

富铬(III)豌豆制备及其含铬蛋白组分 生物活性研究

袁勇敢^{1,2,3}, 李倩^{1,2,3}, 宋莲军^{1,2,3*}, 黄现青^{1,2,3}, 乔明武^{1,2,3},
马燕^{1,2,3}, 程永霞^{1,2,3}, 李天歌^{1,2,3}

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002; 2. 河南省食品加工与流通安全控制
工程技术研究中心, 郑州 450002; 3. 郑州市大豆深加工重点实验室, 郑州 450002)

摘要: **目的** 制备富铬(III)豌豆(*Pisum sativum* L.), 并探究富铬豌豆蛋白的体外生物活性, 为新型有机铬产品开发提供参考。**方法** 以豌豆为实验材料, 通过电感耦合等离子体质谱法测定不同形态铬的含量, 以有机铬含量为指标评价各因素水平对铬(III)的生物富集效应影响; 对比不同萌发生长周期的富铬豌豆铬含量及蛋白质含量。并通过体外降糖、降脂及抗氧化实验评价富铬豌豆蛋白的生物活性。**结果** 豌豆种子浸泡的最佳条件为: 铬离子浓度为 1.32 mmol/L 的三氯化铬溶液在 20℃浸泡 12 h, 该条件下, 富铬豌豆铬含量约为未富铬豌豆铬含量的 930 倍, 富铬豌豆中有机铬的含量为(170.65±2.61) μg/g, 有机化程度达 87%; 萌发过程中富铬豌豆的铬含量呈下降趋势, 但其蛋白质铬含量在萌发第 4 d 最高, 为(82.15±0.45) μg/g, 随后下降。生物活性研究表明富铬豌豆蛋白具有良好的体外降糖、降脂及抗氧化活性。**结论** 利用豌豆通过生物富集方法将无机铬转化为有机铬是切实可行的, 富铬豌豆蛋白具有优于普通豌豆蛋白的体外降糖、降脂及抗氧化活性。

关键词: 豌豆; 生物富集; 铬; 降糖活性; 降脂活性; 抗氧化活性

Study on preparation of chromium(III)-enriched *Pisum sativum* L. and the bioactivity of its chromium-containing protein components

YUAN Yong-Gan^{1,2,3}, LI Qian^{1,2,3}, SONG Lian-Jun^{1,2,3*}, HUANG Xian-Qing^{1,2,3},
QIAO Ming-Wu^{1,2,3}, MA Yan^{1,2,3}, CHENG Yong-Xia^{1,2,3}, LI Tian-Ge^{1,2,3}

(1. School of Food science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Henan Province Engineering Research Center for Food Safety Control of Processing and Circulation,
Zhengzhou 450002, China; 3. Zhengzhou Key Laboratory of Soybean Processing, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT: Objective To prepare chromium(III)-enriched pea (*Pisum sativum* L.), and explore the bioactivity of chromium(III)-enriched pea protein *in vitro*, which provides references for the development of new organic chromium products. **Methods** Using pea as test material, the content of different forms of chromium were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry, and the effects of various factors on the bioenrichment effect of

基金项目: 2022 年河南省研究生联合培养基地项目(YJS2022JD16)、河南省高校科技创新团队支持计划资助项目(23IRTSTHN023)、河南省科技攻关计划项目(212102310390)

Fund: Supported by the 2022 Henan Graduate Joint Training Base Project (YJS2022JD16), the Henan University Science and Technology Innovation Team Support Program (23IRTSTHN023), and the Key Research and Development Programme of Henan Province (212102310390)

*通信作者: 宋莲军, 博士, 教授, 主要研究方向为食品营养与安全。E-mail: slj69@126.com

*Corresponding author: SONG Lian-Jun, Ph.D, Professor, School of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China. E-mail: slj69@126.com

chromium (III) were evaluated using organic chromium content as the index. The chromium content and protein chromium content of chromium(III)-enriched pea during different growth periods were compared. The bioactivity of chromium(III)-enriched pea protein was evaluated by *in vitro* hypoglycemic, lipid-lowering and antioxidant experiments. **Results** The best conditions for soaking pea seeds were as follows: Soaking in the chromium trichloride solution with chromium ion concentration of 1.32 mmol/L at 20°C for 12 h. Under this condition, the chromium content of chromium(III)-enriched pea was about 930 times that of non-chromium(III)-enriched pea, the content of organic chromium in chromium(III)-enriched pea was (170.65 ± 2.61) $\mu\text{g/g}$, and the organic degree of organic chromium was 87%. The chromium content of chromium(III)-enriched peas decreased during germination, but the protein chromium content reached the highest (82.15 ± 0.45) $\mu\text{g/g}$ on the 4th day of germination, then decreased. Bioactivity studies showed that chromium(III)-enriched pea protein had good hypoglycemic, lipid-lowering and antioxidant activities *in vitro*. **Conclusion** It is feasible to convert inorganic chromium to organic chromium by bioenrichment method in pea, and chromium(III)-enriched pea protein has better hypoglycemic, lipid-lowering and antioxidant activities *in vitro* than common pea protein.

KEY WORDS: *Pisum sativum* L.; bioenrichment; chromium; hypoglycemia activity; lipid lowering activity; antioxidant activity

0 引言

铬(III)是人体必需的微量元素,广泛存在于动植物体内^[1-2],是构成葡萄糖耐量因子(glucose tolerance factor, GTF)的主要活性成分^[3],与胰岛素的合成、分泌及其在体内的含量有着密切的联系^[4]。铬(III)通过影响胰岛素的生理功能对生物体内的糖脂代谢等一系列生理活动进行调节^[5],对胰岛素发挥正常功能具有重要作用。人体的应激状态(如剧烈运动,身体创伤)和衰老等会引起人体铬含量的减少,但人体自身是无法合成铬(III)的,只能通过食物或者药物来获取,而天然食物中的铬含量较少,且加工处理也会导致铬(III)部分流失,进一步减少了人体从膳食中摄入铬的机会。机体缺乏铬元素可能导致糖脂代谢异常^[6-7],而使用铬补充剂可改善机体糖脂代谢异常的症状^[8-10],因此开发高吸收效率及高生物活性的铬补充剂具有重要意义。

铬(III)具有有机态和无机态两种形式,机体对于有机铬的吸收率高于无机铬^[11],且有机铬的生物活性优于无机铬^[12-13]。有机铬主要有合成和天然存在两大类,人工合成的有机铬包括烟酸类铬、氨基酸类铬、吡啶羧酸类铬和多糖铬等几类,如多糖铬可通过氧化还原法、酸碱法、离子交换法和沉淀吸附法等方法合成^[14],而酵母铬与低分子量铬络合物则是天然存在的,可通过一定的分离手段直接得到。通过生物富集将无机铬转变为天然有机铬相对于人工合成的有机铬而言经济成本更低,生产周期短且工艺简单易于推广。目前已有通过生物富集将无机铬转变为有机铬的研究,如王盛良等^[15]以绿豆为原料,三氯化铬为铬源,采用生物富集方法培育出了富铬绿豆芽,富铬绿豆芽内的铬(III)有机化程度达 95%左右;郑艺梅等^[16]以黄豆为

