

摘要

结冷胶是鞘氨单胞菌 (*Sphingomonas paucimobilis*) 产生的一种胞外多糖, 它是由葡萄糖-葡萄糖醛酸-葡萄糖-鼠李糖为重复结构组成的线性阴离子多糖。结冷胶因具有良好的物理特性, 在食品、生物医药、化工等行业得到了广泛的应用。功能性寡糖由于具有调节肠道健康、提高免疫力及抗肿瘤等生理功能, 近年来开始引起广泛重视并快速发展。但关于结冷胶寡糖功能活性的研究却鲜有报道, 因此降解结冷胶制备不同聚合度结冷胶寡糖并探究其功能活性差异具有重要研究意义。本研究首先通过酸解与酶解等方式制备出不同聚合度的结冷胶寡糖; 进一步对两种降解方式制备出的结冷胶寡糖进行产物结构分析鉴定; 最后, 对不同聚合度结冷胶寡糖进行了体外模拟消化实验, 探究其对肠道菌群结构和代谢产物的影响。主要研究结果如下:

(1) 分别使用盐酸和结冷胶裂解酶对结冷胶进行降解。以获得聚合度大范围分布的结冷胶寡糖为目标, 对结冷胶酸水解条件进行了优化。结果表明, 底物浓度 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、盐酸浓度 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、水解时间 3 h 条件下, 水解产物为聚合度 2~8 的结冷胶寡糖。为提高酶法降解效率, 提出了一种在裂解酶发酵过程中添加结冷胶的策略, 实现了结冷胶寡糖的一步法制备, 并对裂解酶发酵和多糖实时降解过程进行了优化。结果表明, 发酵初始结冷胶添加量 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、发酵 96 h、甲醇添加量 1% 条件下结冷胶降解效率最高。

(2) 将两种降解方式得到的结冷胶寡糖纯化后分别进行红外光谱分析、单糖组成分析和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析。红外光谱分析结果表明, 酸水解得到的结冷胶寡糖的主链结构没有改变, 而酶解得到的结冷胶寡糖出现了新的 $\text{C}=\text{C}$ 结构; 单糖组成分析结果表明, 酸解结冷胶寡糖的单糖组成与结冷胶一致, 而酶解结冷胶寡糖的单糖组成为葡萄糖和鼠李糖; 质谱分析结果表明, 通过凝胶过滤层析技术分离后, 酸解结冷胶寡糖被分离成聚合度为 3 和 4 的组分 (GOS1) 与 6 和 8 的组分 (GOS2), 而酶解后得到的结冷胶寡糖只包含聚合度为 4 的组分 (GOS3)。

(3) 对不同聚合度结冷胶寡糖进行体外模拟消化实验并探究其益生功能。通过薄层色谱、离子色谱、还原糖含量测定分析结冷胶寡糖在消化过程中降解情况。结果表明, 在模拟上消化道的消化过程中, 无游离单糖出现, 结冷胶寡糖聚合度保持不变, 并且还原糖含量无明显增多。对结冷胶寡糖进行体外粪菌发酵, 并进行菌群 16s rDNA 测序, 结果表明 GOS1 对副拟杆菌属、粪杆菌属和另支杆菌属的富集能力更强, GOS2 对拟杆菌属和罗氏菌属的富集能力更强, 而 GOS3 对巨单胞菌属、毛螺菌属及颤螺菌属的富集能力更强。对体外粪菌发酵后肠道细菌产生的短链脂肪酸进行测定, 结果表明, GOS1、GOS2 与 GOS3 发酵后的乙酸、丙酸与丁酸产量均高于阴性对照组, GOS1 与 GOS3 的短链脂肪酸产量比 GOS2 更高, 聚合度与发酵速率成负相关关系。

关键词: 酸水解; 酶降解; 聚合度; 结冷胶寡糖; 肠道菌群

Abstract

Gellan gum is a kind of extracellular polysaccharide produced by *Sphingomonas paucimobilis*. It is a linear anionic polysaccharide composed of a repetitive structure of glucose, glucuronic acid, glucose and rhamnose. Because of its good physical properties, gellan gum has been widely used in food, biomedicine and chemical industries. Functional oligosaccharides have attracted wide attention and developed rapidly in recent years due to their physiological functions such as regulating intestinal health, improving immunity and anti-tumor. However, there are few reports on the gellan oligosaccharides of functional activities. Therefore, it is of great research value to degrade gellan oligosaccharides to produce gellan oligosaccharides with different degrees of polymerization and explore on their functional activities. In this study, gellan oligosaccharides with different degrees of polymerization were prepared by acid and enzymatic degradation. The product structure of gellan oligosaccharides prepared by two degradation methods were analyzed and identified. Finally, *in vitro* digestion experiments of gellan oligosaccharides with different degrees of polymerization were carried out to explore the effects of the structure and metabolites of gut microbiota. The main research results are as follows:

(1) Gellan gum was degraded by HCl and gellan lyase respectively. In order to obtain gellan oligosaccharides with wide degrees of polymerization, the acid hydrolysis conditions were optimized. The results showed that under the conditions of substrate concentration of $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, HCl concentration of $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and hydrolysis time of 3 h, the hydrolyzed products were mainly gellan oligosaccharides with degrees of polymerization 2~8. In order to improve the efficiency of enzymatic degradation, a strategy of adding gellan gum to the lyase fermentation process was proposed to achieve the one-step preparation of gellan oligosaccharides. The gellan lyase fermentation and real-time degradation of polysaccharides were optimized, and the results showed that the degradation efficiency of gellan gum was the highest under the conditions of $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ initial gellan addition, 96 h fermentation and 1% methanol addition.

(2) The gellan oligosaccharides obtained by the two degradation methods were purified and analyzed by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), monosaccharide composition and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) respectively. FT-IR analysis showed that the main chain structure of gellan oligosaccharides obtained by acid hydrolysis did not change, but the structure of gellan oligosaccharides obtained by enzymatic degradation showed new C=C structure. The results of monosaccharide composition analysis showed that the monosaccharide composition of gellan oligosaccharides obtained by acid hydrolysis was consistent with gellan gum, while the monosaccharide composition of gellan oligosaccharides obtained by enzymatic degradation consisted of glucose and rhamnose. The MALDI-TOF MS results showed that acid hydrolyzed gellan oligosaccharides were separated to obtain two components containing 3 and 4 degrees of polymerization (GOS1), 6 and 8 degrees of polymerization (GOS2), respectively. While the oligosaccharides obtained by enzymatic degradation only contained 4 degree of polymerization

(GOS3).

(3) *In vitro* simulated digestion of gellan oligosaccharides were carried out. The degradation of gellan oligosaccharides during digestion was analyzed by thin layer chromatography, ion chromatography and reducing sugar content detected. The results showed that no free monosaccharides appeared, the polymerization degrees of gellan oligosaccharides remained unchanged, and the content of reducing sugar did not increase significantly in the simulated upper digestive tract digestion process. *In vitro* fecal fermentation of gellan oligosaccharides were carried out and 16s rDNA sequencing of the gut microbiota showed that GOS1 had better enrichment ability for *Parabacteroides*, *Faecalibacterium* and *Alistipes*, GOS2 had better enrichment ability for *Bacteroides* and *Roseburia*, and GOS3 had better enrichment ability for *Megamonas*, *Lachnospiraceae* and *Oscillospiraceae*. Short-chain fatty acids produced by gut microbiota after *in vitro* fecal fermentation were detected. The results showed that the acetic acid, propionic acid and butyric acid produced by GOS1, GOS2 and GOS3 were higher than those in the negative control group; GOS1 and GOS3 had higher yield of short-chain fatty acids than GOS2; and the degree of polymerization was negatively correlated with the fermentation rate.

