 因素变化的幅度小于质量比的影响。当质量比小于 2 时,螯合率与质量比呈正相关关系;而当质量比大于 2 时,其相关关系发生转折,质量比在 2 附近取值时为

螯合率的临界最佳工艺参数,而螯合率随反应 pH 的增加先增加后趋于平缓,临界最佳参数为 8。在反应 pH 7 ~ 8 之间时,随着反应温度的增大,螯合率增加,在反应 pH 8 ~ 9 之间时,随着反应温度的增大,螯合率降低。

为协同考虑各因素之间的交互作用对螯合率的影响,进一步确定全局最优解,以最大螯合率为优化目标,螯合率在 CrCl₃ 浓度、质量比、反应 pH、反应温度等因素共同影响下的最优提取工艺为:CrCl₃ 质量浓度 7.183 mg/mL,质量比 2.208:1,反应 pH 8.555,反应温度 72.941 ℃,在此条件下模型预测的螯合率为 35.199%。

2.2.4 最优工艺条件实验验证

结合实际工艺设置的可行性,取 CrCl₃ 质量浓度 7.2 mg/mL,质量比 2.2:1,反应 pH 8.6,反应温度 73 ℃ 为条件进行 3 次重复,平均螯合率为 35.179%,与模型预测结果接近,表明基于该响应面模型分析优化螯合率提取工艺的方法有效可行。

2.2.5 扫描电镜图对比

螯合前后的小米麸皮 SDF 的 SEM 图像如图 2 所示。在相同放大倍数下,SDF - Cr(Ⅲ) 表面结构疏松,显示出具有多孔的致密蜂窝状外观,分析可知,当 SDF 分子在弱碱环境下,链端或支链的官能团(例如:—OH、—NH₂、—COOH 等)会由于加入亲核试剂去质子,形成孤电子基团,打破原有的分子稳定性,这时加入三价铬离子后,形成中心配位离子,形成稳定产物 SDF - Cr(Ⅲ)^[31];SDF 呈团块状,表面较光滑,且无孔洞,表现出分层且紧凑的结构^[29],分析可知,SDF 一般呈现水平 x 轴和 y 轴方向以氢键作用力形成片层链状。初步推测 SDF 为 2D 片层结构经过螯合反应解聚后重新聚集成 3D 螺旋状结构^[32]。

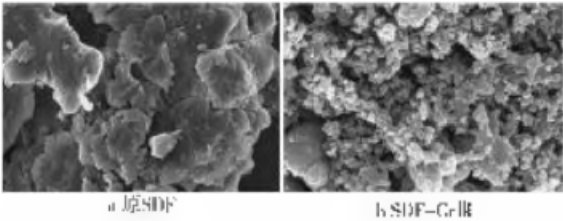


图 2 小米麸皮 SDF 的 SEM 图(1 μm Mag = 50.00 KV WD = 3.8 mm)

2.2.6 傅里叶红外色谱

如图 3 所示,在小米麸皮 SDF 红外光谱中,在 3 340 cm⁻¹ 附近的宽吸收峰处归因于羟基(—OH)的伸缩振动^[33],然而,在 3 364 cm⁻¹ 处的吸收峰有所减弱,显示红移至 3 364 cm⁻¹ 波数,并且 SDF - Cr(Ⅲ)

整合物的(—OH)吸收峰变宽,推测小米麸皮 SDF 分子上的羟基可能参与和三价铬离子配位。此外,小米麸皮 SDF 铬整合物的红外光谱上在 530.27 cm^{-1} 出现 Cr—O 的特征吸收峰^[34]。在 2923 cm^{-1} 附近出现一个较弱的吸收峰,是由于 $\nu(\text{C—H})$ 的伸缩振动,而在 1395 cm^{-1} 波数下是由于 $\sigma(\text{C—H})$ 的伸缩振动。在 1617 cm^{-1} 波数下的吸收峰可能与 C=O 或 $\sigma(\text{OH})$ 伸缩振动有关^[35],然而,在 1617 cm^{-1} 波数下的吸收峰明显有所减弱,且发生红移至 1634 cm^{-1} ,推测 C=O 或 $\sigma(\text{OH})$ 可能与三价铬离子发生配位反应。在 1089 cm^{-1} 处出现吸收峰,是由 C—O—C 中 C—O 的伸缩振动和 C—O—H 的 O—H 变角振动^[36]。表明小米麸皮 SDF 由吡喃糖苷组成,并且在 1089 cm^{-1} 处的吸收峰有所减弱,显示红移至 1100 cm^{-1} 波数,推测 C—O—C 中 C—O 或 C—O—H 的 O—H 在碱性环境中形成孤电子基团,与三价铬离子发生配位反应。红外图谱说明小米麸皮 SDF 的化学官能团和多糖类物质极其相似,同样能够发生铬离子整合反应^[37]。

