

# 醪糟发酵液对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的研究

鲁战会<sup>1</sup>, 杨宁国<sup>1</sup>, 李里特<sup>1</sup>, 李永玉<sup>1</sup>, 许中敏<sup>2</sup>, 陈金显<sup>3</sup>, 朱韶娟<sup>3</sup>

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 北京维他科技有限公司, 北京 100083;

3. 广州普正生物科技有限公司, 广东 广州 515500)

**摘要:** 通过一系列功能性实验, 对醪糟发酵液的抗老年性痴呆、抗氧化、降血压、降血糖等作用进行了初步研究, 发现醪糟发酵液抑制血管紧张素转换酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的作用确切而且明显, 具有潜在的降血压和降血糖作用。然后, 主要研究了不同产地、不同发酵时间的醪糟发酵液以及它们在不同的稀释度下对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用, 并排除了乙醇的抑制作用。发酵液经灭活、离心处理, 用 p-NPG( $\alpha$ -葡萄糖苷对硝基苯酚)法测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性。结果表明, 在原浓度下, 不同产地的醪糟发酵液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果基本相同; 在醪糟发酵的过程中, 发酵液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果保持稳定, 均在 60% 以上, 且在发酵的第 60~66h 内抑制效果最好。此外, 不同稀释度下的醪糟发酵液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果不同, 随着其浓度的增大, 醪糟发酵液的抑制效果明显增强。这说明醪糟发酵液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶具有稳定的抑制作用(由于篇幅有限, 降血压作用另作介绍)。

**关键词:** 醪糟发酵液;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶; 抑制作用; 降血糖

## Study on Inhibition Effect of Fermented Supernatant of Laozao on $\alpha$ -glucosidase

LU Zhan-hui<sup>1</sup>, YANG Ning-guo<sup>1</sup>, LI Li-te<sup>1</sup>, LI Yong-yu<sup>1</sup>, XU Zhong-min<sup>2</sup>,  
CHEN Jin-xian<sup>3</sup>, ZHU Shao-juan<sup>3</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Beijing Weita Science and Technology Co. Ltd., Beijing 100083, China;

3. Guangzhou Procept Biotech Co. Ltd., Guangzhou 515500, China)

**Abstract:** By a series of functionality experiments, the functionality of the fermented supernatant of Laozao (rice distillers' grain) was studied in this paper, such as to reduce the risks of the Alzheimer disease (AD), antioxidation, hypotension, hypoglycemic. The inhibition effects of  $\alpha$ -glucosidase and acetylcholinesterase (AChE) were validated. Then, the inhibition effects of the fermented supernatant of different producing areas and different fermented time and different diluted concentrations were studied on  $\alpha$ -glucosidase, while the inhibition effect of ethanol was excluded. The fermented supernatant was boiled and centrifuged and the activity of  $\alpha$ -glucosidase was assayed by p-NPG(p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside). It showed that in primal concentration, the fermented supernatant of the different producing areas had steady inhibition effect on  $\alpha$ -glucosidase during the course of fermentation of Laozao, it also had steady inhibition effect on  $\alpha$ -glucosidase and the inhibition rate was higher than 60 percent. Moreover, in the sixtieth to sixty-sixth hour, the inhibition effect is highest. In addition, the different concentrations of fermented supernatant of Laozao had different inhibition effect. When the concentration increased, the inhibition effect increased significantly. This finding suggests that the fermented supernatant of Laozao has steady inhibition effect on  $\alpha$ -glucosidase.

**Key words:** the fermented supernatant of Laozao(rice distillers' grain);  $\alpha$ -glucosidase; inhibition; hypoglycemic

中图分类号: TS262.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0112-04

收稿日期: 2005-08-12

基金项目: 中日国际合作项目

作者简介: 鲁战会(1968-), 男, 副教授, 博士, 主要从事食品加工理论与应用方面的研究。



醪糟是我国传统的大米发酵制品,具有口味鲜美、酒性醇和、营养丰富等特点,以其诸多优点而流传至今。民间传说其有许多独特的功能特性,比如活血、补血、养胃、催生产妇乳汁之功效,但到目前为止还没有科学的研究来支持,理论研究也处于空白状态。为了挖掘和发扬这一传统食品的瑰宝,本研究对其功能特性进行了系统的研究。通过功能性实验分别对其抗老年痴呆、抗氧化、降血压、降血糖等作用进行了初步研究,结果发现,醪糟的降血糖作用明显,随即对其进行了深入研究。因此,本文主要研究了醪糟发酵液对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用,以期为进一步证实醪糟发酵液降血糖的功能特性找到理论依据。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20;  $\alpha$ -glucosidase)是一种存在于小肠绒毛粘膜细胞刷状缘的酶类,通过水解 $\alpha$ -1,4糖苷键,可以从淀粉和其它相关多糖的非还原端水解葡萄糖<sup>[1]</sup>。资料表明, $\alpha$ -葡萄糖苷酶的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<sup>[2]</sup>。因此,研究醪糟发酵液对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用具有重要的临床意义<sup>[3]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase),乙酰胆碱碘化物(Acetylthiocholine iodide),5:5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) Sigma公司;

