

酶法制备瓜尔胶水解物的体外酵解特性分析

王金梦¹,孙春晓¹,吴勃^{1,2},王云龙²,丁文涛^{1,3},郭庆彬^{1,3*},王昌禄^{1,3*}

(1. 天津科技大学 食品科学与工程学院,天津 300457;2. 杭州保安康生物技术有限公司,浙江 杭州 310014;3. 天津科技大学 省部共建食品营养与安全国家重点实验室,天津 300457)

摘要: 为研究不同分子量的瓜尔胶(guar gum,GG)水解物对肠道菌群的影响,以瓜尔胶为原料,通过酶解法制备3种不同分子量的瓜尔胶水解物(guar gum hydrolysate,GGH),其分子量分别为32.41 kDa(GGH-1)、10.15 kDa(GGH-2)和5.89 kDa(GGH-3),采用猪结肠消化物构建体外酵解模型,研究GG及其水解产物的体外酵解特性。结果表明:在酵解过程中,GG和3种GGH的分子量逐渐降低,总糖含量显著降低,还原糖含量先增后减。酵解体系的pH值均显著降低($P<0.05$),GGH-1显著促进总短链脂肪酸、乙酸、丁酸的生成,GGH-3显著促进丙酸的生成。GG和不同分子量的GGH均可以提高乳杆菌属和梭菌属的相对丰度,抑制链球菌属的增长,其中GGH-3对肠道菌群组成的影响最为显著。

关键词: 瓜尔胶;瓜尔胶水解物;体外酵解;短链脂肪酸;肠道菌群

In vitro Fermentation Characteristics of Guar Gum Hydrolysate Prepared by Enzymatic Method

WANG Jimeng¹, SUN Chunxiao¹, WU Bo^{1,2}, WANG Yunlong², DING Wentao^{1,3},
GUO Qingbin^{1,3*}, WANG Changlu^{1,3*}

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Hangzhou Biocom Biotech Co., Ltd., Hangzhou 310014, Zhejiang, China; 3. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To investigate the effects of guar gum (GG) hydrolysates with different molecular weights on the intestinal microbiota, three GG hydrolysates (GGHs) with molecular weights of 32.41 kDa (GGH-1), 10.15 kDa (GGH-2), and 5.89 kDa (GGH-3) were prepared by enzymolysis approach, respectively. Digests in porcine colon were used to construct an *in vitro* fermentation model, and the *in vitro* fermentation characteristics of GG and its hydrolysis products were studied. The results showed that during the fermentation process, the molecular weight of GG and the three GGHs gradually decreased; the total sugar content decreased significantly, and the reducing sugar content first increased and then decreased. The pH of the fermentation systems all significantly decreased ($P<0.05$), and GGH-1 significantly promoted the production of total short-chain fatty acids, acetic acid, and butyric acid, and GGH-3 significantly promoted the production of propionic acid. GG and GGH with different molecular weights increased the relative abundance of *Lactobacillus* spp. and *Clostridium* spp. and inhibited the growth of *Streptococcus* spp., GGH-3 had the most significant effect on the composition of intestinal microbiota.

Key words: guar gum; guar gum hydrolysate; *in vitro* fermentation; short chain fatty acids; intestinal microbiota

引文格式:

王金梦,孙春晓,吴勃,等.酶法制备瓜尔胶水解物的体外酵解特性分析[J].食品研究与开发,2024,45(6):90-98.

WANG Jimeng, SUN Chunxiao, WU Bo, et al. *In vitro* Fermentation Characteristics of Guar Gum Hydrolysate Prepared by Enzymatic Method[J]. Food Research and Development, 2024, 45(6): 90-98.

作者简介:王金梦(1998—),女(汉),硕士研究生,研究方向:食品营养机理与功能评价。

*通信作者:郭庆彬(1983—),男(汉),教授,研究方向:食品科学与工程;王昌禄(1960—),男(汉),教授,研究方向:食品生物技术。

瓜尔胶(guar gum, GG),又名瓜尔豆胶,是一类天然的半乳糖聚糖。瓜尔胶主链的甘露糖通过 β -(1,4-)糖苷键连接,侧链的半乳糖通过 α -(1,6-)糖苷键连接在主链上,甘露糖和半乳糖的摩尔比约为2:1。瓜尔胶的平均分子量为250~5 000 kDa,可用作食品添加剂、药物载体、饲料黏合剂等。然而,将高分子量的天然瓜尔胶添加到动物饲料中,可引起某些单胃动物的不良反应,这与胃肠中食糜黏度增加有关,限制了其在饲料工业中的应用^[1]。因此,需要对瓜尔胶进行降解改性,提高实用价值。

瓜尔胶的降解改性主要有物理法、化学法和酶法3种。物理法主要有热处理^[2]、微波^[3]、辐照^[4]和超声降解^[5]等方法。物理法对降解产物的成分和性质的影响较小,但难以控制产物的聚合度,不能彻底降解,易造成原料浪费。化学法主要包括氧化降解法和酸降解法^[6]。氧化降解法多采用氧化剂,如过氧化氢、过硫酸钾等进行氧化降解。酸降解法通常采用硫酸、盐酸等强酸进行降解。降解过程中加入的试剂可能在产物中残留,对产物的化学成分造成影响。酶法是指通过酶处理瓜尔胶,得到分子量较低的酶解产物,通常采用 β -甘露聚糖酶对瓜尔胶进行降解,使主链的 β -(1,4-)糖苷键断裂,得到瓜尔胶水解物(guar gum hydrolysate, GGH)。与天然GG相比,GGH的链长缩短,分子量和黏度大大降低,可以作为膳食纤维加以利用。与物理和化学方法相比,酶法反应条件温和、产物结构可控,且高效、特异性强,能耗低、无污染,是最常用的降解GG的方法。

