

黑米花色苷的酰基化及产物对肠道菌群的益生作用

王慕文, 孙汉巨*, 刘淑芸

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230000)

摘要: 该研究以癸酸为酰基供体, 对黑米矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 (C3G) 酶法修饰。半制备型高效液相色谱 (Semi-HPLC) 用于纯化产物, 质谱 (MS) 用于鉴定产物的结构。结果表明, 酰化反应发生在 C3G 的葡萄糖苷上, 单酰化产物为矢车菊素-3-O-(6"癸酰)葡萄糖苷 (ACD)。通过体外模拟消化试验分析 ACD 在消化过程中的稳定性。并在体外发酵中, 研究它对肠道菌群的调节作用及对短链脂肪酸 (SCFAs) 和乳酸产生的影响。结果表明, ACD 在模拟唾液、胃和小肠液中几乎不被消化。体外发酵 24 h 后, ACD 的总含量从 96.83 mg/L 降至 23.20 mg/L。ACD 显著增加了双歧杆菌属和阿里松氏菌属的相对丰度, 降低了普氏菌属、小类杆菌属、巨单胞菌属和梭状芽孢杆菌属的相对丰度, 而且促进了 SCFAs 的产生。它不仅对肠道菌群表现出比 C3G 更好的动态和多重调节作用, 而且在促进 SCFAs (乙酸、丙酸和丁酸) 的产生方面表现出与菊粉相似的作用, 为酰化花色苷作为益生元在食品中的应用提供理论依据。

关键词: 黑米; 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷; 癸酸; 酶法酰化; 肠道菌群; 消化

文章编号: 1673-9078(2023)03-18-26

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0420

Acylation of Anthocyanins from Black Rice and Probiotic Effect of the Product on Intestinal Microflor

WANG Muwen, SUN Hanju*, LIU Shuyun

(School of Food and Bioengineering, Hefei University of Technology, Hefei 230000, China)

Abstract: In this study, cyanidin-3-O-glucoside (C3G) from black rice was enzymatically modified with capric acid as the acyl donor. Semi-preparative high performance liquid chromatography (Semi-HPLC) was used to purify the product, and mass spectrometry (MS) was used to identify the structure of the product. The results indicated that the acylation occurred to the glucoside of C3G, and the monoacylated product was cyanidin-3-O-(6" decanoyl) glucoside (ACD). The *in vitro* simulated digestion was used to examine the stability of ACD indigestion. Moreover, through *in vitro* fermentation, its regulation of intestinal microflora and effects on the production of short-chain fatty acids (SCFAs) and lactate were investigated. The results indicated that ACD was hardly digested in the simulated saliva, stomach and small intestinal fluid. After 24 h of *in vitro* fermentation, the total content of ACD decreased from 96.83 mg/L to 23.20 mg/L. ACD significantly increased the relative abundance of *Bifidobacterium* and *Arisonia*, decreased the relative abundance of *Prevotella*, *Bacteroides*, *Macromonas* and *Clostridium*, and promoted the production of SCFAs. It not only exhibited better dynamic and multiple regulatory effects on the intestinal microflora compared with C3G but also exhibited similar effects to inulin in promoting the production of SCFAs (acetate, propionate, and butyrate), which provides a theoretical basis for the application of acylated anthocyanins as prebiotics in food.

Key words: black rice; cyanidin-3-o-glucoside (C3G); capric acid; enzymatic acylation; intestinal flora; digestion

引文格式:

王慕文,孙汉巨,刘淑芸,等.黑米花色苷的酰基化及产物对肠道菌群的益生作用[J].现代食品科技,2023,39(3):18-26.

WANG Muwen, SUN Hanju, LIU Shuyun. Acylation of anthocyanins from black rice and probiotic effect of the product on intestinal microflor [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 18-26.

收稿日期: 2022-04-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31771974)

作者简介: 王慕文 (1997-), 女, 在读硕士生, 研究方向: 食品科学,

E-mail: 18742514809@163.com

通讯作者: 孙汉巨 (1966-), 男, 教授, 研究方向: 农产品的综合利用, E-mail:

13721047442@163.com

人体的肠道尤其是结肠中, 栖息着大量的细菌。据估计, 人体肠道菌群中约有 10^{14} 个细菌。肠道菌群是一个复杂的系统, 在维持人体健康方面起着重要作用^[1]。它主要由厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、梭杆菌门和疣菌门组成。厚壁菌门和拟杆菌门是肠道中最丰富的 2 个门 (占肠道菌群的 90%)^[2]。

已知多种疾病与肠道菌群紊乱相关,例如肥胖症,糖尿病,炎症性肠病和自闭症等^[3]。因此,改善肠道菌群紊乱,调节肠道菌群的组成向对人体有益的方向进行是目前研究的重点。

花色苷是花青素(花色素)与糖以糖苷键结合而形成的一类化合物,广泛存在于植物的花、果实、茎、叶和根器官的细胞液中,使其呈现由红、紫红到蓝等不同颜色^[4]。花色苷具有许多生物活性,包括抗氧化、抗炎、抗肿瘤以及预防肥胖、糖尿病和心血管疾病等多种慢性病的作用^[5-7]。花色苷对人体肠道菌群有明显的影响,可以通过促进双歧杆菌和乳杆菌等有益菌的增殖^[8]和抑制产气荚膜梭状芽孢杆菌和沙门氏菌等有害菌的生长^[9]来改变肠道菌群的组成。但由于天然花色苷容易受到外界因素的影响而降解,它们在影响人体肠道菌群组成、促进健康方面的作用是有限的。因此,需要采用一些方法来提高它们的稳定性及生物活性。

近年来,酰化在改善其稳定性和提升其生物活性方面取得了实质性进展。不同链长的脂肪酸已被应用于花色苷的酰化,例如来自高山熊果的C3G^[10]、来自红酒的锦葵素-3-O-葡萄糖苷^[11]来自黑醋栗的飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-O-芦丁苷、C3G和矢车菊素-3-O-芸香苷^[10]。Marta等^[12]还证实由不同链长的饱和脂肪酸酰化的C3G的热稳定性,pH耐受力和脂溶性都显著优于未酰化的C3G。Yang等^[13]也证实月桂酸修饰黑米C3G后提升了其抗氧化力。然而,迄今为止,对酰化花色苷的研究主要集中在其合成方法及其稳定性的变化上。关于其他特性的研究很少,例如它们的生物利用度和对调节肠道菌群组成的能力。

