

海藻糖基麦芽五糖及其微球的体外消化和酵解

潘莹, 江波*, 陈静静, 张涛

(江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为研究包埋前后的海藻糖基麦芽五糖(N-G7)在模拟消化液及体外酵解过程中的变化, 采用口腔、胃部及小肠的体外消化模型分析消化前后溶液中 N-G7 的质量和 N-G7 微球(ALG-Ca) 中的糖组成变化, 应用体外发酵技术评价 N-G7 微球的发酵行为, 检测不同时间点的 pH 值、菌体浓度(OD_{600})、产气量、短链脂肪酸(SCFA)浓度等指标的变化, 并探究其对人体肠道微生物构成的影响。结果表明: N-G7 在口腔消化 2 min 后在强酸性的胃部环境中几乎不被水解, 在小肠中 N-G7 的水解率达到了 82.70%。采用不同质量分数(1%、2%、3%)的海藻酸钙对其进行包埋, 形成的微球保留 80% 以上的 N-G7 到达结肠。在体外酵解中, 各实验组的 pH 随时间延长逐渐降低, OD_{600} 随时间延长逐渐增加。质量分数 2% 的 ALG-Ca 组产气量和碳源消耗率在 0~6 h 内达到最低, 而后逐渐增加, 证明包埋后的 N-G7 发酵体系属于缓慢发酵。与对照相比, 质量分数 2% 的 ALG-Ca 组产生大量 SCFA, 肠道菌群组成发生变化, 更有利于益生菌的生长。

关键词: 海藻糖基麦芽五糖; 微球; 体外消化; 体外发酵; 肠道菌群

中图分类号: TS 201.3 文章编号: 1673-1689(2024)03-0036-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20220212002

In vitro Digestion and Fermentation Characteristics of Trehalose-Based Maltoheptaose and Its Microspheres

PAN Ying, JIANG Bo*, CHEN Jingjing, ZHANG Tao

(State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 21422, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the changes of trehalose-based maltoheptaose (N-G7) before and after encapsulation in simulated digestive fluid and *in vitro* fermentation. The mass ratio of N-G7 and the sugar composition of N-G7 microspheres (ALG-Ca) in the solution before and after digestion were analyzed by *in vitro* digestion models of oral, stomach, and small intestine. The fermentation characteristics of microspheres were evaluated by *in vitro* fermentation technology. The changes in pH values, OD_{600} , gas production, and short-chain fatty acid (SCFA) content at different time points were detected, and their effects on the composition of human intestinal microbiota were studied. The results showed that N-G7 was almost not hydrolyzed in the oral digestion for 2 minutes and in the highly acidic gastric environment. However, the hydrolysis rate of N-G7 reached 82.70% after intestinal digestion. Encapsulation with different concentrations

收稿日期: 2022-02-12 修回日期: 2022-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871745)。

* 通信作者: 江波(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品酶工程与食品功能配料研究。E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

of calcium alginate (1%, 2%, 3%) formed microspheres that retained approximately 80% of N-G7 reaching the colon. During *in vitro* fermentation, the pH value and OD₆₀₀ of each experimental group decreased and increased continuously with time. The gas production and carbon source consumption rate in the 2% ALG-Ca group were the lowest among all groups from 0 to 6 hours, followed by a gradual increase, indicating that the fermentation system of N-G7 after encapsulation belonged to slow fermentation. Compared with the control group, the 2% ALG-Ca group produced a large amount of SCFA and changed the composition of intestinal microbiota, which was more conducive to the growth of probiotics.

Keywords: trehalose-based maltoheptaose, microspheres, *in vitro* digestion, *in vitro* fermentation, intestinal microbiota

肠道菌群数量繁多,影响食物的消化吸收和能量供给。人体肠道菌群构成与众多疾病相关,如肥胖、糖尿病、过敏等^[1],因此对肠道微生物的调节越来越引起人们重视。近年来,各种新型低聚糖和多糖的益生作用已被证实^[2-3]。研究证明,在上消化道未被消化降解的功能性糖类物质能进入大肠被肠道微生物酵解利用,产生短链脂肪酸,增加有益微生物含量,并具有抗炎、降血糖、抗癌等效用^[4]。一些常见的碳水化合物,如低聚果糖、低聚半乳糖、菊粉等可作为益生元被有益菌选择利用,维持人体肠道微生物平衡^[5]。通过体外消化和发酵模型来模拟糖类物质在口腔、胃、小肠和结肠过程中的消化和酵解特性,是一种简单易行的方法。

海藻糖基麦芽五糖(non-reducing maltoheptaose, N-G7)是将葡萄糖以 α -1,4糖苷键和 α -1,1糖苷键相连接,聚合度为7。通过转变麦芽七糖末端的 α -1,4糖苷键,生成非还原性的麦芽糊精,避免美拉德反应和其余不良褐变反应的发生^[6]。然而,N-G7中含有的 α -1,4糖苷键会被 α -淀粉酶和糖化酶水解,无法完整地到达结肠。Venkatachalam等发现以海藻酸钙作为物理屏障,可保护淀粉颗粒完整到达结肠^[7]。此外,淀粉被包埋后在结肠中可表现出缓慢发酵的特性。Rose等研究表明,在体外发酵过程中用海藻酸钙微球包埋淀粉后,对患者粪便微生物体外发酵是有益的^[8]。作者利用体外模拟消化液探讨包埋前后N-G7在经过人体消化道时的变化,确定N-G7微球在体外酵解时的特性及对肠道菌群构成的改变,为进一步研究N-G7的功能及性质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

海藻糖基麦芽五糖:作者所在实验室制备,纯度大于90%^[6];海藻酸钠及乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸的标品:国药集团化学试剂公司;胰酶、色谱级乙腈:Sigma-Aldrich公司;低聚果糖(FOS)、菊粉(IN):上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