Key words: Acid hydrolysis; enzymatic degradation; degree of polymerization; gellan oligosaccharides; gut microbiota

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 结冷胶概述.....	1
1.2 寡糖概述.....	1
1.2.1 寡糖制备方法.....	1
1.2.2 寡糖功能.....	3
1.3 人体肠道微生物功能概述	3
1.3.1 短链脂肪酸.....	3
1.3.2 肠道微生物的其他功能.....	4
1.4 益生元概述.....	5
1.4.1 碳水化合物类益生元.....	6
1.4.2 肠道细菌对寡糖的代谢.....	6
1.4.3 影响肠道细菌代谢寡糖的因素.....	7
1.5 本课题的研究目的、意义及主要内容	7
1.5.1 立题目的与意义.....	7
1.5.2 本课题主要研究内容.....	8
第二章 材料与方法	10
2.1 实验材料.....	10
2.1.1 实验原料.....	10
2.1.2 实验菌种	10
2.1.3 主要试剂.....	10
2.1.4 主要仪器.....	11
2.1.5 主要培养基.....	11
2.2 实验方法.....	11
2.2.1 结冷胶寡糖的制备与条件优化.....	11
2.2.2 结冷胶寡糖分离纯化方法.....	12
2.2.3 体外模拟消化实验.....	13
2.2.4 健康人粪便采集.....	13
2.2.5 体外静态粪菌发酵.....	13
2.2.6 16s rDNA 测序	14
2.3 分析检测方法.....	14
2.3.1 还原糖含量测定.....	14
2.3.2 薄层色谱分析.....	14
2.3.3 傅里叶变换红外光谱分析.....	14
2.3.4 单糖组成分析.....	15

2.3.5 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析	15
2.3.6 离子色谱分析	15
2.3.7 蒽酮硫酸法测定总糖	15
2.3.8 气相色谱测定短链脂肪酸浓度	16
第三章 结果与讨论	17
3.1 结冷胶寡糖的制备及条件优化	17
3.1.1 酸水解制备结冷胶寡糖及其条件优化	17
3.1.2 酶降解制备结冷胶寡糖及其条件优化	18
3.2 结冷胶寡糖的结构表征	20
3.2.1 傅里叶红外光谱分析	20
3.2.2 单糖组成分析	21
3.2.3 结冷胶寡糖聚合度分析	22
3.3 结冷胶寡糖的体外模拟消化	23
3.3.1 体外模拟消化过程中结冷胶寡糖聚合度变化	23
3.3.2 体外模拟消化过程中还原糖含量变化	26
3.4 结冷胶寡糖的体外粪菌发酵	26
3.4.1 不同聚合度结冷胶寡糖在体外粪菌发酵过程中的消耗速率	26
3.4.2 不同聚合度结冷胶寡糖对肠道菌群多样性的影响	27
3.4.3 不同聚合度结冷胶寡糖对肠道菌群组成的影响	29
3.4.4 不同聚合度结冷胶寡糖对短链脂肪酸的影响	33
3.4.5 不同聚合度结冷胶寡糖的肠道微生物代谢功能预测	36
主要结论与展望	38
主要结论	38
展望	39
参考文献	40

第一章 绪论

1.1 结冷胶概述

结冷胶是鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas paucimobilis*) 产生的一种线性阴离子多糖, 由 $\rightarrow 3$)- β -D-葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-葡萄糖醛酸-(1 \rightarrow 4)- β -D-葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- α -L-鼠李糖-(1 \rightarrow 为重复单元构成^[1], 如图 1-1 所示, 分子量大约为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ Da^[2]。最初产生结冷胶的细菌是由一个天然池塘的百合植物组织中发现和分离的, 1992 年结冷胶获得美国食品药品监督管理局批准用作食品添加剂^[3], 是第三种在食品中使用的微生物胞外多糖^[4]。结冷胶是由双螺旋结构聚集而成的, 由于物理力、氢键和范德华力的作用, 结冷胶的双螺旋结构具有内聚性。通过氢键的二次相互作用双螺旋结构进一步交联形成三维大分子网状结构^[5]。研究发现, 结冷胶在胶化过程中经历了一个热可逆的螺旋向双螺旋转变过程, 随温度降低, 由无序的单链状态转变为有序的双螺旋结构^[6]。

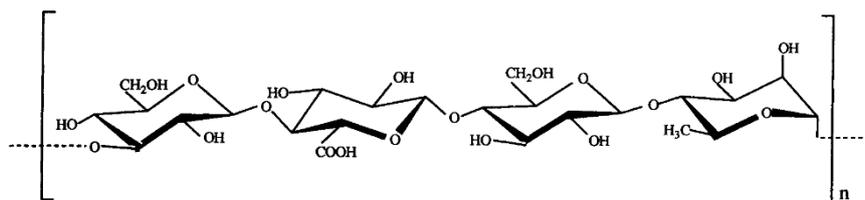


图 1-1 结冷胶重复单元结构图

Fig.1-1 Repeating-unit structure of gellan gum

结冷胶因其特有的结构而呈现出稳定性、凝胶性和增稠性等优越性能^[7, 8], 并且结冷胶安全无毒、互溶性好, 被广泛应用于食品、生物制药与农业环境等领域^[9-11]。在食品工业中, 结冷胶能在连续相和油水界面处形成网络结构, 可以作为稳定剂用于乳液凝胶, 被添加在多种类型的果冻、布丁等凝胶性食品这中^[12]。在生物医药领域中, 结冷胶能够作为药物递送载体, 也可以作为新型的材料用于软骨组织再生^[13]。在农业领域, 结冷胶复合水凝胶由于具有高保水性, 能够可控的释放肥料^[14]。

1.2 寡糖概述

1.2.1 寡糖制备方法

寡糖是一种具有很大潜力的功能碳水化合物, 由 2~10 个单糖单元通过 α -或 β -糖苷键连接而成^[15, 16]。寡糖主要可以通过从天然原料中提取与多糖降解来制备^[17]。

低聚果糖、低聚木糖与大豆低聚糖都可以从天然原料中提取。低聚果糖大量存在于谷物、水果和蔬菜中, 如小麦、蜂蜜、洋葱、大蒜和香蕉等^[18]; 低聚木糖也可以从植物中提取, 包括麦麸、大麦壳、杏仁壳、稻壳、竹子和玉米芯等^[19]; 大豆低聚糖的主成分水苏糖、棉籽糖与蔗糖广泛存在与植物中, 其中水苏糖与棉籽糖在豆科植物中含量最多^[17]。此外, 微生物合成是获得寡糖的另一种重要途径。有寡糖生产能力的微

生物包括双歧杆菌、曲霉、克鲁威菌和芽孢杆菌等^[16]。还有一些功能性寡糖如低聚半乳糖和人乳寡糖都天然存在于母乳中，其在婴儿的发育与消化中都起着不可或缺的作用^[20]。除此之外，大部分寡糖是由多糖作为原料，通过一些技术手段降解得到的，常用的多糖降解方法主要有物理、化学与生物降解三种方法。

1.2.1.1 化学法降解

化学降解包括酸水解、碱水解和氧化降解，化学法降解具有操作简单、成本低廉的优点，并且通过控制降解条件，可得到不同聚合度分布的产物。但化学法降解过程通常是在高温和酸性条件下进行的，这可能会导致副产物的产生，并且需要用碱来中和酸。化学降解已被广泛应用到多糖降解中，如王琪等人利用 H_2O_2 对海带硫酸多糖进行降解，使其分子量降至 1×10^4 Da 左右^[21]；师然新等人也采用 H_2O_2 降解角叉菜多糖，结果发现降解过后溶液黏度明显降低，且黏度与 H_2O_2 添加量呈负相关^[22]。高玉杰等人利用三氟乙酸降解浒苔多糖，发现降解后黏度显著降低，水溶性提高，并且平均分子量降低了 46.13%^[23]。酸水解也是制备褐藻寡糖最常用的方法，褐藻胶在 $0.1 \sim 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 水溶液中能够被降解。此外，酸预处理还能够提高氧化降解聚褐藻胶的降解效率，增加低分子量褐藻寡糖产物，使用 30% H_2O_2 水解经 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 预处理后的褐藻胶，可得到更多聚合度 2~7 的褐藻寡糖^[24]。

1.2.1.2 物理法降解

物理法降解多糖具有无污染、简单和高效等优点。水热降解、微波辅助降解、超声波辅助降解、紫外辐射与伽马辐射都是常用的多糖物理降解方式。Nguyen 等人采用 γ 射线对含有不同浓度 H_2O_2 (0.25~1%) 的壳聚糖 (3%) 溶液进行辐射，制备了分子量小于 1×10^4 Da 的不同聚合度低聚糖，并研究了不同剂量对壳聚糖分子量分布和辐射降解率的影响，验证了 γ 射线与 H_2O_2 诱导的协同降解效应^[25]。杨天怡等人采用 γ 射线对结冷胶多糖进行降解，当辐照剂量为 175 kGy，剂量率 $7 \text{ kGy} \cdot \text{h}^{-1}$ 时，结冷胶分子量由 4.4×10^5 Da 降低至 7×10^4 Da^[26]。Ulbrich 等人利用酸水解和超声波降解相结合的方式降解颗粒状马铃薯淀粉，结果表明超声波处理诱导了支链淀粉的去分支，与直链淀粉的链断裂^[27]。但物理法降解多糖成本高，降解效率低，因此物理降解在实践中还没有被广泛采用。