黑米被认为是最丰富的花色苷天然来源之一,在所有有色谷物中花色苷含量最高。黑米中主要的未酰化花色苷是C3G,约占其花色苷含量的88%^[14]。基于本课题组的前期研究,以癸酸作为酰基供体,Novozym 435脂肪酶作为催化剂,对从黑米中提取的C3G进行酶法酰化。Semi-HPLC和MS被用来纯化和鉴定酰化产物。体外消化模型用于研究在模拟口腔、胃和小肠环境下花色苷的含量变化。通过厌氧发酵和高通量测序评估两种花色苷对人体肠道菌群的影响。此外,还通过气相色谱(GC)检测它们对培养基中SCFAs和乳酸的产生的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑米花色苷提取物(含C3G 35%),天津康友生物科技有限公司;Novozym 435脂肪酶($\geq 10\ 000$ U/g),

生物级,丹麦诺维信Novozymes有限公司; α -淀粉酶(2 000 U/g)、胃蛋白酶($> 3\ 000$ U/mg)和胰蛋白酶(250 000 U/g),生物级,上海源叶生物科技有限公司;菊粉、癸酸、叔戊醇、乙腈、正庚烷、乙酸乙酯、甲醇、NaCl、KCl、HCl、CaCl₂、NaHCO₃、CH₃COONa和NaOH,分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

HP Plus 100D半制备液相色谱仪,苏州利德科技有限公司;VT 05404-0998酶标仪,美国BioTek仪器公司;ZHWHY-200B恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;YQX III厌氧培养箱,上海万锐实验室设备有限公司。

1.3 ACD的制备

根据前述方法纯化黑米花色苷^[15]。用甲醇溶解黑米花色苷提取物至浓度4 mg/mL,通过半制备高效液相色谱仪分离C3G。流动相:A为10%甲酸水溶液,B为甲醇:甲酸:乙腈:水=25:25:10:40。洗脱条件:0~8 min,16%~20% B;8~11 min,20%~38% B;11~25 min,38%~46% B;25~27 min,46%~85% B;27~34 min,85% B;34~35 min,85%~16% B;35~45 min,16% B,流速:10 mL/min。减压蒸发除去纯化物中有机溶剂,冷冻干燥得到C3G(纯度95.93%)。将C3G、癸酸、Novozym 435脂肪酶及25 mL三角瓶在37 °C的烘箱中干燥24 h。将100 g已活化4A分子筛加入100 mL叔戊醇中,静置48 h,干燥备用。在三角瓶中加入11.23 mg C3G,0.26 g癸酸,5 mL叔戊醇,100 mg Novozym 435脂肪酶,最后加入0.50 g干燥活化后的4A分子筛以吸收反应过程中生成的水。将上述反应体系置于恒温培养振荡器中,在56 °C、100 r/min下反应28 h。反应结束后,过滤除去酶和分子筛,并在真空下蒸发除去溶剂。将干物质溶于乙腈/正庚烷(2/5, V/V),待其充分分层后,取乙腈层,减压蒸发得到酰化产物。用20%的酸化甲醇水溶液溶解上述干物质,并通过装有EP-C18M反相硅胶(10 μ m, 250 mm \times 10 mm)的Semi-HPLC纯化。流动相:A为10%甲酸水溶液,B为乙腈。洗脱条件:0~5 min,5%~10% B;5~10 min,10% B;10~17 min,10%~24% B;17~27 min,24%~90% B;27~30 min,90% B;30~35 min,90%~5% B;35~45 min,5% B。流速:10 mL/min。纯化物通过MS进行鉴定。MS条件:离子模式为N₂雾化气,N₂干燥气,毛细管温度350 °C,正离子模式下毛细管电压3 kV。MS扫描范围为50至1 000 m/z 。得到的C3G及ACD冷冻干燥后保存备用。

1.4 花色苷含量的测定

花色苷的含量是通过 pH 示差法测定的^[16]。将 0.4 mL 样品溶液分别与 3.6 mL 0.025 mol/L KCl 溶液 (pH 值 1.0) 和 0.4 mol/L 醋酸钠溶液 (pH 值 4.5) 混合, 以蒸馏水为空白, 在 519 nm 处测量溶液的吸光度 (Abs)。总花色苷含量根据以下公式计算:

$$C = \frac{A \times Mw \times DF \times 1000}{\varepsilon \times l} \quad (1)$$

式中:

C ——总花青素含量, mg/mL;

A —— Abs_{519} (pH 值 1.0) - Abs_{519} (pH 值 4.5);

Mw ——C3G 和 ACDs 的相对分子量 (C3G, 449.4 g/mol; ACD, 603.6 g/mol);

DF ——稀释倍数, 60;

ε ——消光系数, 26 900 L/(cm mol);

l ——光路的长度, 1 cm。

1.5 模拟唾液消化

模拟唾液消化的程序根据前述方法^[17]设定。首先, 将 0.012 g NaCl、0.015 g KCl、0.100 g 粘蛋白和 0.200 g α -淀粉酶溶解在 100 mL 去离子水中以制备人工唾液。然后, 将 3 mL 人工唾液与 3 mL 花色苷溶液 (0.1 mg/mL) 混合。将混合物在 37 °C, 60 r/min 的恒温培养振荡器中培养。在消化过程中, 分别在 0、0.5、1、2 和 4 h 取出 1 mL 混合物, 并与 2 mL 甲醇 (0.1% HCl 酸化) 混合以灭活 α -淀粉酶。总花色苷含量采用分光光度法 pH 示差法测定。