多糖的酵解特性与其分子量、溶解度和单糖组成等性质有关。目前,关于分子量和酵解特性的研究报道相对较多。魔芋甘露聚糖经 β -甘露聚糖酶降解后,显著提高了小鼠结肠内的短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)浓度,可能是较低分子量的魔芋甘露聚糖更易被结肠微生物酵解^[7]。Ho等^[8]通过研究不同聚合度的低聚木糖和多聚木糖的体外酵解特性发现,低聚合度的低聚木糖/多聚木糖更能促进有机酸的产生和双歧杆菌的生长。

本研究以GG为原料,通过酶解法制备3种不同分子量的GGH,采用猪结肠消化物构建体外酵解模型,评价GG和GGH的酵解特性,探讨分子量对GGH体外酵解特性的影响。通过细菌16S rDNA扩增子测序分析技术,评估GG和不同分子量的GGH在酵解过程中对肠道菌群组成和结构的影响,以期为GGH的研究和应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

瓜尔胶:北京瓜尔润科技有限公司; β -甘露聚糖酶

(酶A, 187.209 9 IU/g):杭州保安康生物技术有限公司; β -甘露聚糖酶(酶B, 117.1032 IU/g):奕农生物科技有限公司;猪结肠消化物:天津农博养猪场。

1.1.2 试剂

乙醇、碳酸钠、氯化钠、硫酸铵、磷酸氢二钾、氯化钙、硫酸镁、硫酸亚铁、硫酸锰、硫酸锌:天津市江天化工试剂公司;3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂、氯化钴、 V_{B_1} 、 V_{B_2} 、 V_{B_6} 、烟酰胺、泛酸钙、对氨基苯甲酸、 V_H 、 $V_{B_{12}}$ 、叶酸、L-盐酸半胱氨酸、刃天青:北京索莱宝科技有限公司;硫酸、盐酸:天津市化学试剂一厂;硝酸钠:天津市大茂化学试剂厂;甘露糖、脂肪酸标品、2-乙基丁酸:美国Sigma公司。除甘露糖纯度为优级纯外,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

磁力搅拌器(LP Vortex Mixer):美国赛默飞世尔科技有限公司;傅里叶红外光谱仪(IS50):广州尼高利科学仪器有限公司;示差高效液相色谱仪(LC-20A)、热脱附气相色谱仪(GC2010 Plus):日本岛津公司;摇床(ZWY-103B):上海智城分析仪器制造有限公司;快速冷冻干燥机(Alpha 2-4 LD plus):德国CHRIST公司;冷冻离心机(Avanti J-26 XP):北京吉艾姆科技有限公司;高压灭菌锅(LDZH-200KBS):上海申安医疗器械厂;厌氧培养箱(YOX-II):上海新苗医疗器械制造有限公司;pH计(PB-10):德国赛多利斯公司。

1.3 实验方法

1.3.1 GGH制备

将10 g瓜尔胶边搅拌边加入到100 mL预热至50℃、含有40 IU/g的 β -甘露聚糖酶溶液中,持续搅拌反应3 h,沸水浴15 min,灭酶活,离心(4 000 r/min, 20 min),分离沉淀和上清液,在上清液中加入3倍体积的无水乙醇,4℃静置12 h,离心(4 000 r/min, 20 min),分离沉淀和上清液,浓缩上清液,冻干,得到GGH。根据分子量大小将GGH分别命名为GGH-1(32.41 kDa)、GGH-2(10.15 kDa)和GGH-3(5.89 kDa),其中GGH-1为酶A处理得到的样品,GGH-2为酶A和酶B按照3:1体积比混合处理得到的样品,GGH-3为酶B处理得到的样品。

1.3.2 样品分子量测定

将GG配制成3 mg/mL的溶液,酶解得到的不同分子量的GGH配制成10 mg/mL的溶液,过0.22 μ m滤膜,采用示差高效液相色谱仪进行分子量测定。以不同分子量的葡聚糖为标准品,绘制标准曲线。色谱条件:色谱柱为Ultrahydrogel™ DP 120A column(分子量测定范围10~400 kDa)和Ultrahydrogel™ 500 column(分子量测定范围0.1~5 kDa)水溶性凝胶柱串联;保护柱为Ultrahydrogel™ DP guard column;柱温40℃;流动相为0.1 mol/L硝酸钠溶液;流速0.6 mL/min;进样量20 μ L。

1.3.3 猪结肠消化物的制备

新鲜的猪结肠消化物取自6只健康大猪供体,大猪在近6个月内未有抗生素治疗史。将收集到的猪结肠消化物等量混合,保存在-80℃冰箱待用。

1.3.4 厌氧培养基的配制

根据表1制备厌氧培养基。

表1 厌氧培养基的组成和用量

Table 1 Composition and dosage of anaerobic incubation medium

成分1		成分2	
名称	用量/mg	名称	用量/mg
Na ₂ CO ₃	4 000	V _{B₁}	2
NaCl	900	V _{B₂}	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	900	V _{B₆}	2
K ₂ HPO ₄	900	烟酰胺	2
CaCl ₂	50	泛酸钙	2
MgSO ₄	50	对氨基苯甲酸	0.1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20	V _H	0.05
MnSO ₄ ·H ₂ O	20	V _{B₁₂}	0.005
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	20	叶酸	0.05
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2	L-盐酸半胱氨酸	1 000
刃天青	1		

