

高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物的体外大肠发酵特性及其对肠道菌群的影响规律

徐诗琪, 周倩雯, 扶雄, 黄强, 张斌*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究以高直链玉米淀粉 (High-Amylose Maize Starch, HAMS) 与四种饱和度不同的脂肪酸为原料, 制备淀粉-不饱和脂肪酸复合物, 研究不同复合物体外大肠发酵特性及菌群调控的影响。结果表明, 随着脂肪酸不饱和度的增加, 除淀粉-油酸复合物 (34.87%) 外, 形成的复合物 V 型结晶越少 (30.42%~32.93%)。淀粉-不饱和脂肪酸复合物在整个发酵过程中发酵速率无显著性差异 ($p>0.05$), 最终产气量基本一致 (13.8~14.2 mL)。淀粉-不饱和脂肪酸复合物产丁酸浓度 (14.83~17.91 mmol/L) 低于 HAMS (22.42 mmol/L), 但产较多乙酸 (60.25~63.73 mmol/L) 和丙酸 (21.22~24.81 mmol/L)。淀粉-不饱和脂肪酸复合物均能显著促进 *Prevotella* 的相对丰度, 这与其较高的丙酸产量有关。综上, 淀粉-不饱和脂肪酸复合物大肠发酵特性受脂肪酸饱和度的影响较小, 主要与淀粉-脂质复合物自身结构有关, 复合物中脂肪酸的饱和度对高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物菌群结构具有一定影响。

关键词: 淀粉-脂质复合物; 脂肪酸饱和度; 体外发酵特性; 肠道菌群

文章编号: 1673-9078(2023)01-20-30

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0169

High-amylose Maize Starch-unsaturated Fatty Acid Complexes: *In Vitro* Large Intestine Fermentation Characteristics and Effects on Gut Microbiota

XU Shiqi, ZHOU Qianwen, FU Xiong, HUANG Qiang, ZHANG Bin*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, high-amylose maize starch (HAMS) and four fatty acids with different saturation degrees were used as the raw materials to form starch-unsaturated-fatty-acid complexes. The effects of the different complexes on the *in vitro* large intestine fermentation characteristics and regulation of microbiota were investigated. The results showed that with the increase of the unsaturation of fatty acids, the formation of V-type starch complexes (30.42%~32.93%) decreased, except for the starch-oleic-acid complex (34.87%). There were no significant differences in the fermentation rate for the starch-unsaturated fat complexes during the entire fermentation process ($p>0.05$), with their final gas productions being essentially the same (13.8~14.2 mL). The starch-unsaturated fatty acid complexes produced a lower concentration of butyrate (14.83~17.91 mmol/L; compared with HAMS 22.42 mmol/L), but produced higher concentrations of acetate (60.25~63.73 mmol/L) and propionate (21.22~24.81 mmol/L). The starch-unsaturated fatty acid complexes all significantly increased the relative abundance of *Prevotella*, which might be associated with their higher propionate productions. Taken together, the *in vitro* large intestine fermentation characteristics of HAMS-unsaturated-fatty-acid complexes were less affected by the fatty acid saturation, but related mainly to their own complex structure. The

引文格式:

徐诗琪,周倩雯,扶雄,等.高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物的体外大肠发酵特性及其对肠道菌群的影响规律[J].现代食品科技,2023,39(1):20-30

XU Shiqi, ZHOU Qianwen, FU Xiong, et al. High-amylose maize starch-unsaturated fatty acid complexes: *in vitro* large intestine fermentation characteristics and effects on gut microbiota [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 20-30

收稿日期: 2022-02-19

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2021A1515011328)

作者简介: 徐诗琪(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 碳水化合物化学与营养, E-mail: 1030744065@qq.com

通讯作者: 张斌 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 碳水化合物化学与营养, E-mail: zhangb@scut.edu.cn

saturation of the fatty acids in the HAMS-unsaturated fatty acid complexes has a certain effect on the microbiota structure.

Key words: starch-lipid complex; *in vitro* large intestine fermentation; gut microbiota; short-chain fatty acids

人类肠道菌群是一种相当复杂的生态系统, 约由 10^{13} ~ 10^{14} 种菌群所构成, 维持机体代谢平衡^[1]。肠道菌群的形成受宿主和环境因素共同影响, 涉及生活环境、食物、用药习惯等, 而饮食结构是最重要的因素之一^[2]。肠道菌群与人类是互利共生的关系: 人类为微生物群落提供营养和保护, 同时微生物群落也对人类免疫、神经系统调节起到了一定的效果, 帮助调节肠道健康^[3]。肠道菌群参与生理调节的过程, 普遍是基于酵解所产生的有益代谢产物短链脂肪酸 (Short Chain Fatty Acids, SCFAs) 来实现的。SCFAs 通过激活活性物质和神经系统间接影响外部组织和器官, 从而在调节宿主代谢、免疫和细胞增殖等功能发挥重要作用^[4]。

抗性淀粉 (Resistant Starch, RS) 是指淀粉和部分淀粉制品在通过胃肠道时, 120 min 内 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的消化产生抵抗的部分, 但可在大肠中作为底物被结肠菌群完全或部分发酵^[5]。目前, RS 根据来源和抗性机理的不同, 主要分物理包埋淀粉 (Type 1 Resistant Starch, RS1)、天然抗性淀粉 (Type 2 Resistant Starch, RS2)、老化淀粉 (Type 3 Resistant Starch, RS3)、化学改性淀粉 (Type 4 Resistant Starch, RS4) 和淀粉-脂质复合物 (Type 5 Resistant Starch, RS5) 等五类, 其中 RS5 是一种新型抗性淀粉, 它是由直链淀粉与脂质等配体复合而成的单螺旋结构, 具有良好的热稳定性和抗酶解性等特点^[6]。抗性淀粉对结肠具有重要作用, 能够降低肠道内 pH 值, 促进益生菌增长, 产生高浓度的 SCFAs 以及降低肠道性疾病的发生等生理功能^[7]。淀粉和脂质都是人体重要的能量来源和营养物质, 它们在人体内具有特定的生理功能, 而当淀粉和脂质形成稳定的单螺旋结构后将拥有热稳定性、抗消化等功能特性和控制肥胖、调节血糖、调控肠道菌群等营养特性^[8-10]。例如, Annor 等^[11]通过测定血糖生成指数, 发现小米淀粉与棕榈酸、油酸和亚油酸形成的复合物血糖生成指数显著低于小米淀粉。目前, 已有大量研究报道了淀粉-脂质复合物的形成机理、结构和功能特性 (如糊化、粘弹性和消化)^[9,12,13], 但研究多局限于 RS5 的制备方法、加工特性等问题。鉴于淀粉和脂肪的种类丰富、结构多样化, 而不饱和脂肪酸被认为具有重要的营养价值, 对于维持人类健康、预防脂质相关疾病和发育至关重要, 因此将不饱和脂肪酸与淀粉进行复合后能否产生更多协同效应, 将是值得探讨的关注点。另一方面, 不饱

和脂肪酸的复合物的体外发酵特性以及微生物结构的变化等方面的研究仍未够深入, 特别是不同特定结构的 RS5 之间发酵特性的比较。

本文选用高直链玉米淀粉和饮食中各种常见的脂肪酸即硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸作为原料, 采用碱液分散法得到不同饱和度的淀粉-脂肪酸复合物。采用 X 射线衍射 (X-Ray Diffraction, XRD)、差示扫描量热仪 (Differential Scanning Calorimeter, DSC) 等表征手段和测定样本的复合率和含量对样品结构进行解析。利用体外大肠发酵实验和 16S rRNA 基因测序, 揭示样品的发酵特性和菌群结构变化。本文旨在明确 RS5 的发酵特性与微生物反应同复合物的脂肪酸饱和度之间的关系, 为针对性开发益生元产品和以淀粉为基础的功能性食品配料提供了新的可能。

