

南瓜醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

The inhibition effect on α -glucosidase from fermented supernatant of pumpkin laozao

效碧亮 杨转萍 罗丽媛 孙静

XIAO Bi-liang YANG Zhuan-ping LUO Li-yuan SNU Jing

(兰州理工大学技术工程学院, 甘肃 兰州 730050)

(College of Technology and Engineering, Lanzhou University of Technology, Gansu, Lanzhou 730050, China)

摘要:以糯米和南瓜为原料,安琪酒曲为发酵菌剂,采用半固态发酵法制作南瓜醪糟,比较分析南瓜醪糟与纯米醪糟对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,研究发酵液不同稀释倍数、发酵时间、南瓜加入量对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的影响,同时测定南瓜醪糟的部分理化指标。结果表明,南瓜醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制作用,原液抑制率可达 80% 以上,且抑制活性较纯米醪糟发酵液强;发酵液不同稀释倍数、发酵时间及南瓜加入量对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用均有极显著影响,发酵时间为 48 h 时,抑制效果最好,南瓜加入量以米:南瓜 2:1(g/g)为宜;南瓜醪糟中多糖为 2.87 mg/g,还原糖为 3.88%,V_c 为 0.024 mg/100 g,蛋白质为 0.071 2 mg/g,酒精为 2 mL/g,pH 为 3.75。

关键词:南瓜醪糟; α -葡萄糖苷酶;抑制;成分含量

Abstract: Pumpkin with glutinous rice as raw material, lao-zao was made by semi solid fermentation. The inhibition of pumpkin lao-zao and pure rice lao-zao was compared, and the inhibition effect of fermented supernatant of the different concentrations and different fermented time and different adding amount of pumpkin were studied. Then, some physical and chemical indexes were determined. The result showed that pumpkin Lao-zao had significant inhibition effect on α -glucosidase, the inhibition rate of primal was higher than 75 percent, and the active of inhibitor of pumpkin Lao-zao was higher than pure rice Lao-zao. The fermented supernatant of the different concentrations and different fermented time and different adding amount of pumpkin had extremely significant effect on the inhibition effect of α -glucosidase. Moreover, in the forty-eight hour, the inhibition effect was highest, the ratio of glutinous rice and pumpkin was appropriate as 2:1(g/g). In pumpkin Lao-zao, polysaccharide is 2.87 mg/g, re-

ducing sugar is 3.88%, V_c is 0.024 mg/100 g, protein is 0.071 2 mg/g, alcohol is 2 mL/g, pH is 3.75.

Keywords: the pumpkin Lao-zao; α -glucosidase; inhibition; composition content

α -葡萄糖苷酶抑制剂在防治糖尿病、肥胖症、抗肿瘤和抗病毒等方面具有重要的作用^[1],尤其在治疗糖尿病方面,是一类新型的抗糖尿病药物。葡萄糖苷酶抑制剂的种类较多,按照其来源可以分为三类:微生物的代谢产物中得到,天然产物中提取以及化学法合成。但市场上降糖药物总体价格昂贵,且副作用明显。

因此,食疗是最安全、最经济、最放心的方法。目前资料表明具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性物质的食材有大豆(皂苷^[2])、苦瓜^[3]、山药^[3]、苦荞(提取物)^[4]和醪糟发酵液^[5]等。相对大豆、苦瓜、山药和苦荞等的提取物而言,醪糟发酵液制作方便、经济实惠,且抑制效果较好,为 70% 左右。鲁战会等^[5]曾对纯米醪糟发酵液抑制 α -葡萄糖苷酶的作用进行过研究,但未见南瓜醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用的相关报道。为提高醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,本课题组大胆尝试改变醪糟发酵原料,将具有降糖作用的南瓜作为醪糟发酵原料之一,研究南瓜醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,提高其抑制率。南瓜作为主要原料制作醪糟不仅打破了传统醪糟制作原料的单一性,同时可向醪糟中引入更多生物活性物质,如南瓜多糖、钴、V_c、葫芦巴碱^[6]等,其中南瓜多糖、钴均具有降糖作用^[7]。鉴于此,本研究主要对南瓜醪糟降血糖特性做初步研究,比较南瓜醪糟与纯米醪糟对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及部分成分,旨在进一步证实醪糟发酵液可抑制 α -葡萄糖苷酶这一理论,为醪糟发酵液抑制 α -葡萄糖苷酶的相关理论研究向前迈步,同时为南瓜醪糟今后能成为辅助降血糖的功能性食品的开发与研究提供理论依据。

基金项目:甘肃省教育厅项目(编号:2015B-218)

