

苦荞蛋白对益生菌生长及其胆酸盐耐受能力的影响

周小理, 路远, 周一鸣, 肖瀛

(上海应用技术大学香料香精技术与工程学院, 上海 201418)

摘要: 本文以水溶性苦荞蛋白为研究对象, 通过其对益生菌(植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌)生长和益生菌胆酸盐耐受能力的影响, 以及体外模拟肠道环境中的益生菌生长实验, 探明了苦荞蛋白对益生菌生长及生存能力的影响。实验结果表明: 添加不同浓度的苦荞蛋白(1、3和5 mg/mL), 植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌培养液的光密度值(OD_{600})分别提高12.33%、25.84%、35.31%和15.37%、26.66%、30.57%; 同时, 苦荞蛋白使植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌对胆酸盐(胆酸钠(SC)、甘氨酸胆酸钠(SGC))的耐受作用显著提高($p < 0.05$), 其光密度值(OD_{600})分别增加了1.64、8.67和4.11、8.30倍。进一步的体外模拟培养实验表明苦荞蛋白对肠道中乳酸杆菌的生长作用显著提高($p < 0.05$)。综上所述, 苦荞蛋白可提高乳酸杆菌在胆酸盐中的生长并促进肠道中乳酸杆菌的生长, 为苦荞蛋白在食品中的应用提供了理论依据。

关键词: 蛋白质; 胆酸盐; 益生菌; 促生长因子; 厌氧培养; 发酵

文章编号: 1673-9078(2016)9-121-126

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.018

Effect of Tartary Buckwheat Protein on the Growth and Bile Salts Tolerance of Probiotics

ZHOU Xiao-li, LU Yuan, ZHOU Yi-ming, XIAO Ying

(School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

Abstract: The effect of water-soluble tartary buckwheat protein on the growth and bile salt tolerance of probiotics (*Lactobacillus plantarum* and *L. acidophilus*) was explored in an *in vitro* intestinal environment. The results demonstrated that the addition of different concentrations of tartary buckwheat protein (1, 3 and 5 mg/mL) increased the optical density value (OD_{600}) of *L. plantarum* culture broth by 12.33%, 25.84% and 35.31%, respectively, and that of *L. acidophilus* culture liquid by 15.37%, 26.66% and 30.57% respectively. In addition, tartary buckwheat protein increased the tolerance of *L. plantarum* and *L. acidophilus* to bile salts (sodium cholate and sodium glycycolate) significantly ($p < 0.05$). The OD_{600} values of *L. plantarum* culture broth increased 1.64 and 8.67 times and that of *L. acidophilus* culture broth increased 4.11 and 8.30 times in sodium cholate and sodium glycycolate, compared with that of control, respectively. Further *in vitro* culture experiments demonstrated that the effect of buckwheat protein significantly promoted the growth of intestinal *Lactobacilli* ($p < 0.05$). In conclusion, tartary buckwheat protein improves the growth of *Lactobacillus* in bile acid salts and the intestine, indicating scope for the application of tartary buckwheat protein in food.

Key words: proteins; bile salts; probiotics; growth promoting factor; anaerobic culture; fermentation

苦荞 (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) 是我国特有的荞麦栽培品种, 其营养成分全面, 含有丰富的蛋白质(高达10%~15%)、淀粉、纤维素、黄酮类物质等多种营养素以多种矿物质元素, 具有许多独特的优势

收稿日期: 2015-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371761); 国家自然科学基金青年基金项目(31501437); 上海市“化学工程与技术(香料香精技术与工程)”高原学科资助

