

DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240043

网络首发日期: 2024-10-08; 网络首发地址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.n.20240930.1637.008>

柑橘果胶与红曲色素复合物的体外酵解特性与降脂活性

刘海靖¹, 闫雪婷¹, 刘欢欢^{1,3}, 王昌禄¹, 王昵霏², 郭庆彬¹

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457; 2. 山西大学生物技术研究所, 太原 030000;

3. 天津益膳康生物科技有限公司, 天津 300457)

摘要: 以柑橘果胶和红曲色素为原料, 采用物理混合(PM)和 H_2O_2 -Vc 自由基诱导(FR)两种复合方式获得果胶-红曲色素复合物, 并通过体外模拟消化、酵解及体外降脂实验研究复合物的促进肠道健康活性和降脂活性。结果表明: PM 组和 FR 组在体外模拟口腔、胃和小肠消化过程中几乎不被消化, 通过物理混合方式处理的柑橘果胶与红曲色素复合物发酵特性较好, 且红曲色素的添加可以显著提高柑橘果胶的降脂活性 ($P < 0.05$)。

关键词: 柑橘果胶; 红曲色素; 体外酵解; 降脂活性

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2025)02-0051-10

In vitro Fermentation Characteristic and Lipid-Lowering Activity of Complex of Citrus Pectin and *Monascus* Pigment

LIU Haijing¹, YAN Xueting¹, LIU Huanhuan^{1,3}, WANG Changlu¹, WANG Nifei², GUO Qingbin¹

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030000, China;

3. Tianjin Yishankang Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: The complex was prepared by physical mixing (PM) and free radical induction (FR) with citrus pectin and *Monascus* pigment as raw materials, and the intestinal health-promoting and lipid-lowering activities of the complex were investigated by simulated digestion, fermentation and lipid-lowering experiments *in vitro*. The results showed that the PM and FR groups were almost not digested during *in vitro* simulated oral, gastric and small intestinal digestion, the physical mixing of citrus pectin and *Monascus* pigment complex had better fermentation characteristics, and the addition of *Monascus* pigment could significantly improve the lipid-lowering activity of citrus pectin ($P < 0.05$).

Key words: citrus pectin; *Monascus* pigment; *in vitro* fermentation; lipid-lowering activity

引文格式:

刘海靖, 闫雪婷, 刘欢欢, 等. 柑橘果胶与红曲色素复合物的体外酵解特性与降脂活性[J]. 天津科技大学学报, 2025, 40(2): 51-60.

LIU H J, YAN X T, LIU H H, et al. *In vitro* fermentation characteristic and lipid-lowering activity of complex of citrus pectin and *Monascus* pigment[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2025, 40(2): 51-60.

柑橘果胶是从橘、柑、柠檬、甜橙、柚等栽培类型的果皮中提取(含量约 25%)的酸性多糖, 作为凝胶剂、稳定剂、乳化剂及增稠剂等广泛应用于食品生产中^[1]。根据结构的不同, 果胶可分为同型半乳糖醛酸聚糖(HG)、鼠李半乳糖醛酸聚糖 I (RG-I)、鼠李半

乳糖醛酸聚糖 II (RG-II) 和木糖半乳糖醛酸聚糖^[2]。

天然果胶的相对分子质量较大, 难以被人体吸收, 因此对果胶进行降解可以提高其生物活性^[3]。Lu 等^[4]发现酶解柑橘果胶不仅可以增加肠道短链脂肪酸的浓度, 还提高了有益菌的丰度, 促进肠道健康。

收稿日期: 2024-03-08; 修回日期: 2024-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(32101901); 天津市研究生科研创新项目(KYS202201)

作者简介: 刘海靖(1998—), 女, 河北廊坊人, 硕士研究生; 通信作者: 王昵霏, 副教授, nifei.wang@sxu.edu.cn

张若培等^[5]发现,低分子柑橘果胶具有降低大鼠高血脂水平和改善肥胖的作用。

红曲色素是一种由红曲霉发酵而成的优质天然食用色素,被广泛应用于食品加工中。由于红曲色素具有良好的着色能力和防腐性能,可代替亚硝酸盐应用于腊肉制品;红曲色素的添加还可以提升面包的香味与色泽等^[6]。红曲色素主要包括化学结构类似的红/紫色、橙色、黄色的色素^[7],具有降血脂、降血糖以及调节免疫活性等功效^[8]。王小璐^[9]通过建立体外脂肪蓄积模型,证明红曲色素可以有效预防非酒精性脂肪肝,具备应用于降血脂功能食品的潜力。

然而,红曲色素的稳定性差,在食品加工、包装或储存过程中容易受到光和氧气的影响而损失和降解,易发生化学反应,极大降低了着色性能,影响食品货架期,限制了其在食品中的应用^[10]。研究^[11]表明,多糖的加入可以在一定程度上提高红曲色素的光稳定性,相比其他多糖,果胶与红曲色素混合后其稳定性更好,且色素能够在果胶的凝胶网络中进行扩散。近年来,大分子间的相互作用及协同增效研究逐渐增多,例如果胶能够与花青素结合,显著改善花青素的色泽、化学稳定性和体外胃肠消化稳定性^[12];红曲橙色素与羟丙基- β -环糊精制备的复合物可以显著提高色素的稳定性^[10]。

本研究对降解后的果胶与红曲色素进行复合,通过体外酵解和体外降脂模型,探究柑橘果胶与红曲色素复合物的促进肠道健康活性和降脂活性,从而充分利用果胶与红曲色素各自的功能优势,扩大其在食品工业中的应用范围,为开发新型食品配料及相关产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜的橘子购买于天津市当地超市;红曲色素由广东天益生物有限公司提供;脂肪酸标准品(乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸、己酸、庚酸),美国 Sigma 公司;猪结肠消化物取自天津广华肉类有限公司健康长白猪(5月龄,100~120 kg)的结肠。

GC2010 Plus 型热脱附气相色谱仪,日本岛津公司;LDZH-200KBS 型高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂;YOX-II 型厌氧培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;LD-10 型高速大容量冷冻离心机,湖南