作者简介:效碧亮(1984—),女,兰州理工大学技术工程学院讲师,硕士。E-mail: xiaobiliang840824@126.com

收稿日期:2016-08-08

1 材料与方方法

1.1 原料、试剂与设备

1.1.1 原材料

南瓜:黄金二号,市售;

糯米:市售;

酒曲:安琪酵母股份有限公司。

1.1.2 试剂

α -葡萄糖苷酶(100 U)和 p -NPG(对硝基苯酚 α -葡萄糖糖苷):美国 Sigma 公司;

牛血清蛋白:美国 Roche 公司;

Na_2CO_3 、磷酸二氢钠:分析纯,天津市鼎盛鑫化工有限公司;

磷酸盐缓冲液:准确称取 7.801 5 g 磷酸二氢钠,用蒸馏水溶解后定容至 1 000 mL,所得溶液浓度为 50 mmol/L;准确称取 8.955 g 磷酸氢二钠,用蒸馏水溶解后定容至 500 mL,所得溶液浓度为 50 mmol/L;取 565 mL 50 mmol/L 的磷酸二氢钠和 435 mL 50 mmol/L 的磷酸氢二钠充分混合,所得溶液为 pH 6.7 的磷酸盐缓冲液;

α -葡萄糖苷酶溶液:取 α -葡萄糖苷酶 100 U,牛血清蛋白 877.2 mg,溶于 50 mmol/L pH 6.7 磷酸盐缓冲液中,用缓冲液定容至 438 mL,所得酶浓度为 22.8 U/100 mL;

对硝基苯酚 α -葡萄糖糖苷溶液(p -NPG):取 p -NPG 0.150 7 g 溶于磷酸盐缓冲液中,用缓冲液定容至 500 mL,得 10 mmol/L p -NPG 溶液。

1.1.3 设备

pH 计:PHS-3C 型,上海精密科学仪器有限公司;

高速离心机:TGL16M 型,湖南凯达科学仪器有限公司;

紫外分光光度计:UV5100B 型,上海元析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 醪糟发酵液的制备

(1) 南瓜醪糟发酵液:称取糯米 20 g 于清水中浸泡 8 h,取出,加入切碎的南瓜 10 g 同糯米一起蒸 20 min(同时将浸泡糯米水煮沸晾凉后待用),之后转移到烧杯中迅速冷却至 30 ℃左右。称取酒曲 0.12 g 溶于 30 mL 煮沸晾凉的泡米水中,缓缓加入盛有糯米和南瓜的烧杯中搅拌均匀,盖好保鲜膜于 30 ℃水浴中发酵 48 h。取发酵液 20 mL,煮沸 15 min,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液置于 4 ℃冰箱中待用。

(2) 纯米醪糟发酵液:不加南瓜,其它发酵工艺相同。

1.2.2 酶活抑制试验 取 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.7)100 μL ,22.8 U/100 mL α -葡萄糖苷酶溶液 150 μL ,样品 40 μL ,37 ℃保温 5 min 后,加入 10 mmol/L p -NPG 750 μL ,于 37 ℃反应 10 min 后,最后加入 2 mL 0.1 mol/L Na_2CO_3 终止反应。测定 400 nm 处的吸光值。试验结果记录为 B。以不加样品作为空白组,结果记为 A。其中试验组的调零操作是将酶替换为灭活酶;而空白组是将酶和样品都以缓冲液替代。抑制率按式(1)计算:

$$W = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

W——抑制率,%;

A_0 ——不加样品空白组的吸光值;

A_1 ——加样品试验组的吸光值。

1.2.3 不同稀释倍数的醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果 为了研究不同稀释倍数发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果,以及比较南瓜醪糟与纯米醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果,对南瓜醪糟发酵与纯米醪糟发酵液均进行了 0,20,40,60,80,100 倍稀释,并测定各处理样对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果。

1.2.4 不同发酵时间的醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果 分别取发酵了 24,30,36,42,48,54 h 的南瓜醪糟发酵液,测定其对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果。

1.2.5 不同南瓜加入量的醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果 为了确定南瓜加入量是否对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果具有显著影响,设计了糯米:南瓜(g/g)梯度分别为:1:0,4:1,3:1,2:1,1:1,并分别测定了对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果。