亚油酸 日本 Woke 公司;硫酸氰铵、硫酸亚铁、无水乙醇 均为国产分析纯;

马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL),血管紧张素转换酶(ACE),OPA (O-phthaldialdehyde)色谱纯 Sigma公司;

$\alpha$ -葡萄糖苷酶, p-NPG (4-硝基酚- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷) Sigma公司;牛血清白蛋白组份V 北京普博生物科技有限公司;得月楼上海醪糟 银川市一品园工贸有限公司北京食品厂;糯米酒 北京玫瑰园稠酒厂;江米酒 市售;糯米(品种为太湖1号) 中国水稻研究所;甜酒曲 安琪酵母股份有限公司;其余试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制实验

乙酰胆碱酯酶抑制实验是利用96孔微板读数器,采用Ellman的光度检测方法<sup>[4]</sup>改进后进行。

#### 1.2.2 抗氧化实验

过氧化值(POV)的测定用FTC法,FTC法参照Osawa<sup>[5]</sup>和Kikuzaki<sup>[6]</sup>。并根据Ottlenghi<sup>[7]</sup>加以改进,反应过程中,加入硫酸亚铁催化加快反应

速度。

#### 1.2.3 血管紧张素转换酶(ACE)抑制活性的测定

参照日本农林水产省等制定的食品机能评价手册中的降血压功能评价法<sup>[8]</sup>改进后进行。

#### 1.2.4 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制实验

##### 1.2.4.1 试剂及醪糟发酵液的制备

$\alpha$ -葡萄糖苷酶液的制备:取 $\alpha$ -葡萄糖苷酶4mg,牛血清蛋白(BSA)200mg,溶于50mmol/L pH6.7磷酸盐缓冲液中,用缓冲液定容至100ml,所得酶浓度为22.8U/100ml。

$\alpha$ -葡萄糖苷对硝基苯酚溶液(p-NPG)的制备:取p-NPG 30.13mg溶于磷酸盐缓冲液中,用缓冲液定容至100ml,得10mmol/L p-NPG溶液。

醪糟发酵液的制备:取不同醪糟发酵液各20ml,煮沸15min,4000r/min离心10min,然后取上清液稀释成0、10、100倍的系列溶液。置于4℃冰箱中待用。

##### 1.2.4.2 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活力及醪糟发酵液抑制率的测定<sup>[9,10]</sup>

取 $\alpha$ -葡萄糖苷酶液210 $\mu$ l,加入样品液40 $\mu$ l,在37℃下保温5min,然后加入750 $\mu$ l p-NPG溶液反应15min,再加入2ml 0.1mol/L的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>终止反应,在400nm处测定吸光度。以先加Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>后加p-NPG为空白,用缓冲液代替酶液所测吸光度值记为A<sub>P</sub>,加醪糟发酵液所测得的吸光度值记为A<sub>V</sub>。

抑制率=(1-A<sub>P</sub>/A<sub>V</sub>)×100%。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶活力单位定义<sup>[11]</sup>:pH6.7,37℃时,每分钟释放1 $\mu$ mol PNP为一个活力单位。抑制剂活力单位定义:pH6.7,37℃时,相同时间内使一个酶活力单位失活为一个抑制剂活力单位。

#### 1.2.5 不同发酵时间的醪糟发酵液对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果

分别取发酵了36、42、48、54、60、66、72、78h的醪糟发酵液,测定其对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果。

#### 1.2.6 醪糟中酒精作用的排除

因醪糟中的乙醇含量均低于3%(V/V),因此,配制1%、2%、3%的乙醇系列溶液并将它们分别稀释成0、10、100倍的溶液,测定其对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 醪糟发酵液对乙酰胆碱酯酶的抑制实验(图1)