湘仪实验室仪器开发有限公司;IS50 型傅里叶变换红外光谱仪,广州尼高力科学仪器有限公司;SU1510 型扫描电子显微镜,日本 Hitachi 公司;PB-10 型 pH 计,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;LP Vortex Mixer 型加热磁力搅拌器,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;ZWY-103B 型摇床,上海智能分析仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 柑橘果胶的提取降解

橘皮 50℃烘干打粉,过 40 目筛。加入无水乙醇常温搅拌 3 h,除去色素以及脂类物质,离心取沉淀,挥发剩余乙醇。按 1:20 的料液比加入蒸馏水,并用柠檬酸调节 pH=2,100℃搅拌 2 h,采用 Sevage 法除蛋白质^[13],加入无水乙醇(乙醇终体积分数为 60%),4℃过夜,离心取沉淀,用相对分子质量为 3 500 的透析袋透析 48 h,-80℃冷冻后真空浓缩干燥。

采用三氟乙酸水解法降低柑橘果胶相对分子质量^[14]。在 2 mg/mL 果胶溶液中加入 0.1 mol/mL 三氟乙酸,90℃反应 3.5 h,加入 3 倍体积无水乙醇,4℃过夜,离心取沉淀,冻干得到柑橘果胶。

1.2.2 柑橘果胶的理化指标测定

通过苯酚-硫酸法测定总糖含量^[13]。

以半乳糖醛酸为标准品,采用间羟基联苯法^[13]测定样品的糖醛酸含量。

以牛血清白蛋白为标准品,采用考马斯亮蓝法^[13]测定样品的蛋白质含量。

1.2.3 柑橘果胶与红曲色素复合物的制备

采用物理混合法、自由基诱导法^[14]两种方式获得柑橘果胶与红曲色素的物理混合组(PM)、自由基诱导复合组(FR),并为两组复合物分别设置对照组,即柑橘果胶组(CP)、柑橘果胶自由基诱导组(CPFR),制备方法见表 1。将原料在常温下混匀,分别将得到的溶液用相对分子质量为 3 500 的透析袋透析,除去未反应的色素,冻干得到的样品为后续实验所用。

表 1 柑橘果胶与红曲色素复合物的制备方法

Tab. 1 Preparation method of citrus pectin and *Monascus* pigment complex

样品名称	ρ (柑橘果胶)/ (mg·mL ⁻¹)	ρ (红曲色素)/ (mg·mL ⁻¹)	$V(\text{H}_2\text{O}_2)$ / mL	维生素 C 质量/mg
FR	10	10	0.2	10.8
CPFR	10	—	0.2	10.8
PM	10	10	—	—
CP	10	—	—	—

1.2.4 化学结构分析

采用溴化钾(KBr)压片法对样品进行红外光谱测定^[15]。分别称取 1 mg 样品和干燥的 KBr 150 mg, 用研钵快速研磨均匀, 然后放到压片机上压片, 停留 40 s 使样品成型, 用傅里叶变换红外光谱仪扫描, 扫描范围为 400 ~ 4 000 cm^{-1} 。

取少量干燥的样品用双面导电胶将样品粘到样品台上, 用溅射镀膜法镀金处理, 使用扫描电子显微镜对样品进行微观形态分析^[16]。

1.2.5 体外模拟消化特性分析

体外模拟消化液的配制: 参考张冠亚等^[17]的方法并适当修改。模拟唾液(SSF)、模拟胃液(SGF)以及模拟小肠液(SIF)的配制方法见表 2。上述溶液均现配现用。

表 2 体外模拟消化液的配制

Tab. 2 Preparation of simulated digests *in vitro*

试剂	SSF	SGF	SIF
KCl/mg	112	—	50
NaHCO ₃ /mg	114	120	—
KH ₂ PO ₄ /mg	50	12	11
CaCl ₂ /mg	22	12	8
NaCl/mg	12	310	220
MgCl ₂ /mg	3	3	—
猪胆盐/mg	—	—	200
pH	7.0 ± 0.5	2.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
α -淀粉酶/(U·mL ⁻¹)	75	—	—
胃蛋白酶/(U·mL ⁻¹)	—	2 000	—
胰酶/(U·mL ⁻¹)	—	—	250
胰蛋白酶/(U·mL ⁻¹)	—	—	100
蒸馏水/mL	100	100	100

体外模拟口腔消化: 参照 Chen 等^[18]的方法并略作修改。8.0 mg/mL 样品溶液与等体积模拟唾液混合, 37 °C 振荡培养 15、30 min 后, 沸水浴 10 min 灭活 α -淀粉酶, 冷却后离心备用, 每组设置 3 个重复。

体外模拟胃消化: 参照 Hu 等^[19]方法并略作修改。8.0 mg/mL 样品溶液与等体积模拟胃液混合, 调节 pH = 2.0, 37 °C 振荡培养 1、2、3 h 后, 沸水浴 10 min 灭活胃蛋白酶, 冷却后离心备用, 各组设置 3 个重复。

体外模拟小肠消化: 参照 Ding 等^[20]的方法并略作修改。将模拟胃液消化 3 h 后的样品溶液与模拟小肠液按照体积比 10 : 3 混合, 调节 pH = 7.0 ± 0.5, 37 °C 振荡培养 1、2、3 h 后, 沸水浴 10 min 灭活胰酶, 冷却后离心备用, 各组设置 3 个重复。

消化液相对分子质量的测定: 采用高效液相色谱(HPLC)法^[21]测定相对分子质量。准确称取 2 mg 样

品溶于 1 mL 0.1 mol/L NaNO₃ 溶液中, 60 °C 搅拌 6 h 至样品完全溶解, 过 0.22 μm 水系滤膜, 采用配备有超水凝胶线性柱(10 μm , 7.8 mm × 300 mm)、具有示差检测器(RID)和紫外检测器(SPD)的高效液相色谱仪测定样品的相对分子质量。色谱条件: 流动相为 0.1 mol/L NaNO₃ 溶液, 检测温度为 40 °C, 流量为 0.6 mL/min, 进样量为 20 μL 。