原料,培育出了富铬黄豆芽,有机化程度达 70%左右;何颖敏等^[17]以螺旋藻为原料,培育出富铬螺旋藻,其有机化程度也为 70%左右。以上研究均成功将外源无机铬转化为内部有机铬,但未深入探究植物生物富集铬(III)过程中影响有机铬含量的因素。

豌豆(*Pisum sativum* L.)是一种自花授粉的冷季豆科植物,广泛种植于世界温带地区^[18],是世界上最重要、价值最高的豆类作物之一。2018 年联合国粮农组织统计数据库(Food and Agriculture Organization Statistical Databases, FAO STAT)数据显示,我国豌豆年种植面积约为 950 万公顷,在世界排名第四。豌豆同绿豆^[15]、黄豆^[16]和螺旋藻^[17]等一样,均是有机物含量丰富的植物^[19],铬(III)通过生物富集进入植物内部后大部分是以有机态存在的^[17],因此推测豌豆也可通过生物富集的方式将无机铬转化为有机铬,但目前未见有关豌豆富集铬(III)的研究报道。另外在不同的因素条件下利用不同的植物对铬(III)进行生物富集,其有机铬含量可能存在差异。因此,本研究利用豌豆对铬(III)进行生物富集,通过电感耦合等离子体质谱法(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)测定不同形态铬(III)的含量,以有机铬含量为指标探究不同因素条件下豌豆生物富集铬(III)的效应,以期将无机铬转化为人体的吸收效率更高的有机铬,并评价富铬豌豆蛋白的生物活性,为开发天然有机铬络合物和富铬有机食品提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豌豆(中豌 9 号)随机收购于郑州周边农户,收购总量约 500 kg,实验过程中根据实际需求对各个麻袋豌豆分上中下三层使用取样器采样。

α -淀粉酶(40 U/mg, 合肥博美试剂有限公司); α -葡萄糖苷酶(1000 U)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazylradical, DPPH)、对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, pNPG)、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂(分析纯)(北京索莱宝试剂有限公司); 4-硝基苯基丁酸酯、月桂酸-4-硝基苯酯、阿卡波糖、六水合三氯化铬、40%硫酸铬溶液、硝酸铬、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)(分析纯)、胰脂肪酶(15~35 U/mg)(上海麦克林生化科技有限公司); 胆固醇酯酶(10 U/mg, 上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

HH-4 恒温水浴锅(山东高芯生物传感器研究院有限公司); UV2000 紫外分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); FD-2 真空冷冻干燥机(博医康仪器有限公司); SCIKENTZ 超声细胞破碎仪(宁波新芝生物科技有限公司); FA224 电子分析天平(精度 0.0001 g, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司); Neofuge 1600R 高速冷冻离心机(力康生物医疗科技有限公司); DFY-500 高速粉碎机(上海新诺仪器集团有限公司); Agilent 7900 电感耦合等离子体质谱仪[安捷伦(中国)科技有限公司]; MDS-6 微波消解仪(上海新仪微波化学科技有限公司); ZRQ-250 型人工气候培养箱(上海喆图科学仪器有限公司)。

1.3 豌豆生物富集铬方法

豌豆经除杂剔、除瘪粒后, 取适量豌豆, 使用去离子水清洗 3 次后, 沥干水分, 放于烧杯中。按照料液比 1:3 ($m:V$) 加入铬离子溶液, 在水浴锅中恒温处理一段时间。处理完毕后, 将烧杯中的水分沥干, 取出处理好的豌豆, 使用去离子水清洗 3 次。将清洗完毕的豌豆冷冻干燥, 磨粉, 过 60 目筛, 待测。

1.4 不同形态铬含量测定方法

采用 GB 5009.123—2014《食品安全国家标准 食品中铬的测定》测定铬含量。

1.4.1 总铬含量测定

参照何颖敏等^[17]总铬测定方法, 根据实际实验情况调整取样量为 0.5 g, 改用微波消解仪对样品进行消化处理, 以减少消化时间, 提高消化效率。

1.4.2 无机铬含量测定

参照郑艺梅等^[16]的无机铬测定方法, 调整取样量为 0.5 g。

1.4.3 有机铬含量测定

有机铬用总铬与无机铬之差表示^[16-17]。

1.5 豌豆蛋白质提取方法

参考沙金华等^[20]的豌豆蛋白质提取方法, 冷冻干燥

得豌豆蛋白粉。

1.6 豌豆富铬单因素实验

以 1.3 中的方法进行豌豆富铬操作。以铬离子浓度 0.66 mmol/L、浸泡温度 30℃、浸泡时间 8 h 为基础条件, 以有机铬含量为指标, 探究豌豆富集铬过程中铬离子种类(三氯化铬、硫酸铬和硝酸铬)、浸泡时间(8、12、16、20、24 h)、浸泡温度(20、25、30、35、40℃)和铬离子浓度(0.66、0.88、1.10、1.32、1.54 mmol/L)这 4 个因素对豌豆生物富集铬效应的影响。

1.7 不同萌发生长周期对富铬豌豆铬含量及其蛋白质铬含量的影响

探究富铬豌豆培育过程中生长周期对铬含量的影响。选取 1.6 中单因素条件最优组进行富铬处理, 取富铬豌豆 200 g, 使用去离子水清洗 3 次。将清洗完毕的富铬豌豆分别放入 5 个发芽盘内, 使用去离子水作为培养液, 在人工气候培养箱中进行富铬豌豆萌发。培养温度 25℃、光照时间 12 h/d、培养周期 7 d, 分别于 0、1、2、3、4、5、6、7 d 对富铬豌豆进行随机取样, 取样量为 20 g。取样完毕后使用去离子水清洗 3 次, 冷冻干燥后磨粉, 以 1.4 中的方法测定其铬含量, 并按照 1.5 中的方法对其分别进行蛋白质的提取, 冷冻干燥后得富铬豌豆蛋白粉, 以 1.4 中的方法对富铬豌豆蛋白粉进行铬含量测定。

1.8 富铬豌豆蛋白生物活性分析

1.8.1 富铬豌豆蛋白体外降糖活性测定

(1) α -葡萄糖苷酶抑制率测定方法

参考郝飞龙等^[21]的方法, 并稍作修改。取 67 mmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) (pH 6.8) 2 mL, 1 U/mL α -葡萄糖苷酶 100 μ L, 样品溶液 1 mL, 37℃保温 10 min。加入 10 mmol/L pNPG 100 μ L, 37℃反应 15 min, 加入 0.1 mol/L Na_2CO_3 10 mL 终止反应并显色。405 nm 处测 OD 值。空白组以等体积缓冲溶液代替样品溶液, 空白对照组以等体积缓冲溶液代替样品溶液和 α -葡萄糖苷酶溶液, 背景组以等体积缓冲溶液代替 α -葡萄糖苷酶溶液。按照公式(1)计算:

$$\text{抑制率} = 1 - \left[\frac{(A_{\text{样}} - A_{\text{背景}})}{(A_{\text{空白}} - A_{\text{空白对照}})} \right] \times 100\% \quad (1)$$