1.6 模拟胃消化

模拟胃消化的程序根据前述方法^[18]设定。首先, 将 0.310 g NaCl、0.110 g KCl、0.015 g CaCl₂、0.060 g NaHCO₃、1 mL CH₃COONa (1.0 mol/L, pH 值 5.0) 和 23.600 g 胃蛋白酶溶解在 100 mL 去离子水中, 并用 0.1 mol/L HCl 溶液将所得溶液 pH 调至 3, 得到模拟胃介质。然后, 将 5 mL 模拟胃介质与 5 mL 花色苷溶液 (0.1 mg/mL) 混合。将混合物在 37 °C, 60 r/min 的恒温培养振荡器中培养。在消化过程中, 溶液的 pH 值保持在 3。分别在 0、0.5、1、2、4 和 6 h 取出 1 mL 混合物, 并与 2 mL 甲醇 (0.1% HCl 酸化) 混合以灭酶。总花色苷含量采用分光光度法 pH 示差法测定。

1.7 模拟小肠消化

模拟肠道消化的程序根据前述方法^[19]设定。首先将 0.540 g NaCl、0.065 g KCl 和 0.033 g CaCl₂ 溶于

100 mL 去离子水中, 并用 0.100 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7, 得到小肠电解液。然后, 将 20 g 小肠电解质溶液与 20 g 胰酶溶液 (7%, m/m)、2.600 mg 胰蛋白酶混合。用 0.1 mol/L NaOH 溶液将溶液的 pH 值调至 7.5, 得到模拟小肠培养基。最后, 将 1.5 mL 模拟小肠培养基与 5 mL 胃消化液混合 6 h (pH 值调至 7)。按照上述模拟胃消化的方法进行模拟小肠消化。总花色苷含量采用分光光度法 pH 示差法测定。

1.8 模拟体外厌氧发酵

模拟大肠发酵的程序根据前述方法^[20]设定。首先, 从 6 名至少 3 个月未服用抗生素的健康志愿者 (3 男 3 女, 22~28 岁) 中收集用于实验的新鲜粪便。用灭菌的改良生理盐水 (含 NaCl 8.5 g/L 和半胱氨酸盐酸盐 0.5 g/L) 把粪便稀释 10 倍, 搅拌均匀, 并在 4 °C, 500 r/min 下离心 5 min。所得上清液用作后续发酵中的粪便浆液。粪便浆液的微生物群落组成记录为 OR。用适量已高压灭菌的基础营养生长培养基 (含蛋白胨 2 g/L、酵母提取物 2 g/L、NaCl 0.10 g/L、K₂HPO₄ 0.04 g/L、MgSO₄ 0.01 g/L、CaCl₂ 0.01 g/L、NaHCO₃ 2 g/L、氯化血红素 0.02 g/L、半胱氨酸盐酸盐 0.50 g/L、胆汁盐 0.50 g/L、刃天青 1 mg/L、吐温 80 2 mL/L 和维生素 K₁ 10 μ L/L) 溶解花色苷和菊粉, 并用 0.22 μ m 水系针孔滤膜过滤除菌。最后, 加入已灭菌培养基至最终花色苷和菊粉浓度分别为 1 g/L 和 10 g/L。将 1 mL 粪便悬浮液加入三角瓶中 9 mL 含有花色苷 (记为 C3G 和 ACD) 或菊粉 (记为 INL) 的营养生长培养基中进行体外发酵。不含任何其他碳源的基础营养生长培养基用作空白对照 (记为 BLK)。将三角形瓶置于厌氧培养箱中, 在 37 °C 下培养 24 h。

1.9 肠道菌群分析

体外厌氧发酵 24 h 后, 进行 16S rRNA 测序, 将样品在 -20 °C 和干冰保存下发送至上海欧易生物有限公司遗传与基因组分析中心。使用细菌特异性引物 343F(5'-TACGGRAGGCAGCAG-3')和 798R(5'-AGGG TATCTAATCCT-3')扩增 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区。在对文库进行定量、混合和质量检查后, 在 Illumina Miseq 平台上进行高通量测序。所有结果均基于测序读数和操作分类单元 (OTU)。

1.10 SCFAs 和乳酸含量的测定

采用气相色谱法 (GC) 测定各组发酵液中 SCFAs 包括乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸和异戊酸的含量。在 GC 分析之前, 样品用 HCl 溶液酸化。气

相色谱分析条件为: HP-INNOWAX 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm), 火焰离子化检测器 (FID), N₂ 为载气, 流速 19.0 mL/min; 在最初的 1 min 内, 柱温保持在 100 °C; 1~16 min, 柱温以 5 °C/min 上升至 180 °C; 16~20 min, 柱温保持在 180 °C。乳酸含量通过乳酸测定试剂盒进行检测。

1.11 数据分析

使用 OriginPro 8.5 软件作图, 数值以平均值±SD 表示。当获得的 $P < 0.05$ 时, 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 ACD 的制备

通过 Semi-HPLC 从产物中纯化酰化 C3G, 酰化效率为 32.30%, 酰化物纯度为 96.25%。(图 1a)。在 9.83 min 处, 有一个明显的 C3G 峰, MS₁ 为 449, MS₂ 为 287 (图 1b)。在 21.16 min 的另一个峰被认为是酰化 C3G。如图 1c 所示, MS₁ 中出现了一个 M⁺ 为 603 的分子离子信号峰, 这正是 C3G 与一个癸酸分子通过酯键连接后的物质的相对分子质量, 表明酰化反应生成了单酰化产物。此外, 在 MS₂ 中出现了另一个 m/z 为 287 的分子离子信号峰, 这是一个矢车菊素的分子量。该信号的出现表明酰化发生在葡萄糖苷的羟基上, 而不是 C3G 的苷元矢车菊素上。根据以上结果, 可以推测该反应为定向反应, 生成单酰化产物。结合前人关于饱和脂肪酸对 C3G 的修饰位点研究, 该酰化产物为矢车菊素-3-O (6''癸酰) 葡萄糖苷 (ACD)。