消化液游离还原糖的测定: 采用 DNS 法^[22]测定还原糖含量。

1.2.6 体外模拟酵解特性分析

猪结肠消化物样品制备: 宰杀过程中取出整段结肠部分, 在无氧环境下取出结肠中的消化物。

厌氧培养基^[23](mg/L): Na₂CO₃ 4000, (NH₄)₂SO₄ 900, NaCl 900, K₂HPO₄ 900, CaCl₂ 50, MgSO₄ 50, MnSO₄·H₂O 20, FeSO₄·7H₂O 20, ZnSO₄·7H₂O 20, CoCl₂·6H₂O 2, 刃天青 1, 泛酸钙 2, 烟酰胺 2, 维生素 B₁ 2, 维生素 B₂ 2, 维生素 B₆ 2, 维生素 B₁₂ 0.05, 维生素 H 0.5, 对氨基苯甲酸 0.1, 生物素 0.1, 叶酸 0.05, 盐酸半胱氨酸 1 000。

体外模拟酵解: 体外酵解方法参照 Ding 等^[23]的方法略有修改。PM、FR、CP、CPFR 分别作为唯一的碳源, 其添加量为 1%, 猪结肠消化物添加量为 10%, 只添加猪结肠消化物和厌氧培养基的组为空白对照组, 以菊粉为阳性对照组。在离心管中分别称取 0.06 g 样品, 加入 6 mL 培养基加热溶解。在厌氧培养箱中, 称取 0.6 g 猪结肠消化物置于离心管中, 分别将样品溶液加入其中并充分混匀。将离心管用封口膜封口, 装入厌氧袋中, 37 °C、250 r/min 酵解 0、6、12、24、48 h, 依次取样, 离心终止发酵, 将上清液过无菌滤膜即为肠道菌群酵解发酵液。

肠道菌群酵解发酵液的总糖采用苯酚-硫酸法^[13]测定。短链脂肪酸(SCFAs)采用热脱附气相色谱仪测定^[24]。

根据杨曼红等^[25]的方法并略有修改进行肠道菌群酵解发酵液色价的测定。在 2 mL 发酵液加入蒸馏水, 稀释至吸光度为 0.2 ~ 0.8, 并以蒸馏水为空白对照, 设定 385 nm(代表黄色素)、470 nm(代表橙色素)、505 nm(代表红色素)作为色价检测波长, 按照式(1)计算色价。

$$S = A \cdot V \cdot n / m \quad (1)$$

式中: S 为色价, U/g; A 为稀释后的吸光度; V 为样品提取液的体积, mL; m 为样品质量, g; n 为稀释倍数。

1.2.7 体外降脂活性分析

根据李志坤^[26]的方法测定胆酸钠吸附能力。

胰脂肪酶抑制能力的测定:以奥利司他为阳性对照,评价样品的胰脂肪酶抑制能力^[27]。根据测定脂肪酶活性方法,将样品、脂肪酶和 4-甲基伞形酮油酸酯(4-MUO)溶解在三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液中(13 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1.3 mmol/L CaCl₂, pH 8)。黑色 96 孔板中分别加入 50 μ L 0.1 mmol/L 4-MUO 和 25 μ L 不同浓度的样品, 25 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 然后加入 25 μ L 脂肪酶(1 mg/mL), 25 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 用等量的 Tris-HCl 缓冲液代替脂肪酶为空白, 以 340 nm 为激发波长、460 nm 为发射波长, 记录相对荧光强度。胰脂肪酶抑制率(R)按照式(2)计算。

$$R = \left(1 - \frac{B - B_{\text{blank}}}{A - A_{\text{blank}}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

其中: A 和 B 是无脂肪酶和有胰脂肪酶反应下测定的相对荧光强度, A_{blank} 和 B_{blank} 是用 Tris-HCl 缓冲液代替样品的空白组相对荧光强度。

1.3 数据处理

实验测定得到的数据使用 SPSS 25.0 分析软件通过单因素方差分析(ANOVA)和多重比较法(Duncan)进行统计分析, 结果用“平均值 $\pm$ 标准差”表示, 当 $P < 0.05$ 时说明差异显著, 结果具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 柑橘果胶的理化指标

提取到的柑橘果胶中的总糖含量为 $(46.27 \pm 3.03)\%$, 糖醛酸含量为 $(75.60 \pm 3.62)\%$, 蛋白质含量为 $(3.63 \pm 0.16)\%$ 。根据测定结果可知, CP 具有较高的糖含量, 且蛋白质含量较低, 表明提取出的柑橘果胶具有较高的纯度。果胶的总糖、糖醛酸、蛋白质含

量之和在 100% 以上, 这可能是通过苯酚-硫酸法测定总糖时比色法的结果被高估, 因为糖醛酸也可能参与比色反应。

2.2 柑橘果胶与红曲色素复合物的化学结构

2.2.1 傅里叶变换红外光谱分析

傅里叶变换红外光谱图如图 1 所示。红曲色素样本在 1540 cm^{-1} 左右出现了红曲色素特征峰^[10], 这对应着脂肪族侧链羰基的伸缩振动。在 1740 cm^{-1} 左右出现了酯化的羰基的拉伸运动, 这是果胶的特征峰。PM 组和 FR 组的红外光谱图呈现红曲色素和柑橘果胶各自光谱图的叠加, 都具有典型的多糖和红曲色素的特征吸收峰, 但二者的相对峰强度不同, 表明它们之间部分多糖残基的物质的量比不同。

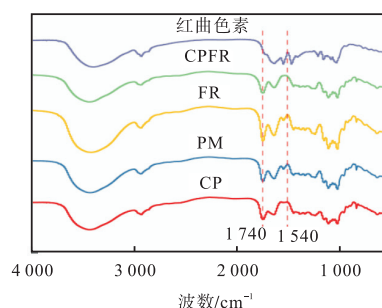


图 1 傅里叶变换红外光谱图

Fig. 1 Fourier transform infrared spectroscopy

2.2.2 样品微观形态

样品的扫描电子显微镜图如图 2 所示。CP 组呈现不规则网格状, 含有大量致密而粗的纤维状结构, 分子缠绕聚集严重。PM 组有丝状物呈现桥状连接, 呈现良好的分子间交联。CPFR 组呈现大小均一排列蜂窝状, 而添加色素的 FR 组呈现不规则絮状, 未见孔洞, 分子间聚集情况也相当严重。PM 组和 FR 组之间的差异可能是果胶经自由基诱导后相对分子质量下降, 故呈现絮状, 且红曲色素的加入改变了果胶大分子链的聚合度, 导致复合物与柑橘果胶形态的差异。