1 材料与方法

1.1 材料

高直链玉米淀粉 (HylonV), 美国 Ingredion 公司; 低聚果糖, 美国 Ingredion 公司; 亚油酸、亚麻酸、猪胰 α 淀粉酶 (EC 号: 232-468-9; 活性: $8 \times \text{USP}/\text{mg}$)、淀粉葡萄糖苷酶 (EC 号: 3.2.1.3 (BRENDA, IUBMB); 活性: $\geq 260 \text{ units}/\text{mL}$), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 硬脂酸, 阿拉丁化学试剂公司; 油酸, 阿拉丁化学试剂公司; 其他试剂或药品均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

HYQX-II 型厌氧箱, 上海跃进医疗器械公司; MR-Hei-Tec 型加热型磁力搅拌器, 德国 Heidolph 公司; LDZH-100KBS 型立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械公司; DL-5-B 型离心机, 上海安亭科学仪器有限公司; FE20 型数显 pH 计, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; DSC3 型差示扫描量热仪, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; D/Max-1200 型 X-射线衍射分析仪, 日本 Rigaku 公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京六仪公司; 2720 型 PCR 扩增仪, 美国应用生物系统公司; E6090 型 TBS-380 荧光计, 北京原平皓生物技术有限公司; NanoDrop-ND-1000 分光光度计, 美国赛默飞公司; 2100 生物分析仪, 美国安捷伦公司; Illumina PE250 型 NovaSeq 高通量测序仪, 美国 Illumina 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 淀粉-不饱和脂肪酸复合物制备

本文制备淀粉-不饱和脂肪酸复合物的方法参考 Karkalas 等^[14]方法进行修改。将 6 g 高直链淀粉玉米淀粉溶于 400 mL 0.1 mol/L 的 KOH 溶液,在 300 r/min 下恒定搅拌至充分溶解,然后将温度快速升高到 90 °C 保持 1 h 得到糊化淀粉。同样,将 0.6 g 脂肪酸溶解于 600 mL 0.1 mol/L 的 KOH 溶液,在 90 °C 加热并持续搅拌至完全溶解。在 90 °C 下将脂肪酸与淀粉溶液混合均匀并充分搅拌 30 min,用 2.0 mol/L 的 HCl 溶液将混合溶液的 pH 值调至 4.6~4.7,维持 90 °C 继续加热 1 h,冷却至室温,在 3 000 r/min 下离心 15 min 得到的沉淀即为淀粉-不饱和脂肪酸复合物。将所得的沉淀物冷冻干燥 48 h 得到样品,粉碎过筛,置于冰箱中密封保存。对照组除了不加脂肪酸外,其余处理步骤一致。样品分别命名为 HAMS,高直链玉米淀粉;GS,糊化淀粉;GS-SA,淀粉-硬脂酸复合物;GS-OA,淀粉-油酸复合物;GS-LA,淀粉-亚油酸复合物;GS-ALA,淀粉-亚麻酸复合物;SA,硬脂酸;OA,油酸;LA,亚油酸;ALA,亚麻酸。

1.3.2 X-射线衍射测定

将待测样品平衡水分,随后平铺于样品池中过夜,然后放入 XRD 仪的样品台中进行测试。测试条件为波长 0.154 0 nm、测试管电压 40 kV、电流 30 mA。扫描的区域为 4~30 °2θ、扫描速度 2 °/min。通过对比图谱,确定淀粉颗粒结晶性质。相对结晶度计算方法参照 Nara 等^[15]提出的方法计算,通过 Jade 软件对结晶区域和总面积部分分别进行积分计算,所得比值即为相对结晶度 (Relative Crystallinity, RC)。

$$RC = \frac{Ac}{Ac + Aa} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Ac——结晶区域面积;

Aa——非结晶区域面积。

1.3.3 热力学性质测定

准确称取 3 mg 淀粉干基与去离子水均匀混合成水分含量为 70% 的混合物,密封高压盘,在室温下平衡过夜后,用 DSC 检测样品,扫描温度为 30~140 °C,扫描速率为 10 °C/min^[16]。用 STARe 软件分别计算热力学曲线中的起始温度 (T_0)、峰值温度 (T_p)、终止温度 (T_c) 和焓值 (ΔH)。

1.3.4 复合指数测定

采用 Jia 等^[17]的方法测定样品的复合指数,用 CI 值表示淀粉-脂质复合物的形成程度。准确称取淀粉干基 300 mg,悬浮于 5 mL 去离子水中,在沸水浴中加热搅拌 30 min,冷却至室温,在 2 000 r/min 下离心

8 min,取 50 μL 上清液与 2 ml 含有 $m=1.3\%$ I_2 和 $m=2\%$ KI 的碘溶液进行混合。用紫外-可见分光光度计在 690 nm 处测定配合物 and 对照物的吸光度并用下式计算:

$$CI = \frac{ABS_{reference} - ABS_{sample}}{ABS_{reference}} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$ABS_{reference}$ ——原淀粉吸光值;

ABS_{sample} ——样品吸光值。

1.3.5 抗性淀粉含量测定

抗性淀粉含量测定参照 Xie 等^[18]的体外模拟小肠消化方法。准确称取 0.6 g 淀粉样品干基于 50 mL 离心管中,分别加入 20 mL 0.1 mol/L 的醋酸钠缓冲液和磁子,涡旋混匀后置于 37 °C 磁力搅拌水浴锅中震荡。加入 5 mL 猪胰酶和淀粉葡萄糖苷酶的混合酶解液后开始计时。在反应 2 h 后,从每个试管中各取 0.25 mL 上清液与 10 mL $\phi=66\%$ 的乙醇混合停止酶解反应。于 4 300 r/min 下离心 5 min,取 0.1 mL 上清液与 3 mL 的 GOPOD 混合均匀,测定 510 nm 处吸光值,具体计算方法如下:

$$RS = \frac{TG - G_{120} \times 0.9}{TG} \quad (3)$$

式中:

RS——抗性淀粉含量, %;

G_{120} ——酶水解 2 h 后产生的葡萄糖含量, %;

TG——样品总葡萄糖含量, %。

1.3.6 体外大肠发酵实验

体外大肠发酵实验参考相关文献^[18-20]。制备微量元素溶液和碳酸-磷酸缓冲液,并在使用前灭菌。将 0.25 g/L 的半胱氨酸加入到碳酸-磷酸缓冲液中,通入 CO_2 气流去除氧气。准确称取每个时间点的发酵样品 50 mg 于厌氧瓶中,然后将各厌氧瓶和碳酸-磷酸缓冲液转移到厌氧培养箱中过夜。实验以低聚果糖 (Fructooligosaccharide, FOS) 作为阳性对照,以 HAMS、GS 和 SA、OA、LA、ALA 作为阴性对照。

体外发酵实验已获得广州市第一人民医院 (华南理工大学第二附属医院) 伦理委员会批准 (批准号为 K-2021-085-01),征得 3 名志愿者的知情同意。于发酵试验当天收集粪便到无菌离心管中,并立即转移至厌氧培养箱中备用。志愿者必须满足以下条件: (1) 年龄在 20~25 岁, BMI 值处于正常范围 ($18.5 \sim 23.9 \text{ kg/m}^2$);