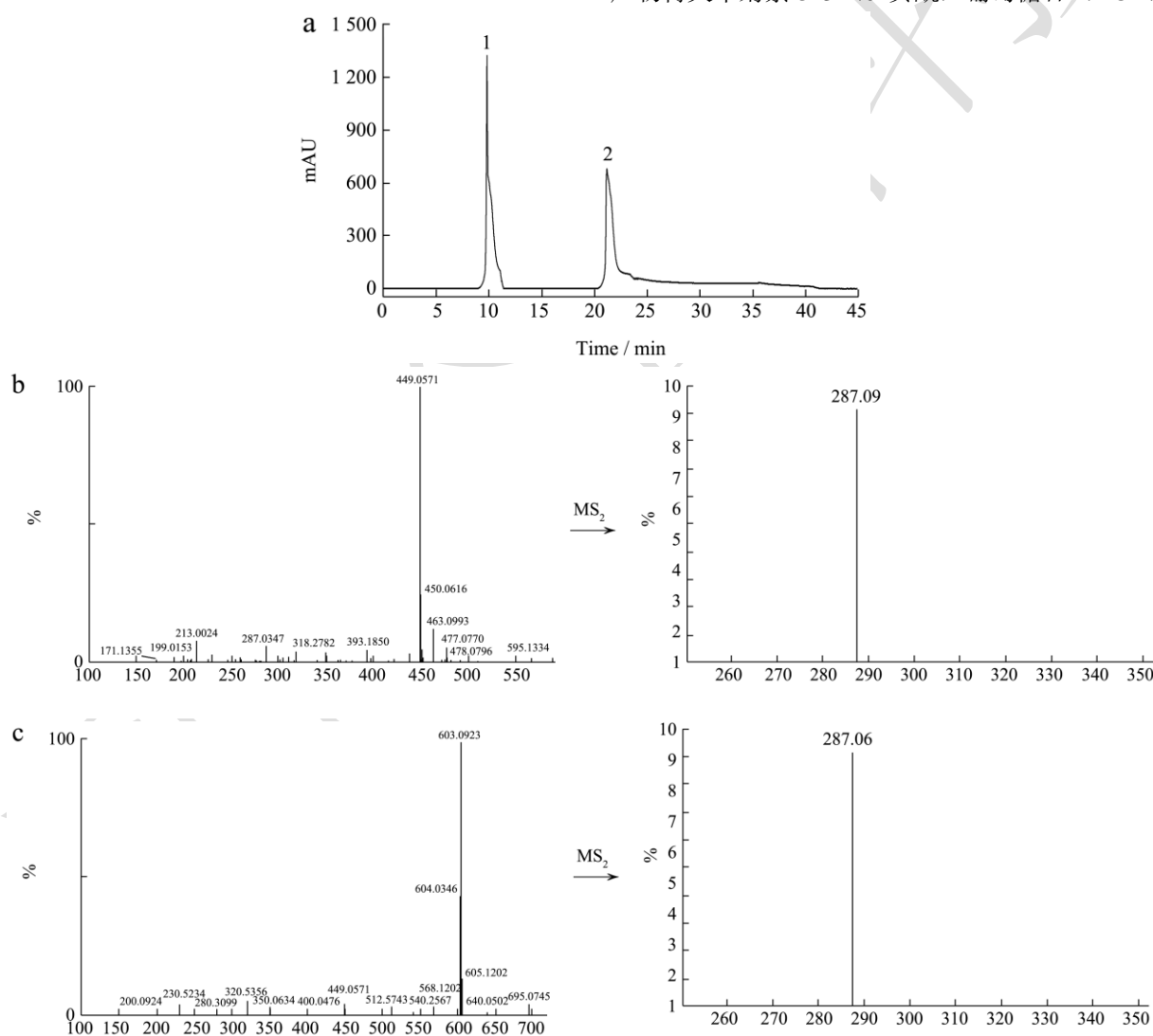


图1 获得 C3G 和 ACD 的反应产物的半制备 HPLC (a), 从峰 1 (b) 收集的 C3G 和从峰 2 (c) 收集的 ACD 的 MS1 和 MS2

Fig.1 Semi-preparative HPLC of the reaction product to obtain C3G and ACD (a), the MS1 and MS2 spectra of C3G collected from peak 1 (b) and ACD collected from peak 2 (c)

2.2 花色苷在模拟口腔、胃、小肠液和体外发酵中的消化

C3G 及 ACD 在模拟口腔、胃、小肠和体外发酵过程中含量的变化见表 1。总体可见，在模拟口腔、胃及小肠消化过程，C3G 和 ACD 的总含量没有显著差异。因此，可以认为，C3G 和 ACD 在口腔、胃和小肠中没有被消化。与未修饰的 C3G 相比，ACD 在口腔（下降 0.90%）、胃（下降 1.30%）和小肠（下降 1.60%）中的稳定性略有提升。已有的研究证实，只有一小部分花色苷会在口腔、胃和小肠中被吸收，大部分花色苷进入结肠并在结肠中被肠道菌群代谢^[21]。脂肪酸酰化可实现 ACD 的分子内共色，并形成“夹心”或“三明治”结构。ACD 结构还拥有呈带状的可折叠糖链，可将癸酸置于 2-苯并吡喃骨架的表面。这种堆积作用可以抵抗消化过程中的亲核攻击和 ACD 的自身降解反应^[22]。这可能是 ACD 在上消化道中表现出比 C3G 更稳定性的原因。体外发酵 24 h 后，C3G 和 ACD 的总含量显著降低，分别从 98.20 和 96.83 mg/L 降至

22.40 和 23.20 mg/L。结果表明，C3G 和 ACD 在结肠内可能被肠道菌群代谢，从而产生代谢产物被微生物利用^[23,24]。因此，我们进一步研究了它们对肠道菌群的影响，以探究它们的体内益生元活性。

2.3 体外发酵引起的肠道菌群的总体差异

在 OTU 水平上比较了肠道菌群的总体差异，结果如图 2 所示。体外发酵 24 h 后，与 BLK 组相比，C3G、ACD 及 INL 组的肠道菌群组成发生了显著变化。此外，基于主成分分析（图 2a），C3G 和 ACD 组与 INL 组的肠道菌群组成接近。作为益生元，菊粉已被证实能够通过调节宿主的肠道菌群，例如促进双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖，降低肠道内不良菌群的比例，进而实现降血脂、抗炎等作用^[25]。以上结果表明，像菊粉作为益生元一样，从黑米花色苷中分离的 C3G 及其癸酸酰化物 ACD 可能调节肠道菌群的组成向有益方向进行。如图 2b 所示，在肠道菌群的组成中，C3G 组与 INL 组最相似，ACD 组与 INL 组第二相似，而 BLK 组和 OR 组与 INL 差异最大，与主成分分析结果一致。