结果显示,醪糟发酵液对乙酰胆碱酯酶有抑制作用。当醪糟发酵液稀释100倍时抑制率为7.94%,稀释10倍时抑制率为8.07%,表明稀释10倍和100倍时对乙



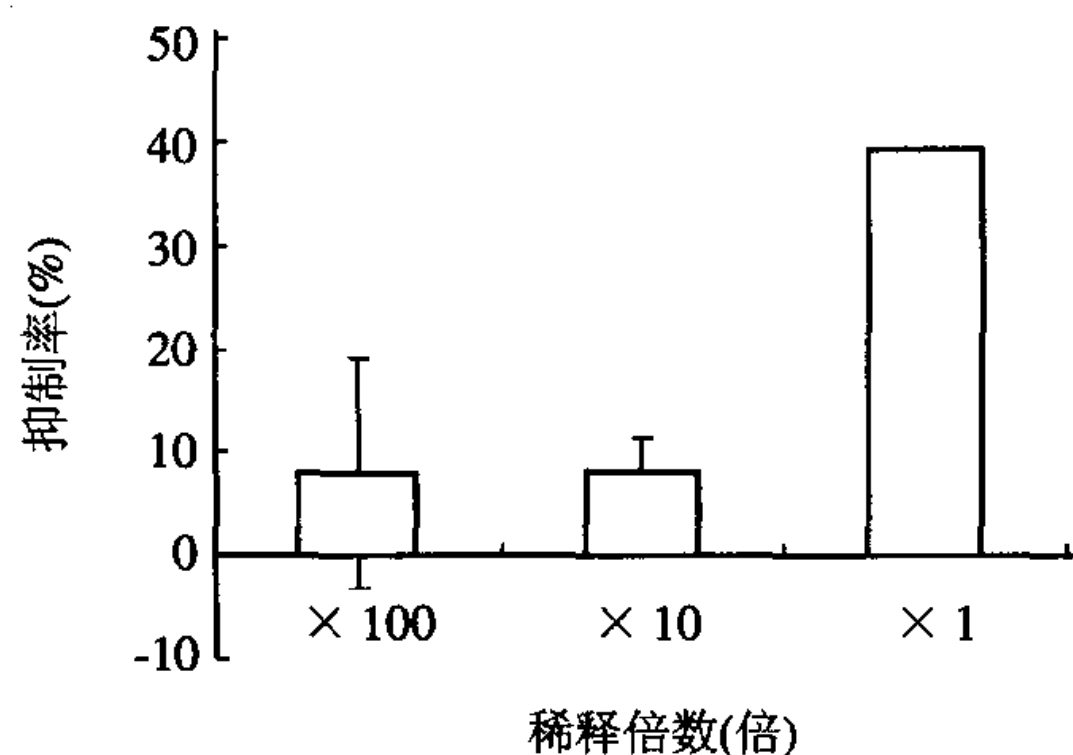


图1 醪糟发酵液对乙酰胆碱脂酶的抑制效果

Fig.1 Inhibition effect of the fermented liquid of Laozao on AChE

酰胆碱脂酶的抑制效果基本相同。当浓度增大到原液时,抑制率为39.32%,说明稀释对醪糟发酵液抑制乙酰胆碱脂酶的能力影响较大。

## 2.2 醪糟发酵液的抗氧化实验(图2)

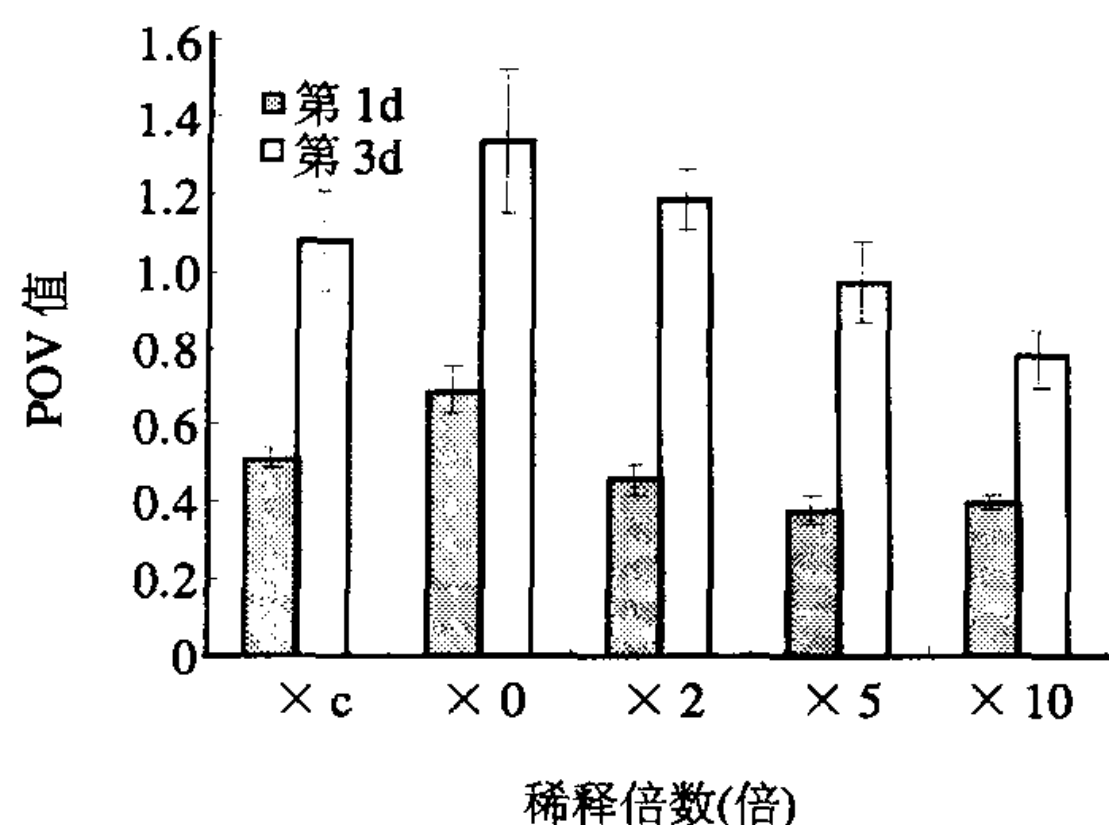


图2 醪糟发酵液抗氧化实验

Fig.2 Antioxidation of the fermented liquid of Laozao

结果显示,醪糟发酵液对油脂没有抗氧化性。由图2可以看出,对照组与加入原浓度的醪糟发酵液时的油脂过氧化值(POV)相比,加入醪糟发酵液的POV大于对照组,说明醪糟发酵液对油脂没有抗氧化性;而随着发酵液稀释倍数的增大,油脂的过氧化值逐渐降低,说明此时油脂的过氧化值的降低是由醪糟发酵液的浓度降低使其吸光度减小所引起的,而非醪糟发酵液对油脂表现了抗氧化性。

## 2.3 醪糟发酵液对血管紧张素转换酶的抑制实验(图3)

结果显示,醪糟对血管紧张素转换酶有极强的抑制活性。只需加入20μl未稀释的发酵液即可产生95%以上的抑制活性。取不同稀释倍数的醪糟发酵液,研究其在不同浓度下对血管紧张素转换酶活性的影响(见图3)。结果发现,当稀释100倍时,醪糟发酵液的抑制率为4.870%,当发酵液的浓度增大到10倍时,抑制率比稀释100倍时增加了15倍以上。随着发酵液浓度的增大,对酶的抑制效果呈明显的增加趋势。因此,可以确认醪糟发酵液对血管紧张素转换酶有良好的亲和性和