1.2.6 成分测定

(1) 多糖的测定:采用苯酚—硫酸法^[8]。

(2) 还原糖的测定:采用 3,5-二硝基水杨酸法^[9]。

(3) 蛋白质的测定:采用考马斯亮蓝法^[9]。

(4) V_C的测定:采用 2,4-二硝基苯肼法^{[10]203-204}。

(5) 酒精含量的测定:密度瓶法^{[10]30-31}。

(6) 酸度的测定:采用 pH 计^{[10]211-212}。

每次测定重复 3 次。

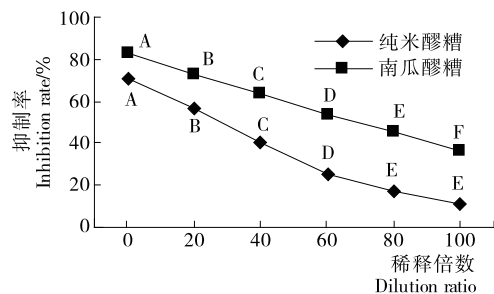
1.3 数据处理

采用 SPSS 软件处理。

2 结果与分析

2.1 不同稀释倍数的南瓜醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果

由图 1 可知,南瓜醪糟发酵液和纯米醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶活性均具有较好的抑制作用,南瓜醪糟发酵液抑制率达 80% 以上,纯米醪糟发酵液抑制率约为 70%,前者比后者抑制率高出了 10%。经方差分析表明稀释度对两种发酵液抑制率均具有极显著的影响,随着稀释度增加,两种醪糟发酵液对酶活抑制率均呈下降趋势,然而南瓜醪糟发酵液的



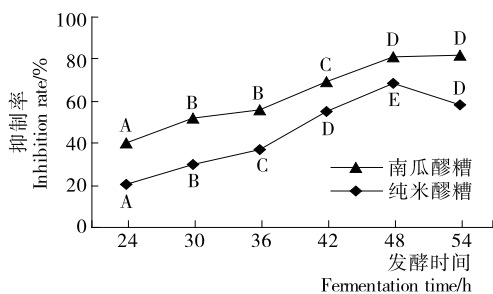
不同字母表示差异极显著, $P < 0.01$

图 1 不同稀释倍数醪糟发酵液对酶活的抑制作用
Figure 1 The inhibition effect of the different dilute concentration of Laozao on α -glucosidase

抑制效果显著大于纯米醪糟,且其抑制率约以 10% 的速率下降,而纯米醪糟约以 13% 的速率下降,南瓜醪糟发酵液中抑制剂活性成分受稀释倍数的影响较纯米醪糟小,进一步说明南瓜作为醪糟原料可显著提高其发酵液抑制 α -葡萄糖苷酶活性的效果。

2.2 不同发酵时间的醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果

由图 2 得知,在其他条件不变的情况下,随着发酵时间的延长,南瓜醪糟和纯米醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用均呈上升趋势,南瓜醪糟发酵液抑制率从 40.712% 增大到 81.396%,而纯米醪糟的从 20.523% 增大到 70.176%,进一步说明南瓜醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果更好,同时表明抑制 α -葡萄糖苷酶的活性成分在醪糟发酵过程中也会产生。为了确定南瓜醪糟发酵液最佳发酵时间,对结果进行了方差分析和多重比较,结果表明发酵时间对南瓜醪糟发酵液抑制 α -葡萄糖苷酶的活性有极显著影响,图 2 表明发酵 48 h 和 54 h 的抑制作用无显著差异,故抑制效果最好的发酵时间可选择 48 h,这一结果与南瓜醪糟发酵最佳发酵时间相吻合。



不同字母表示差异极显著, $P < 0.01$

图 2 不同发酵时间的南瓜醪糟发酵液对酶的抑制作用

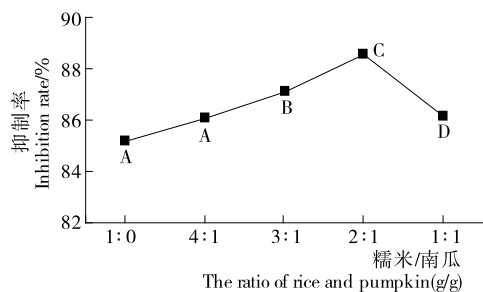
Figure 2 The inhibition effect of the different fermented time of pumpkin Laozao on α -glucosidase

2.3 不同南瓜量的醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果

经方差分析表明醪糟中南瓜加入量对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用具有极显著影响,再次证实了南瓜的加入量可增强醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。图 3 表明,随着南瓜加入量的增加,醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用呈先上升后下降趋势,当南瓜加入量为糯米:南瓜 2:1 (g/g) 时,发酵液抑制率达到最大。这一结果与南瓜醪糟发酵南瓜最佳加入量相吻合,由于醪糟的发酵主要靠糯米完成,若南瓜加入量太多,产品发酵品质较差,至于其抑制率会下降具体原因需后期进一步研究。