FE20型pH计:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;P7紫外可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司;THZ-82水浴恒温振荡器:常州国华电器有限公司;Waters e2695高效液相色谱仪:美国Waters公司;GC-2010Plus气相色谱仪:日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 海藻糖基麦芽五糖微球的制备 参照文献[9]的微球制备方法并稍加修改。称取最终质量分数分别为1%、2%、3%的海藻酸钠于去离子水中,60℃搅拌溶解后冷却至室温。按海藻酸钠与N-G7质量比分别为1:9、2:9、3:9称取N-G7,分散均匀后超声消除气泡。通过蠕动泵将混合液泵入4 g/dL的CaCl₂溶液中,微球在CaCl₂溶液中静置保存3 h。过滤收集N-G7微球,HPLC测定滤液中未被包埋的N-G7质量,包封率见式(1)。

$$H = \left(1 - \frac{m}{m_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: H 为包封率,%; m_0 为包埋前称取的N-G7质量,g; m 为包埋后由HPLC检测出滤液中的N-G7质量,g。

大量去离子水清洗微球,去除表面的盐离子,

并转移至 40 ℃烘箱中干燥过夜。

1.3.2 HPLC 测定微球中 N-G7 质量分数 N-G7 微球干燥后,用质量分数为 3%的柠檬酸钠溶液搅拌破碎处理 12 h。8 000 r/min 离心处理 10 min,取上清液检测 N-G7 质量分数。糖组分及含量测定通过高效液相色谱仪和示差折光检测器联用测定,色谱条件如下:色谱柱为 NH₂ 柱 (Agilent, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相配比为 V(乙腈):V(水)=65:35;流量 1 mL/min;进样量 10 μL;柱温 30 ℃。

1.3.3 体外消化

1)模拟口腔消化 N-G7 参照 Stokes 等的方法进行人体唾液的收集^[10]。配制质量浓度为 20 mg/mL 的样品溶液。实验组加入 1 mL 唾液和 5 mL 样品溶液,阴性对照组加入 1 mL 唾液和 5 mL 去离子水,阳性对照组加入 5 mL 样品溶液和 1 mL 去离子水,于 37 ℃、120 r/min 摇床中反应,在 0.2 min 时取样,沸水浴灭酶 20 min。8 000 r/min 离心 10 min,取上清液检测 N-G7 质量分数。

2)模拟胃部消化 N-G7 模拟胃液(SGF)的配制参照 Minekus 等的方法^[11]。配制质量浓度为 20 mg/mL 的样品溶液。管 1 由 10 mL 样品溶液与 7.5 mL SGF、5 μL 的 0.3 mol/L 的 CaCl₂ 混合而成,用 0.2 mL 的 0.1 mol/L HCl 调节 pH 至 3,去离子水补足至 20 mL;管 2 样品溶液换成去离子水;管 3 由 10 mL 样品溶液与 10 mL 去离子水混匀;置于 37 ℃、120 r/min 水浴 2 h。分别在 0、0.5、1.0、2.0 h 取样,并立即置于沸水浴中灭酶 10 min。8 000 r/min 离心 10 min,取上清液检测 N-G7 质量分数。

3)模拟小肠消化 N-G7 及微球 模拟肠液(SIF)的配制参照 Minekus 等的方法^[11]。管 1 由 20 mL 样品溶液(20 mg/mL)与 11 mL SIF、2.5 mL 的体积分数 4%胆汁、5 mL 的 800 U/mL 胰酶、40 μL 的 0.3 mol/L CaCl₂ 混合,用 0.15 mL 的 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7,去离子水补足至 40 mL;管 2 样品溶液换成去离子水;管 3 由 20 mL 样品溶液与等体积去离子水混匀;置于 37 ℃、120 r/min 水浴 2 h。分别在 0、0.5、1.0、2.0 h 取样。N-G7 反应液取样后于沸水浴中灭酶 10 min,8 000 r/min 离心 10 min 后取上清液检测 N-G7 质量分数。微球消化后,用大量水清洗并干燥,柠檬酸钠溶液破碎处理,离心取上清液检测 N-G7 质量分数。

1.3.4 体外发酵

1)肠道菌群种子液的制备 挑选 3 位近 6 个月没有服用过抗生素类药物、健康饮食、无胃肠道病史的志愿者(两名女性和一名男性,年龄在 20~25 岁),收集新鲜的粪便并密封处理。以 1 g 混合粪便与 10 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)的比例混匀后,经过 4 层纱布过滤后备用,滤液为肠道菌群种子液。

2)模拟体外酵解 发酵培养基的配制参照黄超的方法^[12]。设置不含碳源的培养基为阴性对照组(Blank),以含质量分数 1%葡萄糖、菊粉和低聚果糖的培养基为阳性对照。样品组(N-G7 与质量分数 2%的 ALG-Ca)碳源添加量与阳性对照组一致。将 20 mL 的厌氧发酵培养基装入充 N₂ 的厌氧管中,用无菌注射器加入体积分数 10%的肠道菌群种子液。厌氧管放入厌氧培养盒内,内置厌氧产气袋和指示剂。置于 37 ℃恒温培养箱中于 120 r/min 发酵培养,0、6、12、24、36、48 h 取样测定。

3)发酵液的 pH、菌体含量及产气量测定 用 pH 计和分光光度计测定发酵液的 pH 和 OD₆₀₀。用无菌注射器插入厌氧罐的橡胶帽中测量发酵液产生的气体量。

4)发酵液的碳源消耗率 定时取发酵液离心后的上清液,通过苯酚-硫酸法测定阴性和阳性对照组中的总糖质量。1 mL 发酵液与 1 mL 质量分数 5%的苯酚摇匀,加入 5 mL 浓硫酸迅速摇匀,冷却 10 min 后于 30 ℃水浴反应 20 min,490 nm 波长下测吸光度。通过高效液相色谱测定发酵液中 N-G7 质量,通过破碎处理测定发酵液中包埋后的 N-G7 质量,发酵液中碳源的消耗率见式(2)。

$$I = \left(1 - \frac{N}{N_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中: I 为碳源消耗率,%; N_0 为添加至培养基的碳源质量,g; N 为发酵后发酵液中的剩余碳源质量,g。

5)发酵液的短链脂肪酸浓度测定 发酵液以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜,将 40 μL 质量分数 10%硫酸加入 1 mL 滤液中酸化,再加入 1.5 mL 乙醚萃取,离心取上清液。用无水硫酸钠除去多余水分,离心后将上清液转移至气相进样瓶中。采用气相色谱 0.32 mm×30 m RTX-WAX 毛细管柱和 FID 检测器,载气为 N₂,分流比为 2:1。升温程序为 50 ℃维持 3 min,以 6 ℃/min 升至