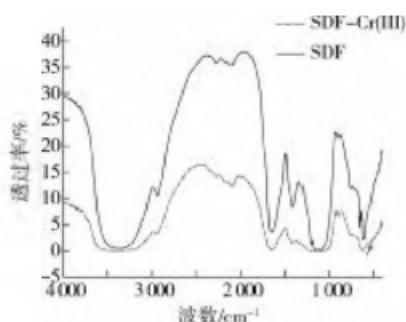


图3 SDF 以及 SDF-Cr(Ⅲ)整合物红外扫描图

2.2.7 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用

α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶可以在糖降解过程中将淀粉水解成葡萄糖,导致餐后血糖显著升高^[38]。由此, α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制可以用来评价化合物体外降血糖活性的有效方法^[39]。如图4所示,以阿卡波糖作为对照,小米麸皮 SDF 和 SDF-Cr(Ⅲ)整合物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶均有抑制作用,且随样品浓度的增大,对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率呈现上升趋势,且 SDF-Cr(Ⅲ)整合物抑制率较 SDF 显著,具有明显的量效关系。其中,SDF-Cr(Ⅲ)整合物对这2种酶的抑制作用最强,且都强于阿卡波糖。在样品质量浓度为 5 mg/mL 时,SDF-Cr(Ⅲ)整合物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率分别为 92.30% 和 85.66% 。由

spss.19 分析 SDF 和 SDF-Cr(Ⅲ)整合物对 α -葡萄糖苷酶半数抑制率 IC_{50} 表明 SDF-Cr(Ⅲ)整合物对 α -葡萄糖苷酶抑制显著优于 SDF;SDF 和 SDF-Cr(Ⅲ)整合物对 α -淀粉酶半数抑制率 IC_{50} 表明 SDF-Cr(Ⅲ)整合物对 α -淀粉酶抑制显著优于 SDF。结果表明 SDF 和 SDF-Cr(Ⅲ)整合物对 α -淀粉酶有适度的抑制同时对 α -葡萄糖苷酶有更强的抑制,与 Yan 等^[40]的研究结果一致,是一个好的降血糖活性的体现。

如图4所示,经过三价铬离子与小米麸皮 SDF 发生配位反应后,对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率更大,表明小米麸皮 SDF-Cr(Ⅲ)整合物是一种抑制能力大于小米麸皮 SDF 的 α -葡萄糖苷酶抑制剂和 α -淀粉酶抑制剂。原因为小米麸皮 SDF 分子结构中孤电子基团与 Cr^{3+} 发生配位反应,使原本分子结构改变,使分子聚合结构发生改变从而表现出良好的生物活性。