1.2.1.3 生物法降解

与物理和化学方法相比，酶降解多糖具有高效、专一、安全及副产物少等优点。越来越多的研究者开始进行酶解多糖的研究，例如，木糖是低聚木糖的生产原料，木糖存在于麦麸、稻草、废木材、大麦壳、杏仁壳、竹子和玉米芯等植物中，曲霉、木霉、鞭孢菌、芽孢杆菌和链霉菌能产生木聚糖酶对木聚糖进行水解从而制备低聚木糖^[28]。杨国帅等人利用在毕赤酵母中外源表达的黄原胶内切酶降解野油菜黄单胞菌生产的黄原胶，成功制备出分子量为 1093 Da 的黄原胶寡糖^[29]。高敏杰等人在毕赤酵母中表达哈茨木霉内切- β -1, 3-葡聚糖酶基因，所表达的葡聚糖酶能有效水解硬葡聚糖和裂褶多糖，生成具有不同聚合度 (DP=3~10) 和不同结构的支链低聚糖^[30]。

1.2.2 寡糖功能

寡糖在早期被日本、欧洲等国家的学者提出进行研究，而我国对于寡糖及其功能性研究起步较晚。已有大量研究证明，功能性寡糖具有抗菌、提高机体免疫功能、抵抗炎症反应、抗病毒和调节生理机能等多种功效，而且能够刺激肠道蠕动、增加粪便湿润度、减缓腹泻和便秘^[31]。

壳寡糖是目前天然糖中唯一被发现的、大量存在的碱性氨基寡糖，壳寡糖的生物相容性好且安全无毒，具有改善食品风味、抗菌、果蔬保鲜、促进植物生长及提高免疫力等功能^[32]。褐藻寡糖稳定性好、安全无毒，具有抗肿瘤、抗病毒和抗氧化等功能，还能够保护神经、促进植物与双歧杆菌的生长^[33]。半乳寡糖能够促进叶酸、维生素 B 及烟酸的生成，还能够促进肠道对矿物质元素的吸收。异麦芽糖能够改善肠道生态环境，增加益生菌的丰度、减少有害菌的增殖并且能够防病抗病^[32]。琼脂寡糖具有抗炎、抗氧化、抗糖尿病与抗肥胖等功能^[34]。人乳寡糖在肠道微生物群和早期免疫系统的发育中发挥着关键作用。另外，功能性碳水化合物也被用作药物配方中的辅料或药物递送系统^[35]。

1.3 人体肠道微生物功能概述

人的胃肠道是宿主、人体内抗原和环境因素之间最大的界面之一。人体肠道中存在着超过 100 万亿个微生物，在胃肠道中定居的肠道菌群包括细菌、古生菌和真核生物^[36,37]。肠道细菌分为 12 个不同门，共有 2172 种，其中拟杆菌门（Bacteroidetes）、变形菌门（Proteobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）、放线菌门（Actinobacteria）是肠道细菌中的优势菌门，大约占有肠道细菌门类的 93.5%^[38]。这些肠道微生物会产生短链脂肪酸和其他必需维生素等营养物质，还会参与维持肠道上皮稳态、免疫系统发育、神经系统调控等生理活动，是人体健康平衡的关键因素。

1.3.1 短链脂肪酸

肠道菌群能够合成大量的糖苷水解酶将复杂的多糖分解成单糖，然后肠道菌群再利用这些单糖进行代谢活动从而生成短链脂肪酸。这些短链脂肪酸除了是脂肪生成的重要能量来源外，还是肠道内分泌细胞中两种 G-蛋白偶联受体 GPR41（G-protein-coupled receptor 41）和 GPR43（G-protein-coupled receptor 43）的配体^[39]。与配体结合后，这些 G-蛋白偶联受体刺激 PYY（Peptide YY）的分泌，抑制肠道运动，减缓肠道运输，从而增强营养吸收。乙酸、丙酸和丁酸是肠道菌群产生的三种主要的短链脂肪酸，通常在胃肠道中以 1:1:3 的比例存在^[40]。短链脂肪酸在胃肠道中被肠道上皮细胞迅速吸收，参与如基因表达、分化、增殖和凋亡等细胞调控过程^[41]。

1.3.1.1 短链脂肪酸的产生途径

大多数肠道细菌都能够产生乙酸，而丙酸和丁酸则由不同的肠道细菌亚群按照不同的分子途径产生。

丙二醇途径与琥珀酸途径是糖通过肠道细菌发酵形成丙酸的两种主要途径，脱氧的岩藻糖和鼠李糖是通过丙二醇途径代谢的，而多数戊糖和己糖是通过琥珀酸途径代谢的。琥珀酸途径是形成丙酸盐的主要途径，其大多存在于拟杆菌门中。有研究表明拟杆菌门的相对丰度与人体粪便中的丙酸盐水平相关^[42]。还有一些人肠道菌群构成以厚壁菌门的革兰氏阴性菌为主时，也具有将琥珀酸转化为丙酸的能力，如 *Phascolarctobacterium succinatutens*^[43]。脱氧鼠李糖与岩藻糖能够通过丙二醇途径形成丙酸和丙醇，这一代谢途径已在属于毛螺菌科的主要肠道共生细菌中得到证实，其中包括罗氏菌属 (*Roseburia*) 与经黏液真杆菌属 (*Blautia*)^[44, 45]。另外，其他细菌如大肠杆菌和鼠李糖厌氧菌都能通过丙二醇途径降解糖，但最终产物为途径中间体 1,2-丙二醇^[46, 47]。*Eubacterium hallii* 和罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 虽然不能利用鼠李糖生长，但能够利用 1,2-丙二醇生产丙酸和丙醇^[48]。此外，*Flavonoidsifractor plautii* 和产丁酸肠单胞菌 (*Nestiinimonas butyriproducens*) 也可能利用丙二醇产生丙酸^[49]。

丁酸是由碳水化合物通过糖酵解和乙酰辅酶 a 途径生成的，然后逐步还原为丁基辅酶 a。丁基辅酶 a 形成丁酸盐的最后一步有两种不同的途径，一种是通过丁基辅酶 a 与乙酸辅酶转移酶途径，另一种是通过磷酸转丁酸酶和丁酸激酶途径^[50]。普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) 是健康人类微生物群中最丰富的物种之一，通过丁基辅酶 a 与乙酸辅酶转移酶途径净消耗乙酸盐产生丁酸盐^[51]。而研究发现，丁基辅酶 a 与乙酸辅酶转移酶途径在这个生态系统中比丁酸激酶途径更为普遍。对于使用丁酸激酶途径生成丁酸盐的粪球菌 (*Coprococcus eutactus*)，只有 28% 的丁酸来自乙酸盐，而对于使用丁基辅酶 a 与乙酸辅酶转移酶途径的几个菌株，大于 85% 的丁酸盐是以乙酸盐为底物合成的^[52]。

1.3.1.2 短链脂肪酸的功能

结肠中的乙酸浓度是所有短链脂肪酸中最高的，乙酸是细胞中碳水化合物和脂肪代谢的关键因素^[53]，其可被肝脏吸收并参与胆固醇的合成^[54]。丙酸是肝脏中糖异生和胆固醇合成的抑制剂^[55]，此外丙酸还具有抗炎、抗菌作用^[56]。丁酸是最强的炎症影响因子，肠黏膜发炎常伴随着其他病理过程，造成这种结果的原因是缺乏能量。而丁酸是肠上皮细胞的主要能量来源，能够调节肠上皮细胞分化、增殖和恢复，对肠上皮细胞和其他黏膜细胞群具有有益的免疫调节作用。

1.3.2 肠道微生物的其他功能

肠道微生物群对宿主无法产生的必需维生素等营养物质的合成也至关重要^[57]。在人体中，肠道菌群成员已被证明能够合成维生素 K 以及大多数水溶性维生素 B，如生物素、钴胺素、叶酸、烟酸、泛酸、吡哆醇、核黄素和硫胺素等^[58]。例如，维生素 B₁₂ 是一种人体必需的维生素，但动物，植物及真菌都不能合成，而乳酸菌是合成维生素 B₁₂ 的关键微生物^[57]。叶酸作为一种维生素，同时参与重要宿主代谢过程包括 DNA 的合成和修复，也有证据证明双歧杆菌是其主要的生产者^[59]。另外，结肠细菌还可以代