120 ℃,再以 10 ℃/min 升至 240 ℃,维持 3 min。设置检测器温度为 250 ℃,样品进样量为 1 μ L^[13]。

6)肠道菌群分析 取 0 h 的 Blank 组和发酵 48 h 的各样品组,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀置于-80 ℃冰箱内保存。所有样本送至生工生物工程(上海)有限公司进行 DNA 提取和肠道菌群分析,每个样本选择 16S rDNA 的 V3-V4 区进行扩增,通过 Illumina Miseq 平台进行高通量测序和物种分析,确定 N-G7 包埋前后对肠道菌群的影响。

1.4 数据处理

所有实验重复 3 次,以平均值 \pm 标准偏差计算。采用 Origin 8.0 进行曲线拟合和 SPSS 21.0 软件进行数据统计与分析。

2 结果与分析

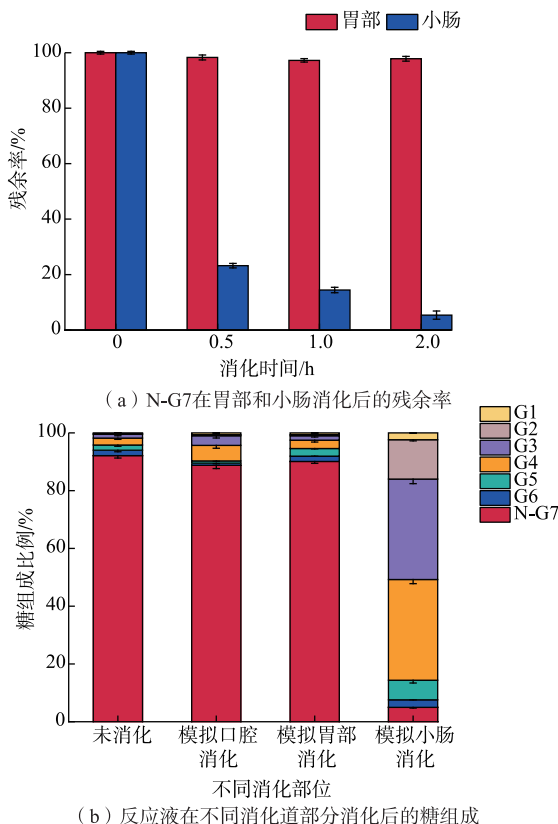
2.1 N-G7 的体外消化特征

与未经消化的 N-G7 相比,通过口腔和胃部消化后,反应液中的糖组成几乎不发生改变。唾液中的 α -淀粉酶在短时间内对 N-G7 进行了部分水解,N-G7 在消化液中的质量分数从 92.13%降至 88.79%。在低 pH 的胃部环境中,N-G7 并未发生降解,表明 N-G7 在强酸环境下仍具有 pH 稳定性。不同食品通过小肠的时间约为 2 h,只有 N-G7 对小肠液有一定的耐受性,能发挥其益生作用。然而在模拟小肠消化过程中,随时间延长,N-G7 的水解程度不断增加。如图 1(a)所示,消化 2 h 后,总糖中 N-G7 的质量分数从 92.13%下降至 4.97%。由图 1(b)可知,N-G7 经过胰酶水解后,主要转化为麦芽三糖(G3)与麦芽四糖(G4)。

2.2 N-G7 微球的包封率及模拟小肠消化特征

为形成缓慢发酵体系和避免 N-G7 在小肠中的过度降解,采用不同质量分数的海藻酸钙微球对其包埋,包封率见表 1。海藻酸钠的质量分数由 1%增加至 3%,包封率也呈上升趋势。质量分数为 2%的微球与质量分数 3%的微球相比,包封率从 85.77%升至 90.03%,增加程度较小,并且质量分数为 3%的海藻酸钠黏度较高,不易制备微球,因此后续以质量分数 2%的 ALG-Ca 进行微球的体外发酵研究。

海藻酸钙微球一定程度上保护了 N-G7 在小肠中不被消化,微球中 N-G7 的质量随小肠消化时间的延长而降低,这是因为与胃部的酸性环境相比,微球在肠环境等碱性条件下的溶胀程度更大^[14]。质



Gn(n 为 1~6)表示该物质由 n 个葡萄糖以 α -1,4 糖苷键组成。

图 1 N-G7 在不同消化部位的表现

Fig. 1 Presentation of N-G7 in different digestive tracts

表 1 模拟小肠消化中微球内 N-G7 的残余率变化

Table 1 Changes of N-G7 content in microspheres during simulated intestinal digestion

组别	包封率/%	消化时间/h	N-G7 残余率/%
质量分数 1% 的 ALG-Ca	67.12 \pm 1.47 ^a	0	100.00 \pm 0.39 ^a
		0.5	90.21 \pm 0.83 ^b
		1.0	85.23 \pm 1.23 ^b
		2.0	79.19 \pm 1.48 ^c
质量分数 2% 的 ALG-Ca	85.77 \pm 1.36 ^b	0	100.00 \pm 0.42 ^a
		0.5	95.84 \pm 0.84 ^a
		1.0	90.12 \pm 1.04 ^b
		2.0	86.07 \pm 1.07 ^b
质量分数 3% 的 ALG-Ca	90.03 \pm 1.03 ^c	0	100.00 \pm 0.51 ^a
		0.5	96.12 \pm 0.58 ^a
		1.0	93.43 \pm 0.87 ^a
		2.0	88.34 \pm 0.93 ^b

注:数值以 $\bar{x}\pm$ SD 表示,不同字母表示同组样品之间的差异显著($P<0.05$)。

量分数 1%的 ALG-Ca 在小肠消化液中反应 2 h 后,

仍含有约 80%的 N-G7,极大程度保留了 N-G7。海藻酸钠质量分数由 1%增加至 2%后,两者破碎后的 N-G7 质量存在显著差异,表明微球中海藻酸钠质量分数的增加对被包埋物质的保护能力更强。质量分数 3%的微球消化后 N-G7 残余量最多,但比质量分数 2%的 ALG-Ca 增加不显著。