2.4 成分测定

由表 1 可知,醪糟中南瓜的加入丰富了其营养成分,例如南瓜多糖和维生素,其中南瓜醪糟多糖含量明显高于纯米醪糟,这主要是南瓜多糖的含量,由于南瓜多糖具有很好的降血糖作用,所以在对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用方面南瓜醪糟比纯米醪糟更稳定,抑制剂活性更高。从两者所含还原糖的量来看,南瓜醪糟为 3.88%,纯米醪糟为 8.67%,前者比后者低 4.79%,有利于高血糖患者使用。其中酒精和 pH 值两者无较大差异,说明南瓜的加入对二者影响较小。



不同字母表示差异极显著, $P < 0.01$

图 3 南瓜加入量对酶的抑制效果

Figure 3 The inhibition effect of adding amount of pumpkin on α -glucosidase

表 1 成分分析

Table 1 The component analysis

| 样品 | 多糖/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) | 还原糖/ % | V _c / ($10^{-2} \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) | 蛋白质/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) | 酒精/ ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$) | pH 值 |
|------|--|-------------|---|---|--|-------------|
| 南瓜醪糟 | 2.87 ± 0.06 | 3.88 ± 0.07 | 0.02 ± 0.00 | 0.07 ± 0.00 | 2.09 ± 0.00 | 3.81 ± 0.14 |
| 纯米醪糟 | 2.25 ± 0.01 | 8.67 ± 0.20 | — | 0.04 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 3.75 ± 0.14 |
| 南瓜 | 6.08 ± 0.08 | 1.24 ± 0.02 | 9.79 ± 0.04 | 0.14 ± 0.00 | — | — |

3 结论

研究结果表明南瓜醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶具有极强的抑制作用,抑制率达 80% 以上,且其抑制率较纯米醪糟发酵液高约 10%。南瓜醪糟部分成分的测定再次证实了南瓜作为醪糟的原料之一不仅可丰富醪糟的营养成分和颜色,降低原糖含量,还进一步增强了抑制 α -葡萄糖苷酶的稳定性和活性,此研究结果可为南瓜醪糟今后能成为辅助降血糖功能性食品的开发与研究提供理论支撑。然而,对南瓜醪糟中降糖活性物质定性、

定量以及理化性质和降糖的机理却需更深入研究,为南瓜醪糟发酵液抑制 α -葡萄糖苷酶的机理提供更有力的理论依据。

参考文献

- [1] BOW LIN T L, MCKOWN B J, KANG M S, et al. Potentiation of human lymphokine-activated killer cell activity by swainsonine, an inhibitor of glycoprotein processing[J]. Cancer Research, 1989, 49: 4 109-4 115.

(下转第 21 页)

持凝胶;经还原剂亚硫酸钠改性的蛋白在浓度为 10% 时能够形成半流动性固体,在 12% 时能形成很好的自持凝胶。由此可见,改性后的核桃浓缩蛋白更容易形成凝胶,其中,超声处理的核桃浓缩蛋白速凝性更为明显。超声处理和还原剂亚硫酸钠处理使蛋白质原来紧密有序的结构变成了松散的结构,疏水基团部分暴露,游离巯基含量增多,因此,一定浓度的蛋白溶液经过热诱导的过程,较易形成热稳定性凝胶。

2.4 改性方法对核桃浓缩蛋白凝胶质构特性的影响

蛋白质的凝胶特性主要表现在拥有高硬度、弹性和黏结力,这一性质在肉制品加工中极为重要^[15]。由表 2 可知,改性方法对核桃浓缩蛋白的凝胶硬度具有显著影响,并且经过改性的蛋白凝胶硬度要显著高于改性前的蛋白,尤以超声改性后的凝胶硬度最大,比原始蛋白增加了 149.85%,比还原剂改性的蛋白增加了 26.22%,而经还原剂改性的蛋白凝胶硬度比原始蛋白增加了 97.95%;经不同改性方法处理的蛋白凝胶的弹性并没有显著差异,但改性后的蛋白凝胶的弹性均显著高于原始蛋白,超声改性蛋白的凝胶弹性比原始蛋白增加了 66.67%,还原剂改性蛋白的凝胶弹性比原始蛋白增加了 78.95%;经不同改性方法处理的蛋白凝胶的黏结力没有显著差异,但改性后的蛋白凝胶的黏结力要显著高于原始蛋白,超声改性蛋白的凝胶黏结力比原始蛋白增加了 92.5%,还原剂改性蛋白的凝胶黏结力比原始蛋白增加了 80%。综合上述结果,能够说明超声改性对核桃浓缩蛋白凝胶性的改善作用更大。