谢未被再吸收的胆汁酸，将其转化为次生胆汁酸^[60]。

有许多证据支持肠道菌群可以帮助维持粘膜屏障的完整性^[61]。细菌在促进细胞更新和伤口愈合方面的作用已被证实，例如鼠李糖乳杆菌（*Lactobacillus rhamnosus*）作为一种肠道共生细菌可以通过活性氧介导的黏附激酶磷酸酶失活增强肠道上皮细胞的恢复^[62]。此外，一些其他肠道微生物也参与促进肠道上皮的完整性，如嗜黏蛋白阿克曼菌（*Akkermansia muciniphila*）^[63]和植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）^[64]。

除了维持肠道上皮稳态，肠道细菌还具有调节粘液性质的作用。在无菌条件下饲养的小鼠有一层极薄的结肠黏液层，但当无菌小鼠的结肠黏膜暴露于细菌产物（肽聚糖）时，黏液层的厚度可以恢复到在常规饲养小鼠中观察到的水平^[65]。还有一些肠道细菌可以调节粘液的产生^[66]，例如瘤胃球菌（*Ruminococcus gnavus*）、干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）和多形拟杆菌（*Bacteroides thetaiotaomicron*）能够通过调节糖基转移酶的表达来重塑粘蛋白的糖基化^[67, 68]。

肠道菌群对免疫系统的发育也至关重要，无菌动物在免疫细胞类型和淋巴样结构方面表现出的缺陷证明了这一点。无菌动物表现出的一个主要免疫缺陷是 CD4⁺T 细胞群缺乏，但当脆弱拟杆菌（*Bacteroides fragilis*）在无菌小鼠的肠道定植时则能够在宿主体内建立适当的全身 TH1/TH2 平衡，使这种缺陷完全逆转^[69]。肠道上皮细胞的模式识别受体如 Toll（Toll-like receptors）样或 Nod（Nod-like receptor）样受体可以完成这一过程，这些受体能够识别肠道微生物产生的分子效应物。这些分子效应物介导的过程可以改善某些炎症性肠道疾病，区分有益细菌和致病菌，或增加免疫细胞与其模式识别受体（Pattern recognition receptors, PRRs）的数量^[70]。

1.4 益生元概述

益生元在早期被定义为“通过选择性刺激结肠中一种或有限数量细菌的生长或活性，以改善宿主健康，从而对宿主有益的不可消化的食物成分”^[71]。近几年，国际益生菌和益生元科学协会从更广泛的角度更新的益生元的概念，将其定义为：“被宿主微生物选择性利用的对健康有益的底物”。针对肠道的益生元必须抵抗胃肠道的上部消化，包括胃的低 pH 值、肠酶水解和胃肠道吸收^[72]。在食物成分中，不可消化的碳水化合物（寡糖和多糖），一些多肽和蛋白质，以及某些脂类（包括醚类和酯类）是候选的益生元。由于它们具有特殊的化学结构，这些化合物在胃肠道的上部不能被吸附，也不能被人的消化酶水解。这类食材可称为“菌落食物”，即进入结肠作为内源性菌落细菌底物的食物，从而间接为宿主提供能量、代谢底物和必需微量营养素^[71]。在菌落食物中，不可消化的碳水化合物是天然存在的，能够满足上述定义的益生元标准。虽然已知一些多肽和蛋白质（主要来自牛奶和植物）不可消化，并且在促进肠道对阳离子（主要是钙和铁）的吸收和刺激免疫系统方面具有一些有益的作用，但菌群发酵在这些方面的作用尚未得到证实。相反，对蛋白质进行厌氧发酵很可能产生潜在的有害化合物^[73]。在常见的食品中天然存在的不可消化脂类还没有被广泛研究，因此脂类在菌落微生物

群中的代谢在很大程度上是未知的。不可消化的碳水化合物包括各种化合物，如抗性淀粉、非淀粉多糖（植物细胞壁多糖、半纤维素、果胶）和不可消化的寡糖^[74]。

1.4.1 碳水化合物类益生元

近几十年来，寡糖或多糖已被报道对肠道菌群或肠道微环境发挥有益作用。其中菊粉和低聚果糖是研究最多的，它们在体内和体外都有选择性地调节肠道菌群，对宿主健康有益。菊粉广泛分布于洋蓟、菊苣、洋葱、韭菜、大蒜和芦笋等几种植物中，通常是从菊苣根中分离出来的。摄入菊粉可改善大便频率，有助于增加粪便量，增加粪便酸度。在食物中补充菊粉可以显著增加双歧杆菌的相对丰度，从而改善肠道菌群。菊粉在大肠或结肠中由有益细菌如双歧杆菌和乳酸杆菌发酵，发酵产物可以降低肠道 pH 值，抑制致病菌和腐败菌的生长，使宿主受益^[75]。低聚果糖是低分子量版本的菊粉，在商业上通常使用菊苣中的内糖苷酶部分水解菊粉生产低聚果糖。研究表明将低聚果糖作为碳源进行人体粪便细菌的体外培养，其能够选择性地刺激双歧杆菌的生长，同时将梭状芽孢杆菌等潜在的病原体维持在较低的水平^[76]。

迄今为止，大多数益生元开发工作都集中在碳水化合物上，除菊粉与低聚果糖外，特别是寡糖近年来引起了研究者的广泛关注。在动物与外发酵研究中都发现添加低聚木糖和低聚半乳糖增加了双歧杆菌的相对丰度与短链脂肪酸的产量^[77, 78]。魔芋甘露聚糖被证明可以调节肠道微生物群并降低小鼠的肥胖率^[79]。 β -葡聚糖可以促进乳酸菌生长，增加乙酸盐浓度，还具有抗肿瘤、免疫调节、降低血压和抗糖尿病等作用^[80, 81]。壳寡糖可调节人体肠道菌群，并对大鼠模型中的生长性能和免疫力产生有益影响。

1.4.2 肠道细菌对寡糖的代谢

功能性寡糖能够抵抗宿主上消化道的消化，到达结肠后主要由结肠中的双歧杆菌、乳酸杆菌以及含有各种碳水化合物代谢相关酶的其他共生细菌对其进行代谢^[82]。寡糖被摄入后首先被细菌膜上的模块化糖苷酶识别并水解成低聚合度的寡糖。随后，寡糖通过膜蛋白转运进入细胞，并被酶分解成二糖和单糖^[83]。例如，低聚果糖首先被嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 通过 ABC (ATP binding cassette, ABC) 转运体吸收，并降解为 β -葡萄糖苷，再通过果糖苷酶和 β -呋喃糖苷酶分别分解为果糖和葡萄糖进而被细胞利用^[84]。低聚半乳糖通过渗透酶转运进入嗜酸乳杆菌，随后被 β -半乳糖苷酶水解成葡萄糖和半乳糖，这两种单糖分别是糖酵解和 Leloir 途径的底物^[85]。

对于肠道细菌来说，其碳水化合物转运系统摄取特定寡糖的能力对其寡糖代谢至关重要。首先，促扩散系统能够按照浓度梯度输送寡糖，而不需要借助额外的生物能量。寡糖/ H^+ 和寡糖/ Na^+ 转运体允许寡糖和各自离子之间同时跨膜转运。此外，ABC 转运体是一组已知的活性转运系统，其中成员如 *msmEFGK* 转运体高度参与细菌寡糖转运^[86]。这些 ABC 转运蛋白在细菌中可以吸收具有 ATP 能量输入的寡糖，并赋予寡糖对抗浓度梯度的能力。然而，磷酸转移酶系统 (Phosphotransferase system, PTS) 是原核

特异性的转运系统，一些 PTS，如 *pts1BCA* 可以实现寡糖的跨膜转运和磷酸化^[87]。其中磷酸烯醇丙酮酸在细菌基因库中既是磷酸化供体，也是单糖单元的能量代谢途径^[88]。