式中, $A_{\text{样}}$ 是样品组的吸光值, $A_{\text{背景}}$ 是背景组的吸光值, $A_{\text{空白}}$ 是空白组的吸光值, $A_{\text{空白对照}}$ 是空白对照组的吸光值。

(2) α -淀粉酶抑制率测定方法

参考郝飞龙等^[21]的方法, 并稍作修改。取 100 μ L 4 U/mL α -淀粉酶及 0.1 mL 样品溶液, 37℃保温 5 min。加入 1.0 mL 1% 淀粉溶液, 37℃反应 5 min, 加入 1.0 mL DNS 试剂, 沸水浴中加热 15 min 取出, 于冰水浴中冷却至室温, 再加入 10 mL 去离子水, 540 nm 测定 OD 值。空白组以等体积缓冲液代替样品溶液, 空白组对照组以等体积缓冲液

代替样品溶液和 α -淀粉酶溶液, 背景组以等体积缓冲液代替 α -淀粉酶溶液。按照公式(1)计算。

1.8.2 富铬豌豆蛋白体外降脂活性测定

(1) 胰脂肪酶抑制率的测定

参考纪慧杰等^[22]的方法, 并稍作修改。取 300 μ L 5 mg/mL 胰脂肪酶, 2 mL PBS, 100 μ L 样品溶液和 400 μ L 0.8 mg/mL 月桂酸-4-硝基苯酯, 37°C 反应 30 min, 加 5 mL 去离子水, 于 405 nm 测定吸光值。用等体积缓冲液代替样品溶液作空白组, 用等体积缓冲液代替胰脂肪酶和样品溶液作为空白对照组。用等体积缓冲液代替胰脂肪酶作为背景组, 按照公式(1)计算样品对胰脂肪酶的抑制率。

(2) 胆固醇酯酶抑制率的测定

参考纪慧杰等^[22]的方法, 并稍作修改。取 5 mL 含有牛磺胆酸钠(5.16 mmol/L)、NaCl (0.1 mol/L) 的 PBS (0.1 mol/L, pH=7.0), 250 μ L 胆固醇酯酶(20 μ g/mL), 100 μ L 样品溶液和 100 μ L 4-硝基苯基丁酸酯(4 mmol/L), 25°C 反应 30 min, 405 nm 测定吸光值。用等体积缓冲液代替样品溶液作空白组, 用等体积缓冲液代替胆固醇酯酶和样品溶液作为空白对照组。用等体积缓冲液代替胆固醇酯酶作为背景组, 按照公式(1)计算样品对胆固醇酯酶的抑制率。

1.8.3 富铬豌豆蛋白抗氧化活性测定

(1) DPPH 自由基清除能力的测定

参考刘妍兵等^[23]和张景等^[24]的方法, 并稍作修改。取 2 mL 样品溶液加入到 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液, 振荡均匀。避光反应 20 min, 于 517 nm 处测定上清液的吸光值(A_s)。以去离子水代替样品溶液为对照组(A_c)。以 2 mL 乙醇加入 2 mL 水调零。样品的 DPPH 清除能力用清除率(%)表示, 按照公式(2)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_s 是样品组的吸光值, A_c 是对照组的吸光值。

(2) 羟自由基清除能力的测定

参考刘妍兵等^[23]的方法, 并稍作修改。取 0.5 mL 样品加入 1.0 mL 0.15 mol/L PBS (pH 7.4), 加入 0.5 mL 1.8 mmol/L 邻二氮菲溶液及 0.5 mL 1.8 mmol/L FeSO_4 溶液, 迅速混匀, 最后加入 1.0 mL 0.02% (V/V) 的 H_2O_2 , 37°C 水浴 60 min, 于 536 nm 下测其吸光值(A_s)。用去离子水代替样品作为对照组(A_c)。用去离子水代替样品和 H_2O_2 作为空白组(A_b)。以 1.5 mL PBS 加入 1.5 mL 的去离子水调零。样品清除羟自由基能力用清除率(%)表示, 按照公式(3)计算:

$$\text{羟自由基清除率} = \frac{A_s - A_c}{A_b - A_c} \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_s 是样品组的吸光值, A_c 是对照组的吸光值, A_b 是空白组的吸光值。

(3) 还原能力的测定

参考刘妍兵等^[23]和杜利月等^[25]的方法, 并稍作修改。取 1.0 mL 样品, 加入 2.5 mL 0.15 mol/L PBS (pH 6.6), 2.5 mL 1%

铁氰化钾, 充分混匀后 50°C 水浴 20 min, 迅速冷却, 加入 2.5 mL 10% TCA, 0.5 mL 0.1% FeCl_3 , 静置 10 min 后于 700 nm 测定吸光值, 以吸光值表示还原能力。

1.9 数据分析

采用 Microsoft Office Excel 2016 对实验数据进行统计; 采用 SPSS 21.0 对实验数据进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性; 采用 Origin 2021 进行绘图; 采用 GraphPad Prism 8.0 进行半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})值计算。所有实验至少重复 3 次, 数据统计与分析数据用平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 铬(III)有机化程度表示有机铬含量平均值占总铬含量平均值的比例, 不再以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 豌豆富铬单因素实验结果

2.1.1 铬离子种类对豌豆富铬效果的影响

由图 1A 可知, 豌豆富铬组的铬含量均显著高于未富铬组($P < 0.05$), 其中硝酸铬组的总铬含量相较于三氯化铬组和硫酸铬组最低, 其总铬为 $(45.77 \pm 0.30) \mu\text{g/g}$, 约是未富铬豌豆总铬含量 $[(0.21 \pm 0.03) \mu\text{g/g}]$ 的 218 倍, 这说明豌豆具有较强的富铬能力。三氯化铬、硫酸铬和硝酸铬组铬的有机化程度分别约为 76%、71% 和 70%, 这说明富铬豌豆中的铬(III)大部分都是有机铬, 也表明豌豆在吸收铬(III)的过程中将部分无机铬转化为了有机铬, 通过豌豆对铬(III)进行生物富集是可行的。金属被植物吸收后可与其内在有机物结合^[26], 由此推测, 铬(III)可能也与豌豆内的有机物如有机酸、多糖和蛋白质等发生了结合。另外, 不同种类的铬离子对豌豆的富铬效果具有显著差异($P < 0.05$), 其中三氯化铬组的豌豆总铬含量、无机铬含量及有机铬含量均显著高于硫酸铬组和硝酸铬组($P < 0.05$)。这一结果表明, 在相同的铬离子浓度下, 氯离子对豌豆富铬具有较好的促进作用, 硫酸根离子次之, 硝酸根离子的促进作用最弱。氯离子具有促进植物对钾、钙、镁等金属阳离子吸收的作用^[27], 而植物对金属阳离子的吸收通常是利用钙、铁等必需营养元素的离子通道和转运蛋白等完成^[26], 因此推测氯离子可能通过促进必需营养元素的离子通道打开或增加转运蛋白的易位来达到促进植物吸收金属阳离子的作用。另外由于离子通道对金属阳离子的选择性较低^[26], 所以氯离子可能以上述相同方式促进植物对铬(III)离子的吸收。综上所述, 最佳的铬离子种类应选择三氯化铬。