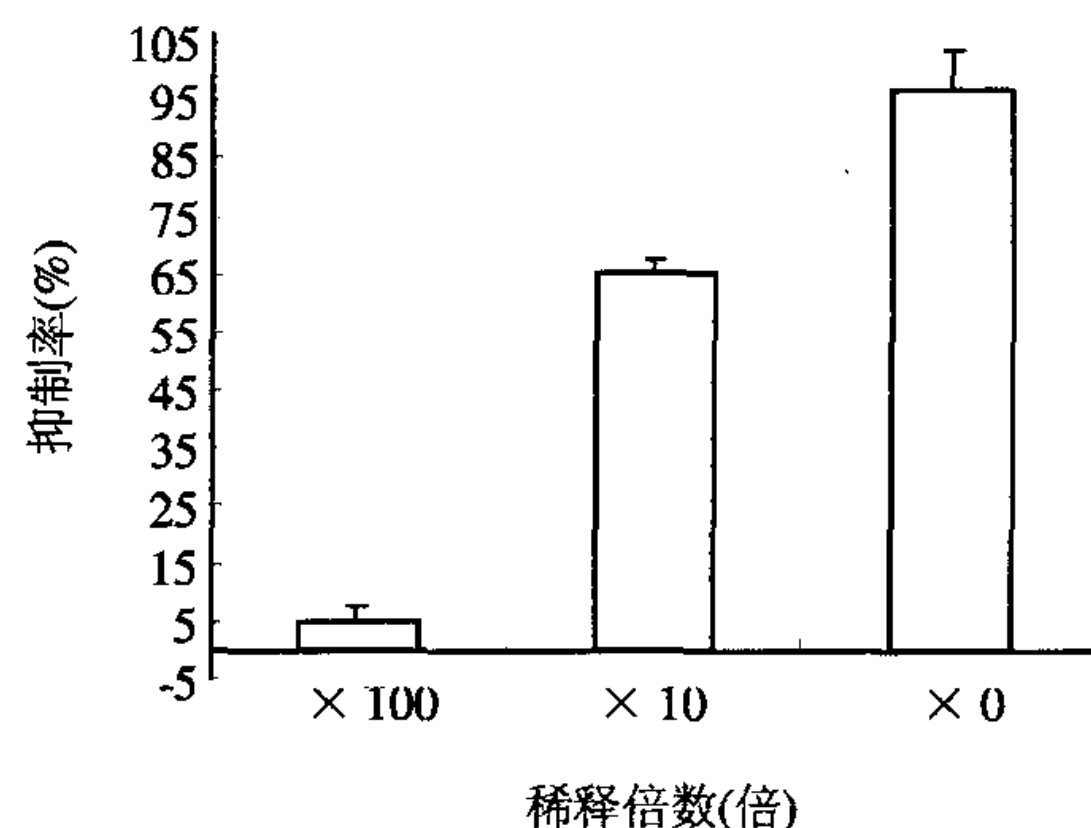


图3 醪糟发酵液对血管紧张素转换酶的抑制效果

Fig.3 Inhibition effect of the fermented liquid of Laozao on ACE

很强的抑制作用。

## 2.4 不同稀释度下的醪糟发酵液对α-葡萄糖苷酶活性的影响

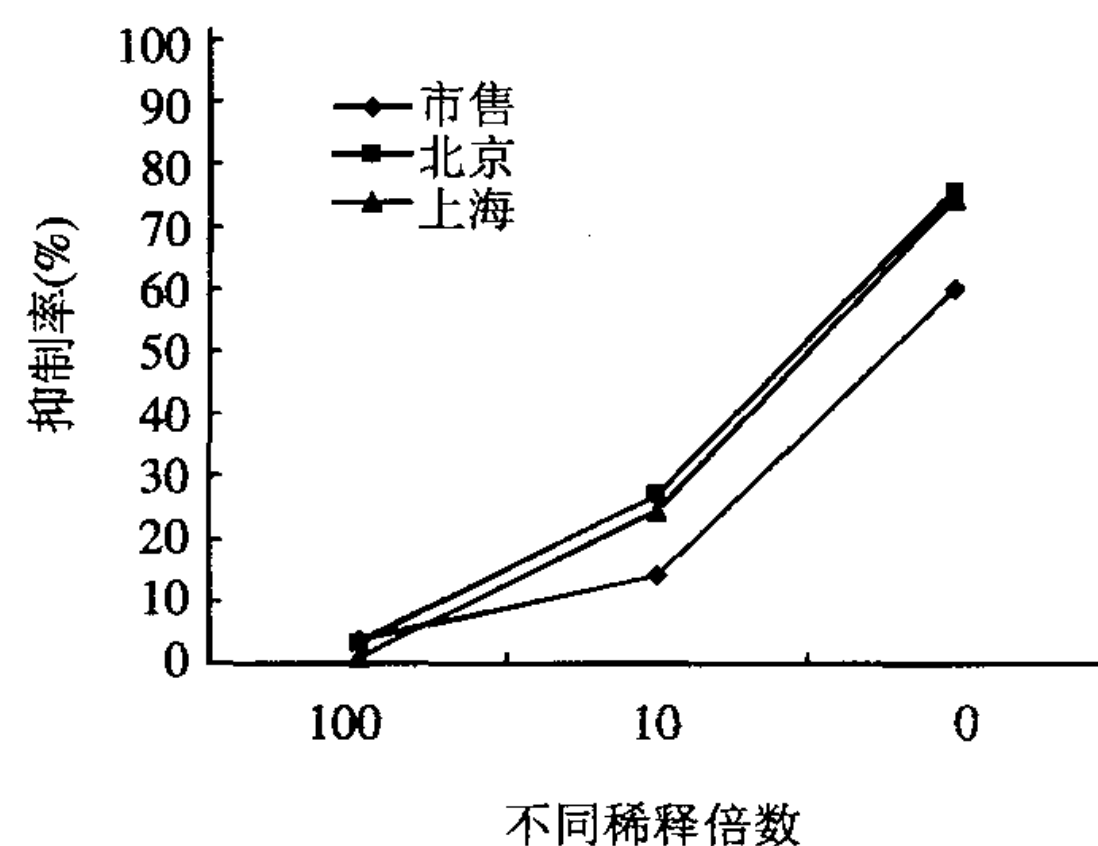


图4 不同稀释倍数的发酵液对酶的抑制作用

Fig.4 Inhibition of the different dilute concentration of Laozao on α-glucosidase