作者简介: 周小理(1957-), 教授, 研究方向: 食品新资源深度开发与利用

通讯作者: 周一鸣(1981-), 博士, 讲师, 研究方向: 功能食品开发、食品加工与工艺

[1], 特别是苦荞蛋白质的高生物活性。苦荞蛋白质主要由谷蛋白、水溶性清蛋白和盐溶性球蛋白组成, 富含18种氨基酸, 其中人体所需的8种必需氨基酸组成合理、比例均衡, 其氨基酸组成符合WHO/FAO推荐标准[2]。近年来研究表明: 苦荞蛋白难以消化, 在肠道中起着较强的吸附胆酸盐作用, 且具有降低血液胆固醇、抑制脂肪蓄积、抑制大肠癌发生、抑制结石形成、增强人体免疫力以及抗衰老等多种生理功能[3]。目前, 对于苦荞蛋白研究主要集中在降低胆固醇、调节血脂等方面, 而苦荞蛋白促进益生菌生长、提升益生菌胆酸盐耐受能力的益生元作用, 则鲜有报道。

乳酸杆菌是一种重要的益生菌, 具有平衡肠道菌

群、刺激和促进肠道蠕动的的作用；所产生的乳酸及短链脂肪酸(乙酸等)，也具有抑制有害菌增殖的作用^[4]。张晓蕾等人研究表明：不被人体消化的食物成分(如：蛋白及其水解物等)可作为促进益生菌增殖的反应底物，具有益生元作用^[5]。胆酸盐则是人体和动物胆汁中由胆固醇衍生而来的、具有甾核结构的一类两性大分子，人体肠道中的浓度为1~10 mM，其对于肠道菌群尤其是乳酸杆菌的生存和生长具有抑制作用^[3,6]。研究表明：蛋白对于胆酸盐具有吸附作用，能够降低人体肠道中胆酸盐的含量^[7]。

荞麦蛋白的消化、吸收利用率较低，可到达肠道作为肠道菌群的发酵底物^[8]。本文以植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌为研究对象，针对苦荞蛋白促进益生菌生长、提升益生菌胆酸盐耐受能力进行了研究，并通过体外模拟肠道验证了苦荞蛋白对益生菌的增殖作用。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

黑丰1号苦荞购于山西省左云县；嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus* BD 0399)、植物乳杆菌(*L.plantarum* ST-III)购于上海光明乳业研发中心；SPF级C57BL/6小鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司；胆酸钠(SC)、脱氧胆酸钠(SDC)、牛黄胆酸钠(STC)、甘氨胆酸钠(SGC)、L-半胱氨酸盐酸盐、胆盐、维生素K1、氯高铁血红素、刃天青、胃蛋白酶(≥ 3000 u/g)、胰酶(≥ 4000 u/g)和猪胆汁粉均为BR级购于上海宝曼生物科技有限公司；葡萄糖、蛋白胨、酵母膏均为AR级购于国药集团化学试剂(上海)有限公司；MRS肉汤培养基、乳酸杆菌选择性琼脂购于青岛海博生物技术有限公司。

体外模拟基础培养基的制备(1 L)：参考MAO Sheng-yong等人^[9]的方法并略作修改。分别称取：2 g葡萄糖、2 g蛋白胨、2 g酵母膏、0.1 g NaCl、0.04 g K_2HPO_4 、0.04 g KH_2PO_4 、0.01 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.01 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 、2 g $NaHCO_3$ 、0.5 g L-半胱氨酸盐酸盐、0.5 g胆盐、10 mL维生素K₁、2 mL吐温-80和1 mL氯高铁血红素溶液，将以上成分溶解后调节基础培养基pH至7.0(± 0.05)，加入4 mL 0.025% (m/V)刃天青溶液并灭菌；取90 mL体外模拟基础培养基置于无菌发酵瓶中，在厌氧培养箱中37℃预还原过夜。

PBS：磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)，分别配制浓度为0.01 mol/L和0.1 mol/L、pH=7.0的PBS。其中将配制好的PBS(0.1 mol/L，pH=7.0)经高压灭菌后，置于厌氧培养箱中37℃过夜，用于稀

释肠道内容物。

1.2 主要仪器设备

TECAN Infinite M200 PRO 多功能酶标仪(帝肯(上海)贸易有限公司)；YQX-II 厌氧培养箱(上海龙跃仪器设备有限公司)；3-18K 高速冷冻离心机(Sigma 仪器有限公司)；冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)；KDN-04C 定氮仪(上海洪纪仪器设备有限公司)；SW-CJ-IFD 垂直洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)；BPH-9082 精密恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)；ZH010 恒温震荡水槽(上海实验仪器厂有限公司)；SF-高速粉碎机(上海科泰粉碎设备厂)；Five Easy 实验室pH计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 苦荞蛋白的制备