1.4.3 影响肠道细菌代谢寡糖的因素

1.4.3.1 糖苷键的类型和单糖组成

不同的糖苷键连接和单糖组成影响寡糖的消化功能抗性，并且进一步影响其肠道代谢和益生元特性^[89]。例如，与 β -1,4 连接的低聚半乳糖相比， β -1,6 连接的低聚半乳糖对于刺激双歧杆菌的生长效果更好^[78]。此外，低聚异麦芽糖、低聚半乳糖与低聚木糖由相同的丁酸梭菌发酵却表现出了不同的产丁酸能力。特别是低聚异麦芽糖的产丁酸量分别是低聚半乳糖和低聚木糖的 1.71 倍和 2.61 倍^[90]。寡糖糖苷键的特异性和单糖组成影响其发酵特性，并促进肠道菌群产生相应的酶。因此，寡糖的动能利用可根据宿主的特定需求进行调整^[91]。

1.4.3.2 聚合度

大多数寡糖由多个单糖组成，形成具有不同聚合度的直链或支链，寡糖的链长是影响肠道细菌发酵的主要因素^[92]。如肠道细菌优先发酵短链异麦芽糖（DP=3）而不是长链异麦芽寡糖（DP=8）。与摄入长链异麦芽糖相比，在大鼠饲料中添加短链异麦芽糖可以通过增加盲肠内容物中的丁酸浓度和结肠黏膜中胰高血糖素样肽-2 水平来延缓结肠炎的发展^[93]。当聚合度低于 7 时，长双歧杆菌会优先利用短链人乳寡糖^[94]，因为短链寡糖能够更高效的被双歧杆菌捕获，转运到细胞质中并进行后续发酵^[83]。使用不同聚合度的低聚半乳糖进行代谢实验发现，鼠李糖乳杆菌（*Lactobacillus rhamnosus*）和乳双歧杆菌（*Bifidobacterium*）主要消耗单糖和二糖，而嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）消耗三糖。

1.4.3.3 线性和分支结构

寡糖的分子结构特性是影响其在胃肠道内被分解和功能的另一个重要决定性因素。带有支链的 α -葡萄糖构成的寡糖在结肠内的消化率低于其对应的线性寡糖。例如，线性或分支型的异麦芽糖（DP=2~8）的消化率低于可消化的麦芽糖糊精（DP=2~8），但远高于抗性麦芽糖糊精^[95]。一项关于葡萄糖化酶功能的研究发现，与带支链的聚合度为 6 的葡寡糖（ $\text{glc}(\alpha-1,4)\text{glc}(\alpha-1,4)[\text{glc}(\alpha-1,4)\text{glc}(\alpha-1,6)]\text{glc}(\alpha-1,4)\text{glc}$ 或 $\text{glc}(\alpha-1,4)[\text{glc}(\alpha-1,4)\text{glc}(\alpha-1,4)\text{glc}(\alpha-1,6)]\text{glc}(\alpha-1,4)\text{glc}$ ）相比，麦芽六糖可以被葡萄糖淀粉酶快速水解。这是因为葡萄糖淀粉酶在线性寡糖中切割 α -1,4 键的速率高于分支寡糖中靠近 α -1,6 键的 α -1,4 键的速率^[96]，这表明该酶优先在远离分支点的非还原端切割 α -1,4 键。因此，寡糖的结构特性是影响其在肠道内消化率和功能特性的另一个决定因素。

1.5 本课题的研究目的、意义及主要内容

1.5.1 立题目的与意义

目前,寡糖的功能活性已引起广泛关注,如 α -1,3-葡寡糖和卡拉胶寡糖具有抗肿瘤活性,壳寡糖具有植物的抗病性。不同结构的寡糖可能具有不同的生物活性,其中聚合度被认为是对分子功能特性影响最大的参数之一。特定聚合度寡糖可能具有特定的功能活性,如麦芽七糖可以作为蛋白质和细胞的特异性识别标记。此外,一些寡糖的功能活性与聚合度大小呈现了相关性,如壳寡糖对超氧自由基的清除能力也与聚合度大小成正相关。近年来有研究者发现利用酸水解结冷胶得到的低聚结冷胶具有植物的抗菌活性,并且能够促进植物生长和改善植物叶片品质。但关于不同聚合度对结冷胶寡糖功能活性影响的研究却鲜有报道,因此降解结冷胶制备不同聚合度结冷胶寡糖并探究其功能活性差异具有重要意义。

传统的寡糖生产方法多是对多糖进行化学降解和酶法降解。化学降解具有操作简便、成本低等优点,但化学降解产物组分往往比较复杂。酶法降解因为其特异性高而能得到均一的目标产物且反应温和得到了越来越多的关注。因此,不同的降解方式可以制备出不同聚合度的寡糖以满足特定需求。本研究通过酸解的方式制备出聚合度分布较大的结冷胶寡糖,并通过结冷胶裂解酶生产聚合度均一的结冷胶寡糖,为制备不同聚合度与均一聚合度寡糖提供了一种新思路,并在此基础上探究了不同聚合度结冷胶寡糖的益生活性。

1.5.2 本课题主要研究内容

本课题通过酸解与酶解的方式制备出不同聚合度的结冷胶寡糖,并对两种降解方式制备出的结冷胶寡糖进行产物分析鉴定,解析其产物在结构方面的差异。在此基础上,对结冷胶寡糖进行了体外模拟消化实验,解析其在上消化道消化过程中的降解情况。最后将不同聚合度的结冷胶寡糖进行体外粪菌发酵,探究其对人体肠道菌群结构的影响与代谢物质差异。主要研究内容如下:

(1) 分别使用盐酸和结冷胶裂解酶对结冷胶进行降解。以获得聚合度大范围分布结冷胶寡糖为目标,分别从底物浓度、盐酸浓度、水解时间三个影响水解效果的重要因素对酸水解条件进行了优化。为提高酶法降解效率,提出了一种在裂解酶发酵过程中添加结冷胶的策略,实现了结冷胶寡糖的一步法制备,并对裂解酶发酵和多糖实时降解过程进行优化从而确定结冷胶降解效率最高的降解条件。

(2) 对两种降解方式的结冷胶寡糖进行分离纯化,将纯化后的产物通过红外光谱、单糖组成和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱对产物的结构差异进行解析。

(3) 对结冷胶寡糖进行体外模拟消化实验,使结冷胶寡糖分别通过模拟唾液、模拟胃液和模拟小肠液的消化,探究其在上消化道消化过程中的降解情况。对结冷胶寡糖进行体外粪菌发酵,并通过 16s rDNA 测序,短链脂肪酸含量测定等方法探究不同降解方式得到的结冷胶寡糖对肠道菌群结构的影响与代谢物质差异。图 1-1 为本文的研究路线图。



图 1-2 论文研究路线图

Fig.1-2 The research route diagram of the paper

第二章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验原料

低酰基结冷胶（食品级）购自江苏仟泊生物工程有限公司。

2.1.2 实验菌种

菌株 *Pichia pastoris* GS115-pPIC9K-nGL1 由江南大学糖生物制造与生物反应器研究室保藏。

2.1.3 主要试剂

表 2-1 主要试剂

Table 2-1 Main reagents

名称	纯度	生产厂家
盐酸	分析纯	国药集团
氢氧化钠	分析纯	国药集团
无水乙醇	分析纯	国药集团
乙酸	分析纯	国药集团
乙酸乙酯	分析纯	国药集团
正丙醇	分析纯	国药集团
蒽酮	分析纯	国药集团
硫酸	分析纯	国药集团
3,5-二硝基水杨酸	分析纯	国药集团
四水酒石酸钾钠	分析纯	国药集团
苯酚	分析纯	国药集团
无水亚硫酸钠	分析纯	国药集团
重水	分析纯	阿拉丁
三氟乙酸	分析纯	国药集团
正丁醇	分析纯	国药集团
三氯甲烷	分析纯	国药集团
甲醇	分析纯	国药集团
乙醚	色谱纯	国药集团
无水硫酸钠	分析纯	国药集团
2-甲基丁酸	分析纯	国药集团
α -淀粉酶	分析纯	国药集团
胃蛋白酶	分析纯	国药集团
胃脂肪酶	分析纯	百灵威
胰蛋白酶	液相纯	百灵威
胰酶	液相纯	百灵威