先将成分1溶于995 mL超纯水中,用5 mol/L盐酸调节pH值为6.8,将溶液转移至1 L棕色瓶中,超声除气泡。超声结束后,充入氮气,121℃灭菌20 min。再将成分2溶于5 mL超纯水中,过0.22 μm 无菌滤膜除菌,充入氮气。最后,在厌氧箱中将成分1和成分2溶液混合。

1.3.5 体外模拟肠道酵解

在体外酵解体系中,将GG及不同分子量的GGH样品、猪结肠消化物与厌氧培养基混合。GG及不同分子量的GGH样品作为碳源,浓度为1%(g/mL),猪结肠消化物浓度为10%(g/mL)。参考Ding等^[9]的方法进行实验,具体如下:在离心管中分别称取GG和不同分子量的GGH样品各0.06 g,加入6 mL厌氧培养基,溶解,获得样品溶液。在厌氧箱中,称取0.6 g猪结肠消化物于离心管中,加入样品溶液,并充分混匀。空白组(negative control, NC)只添加0.6 g猪结肠消化物和6 mL厌氧培养基,无碳源。

采用封口膜将离心管封口,装入厌氧袋,在37℃、250 r/min厌氧培养箱中发酵0、6、12、24、48 h,依次取样。发酵后的样品在11 000 r/min、4℃下离心20 min,分离沉淀和上清液。上清液过0.45 μm 无菌滤膜,储存于-80℃冰箱,用于后续pH值、总糖含量、还原糖含量、分子量、短链脂肪酸浓度等指标的测定,沉淀用于肠道菌群的测定。

1.3.6 酵解液分子量测定

酵解液过0.22 μm 滤膜后,采用示差高效液相色谱仪进行分子量测定。色谱条件同1.3.2。

1.3.7 酵解液糖含量测定

参考Yin等^[7]的方法,采用苯酚-硫酸法测定酵解液总糖含量。采用3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂盒测定酵解液还原糖含量。

1.3.8 酵解液pH值测定

取1~2 mL上清液于10 mL离心管中,采用pH计测定不同发酵时间酵解液的pH值。

1.3.9 短链脂肪酸浓度测定

参考Wang等^[10]的方法对酵解液进行处理,利用热脱附气相色谱仪对短链脂肪酸浓度进行测定。色谱条件:色谱柱为Nukol™ Fused Silica Capillary Column (60 cm×0.25 mm×0.25 μm);进样口温度200℃;火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID)温度250℃;H₂流速40 mL/min;空气流速400 mL/min;进样量1 μL。

1.3.10 酵解物肠道菌群检测

将GG和3种不同分子量的GGH的体外模拟肠道酵解液在11 000 r/min、4℃下离心20 min,得到菌体沉淀送检,进行16S rDNA宏基因组测序,进行肠道菌群分析。

1.4 数据处理与统计分析

所有实验均重复进行3次,数据以平均值±标准差表示。使用SPSS和Duncan方法,对数据进行方差分析和多重测试分析, $P<0.05$ 时表示处理的结果存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 GG和GGH的分子量

根据1.3.2的方法测定GGH和GG的分子量,结果如图1所示。

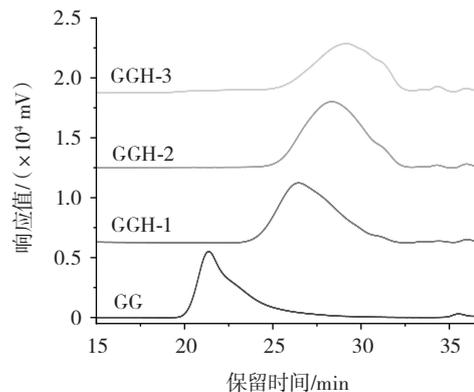


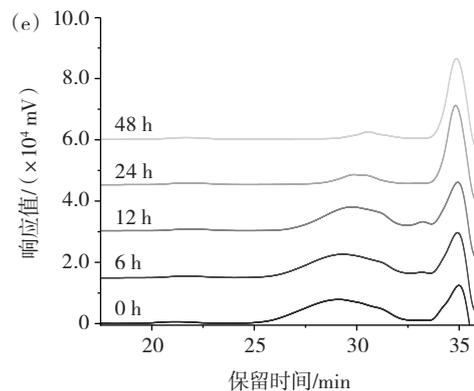
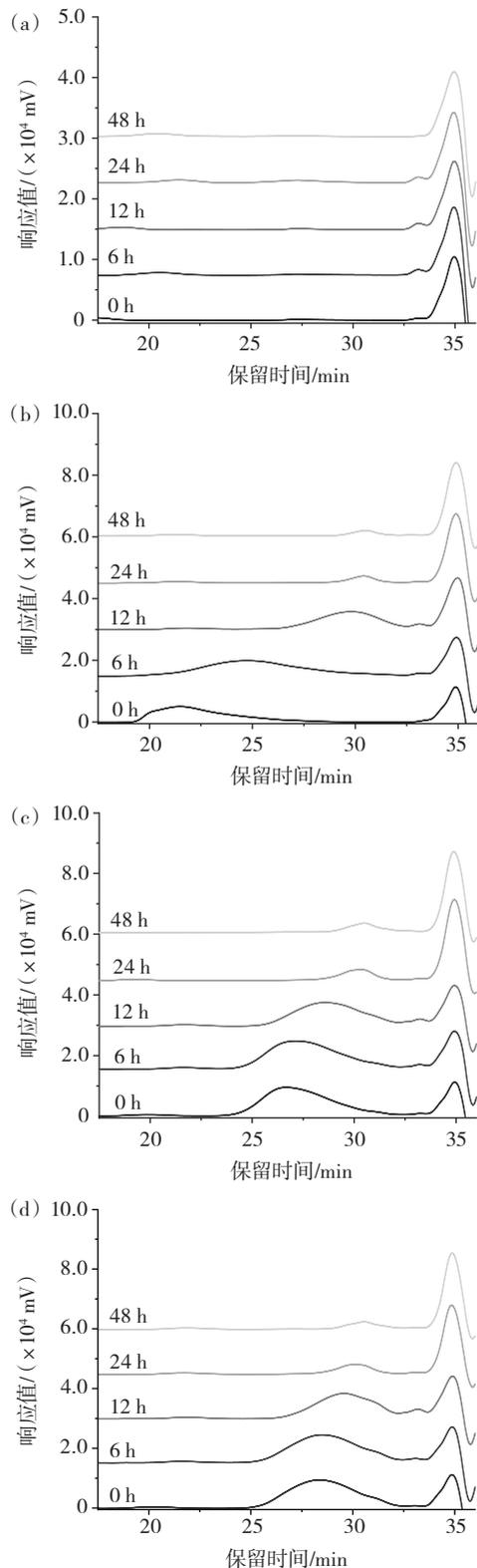
图1 GG和3种GGH的HPSEC谱图
Fig.1 HPSEC spectra of GG and three GGHs