苦荞籽粒粉碎后过筛，脱脂24 h；取100 g脱脂苦荞粉以料液比1:10用0.01 mol/L，pH 7.0的PBS溶解，在磁力搅拌器上搅拌2 h；在4℃条件下，4000 r/min离心30 min，并向上清液中加入 $(NH_4)_2SO_4$ 使其浓度为40%，搅拌1 h；在4℃条件下，10000 r/min离心15 min，并向上清液中加入 $(NH_4)_2SO_4$ 使其浓度为80%，搅拌1 h；在4℃条件下，10000 r/min离心15 min，弃上清，沉淀用少量去离子水复溶；然后将其加入到1 KD透析袋中进行透析48 h(每4 h换水一次)，透析后进行冻干(-70℃条件下冻干24 h)，冻干粉保存备用。相对以苦荞籽粒中的蛋白，其收率为64%。

1.3.2 苦荞蛋白含量的测定

参照国标GB 50095-2010中凯氏定氮法进行样品测定。

1.3.3 苦荞蛋白对乳酸杆菌生长的影响

按照凯氏定氮的结果分别配制浓度为：1、3和5 mg/mL的苦荞蛋白和酪蛋白。乳酸杆菌培养利用96孔板37℃厌氧培养32 h，每个测定时间点采用一块独立的96孔板，每孔上样量为150 μ L，接种培养液中乳酸杆菌的初始浓度为 2×10^3 CFU/mL，每隔4 h取一块96孔板，利用MTH-100 恒温混匀仪进行混匀1 min，然后利用TECAN Infinite M200PRO 多功能酶标仪测定其在600 nm处的光密度值(OD₆₀₀值)。

1.3.4 苦荞蛋白对乳酸杆菌在胆酸盐环境中生长的影响

1.3.4.1 菌株胆酸盐耐受性的测定

向MRS培养基中加入1~6 mM不同浓度的四种

胆酸盐(胆酸钠(SC)、脱氧胆酸钠(SDC)、甘氨酸胆酸钠(SGC)和牛磺胆酸钠(STC))乳酸杆菌的接种终浓度为 2×10^3 CFU/mL。采用96孔板培养,37℃厌氧培养32h,每隔8h测定其OD₆₀₀值。

1.3.4.2 蛋白样品对菌株胆酸盐耐受性的影响

向MRS肉汤培养基中分别添加5 mg/mL苦荞蛋白和6 mM的胆酸盐(胆酸钠(SC)和甘氨酸胆酸钠(SGC))溶液,乳酸杆菌接种终浓度为 2×10^3 CFU/mL。采用96孔板培养,37℃厌氧培养32h,每隔8h测定其OD₆₀₀值。

1.3.5 肠胃道环境模拟

参考Mills等人^[10,11]的方法并略作修改。分别称取5 g苦荞蛋白(BWP)或酪蛋白(Casein)到三角瓶中,加入100 mL双蒸水,充分搅拌均匀后,用6 M HCl调节pH到2.0(±0.05),加入2.5 mL 0.108 g/mL的胃蛋白酶溶液,经37℃恒温水浴震荡2h;再用6 M NaOH将溶液的pH调节到6.8(±0.05)(此时胰酶活性最高),加入12.5 mL胰酶胆汁溶液(胰酶和胆汁浓度分别为4.5 mg/mL和28 mg/mL),37℃恒温水浴震荡2h;沸水浴10 min终止反应。苦荞蛋白水解样品(BWPH)随后经1 KD透析袋进行透析并将截留液进行冷冻干燥,于4℃冰箱保存备用。上述步骤以酪蛋白(Casein)作为对照以及不加样品作为空白。