(2) 身体健康,无胃肠道方面的疾病; (3) 试验前两周内没有服用任何含益生菌的产品,试验前三个月内没有服用任何含抗生素的药物。包含新鲜粪便样本的无菌管迅速转移置厌氧培养箱中,将三名志愿者的粪便与碳酸-磷酸缓冲液按 1:3 的比例混合均匀,然后过

滤得到菌液。在每个厌氧瓶中加入 4 mL 碳酸-磷酸缓冲液和 1 mL 菌液,然后用橡胶塞和铝盖密封。在 37 °C 水浴中发酵 4、8、12 和 24 h 后,立即取出相应的厌氧瓶,用带有刻度的注射器测量产气量。收集发酵后的上清液进行短链脂肪酸分析、沉淀物进行 16S rRNA 基因测序,所有上清液和沉淀物均保存在-80 °C 以作进一步分析。

1.3.7 短链脂肪酸含量测定

短链脂肪酸的产量参考 Wang 等^[21]的方法,使用气相色谱仪测定。将不同发酵时间点的样品以 12 000 r/min 转速离心 10 min,分离得到上清液。以 4-甲基戊酸配制内标混合物,将 200 μ L 的内标混合物加入至 800 μ L 的上清液中,混合均匀,注入气相色谱仪。样品中的短链脂肪酸通过毛细管柱(Zebron, ZB-FFAP, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m)和氢离子火焰检测器,在流速为 1 mL/min 的氮气中分离后测定浓度。具体条件为:分流比 10:1,进样器和检测器温度为 230 °C,初始柱温为 80 °C,以 8 °C/min 升温至 192 °C,保持 3 min。程序结束后,记录出峰面积,通过校正内标的峰面积对样品中的目标短链脂肪酸进行定量计算。

1.3.8 DNA 的提取与序列分析

使用 QIAamp® DNA 试剂盒,从不同时间点的酵解样品中提取 DNA,并在-20 °C 下保存用于测序分析。对 DNA 进行定量,以及琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量。随后对纯化合格的 DNA 样本,添加样本特异性 Barcode 序列,使用正向和反向引物对细菌 16S rRNA V3-V4 区进行聚合酶链式反应扩增,并对扩增产物进行荧光定量。按照每个样本的测序需求,汇聚等量的扩增子,对各样本按相应比例进行混合,采用 Illumina 公司的 MiSeq 测序仪进行高通量双端测序,对应试剂盒为 MiSeq Reagent Kit V3。

1.3.9 16S rRNA 基因序列分析

采用 DADA2 方法对序列进行去噪,并以 100% 的相似度去重、聚类得到 ASVs 序列。依据 Greengenes 数据库和 Classify-sklearn 算法对每个 ASV 进行物种注释,并借助基因云平台进行数据可视化和绘制(<https://www.genescloud.cn/login>)。

1.3.10 数据统计与分析

实验结果用均值 \pm 标准差表示。采用单因素方差分析和 Turkey's 多重检测综合评价试验组之间的差异,采用 $p < 0.05$ 为有统计学意义。实验数据均采用 GraphPad Prism 7.0 版本进行作图和 SPSS 20.0 版本进行统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 X-射线衍射分析

通过 X-射线衍射手段分析 HAMS 和饱和度不同的淀粉-脂质复合物的结晶特性,结果如图 1 所示。HAMS 在 5.6°、17.1°、22.1° 和 24.0° 处均有特征峰出现,表明 HAMS 是典型的 B 型结晶结构^[22,23],而样品 GS 的 B 型结晶特征峰显著减弱,仅在 17.1° 和 20.0° 处出现微弱的特征峰。高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物在图中 7.3°、13.1° 和 20.0° 处均出现了特征峰,这是 V 型结晶结构特有的特征峰的出现位置。有文献报道认为环境中的客体分子能够通过疏水相互作用力进入到单螺旋淀粉链的疏水性空腔中形成具有稳定结构的淀粉 V 型结晶^[24],从图中也证实了淀粉单螺旋和几种脂肪酸成功复合并形成了相应的复合物。但是除 GS-OA 外,随着脂肪酸饱和度增加,V 型特征峰逐渐减弱,呈现 GS-SA>GS-LA>GS-ALA 的趋势。此外,GS-SA 在 21.6° 和 24.1° 均出现了较为尖锐的特征峰,这是未被洗脱的游离脂肪酸的特征峰,由于不饱和脂肪酸常温下是液态,容易被 $\varphi=50\%$ 的乙醇溶液冲洗干净,而中长链饱和脂肪酸在常温下是固态,分散性较差,在常温下难以被 $\varphi=50\%$ 的乙醇溶液洗脱完全,因此出现了尖锐的脂肪酸特征峰^[25]。

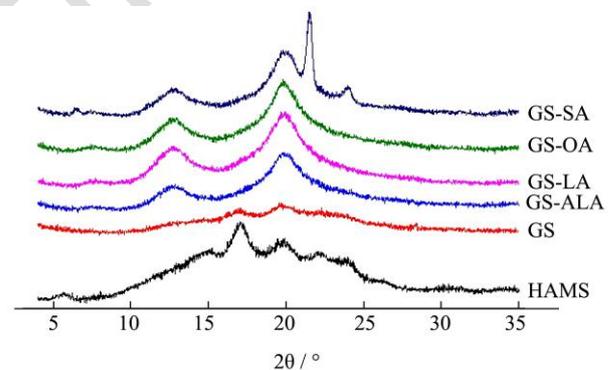


图 1 淀粉-不饱和脂肪酸复合物的 X-射线衍射图谱

Fig.1 X-ray diffraction pattern of starch-unsaturated fatty acid complex

注: HAMS 为高直链玉米淀粉; GS 为糊化淀粉; GS-SA 为淀粉-硬脂酸复合物; GS-OA 为淀粉-油酸复合物; GS-LA 为淀粉-亚油酸复合物; GS-ALA 为淀粉-亚麻酸复合物; SA 为硬脂酸; OA 为油酸; LA 为亚油酸; ALA 为亚麻酸。

高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物和 HAMS 的 V 型、B 型结晶的含量及总结晶度如表 1 所示。XRD 图谱中特征峰的尖锐程度和强度可以表明样品复合程度的大小,通过 Jade 软件对 XRD 图谱中的结晶峰进行积分,发现 GS-OA 的 V 型结晶含量最高 34.87%,其次是 GS-SA 为 32.43%、GS-LA 为 32.93%、GS-ALA 为 30.42%。此结果与先前的文献报道一致,当脂肪酸

碳链长度相同时, 不饱和脂肪酸的分散性优于饱和脂肪酸, 而含有一个不饱和双键的油酸比含有两个不饱和双键的亚油酸和亚麻酸产生的空间位阻更少^[26], 因此当链长相同时, 淀粉与单不饱和脂肪酸最容易形成复合物, 其次是饱和脂肪酸, 最后才是多不饱和脂肪酸。另一方面, 样品 GS-SA 的总结晶度为 38.73%。总结晶度计算包括了 B 型、V 型结晶和游离脂肪酸在内, 由于长链脂肪酸在常温下是固态难以洗脱, 因此 GS-SA 的总结晶度计算中有一部分是未由洗脱的脂肪酸产生的。

表 1 淀粉-不饱和脂肪酸复合物中 V 型、B 型结晶的含量及总结晶度 (%)

Table 1 V-type, B-type and total crystallinity for starch-unsaturated fatty acid complex