2.1.2 浸泡时间对豌豆富铬效果的影响

由图 1B 可知, 当浸泡时间为 12 h 时, 豌豆富铬效果最好, 此时有机铬含量最高, 16 h 次之, 但二者不具有显著性差异($P > 0.05$)。12 h 之后, 随着浸泡时间的增加, 豌豆的总铬含量、无机铬含量及有机铬含量均逐渐降低。其原因

可能是长时间浸泡在铬离子溶液中可能会对豌豆造成一定的生理毒害作用^[28-29],导致豌豆细胞膜被破坏,通透性极大增加,贮存铬(III)的能力降低,前一阶段吸收的铬(III)流失。因此,最佳的浸泡时间应选择 12 h。

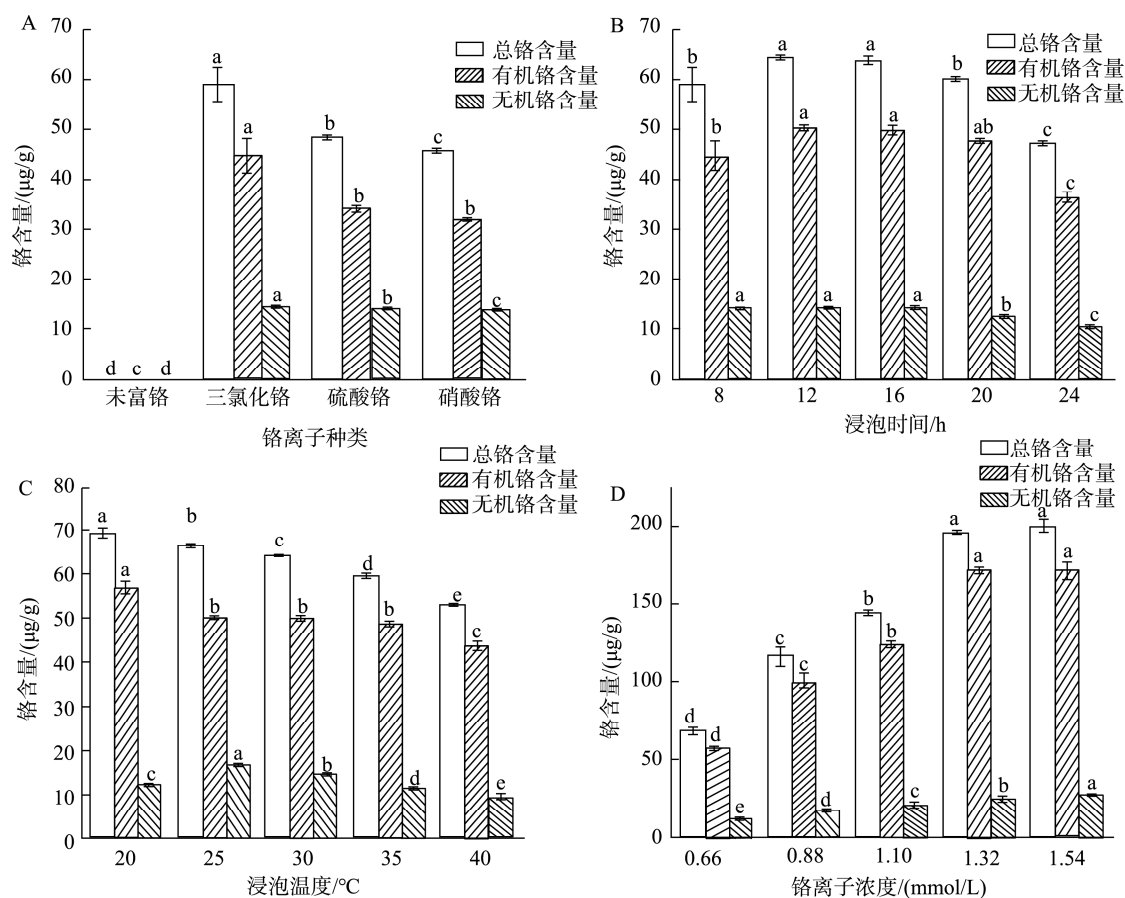
2.1.3 浸泡温度对豌豆富铬效果的影响

由图 1C 可知,当浸泡温度为 20℃时,豌豆的总铬含量及有机铬含量最高,且显著高于其他组($P<0.05$),而该条件下豌豆的无机铬则显著低于 25℃和 30℃($P<0.05$)。这说明在浸泡温度为 20℃时豌豆对铬(III)的吸收能力最高,且该温度下豌豆具有较强的将无机铬转化为有机铬的能力。这可能是由于豌豆是冷季豆科植物,其最适生长温度在 20~25℃左右^[30-32],而适宜的生长温度可促进植物的物质吸收及转运^[33-34],所以豌豆在浸泡温度为 20℃时对铬(III)的吸收能力最高。随着浸泡温度的进一步增加,豌豆的总铬含量及有机铬含量均呈现一个下降的趋势,在浸泡温度为 40℃时豌豆的总铬含量及有机铬含量均达到最低,且显著低于其他组($P<0.05$)。这是因为豌豆对于高温环境的耐受性较差^[30],超过其最适生长温度 20℃后,温度的增加

可能会使得豌豆产生高温胁迫效应,导致豌豆细胞膜的功能出现异常^[35],因此随着浸泡温度的增加豌豆对铬(III)的吸收能力逐渐降低。综合考虑实际生产能耗,富铬效果及经济成本等因素,最佳的浸泡温度选择 20℃。