1.3.6 苦荞蛋白水解物对乳酸杆菌生长的影响

参考Olano-Martin等人^[12]的方法并略作修改。用动物基础饲料喂食C57BL/6小鼠两周以适应环境,在此期间,自由进食和饮水(饮用水121℃、20 min灭菌,基础饲料和垫料紫外照射30 min杀菌)。然后,随机分成3组(做3个平行),断颈处死小鼠,收集结肠内容物并用预还原的PBS(0.1 mol/L, pH 7.0)溶解,并在涡旋振荡器上充分振荡3 min,使彻底匀浆化,500 r/min离心2 min,分别迅速取上清液到90 mL预还原基础培养基中,再加入1 g苦荞蛋白(浓度为14.71 mg/mL)经胃肠模拟环境处理后的苦荞蛋白水解样品BWPH(浓度为10 mg/mL)(酪蛋白消化冻干样品CH作为对照组,不加样品的消化冻干产物CK作为空白对照)充分混匀;在厌氧培养箱中37℃发酵32h,每隔16h取样,采用平板计数法对发酵液中的乳酸杆菌进行计数。

1.3.7 数据分析

采用SPSS 20.0软件进行ANOVA(LSD检验),检验水准 $p=0.05$ 进行显著性分析;所有数据均以平均值±标准差表示,以上每组数据均作3个平行样。

2 结果与分析

2.1 苦荞蛋白对乳酸杆菌生长的影响分析

图1为不同浓度的苦荞蛋白(BWP)对植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌生长的影响变化。由图1可知,在培养前20h,实验中对照组酪蛋白与苦荞蛋白对乳酸杆菌的生长均具有促进作用,培养20h以后,酪蛋白组中的OD₆₀₀值开始下降,而苦荞蛋白组仍保持稳定的生长趋势,这可能是由于酪蛋白与苦荞蛋白的分子量和空间结构的不同,在培养初期,相对于苦荞蛋白乳酸杆菌比较容易利用和代谢酪蛋白。同时,由图1可知,在培养32h时,不同浓度的BWP(1、3和5 mg/mL)对植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌生长的OD₆₀₀值分别提高为12.33%、25.84%、35.31%和15.37%、26.66%、30.57%,并且较高浓度的苦荞蛋白(3 mg/mL、5 mg/mL)不仅能够加快其生长速率,而且能够缩短其迟缓期。此外,相同浓度的苦荞蛋白对植物乳杆菌的促进作用大于嗜酸乳杆菌,这可能是由于苦荞蛋白对乳酸杆菌生长的促进作用与乳酸杆菌种类有关。以上实验结果表明,苦荞蛋白具有促进植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌等益生菌生长的作用。

2.2 乳酸杆菌胆酸盐耐受性分析

胆酸或胆酸盐对乳酸杆菌的生长具有抑制作用且会降低益生菌的存活率,不同胆酸盐的抑制作用有差异。本文选择脱氧胆酸钠(SDC)、胆酸钠(SC)、甘氨酸胆酸钠(SGC)和牛磺胆酸钠(STC)四种最具代表性的胆酸盐为研究对象,并根据四种胆酸盐在肉汤培养基中溶解度分别配制了不同浓度的胆酸盐。表1为不同胆酸盐在不同浓度下对植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌生长和生存的抑制情况。由表1可知,脱氧胆酸钠(SDC)和牛磺胆酸钠(STC)(≤6 mM)对植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌的生长均无抑制作用,而胆酸钠(SC)和甘氨酸胆酸钠(SGC)对植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌的生长具有不同程度地抑制作用,且胆酸钠(SC)和甘氨酸胆酸钠(SGC)浓度达到6 mM时上述两株乳酸杆菌表现为最小生长。结果表明,胆酸盐对乳酸杆菌的抑制作用受胆酸盐种类和浓度的影响。因此,实验选择对乳酸杆菌生存和生长有抑制作用的高浓度(6 mM)胆酸钠(SC)和甘氨酸胆酸钠(SGC)进行下一步苦荞蛋白对不同乳酸杆菌耐受胆酸盐的研究。