样品	V 型/%	B 型/%	总结晶度/%
HAMS	5.71 ± 0.24 ^a	23.42 ± 0.23 ^a	29.31 ± 0.34 ^a
GS	2.12 ± 0.19 ^b	5.63 ± 0.21 ^b	7.72 ± 0.18 ^b
GS-SA	32.43 ± 0.11 ^c	-	38.73 ± 0.29 ^c
GS-OA	34.87 ± 0.11 ^c	-	34.88 ± 0.19 ^c
GS-LA	32.93 ± 0.24 ^d	-	32.96 ± 0.23 ^d
GS-ALA	30.42 ± 0.14 ^e	-	30.46 ± 0.10 ^e

注: HAMS 为高直链玉米淀粉; GS 为糊化淀粉; GS-SA 为淀粉-硬脂酸复合物; GS-OA 为淀粉-油酸复合物; GS-LA 为淀粉-亚油酸复合物; GS-ALA 为淀粉-亚麻酸复合物。同列中相同小写字母表示差异不显著 ($p > 0.05$), 不同则表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.2 热力学性质分析

表 2 淀粉-不饱和脂肪酸复合物的热力学性质

Table 2 Thermodynamic properties of starch-unsaturated fatty acid complex

样品	Peak I				Peak II			
	$T_0/^\circ\text{C}$	$T_p/^\circ\text{C}$	$T_c/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$	$T_0/^\circ\text{C}$	$T_p/^\circ\text{C}$	$T_c/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$
HAMS	72.12 ± 0.92 ^a	80.01 ± 0.63 ^a	90.52 ± 0.61 ^a	6.51 ± 0.72 ^a	112.42 ± 1.71 ^b	120.12 ± 0.17 ^d	126.12 ± 2.11 ^d	2.87 ± 0.63 ^c
GS	-	-	-	-	92.83 ± 1.41 ^a	102.43 ± 0.51 ^{ab}	108.92 ± 0.94 ^b	0.92 ± 0.11 ^d
GS-SA	66.13 ± 1.91 ^b	69.67 ± 1.74 ^b	73.17 ± 1.72 ^b	12.34 ± 0.66 ^b	97.29 ± 1.14 ^c	103.91 ± 1.11 ^a	113.89 ± 1.93 ^a	4.61 ± 0.39 ^a
GS-OA	-	-	-	-	94.54 ± 2.29 ^d	103.47 ± 0.93 ^a	114.27 ± 0.35 ^a	4.85 ± 0.42 ^a
GS-LA	-	-	-	-	91.72 ± 2.34 ^a	101.73 ± 0.95 ^b	108.25 ± 1.63 ^b	4.12 ± 0.33 ^a
GS-ALA	-	-	-	-	88.71 ± 0.45 ^e	100.91 ± 0.15 ^c	109.46 ± 0.79 ^c	3.53 ± 0.31 ^b

注: HAMS 为高直链玉米淀粉; GS 为糊化淀粉; GS-SA 为淀粉-硬脂酸复合物; GS-OA 为淀粉-油酸复合物; GS-LA 为淀粉-亚油酸复合物; GS-ALA 为淀粉-亚麻酸复合物。同列中相同小写字母表示差异不显著 ($p > 0.05$), 不同则表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.3 复合指数和抗性淀粉含量分析

表 3 展示了高直链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物的复合指数 CI 值。CI 值表征的是淀粉对碘结合能力的降低程度, 它测量游离淀粉的可用性, 并间接测量

通过 DSC 进行高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸的热力学性质分析, 结果如表 2 所示。样品 GS-SA 有两个吸热峰, 其中, 第一个峰代表未和淀粉发生复合且没被洗脱掉的硬脂酸, 第二个峰代表淀粉-硬脂酸复合物。同样地, Zhang 等^[27]对高直链玉米淀粉与月桂酸的复合物进行 DSC 分析, 也发现了第一个峰出现了未洗脱的月桂酸。淀粉与油酸、亚油酸、亚麻酸形成的复合物未出现脂肪酸吸热峰, 因为常温下不饱和脂肪酸为液态, 容易洗脱完全。淀粉与油酸、亚油酸、亚麻酸形成的复合物未出现脂肪酸吸热峰, 因为常温下不饱和脂肪酸为液态, 容易洗脱完全。此外, 这三个样品都只出现了一个复合物吸热峰, 且温度大概在 91~114 °C 范围内, 这是由于为避免不饱和脂肪酸氧化分解, 采用复合温度较低的碱液分散法进行淀粉和脂肪酸的复合, 因此形成的复合物也主要为较低温度下形成的 I 型复合物, 而结构更加紧密的 II 型复合物则需要高温长时间加热的环境下才能形成^[28,29]。当淀粉与不同饱和度的脂肪酸复合后, 随着不饱和度的增加, T_0 、 T_p 、 T_c 逐渐降低。据文献报道, 这可能是由于不饱和脂肪酸的双键构成空间阻力, 削弱了化合物的结构稳定性, 且不饱和双键数量越多稳定性越差^[29]。淀粉-油酸复合物的焓值略高于淀粉-硬脂酸复合物, 推测是因为单不饱和脂肪酸油酸在常温下是液态且分散性好, 更利于形成复合物。但随着不饱和度的增加, GS-LA 和 GS-ALA 的 ΔH 逐渐降低, 虽然亚油酸和亚麻酸常温下同为液态易分散于溶液中, 但因为不饱和键的增多导致其空间位阻变大并阻碍复合物的形成^[30], 这点与上述 XRD 结果一致。

已整合到复合物中的脂肪酸的数量。在相同处理条件下, 复合指数呈现样品 GS-OA > GS-SA > GS-LA > GS-ALA 的规律, 这是因为油酸分散性更好, 容易扩散到直链淀粉的疏水空腔内形成复合物, 但由于其含有一个不饱和双键, 而不饱和双键的存在会增加立体

障碍造成空间位阻, 对其进入淀粉的螺旋内部造成一定的困难, 进而导致形成的复合物效果较差, 因此 CI 值仅略高于样品 GS-SA^[27]。已有报道证明, 随着淀粉双螺旋数量的增加, 空间位阻变大, 形成的复合物越少, 因此 CI 值也逐渐降低^[26]。

未经加工处理的 HAMS 是一种典型的 RS2, 具有较高的抗酶解特性, 其 RS 含量为 62.41%。然而, 糊化后的样品 GS 抗性淀粉含量大大降低, 仅约 28.79%, 可能是糊化后, 淀粉致密的结构被大量破坏, 生成了许多直链淀粉单螺旋, 导致 RS 含量大大降低, 但仍存在 28.79% 左右的抗性淀粉, 是因为在冷却过程中, 淀粉单螺旋结构重结晶形成了老化淀粉, 这与图 1 的 XRD 结果一致, GS 样品仅在 B 型结晶特征峰处出现了较微弱的特征峰。高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物中脂肪酸的加入, 在一定程度上降低了淀粉单螺旋重结晶, 并形成了 V 型晶体和增加疏水性。这些物理变化的协同作用降低了高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物的酶催化作用, 因此具有较高的抗酶解特性, 具体 RS 含量的顺序为 GS-OA > GS-SA > GS-LA > GS-ALA, 且实验结果表明 RS 含量与 CI 值密切相关^[26]。

表 3 淀粉-不饱和脂肪酸复合物的复合指数及抗性淀粉含量

Table 3 CI and RS value of starch-unsaturated fatty acid complex

样品	CI/%	RS/%
HAMS	-	62.41±1.02 ^e
GS	-	28.79±0.40 ^d
GS-SA	42.91±1.02 ^{ab}	54.42±0.61 ^a
GS-OA	44.72±0.73 ^a	53.33±0.45 ^a
GS-LA	39.11±0.99 ^b	51.54±1.09 ^b
GS-ALA	37.32±0.30 ^c	50.54±0.33 ^{bc}