取上述各种醪糟发酵液,研究其在不同浓度下对酶活性的影响(见图5)。结果发现,当稀释100倍时,市售醪糟发酵液的抑制率为3.61%,高于北京样的3.21%和上海样的1.03%。当发酵液的浓度增大到原液时,各个样的抑制率比稀释100倍时增加了20倍以上。随着发酵液浓度的增大,对酶的抑制效果呈明显的增加趋势,而且,被测样品抑制酶活性的变化趋势基本相同。因此,可以确认醪糟发酵液对α-葡萄糖苷酶有明显的抑制作用。

## 2.5 不同产地醪糟发酵液对α-葡萄糖苷酶的抑制作用(见图5)。

结果显示,各种醪糟发酵液对α-葡萄糖苷酶具有极强的抑制活性。只需加入40μl未稀释的发酵液即可产生60%以上的抑制活性。三个样品的未稀释的发酵液的抑制效果都在60%以上,表明醪糟发酵液对α-葡萄糖苷酶有良好的亲和性和很强的抑制作用。

## 2.6 不同发酵时间的醪糟发酵液对α-葡萄糖苷酶的抑制效果



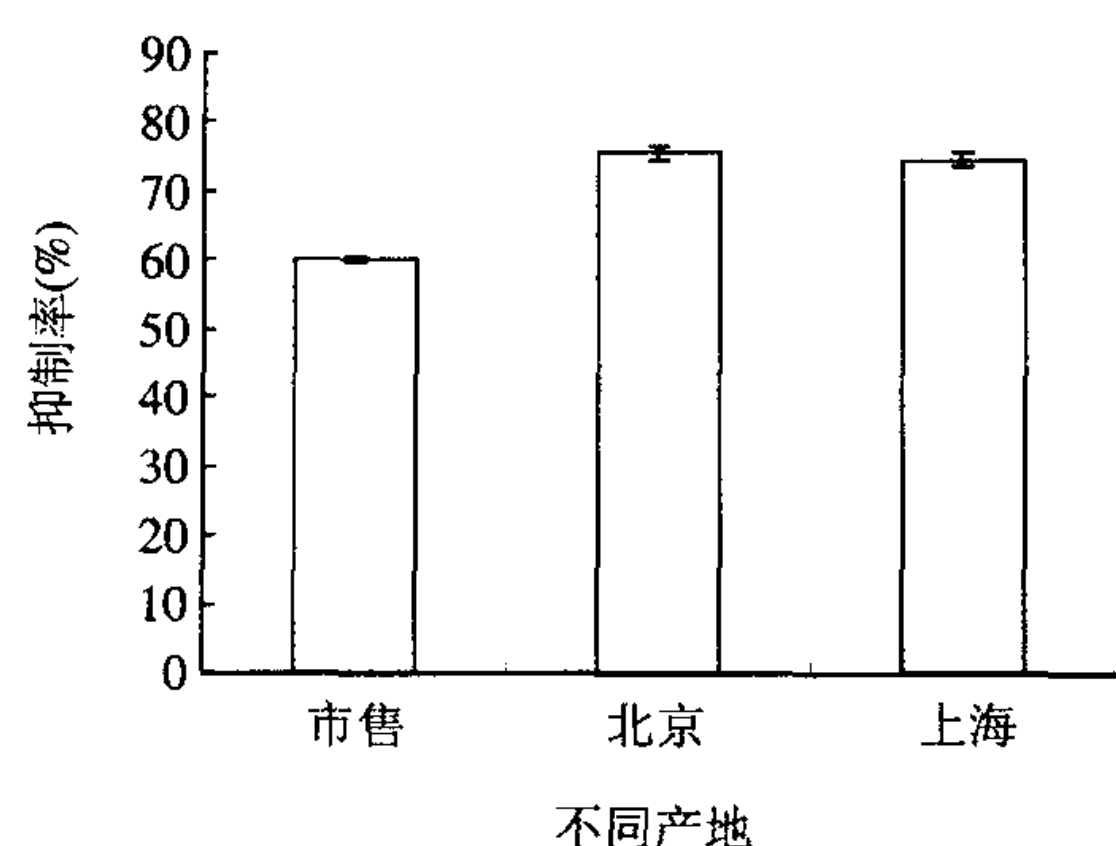


图5 不同产地的醪糟发酵液对酶的抑制作用

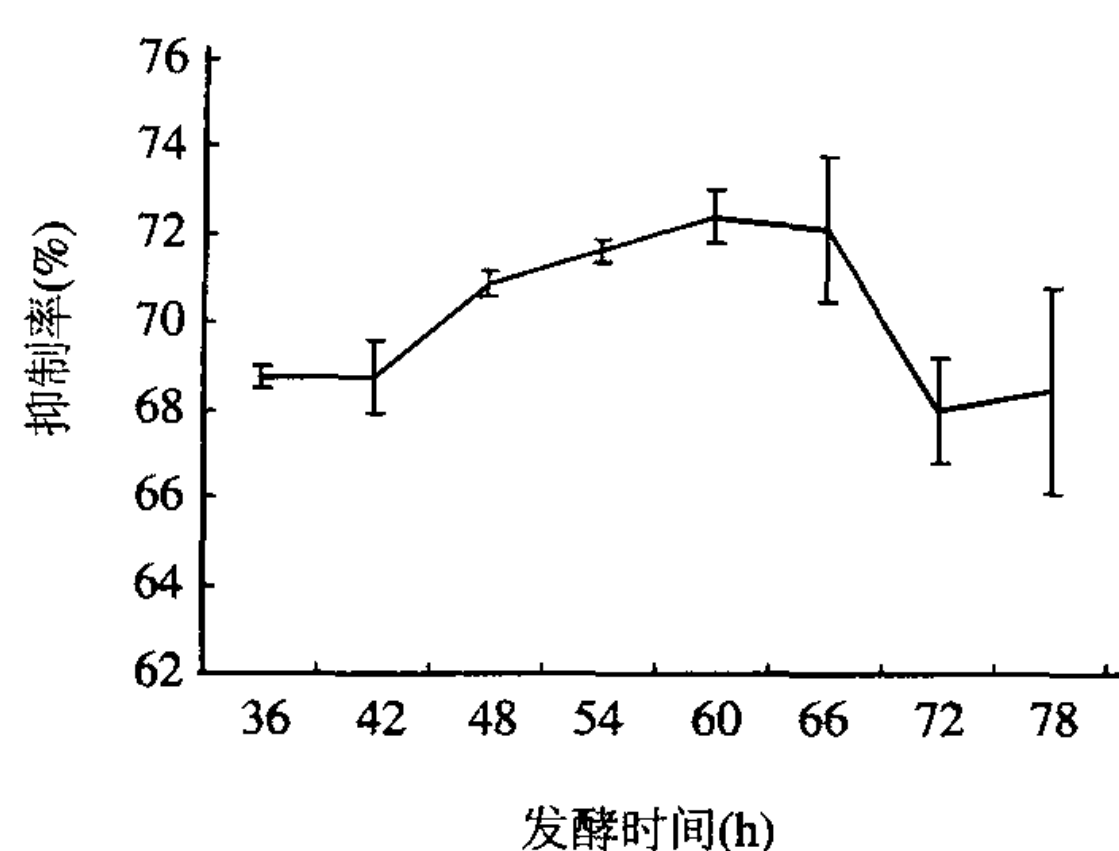
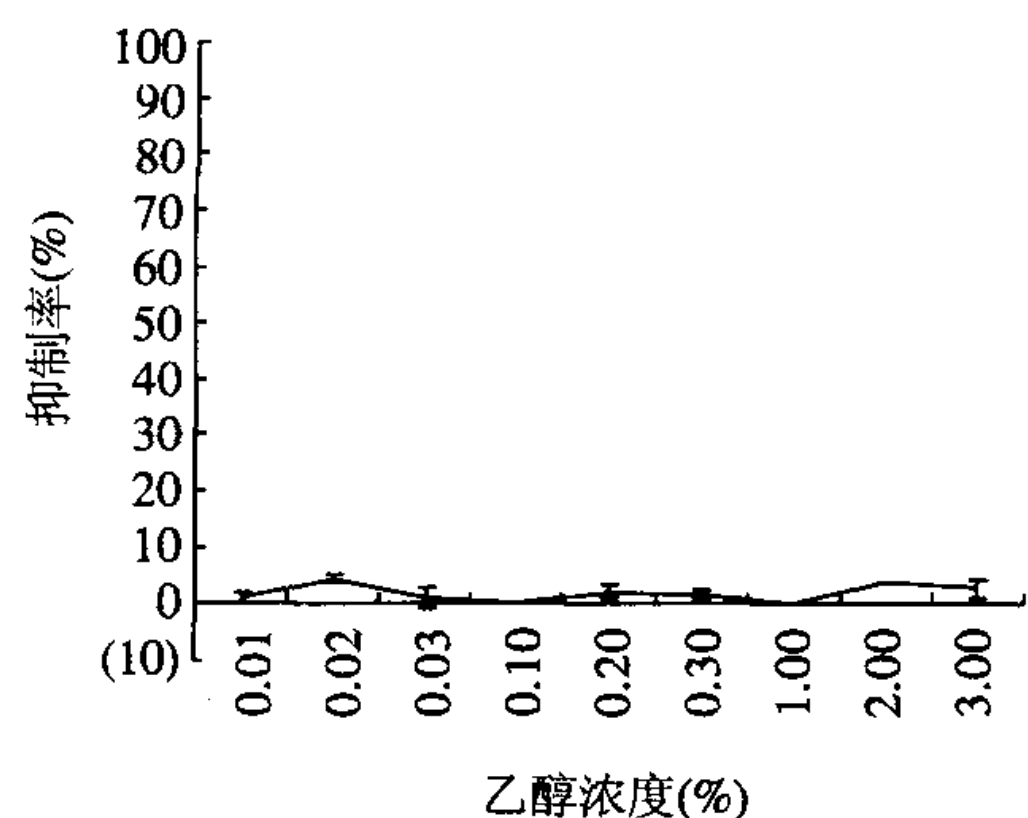
Fig.5 Inhibition of the different producing area of the fermented liquid of Laozao on  $\alpha$ -glucosidase