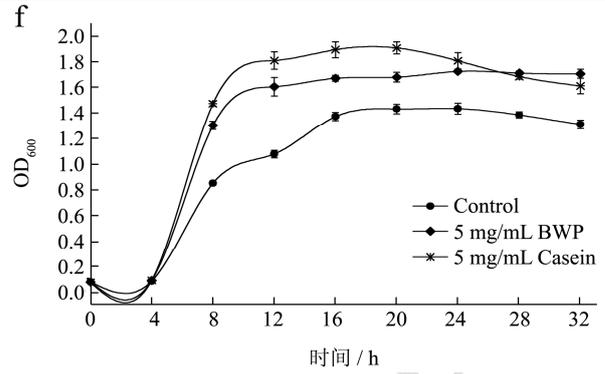
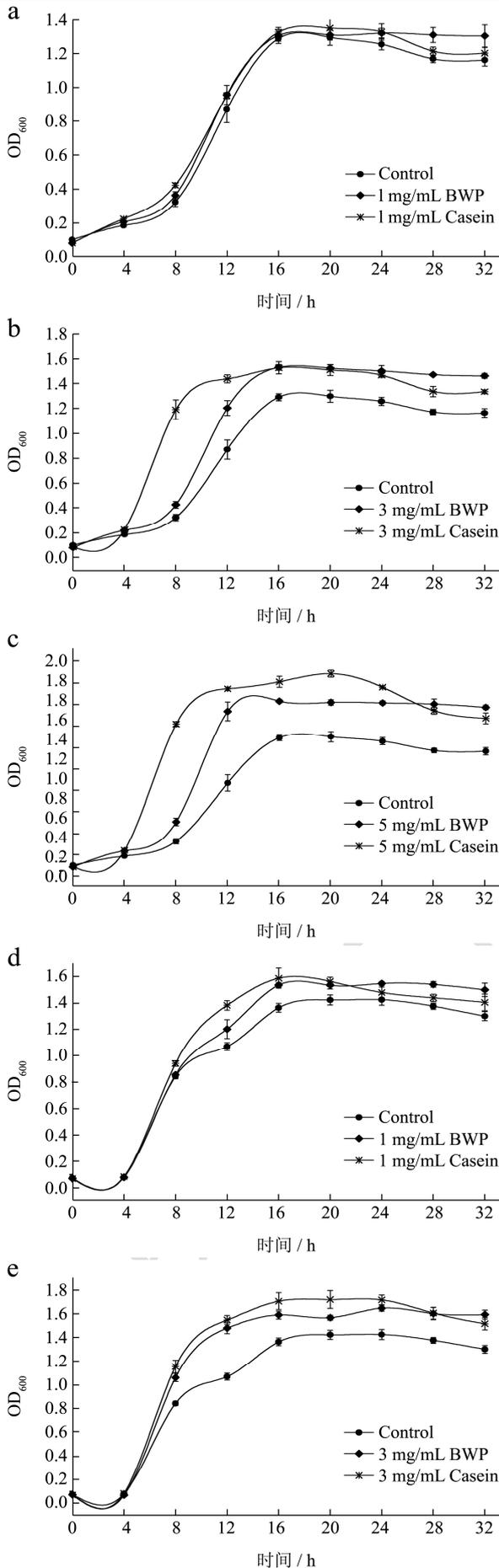


图1 苦荞蛋白对两株乳酸杆菌生长的影响

Fig.1 Effect of tartary buckwheat protein on the growth of two *Lactobacillus* strains

注: a-c, 植物乳杆菌的生长变化图; d-f, 嗜酸乳杆菌的生长变化图。

表1 不同胆酸盐对两株乳酸杆菌生长的影响

Table 1 Effect of different bile salts on the growth of two *Lactobacillus* strains

胆酸盐/mM	植物乳杆菌 (<i>L.plantarum</i> ST-III)	嗜酸乳杆菌 (<i>L.acidophilus</i> BD0399)
SDC	0.5	+++
	0.25	+++
	0.125	+++
SC	6	+
	3	++
	1.5	++
SGC	6	+
	3	++
	1.5	++
STC	6	+++
	3	+++
	1.5	+++