表 2 改性方法对核桃浓缩蛋白凝胶质构性的影响[†]

Table 2 Effects of different modification methods on the texture characteristics of walnut protein concentrate

| 样品 | 硬度/N | 弹性 | 黏结力 |
|---------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| 原始蛋白 | 86.22±0.98 ^c | 0.57±0.02 ^b | 0.40±0.01 ^b |
| 超声改性蛋白 | 215.42±3.04 ^a | 0.95±0.03 ^a | 0.77±0.02 ^a |
| 还原剂改性蛋白 | 170.67±2.38 ^b | 1.02±0.03 ^a | 0.72±0.02 ^a |

† 同列不同字母表示在 P<0.05 时差异显著性。

3 结论

超声波处理和亚硫酸钠改性均可打破核桃浓缩蛋白的二硫键,提高游离巯基含量,从而提高核桃浓缩蛋白形成凝

胶的特性。改性后的蛋白凝胶硬度、弹性、黏结力等质构特征均显著优于改性前,超声改性对蛋白凝胶速凝性和硬度提高尤为显著。由于化学改性存在化学成分和副产物残留,因此,超声改性处理在提高核桃浓缩蛋白的凝胶性方面更具有应用前景。

参考文献

- [1] 张婷婷. 不同施肥处理对核桃生长、产量和坚果品质的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016: 1.
- [2] 施显赫, 王丰俊, 欧阳杰. 核桃油制取方法和质量评价研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(8): 395-399.
- [3] MAO Xiao-ying, HUA Yu-fei. Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 13(2): 1 561-1 581.
- [4] 沈敏江, 刘红芝, 刘丽, 等. 核桃蛋白质的组成、制备及其功能特性研究进展[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(1): 123-128.
- [5] 周杰, 陈韬. 大豆蛋白的功能特性及其在肉制品中的应用[J]. 肉类工业, 2009(11): 46-49.
- [6] 杜蕾蕾, 郭涛, 万辉, 等. 核桃蛋白的分离纯化及功能性质的研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(5): 21-24.
- [7] 吴海文. 花生浓缩蛋白的制备凝胶形成机理及其应用研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [8] 孟小波, 华欲飞, 孔祥珍. 加热改性醇法大豆浓缩蛋白凝胶性的研究[J]. 中国油脂, 2008, 33(10): 25-28.
- [9] 姚玉静, 杨晓泉, 唐传核, 等. 酰化对大豆分离蛋白凝胶性质的影响[J]. 食品与机械, 2008, 24(5): 9-11.
- [10] 王丽, 王强, 刘红芝, 等. 花生品质对其蛋白质凝胶性的影响[J]. 农业工程学报, 2012, 28(17): 260-267.
- [11] BEVERIDGE T, TOMA S J, NAKAI S D. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent[J]. Journal of Food Science, 1974, 39(1): 49-51.
- [12] 邵俊花, 吴菊清, 周光宏, 等. 巯基和疏水性对蛋白质乳化和凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 155-159.
- [13] 林静韵, 李琳, 李坚斌, 等. 马铃薯淀粉糊在超声场中凝胶质构特性的变化研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 120-123.
- [14] 张华江, 迟玉杰. 两种改性技术提高大豆分离蛋白凝胶性能的研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(4): 56-59.
- [15] 郝红涛, 赵改名, 柳艳霞, 等. 肉类制品的质构特性及其研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 125-128.

(上接第 11 页)

- [2] 全吉淑, 尹学哲, 金明, 等. 大豆皂苷对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 中药材, 2003, 26(9): 654-656.
- [3] 吴玥霖, 魏然, 曾里, 等. 四种天然产物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 食品工业科技, 2010(9): 130-131.
- [4] 王斯慧, 白银花, 黄琬凌, 等. 苦芥黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用研究[J]. 食品科技, 2012(2): 24-26.
- [5] 鲁战会, 杨宁国, 李里特, 等. 醪糟发酵液对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 112-115.

- [6] 张英春, 杨鑫, 张华, 等. 高效液相色谱法测定南瓜粉中葫芦巴碱的含量[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 280-282.
- [7] 富新华, 王润珍, 费琳琪, 等. 南瓜降糖功能及其系列食品加工技术[J]. 农产品加工, 2006(1): 75-77.
- [8] 王明艳, 张小杰. 响应面法优化香椿叶多糖的提取条件[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 106-110.
- [9] 李宏高, 魏利军. 南瓜中多糖测定方法的探讨[J]. 陕西科技大学学报, 2010, 28(6): 59-61.
- [10] 王永华, 张水华. 食品分析[M]. 2 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2011.