表 1 不同消化和发酵时间下样品中花色苷的含量 (mg/L)

Table 1 Contents of anthocyanins in samples under different digestion and fermentation times (mg/L)

时间/h	模拟口腔消化		模拟胃消化		模拟小肠消化		体外发酵	
	C3G	ACD	C3G	ACD	C3G	ACD	C3G	ACD
0	96.97±0.59 ^a	96.97±0.59 ^a	96.67±0.42 ^a	96.33±0.12 ^a	97.20±0.35 ^a	96.63±0.20 ^a	98.10±0.20 ^a	96.83±0.62 ^a
0.5	96.57±0.40 ^a	96.90±0.36 ^a	96.33±0.15 ^a	96.51±0.21 ^a	97.33±0.31 ^a	96.55±0.30 ^a	/	/
1	96.30±0.10 ^a	96.47±0.49 ^a	96.10±0.10 ^a	96.23±0.12 ^a	96.77±0.12 ^a	96.31±0.54 ^a	/	/
2	95.67±0.58 ^a	96.23±0.15 ^a	96.23±0.49 ^a	95.97±0.15 ^a	96.83±0.29 ^a	96.40±0.42 ^a	/	/
4	95.40±0.20 ^a	96.13±0.06 ^a	95.93±0.40 ^a	95.19±0.26 ^a	96.90±0.46 ^a	95.23±0.40 ^a	/	/
6	/	/	95.97±0.25 ^a	95.09±0.06 ^a	96.92±0.65 ^a	95.13±0.15 ^a	29.13±0.25 ^b	27.94±0.52 ^b
12	/	/	/	/	/	/	25.20±0.26 ^c	26.28±0.72 ^c
24	/	/	/	/	/	/	22.40±0.46 ^d	23.20±0.24 ^d
对照	96.97±0.15 ^a	96.93±0.47 ^a	96.50±0.26 ^a	96.36±0.33 ^a	97.6±0.42 ^a	96.47±0.29 ^a	97.60±0.40 ^a	96.77±0.38 ^a

注：同列右侧不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

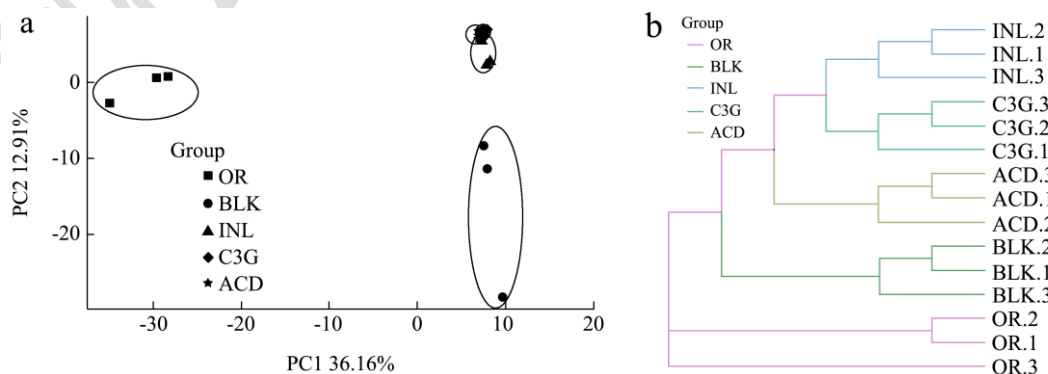


图 2 基于主成分分析 (a) 和聚类分析 (b) 的微生物群落结构差异

Fig.2 Deference of microbial community structure based on principal component analysis (a) and cluster analysis (b)

2.4 ACD 对肠道菌群组成的影响

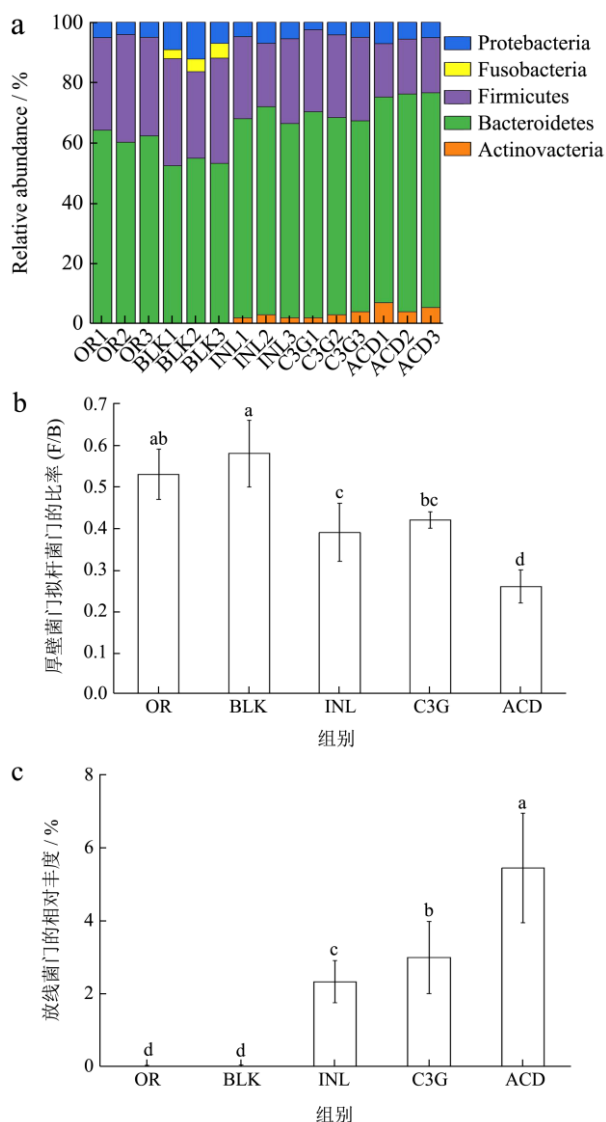


图3 门水平上的OR、BLK、INL、C3G和ACD组的微生物组成

Fig.3 Microbial compositions of OR, BLK, INL, C3G and ACD group at phylum level

注: a为微生物组成柱状图; b为厚壁菌门/拟杆菌门的比率; c为放线菌门的相对丰度。不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$), 图5同。