2.1.4 主要仪器

表 2-2 主要仪器

Table 2-2 Main instruments

仪器名称	型号	生产厂家
电子分析天平	AL204	瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司
恒温磁力搅拌水浴锅	JTLY-70A	常州金坛良友仪器有限公司
pH 计	Starter 2C	上海奥汉斯仪器有限公司
高速冷冻离心机	3K-15	美国 Sigma-Aldrich 公司
全自动电热压力灭菌器	GI80DWS	致微(厦门)仪器有限公司
双人单面超净工作台	SW-CJ-2D	上海博讯实业有限公司
生化培养箱	SPX-150B-Z	上海博讯实业有限公司
恒温回旋式摇床型	HYL-C ₃	太仓市强文实验设备有限公司
旋转蒸发器	RE-5205	上海亚荣生化仪器厂
酶标仪	MULTISKAN FC 型	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
冷冻干燥机	SCIENTZ-10N	宁波新芝生物科技有限公司
分光光度计	TU-1810	北京普析通用仪器有限公司
傅里叶变换红外光谱仪	NEXUS 型	美国 Nicolet 公司
核磁共振波谱仪	Aduance III 400 MHZ	德国布鲁克 AXS 公司
数显恒温金属浴	HH-2 型	美国 Boekel 公司
厌氧培养箱	HYQX-II	上海跃进医疗设备有限公司
真空干燥箱	DZF-6050 型	上海新苗医疗器械制造公司

2.1.5 主要培养基

表 2-3 主要培养基

Table 2-3 Main culture medium

培养基名称	培养基配方 (g·L ⁻¹)
YPD 固体培养基	葡萄糖 20、酵母粉 10、蛋白胨 20、琼脂粉 20
BMGY 培养基	蛋白胨 20、酵母粉 10、YNB 13.4、生物素 4×10 ⁻⁵ 、甘油 10、 磷酸钾缓冲液 100 (mmol·L ⁻¹)、pH 6.0
BMMY 培养基	酵母粉 10、蛋白胨 20、YNB 13.4、生物素 4×10 ⁻⁵ 、 甲醇 10 (mL·L ⁻¹)、磷酸钾缓冲液 100 (mmol·L ⁻¹)、pH 6.0
基础培养基	胰蛋白胨 2、酵母浸粉 2、NaCl 0.1、K ₂ HPO ₄ 0.04、KH ₂ PO ₄ 0.04、 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.01、CaCl ₂ ·6H ₂ O 0.01、NaHCO ₃ 2、吐温-80 2 (mL)、 氯化血红素 0.025、L-半胱氨酸盐酸盐 0.5、胆汁盐 0.5、刃天青 0.25、 维生素 K1 0.002

2.2 实验方法

2.2.1 结冷胶寡糖的制备与条件优化

2.2.1.1 酸水解结冷胶条件优化

底物浓度优化：分别称取 1、3、5、7 g·L⁻¹ 的食品级低酰基结冷胶溶于适量蒸馏水

中，90°C水浴加热至结冷胶完全溶解，向溶液中补加蒸馏水与浓盐酸至溶液中盐酸浓度为 0.5 mol·L⁻¹。将配制好的水解液置于 70°C水浴锅中加热水解 3 h。水解结束后分别取样待后续薄层色谱分析。

盐酸浓度优化：称取 4 份 5 g·L⁻¹ 的食品级低酰基结冷胶溶于适量蒸馏水中，90°C水浴加热至结冷胶完全溶解，补加蒸馏水与浓盐酸至终溶液中的盐酸浓度分别为 0.25、0.5、0.75、1 mol·L⁻¹。将配制好的水解液置于 70°C水浴锅中加热水解 3 h。水解结束后分别取样待后续薄层色谱分析。

水解时间优化：称取 5 g·L⁻¹ 的食品级低酰基结冷胶溶于适量蒸馏水中，90°C水浴加热至结冷胶完全溶解，补加蒸馏水与浓盐酸至终溶液中的盐酸浓度为 0.5 mol·L⁻¹。将配制好的水解液置于 70°C水浴锅中加热水解 6 h，期间每小时取样一次待后续薄层色谱分析。

2.2.1.2 毕赤酵母发酵耦合多糖添加一步法制备结冷胶寡糖及条件优化

酶解结冷胶制备结冷胶寡糖：将前期实验室构建的含有结冷胶裂解酶基因的重组毕赤酵母 (*P. pastoris* GS115-pPIC9K-nGL1) 划线接种于 YPD 平板培养基上，在 30°C 恒温培养箱中倒置活化 60~72 h。活化结束后，挑取单菌落接种至 BMGY 液体培养基中（装液量 10%，v·v⁻¹），30°C、200 r·min⁻¹ 条件下培养 16~18 h 至 OD₆₀₀ 达到 4~6 得到种子液。称取适量结冷胶添加至 BMMY 液体培养基中，将收集的种子液中的菌体接种至添加了结冷胶的 BMMY 培养基中，30°C、200 r·min⁻¹ 条件下培养 120 h。

酶解结冷胶条件优化：保持其他条件不变，调整发酵初始结冷胶添加量为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g·L⁻¹ 研究发酵初始结冷胶添加量对结冷胶寡糖产量的影响。以初始结冷胶添加量为 2.0 g·L⁻¹，保持其他条件不变，研究发酵时间对结冷胶寡糖产量的影响。收集发酵液待后续制备酶解结冷胶寡糖。以初始结冷胶添加量为 2.0 g·L⁻¹，保持其他条件不变，调整甲醇添加量 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% (v·v⁻¹)，研究甲醇添加量对结冷胶寡糖产量的影响。

2.2.2 结冷胶寡糖分离纯化方法

2.2.2.1 酸解结冷胶寡糖纯化

酸水解结束后加入 NaOH 将水解液 pH 调至 7，然后离心除去未水解的悬浮物，收集上清液并通过旋转蒸发浓缩至水解液的 10% (v·v⁻¹) 得到浓缩液。在浓缩液中添加 6 倍体积的无水乙醇进行醇沉，4°C 冰箱过夜后收集上清液，继续在上清液中添加 4 倍浓缩液体积的无水乙醇，4°C 冰箱过夜后收集沉淀。用去离子水复溶沉淀，将复溶后的液体加入凝胶过滤层析柱将酸解结冷胶寡糖分离为 Mw<1000，Mw>1000 两种组分。收集洗脱样品加入 100~500 Da 的透析袋进行透析除盐。

凝胶过滤层析条件：填料为 Bio-Gel P-4，层析柱型号为 1.5×100 cm，上样量 1 mL，洗脱液为 NH₄HCO₃ (0.1 mol·L⁻¹)，流速为 0.1 mL·min⁻¹，。

2.2.2.2 酶解结冷胶寡糖纯化方法

发酵降解结束后的发酵液通过离心除去菌体，收集上清液并通过旋转蒸发浓缩至发酵液的 10% ($v \cdot v^{-1}$) 得到浓缩液。在浓缩液中添加 7 倍体积的无水乙醇进行醇沉，4°C 冰箱过夜后收集上清液，继续向上清液中添加 3 倍浓缩液体积的无水乙醇，4°C 冰箱过夜后收集沉淀。用去离子水复溶沉淀后，通过 Sevage（三氯甲烷:正丁醇=4:1）法除蛋白（发酵液:Sevage 试剂=4:1）。除蛋白后通过 C_{18} 固相萃取小柱进一步除蛋白及色素等其他杂质。最后，将除杂后的糖液加入 100~500 Da 的透析袋进行透析除盐。

C_{18} 固相萃取小柱纯化方法^[97]: (1) 活化小柱: 1~2 倍柱体积的乙腈淋洗小柱; (2) 活化后用 1~2 倍体积的去离子水再次淋洗小柱; (3) 上样, 并收集流出液体; (4) 用 1~2 倍体积去离子水淋洗小柱, 并收集水洗液。

2.2.3 体外模拟消化实验

模拟唾液 ($g \cdot L^{-1}$): KCl 1.126、NaHCO₃ 1.143、NaCl 0.12、CaCl₂ 0.167、 α -淀粉酶 150 U $\cdot mL^{-1}$ 。

模拟胃液 ($g \cdot L^{-1}$): KCl 1.1、NaCl 3.1、NaHCO₃ 0.6、CaCl₂ 0.15、胃蛋白酶 0.24、胃脂肪酶 0.254、20 mL CH₃COONa 溶液 (1.0 mol $\cdot L^{-1}$, pH 5.0), 使用 0.1 mol $\cdot L^{-1}$ HCl 溶液调节 pH 值至 2.0。