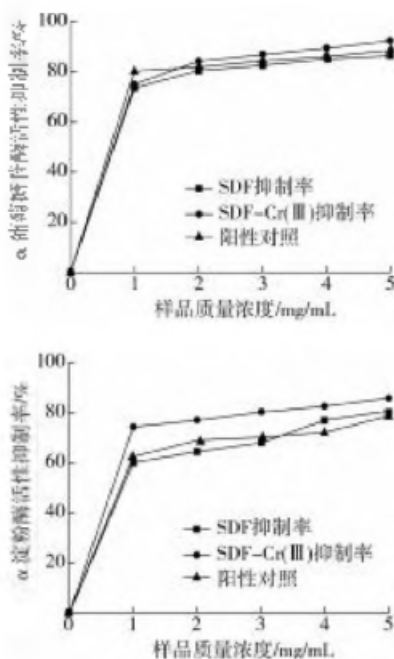


图4 SDF 和 SDF-Cr(Ⅲ)整合物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用

3 结论

以小米麸皮为原料,选用 Cr^{3+} 对小米麸皮 SDF 作为配体进行改性处理,研究提取条件对 SDF-Cr(Ⅲ)整合率的影响。在单因素实验基础上,以 SDF-Cr(Ⅲ)整合率为指标,通过响应面法优化改性条件工艺,得到最佳处理条件: CrCl_3 质量浓度 7.2 mg/mL 、

质量比2.2:1、反应pH 8.6、反应温度73℃。螯合率为35.179%，与模型预测结果接近。然后对SDF和SDF-Cr(Ⅲ)进行光谱分析，结果表明：三价铬离子与小米麸皮SDF的羟基、醚键、羧基发生了配位反应。螯合后形成的新物质从微观表面及微观结构均有较大变化，说明螯合物与小米麸皮SDF分属不同物质；改性前后小米麸皮SDF对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性均有抑制作用，且SDF-Cr(Ⅲ)络合物较SDF显著。

参考文献

- [1] 韩秋敏, 陆正清. 黄小米中水溶性膳食纤维提取工艺[J]. 中国食品添加剂, 2012(6): 198-201
HAN Q M, LU Z Q. Extraction technology of water-soluble dietary fiber from yellow millet[J]. China Food Additives, 2012(6): 198-201
- [2] ZHU Y, CHU J, LU Z, et al. Physicochemical and functional properties of dietary fiber from foxtail millet (*Setaria italica*) bran[J]. Journal of Cereal Science, 2018, 79:456-461
- [3] FULLER S, TAPSELL L C, BECK E J. Creation of a fibre categories database to quantify different dietary fibres[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 71:36-43
- [4] EWELINA K, KREJCIO Z. Chromium(Ⅲ) propionate complex supplementation improves carbohydrate metabolism in insulin-resistance rat model[J]. Food & Chemical Toxicology, 2010, 48(10):2791-2796
- [5] JAIN S K, RAINS J L, CROAD J L. High glucose and ketosis (acetoacetate) increases, and chromium niacinate decreases, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion and oxidative stress in U937 monocytes. [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(10):1581-1590
- [6] LI F, WU X, ZOU Y, et al. Comparing anti-hyperglycemic activity and acute oral toxicity of three different trivalent chromium complexes in mice[J]. Food & Chemical Toxicology, 2012, 50(5):1623-1631
- [7] NOVOTNIK B, ZEGURA B, SCANCAR J, et al. Cytotoxic and genotoxic potential of Cr(VI), Cr(Ⅲ)-nitrate and Cr(Ⅲ)-EDTA complex in human hepatoma (HepG2) cells[J]. Chemosphere, 2016, 154:124-131
- [8] HIROYUKI F, TOMOHIDE Y, KAZUNORI O. Efficacy and safety of Touchi extract, an α -glucosidase inhibitor derived from fermented soybeans, in non-insulin-dependent diabetic mellitus[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2001, 12(6):351-356
- [9] WATANABE J, KAWABATA J, KURIHARA H, et al. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(1):177-178
- [10] 朱振元, 刘晓翠, 郭蓉, 等. 蛹虫草多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(12): 55-60
ZHU Z Y, LIU X C, GUO R, et al. Inhibition of Cordyceps militaris polysaccharide on α -glucosidase activity[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 55-60
- [11] THEUWISSEN E, MENSINK R P. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease[J]. Physiology & Behavior, 2008, 94(2):285-292
- [12] ZHANG N, HUANG C, OU S. In vitro binding capacities of three dietary fibers and their mixture for four toxic elements, cholesterol, and bile acid. [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(1):236-239
- [13] OU S, KWOK K C, LI Y, et al. In Vitro Study of Possible Role of Dietary Fiber in Lowering Postprandial Serum Glucose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(2):1026-1029
- [14] SHEN M, KANG Z Y, GE Y F, et al. Research of Enzymatic Modification on the Extraction and Properties of Soluble Dietary Fiber from Black Bean Hulls[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(6):1046-1053
- [15] 张荣, 任清, 罗宇. 小米可溶性膳食纤维提取及其理化性质分析[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 69-74
ZHANG R, REN Q, LUO Y. Extraction of soluble dietary fiber from millet and analysis of its physical and chemical properties[J]. Food Science, 2014, 35(2): 69-74
- [16] 王琳炜, 欧阳臻, 张碧娟, 等. 霍山铁皮石斛多糖的脱蛋白工艺及结构分析[J]. 食品科学, 2017, 38(12):164-170
WANG L W, OUYANG Z, ZHANG B J, et al. Deproteinization process and structure analysis of polysaccharides from *Dendrobium candidum* Huoshan[J]. Food Science, 2017, 38(12):164-170
- [17] A L S, C Y S A B, C J L A B, et al. Decolorization affects the structural characteristics and antioxidant activity of polysaccharides from *Thesium chinense* Turcz; Comparison of activated carbon and hydrogen peroxide decolorization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155:1084-1091
- [18] WANG C, CHEN Z, PAN Y, et al. Anti-diabetic effects of *Inonotus obliquus* polysaccharides-chromium(Ⅲ) complex in type 2 diabetic mice and its sub-acute toxicity evaluation in normal mice[J]. Food & Chemical Toxicology, 2017, 108:498-509
- [19] LI L, XU J X, GUO W L, et al. Preparation of Ganoderma