2.1.4 铬离子浓度对豌豆富铬效果的影响

由图 1D 可知,随着铬离子浓度的增加,豌豆的总铬含量及有机铬含量均呈现先增加后达到平衡的趋势。当铬离子浓度超过 1.32 mmol/L 之后,豌豆铬含量增加趋势基本平缓。1.32 mmol/L 组和 1.54 mmol/L 组的豌豆总铬含量及有机铬含量不存在显著差异($P>0.05$),但两组豌豆的总铬含量及有机铬含量均显著高于 0.66、0.88 和 1.10 mmol/L 组($P<0.05$)。这说明,在铬离子浓度较低时,随着铬离子浓度增加,豌豆内外的铬离子浓度差增加,豌豆对铬(III)的吸收能力逐渐增强。当铬离子浓度达到 1.32 mmol/L 时,可能由于豌豆自身对铬(III)吸收能力的限制,此时豌豆对铬(III)的吸收已经趋近饱和,所以当铬离子浓度超过 1.32 mmol/L 之后,豌豆铬含量的增加趋势基本平缓。综合考虑富铬效果和经济成本这两个因素,最佳的铬离子浓度应选择 1.32 mmol/L。



注: A 为不同铬离子种类处理的豌豆铬含量; B 为不同浸泡时间处理的豌豆铬含量; C 为不同浸泡温度处理的豌豆铬含量; D 为不同铬离子浓度处理的豌豆铬含量。相同测定指标在同一因素的不同水平之间进行比较,有共同小写字母者表示差异不明显($P>0.05$),有不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。

图 1 豌豆富铬单因素实验结果($n=3$)

Fig.1 Single factor experiment results on chromium enrichment in pea ($n=3$)

2.2 不同萌发生长周期对富铬豌豆铬含量及蛋白质铬含量的影响

由图 2 可知, 富铬豌豆萌发生长第 0 d 的总铬含量及有机铬含量显著高于萌发生长第 1、2、3、4、5、6、7 d 的铬含量($P<0.05$), 这说明铬(III)伴随着豌豆的萌发生长而流失。随着富铬豌豆的萌发生长周期增加, 其总铬含量及有机铬含量均逐渐降低, 且不同生长周期的富铬豌豆总铬含量存在显著性差异($P<0.05$)。第 6 d 和第 7 d 的富铬豌豆有机铬含量差异已不显著($P>0.05$), 但都显著低于其他生长周期($P<0.05$)。这说明富铬豌豆在萌发生长过程中, 铬(III)是逐渐向外界流失的。吴香玉^[36]研究发现, 绿豆在萌发过程中会伴随着细胞膜和细胞壁通透性的改变, 且其内的一部分代谢物质会流失到外界。因此推测富铬豌豆在萌发生长过程中也可能产生了这种变化, 并且对于富铬豌豆生长的去离子水环境而言, 富铬豌豆中的铬含量较高, 这本身造成了浓度差, 所以富铬豌豆中的铬(III)可能在萌发生长过程中伴随着与外界的物质交换而流失。

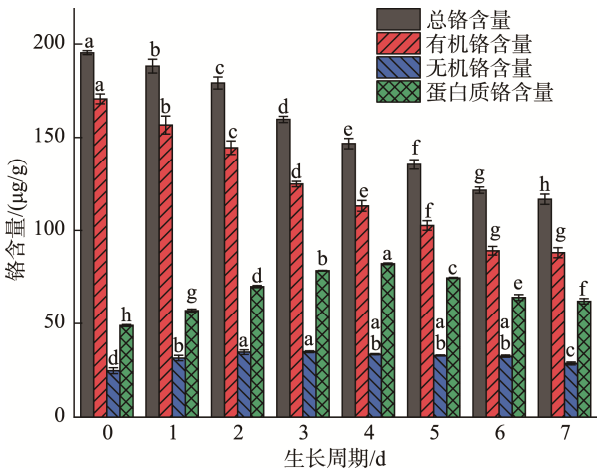
由图 2 可知, 生长第 0 d 的富铬豌豆蛋白质铬含量显著低于第 1 d 的蛋白质铬含量($P<0.05$), 这说明富铬豌豆通过萌发生长提高了蛋白质铬含量。随着富铬豌豆的萌发生长周期增加, 蛋白质铬含量显著升高($P<0.05$), 至第 4 d 时达到最高, 表明在萌发生长过程中, 蛋白质与铬(III)进一步发生了结合。随后, 蛋白质铬含量开始逐渐降低, 这说明生长周期超过第 4 d 后, 富铬豌豆中蛋白质与铬(III)的结合开始减弱, 这可能是由于随着富铬豌豆的生长周期增加, 其内蛋白酶活性增高, 富铬豌豆中的蛋白质发生了水解^[37], 其中可能包含部分与铬(III)结合的蛋白质。因此, 富铬豌豆的蛋白质铬含量在生长周期超过第 4 d 后逐渐降低。

2.3 富铬豌豆蛋白生物活性分析

2.3.1 富铬豌豆蛋白体外降糖活性

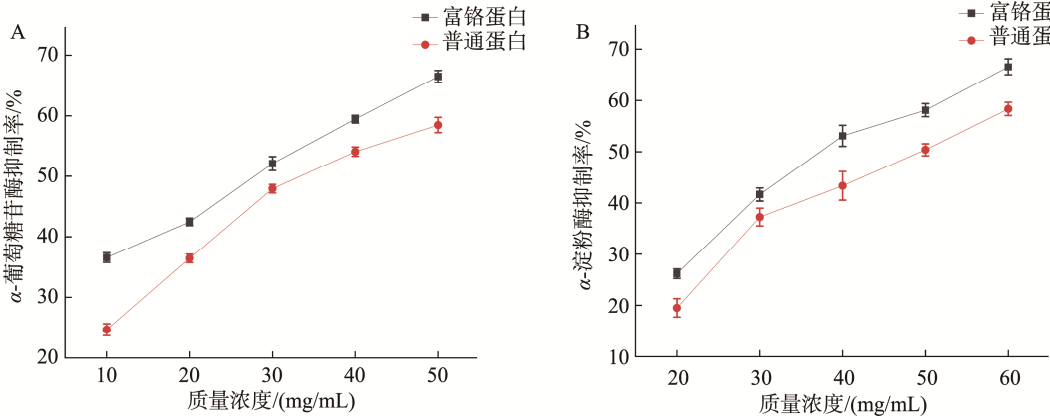
由图 3 可知, 富铬豌豆蛋白及普通豌豆蛋白均有较好的体外降糖活性, 且不同的蛋白质质量浓度与体外降糖活性之间

存在量效关系, 随着蛋白质质量浓度增大, 样品对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率也随之增大。富铬豌豆蛋白对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的 IC_{50} 分别为 24.38 mg/mL 和 38.34 mg/mL; 普通豌豆蛋白对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的 IC_{50} 分别为 34.08 mg/mL 和 47.73 mg/mL。富铬豌豆蛋白对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的 IC_{50} 值均低于普通豌豆蛋白, 说明富铬豌豆的体外降糖活性优于普通豌豆蛋白, 也提示铬(III)对于豌豆蛋白的降糖活性具有协同增效作用, 这与 WANG 等^[38]和 LIU 等^[39]的研究结论相一致。本研究中阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的 IC_{50} 值分别为 0.16 mg/mL 和 0.41 mg/mL, 远低于富铬豌豆蛋白及普通豌豆蛋白的 IC_{50} 值, 这可能是由于本研究得到的富铬豌豆蛋白及普通豌豆蛋白仍为混合物, 随着进一步的分离纯化, 有可能得到降糖活性更好的组分。