模拟小肠液 ($g \cdot L^{-1}$): KCl 0.65、NaCl 5.4、CaCl₂ 0.33, NaHCO₃ (1 mol $\cdot L^{-1}$) 溶液调节 pH 值到 7.0, 然后加入胰蛋白酶 0.013、胰酶溶液 7.0 和胆汁盐 4.0, 用 NaOH 溶液 (0.1 mol $\cdot L^{-1}$) 调节 pH 值至 7.5。

称取 32 mg 结冷胶寡糖溶解于 8 mL 模拟唾液中, 将溶液置于 37°C 水浴锅中震荡 (100 r $\cdot min^{-1}$), 于 0、15、30 min 分别取样 1 mL。将剩余的 5 mL 模拟唾液和寡糖混合物与 5 mL 模拟胃液混合, 至于 37°C 水浴锅中震荡 (100 r $\cdot min^{-1}$), 于 0、1、2、4、6 h 分别取样 1 mL。再次将剩余 5 mL 液体与 5 mL 模拟小肠液混合, 至于 37°C 水浴锅中震荡 (100 r $\cdot min^{-1}$), 于 0、1、2、4、6 h 分别取样 1 mL, 至此模拟唾液、胃液、小肠液消化结束。

2.2.4 健康人粪便采集

新鲜人粪便来源于三名健康捐赠者 (两男一女, 年龄 20~30 岁), 采用无菌粪便收集杯进行粪便采集, 采集后立即放入厌氧袋, 并至于冰上保存。志愿者需在捐赠粪便前两个月内没有服用过抗生素、益生元与益生菌。

2.2.5 体外静态粪菌发酵

以 0.5% ($w \cdot v^{-1}$) 的浓度将酸解结冷胶寡糖 ($M_w < 1000$, $M_w > 1000$)、酶解结冷胶寡糖作为碳源添加到基础营养培养基中, 共三组实验组, 分别为 GOS1、GOS2 与 GOS3 组。添加低聚果糖 (Fructo oligosaccharide, FOS) 为碳源作为阳性对照 FOS 组, 不添加碳源的基础营养培养基作为阴性对照 (发酵 0 h 为 Blank0 组, 发酵 24 h 为 Blank 组), 共两组对照组。将上述 2.2.4 中收集的三个健康人的新鲜粪便等量混匀, 并用无菌

磷酸盐缓冲液 ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对粪便进行稀释获得粪便匀浆 (10% , $\text{w}\cdot\text{v}^{-1}$), 并在厌氧无菌条件下通过四层无菌纱布过滤去除食物残渣。将粪便浆液以 10% ($\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$) 的接种比接种到培养基中 (均在厌氧条件下进行)。每个实验组分别设置三个平行实验, 在 37°C 下厌氧培养 24 h , 每隔 8 h 收集一次发酵液样品。将收集到的发酵液进行离心 ($12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 获得的菌体沉淀和发酵液上清用于进一步分析。

2.2.6 16s rDNA 测序

采用磁珠法对基因组 DNA 进行提取 (土壤和粪便基因组 DNA 提取试剂盒 DP712)。使用通用引物 338F (($5'$ -ACTCCTACGGGAGGCAGCAG- $3'$) 和 806R ($5'$ -GGACTAC HVGGGTWCTAAT- $3'$) 扩增 16S rRNA 基因的 V3-V4 区。使用建库试剂盒 (NEB/E74 30L) 进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 q-PCR 定量, 文库经检查合格后, 使用 NovaSeq 6000 进行 PE 250 上机测序。分别使用 FLASH (1.2.11 版) 和 QIIME2 (QIIME2-202006 版) 进行配对末端读段的组装和质量控制。使用 QIIME2 (Version QIIME2-202006) 软件中的 DADA2 模块或 deblur 进行降噪, 使用 QIIME2 软件进行物种注释 (数据库为 Silva 138)。利用 QIIME2 分析 Alpha 和 Beta 多样性, 优势微生物群落的显著差异、相关性和功能预测。并使用 R 软件 (4.0.3 版) 进行显示和冗余分析。

2.3 分析检测方法

2.3.1 还原糖含量测定

取 1 mL 稀释到适当浓度的发酵液, 加入 1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) 试剂, 沸水浴加热 5 min , 冷却至室温后补加蒸馏水至 0 mL , 于 550 nm 下测定吸光度。用蒸馏水代替发酵液做空白对照。根据标准曲线计算出吸光度。

DNS 试剂的配制: 准确称取 DNS 3.15 g 于烧杯中, 加入 250 mL 蒸馏水, 加热至 45°C 并充分搅拌。趁热加入酒石酸钾钠 91 g , 氢氧化钠 10.5 g , 苯酚 2.5 g , 亚硫酸钠 2.5 g , 搅拌至完全溶解。待冷却后将溶液置于棕色容量瓶中, 用蒸馏水定容至 500 mL , 室温避光放置 7 d 后使用。

2.3.2 薄层色谱分析

将制备好的样品点于薄层板上, 点样量 $2 \mu\text{L}$, 晾干后放入装有展开剂的层析缸中将产物进行分离。层析完晾干薄层板, 均匀喷上显色剂于 105°C 烘箱显色 5 min 。

展开剂: 酸解结冷胶寡糖 (乙酸乙酯:乙酸:水=5:5:2), 酶解结冷胶寡糖 (正丙醇:乙酸:水=5:2:3); 显色剂: 900 mg 地衣酚, 25 mL 水, 375 mL 乙醇, 50 mL 浓硫酸。

2.3.3 傅里叶变换红外光谱分析

称取制备好的冻干后的结冷胶寡糖 5 mg , 使用傅里叶变换红外光谱 (Fourier Transform infrared spectroscopy, FT-IR) 仪在波数 $4000\sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 区间内进行扫描。

2.3.4 单糖组成分析

称取 5 mg 待测样品溶于 300 μL 三氟乙酸中 ($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)，于 100°C 下金属浴 10 小时。反应结束后在溶液中加入甲醇，使用氮吹仪吹干三氟乙酸，重复此操作 3~4 次，直至三氟乙酸被彻底除尽。然后用去离子水溶解试管底部被吹干的残留物质，通过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤除杂。使用配有 CarboPac PA10 色谱柱的离子色谱仪 (DIONEX ICS-5000+SP-5) 进行检测，洗脱程序如表 2-4 所示。

表 2-4 离子色谱洗脱程序
Table 2-4 The elution program of ion chromatography

时间 (min)	H_2O (%)	$1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaAc}$ (%)	$250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ (%)
0.0	100	0.0	0.0
21.0	97.4	0.0	2.6
21.1	92.4	5.0	2.6
30.0	77.4	20.0	2.6
30.1	20.0	0.0	80.0
50.0	20.0	0.0	80.0

2.3.5 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析

配制 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的寡糖样品溶液，取 $1 \mu\text{L}$ 基质点于质谱预制靶上，再取 $1 \mu\text{L}$ 样品与基质混合，真空泵中抽干液体水分待测量，使用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) 仪在 m/z 400~2000 范围内进行分析。

2.3.6 离子色谱分析

通过模拟唾液、胃液和小肠液消化后的结冷胶寡糖经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤除杂，使用配有 CarboPac PA200 色谱柱的离子色谱仪 (DIONEX ICS-5000+SP-5) 进行检测，洗脱程序如表 2-5 所示。

表 2-5 离子色谱洗脱程序
Table 2-5 The elution program of ion chromatography

时间 (min)	H_2O (%)	$250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ (%)
0.0	100	0.0
21.0	97.4	2.6
21.1	92.4	2.6
30.0	77.4	2.6

2.3.7 蒽酮硫酸法测定总糖

蒽酮试剂配制：称取 1 g 蒽酮溶解于 1000 mL 稀硫酸中 (稀硫酸为 760 mL 浓硫酸

稀释至 1000 mL)。葡萄糖标准液配制：称取 200 mg 烘干恒重的葡萄糖溶解于 1000 mL 水中，配制成 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖标准液。

总糖浓度测定：取 1 mL 待测样品加入试管，再加入 5 mL 蒽酮试剂，沸水浴煮沸 10 min。取出室温下冷却 10 min，震荡后于 620 nm 波长下测定样品吸光度值。根据标准曲线公示计算总糖浓度。