注: CI 为复合指数; RS 为抗性淀粉含量; HAMS 为高直链玉米淀粉; GS 为糊化淀粉; GS-SA 为淀粉-硬脂酸复合物; GS-OA 为淀粉-油酸复合物; GS-LA 为淀粉-亚油酸复合物; GS-ALA 为淀粉-亚麻酸复合物。同列中相同小写字母表示差异不显著 ($p>0.05$), 不同则表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.4 体外大肠发酵产气量

高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物体外大肠发酵产气量如图 2 所示。阳性对照 FOS 在整个发酵过程中显示出最高的发酵速率, 与文献报道一致, 但过快的发酵速率容易导致胀气等不适症状^[31]。与 FOS 相比, HAMS 在整个发酵过程中具有缓慢的发酵速率。而与 FOS 相比, 高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物样品 GS-SA、GS-OS、GS-LA、GS-ALA 在整个过程的发酵速率都较为缓慢, 但彼此间无显著性差异 ($p>0.05$),

复合物在发酵终点时的产气量基本一致(13.8~14.2 mL), 因此推断, 高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物能够降低发酵速率, 缓慢并稳定地释放发酵产物, 但其产气特性与复合物中的脂肪酸饱和度无关。此外, 膳食纤维在结肠微生物酵解的过程中, 主要产生氢气、甲烷、二氧化碳等气体。其中二氧化碳能由所有细胞产生, 但只有细菌可以通过代谢产生氢气和二氧化碳, 因此总气体产量可以作为膳食纤维发酵速率的反映并表征微生物群的活跃性^[32]。Candido 等^[33]的研究发现肠道微生物几乎不能在厌氧的环境中分解利用游离脂肪酸。脂肪酸样品 SA、OA、LA、ALA 在整个发酵过程中产气量都很低, 这意味着脂肪酸难以被微生物分解利用。这些结果表明与 FOS 这类快速发酵的益生元相比, RS5 具有缓慢发酵的特性, 但这种特性与复合物中的脂肪酸饱和度联系不大。

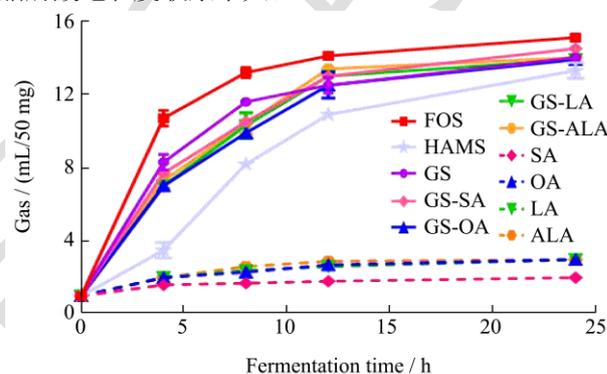


图 2 淀粉-不饱和脂肪酸复合物进行 24 h 体外发酵过程中产气量情况 (mL/50 mg 碳水化合物)

Fig.2 Gas production (mL/50 mg carbohydrate) during *in vitro* fecal fermentation time course

注: FOS 为低聚果糖; HAMS 为高直链玉米淀粉; GS 为糊化淀粉; GS-SA 为淀粉-硬脂酸复合物; GS-OA 为淀粉-油酸复合物; GS-LA 为淀粉-亚油酸复合物; GS-ALA 为淀粉-亚麻酸复合物; SA 为硬脂酸; OA 为油酸; LA 为亚油酸; ALA 为亚麻酸。

2.5 短链脂肪酸产量和组成

短链脂肪酸是肠道菌群发酵的主要有益代谢产物, 乙酸、丙酸和丁酸具有各自不同的作用, 短链脂肪酸的产量也常被用作判断膳食纤维发挥益生作用的功能指标之一^[34]。高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物的乙酸、丙酸和丁酸产量如图 3a~3c 所示。本文以 FOS 作为阳性对照, 以 HAMS、GS 和 SA、OA、LA、ALA 作为阴性对照。FOS 在发酵各时间点的乙酸和丙酸的浓度最高。与 FOS 相比, HAMS 和 GS 在整个发酵过程中乙酸和丙酸的产量较低。发酵终点时, HAMS 产生了 22.42 mmol/L 的丁酸, 这与之前报道的结果一

致^[35]。发酵终点时,高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物 GS-SA、GS-OA、GS-LA、GS-ALA 产生 60.25~63.73 mmol/L 的乙酸和 21.22~24.81 mmol/L 的丙酸,均高于样品 HAMS 和 GS,说明在淀粉中引入脂肪酸能够提高发酵过程中部分 SCFAs 的产量,尤其是乙酸和丙酸。而各种脂肪酸在发酵终点的总酸产量基本一致,这可能是由于在厌氧环境中脂肪酸难以被微生物分解,因此肠道中发酵产生的 SCFAs 含量很低^[33]。

图 3d 为体外粪便发酵过程中高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物的总酸产量。FOS 在发酵前 12 h 的产酸速率最快并且在整个发酵过程中的总酸产量最高。高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物的总酸产量均高于样品 HAMS 和 GS,但是高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物之间产酸含量差异不显著,进一步说明复合物中的脂肪酸饱和度不是影响短链脂肪酸产量的关键因素。