在门的水平上, 肠道菌群主要由拟杆菌门 (Bacteroidetes), 厚壁菌门 (Firmicutes), 放线菌门 (Actinovacteria), 变形菌门 (Proteobacteria) 和梭杆菌门 (Fusobacteria) 组成 (图3a)。如图3b所示, 与OR组 (0.53) 和BLK组 (0.58) 相比, INL组 (0.39)、C3G组 (0.42) 和ACD组 (0.26) 的厚壁菌门和拟杆菌门的比率显著地下降。厚壁菌门和拟杆菌门的比率

与肥胖症等代谢疾病息息相关, 患有肥胖症的小鼠的厚壁菌门和拟杆菌门的比比较大^[26]。这说明与菊粉相似, C3G和ACD可能通过调节肠道菌群的组成改善肥胖症。此外, 如图3c所示, C3G和ACD组的放线菌门相对丰度分别为3.00%和5.45%, 显著高于其他3组。膳食纤维和益生菌可以促进类杆菌门和放线菌门的生长, 抑制厚壁菌门的生长, 从而达到预防肥胖症的作用^[27]。C3G和ACD组放线菌门丰度的上升进一步证实了C3G和ACD具有潜在的抗肥胖作用。ACD在降低厚壁菌门和拟杆菌门的比率, 提高放线菌门的相对丰度方面具有比C3G更好的作用, 说明癸酸的接入可以使ACD更好地改善肥胖症。

在属水平上, 肠道菌群主要由拟杆菌属 (*Bacteroides*), 普氏菌属 (*Prevotella*), 双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*), 粪杆菌属 (*Faecalibacterium*), 阿里松氏菌属 (*Allisonella*), 小类杆菌属 (*Dialister*), 巨单胞菌属 (*Megamonas*), 大肠杆菌/志贺菌属 (*Escherichia/Shigella*), 副杆菌属 (*Parabacteroides*), 严格意义上的梭菌属 (*Clostridium_sensu_stricto*), 梭杆菌属 (*Fusobacterium*) 和梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium_XIVa*) 组成 (图4)。与OR组相比, ACD显著增加了双歧杆菌属和阿里松氏菌属的相对丰度 (图5a和b)。双歧杆菌被认为是与人类健康相关的最重要的细菌群之一, 可以增强肠道屏障功能, 完善宿主免疫系统, 预防腹泻或过敏, 参与维生素的产生和调节脂质代谢^[28]。此外, ACD还降低了普氏菌属、小类杆菌属、巨单胞菌属和梭状芽孢杆菌属的相对丰度 (图5c~f)。其中, 小类杆菌属和梭状芽孢杆菌属是临床重要的条件致病菌, 可能导致阑尾炎、腹膜炎和和肛门脓肿等疾病^[29]。