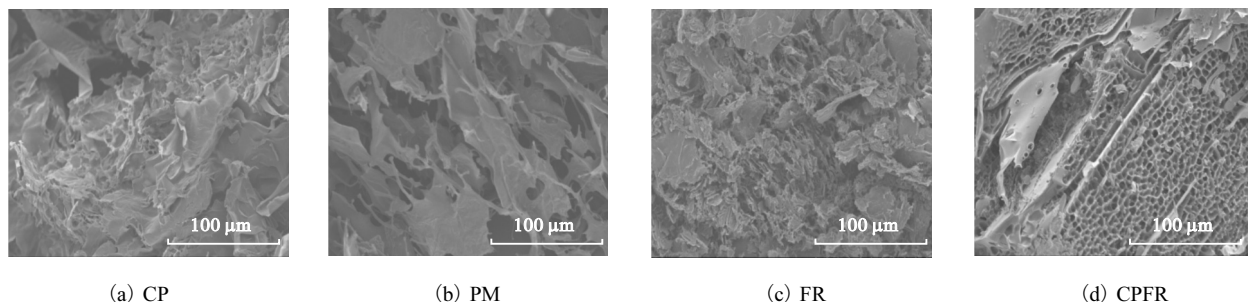


图 2 扫描电子显微镜图

Fig. 2 Results of scanning electron microscope images

2.3 体外模拟消化特性

2.3.1 消化液中多糖的相对分子质量

模拟口腔、胃、小肠消化过程中的多糖相对分子质量 HPLC 图结果如图 3 所示。在模拟口腔 (SSF)、胃 (SGF)、小肠 (SIF) 消化过程中, CP 组、PM 组、FR 组和 CPFRR 组的多糖保留时间和峰面积几乎没有发生变化, 4 组样品的相对分子质量波动分别为

$5.3762 \times 10^5 \sim 5.3211 \times 10^5$ 、 $5.2245 \times 10^5 \sim 5.1709 \times 10^5$ 、 $8.366 \times 10^4 \sim 6.926 \times 10^4$ 、 $8.366 \times 10^4 \sim 7.251 \times 10^4$, 表明模拟消化对 4 组样品的相对分子质量没有影响, 可以近乎完整地到达结肠, 也表明红曲色素并不影响柑橘果胶的膳食纤维特性。FR 组和 CPFRR 组的相对分子质量低于 PM 组和 CP 组, 这可能是因为 H_2O_2/V_C 体系对柑橘果胶进行了二次降解。

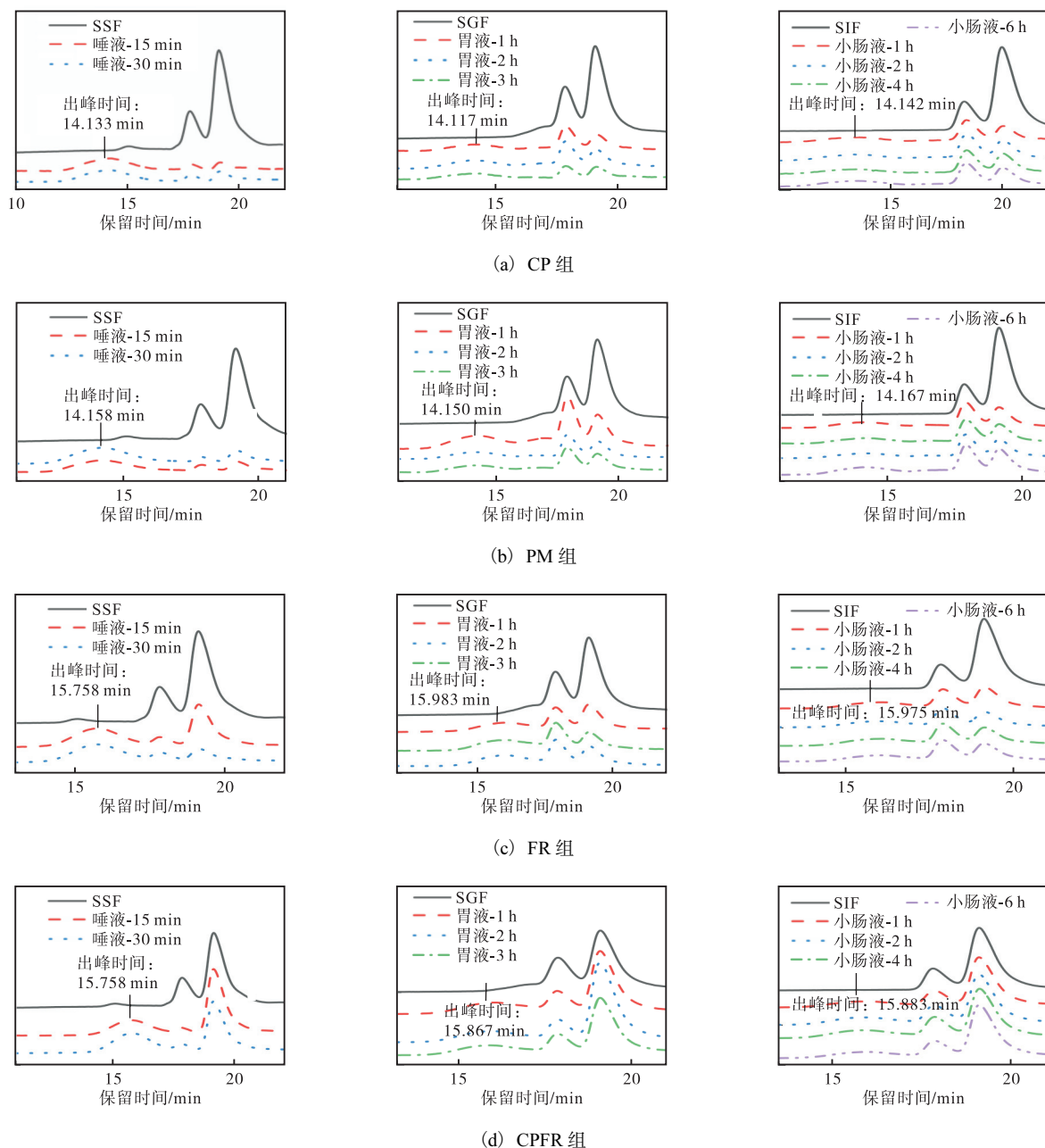


图 3 模拟口腔、胃、小肠消化过程中的多糖相对分子质量 HPLC 图

Fig. 3 HPLC plot of molecular weight of polysaccharides during simulated digestion in oral, gastric and small intestine