由图1可知,通过GG和GGH的保留时间,计算得到GG的分子量为790.25 kDa,而GGH-1、GGH-2和GGH-3的分子量分别为32.41、10.15、5.89 kDa。与GG相比,GGH的分子量大幅降低,这是由于β-甘露聚糖

酶使瓜尔胶主链断裂,链长缩短,聚合度降低,与相关文献报道一致^[11]。

2.2 酵解过程中分子量的变化

对 GG 和 3 种不同分子量的 GGH 接种猪结肠消化物后的酵解特性进行了对比。酵解过程中样品的分子量变化如图 2 所示。



(a)空白组;(b)GG;(c)GGH-1;(d)GGH-2;(e)GGH-3。

图 2 酵解过程中分子量的变化

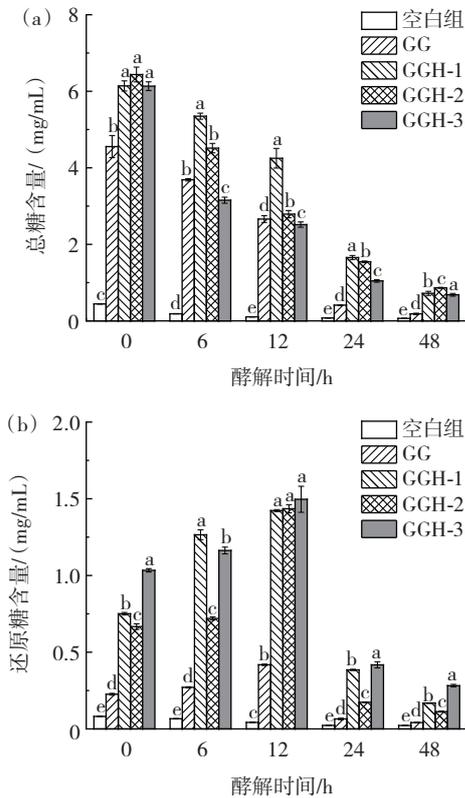
Fig.2 Changes of molecular weight during fermentation *in vitro*

图 2 中 34.9 min 处的峰来自于猪结肠消化物和厌氧培养基中的物质,出峰时间晚于样品,因此,不影响酵解过程中样品分子量的检测。由图 2(b)可知,酵解到 6 h 时,GG 的分子量由最初的 790.25 kDa 降至 96.8 kDa。3 种 GGH 也被快速发酵,到 12 h 时,其分子量分别为 8.5、4.7、4.2 kDa。酵解进行到 24 h 时,样品分子量进一步降低,且样品峰的比例持续降低,表明在体外模拟酵解过程中,肠道微生物可以持续利用 GG 和不同分子量的 GGH 作为碳源进行酵解。酵解 48 h 时,样品分子量变化很小,说明样品基本完成酵解。在体外酵解模型中,GG 和不同分子量的 GGH 可以被肠道菌群酵解利用,生成小分子的代谢产物。其他的多糖,如阿拉伯木聚糖^[12]、罗望子多糖^[13]、雪菊多糖^[14]等也表现出相同的趋势。多糖的酵解特性与溶解度、单糖组成等理化特性有关。溶解度高、聚合度低的多糖发酵速率高,主要在结肠近端发酵,而不溶性和高聚合度的多糖发酵速率较低,在结肠远端发酵^[15]。因此,为了延长发酵时间,需要进一步研究多糖的酵解特性,以确定最有利的理化特性。

2.3 酵解过程中糖含量的变化

肠道微生物可以产生糖苷水解酶来破坏碳水化合物中相应的糖苷键,并逐渐利用产生的寡糖,从而导致酵解体系中总糖含量降低,因此,可以通过糖含量的变化来确定碳水化合物的发酵程度。体外酵解过程中总糖和还原糖含量的变化如图 3 所示。