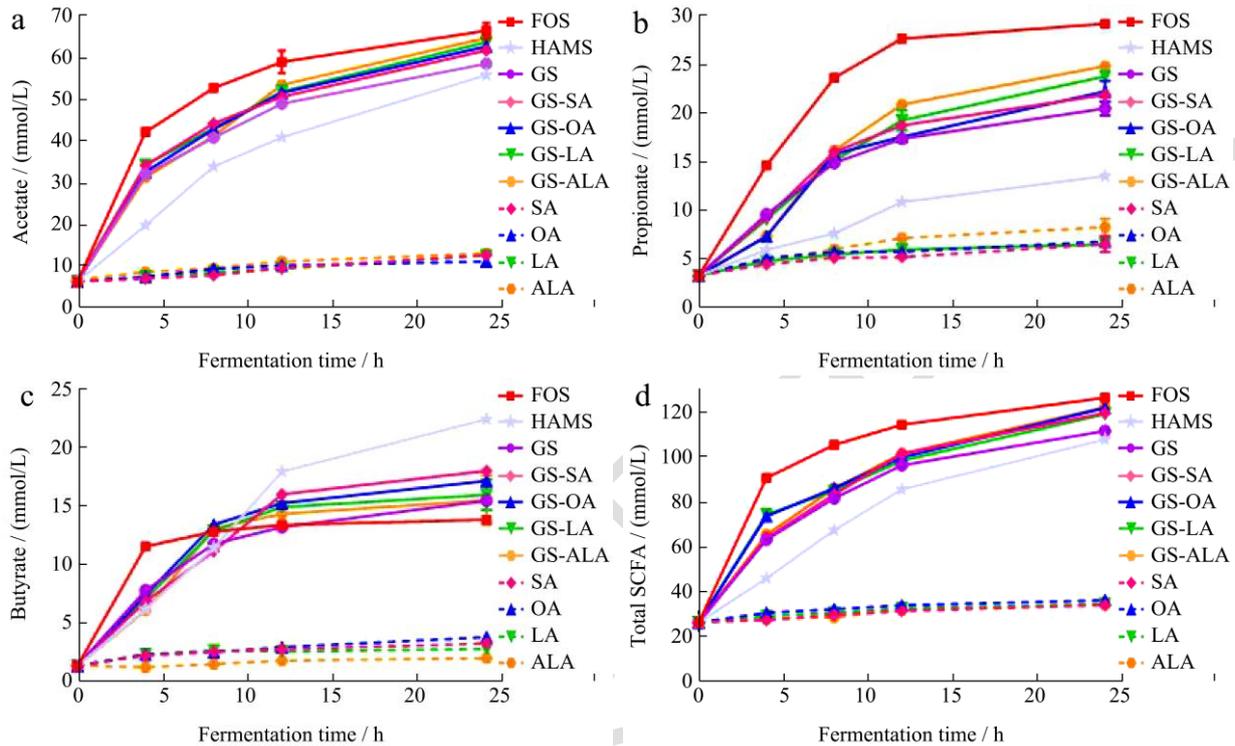


图 3 淀粉-不饱和脂肪酸复合物在发酵不同时间点的乙酸(a)、丙酸(b)、丁酸(c)及总酸(d)浓度

Fig.3 Acetate (a), propionate (b), butyrate (c) and total SCFA (d) concentration produced during in vitro fecal fermentation

注: FOS 为低聚果糖; HAMS 为高直链玉米淀粉; GS 为糊化淀粉; GS-SA 为淀粉-硬脂酸复合物; GS-OA 为淀粉-油酸复合物; GS-LA 为淀粉-亚油酸复合物; GS-ALA 为淀粉-亚麻酸复合物; SA 为硬脂酸; OA 为油酸; LA 为亚油酸; ALA 为亚麻酸。

2.6 肠道菌群物种丰度变化

通过 16S rRNA 测序,在门水平和属水平上进一步研究了发酵终点的肠道微生物群落的相对丰度,其中门水平上结果如图 4a 所示。与空白相比, HAMS 和 GS 促进了 Bacteroidetes 的相对丰度,抑制了 Firmicutes 的相对丰度。高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物随着复合物中脂肪酸不饱和度的增加, Bacteroidetes 的相对丰度不断增加。而所有的脂肪酸样品均提高了 Proteobacteria 的相对丰度。有报道称 Proteobacteria 相对丰度升高可能与肠道炎症性疾病有关^[36],这说明所有的脂肪酸样品具有潜在的不良效果,可能会引起机体的肠道方面的疾病。在发酵结束时,高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物对 Bacteroidetes 和 Firmicutes 的丰度表现出不同的影响。具体而言,样品

GS-SA 在门水平上的发酵特性与 GS 最为接近,这表明 GS 与 GS-SA 的发酵特性最为相似,而 GS-OA, GS-LA 和 GS-ALA 的 Bacteroidetes 丰度均比 GS-SA 和 GS 高,可能与丙酸浓度有关^[37]。

样品在属水平上的变化如图 4b 所示。与空白相比, FOS 显著促进 *Prevotella* 和 *Bacteroides* 的相对丰度,抑制了 *Roseburia*、*Faecalibacterium*、*Blautia*、*unidentified Ruminococcus* 和 *Dialister* 的生长。研究表明 *Bacteroides* 能够通过一系列糖苷水解酶和碳水化合物代谢途径产生丰富的乙酸和丙酸^[37],这与前面 FOS 显著提高乙酸和丙酸浓度的结果一致(图 3a~3b)。与空白相比, HAMS 和 GS 显著提高了 *Prevotella* 和 *Bacteroides* 的相对丰度;与 FOS 相比, HAMS 和 GS 明显增加了 *Roseburia* 和 *unidentified Lachnospiraceae*,这与前面 SCFAs 数据(图 3c)一致。*Roseburia* 和

Lachnospiraceae 具有良好的产丁酸效应,能有效增强肠道屏障功能,进一步改善结肠相关的疾病^[38,39]。值得注意的是,高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物显著促进了 *Prevotella* 的增加,并且随着脂肪酸不饱和度的增加,*Prevotella* 的相对丰度逐渐升高。据相关研究,*Prevotella* 能够促进多糖降解从而实现高乙酸和丙酸的产量^[40],这与前文高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物产乙酸(图 3a)数据一致。与空白相比,样品 SA、OA、LA 均显著促进了 *Faecalibacterium*、*Blautia*、unidentified *Ruminococcus* 和 *Oscillospira* 的相对丰度,样品 ALA 显著促进了 *Bacteroides* 的生长,其中样品 SA 还促进了 *Prevotella* 相对丰度的增加。

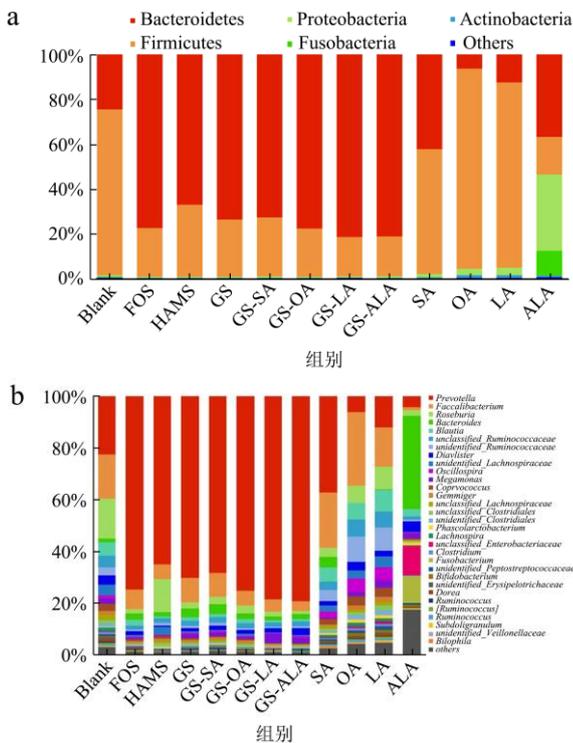


图 4 淀粉-不饱和脂肪酸复合物经体外粪便发酵 24 h 后肠道菌群门水平 (a) 和属水平 (b) 物种丰度变化

Fig.4 Phylum level (a) and genus level (b) of starch-unsaturated fatty acid complex after 24 h in vitro fecal fermentation

注: Blank 为空白对照; FOS 为低聚果糖; HAMS 为高直链玉米淀粉; GS 为糊化淀粉; GS-SA 为淀粉-硬脂酸复合物; GS-OA 为淀粉-油酸复合物; GS-LA 为淀粉-亚油酸复合物; GS-ALA 为淀粉-亚麻酸复合物; SA 为硬脂酸; OA 为油酸; LA 为亚油酸; ALA 为亚麻酸。

为了进一步比较样品之间的物种组成差异,可以突出样品物种丰度分布的趋势,对样品中平均丰度大于 6 000 的 ASVs 进行丰度分析,根据类群间的相关性绘制了聚类热图(图 5),二维空间的长度大于描述符的平衡圆半径的 ASVs 列为关键 ASVs,并以绿色标注,关键 ASVs 将在决定细菌群落结构起到至关