2.3.2 消化液中游离还原糖的含量

模拟口腔、胃、小肠消化过程中还原糖含量的变化, 结果见表 3。在口腔唾液消化过程中 (0.25 h 和

2.5 h), 还原糖含量未发生显著变化; 在胃肠消化过程中, 还原糖含量的变化较复杂, 但变化幅度均不明显, 保持在 5% 以内。

表3 模拟口腔、胃、小肠消化过程中还原糖含量的变化
Tab.3 Changes in reducing sugar content during oral, gastric, and small intestinal digestion

部位	时间/ h	还原糖/(mg·mL ⁻¹)			
		CP	PM	FR	CPFR
口腔	0.25	0.022 ± 0.005	0.038 ± 0.001	0.105 ± 0.006	0.058 ± 0.000
	0.5	0.023 ± 0.003	0.033 ± 0.002	0.107 ± 0.003	0.041 ± 0.002
胃	1	1.192 ± 0.008	1.288 ± 0.026	1.255 ± 0.043	1.248 ± 0.028
	2	1.194 ± 0.027	1.290 ± 0.029	1.224 ± 0.006	1.266 ± 0.040
	3	1.249 ± 0.022	1.273 ± 0.035	1.235 ± 0.018	1.256 ± 0.028
小肠	1	1.188 ± 0.031	1.241 ± 0.046	1.189 ± 0.006	1.236 ± 0.046
	2	1.192 ± 0.035	1.238 ± 0.030	1.184 ± 0.011	1.200 ± 0.026
	4	1.180 ± 0.028	1.222 ± 0.029	1.179 ± 0.009	1.194 ± 0.023
	6	1.192 ± 0.008	1.242 ± 0.005	1.187 ± 0.024	1.231 ± 0.023

2.4 肠道菌群模拟酵解特性

2.4.1 肠道菌群酵解过程中发酵液的多糖相对分子质量变化

肠道菌群对多糖的发酵可以通过其相对分子质量(M_w)的变化反映^[28]。不同发酵时间肠道菌群酵解

液的多糖相对分子质量变化如图4所示,出峰时间越晚,相对分子质量越小。结果发现,随着发酵时间的延长,样品的色谱峰明显出现后移,表明发酵液多糖相对分子质量逐渐降低,说明添加红曲色素前后的样品均能被肠道菌群利用而发生降解。

2.4.2 肠道菌群酵解过程中发酵液的总糖含量变化

总糖含量的变化常被用来衡量碳水化合物的发酵程度^[29]。不同发酵时间肠道菌群酵解液的总糖含量变化见表4。

发酵液总糖含量均显著降低($P<0.05$),CP组从37.03%降至28.52%,PM组从33.56%降至27.56%,FR组从33.73%降至25.64%,CPFR组从32.05%降至27.87%。总糖的显著下降可能是由于结肠微生物区系能分泌碳水化合物活性酶,破坏多糖的糖苷键,进而利用降解后的多糖片段^[30]。总糖含量的降低可以反映出在肠道中被消耗的速率,本研究中FR组在肠道消耗的速率最快,其次是CP组和PM组,CPFR组最慢。

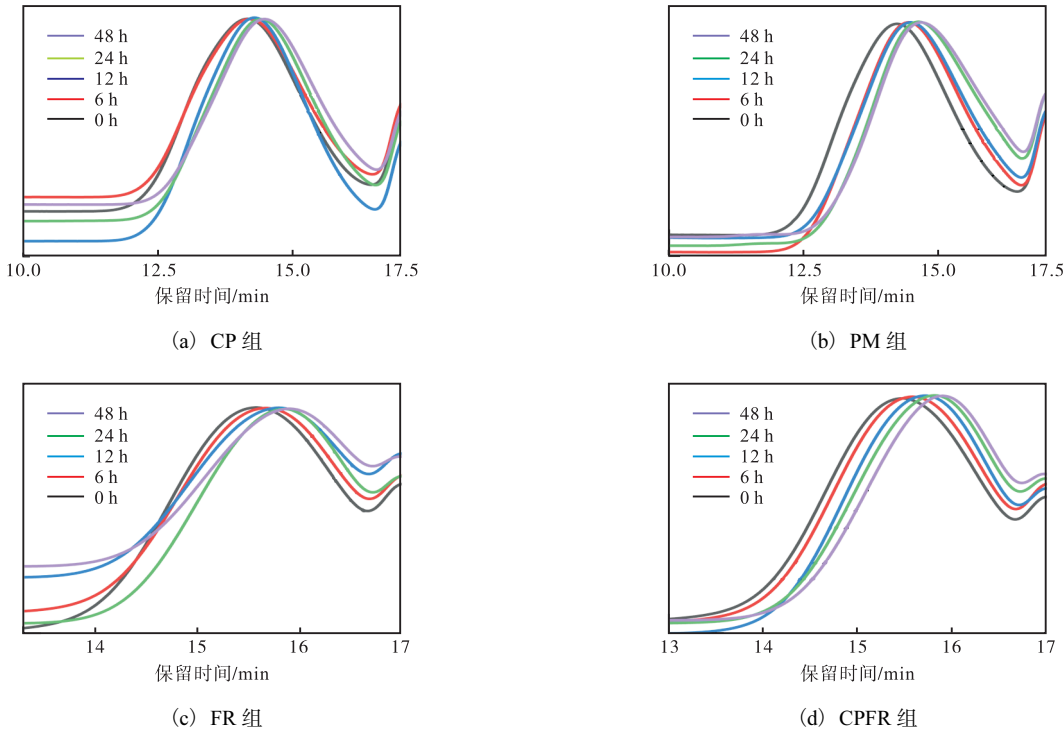


图4 不同发酵时间肠道菌群酵解液的多糖相对分子质量变化
Fig.4 Changes in the polysaccharide M_w from the fermentation broth of intestinal flora at different time points