由图 3(a)可知,在酵解过程中,空白组总糖含量几乎无变化,而实验组的总糖含量随酵解时间延长均呈快速下降趋势。到发酵结束时,GG 由最初的(4.55±0.29) mg/mL 降至(0.18±0.02) mg/mL;GGH-1、GGH-2 和 GGH-3 则分别由(6.14±0.13)、(6.44±0.19)和(6.13±0.11) mg/mL 降至(0.72±0.05)、(0.86±0.01)和(0.68±0.03) mg/mL。总糖含量降低,说明 GG 和不同分子量的 GGH 可以作为碳源供肠道微生物酵解利用。



(a)总糖;(b)还原糖。不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

图3 酵解过程中糖含量的变化

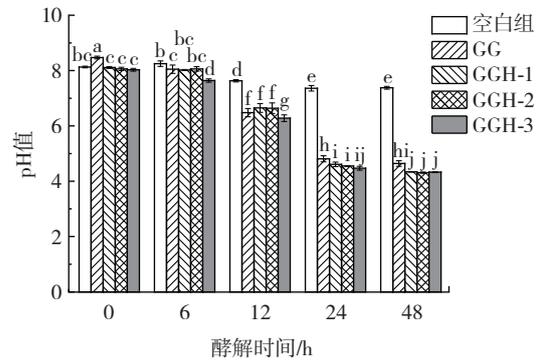
Fig.3 Changes of sugar content during fermentation *in vitro*

从图3(b)可知,在整个酵解过程中,除空白组的还原糖含量几乎无变化外,实验组的还原糖含量均呈现出先增后减的趋势,均在酵解12 h时达到峰值,说明微生物可以酵解利用GG和不同分子量的GGH,导致其分子中的糖苷键断裂,生成小分子糖,并进一步利用小分子糖,产生代谢物质。其中GGH-3在12 h时还原糖含量达到最大值(1.50 ± 0.08)mg/mL,与GGH-1、GGH-2接近,显著高于GG处理组($P<0.05$)。12~48 h内,实验组还原糖含量迅速降低,可能是由于样品本身含有的还原糖以及酵解过程中产生的还原糖被微生物利用。铁皮石斛多糖在体外酵解过程中糖含量也表现出类似的变化趋势,多糖不断被结肠微生物酵解,总糖含量逐渐降低,还原糖含量先增后减,说明多糖可以作为碳源被肠道微生物利用^[16]。

2.4 酵解过程中pH值的变化

pH值可以作为体外酵解实验中的重要指标,反映酵解体系中碳水化合物的利用和有机酸的产生情况。图4展示了酵解过程中pH值的变化。

由图4可知,各组初始pH值均在8.00以上。随着酵解的进行,空白组pH值略降低,从最初的 8.13 ± 0.03 降至 7.38 ± 0.05 。GG和不同分子量的GGH在0~24 h内,pH值显著降低($P<0.05$)。其中6~12 h内,pH值的降低速率最快,说明在6~12 h内微生物酵解GG和不



不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

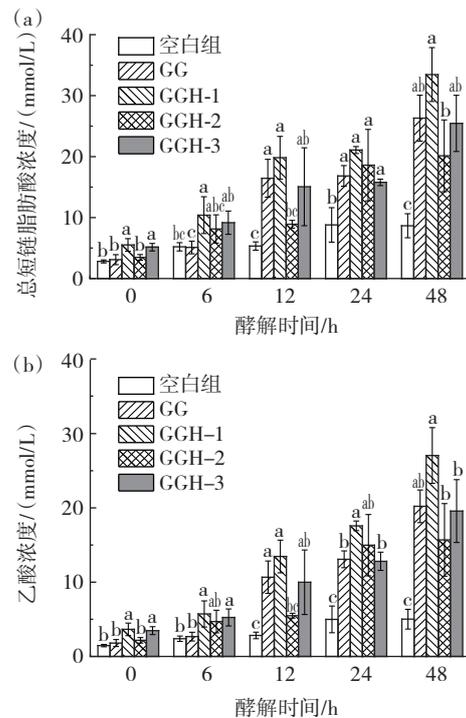
图4 酵解过程中pH值的变化

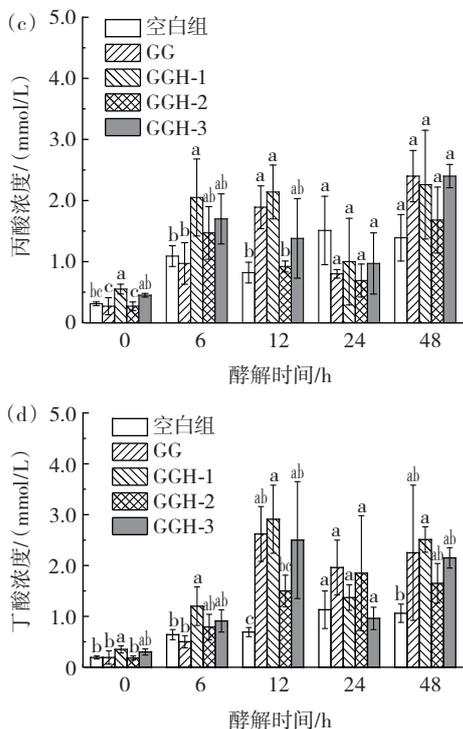
Fig.4 Changes of pH during fermentation *in vitro*

同分子量的GGH,产生短链脂肪酸的代谢活动最为活跃。酵解到48 h时,各实验组的pH值变化趋于平稳,说明GG和不同分子量的GGH基本被微生物完全酵解利用,产生短链脂肪酸的速度减缓,因此,pH值基本保持不变。同时,除发酵初始外,实验组pH值均显著低于空白组($P<0.05$),这与Paesani等^[12]研究结果一致。降低结肠和粪便的pH值,可能对结肠环境有益。酸性环境可以抑制某些致病菌的增殖,从而刺激有益细菌,如双歧杆菌、丁酸和乳酸发酵细菌的增殖^[15]。