2.3 体外酵解特征

2.3.1 pH 变化 肠道菌群消耗碳源会产生酸性的发酵产物,其中包括各种对人体有益的短链脂肪酸,因此发酵过程中 pH 的变化可表明反应进程。此外,SCFA 的低 pH 也会通过改善肠道微环境和抑制致病菌的生长来影响肠道菌群的组成^[15]。由图 2 可以看出,初始发酵液的 pH 均为微碱性,随着发酵的进行,发酵液的 pH 值不断降低。各样品的 pH 始终远低于空白组,这与发酵进程中 SCFA 的产量显著增加有关。发酵 6 h 后,Blank 组的 pH 从 8.48 略微降至 7.59,随后 6~48 h 内变化较小,结束发酵的 pH 为 7.38。质量分数 2%的 ALG-Ca 组 pH 从 8.49 变为 5.65,发酵 6~48 h 的 pH 稳步下降。而 N-G7 组和阳性对照组的 pH 在 6 h 内降低显著,之后维持在同一水平,均低于 ALG-Ca 的 pH。此外,小分子结构的物质更易于被肠道微生物利用^[16],产生酸性物质会降低 pH,因此在整个酵解过程中,葡萄糖组的 pH 水平最低。

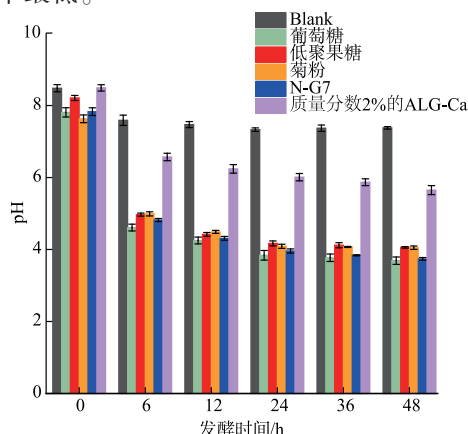


图 2 不同发酵时间各样品组的 pH 变化

Fig. 2 pH changes of each group at different fermentation times

2.3.2 菌体浓度变化 以发酵液在 600 nm 下的 OD 值表示菌体浓度变化,OD 值越大,菌体浓度越高。如图 3 所示,所有组别发酵液的菌体浓度在 6 h 内随发酵时间的延长迅速增大,因此 0~6 h 的肠道微生物处于对数生长期。随着发酵时间的延长,6~

48 h 的 OD₆₀₀ 变化趋于平缓,肠道菌群的数量逐渐稳定。与 pH 的变化趋势相似,葡萄糖组的菌体浓度增加最多,其次是 N-G7。即使 ALG-Ca 组的菌体浓度在不同发酵时间低于其他碳源处理组,但仍远高于 Blank 组。总的来说,肠道微生物对碳源的消耗是其不断生长的必要条件。

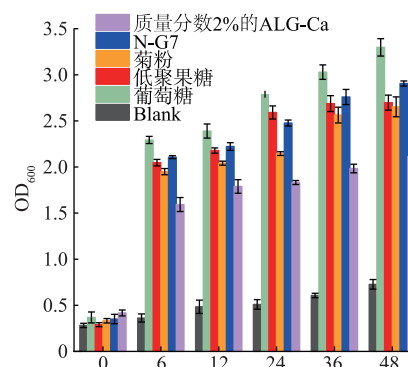


图 3 不同发酵时间各样品组的 OD₆₀₀

Fig. 3 OD₆₀₀ changes of each group at different fermentation times

2.3.3 产气量变化 在体外发酵过程中,不同样品肠道微生物产气量见图 4。FOS 在发酵前期产生了较多的气体,这与文献[17]的结果一致。N-G7 与 FOS 的变化趋势类似,长链菊粉在 6 h 的发酵过程中初期产气量较低,显著低于葡萄糖、FOS 和 N-G7,也表明其对腹胀、胀气有潜在的益生作用。随着发酵的进行,对照组与 IN、FOS 和 N-G7 组微生物的产气量都趋于稳定。而质量分数 2%的 ALG-Ca 中微生物在 0~6 h 内产气量最低,并且在整个发酵过程中持续产生气体。这证实了海藻酸钙微球包埋可以作为慢发酵体系使用,与 Kaur 等的研究结果相符^[18]。

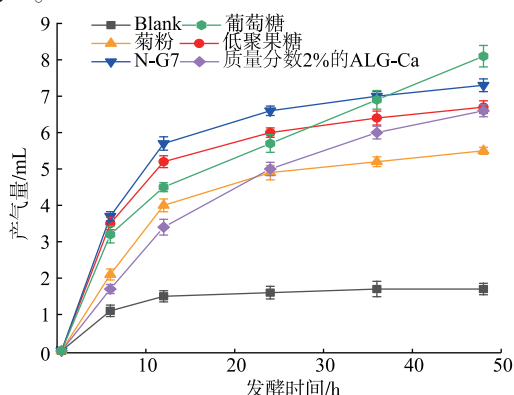


图 4 不同发酵时间各样品组的产气量变化

Fig. 4 Gas production changes of each group at different fermentation times

2.3.4 碳源消耗率变化 如图5所示,微生物利用糖组分的效率随发酵时间延长而升高,在发酵48 h时达到平衡,其中小分子葡萄糖的利用率最高,在发酵结束时,达到了84.24%。质量分数2%的ALG-Ca在酵解前24 h的消耗量明显低于FOS和IN,之后,质量分数对2% ALG-Ca的消耗量逐渐增加,与FOS的利用率接近。肠道菌群发酵利用碳源的能力受分子链长、单糖组成糖苷键类型及聚合度等影响^[19],因此碳源被微生物分解利用的程度有差异。

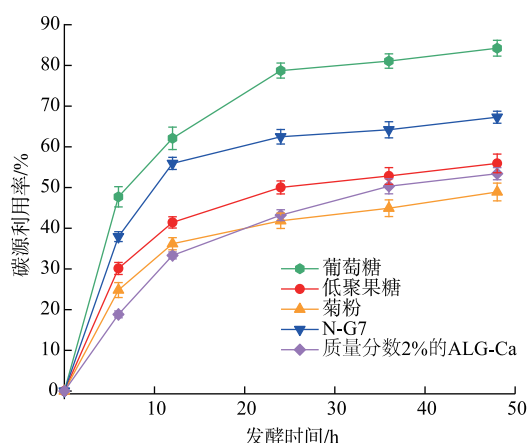


图5 不同发酵时间各样品组的碳源利用率变化

Fig. 5 Carbon source utilization changes of each group at different fermentation times