2.4.3 肠道菌群酵解过程中发酵液的 pH 和 SCFAs 产量的变化

体外发酵过程中发酵液 pH 的动态变化可以间接反映结肠微生物群对天然多糖的降解和利用^[29]。不同发酵时间肠道菌群酵解液的 pH 变化如图5所

示,其中不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。所有底物都被肠道菌群利用,从而导致 pH 下降,而在无碳源的空白对照组中观察到相对稳定的 pH,这可能是有限的 SCFAs 产生或者可能与蛋白质产生的氨发生中和^[31]。添加红曲色素的 PM 组 and 自

由基诱导的 FR 组在发酵过程中 pH 分别从 6.75 降至 4.67、从 6.34 降至 4.83, 未添加红曲色素的 CP 组和 CPFR 组的 pH 分别从 5.29 降至 4.28 和从 6.11 降至 4.74, 菊粉组的 pH 从 8.52 降至 4.02, 随后趋于稳定。

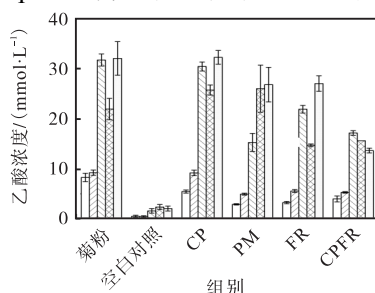
表 4 不同发酵时间肠道菌群酵解液的总糖含量变化

Tab. 4 Changes in total sugar content of the fermentation broth of intestinal flora at different fermentation times

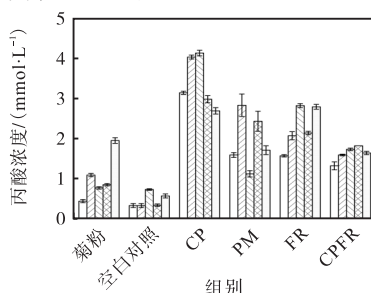
样品名称	酵解时间/h	总糖含量/%
CP	0	37.03 ± 0.02 ^a
	6	35.60 ± 0.03 ^a
	12	31.73 ± 0.06 ^b
	24	30.51 ± 0.03 ^b
	48	28.52 ± 0.15 ^c
PM	0	33.56 ± 0.08 ^a
	6	31.87 ± 0.06 ^b
	12	29.24 ± 0.04 ^c
	24	28.53 ± 0.19 ^d
	48	27.56 ± 0.07 ^d
FR	0	33.73 ± 0.04 ^a
	6	29.61 ± 0.07 ^b
	12	28.95 ± 0.19 ^b
	24	27.37 ± 0.28 ^b
	48	25.64 ± 0.03 ^b
CPFR	0	32.05 ± 0.31 ^a
	6	31.40 ± 0.09 ^a
	12	30.96 ± 0.05 ^a
	24	29.60 ± 0.02 ^b
	48	27.87 ± 0.03 ^c

注:不同字母表示组间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

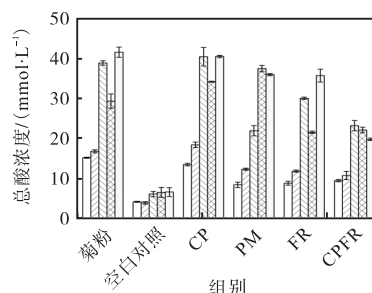
pH 下降幅度越大说明发酵程度越高, 因此添加



(a) 乙酸



(b) 丙酸



(c) 总酸

□ 0 h ▨ 6 h ▩ 12 h ▪ 24 h ◻ 48 h

图 6 不同发酵时间肠道菌群酵解液的 SCFAs 含量变化

Fig. 6 Changes in SCFAs content in the fermentation broth of intestinal flora at different time points

多糖被肠道菌群利用, 产生的 SCFAs 对宿主有诸多有益健康的作用。本研究, CP 组在酵解 48 h 产生的总 SCFAs 含量最高, 其次是 PM 组和 FR 组。乙酸和丙酸是最主要的 SCFAs, 乙酸既是肠道外周细胞和肝脏的能量来源, 又是糖异生和脂肪生成代谢途径中的信号分子^[32]。大约 90% 的丙酸通过门静脉

红曲色素的 PM 组的发酵程度优于 FR 组, 其次是 CPFR 组和 CP 组。添加红曲色素的两组在发酵 0 ~ 6 h 显著下降 ($P < 0.05$), 而未添加色素的两组下降速度缓慢, 因此, 红曲色素的加入大幅提升了柑橘果胶的可发酵性。

SCFAs 是肠道菌群代谢物, 它们在宿主的免疫和代谢系统中都起着重要作用。不同发酵时间肠道菌群酵解液的 SCFAs 含量变化如图 6 所示。CP 组、PM 组、FR 组、CPFR 组和菊粉组在发酵 48 h 产生的总酸含量均高于空白对照组。乙酸和丙酸是在体外发酵过程中产生的主要 SCFAs, 4 组样品间相互比较, CP 组产生的乙酸、丙酸含量较高, 分别为 (32.17 ± 1.37) mmol/L 和 (4.14 ± 0.07) mmol/L, 其次是 FR 组和 PM 组, CPFR 组产生的乙酸和丙酸含量最低。此外, 除乙酸和丙酸外, 其他 7 种 SCFAs 的含量变化并不明显。

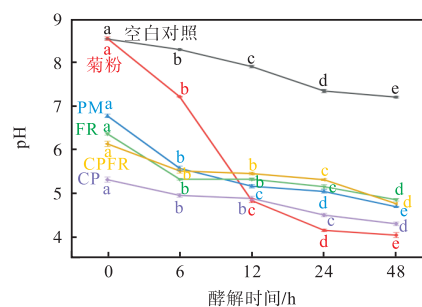


图 5 不同发酵时间肠道菌群酵解液的 pH 变化

Fig. 5 pH changes in the fermentation broth of intestinal flora at different time points

输送到肝脏, 其中很大一部分用于糖异生和抑制胆固醇合成^[33]。

2.4.4 肠道菌群酵解过程中发酵液色价的变化

利用紫外-可见分光光度法研究 PM 组和 FR 组在发酵过程中红曲色价的变化。不同发酵时间肠道菌群酵解液的色价变化如图 7 所示, 两组样品的色价

随发酵时间延长而降低。PM组的色价从2560.3 U/g降至1232.0 U/g, FR组从1832.9 U/g降至951.1 U/g, PM组的红曲色素利用率高于FR组。