2.5 酵解过程中SCFAs浓度的变化

SCFAs是微生物酵解多糖产生的主要产物,是重要的能量和信号分子^[17],多糖的理化特性与肠道菌群的酵解代谢有关,从而影响SCFAs的生成^[18]。图5展示了体外酵解过程中酵解液的总SCFAs、乙酸、丙酸和丁酸的浓度变化。





(a)总短链脂肪酸;(b)乙酸;(c)丙酸;(d)丁酸。不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

图5 酵解过程中 SCFAs 含量的变化

Fig.5 Changes of SCFAs content during fermentation *in vitro*

由图5可知,随着酵解时间的延长,各处理组的总SCFAs浓度均呈现出逐渐增长的趋势,说明微生物可以持续利用GG和不同分子量的GGH,产生低分子量的寡糖或单糖,进而生成SCFAs。酵解6h时,GGH-1的总SCFAs浓度最高,其次是GGH-3和GGH-2。继续酵解至12h,GG的总SCFAs浓度迅速升高,为(16.45±3.10) mmol/L,仅次于GGH-1。24h时,GGH-2的总SCFAs浓度从12h的(8.91±0.64) mmol/L增加至(18.60±5.86) mmol/L。酵解结束时,各处理组总SCFAs浓度均达到峰值。其中,GGH-1的浓度最高,为(33.46±4.42) mmol/L;随后依次是GG、GGH-3和GGH-2,其总SCFAs浓度分别是空白组的3.04、2.93倍和2.32倍。

在体外酵解过程中,乙酸是肠道微生物酵解利用碳水化合物产生的主要产物。GGH-1的乙酸浓度最高,在48h时达到峰值。在酵解过程中,实验组的乙酸浓度变化趋势与总SCFAs浓度变化趋势基本一致,Reichardt等^[19]研究也证实,半乳甘露聚糖在酵解过程中乙酸形成的动力学与总SCFAs相似。丙酸浓度也在48h时达到最大值,其中,GG和GGH-3的丙酸浓度较高。酵解到12h时,GG、GGH-1和GGH-3的丁酸浓度达到最大值。其中,GGH-1的产丁酸效果最好,丁酸浓度从发酵初始的(0.35±0.07) mmol/L增加到(2.91±0.67) mmol/L。

肠道微生物酵解利用多糖产生的SCFAs对宿主健康有益。在本研究中,产生的SCFAs以乙酸为主,乙酸不仅可以为心脏、大脑和肌肉供能,而且在糖异生、脂肪生成和胆固醇合成中也起着重要作用^[20]。丙酸可以增加葡萄糖摄取和脂肪生成,对脂肪组织有直接的有益作用^[21]。丁酸是肠上皮细胞主要的能量来源,在调节肠上皮细胞、T细胞增殖和肠道免疫应答中发挥重要作用^[22]。

2.6 肠道微生物的测定

2.6.1 Alpha多样性分析

由2.5的结果可知,添加GG和不同分子量的GGH后,酵解体系中的乙酸、丙酸、丁酸等代谢产物浓度增加,由此推测,在GG和不同分子量GGH的酵解过程中,肠道菌群发生了明显变化,因此,对酵解物进行肠道菌群检测 and 对比分析。图6为样品的稀释性曲线,表2为各组样本的Shannon指数。

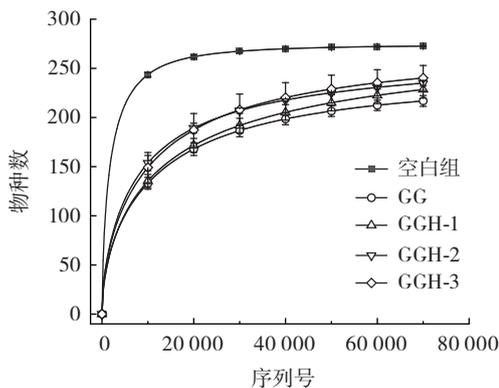


图6 各组样本的稀释性曲线

Fig.6 Rarefaction curve in various groups

表2 各组样本的Shannon指数统计

Table 2 Shannon index statistics of intestinal microbiota

样品名称	Shannon 指数
空白组	4.12±0.10 ^a
GG	3.03±0.04 ^e
GGH-1	3.14±0.04 ^e
GGH-2	3.46±0.09 ^b
GGH-3	3.44±0.10 ^b

注:不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

稀释性曲线可以反映数据的合理性和连续抽样条件下新特征出现的速率。从图6中可以看出,随着测序条数的不断增加,发现的物种逐渐增多,稀释性曲线逐渐趋于平缓,说明样品序列充分,测序数据量合理,能够反映样品的肠道菌群分布状况,可以进行数据分析。此外,Shannon指数与肠道菌群多样性呈正相关。在本研究中,空白组的Shannon指数显著高于实验组,可能是由于体外酵解模型缺乏宿主对肠道菌

群的调节以及对营养物质的吸收利用^[23],某些菌种在相对匮乏的营养条件下,在对碳源的竞争中处于劣势,因此,这些菌种的增殖受到影响,导致肠道菌群多样性降低。

2.6.2 主坐标分析(principal coordinates analysis,PCoA)

PCoA 可以反映主成分对样本差异的贡献值,或对群落样本的解释度。酵解 24 h 后的肠道菌群样本基于 bray-curtis 算法的 PCoA 如图 7 所示。