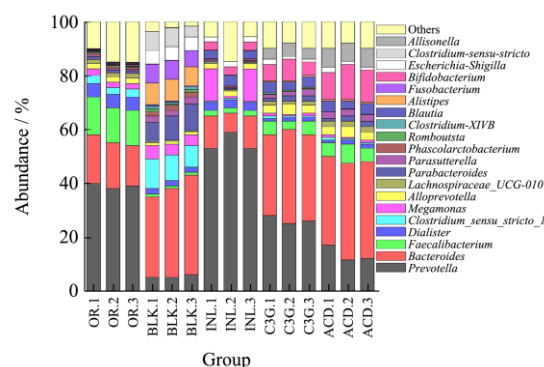


图4 属级微生物组成柱状图

Fig.4 Column diagram of microbial composition at genus level

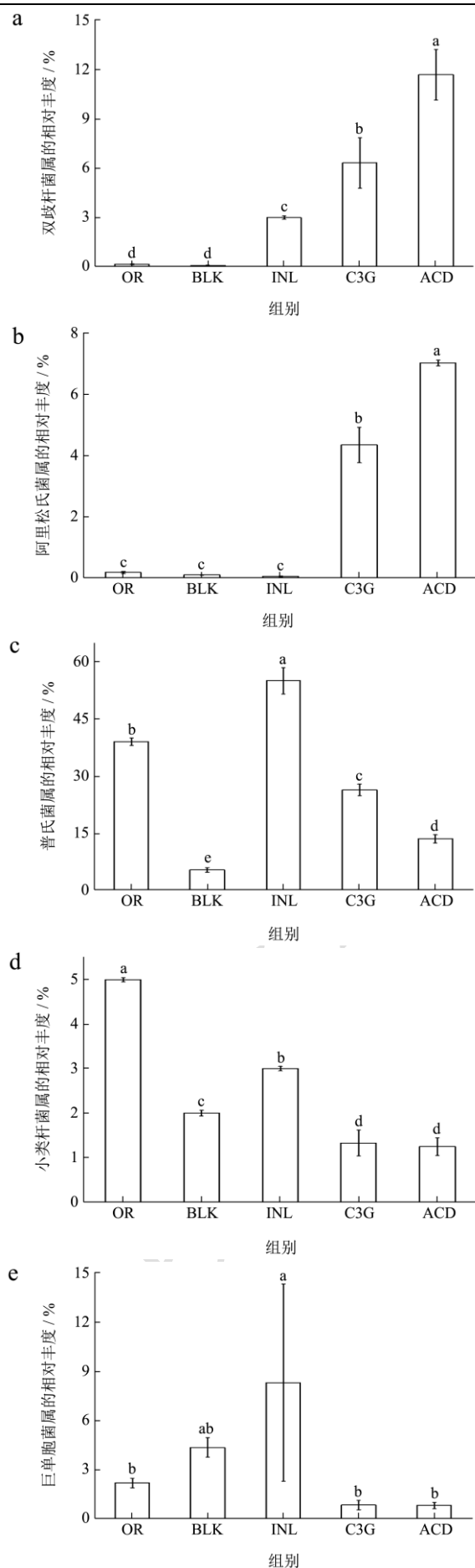


图5 属级微生物组成

Fig.5 Microbial composition at genus level

2.5 ACD 对 SCFAs 和乳酸产生的影响

体外发酵过程中, 各组 SCFAs、乳酸及总酸的变化如表 2 所示。各组乙酸、丙酸、正丁酸和乳酸在体外发酵 24 h 后均显著增加。此外, 异丁酸、正戊酸和异戊酸的含量相对较低。体外培养 24 h 后, OR、BLK、INL、C3G 和 ACD 组的总酸浓度分别增加 1.89、16.24、46.79、41.22 和 43.47 mmol/L。INL 组的总酸浓度提升最多, 其次是 ACD 和 C3G 组, BLK 和 OR 组的总酸浓度提升较少。SCFAs 和乳酸是由肠道厌氧微生物发酵膳食中的益生元产生的最终产物, 这些小分子酸可以促进营养物质的摄入, 有助于结肠和机体健康。同时, SCFAs 可以改变一些代谢途径, 如能量调节、脂质代谢和脂肪代谢^[30]。体外发酵 24 h 后, ACD 组的双歧杆菌的相对丰度显著上升 (图 5a)。乙酸是双歧杆菌代谢菊粉或花色苷的最终产物, 乙酸含量的增加与双歧杆菌相对丰度的增加有关^[20]。高浓度的乙酸可以促进 AMP 激酶的表达并抑制脂肪合成, 因此乙酸与体重调节密切相关^[31]。类似地, 丙酸也被证明能增加饱腹感, 从而减少能量摄入并降低体重。丁酸可以通过提高胰岛素敏感性增加能量消耗, 也是结肠的主要能量来源, 参与维持健康的结肠粘膜。放线菌门水平下的几种细菌被确定为丁酸的产生菌^[32]。因此, ACD 组丁酸浓度增加可能是由于放线菌相对丰度的增加。乳酸也是一种重要的酸, 容易被细菌转化为 SCFAs, 是体外发酵过程中形成乙酸、丙酸和丁酸的关键中间体, 乙酸、丙酸和丁酸的增加通常伴随着其减少。本研究中, 各组 SCFAs、乳酸及总酸的变化趋势与肠道菌群组成的关系与文献报道的结果基本一致。总的来说, ACD 与菊粉具有相似的益生元作用, 通过调节肠道菌群的组成促进 SCFAs 和乳酸的产生。肠道菌群代谢产生的 SCFAs 不仅可以作为能量来源, 而且在减肥降脂等方面发挥了重要作用。此外, ACD 不仅对产生 SCFAs 的肠道菌群有单一的抑制或促进

作用,在促进一些微生物群的同时也抑制了一些微生物群。在本研究的 ACD 组中,与乙酸生产相关的双歧杆菌属被促进,而小类杆菌属、巨单胞菌属和梭状芽孢杆菌属的相对丰度降低(图 5a、d、e 和 f)。其中,

小类杆菌属是产生丙酸的主要菌属之一,巨单胞菌属是一种与 SCFAs 产生相关的细菌,与乳酸含量呈正相关,梭状芽孢杆菌属是能产生丁酸^[21]。因此,ACD 对肠道菌群的调节是一个动态的多元的结果。

表 2 体外发酵过程中短链脂肪酸、乳酸和总酸的含量 (nmol/L)

Table 2 Contents of SCFAs, lactic acid and total acids in fermentation *in vitro* (mmol/L)

组别	时间/h	乙酸	丙酸	异丁酸	正丁酸	异戊酸	正戊酸	乳酸	总酸
OR	0	3.13±0.12 ^d	0.59±0.10 ^c	0.00±0.00 ^e	0.13±0.01 ^d	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^a	0.60±0.09 ^{de}	4.45±0.13 ^f
	24	4.23±0.13 ^c	0.85±0.15 ^c	0.12±0.01 ^d	0.23±0.04 ^d	0.06±0.02 ^e	0.08±0.01 ^a	0.77±0.08 ^c	6.34±0.12 ^e
BLK	0	3.29±0.14 ^d	0.62±0.04 ^c	0.00±0.00 ^e	0.15±0.04 ^d	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^a	0.62±0.02 ^d	4.68±0.10 ^f
	24	9.81±0.02 ^b	4.67±0.09 ^b	0.10±0.02 ^d	3.28±0.30 ^c	1.57±0.11 ^a	1.12±0.13 ^d	0.38±0.02 ^f	20.92±0.68 ^d
INL	0	3.25±0.15 ^d	0.58±0.09 ^c	0.00±0.00 ^e	0.13±0.05 ^d	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^a	0.59±0.06 ^{de}	4.55±0.35 ^f
	24	19.30±0.30 ^a	13.4±0.17 ^a	0.55±0.04 ^a	8.98±0.17 ^a	0.92±0.08 ^b	7.96±0.23 ^a	0.49±0.06 ^{ef}	51.34±1.04 ^a
C3G	0	3.16±0.14 ^d	0.57±0.02 ^c	0.00±0.00 ^e	0.13±0.01 ^d	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^a	0.62±0.03 ^d	4.48±0.08 ^f
	24	19.16±0.14 ^a	12.22±0.11 ^b	0.33±0.04 ^c	8.17±0.15 ^b	0.33±0.11 ^d	4.49±0.15 ^c	1.00±0.10 ^b	45.70±0.64 ^c
ACD	0	3.12±0.12 ^d	0.57±0.02 ^c	0.00±0.00 ^e	0.13±0.01 ^d	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^a	0.58±0.02 ^d	4.40±0.11 ^f
	24	19.29±0.29 ^a	13.10±0.36 ^a	0.43±0.05 ^b	8.22±0.04 ^b	0.54±0.06 ^c	5.14±0.15 ^b	1.15±0.06 ^a	47.87±0.93 ^b

注: 同列右侧不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$)。

3 结论

C3G 及其癸酸酰化产物 ACD 在模拟口腔、胃和小肠中几乎没有被消化,但它们可以被结肠内的肠道菌群降解。它们能促进肠道有益细菌(如双歧杆菌)的生长,并通过肠道菌群产生 SCFAs,表现出与调节肠道菌群组成的益生元(菊粉)类似的作用。而且,经过癸酸修饰后,ACD 在胃肠道上部的稳定性有所提升,更多的到达结肠发挥作用。简言之,从黑米花色苷提取物中纯化的 C3G 对调节肠道菌群的组成具有有益的影响,癸酸酰化的 C3G 在提高其稳定性的基础上,具有更优的调节肠道菌群组成和促进 SCFAs 产生的作用。