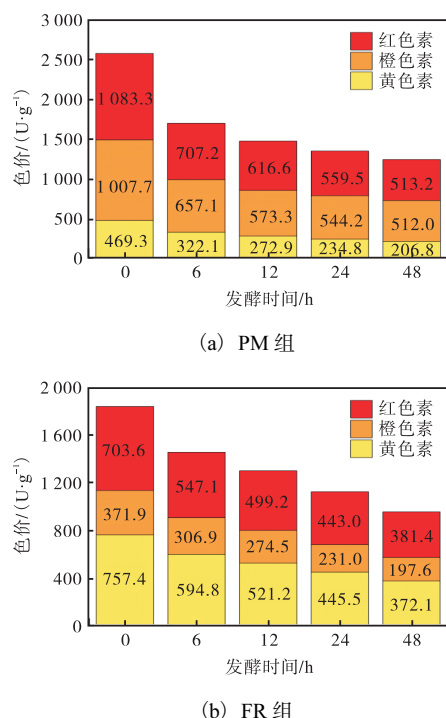


图7 不同发酵时间肠道菌群酵解液的色价变化

Fig. 7 Changes in color value of the fermentation broth of intestinal flora at different time points

2.5 体外降脂活性

2.5.1 胆酸钠吸附能力

膳食纤维结合胆酸钠的能力可以减少其重吸收,需要肝细胞中胆固醇的分解代谢维持胆盐平衡,从而降低血浆胆固醇水平,起到降脂作用^[34]。胆酸钠吸附量结果如图8所示,其中不同字母表示组间有显著性差异($P<0.05$)。

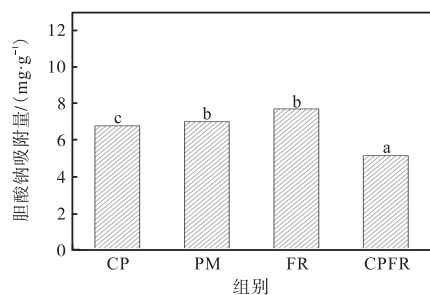


图8 胆酸钠吸附量

Fig. 8 Sodium cholate adsorption capacity

在相同的胆酸钠浓度下,添加红曲色素的FR组,胆酸钠吸附量最高,为 (7.640 ± 0.002) mg/g,显著高于未添加红曲色素的CPFR组($P<0.05$);添加红

曲色素的PM组胆酸钠吸附量为 (6.950 ± 0.002) mg/g,显著高于未添加红曲色素的CP组($P<0.05$),表明在两种复合方式下,添加红曲色素后都可以显著提高柑橘果胶的胆酸钠吸附能力($P<0.05$)。FR组吸附量优于PM组($P<0.05$),可能是因为FR组经自由基诱导后,结构更加疏松,具有更大的比表面积和电荷密度,暴露出更多的胆酸钠结合位点,增加了胆酸钠吸附量^[35]。

2.5.2 胰脂肪酶抑制率

胰脂肪酶可以将肠道中的脂肪水解成游离脂肪酸和单酰甘油酯,从而进一步被人体吸收,因此可以通过抑制胰脂肪酶活性,减少人体对脂肪的水解和吸收,从而达到降脂的目的^[27]。以脂肪酶抑制剂奥利司他为阳性对照^[36],胰脂肪酶活性抑制率结果如图9所示。CP组和CPFR组随着浓度的升高,对胰脂肪酶抑制活性呈剂量依赖性,分别在样品质量浓度为5 mg/mL和3 mg/mL时,对胰脂肪酶的抑制率达到最大值,为90.07%和84.70%。添加红曲色素的PM组和FR组随着样品浓度的增加,对胰脂肪酶的抑制率先升高后趋于稳定,分别在样品质量浓度2 mg/mL和3 mg/mL时达到最大值,为97.30%和97.53%,表明红曲色素的添加提高了柑橘果胶的胰脂肪酶抑制率,改善了柑橘果胶的降脂活性。

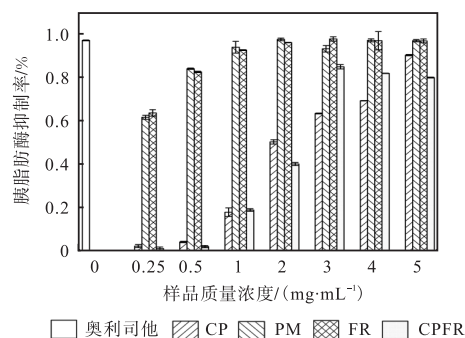


图9 胰脂肪酶活性抑制率

Fig. 9 Inhibition rate of pancreatic lipase

3 结 语

本研究首先以物理混合法(PM)和自由基诱导复合法(FR)制备得到两种柑橘果胶和红曲色素的复合物,并对复合物进行傅里叶变换红外光谱和扫描电子显微镜分析;然后通过体外模拟消化实验测定复合物的消化特性,并在厌氧条件下酵解0、6、12、24、48 h,通过测定发酵液的总糖、pH、SCFAs、色价进行体外酵解特性研究,再通过测定胆酸钠吸附能力和胰

脂肪酶活性抑制率研究复合物的降脂活性。结果表明: PM 组和 FR 组在消化过程中不会被降解, 可以完整地到达结肠, 并且在结肠中被肠道菌群利用而发生降解, 产生的 SCFAs 主要为乙酸和丙酸, PM 组的体外发酵特性较好。在体外降脂活性的研究中发现, 添加红曲色素后, 可以显著提高柑橘果胶的降脂活性 ($P < 0.05$)。本研究为多糖与色素的相互作用以及在药品、食品等方面的应用开发提供理论依据。

参考文献:

- [1] KOH J, XU Z M, WICKER L. Binding kinetics of blueberry pectin-anthocyanins and stabilization by non-covalent interactions[J]. Food hydrocolloids, 2020, 99: 105354.
- [2] HOSSEINI S S, KHODAIYAN F, YARMAND M S. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties[J]. Carbohydrate polymers, 2016, 140: 59–65.
- [3] YANG Z, ZHANG Y, JIN G, et al. Insights into the impact of modification methods on the structural characteristics and health functions of pectin: a comprehensive review[J]. International journal of biological macromolecules, 2024, 261: 129851.
- [4] LU X M, ZHAO C Y, LIU D, et al. A novel prebiotic enzymatic hydrolysate of citrus pectin during juice processing[J]. Food hydrocolloids, 2024, 146: 109198.
- [5] 张若培, 范晓青, 陈建国, 等. 低分子柑桔果胶粉对肥胖大鼠调节血脂及瘦素的研究[J]. 浙江预防医学, 2008, 20(1): 7–9.
- [6] MONTEIRO A B P, PRADOS C R M G, SILVA M D L R, et al. Production of *Monascus* pigments by solid-state cultivation of wheat grains and application in bread formulations[J]. International journal of gastronomy and food science, 2021, 24: 100313.
- [7] ARULDASS C A, DUFOSSE L, AHMAD W A. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms: a review[J]. Journal of cleaner production, 2018, 180: 168–182.
- [8] AGBOYIBOR C, KONG W B, CHEN D, et al. *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: a review[J]. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 2018, 16: 433–447.
- [9] 王小璐. 红曲黄色素对油酸诱导 HepG2 细胞脂质蓄积的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2020.
- [10] WU S F, BAO Y X, WANG D Y, X, et al. Water-soluble complexes of orange pigments from *Monascus* sp. with HP- β -CD: preparation, inclusion mechanism, and improved stability[J]. Journal of molecular liquids, 2020, 300: 112212.
- [11] RAHAYUNINGSIH E, SETIAWAN F A, RAHMAN A B K, et al. Microencapsulation of betacyanin from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peels using pectin by simple coacervation to enhance stability[J]. Food science and technology research, 2021, 58: 3379–3387.
- [12] KOH J, XU Z M, WICKER L. Blueberry pectin and increased anthocyanins stability under *in vitro* digestion[J]. Food chemistry, 2020, 302: 125343.
- [13] 邵严辉. 不同果胶结构、功能及对酸奶品质的影响研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
- [14] 何媛. 秋葵果胶多糖的降解、结构特征、生物活性及其体外粪便发酵特性的研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2022.
- [15] GUO Q B, DU J H, JIANG Y, et al. Pectic polysaccharides from hawthorn: physicochemical and partial structural characterization[J]. Food hydrocolloids, 2019, 90: 146–153.
- [16] 刘振飞, 闫雪崧, 单政欣, 等. 超声处理对 κ 卡拉胶的影响[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(10): 32–38.
- [17] 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.
- [18] CHEN G J, XIE M H, WAN P, et al. Digestion under saliva, simulated gastric and small intestinal conditions and fermentation *in vitro* by human intestinal microbiota of polysaccharides from Fuzhuan brick tea[J]. Food chemistry, 2018, 244: 331–339.
- [19] HU J L, NIE S P, MIN F F, et al. Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. [J]. Carbohydrate polymers, 2013, 92: 1143–1150.
- [20] DING Y, YAN Y M, PENG Y J, et al. *In vitro* digestion under simulated saliva, gastric and small intestinal conditions and fermentation by human gut microbiota of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum*[J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 125: 751–760.
- [21] WANG N F, ZHANG X J, WANG S W, et al. Structural characterisation and immunomodulatory activity of polysaccharides from white asparagus skin[J]. Carbohydrate polymers, 2020, 227: 115314.

- [22] YE K, FU C J, MA S, et al. Comprehensive assessment of *Hypsizygus marmoreus* polysaccharides through simulated digestion and gut microbiota fermentation *in vitro* [J]. Food hydrocolloids, 2023, 144: 108989.
- [23] 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: 62–68.
- [24] GUO X Y, ZHANG X M, YING X, et al. Fermentation properties and prebiotic potential of different pectins and their corresponding enzymatic hydrolysates [J]. Food hydrocolloids, 2023, 143: 108878.
- [25] 杨曼红, 郭佳, 杨露, 等. 红曲橙色素与红曲黄色素定量分析方法改进 [J]. 食品研究与开发, 2022, 43 (24): 175–180.
- [26] 李志坤. 微拟球藻藻渣膳食纤维的制备及功能特性研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2020.
- [27] HUANG R, ZHANG Y, SHEN S Y, et al. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory effects of flavonoids from different citrus peel extracts; an *in vitro* study [J]. Food chemistry, 2020, 326: 126785.
- [28] PAYLING L, FRASER K, LOVEDAY S M, et al. The effects of carbohydrate structure on the composition and functionality of the human gut microbiota [J]. Trends in food science & technology, 2020, 97: 233–248.
- [29] HU J L, NIE S P, LI C, et al. *In vitro* fermentation of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. by human fecal microbiota [J]. Food hydrocolloids, 2013, 33: 384–392.
- [30] HUANG F, HONG R Y, YI Y, et al. *In vitro* digestion and human gut microbiota fermentation of longan pulp polysaccharides as affected by *Lactobacillus fermentum* fermentation [J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 147: 363–368.
- [31] ZHAO Y Y, BI J F, YI J Y, et al. Pectin and homogalacturonan with small molecular mass modulate microbial community and generate high SCFAs via *in vitro* gut fermentation [J]. Carbohydrate polymers, 2021, 269: 118326.
- [32] ZAMBELL K L, FITCH M D, FLEMING S E, et al. Acetate and butyrate are the major substrates for de novo lipogenesis in rat colonic epithelial cells [J]. The journal of nutrition, 2003, 133: 3509–3515.
- [33] PEREIRA D I A, GIBSON G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut [J]. Applied and environmental microbiology, 2002, 68: 4689–4693.
- [34] FENG Z Q, DOU W, ALAXI S, et al. Modified soluble dietary fiber from black bean coats with its rheological and bile acid binding properties [J]. Food hydrocolloids, 2017, 62: 94–101.
- [35] BENITEZ V, HERNANZ REBOLLO M, HERNANZ S, et al. Coffee parchment as a new dietary fiber ingredient: functional and physiological characterization [J]. Food research international 2019, 122: 105–113.
- [36] ZHU Y T, JIA Y W, LIU Y M, et al. Lipase ligands in *Nelumbo nucifera* leaves and study of their binding mechanism [J]. Journal of agriculture and food chemistry, 2014, 62: 10679–10686.

责任编辑: 郎婧