注: SC、SGC 和 STC 的最大溶解浓度为 6 mM; SDC 最大溶解浓度为 0.5 mM; +++, 生长良好; ++, 较少生长; +, 最小生长^[3]。

2.3 苦荞蛋白对乳酸杆菌耐受胆酸盐的影响

苦荞蛋白对不同乳酸杆菌耐受胆酸盐的影响结果见图 2。由图 2 可知, 苦荞蛋白可以增强植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌对胆酸钠 (SC) 和甘氨酸胆酸钠 (SGC) 的耐受能力, 且这种作用受胆酸盐的种类和乳酸杆菌种类的影响, 其光密度值 OD₆₀₀ 分别增加了 1.64、8.67 和 4.11、8.30 倍, 即在培养 32 h 时, 与对照组相比苦荞蛋白使植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌在胆酸钠 (SC)、甘氨酸胆酸钠 (SGC) 中的 OD₆₀₀ 值分别增加了 0.78、

1.38 和 1.07、1.54。同时, 苦荞蛋白对植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌耐受胆酸盐的作用均显著高于空白组 ($p<0.05$), 这可能是由于部分胆酸盐被苦荞蛋白所吸附从而降低胆酸盐对乳酸杆菌生存和生长的抑制作用^[13]。综上所述, 苦荞蛋白可显著提高乳酸杆菌在胆酸盐逆境下的生存和生长能力。