参考文献

- [1] Clemente J, Ursell L, Parfrey L, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view [J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1258-1270.
- [2] Gill S R, Pop M, Deboy R T, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome [J]. *Science*, 2006, 312: 1355-1359.
- [3] 王晓旭,吴玲璐,张广中.从肠道菌群紊乱探讨炎症性皮肤病的发病机制[J].*中国中西医结合皮肤性病杂志*,2021, 20(5):522-525.
- [4] Escobar-Puentes A, Gurrola AG, Rincón S, et al. Effect of amylose/amylopectin content and succinylation on properties of corn starch nanoparticles as encapsulants of anthocyanins [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 250: 116972.
- [5] Cassidy A. Berry anthocyanin intake and cardiovascular health [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2018, 61: 76-82.
- [6] Piovezana G J V, Buttow R T C, Silveira S M S D, et al. The antiobesity effects of anthocyanins on mitochondrial biogenesis, inflammation and oxidative stress: A systematic review [J]. *Nutrition*, 2019, 66: 92-202.
- [7] Jiang X, Li X, Zhu C, et al. The target cells of anthocyanins in metabolic syndrome [J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2019, 59(6): 921-946.
- [8] 金缘,张左勇,刘淑芸,等.黑米矢车菊素-3-O-葡萄糖苷及其月桂酸酰化物对小鼠肠道免疫功能的影响[J].*食品安全质量检测学报*,2021,12(14):5742-5750.
- [9] Sun X, Zhou X, Wei C, et al. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens [J]. *Food Control*, 2018, 94: 155-161.
- [10] Yang, Wei, Kortensniemi, et al. Enzymatic Acylation of Anthocyanins isolated from alpine bearberry (*Arctostaphylos alpina*) and lipophilic properties, thermostability, and antioxidant capacity of the derivatives [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2018, 66(11): 2909-2916.
- [11] Cruz, Guimaraes, Araujo, et al. Malvidin 3-glucoside-fatty acid conjugates: from hydrophilic toward novel lipophilic derivatives [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2017, 65: 6513-6518.
- [12] Marta G, Nuno M, Victor D F, et al. Improvement of color

- stability of cyanidin-3-glucoside by fatty acid enzymatic acylation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(38): 10003-10010.
- [13] Yang X, Sun H, Li T, et al. Kinetics of enzymatic synthesis of cyanidin-3-glucoside lauryl ester and its physicochemical property and proliferative effect on intestinal probiotics [J]. *Biology*, 2020, 9(8): 1-17.
- [14] Hou Z, Qin P, Zhang Y, et al. Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics [J]. *Food Research International*, 2013, 50(2): 691-697.
- [15] He S, Lou Q, Shi J, et al. Water Extraction of Anthocyanins from black rice and purification using membrane separation and resin adsorption [J]. *Journal of Food Processing & Preservation*, 2017, 41(4): e13091.
- [16] Ravanfar R, Tamaddon A M, Niakousari M, et al. Preservation of anthocyanins in solid lipid nanoparticles: Optimization of a microemulsion dilution method using the Plackett-Burman and Box-Behnken designs [J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 573-580.
- [17] Xie M, Chen G, Hu B, et al. Hydrolysis of Dicafeoylquinic acids from *Ilex kudingcha* happens in the colon by intestinal microbiota [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2016, 64(51): 9624-9630.
- [18] Hu J, Nie S, Min F, et al. Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2): 1143-1150.
- [19] Chen D, Chen G, Wan P, et al. Digestion under saliva, simulated gastric and small intestinal conditions and fermentation in vitro of polysaccharides from the flowers of *Camellia sinensis* induced by human gut microbiota [J]. *Food & Function*, 2017, 8(12): 4619-4629.
- [20] Xie M, Chen G, Wan P, et al. Modulating effects of dicafeoylquinic acids from *Ilex Kudingcha* on intestinal microecology *in vitro* [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2017, 65(47): 10185-10196.
- [21] Yan Y, Peng Y, Tang J, et al. Effects of anthocyanins from the fruit of *Lycium ruthenicum* Murray on intestinal microbiota [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48: 533-541.
- [22] Yang X, Sun H, Tu L, et al. , Investigation of acute, subacute and subchronic toxicities of anthocyanin derived acylation reaction products and evaluation of their antioxidant activities *in vitro* [J]. *Food & Function*, 2020, 11(12): 10954-10967.
- [23] Peng Y, Yan Y, Wan P, et al. Effects of long-term intake of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray on the organism health and gut microbiota *in vivo* [J]. *Food Research International*, 2020, 130: 108952.
- [24] Morais, Veridiana, Estadella, et al. Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016, 33: 1-7.
- [25] 赵孟良,任延靖.菊粉及其调节宿主肠道菌群机制的研究进展[J].*食品与发酵工业*,2020,46(7):271-276.
- [26] Karlsson F, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control [J]. *Nature*, 2013, 498(7452): 99-103.
- [27] Barczynska R, Kapusniak J, Litwin M, et al. Dextrins from maize starch as substances activating the growth of bacteroidetes and actinobacteria simultaneously inhibiting the growth of *Firmicutes*, responsible for the occurrence of obesity [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2016, 71(2): 190-196.
- [28] Klancic T, Laforest-Lapointe I, Choo A, et al. Prebiotic oligofructose prevents antibiotic-induced obesity risk and improves metabolic and gut microbiota profiles in rat dams and offspring [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2020, 64(16): e2000288.
- [29] 王国钺,罗予.类杆菌属细菌的分子生物学鉴定[C].中华预防医学会微生物生态学第二届特种医学暨河南省、山东省预防医学会微生物生态学学术研讨会论文集,2006,20.
- [30] Wenzel T, Gates E, Ranger A, et al. Short-chain fatty acids (SCFAs) alone or in combination regulate select immune functions of microglia-like cells [J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2020, 105: 103493.
- [31] Hiromi, Katsuhiko, Erina, et al. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in type 2 diabetic otsuka long-evans Tokushima fatty (OLETF) rats [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(5): 1236-1243.
- [32] Lin H, Frassetto A, Kowalik E, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms [J]. *Plos One*, 2012, 7(4): e35240.