图6 不同发酵时间的醪糟发酵液对酶抑制作用的变化

Fig.6 Inhibition effect of the different fermented time of the Laozao on  $\alpha$ -glucosidase

由图6可知,在醪糟发酵过程中,醪糟发酵液对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果保持在65%以上,在发酵时间为60~66h时,抑制效果最好,第66h以后,抑制效果逐渐降低,但在发酵的整个过程中,对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制效果稳定。说明醪糟发酵液中抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的物质性质稳定。

## 2.7 醪糟发酵液中酒精作用的排除

图7 乙醇对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果Fig.7 The inhibition effect of the ethanol on  $\alpha$ -glucosidase

取上述各种不同浓度的乙醇稀释液,研究其在不同浓度下对酶活性的影响(见图7)。结果发现,3%以下的

乙醇溶液基本对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶没有抑制效果。由图7可以看到,乙醇的浓度是0.02%时其抑制率最大,在同一系列稀释浓度下,乙醇对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果不呈趋势变化,而且,被测样品抑制酶活性的趋势基本相同。因此,可以确认醪糟发酵液中的乙醇对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基本没有抑制作用。

## 3 讨论

醪糟发酵液中含有能降低血糖水平的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,可为广大的糖尿病患者带来食疗的希望。用食疗的方法控制餐后血糖升高所引起的胰岛素敏感性降低,从而加重病情并导致严重并发症等一系列症状,也可以在一定程度上避免目前市场上降血糖药物价格昂贵,副作用明显,如腹胀、腹部不适、腹泻、出虚恭、大便增加等症状的缺点<sup>[12,13]</sup>。

本文研究的醪糟发酵液,在不同的稀释度下对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性都有不同程度的抑制作用,而且随着浓度的增大其抑制活性也逐渐增加。这可能是醪糟发酵液具有与拜糖平类似的作用特性和药效机理的原因,至于其确切的原因,本研究室正进一步对其性质、显效成分以及对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制机理进行研究,以期找到更好的证据并用于生产,发挥其治疗疾病的作用。

## 参考文献:

- [1] Asano N, Nishida M, Kizu H, et al. Homonojirimycin isomers and glycosides from aglaonematreubii[J]. J Nat Prod, 1997, 60: 98-102.
- [2] Bow lin TL, Mckown BJ, Kang MS, et al. Potentiation of human lymphokine-activated killer cell activity by swainsonine, an inhibitor of glycoprotein processing[J]. Cancer Research, 1989, 49: 4109-4115.
- [3] 候为开, 张宝珠, 徐进, 等. 拜糖平治疗 NIDDM 的双盲对照研究[J]. 中国糖尿病杂志, 1996, 4(1): 56-59.
- [4] Ellman G L, Courteney K D, Valentino A J, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochem Pharmacol, 1961, (7): 88-95.
- [5] Osawa T, Namiki M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves[J]. Agric Biol Chem, 1981, 45(3): 735-739.
- [6] Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents [J]. Journal of Food Science, 1993, 58(6): 1407-1410.
- [7] Ottolenghi A. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 79: 355-363.
- [8] 日本农林水产省, 农林水产技术会议事務局, 食品综合研究所. 食品机能评价手册[M]. 东京: 1999. 117-121.
- [9] Lee D S, Lee S H. Genistein, a soy isoflavone is a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor[J]. FEBS Letters, 2001, 501:84-86.
- [10] Jun Watanabe, Jun Kawabata, Hideyuki Kurihara, et al. Isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from tochu-cha (Eucommia ulmoides)[J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(1): 177-178.
- [11] 李英, 张兰, 杨万山, 等.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选和初步研究[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2000, 6(2): 129-131.
- [12] 丰田隆谦.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制药[J]. 日本医学介绍, 1997, 18(8): 362-363.
- [13] 张玲芝, 冯磊. 灵芝多糖降血糖的机理探讨[J]. 福建医药杂志, 2004, 26(3): 137-140.