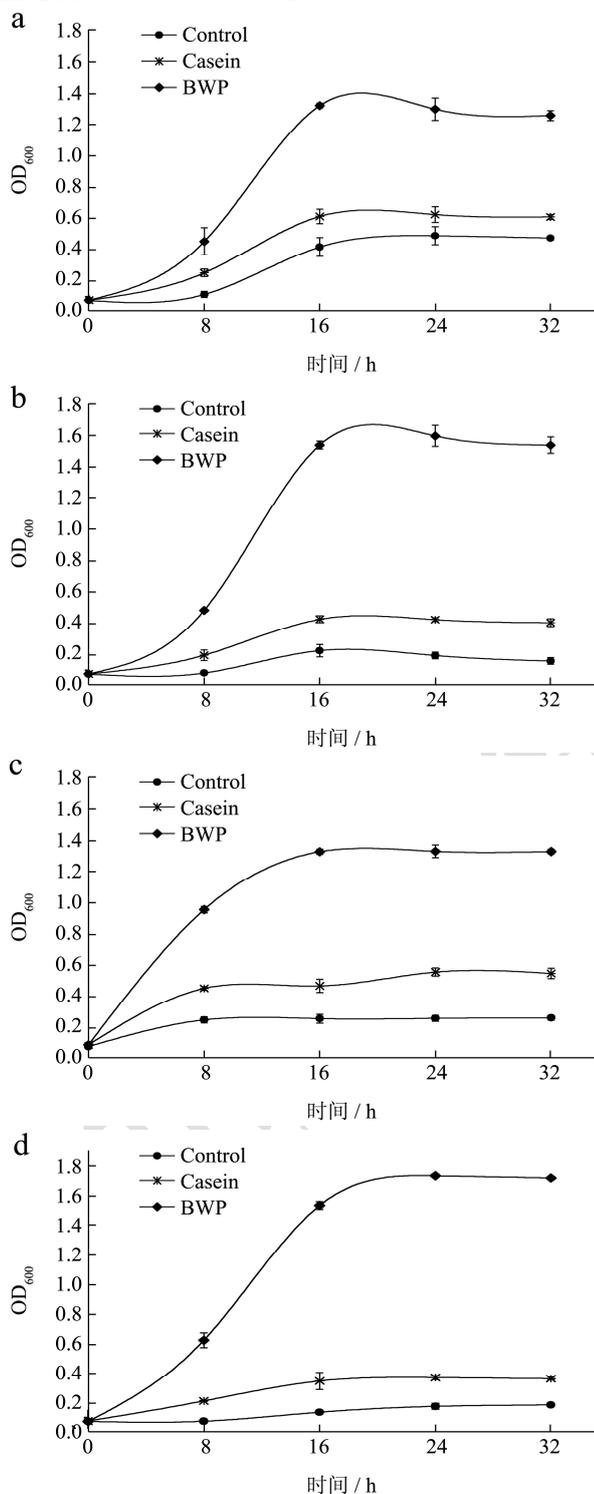


图2 苦荞蛋白对不同乳酸杆菌耐受胆酸盐的影响
Fig.2 Effect of tartary buckwheat protein on the bile salt tolerance in different *Lactobacillus* strains

注: a, 植物乳杆菌+胆酸钠; b, 植物乳杆菌+甘氨酸胆酸钠; c, 嗜酸乳杆菌+胆酸钠; d, 嗜酸乳杆菌+甘氨酸胆酸钠。

2.4 苦荞蛋白水解物对乳酸杆菌生长的影响

为了进一步研究苦荞蛋白对乳酸杆菌生长的影响, 本文通过体外胃肠消化模拟实验, 研究了苦荞蛋白水解产物对小鼠结肠中的乳酸杆菌数量变化的影响, 结果如图3所示。由图3可知, 经胃肠模拟环境处理后的苦荞蛋白水解样品(BWPH)能促进肠道菌群中乳酸杆菌的生长, 且随着培养时间的延长, 乳酸杆菌的数量逐渐增加; 在培养到32 h时, 苦荞蛋白水解物(BWPH)使乳酸杆菌的数量增加了4.26倍(酪蛋白水解物(CH)使乳酸杆菌的数量增加了1.20倍)此结果与申瑞玲等^[14]的研究结论一致。此外, 在16 h和32 h时, 苦荞蛋白水解物(BWPH)对乳酸杆菌的促进作用与酪蛋白水解物(CH)相比均具有差异显著 ($p<0.05$), 即苦荞蛋白对乳酸杆菌的促进作用优于酪蛋白。上述结果表明: 苦荞蛋白水解物(BWPH)对乳酸杆菌生长的促进作用大于酪蛋白水解物(CH)。由此我们可以认为, 苦荞蛋白可能会增加肠道中乳酸杆菌的生长从而起到调节肠道菌群和促进肠道的蠕动的作用。

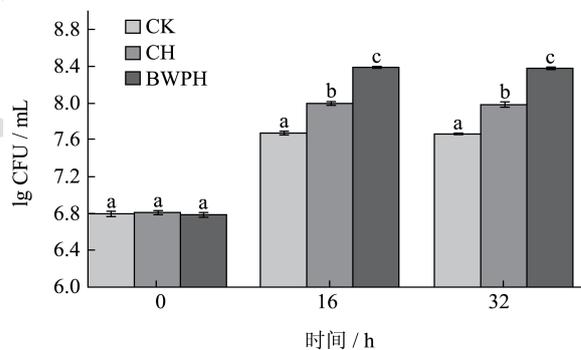


图3 苦荞蛋白消化物体外发酵对乳酸杆菌数量变化的影响

Fig.3 Effect of *in vitro* fermentation of tartary buckwheat protein hydrolysate on *Lactobacillus* cell count

注: a、b和c表示组间差异显著 ($p<0.05$)。

3 结论

3.1 本文研究了苦荞蛋白对益生菌生长及生存的影响, 包括苦荞蛋白对乳酸杆菌生长的影响、苦荞蛋白对乳酸杆菌耐受胆酸盐的影响、以及在体外模拟肠道环境中苦荞蛋白水解物对乳酸杆菌生长的影响三个方面。实验结果表明, 苦荞蛋白对植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌的生长均有促进作用, 其中, 苦荞蛋白浓度为5 mg/mL 时对植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌的促进作用最强, 较空白对照组分别增加35.31%和30.57%。同时,