- lucidum polysaccharid echromium (Ⅲ) complex and its hypoglycemic and hypolipidemic activities in high-fat and high-fructose diet-induced pre-diabetic mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140:782-793
- [20] GAN J P, HUANG Z Y, YU Q, et al. Microwave assisted extraction with three modifications on structural and functional properties of soluble dietary fibers from grapefruit peel[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101:105-149
- [21] ZHANG C, HUANG M, HONG R, et al. Preparation of a Momordica charantia L. polysaccharidechromium (Ⅲ) complex and its anti-hyperglycemic activity in mice with streptozotocin-induced diabetes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019 Feb 1;122:619-627
- [22] SHAN X, LIU X, HAN J, et al. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans[J]. International journal of biological macromolecules, 2015(1):249-255
- [23] DONG H Q, LI M, ZHU F, et al. Inhibitory potential of trilobatin from Lithocarpus polystachyus Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes[J]. Food Chemistry, 2012, 130(2):261-266
- [24] FENG M, MEI J, HU S, et al. Selective removal of iron from grape juice using an iron (Ⅲ) chelating resin[J]. Separation and Purification Technology, 1997, 11(2):127-135
- [25] LU Q, XU L, MENG Y, et al. Preparation and characterization of a novel Astragalus membranaceus polysaccharide-iron (Ⅲ) complex[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016:208-216
- [26] 尹红力,王振宇,梁薇薇,等. 响应面法优化黑木耳多糖与三价铬整合工艺[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(15):4830-4833
- YIN H L, WANG Z Y, LIANG W W, et al. Optimization of the chelation process of black fungus polysaccharide and trivalent chromium by response surface methodology[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(15):4830-4833
- [27] CHEN G T, MA X M, LIU S T, et al. Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from Grifola frondosa[J]. Carbohydr Polym, 2012, 89(1):61-66
- [28] SHIBAKAMI, MOTONARI, TSUBOUCHI, et al. Preparation of carboxylic acid-bearing polysaccharide nanofiber made from euglenoid β -1,3-glucans[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1):95-101
- [29] 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
- CAO L K, KANG L J, KOU F, et al. Structural analysis of dietary fiber of millet bran before and after modification and inhibition of α -glucosidase activity *in vitro*[J]. Food Science, 2018, 39(11):46-52
- [30] QIU J, ZHANG H, WANG Z, et al. Response surface methodology for the synthesis of an Auricularia auriculajudae polysaccharides-CDDP complex[J]. International journal of biological macromolecules, 2016, 93:333-343
- [31] 李军平,于淑娟. 糖类物质与金属离子络合物的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2005(1):59-61
- LI J P, YU S J. Research progress on complexes of carbohydrates and metal ions[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2005(1):59-61
- [32] 于丽娜,杨庆利,禹山林,等. 花生壳不溶性膳食纤维提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(2):74-78
- YU L N, YANG Q L, YU S L, et al. Study on the extraction technology of insoluble dietary fiber from peanut shell[J]. Food Science, 2010, 31(2):74-78
- [33] WANG C Z, ZHANG, et al. Chemical constituents and structural characterization of polysaccharides from four typical bamboo species leaves[J]. Molecules, 2015, 20(3):4162-4179
- [34] WANG C, CHEN Z, PAN Y, et al. Anti-diabetic effects of Inonotus obliquus polysaccharides-chromium (Ⅲ) complex in type 2 diabetic mice and its sub-acute toxicity evaluation in normal mice - Science Direct [J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 108:498-509
- [35] MITI A, NIKOLI G S, CAKI M, et al. FTIR spectroscopic characterization of Cu(Ⅱ) coordination compounds with exopolysaccharide pullulan and its derivatives[J]. Journal of Molecular Structure, 2009, 924:264-273
- [36] MITI A, CAKI M, NIKOLI G M, et al. Synthesis, physicochemical and spectroscopic characterization of copper (Ⅱ)-polysaccharide pullulan complexes by UV-vis, ATR-FTIR, and EPR[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(3):434-441
- [37] WLGA B, MIN C, WLP A, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic mechanism of organic chromium derived from chelation of Grifola frondosa polysaccharide-chromium (Ⅲ) and its modulation of intestinal microflora in high fat-diet and STZ-induced diabetic mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145:1208-1218
- [38] OBOH G, ADEMOSUN A O, AKINLEYE M. Starch composition, glycemic indices, phenolic constituents, and antioxidative and antidiabetic properties of some common tropical fruits[J]. Journal of Ethnic Foods, 2015, 2(2):64-73
- [39] SINEAD L, SMYTH T J, SOLER-VILA A, et al. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts[J]. Food Chemistry, 2013, 141(3):2170-2176