注: 相同指标在不同生长周期之间进行比较, 有共同上标字母者表示差异不明显($P>0.05$), 有不同上标字母者表示差异显著($P<0.05$)。

图 2 不同生长周期富铬豌豆铬含量及蛋白质铬含量($n=3$)
Fig.2 Chromium content and protein chromium content in chromium(III)-enriched pea of different growth cycles ($n=3$)



注: A 为不同浓度蛋白质的 α -葡萄糖苷酶抑制作用; B 为不同浓度蛋白质的 α -淀粉酶抑制作用。

图 3 不同质量浓度蛋白质体外降糖活性($n=3$)

Fig.3 Hypoglycemic activities of different mass concentrations of proteins *in vitro* ($n=3$)

2.3.2 富铬豌豆蛋白体外降脂活性

由图4可知,富铬豌豆蛋白及普通豌豆蛋白均具有良好的体外降脂活性,随着蛋白浓度增大,富铬豌豆蛋白及普通豌豆蛋白对胰脂肪酶和胆固醇酯酶的抑制率也随之增大。富铬豌豆蛋白对胰脂肪酶和胆固醇酯酶的 IC_{50} 值分别为42.36 mg/mL和108.20 mg/mL;普通豌豆蛋白对胰脂肪酶和胆固醇酯酶的 IC_{50} 值分别为50.50 mg/mL和123.10 mg/mL。由此可知,普通豌豆蛋白的 IC_{50} 值高于富铬豌豆蛋白,其体外降脂活性弱于富铬豌豆蛋白,这说明由于铬(III)的存在,豌豆蛋白的体外降脂活性得到增强。这可能是因为铬(III)本身就具有降脂活性^[40-41],所以与豌豆蛋白结合后二者的降脂活性可能产生了协同作用,因此富铬豌豆蛋白降脂活性得到增强。

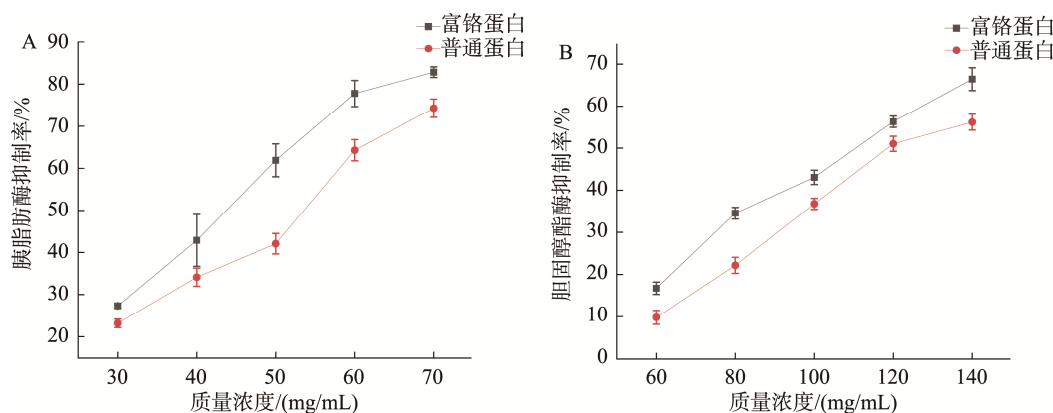
2.3.3 富铬豌豆蛋白抗氧化能力

由图5可知,富铬豌豆蛋白及普通豌豆蛋白均具有较强的抗氧化,并且随着蛋白浓度的增大,富铬豌豆蛋白及普通豌豆蛋白的DPPH自由基、羟基自由基清除能力及还原能力均逐渐增强的。由此可知,蛋白质浓度与抗氧化能力之间存在剂量依赖效应。富铬豌豆蛋白对DPPH自由基、羟基自由基的 IC_{50} 值分别为76.62 mg/mL和27.80 mg/mL;

普通豌豆蛋白对DPPH自由基、羟基自由基的 IC_{50} 值分别为115.50 mg/mL和34.46 mg/mL。这说明富铬豌豆的DPPH自由基、羟基自由基清除能力均强于普通豌豆蛋白。由图5C可知,在蛋白质质量浓度为5~25 mg/mL时,富铬豌豆蛋白的还原能力始终强于普通豌豆蛋白。综上所述,富铬豌豆蛋白的抗氧化能力强于普通豌豆蛋白,这表明铬(III)对于豌豆蛋白的抗氧化能力也有协同增效作用,这也与铬(III)自身的抗氧化活性相关^[38]。

3 讨论与结论

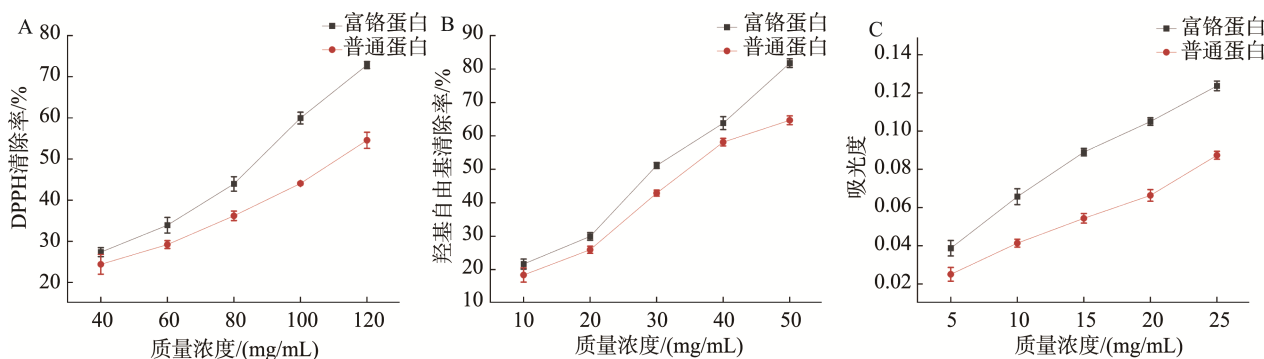
本研究中豌豆种子经浓度1.32 mmol/L的三氯化铬溶液在20℃浸泡12 h后,可得到最佳富铬效果的豌豆,该条件下富铬豌豆的铬含量为未富铬豌豆的930倍,其有机铬的含量为 (170.65 ± 2.61) $\mu\text{g/g}$,有机化程度达87%;富铬豌豆的萌发生长可增加其蛋白质的铬含量,萌发生长第4 d蛋白质铬含量最高,为 (82.15 ± 0.45) $\mu\text{g/g}$ 。通过生物活性评价可知,富铬豌豆蛋白与普通豌豆蛋白均具有良好的体外降糖、降脂及抗氧化活性,且富铬豌豆蛋白优于普通豌豆蛋白,这说明铬(III)对豌豆蛋白的生物活性具有协同增效作用。