2.3.5 短链脂肪酸浓度变化 短链脂肪酸是肠道菌群发酵过程中的主要代谢产物,其中乙酸、丙酸和丁酸约占结肠产生SCFA的90%~95%,它们在肠道和肝脏代谢中发挥重要作用,从而影响宿主的整体健康^[20],酵解结束后的SCFA浓度见图6。乙酸和丙酸为主要发酵产物,经过体外发酵,各实验组的乙酸、丙酸及总SCFA浓度远高于Blank组,这可能是由于含有较多副杆菌属(*Parabacteroides*),其可产生乙酸和丙酸,用以提供能量和发挥免疫抑制作用^[21]。此外,质量分数2%的ALG-Ca产生的丁酸浓度显著高于其他5组,这可能是由于质量分数2%的ALG-Ca组中含有较多发酵底物,增加了肠道中丁酸盐的菌群,可增强抗炎效果。

比较表2中各样品组的SCFA变化速率可发现,阳性对照组和N-G7组的乙酸、丙酸及正丁酸的浓度在发酵0~24 h内急剧增加,在24~48 h趋于稳定或轻微增加。而质量分数2%的ALG-Ca中每种短链脂肪酸在不同发酵时间几乎都在显著增加,这一结果进一步说明被包埋后的N-G7可在整个发酵过

程都缓慢地影响肠道菌群环境,这与pH的变化趋势相吻合。

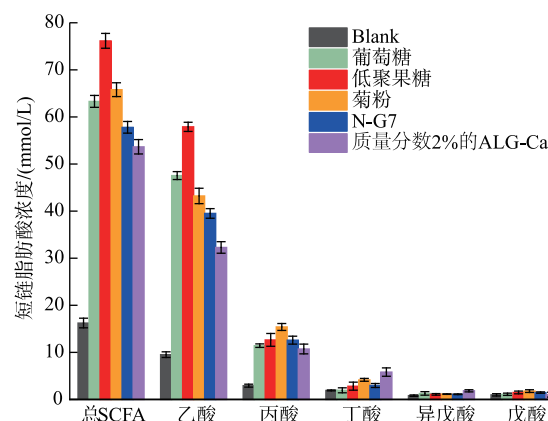


图6 不同发酵时间各样品组的短链脂肪酸浓度变化

Fig. 6 Concentration changes of SCFA in each group at different fermentation times

2.4 肠道菌群结构变化

2.4.1 Alpha多样性分析 通过对样品的Alpha多样性分析可以反映微生物群落的丰富度和多样性,采用Chao和Ace指标衡量物种的丰富度,Shannon和Simpson指标衡量样品的多样性^[22]。对照组初始发酵液与各样品组发酵48 h后的Alpha多样性统计结果见表3。其中Coverage的数值均为1,表明此次测序结果真实反映了各处理组的菌群生长情况。菊粉处理组的Chao与Ace指标与其他组别存在显著差异,物种丰富度降低,这可能是由于菊粉能抑制致病菌增殖,促进益生菌生长^[22]。结合Shannon和Simpson指标,各样品组与发酵前后的Blank组相比,显著降低了菌群的物种多样性。

2.4.2 肠道菌群相似度分析 图7分析了不同样品之间共有的和独有的OTU数目。5个组别中共有的OTU数目为78个,质量分数2%的ALG-Ca与Blank组之间共有的OTU数目为105个,比葡萄糖、菊粉及N-G7的组别更多,说明海藻酸钙微球包埋N-G7后更能维持肠道微生物的多样性。与Blank组相比,葡萄糖、菊粉及N-G7组的OTU数目显著低于对照组,表明体外发酵后肠道菌群确实发生了变化。

2.4.3 主成分分析 采用PCA来评估不同样品对肠道菌群的调节效果是否存在显著差异,结果见图8。PCoA1和PCoA2两个主成分因子的累积方差贡献率达到98.58%,证实其可以用来解释不同样品处理组的所有信息。在主成分分析中,图中距离越接近,表

表 2 不同发酵时间内各发酵液中短链脂肪酸浓度

Table 2 Concentrations of SCFA in fermentation solutions at different time points