[40] YAN J K, DING Z C, GAO X, et al. Comparative study of physicochemical properties and bioactivity of *Hericium eri-*

naceus polysaccharides at different solvent extractions[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 193:373–382.

Preparation of SDF - Cr (Ⅲ) Chelates of Millet Bran and Analysis of Enzyme Activity Inhibition *in vitro*

Quan Zhigang¹ Wang Weihao^{1,2} Zhao Shuting¹ Liu Dezhi¹
Wang Yifei¹ Wu Yunjiao¹ Su Youtao¹ Cao Longkui^{1,2}

(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University¹, Daqing 163319)

(Heilongjiang Bayi Agricultural University,

National Coarse Cereals Engineering Research Center², Daqing 163319)

Abstract In order to produce new organic chromium (Cr^{3+}) supplements with lower toxicity and higher bioactivity and to increase the added value of millet bran, the chelation process was optimized by chelating millet bran SDF with chromium (Cr^{3+}), taking the chelation rate as an index, and using a combination of single factor and response surface. The inhibition of α -glucosidase and α -amylase by SDF *in vitro* was determined by comparing the structural changes before and after chelation using scanning electron microscopy and infrared spectroscopy. The results indicated that the best conditions for the preparation of SDF - Cr(Ⅲ) were CrCl_3 concentration of 7.2 mg/mL, mass ratio of 2.2:1, reaction pH 8.6, and reaction temperature of 73 °C, and the chelation rate reached 35.179%. The infrared spectroscopic analysis indicated that the —OH, C—O—C and —COOH of SDF were involved in the reaction. *in vitro* experiments indicated that SDF inhibited α -glucosidase and α -amylase activities before and after modification, and the SDF - Cr(Ⅲ) chelate was more pronounced than SDF.

Key words millet bran, chromium, chelate, structure characterization, inhibition