注: A 为不同浓度蛋白质的胰脂肪酶抑制作用; B 为不同浓度蛋白质的胆固醇酯酶抑制作用。

图4 不同质量浓度蛋白质体外降脂活性($n=3$)

Fig.4 Lipid-lowering activities of different mass concentrations of proteins *in vitro* ($n=3$)



注: A 为不同浓度蛋白质的DPPH自由基清除活性; B 为不同浓度蛋白质的羟基自由基清除活性; C 为不同浓度蛋白质的还原力。

图5 不同质量浓度蛋白质体外抗氧化活性($n=3$)

Fig.5 Antioxidant activities of different mass concentrations of proteins *in vitro* ($n=3$)

本研究以豌豆为原料, 利用生物富集将无机铬转化为有机铬, 探究了铬离子种类、浸泡时间、浸泡温度和铬离子浓度对豌豆生物富集铬效果的影响, 以期为该研究方向提供新的参考。本研究中有有机化程度为 87%, 优于富铬黄豆芽^[16]及富铬螺旋藻^[17]; 相较于绿豆芽有机化程度^[15]偏低, 其原因可能是由于豆子的种类不同, 导致对铬的吸收能力存在差异; 其次豌豆的体积较绿豆大, 相对而言其表面积较绿豆小, 因此豌豆与铬离子溶液的接触不如绿豆充分, 故其有机铬转化率略低于绿豆。此外, 本研究考察了不同萌发生长周期对富铬豌豆铬含量和蛋白质铬含量的影响, 结果表明, 富铬豌豆的萌发生长可促进富铬豌豆中铬(III)与蛋白质的结合, 从而使蛋白质铬含量增加。另外, 生物活性评价结果表明, 富铬豌豆蛋白的体外降糖、降脂及抗氧化活性均优于普通豌豆蛋白。因此, 利用豌豆通过生物富集方法将无机铬转化为有机铬是切实可行的, 所得产物也具有较好的生物活性。

今后在此基础上可以进一步研究生物富集铬样品中的有机铬提取及分离纯化技术, 以期得到纯度更高的天然有机铬化合物, 为开发天然有机铬络合物和富铬有机食品提供新的参考。

参考文献

- [1] ASBAGHI O, FATEMEH N, MAHNAZ RK, *et al.* Effects of chromium supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105098.
- [2] VINCENT JB. Effects of chromium supplementation on body composition, human and animal health, and insulin and glucose metabolism [J]. *Curr Opin Clin Nutr*, 2019, 22(6): 483–489.
- [3] MARET W. Chromium supplementation in human health, metabolic syndrome, and diabetes [J]. *Met Ions Life Sci*, 2019, 19: 231–251.
- [4] 唐海燕, 肖清贵, 徐红彬, 等. 有机铬营养生物学研究进展[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(12): 378–383.
TANG HY, XIAO QG, XU HB, *et al.* Research progress in the nutritional biology of organic trivalent chromium [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2014, 35(12): 378–383.
- [5] MONGA A, FULKE AB, DASGUPTA D. Recent developments in essentiality of trivalent chromium and toxicity of hexavalent chromium: Implications on human health and remediation strategies [J]. *J Hazard Mater Adv*, 2022, 7: 100113.
- [6] HANSEN AF, SIMIĆ A, ÅSVOLD BO, *et al.* Trace elements in early phase type 2 diabetes mellitus-A population-based study. The HUNT study in Norway [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2017, 40: 46–53.
- [7] CANCARINI A, FOSTINELLI J, NAPOLI L, *et al.* Trace elements and diabetes: Assessment of levels in tears and serum [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 154: 47–52.
- [8] LI L, XU JX, CAO YJ, *et al.* Preparation of ganoderma lucidum polysaccharide-chromium(III) complex and its hypoglycemic and hypolipidemic activities in high-fat and high-fructose diet-induced pre-diabetic mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 140: 782–793.
- [9] MOREIRA LPD, GOMES JVP, MATTAR JB, *et al.* Potential of trace elements as supplements for the metabolic control of type 2 diabetes mellitus: A systematic review [J]. *J Funct Foods*, 2019, 57: 317–327.
- [10] HASHEMIAN K, NOROUZIAN MA, MOHAMMADI-SANGCHESHMEH A. Dietary supplemental chromium and niacin influence the growth performance and fat deposition in lambs [J]. *Anim Prod Sci*, 2020, 60(5): 618–624.
- [11] 吴扬, 胡志和. 铬及铬络合物与糖尿病的关系研究进展[J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 774–779.
WU Y, HU ZH. Advance of study on relationship between chromium or its complexes and diabetes mellitus [J]. *Food Sci*, 2008, 29(12): 774–779.
- [12] TANG H, XIAO Q, XU H, *et al.* Hypoglycemic activity and acute oral toxicity of chromium methionine complexes in mice [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2015, 29: 136–144.
- [13] LI F, WU X, ZHAO T, *et al.* Anti-diabetic properties of chromium citrate complex in alloxan-induced diabetic rats [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2011, 25(4): 218–224.
- [14] 王宝琴, 刘雪红. 多糖铬配合物的研究进展[J]. *广东微量元素科学*, 2014, 21(9): 26–31.
WANG BQ, LIU XH. Progress on research of polysaccharides-chromium complex [J]. *Guangdong Trace Elem Sci*, 2014, 21(9): 26–31.
- [15] 王盛良, 黄杰, 黄薇, 等. 绿豆芽的富铬效果及影响因素研究[J]. *卫生研究*, 2002, (1): 67–69.
WANG SL, HUANG J, HUANG W, *et al.* Study on the influencing factor of cultivating mungbean sprouts rich in chromium [J]. *J Hyg Res*, 2002, (1): 67–69.
- [16] 郑艺梅, 叶华, 华平. 黄豆发芽过程中铬的生物富集效应的研究[J]. *食品工业科技*, 2005, (6): 101–103.
ZHENG YM, YE H, HUA P. Study on the bioenrichment effect of chromium in soybean germination [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2005, (6): 101–103.
- [17] 何颖敏, 孙宜君, 张娇, 等. 螺旋藻富铬及其含铬蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶抑制的研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2012, 39(4): 571–575.
HE YM, SUN YJ, ZHANG J, *et al.* Effects of chromium (III)-riched *Spirulina platensis* proteins on the activity inhibition of α -glucosidase [J]. *J Anhui Agric Univ*, 2012, 39(4): 571–575.
- [18] PANDEY AK, RUBIALES D, WANG Y, *et al.* Omics resources and omics-enabled approaches for achieving high productivity and improved quality in pea (*Pisum sativum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2021, 134(3): 755–776.
- [19] 姜颖, 张蕾, 刘畅, 等. 3 种己糖糖基化修饰对豌豆蛋白结构和抗氧化活性的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(16): 6552–6557.
JIANG Y, ZHANG L, LIU C, *et al.* Effects of glycation modifications with 3 kinds of hexose on the structure and antioxidant activity of pea protein [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(16): 6552–6557.
- [20] 沙金华, 马晓军. 豌豆分离蛋白提取工艺的研究[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(7): 262–263, 290.
SHA JH, MA XJ. Study on extraction technology of pea protein isolate [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, 30(7): 262–263, 290.
- [21] 郝飞龙, 梁晓, 范莹, 等. 黑豆皮多酚提取物体外对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3359–3364.
HAO FL, LIANG X, FAN Y, *et al.* Effects of polyphenol extracts from black soybean seed coat on the activity of α -amylase and α -glucosidase in