短链脂肪酸种类	发酵时间/h	SCFAs 浓度/(mmol/L)					
		Blank	葡萄糖	低聚果糖	菊粉	N-G7	质量分数 2% 的 ALG-Ca
乙酸	0	0.89±0.02 ^{aA}	1.31±0.17 ^{aB}	1.42±0.17 ^{aB}	1.16±0.00 ^{aB}	1.03±0.12 ^{aB}	0.88±0.12 ^{aA}
	6	1.68±0.12 ^{bA}	10.53±1.21 ^{bC}	12.58±0.97 ^{bC}	8.91±0.60 ^{bC}	7.34±0.57 ^{bB}	5.36±0.52 ^{bB}
	24	3.28±0.15 ^{cA}	17.03±1.62 ^{cC}	20.79±1.36 ^{cC}	15.33±0.52 ^{cB}	13.86±0.60 ^{cB}	11.16±0.81 ^{cB}
	48	3.67±0.21 ^{cA}	18.08±0.98 ^{cC}	23.11±1.02 ^{cD}	17.82±0.55 ^{cC}	17.28±1.02 ^{dC}	14.62±0.79 ^{dB}
丙酸	0	0.10±0.00 ^{aA}	0.08±0.02 ^{aA}	0.05±0.01 ^{aA}	0.06±0.01 ^{aA}	0.05±0.01 ^{aA}	0.06±0.01 ^{aA}
	6	0.64±0.02 ^{bA}	2.51±0.28 ^{bB}	2.83±0.37 ^{bB}	3.82±0.41 ^{bC}	2.64±0.31 ^{bB}	2.59±0.21 ^{bB}
	24	0.98±0.10 ^{bA}	4.43±0.69 ^{bB}	4.65±1.23 ^{bB}	5.39±1.89 ^{cC}	4.13±1.05 ^{cB}	3.79±0.16 ^{cB}
	48	1.21±0.09 ^{cA}	4.71±0.63 ^{cB}	5.12±0.58 ^{cC}	6.13±1.53 ^{cC}	5.78±0.85 ^{dC}	4.47±0.12 ^{dB}
异丁酸	0	0.01±0.00 ^{aA}	0.02±0.00 ^{aA}	0.03±0.01 ^{aA}	0.01±0.00 ^{aA}	0.03±0.01 ^{aA}	0.03±0.00 ^{aA}
	6	0.01±0.00 ^{aA}	0.03±0.00 ^{aA}	0.05±0.02 ^{aA}	0.02±0.01 ^{aA}	0.03±0.01 ^{aA}	0.02±0.00 ^{aA}
	24	0.02±0.10 ^{aA}	0.05±0.01 ^{aB}	0.06±0.01 ^{aB}	0.02±0.01 ^{aA}	0.05±0.02 ^{aB}	0.04±0.01 ^{aA}
	48	0.01±0.00 ^{aA}	0.05±0.01 ^{aB}	0.08±0.03 ^{aC}	0.03±0.01 ^{aA}	0.04±0.02 ^{aA}	0.04±0.01 ^{aA}
正丁酸	0	0.31±0.02 ^{aA}	0.19±0.03 ^{aA}	0.28±0.07 ^{aA}	0.36±0.01 ^{aA}	0.27±0.06 ^{aA}	0.28±0.05 ^{aA}
	6	0.43±0.04 ^{aA}	0.44±0.10 ^{bA}	0.57±0.14 ^{bA}	0.79±0.06 ^{bB}	0.58±0.08 ^{bA}	1.02±0.12 ^{bC}
	24	0.55±0.04 ^{aA}	0.78±0.18 ^{cA}	0.83±0.18 ^{bB}	1.48±0.18 ^{cC}	0.89±0.11 ^{cB}	1.83±0.18 ^{cD}
	48	0.63±0.06 ^{bA}	0.66±0.07 ^{cA}	1.14±0.24 ^{bB}	1.54±0.06 ^{cC}	1.23±0.27 ^{dB}	2.67±0.26 ^{dD}
异戊酸	0	0.15±0.01 ^{aA}	0.13±0.02 ^{aA}	0.14±0.02 ^{aA}	0.15±0.01 ^{aA}	0.12±0.03 ^{aA}	0.18±0.02 ^{aA}
	6	0.19±0.02 ^{aA}	0.25±0.05 ^{bA}	0.22±0.04 ^{aA}	0.23±0.03 ^{aA}	0.20±0.04 ^{aA}	0.38±0.04 ^{bB}
	24	0.23±0.01 ^{aA}	0.39±0.08 ^{bB}	0.32±0.07 ^{bB}	0.35±0.03 ^{bB}	0.34±0.04 ^{bB}	0.65±0.08 ^{cC}
	48	0.25±0.02 ^{bA}	0.51±0.10 ^{cC}	0.40±0.10 ^{bB}	0.41±0.06 ^{bB}	0.44±0.06 ^{bB}	0.69±0.03 ^{dD}
正戊酸	0	0.19±0.02 ^{aB}	0.11±0.01 ^{aA}	0.15±0.02 ^{aA}	0.18±0.02 ^{aB}	0.14±0.05 ^{aA}	0.17±0.04 ^{aB}
	6	0.23±0.03 ^{aA}	0.28±0.03 ^{bA}	0.37±0.06 ^{bB}	0.43±0.04 ^{bC}	0.32±0.05 ^{bB}	0.28±0.06 ^{aA}
	24	0.28±0.03 ^{aA}	0.38±0.06 ^{bA}	0.46±0.08 ^{cB}	0.55±0.03 ^{bC}	0.48±0.07 ^{bB}	0.36±0.06 ^{bA}
	48	0.29±0.03 ^{aA}	0.43±0.08 ^{cB}	0.51±0.12 ^{cC}	0.62±0.05 ^{dD}	0.53±0.10 ^{cC}	0.40±0.11 ^{bB}

注:数值以 $\bar{x}\pm\text{SD}$ 表示,小写字母表示同组样品间的差异显著($P < 0.05$),大写字母表示样品组间的差异显著($P < 0.05$)。

表 3 体外发酵后不同样品处理组的 Alpha 多样性

Table 3 Alpha diversity of different treatment groups after in vitro fermentation

组别	Chao	Shannon	Simpson	Ace	Coverage
Blank(发酵前)	143.64±14.32 ^a	3.03±0.13 ^d	0.11±0.01 ^c	143.80±12.84 ^b	1.00±0.00 ^a
Blank(发酵后)	148.02±12.38 ^a	1.77±0.04 ^c	0.33±0.01 ^b	154.57±18.93 ^b	1.00±0.00 ^a
葡萄糖	149.62±18.04 ^a	0.55±0.02 ^a	0.80±0.02 ^a	150.52±13.53 ^b	1.00±0.00 ^a
菊粉	117.12±15.01 ^b	0.49±0.03 ^a	0.88±0.02 ^a	109.13±8.48 ^a	1.00±0.00 ^a
N-G7	138.77±9.52 ^a	0.73±0.05 ^a	0.70±0.01 ^a	138.88±14.29 ^b	1.00±0.00 ^a
质量分数 2% 的 ALG-Ca	140.25±10.11 ^a	1.31±0.10 ^b	0.39±0.01 ^b	138.18±15.62 ^b	1.00±0.00 ^a

注:数值以 $\bar{x}\pm\text{SD}$ 表示,不同字母表示不同样品组之间的差异显著($P < 0.05$)。

明两者的菌群组成越相似^[23]。很明显,不同底物对粪便菌群具有不同的调节作用,质量分数 2% 的 ALG-Ca 组与 Blank 组的 0 h 和发酵 48 h 相互分离,并且