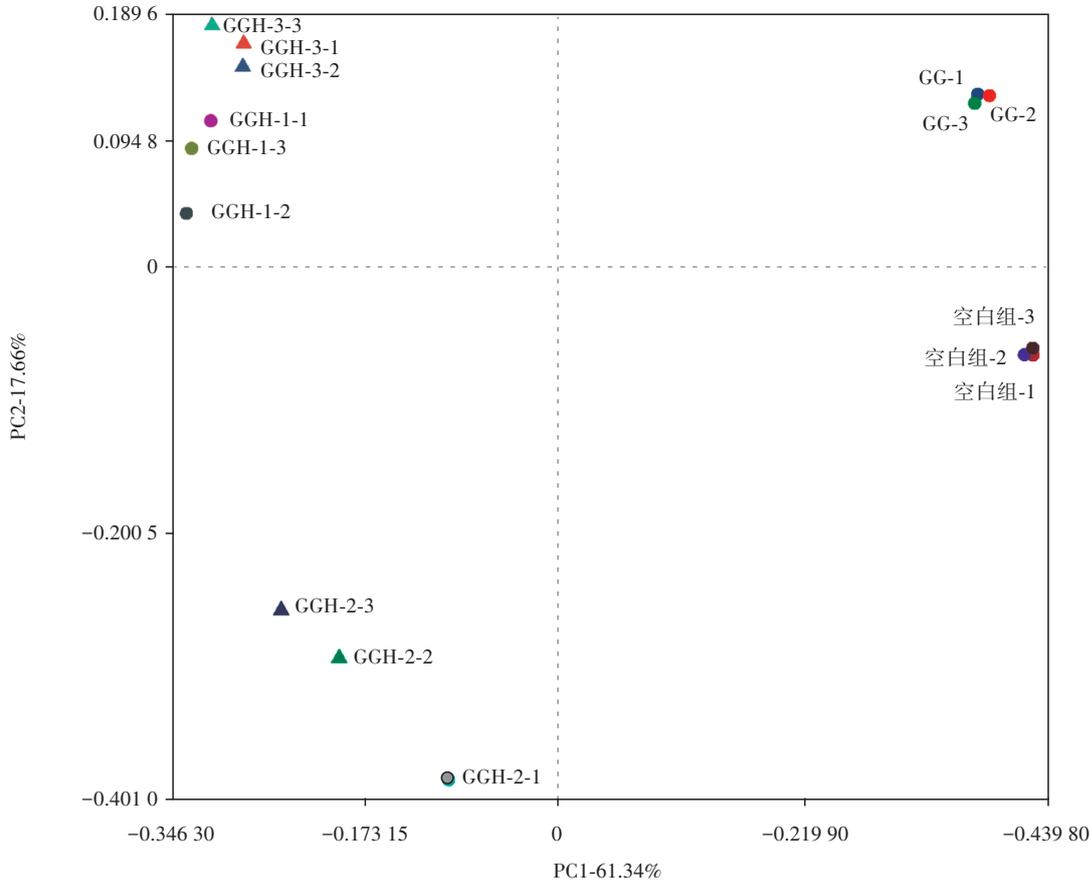


图 7 各组样本基于 bray-curtis 的主坐标分析

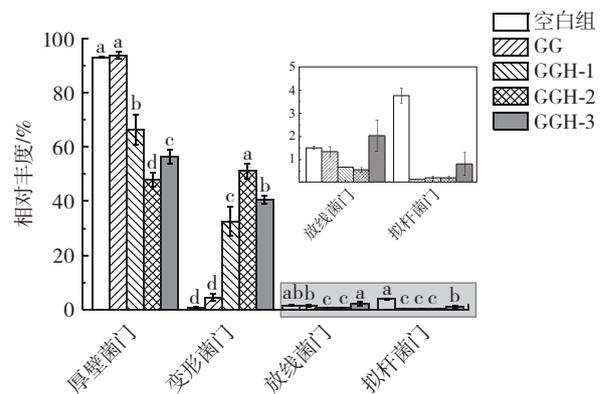
Fig.7 Principal co-ordinates analysis (PCoA) based on bray-curtis distance in various groups

由图 7 可知,各组内样本间距离较近,说明组内 3 个平行间微生物群落结构相似,平行效果较好。酵解 24 h 后,实验组与空白组距离较远,说明实验组与空白组的物种组成存在差异。而且,GG 和不同分子量的 GGH 对于微生物群落结构造成的影响是不同的。与 3 种 GGH 相比,GG 与空白组之间的距离更近,说明添加瓜尔胶的结肠消化物的菌落结构与空白组更接近,3 种不同分子量的 GGH 对菌落结构的影响更大。

2.6.3 门分类水平的物种分布

物种分布柱状图可以显示不同物种在肠道菌群中所占的比例,图 8 为 GG 和不同分子量的 GGH 酵解 24 h 时,对厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)的影响。

由图 8 中可知,各组样品中厚壁菌门和变形菌门的数量占比较高,在 90% 以上,其中,厚壁菌门的相对丰度最高,均在 40% 以上。与空白组相比,酵解 24 h



不同字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)。

图 8 GG 和 GGH 酵解 24 h 后门水平物种分布的变化

Fig.8 Changes of flora on the phylum level after 24 h fermentation of GG and GGH

后,不同分子量 GGH 处理组的厚壁菌门相对丰度减少($P < 0.05$),而变形菌门相对丰度大幅增加($P < 0.05$);

制链球菌属的增长,其中,GGH-3对肠道菌群的影响最为显著。后续可以进行体内实验,进一步验证其作为益生元进行开发利用的潜力。

参考文献:

- [1] RAMOS L R V, ROMANO L A, MONSERRAT J M, et al. Biological responses in mullet *Mugil liza* juveniles fed with guar gum supplemented diets[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, 205: 98-106.
- [2] MIYAZAWA T, FUNAZUKURI T. Noncatalytic hydrolysis of guar gum under hydrothermal conditions[J]. *Carbohydrate Research*, 2006, 341(7): 870-877.
- [3] SINGH V, TIWARI A. Hydrolytic fragmentation of seed gums under microwave irradiation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 44(2): 186-189.
- [4] GUPTA S, SHAH B, SANYAL B, et al. Role of initial apparent viscosity and moisture content on post irradiation rheological properties of guar gum[J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(7): 1785-1791.
- [5] ANSARI S A, MATRICARDI P, CENCETTI C, et al. Sonication-based improvement of the physicochemical properties of guar gum as a potential substrate for modified drug delivery systems[J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 985259.
- [6] 赵晓峰. 瓜尔胶的接枝改性和酶解法制备半乳甘露低聚糖的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2008.
ZHAO Xiaofeng. Study on grafting modification of guar gum and preparation of galacto-mannan-oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of β -mannanase[D]. Nanning: Guangxi University, 2008.
- [7] YIN J Y, MA L Y, XIE M Y, et al. Molecular properties and gut health benefits of enzyme-hydrolyzed konjac glucomannans[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 237: 116117.
- [8] HO A L, KOSIK O, LOVEGROVE A, et al. *In vitro* fermentability of xylo-oligosaccharide and xylo-polysaccharide fractions with different molecular weights by human faecal bacteria[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 179: 50-58.
- [9] DING H H, CUI S W, GOFF H D, et al. Short-chain fatty acid profiles from flaxseed dietary fibres after *in vitro* fermentation of pig colonic digesta: Structure-function relationship[J]. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2015, 6(2): 62-68.
- [10] WANG Y L, LI C R, SHAN Z X, et al. *In vitro* fermentability of soybean oligosaccharides from wastewater of tofu production[J]. *Polymers*, 2022, 14(9): 1704.
- [11] MUDGIL D, BARAK S, KHATKAR B S. Effect of enzymatic depolymerization on physicochemical and rheological properties of guar gum[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90(1): 224-228.
- [12] PAESANI C, SCIARINI L S, MOIRAGHI M, et al. Human colonic *in vitro* fermentation of water-soluble arabinoxylans from hard and soft wheat alters *Bifidobacterium* abundance and short-chain fatty acids concentration[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 134: 110253.
- [13] LI X, GUO R, WU X, et al. Dynamic digestion of tamarind seed polysaccharide: Indigestibility in gastrointestinal simulations and gut microbiota changes *in vitro*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 239: 116194.
- [14] WU D, YUAN Q, GUO H, et al. Dynamic changes of structural characteristics of snow chrysanthemum polysaccharides during *in vitro* digestion and fecal fermentation and related impacts on gut microbiota[J]. *Food Research International*, 2021, 141: 109888.
- [15] JHA R, BERROCOSO J F D. Dietary fiber and protein fermentation in the intestine of swine and their interactive effects on gut health and on the environment: A review[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 212: 18-26.
- [16] 张冠亚, 黄晓君, 聂少平, 等. 体外模拟3种消化液对铁皮石斛多糖的消化作用[J]. *食品科学*, 2014, 35(23): 279-283.
ZHANG Guanya, HUANG Xiaojun, NIE Shaoping, et al. Effects of three digestive juices on the *in vitro* digestion of *Denfrobium officinale* polysaccharide[J]. *Food Science*, 2014, 35(23): 279-283.
- [17] KOH A, VADDER F, KOVATCHEVA DATCHARY P, et al. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332-1345.
- [18] FU X, CAO C, REN B, et al. Structural characterization and *in vitro* fermentation of a novel polysaccharide from *Sargassum thunbergii* and its impact on gut microbiota[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 183: 230-239.
- [19] REICHARDT N, GNIECHWITZ D, STEINHART H, et al. Characterization of high molecular weight coffee fractions and their fermentation by human intestinal microbiota[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, 53(2): 287-299.
- [20] MATEOS A I, SUÁREZ G, REDONDO C A. Chemical structure and molecular weight influence the *in vitro* fermentability of polysaccharide extracts from the edible seaweeds *Himathalia elongata* and *Gigartina pistillata*[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83: 348-354.
- [21] 陈君诚. 知母多糖的结构鉴定、降血糖机制及其对肠道菌群的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
CHEN Juncheng. Structural identification and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Anemarrhena asphodeloides bunge* and their effect on gut microflora[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [22] HUANG F, LIU Y, ZHANG R, et al. Structural characterization and *in vitro* gastrointestinal digestion and fermentation of litchi polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 965-972.
- [23] 李煜. 魔芋葡甘聚糖的微波和酶法降解制备及其益生元活性[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
LI Yu. Study on the structure and probiotics activity of konjac glucomannan degraded by microwave and enzyme process[D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.
- [24] LU Y, PUTRA S D, Liu S. A novel non-dairy beverage from durian pulp fermented with selected probiotics and yeast[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 265: 1-8.
- [25] FU X, WEI X, XIAO M, et al. Properties of hydrolyzed guar gum fermented *in vitro* with pig fecal inocula and its favorable impacts on microbiota[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 237: 116116.
- [26] 李雄. 脆江蓠低聚糖的制备及其益生元活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
LI Xiong. Preparation of oligosaccharides from *Gracilaria chouae* and their prebiotic activities[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.