重要作用的 ASVs。从图中可以看到, FOS 明显促进了 12 种 ASVs 的相对丰度。与空白相比, GS-OA、GS-LA、GS-ALA 均能够促进 12 种 ASVs(ASV23395、ASV17067、ASV6097、ASV8028、ASV295、ASV10495、ASV13556、ASV7621、ASV5458、ASV14314、ASV16282 和 ASV8140 *Prevotellacopri*) 的相对丰度,这与 FOS 能够促进的菌一致,但 GS-SA 与 GS 能够促进的菌群结构更为相似,这意味着淀粉-硬脂酸复合物与所复合的淀粉对菌群调控具有相似作用。研究表明, *Prevotellacopri* 是肠道的常见菌之一,能够将多糖降解为丙酸和琥珀酸,并促进肝糖原的储存^[41,42]。样品 SA 能够促进 3 种 ASVs (ASV14115、ASV17039 和 ASV14843 *Faecalibacterium prausnitzii*) 相对丰度升高。*Faecalibacterium prausnitzii* 是健康成人结肠中最丰富的细菌种类之一,占细菌总数的 5% 以上,是人类肠道健康的主要参与者和生物传感器,并且能够生产具有抗炎作用的 SCFAs^[43]。样品 OA 能够促进 5 种 ASVs 相对丰度升高,其中 ASV15724 unidentified *Dialister* 是厚壁菌门中的一类细菌,常存在于健康人体内^[42]。样品 LA 能够促进 ASV15724 unidentified *Dialister* 和 ASV6837 Unidentified *Roseburia* 相对丰度的升高,而样品 ALA 似乎在促进 ASV14306 Unidentified *Bacteroides* 生长方面具有突出贡献,这与之前属水平(图 4)的结果一致。

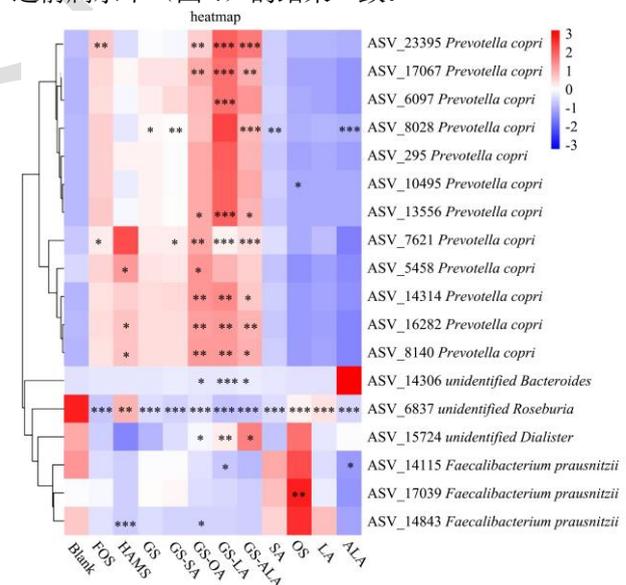


图 5 淀粉-不饱和脂肪酸复合物经体外粪便发酵 24 h 后肠道菌群 ASV 水平物种丰度变化

Fig.5 Heatmap from 16S rRNA gene sequencing of the starch-unsaturated fatty acid complex after 24 h in vitro fecal fermentation

注: Blank 为空白对照; FOS 为低聚果糖; HAMS 为高直链玉米淀粉; GS 为糊化淀粉; GS-SA 为淀粉-硬脂酸复合物; GS-OA

为淀粉-油酸复合物; GS-LA 为淀粉-亚油酸复合物; GS-ALA 为淀粉-亚麻酸复合物; SA 为硬脂酸; OA 为油酸; LA 为亚油酸; ALA 为亚麻酸。热图方块的颜色由蓝变红表示 ASV 物种丰度由低变高; 不同样品的同一 ASV 物种丰度与空白对照相比的显著性标注, *表示 $p < 0.05$; **表示 $p < 0.01$; ***表示 $p < 0.001$ 。

2.7 肠道菌群结构多样性分析

PCA 分析能够确定各样本间微生物群落的结构差异, 判断样品间菌群相似度。采用 key ASV 对发酵 24 h 后的样品微生物群落进行 PCA 分析, 如图 6 所示。两个主轴表示了样本间 88.7% 的总方差(PC1: 66.2%, PC2: 22.5%), 这说明样品间的微生物结构具有显著差异。发酵结束时, 对照组与复合物组之间存在显著差异。从图中发现 ASV10495、ASV16282、ASV17067、ASV8104 *Prevotellacopri* 与样品 GS-SA、GS-OA、GS-LA、GS-ALA、HAMS、DS 之间显著相关, 由于 *Prevotellacopri* 能促进丙酸的产生, 这种显著相关可能与前面测定高浓度的丙酸产生有关^[40,41]。另外, 样品 SA、OA、LA 与空白发生了聚类现象, 促进 ASV14843、ASV17039 *Faecalibacterium prausnitzii* 的相对丰度的增加, 与高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物相比, 这几种脂肪酸对菌群构成的影响较小, 对菌群的调控作用不显著。值得注意的是, 样品 ALA 作为一种不饱和脂肪酸对菌群的影响十分特殊, 与前面所述的三种脂肪酸样品不同的是, 样品 ALA 能够促进 ASV14306 Unidentified *Bacteroides* 和 ASV19479 Unidentified *Fusobacterium* 的增加, 这与热图(图 5)的结果一致。

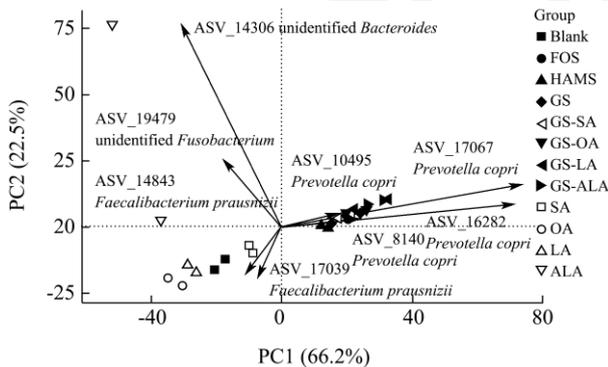


图 6 淀粉-不饱和脂肪酸复合物经体外粪发酵 24 h 后肠道菌群 ASV 水平的主成分分析结果

Fig.6 PCA from 16S rRNA gene sequencing of the starch-unsaturated fatty acid complex after 24 h in vitro fecal fermentation

注: Blank 为空白对照; FOS 为低聚果糖; HAMS 为高直链玉米淀粉; GS 为糊化淀粉; GS-SA 为淀粉-硬脂酸复合物; GS-OA 为淀粉-油酸复合物; GS-LA 为淀粉-亚油酸复合物; GS-ALA 为淀粉-亚麻酸复合物; SA 为硬脂酸; OA 为油酸;

LA 为亚油酸; ALA 为亚麻酸。

3 结论

本文利用碱液分散法, 使用四种饱和度不同的脂肪酸为原料, 制备了四种淀粉-不饱和脂肪酸复合物, 并通过体外批式发酵模型探究了复合物的体外发酵产气量、短链脂肪酸产量及菌群丰度的变化。通过结构表征, 发现除淀粉-油酸复合物以外, 随着脂肪酸不饱和度增加, 淀粉与各脂肪酸复合程度逐渐降低。在体外发酵过程中, 高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物具有相似的发酵速率但彼此间无显著性差异 ($p > 0.05$), 表明脂肪酸的饱和度并不是控制总体发酵速率的关键因素。发酵结束时高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸产生的乙酸和丙酸浓度, 均高于样品 HAMS 和 GS, 说明在淀粉中引入各种脂肪酸能够提高发酵过程中部分 SCFAs 的产量, 尤其是乙酸和丙酸, 但其产量在各复合物之间无显著性差异 ($p > 0.05$)。通过 16S rRNA 测序发现高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物与 HAMS 和 GS 的菌群结构更为相似, 且明显促进了 *Prevotella* 的相对丰度, 这可能与淀粉类样品能够显著促进丙酸浓度有关。本研究发现高链玉米淀粉-不饱和脂肪酸复合物作为 RS5 的一种, 具有调节发酵代谢产物和肠道微生物构成以及改善结肠健康的潜力。本实验为定向设计促进肠道健康的食品配料提供了理论支撑。