与另外 3 组相距甚远,说明它们之间的菌群结构存在显著差异。而葡萄糖、菊粉及 N-G7 紧密地聚在一起,表明三者之间的菌群组成相似。

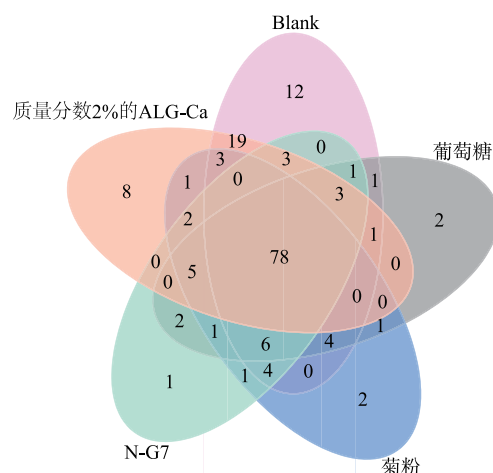


图7 不同样品体外发酵后对肠道菌群 OTU 数目的 Venn 分析

Fig. 7 Venn analysis of different samples on OTU number of intestinal microbiota after *in vitro* fermentation

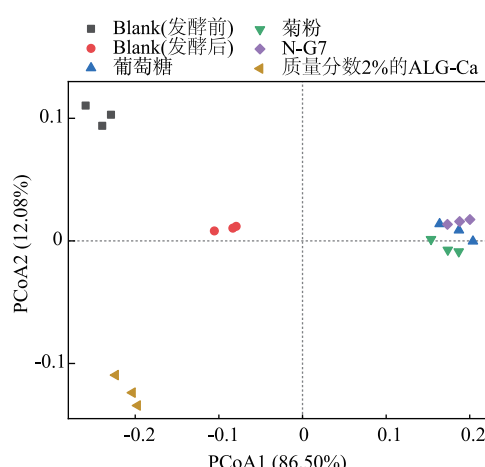


图8 不同样品体外发酵后肠道菌群的 PCoA 分析

Fig. 8 PCoA analysis of intestinal microbiota of different samples after *in vitro* fermentation

2.4.4 不同水平上的肠道菌群分析 通过高通量测序评价葡萄糖、菊粉、N-G7 与质量分数 2% 的 ALG-Ca 对粪便发酵过程中肠道微生物组成的影响。门水平上微生物组成的变化结果见图 9(a)。与 Blank 组相比,发酵 48 h 后葡萄糖、菊粉、N-G7 与质量分数 2% 的 ALG-Ca 处理组的变形菌门 (Proteobacteria) 的丰度显著降低,表明处理组可以抑制致病菌的生长^[24]。此外,处理组的拟杆菌门 (Bacteroides) 的丰度显著增加,厚壁菌门 (Firmicutes) 的丰度也发生了变化,因此两者的比值

F/B 也存在显著差异。由于拟杆菌门和厚壁菌门的细菌代谢效率不同,所以 F/B 值与肥胖有一定的相关性^[25]。结果显示,质量分数 2% 的 ALG-Ca 组的 F/B 值显著降低,说明质量分数 2% 的 ALG-Ca 可能有益于肥胖人群。葡萄糖、菊粉及 N-G7 处理组的放线菌门 (Actinobacteria) 丰度显著增加,研究证明 Actinobacteria 对上皮细胞表面的发育和维持稳态具有重要作用^[26]。

各处理组在属水平上的肠道菌群丰度结果见图 9 (b)。*Escherichia_shigella*、*Bacteroides*、*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Parabacteroides*、*Bifidobacterium* 等为优势菌种。与酵解 48 h 后的 Blank 组对比,各处理组中大肠杆菌-志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*) 的生长受到显著抑制,拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的丰度显著增加。此外,乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 是典型的肠道益生菌,对调节肠道健康有显著影响^[27-28]。肠道菌群发酵葡萄糖、菊粉与 N-G7 后, *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 为高丰度菌群,说明这 3 种碳源对肠道微生物平衡发挥了重要作用。*Parabacteroides* 属于拟杆菌门,主要代谢产物为乙酸和琥珀酸,帮助抵御炎症发生。以上结果说明,各处理组都可以有效提高肠道菌群中有益菌的丰度,对肠道健康有保护作用。

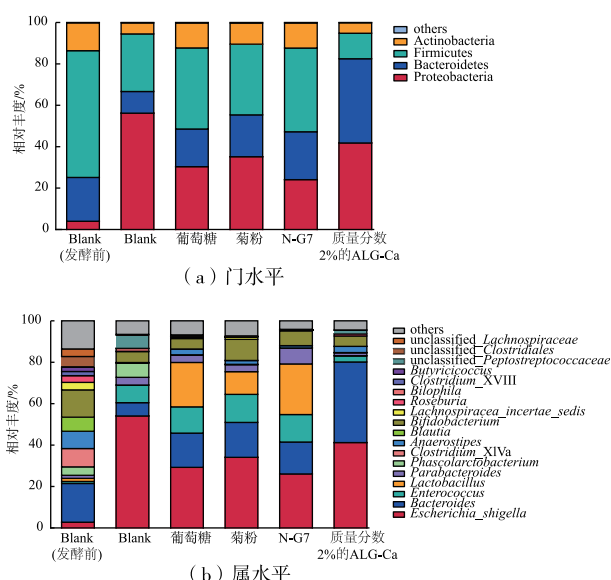


图9 体外发酵后不同水平的肠道菌群组成

Fig. 9 Composition of intestinal microbiota at different levels after *in vitro* fermentation

3 结 语

通过对海藻糖基麦芽五糖及其微球进行体外消化,观察不同时间点的 N-G7 残余量及糖组成变化,检测 N-G7 及微球在酵解过程中不同指标的变化趋势,为进一步探讨其生物活性及应用提供理论依据。结果表明,N-G7 在口腔和低酸性的胃部环境中几乎不被水解,在小肠部位停留 2 h 后 N-G7 的水解率骤增,达到了 82.70%。采用海藻酸钙对其进行包埋,形成的微球保留约 80% 以上的 N-G7 到达结肠。N-G7 在发酵过程中的 pH 和 OD₆₀₀ 与阳性对

照组(葡萄糖、低聚果糖和菊粉)相近,发酵终点时 pH 为 3.74。利用 N-G7 微球发酵产生的酸性产物质量和菌体生长速率低于阳性对照组,而产气量随发酵时间增加缓慢增加,48 h 时的产气量为 6.6 mL,低于低聚果糖。碳源的消耗和 SCFA 的变化也证明 N-G7 微球在酵解过程中持续发挥作用。高通量测序结果表明 N-G7 与葡萄糖、菊粉处理后的肠道菌群组成相似,而 N-G7 微球更能维持肠道菌群的多样性,增加 *Bacteroides*、*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 等常见益生菌的相对丰度对维持肠道菌群平衡、保护肠道健康有重要作用。