- vitro* [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(9): 3359–3364.
- [22] 纪慧杰, 朱彩平. 石榴皮多糖的提取及组成, 体外降脂活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, (5): 1–11.
- JI HJ, ZHU CP. Study on the extraction and composition of pomegranate peel polysaccharide and hypolipidemic activity *in vitro* [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, (5): 1–11.
- [23] 刘妍兵, 陶阳, 苗雪, 等. 绿豆蛋白酶解物抗氧化活性与其结构, 氨基酸组成的相关性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 50–58.
- LIU YB, TAO Y, MIAO X, *et al.* Correlation between antioxidant activity and structure and amino acid composition of protease hydrolysates from mung bean [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(7): 50–58.
- [24] 张景, 刘养山, 任洪飞, 等. 羊肚菌多糖的提取优化及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(5): 317–324.
- ZHANG J, LIU YS, REN HF, *et al.* Study on the extraction optimization and antioxidant activity of *Morchella esculenta* polysaccharides [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(5): 317–324.
- [25] 杜利月, 赵新如, 王飞. 香菇多糖锌螯合物的制备及结构表征和体外抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(4): 290–298.
- DU LY, ZHAO XR, WANG F. Preparation, structure characterization and *in vitro* antioxidant activity of lentinan-zinc chelate [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(4): 290–298.
- [26] 何玉君, 孙梦荷, 沈亚婷, 等. 超富集植物与重金属相互作用机制及应用研究进展[J]. 岩矿测试, 2020, 39(5): 639–657.
- HE YJ, SUN MH, SHEN YT, *et al.* Research progress on the interaction mechanism between hyperaccumulator and heavy metals and its application [J]. *Rock Miner Anal*, 2020, 39(5): 639–657.
- [27] 陈铭. 植物无机阴离子营养研究[J]. 土壤通报, 1993, (2): 95–97, 86.
- CHEN M. Studies on plant inorganic anion nutrition [J]. *Chin J Soil Sci*, 1993, (2): 95–97, 86.
- [28] 钟昱欣, 张新全, 杨昕颖, 等. 植物对重金属铬胁迫响应机制的研究进展[J]. 草业科学, 2019, 36(8): 1962–1975.
- ZHONG MY, ZHANG XQ, YANG XY, *et al.* Recent advances in plant response to chromium stress [J]. *Pratac Sci*, 2019, 36(8): 1962–1975.
- [29] AHMAD R, ALI S, ABID M, *et al.* Glycinebetaine alleviates the chromium toxicity in *Brassica oleracea* L. by suppressing oxidative stress and modulating the plant morphology and photosynthetic attributes [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2020, 27: 1101–1111.
- [30] 郭静. 豌豆栽培及病虫害综合防治技术[J]. 世界热带农业信息, 2022, (9): 27–28.
- GUO J. Cultivation of pea and integrated pest control technology [J]. *World Trop Agric Inf*, 2022, (9): 27–28.
- [31] 伊风艳, 孙海莲, 晔霁罕, 等. 温度和干旱胁迫对乌拉特肋脉野豌豆种子萌发的影响[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2019, 40(5): 43–49.
- YI FY, SUN HL, YE RH, *et al.* Effects of temperature and drought stress on seed germination of *Vicia costata* Ledeb. cv. Wulate [J]. *J Inner Mongolia Agric Univ*, 2019, 40(5): 43–49.
- [32] 张余洋, 胡全凌, 李汉霞. 不同处理对豌豆和萝卜芽苗菜生长, 产量及品质的影响[J]. 华中农业大学学报, 2008, (2): 289–293.
- ZHANG YY, HU QL, LI HX. Effects of different treatments on growth, yield and quality of pea and radish sprouts [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2008, (2): 289–293.
- [33] DING Y, YANG S. Surviving and thriving: How plants perceive and respond to temperature stress [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(8): 947–958.
- [34] DUSENGE ME, DUARTE AG, WAY DA. Plant carbon metabolism and climate change: Elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration [J]. *New Phytol*, 2019, 221(1): 32–49.
- [35] 解玉玲. 高温胁迫对植物生理影响的研究进展[J]. 吉林农业, 2019, (8): 107–108.
- XIE YL. Research progress of effects of high temperature stress on plant physiology [J]. *Agric Jilin*, 2019, (8): 107–108.
- [36] 吴香玉. 绿豆萌发的动态代谢组学研究[D]. 武汉: 中国科学院大学, 2014.
- WU XY. Dynamic metabolomics for mung bean germination [D]. Wuhan: University of Chinese Academy of Sciences, 2014.
- [37] 秦高一鑫, 裴斐, 赵立艳, 等. 豌豆发芽过程中营养成分和抗氧化活性的变化[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(4): 38–42.
- QIN GYX, PEI F, ZHAO LY, *et al.* Changes of nutritional functional components and antioxidant activities of pea during germination [J]. *J Chin Cereal Oil Ass*, 2019, 34(4): 38–42.
- [38] WANG C, GAO X, SANTHANAM RK, *et al.* Effects of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and its chromium (III) complex on advanced glycation end-products formation, α -amylase, α -glucosidase activity and H₂O₂-induced oxidative damage in hepatic L02 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 116: 335–345.
- [39] LIU L, ZHANG S, LU J, *et al.* Antidiabetic effect of high-chromium yeast against type 2 diabetic KK-Ay mice [J]. *J Food Sci*, 2018, 83(7): 1956–1963.
- [40] CHEN WY, CHEN CJ, LIU CH, *et al.* Chromium attenuates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in KK/HIJ mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397(3): 459–464.
- [41] 王维纲, 李晓红, 刘冰, 等. 染料木素铬配合物对谷氨酸钠诱导的肥胖大鼠糖脂代谢的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(4): 892–897.
- WANG WG, LI XH, LIU B, *et al.* Effect of genistein chromium complex on glucose and lipid metabolism in obese rats induced by sodium glutamate [J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2022, 48(4): 892–897.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



袁勇敢, 硕士研究生, 主要研究方向为食品营养与安全。

E-mail: 344007105@qq.com



宋莲军, 博士, 教授, 主要研究方向为食品营养与安全。

E-mail: slj69@126.com