苦荞蛋白具有增强乳酸杆菌耐受胆酸盐的作用, 分别使植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌耐受胆酸钠 (SC)、甘氨酸胆酸钠 (SGC) 的作用分别增加了 1.64、8.67 和 4.11、8.30 倍, 且这种作用受胆酸盐和乳酸杆菌种类的影响。此外, 体外模拟苦荞蛋白水解物对肠道菌群中乳酸杆菌的培养实验结果表明, 发酵 32 h 时, 苦荞蛋白水解物 (BWPH) 使乳酸杆菌的数量显著增加 ($p < 0.05$), 达到 2.38×10^8 CFU/mL, 从而进一步表明苦荞蛋白可以促进乳酸杆菌的生存和生长。

3.2 综上所述, 苦荞蛋白不仅可以有效促进肠道中乳酸杆菌的生长, 而且可以有效改善胆酸盐对肠道益生菌的抑制作用, 可作为一种潜在的乳酸杆菌促生长因子和益生元并作为食品添加剂加入到食品中或与益生菌制成合生元产品。

参考文献

- [1] 周小理, 黄琳. 荞麦蛋白的组成与功能成分研究进展[J]. 上海应用技术学院学报(自然科学版), 2010, 10(3): 196-199
ZHOU Xiao-li, HUANG Lin. The study progress in the composition of buckwheat protein and its functional ingredients [J]. Journal of Shanghai Institute of Technology (Natural Science), 2010, 10(3): 196-199
- [2] 阮景军, 陈惠. 荞麦蛋白的研制进展与展望[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(3): 209-213
RUAN Jing-jun, CHEN Hui. Buckwheat protein: study progress and prospective application [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2008, 23(3): 209-213
- [3] Adebola O O, Corcoran O, Morgan W A. Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of *Lactobacilli* probiotics [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 75-84
- [4] Hernandez-Hernandez O, Muthaiyan A, Moreno F J, et al. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus* [J]. Food Microbiology, 2012, 30(2): 355-361
- [5] 张晓蕾. 乳蛋白水解物对益生菌增殖作用及存活力的影响 [M]. 天津: 天津商业大学, 2007
ZHANG Xiao-lei. Probiotic cell counts and viability in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates [M]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2007
- [6] Hofmann A F, Hagey L R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics [J]. Cell and Molecular Life Sciences, 2008, 65(16): 2461-2483
- [7] 邓雪, 黄惠华. 茶花水溶性蛋白的分离纯化及其体外吸附胆酸盐能力的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(1): 63-67
DENG Xue, HUANG Hui-hua. *In vitro* binding of bile salts by water-soluble protein extract from tea flower [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(1): 63-67
- [8] Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility [J]. Journal of Nutrition, 1997, 127(7): 1395-1400
- [9] MAO Sheng-yong, ZHU Wei-yun. Effects of six flavonoid compounds addition on short-chain fatty acids production and human fecal microbial community change during *in vitro* fermentation [J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(26): 4484-4491
- [10] Mills D J, Tuohy K M, Booth J, et al. Dietary glycosylated protein modulates the colonic microbiota towards a more detrimental composition in ulcerative colitis patients and non-ulcerative colitis subjects [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(3): 706-714
- [11] Mao S, Zhu W. Effects of six flavonoid compounds addition on short-chain fatty acids production and human fecal microbial community change during *in vitro* fermentation [J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(26): 4484-4491
- [12] Olano-Martin E, Mountzouris K C, Gibson G R, et al. *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria [J]. British Journal of Nutrition, 2000, 83(3): 247-255
- [13] 周小理, 黄琳, 周一鸣. 苦荞水溶性蛋白体外吸附胆酸盐能力的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 77-81
ZHOU Xiao-li, HUANG Lin, ZHOU Yi-ming. *In vitro* binding of bile salts by water-soluble proteins from tartary buckwheat grains [J]. Food Science, 2011, 32(23): 77-81
- [14] 申瑞玲, 张静雯, 党雪雅, 等. 苦荞粉对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 38-40
SHEN Rui-ling, ZHANG Jing-wen, DANG Xue-ya, et al. Effect of buckwheat flour on intestinal flora in mice [J]. Food and Machinery, 2012, 28(1): 38-40