参考文献:

- [1] CHEN C, HUANG Q, FU X, et al. *In vitro* fermentation of mulberry fruit polysaccharides by human fecal inocula and impact on microbiota[J]. **Food & Function**, 2016, 7(11): 4637-4643.
- [2] FU Y S, ZHANG J N, CHEN K N, et al. An *in vitro* fermentation study on the effects of *Dendrobium officinale* polysaccharides on human intestinal microbiota from fecal microbiota transplantation donors[J]. **Journal of Functional Foods**, 2019, 53: 44-53.
- [3] MIYAMOTO J, WATANABE K, TAIRA S, et al. Barley β -glucan improves metabolic condition via short-chain fatty acids produced by gut microbial fermentation in high fat diet fed mice[J]. **PLoS One**, 2018, 13(4): e0196579.
- [4] GULLÓN B, GULLÓN P, TAVARIA F, et al. *In vitro* assessment of the prebiotic potential of aloe vera mucilage and its impact on the human microbiota[J]. **Food & Function**, 2015, 6(2): 525-531.
- [5] FLINT H J, BAYER E A, RINCON M T, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis[J]. **Nature Reviews: Microbiology**, 2008, 6(2): 121-131.
- [6] ZHENG L H, JIANG B, CHEN J J, et al. Efficient biotransformation and synergetic mechanism of dual-enzyme cascade reaction in nonreducing maltoheptaose synthesis[J]. **Food Bioscience**, 2021, 41: 101066.
- [7] VENKATACHALAM M, KUSHNICK M R, ZHANG G Y, et al. Starch-entrapped biopolymer microspheres as a novel approach to vary blood glucose profiles[J]. **Journal of the American College of Nutrition**, 2009, 28(5): 583-590.
- [8] ROSE D J, VENEMA K, KESHAVARZIAN A, et al. Starch-entrapped microspheres show a beneficial fermentation profile and decrease in potentially harmful bacteria during *in vitro* fermentation in faecal microbiota obtained from patients with inflammatory bowel disease[J]. **The British Journal of Nutrition**, 2010, 103(10): 1514-1524.
- [9] ROSE D J, KESHAVARZIAN A, PATTERSON J A, et al. Starch-entrapped microspheres extend *in vitro* fecal fermentation, increase butyrate production, and influence microbiota pattern[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2009, 53(1): 121-130.
- [10] STOKES J R, DAVIES G A. Viscoelasticity of human whole saliva collected after acid and mechanical stimulation [J]. **Biorheology**, 2007, 44(3): 141-160.
- [11] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus[J]. **Food & Function**, 2014, 5(6): 1113-1124.
- [12] 黄超. 水溶性(1-3)(1-6)- α -D-葡聚糖的结构与性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [13] 甄远航. 抗性糊精的分离纯化及其在面制品中的应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [14] GEORGE M, ABRAHAM T E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review[J]. **Journal of Controlled Release**, 2006, 114(1): 1-14.
- [15] ZEYNEB H, PEI H R, CAO X L, et al. *In vitro* study of the effect of quinoa and quinoa polysaccharides on human gut microbiota [J]. **Food Science & Nutrition**, 2021, 9(10): 5735-5745.
- [16] GHODDUSI H B, GRANDISON M A, GRANDISON A S, et al. *In vitro* study on gas generation and prebiotic effects of some

- carbohydrates and their mixtures[J]. *Anaerobe*, 2007, 13(5/6):193-199.
- [17] HERNOT D C, BOILEAU T W, BAUER L L, et al. *In vitro* fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(4):1354-1361.
- [18] KAUR A, ROSE D J, RUMPAGAPORN P, et al. *In vitro* batch fecal fermentation comparison of gas and short-chain fatty acid production using “slowly fermentable” dietary fibers[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(5):H137-H142.
- [19] HOLSCHEER H D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota[J]. *Gut Microbes*, 2017, 8(2):172-184.
- [20] RIOS-COVIAN D, RUAS-MADIEDO P, MARGOLLES A, et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:185-196.
- [21] 白茹玉. 羧甲基壳聚糖—没食子酸接枝共聚物的抗氧化、体外模拟消化和发酵特性研究[D]. 扬州:扬州大学, 2020.
- [22] ZHOU W T, YAN Y M, MI J, et al. Simulated digestion and fermentation *in vitro* by human gut microbiota of polysaccharides from bee collected pollen of Chinese wolfberry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(4):898-907.
- [23] XU J J, WANG R Y, ZHANG H T, et al. *In vitro* assessment of prebiotic properties of oligosaccharides derived from four microbial polysaccharides[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 147:111544.
- [24] 张智, 包智影, 孙家佳, 等. 发酵黄精多糖对肥胖小鼠肠道菌群的影响[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2021, 49(3):95-105.
- ZHANG Z, BAO Z Y, SUN J J, et al. Effect of fermented *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on intestinal flora in obese mice [J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2021, 49(3):95-105. (in Chinese)
- [25] MILLION M, LAGIER J C, YAHAV D, et al. Gut bacterial microbiota and obesity[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013, 19(4):305-313.
- [26] BARCZYNSKA R, SLIZEWSKA K, LITWIN M, et al. Effects of dietary fiber preparations made from maize starch on the growth and activity of selected bacteria from the Firmicutes, Bacteroidetes, and *Actinobacteria* phyla in fecal samples from obese children[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2016, 63(2):261-266.
- [27] 杨晰茗, 徐红艳, 刘已齐, 等. 食用菌多糖调节炎症性肠病研究进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(9):211-217.
- YANG X M, XU H Y, LIU S Q, et al. Recent progress on regulation of inflammatory bowel disease by polysaccharides from edible fungi[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(9):211-217. (in Chinese)
- [28] 姬妍茹, 张正海, 杨庆丽, 等. 黑菊芋多糖的润肠通便和调节肠道菌群作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(7):33-39.
- JI Y R, ZHANG Z H, YANG Q L, et al. Laxative effect of black jerusalem artichoke polysaccharide and its regulatory effect on intestinal flora[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(7):33-39. (in Chinese)