参考文献

- [1] Gill S R, Pop M, Deboy R T, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome [J]. Science, 2006, 312(5778): 1355-1359
- [2] Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota [J]. Biochemical Journal, 2017, 474(11): 1823-1836
- [3] Backhed F, Ley R E, Sonnenburg J L, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. Science, 2005, 307(5717): 1915-1920
- [4] Luu M, Monning H, Visekruna A. Exploring the molecular mechanisms underlying the protective effects of microbial SCFAs on intestinal tolerance and food allergy [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 1225
- [5] Lehmann U, Robin F. Slowly digestible starch - its structure and health implications: a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2007, 18(7): 346-355
- [6] Englyst H N, Kingman S M, Cummings J H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46(Suppl. 2): 33-50

- [7] 吕玉红,郭瑞瑞,孙心悦,等.肠道菌群利用膳食纤维及其与人体健康关系研究进展[J].中国酿造,2021,40(3):6-10
- [8] Cui R, Oates C G. The effect of amylose-lipid complex formation on enzyme susceptibility of sage starch [J]. Food Chem, 1999, 65(4): 417-425
- [9] Zhao Y S, Ai Y F, Li L, et al. Inhibition of azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the rat colon by a stearic acid complexed high-amylose cornstarch using different cooking methods and assessing potential gene targets [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 6: 499-512
- [10] 项丰娟,秦仁炳,王硕,等.淀粉-脂质复合物制备及其体外益生作用[J].天津科技大学学报,2020,35(4):14-20
- [11] Annor G A, Marcone M, Corredig M, et al. Effects of the amount and type of fatty acids present in millets on their *in vitro* starch digestibility and expected glycemic index (eGI) [J]. Journal of Cereal Science, 2015, 64: 76-81
- [12] Chang F, He X, Huang Q. The physicochemical properties of swelled maize starch granules complexed with lauric acid [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(2): 365-372
- [13] De Pilli T, Derossi A, Talja R A, et al. Study of starch-lipid complexes in model system and real food produced using extrusion-cooking technology [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12(4): 610-616
- [14] Karkalas J, Ma S, Morrison W R, et al. Some factors determining the thermal properties of amylose inclusion complexes with fatty acids [J]. Carbohydrate Research, 1995, 268(2): 233-247
- [15] Nara S, Komiya T. Studies on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch [J]. Starch-Stärke, 1983, 35(12): 407-410
- [16] Ao Z H, Jane J L. Characterization and modeling of the A- and B-granule starches of wheat, triticale, and barley [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 67(1): 46-55
- [17] Jia X Z, Sun S W, Chen B Y, et al. Understanding the crystal structure of lotus seed amylose-long-chain fatty acid complexes prepared by high hydrostatic pressure [J]. Food Research International, 2018, 111: 334-341
- [18] Xie Z, Wang S, Wang Z, et al. *In vitro* fecal fermentation of propionylated high-amylose maize starch and its impact on gut microbiota [J]. Carbohydr Polym, 2019, 223: 115069
- [19] Rose D J, Patterson J A, Hamaker B R. Structural differences among alkali-soluble arabinoxylans from maize (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*), and wheat (*Triticum aestivum*) brans influence human fecal fermentation profiles [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(1): 493-499
- [20] Guan N N, He X W, Wang S K, et al. Cell wall integrity of pulse modulates the *in vitro* fecal fermentation rate and microbiota composition [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(4): 1091-1100
- [21] Deehan E C, Yang C, Perez-Munoz M E, et al. Precision microbiome modulation with discrete dietary fiber structures directs short-chain fatty acid production [J]. Cell Host & Microbe, 2020, 27(3): 389-404
- [22] Chang F, He X, Huang Q. The physicochemical properties of swelled maize starch granules complexed with lauric acid [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(2): 365-372
- [23] Shrestha A K, Ng C S, Lopez-Rubio A, et al. Enzyme resistance and structural organization in extruded high amylose maize starch [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 699-710
- [24] Brisson J, Chanzy H, Winter W T. The crystal and molecular structure of VH amylose by electron diffraction analysis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1991, 13(1): 31-39
- [25] Kawai K, Takato S, Sasaki T, et al. Complex formation, thermal properties, and *in-vitro* digestibility of gelatinized potato starch-fatty acid mixtures [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27(1): 228-234
- [26] Kanicky J R, Shah D O. Effect of degree, type, and position of unsaturation on the pK(a) of long-chain fatty acids [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2002, 256(1): 201-207
- [27] Zhang B, Huang Q, Luo F, et al. Structural characterizations and digestibility of debranched high-amylose maize starch complexed with lauric acid [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(1): 174-181
- [28] Wongsagonsup R, Varavinit S, Bemiller J N. Increasing slowly digestible starch content of normal and waxy maize starches and properties of starch products [J]. Cereal Chemistry, 2008, 85(6): 738-745
- [29] Li L, Jiang H X, Campbell M, et al. Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches. Part I: Relationship between resistant starch contents and molecular structures [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(3): 396-404
- [30] Marinopoulou A, Papastergiadis E, Raphaelides S N, et al. Structural characterization and thermal properties of amylose-fatty acid complexes prepared at different temperatures [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 58: 224-234
- [31] Hamaker B R, Tuncil Y E. A perspective on the complexity

- of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(23): 3838-3850
- [32] 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): H137-142
- [33] Candido F G, Valente F X, Grzeskowiak L M, et al. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2018, 69(2): 125-143
- [34] Fuentes-Zaragoza E, Sanchez-Zapata E, Sendra E, et al. Resistant starch as prebiotic: A review [J]. *Starch-Starke*, 2011, 63(7): 406-415
- [35] Fukui H. Role of gut dysbiosis in liver diseases: what have we learned so far? [J]. *Diseases (Basel, Switzerland)*, 2019, 7(4): 58
- [36] Sun Q, Zhu L, Li Y, et al. A novel inulin-type fructan from *Asparagus cochinchinensis* and its beneficial impact on human intestinal microbiota [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 247: 161
- [37] Meehan C J, Beiko R G. A phylogenomic view of ecological specialization in the *Lachnospiraceae*, a family of digestive tract-associated bacteria [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2014, 6(3): 703-713
- [38] Vital M, Howe A C, Tiedje J M. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta) genomic data [J]. *mBio*, 2014, 5(2): 11
- [39] Brahma S, Martínez I, Walter J, et al. Impact of dietary pattern of the fecal donor on *in vitro* fermentation properties of whole grains and brans [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 29: 281-289
- [40] Tian Y, Nichols R G, Roy P, et al. Prebiotic effects of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) feeding on succinate and intestinal gluconeogenesis in C57BL/6 mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 45: 223-232
- [41] Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, et al. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of *Prevotella* [J]. *Cell Metabolism*, 2015, 22(6): 971-982
- [42] Leylabadlo H E, Ghotaslou R, Feizabadi M M, et al. The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 12
- [43] Afouda P, Dubourg G, Tomei E, et al. *Dialister massiliensis* sp. nov. a new bacterium isolated from the human gut [J]. *New Microbes and New Infections*, 2020, 34: 10065