2.3.8 气相色谱测定短链脂肪酸浓度

样品制备：取 1 mL 粪菌发酵液加入试管中，随后依次向试管中加入 10 μL 内标（二甲基丁酸），250 μL 盐酸和 1 mL 乙醚，漩涡震荡 3~5 min，静置待分层。吸取上清液，加无水硫酸钠进行干燥吸水，涡旋 1 min 后静置。最后吸取上清液体，并用 0.22 μm 有机相滤器过滤，至此样品制备完成。

短链脂肪酸（Short-chain fatty acids, SCFAs）测定：使用配有 HP-INNOWAX 色谱柱的气相色谱仪（Agilent-7890A, Santa Clara）测定短链脂肪酸浓度。用进样针吸取样品（5 μL ），以 1:20 的分流比注入进样口。测定条件如下：进样器温度为 220°C ；检测器温度为 250°C ；烘箱温度为 190°C ，并在 4 min 内升至 190°C ；氮气作为载气，流速为 $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。根据内标法分别计算乙酸，丙酸与丁酸的浓度。

第三章 结果与讨论

3.1 结冷胶寡糖的制备及条件优化

3.1.1 酸水解制备结冷胶寡糖及其条件优化

酸水解多糖通常是无规则降解，所得产物往往组分不单一，能够得到分子量分布范围较大的寡糖^[98]。酸浓度、水解时间，底物浓度均能影响酸水解效果，控制这几个重要的影响水解效果的因素对结冷胶进行酸水解从而得到聚合度大范围分布的结冷胶寡糖。通过薄层色谱可以快速对寡糖聚合度进行检测，并且可根据薄层色谱图上斑点颜色深浅大致判断样品浓度。如图 3-1 所示，分别是不同底物浓度、盐酸浓度和不同水解时间对酸水解结冷胶寡糖聚合度分布的影响。从图 3-1a 中可以看出各聚合度的寡糖含量随底物浓度增加而增加，但当底物浓度超过 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时各聚合度斑点颜色变化不再明显。如图 3-1b 所示，当盐酸浓度为 $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，主要产物为聚合度 4 和 8 的寡糖。随盐酸浓度增加，聚合度小于 4 的寡糖逐渐增多，聚合度大于 4 的寡糖逐渐减少，当盐酸浓度为 $0.75 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，聚合度 8 的寡糖在薄层色谱板上几乎消失。尽管聚合度小于 4 的寡糖随盐酸浓度增加而逐渐增加，但当盐酸浓度超过 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，寡糖聚合度范围却在变小，这与得到聚合度大范围分布的结冷胶寡糖的目标不符。考虑到目标产物特性， $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸用来降解结冷胶较为合适。如图 3-1c 所示，随水解时间的增加，聚合度小于 4 的寡糖逐渐增加，聚合度大于 4 的寡糖逐渐减少；但从 4 h 开始，聚合度 4 以上的寡糖逐渐消失。因此，综合考虑下最终选择底物浓度 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，盐酸浓度 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，水解 3 h 作为最优酸水解条件制备结冷胶寡糖。

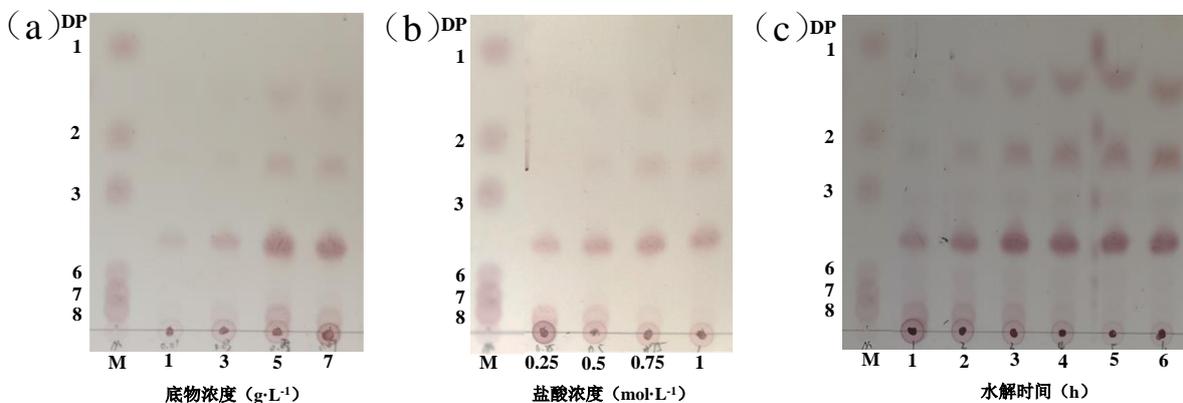


图 3-1 酸水解制备结冷胶寡糖及其条件优化

(a) 底物浓度优化；(b) 盐酸浓度优化；(c) 水解时间优化

Fig. 3-1 Preparation of gellan oligosaccharides by acid hydrolysis and optimization of its conditions
(a) Optimization of substrate concentration; (b) Optimization of HCl concentration; (c) Optimization of hydrolysis time

注：薄层色谱展开剂为乙酸乙酯:乙酸:水=5:5:2

以上述优化后的酸水解条件对结冷胶进行降解。由图 3-2 可知，随水解时间增加，

各聚合度寡糖逐渐增多。水解时间超过 3 h 聚合度大于 4 的寡糖逐渐消失，水解 3 h 能够得到聚合度 2~8 的结冷胶寡糖，并且此时各聚合度寡糖浓度都相对较高。

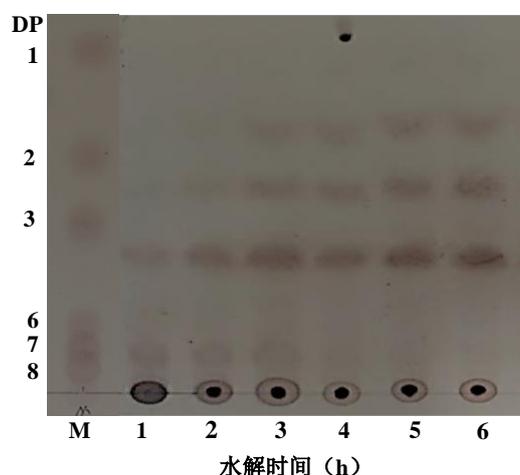


图 3-2 最优酸水解条件验证

Fig. 3-2 Verification of optimal acid hydrolysis conditions

注：薄层色谱展开剂为乙酸乙酯:乙酸:水=5:5:2

3.1.2 酶降解制备结冷胶寡糖及其条件优化

酶解多糖制备寡糖具有产物专一且温和的特点，本研究利用前期实验室构建的含有结冷胶裂解酶基因（来源于 *Bacillus* sp. GL1）的重组毕赤酵母进行外源表达得到结冷胶裂解酶^[99]。传统的酶降解法是先通过发酵生产目标酶，然后直接用粗酶液或是将酶分离纯化后再对多糖进行降解。用粗酶液直接进行降解需要先将酶制备出来再降解多糖，而酶的分离纯化因蛋白质结构复杂、易失活等原因往往需要几种纯化技术联用才能够得到目标蛋白^[100]，降解结束后还需要一系列的寡糖纯化步骤，这样极大的降低了酶法降解结冷胶生产结冷胶寡糖的效率。为了缩短酶法降解的时间，提高酶法降解效率，我们提出了毕赤酵母发酵耦合多糖添加一步法制备结冷胶寡糖的策略，即在结冷胶裂解酶发酵初始添加结冷胶，达到生产结冷胶裂解酶并实时降解多糖，实现一步制备结冷胶寡糖的目的。为此分别对发酵初始结冷胶添加量、发酵时间及甲醇添加量进行优化，从而确定结冷胶寡糖产量更高的降解条件。多糖的降解过程中，某些特定的化学键会发生断裂，使得更多的还原末端被暴露出来，进而使其还原糖含量增加，因此还原糖含量可以作为反应降解效率的一项指标。

发酵初始结冷胶添加量对酶法降解结冷胶效率的影响如图 3-3a 所示，随结冷胶添加量的增加还原糖产量逐渐增加，但当结冷胶添加量超过 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，还原糖含量不再增加。在实验过程中观察到当结冷胶添加量超过 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，会发生发酵培养基凝结的问题，造成这种现象的原因是结冷胶在常温下呈胶状，不利于降解。为了既能够生成较多的结冷胶寡糖又不影响结冷胶裂解酶的生产，综合考虑最终确定发酵初始添加结冷胶 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 较为合适。

为进一步提高酶法降解的效率，本研究对发酵时间进行优化。发酵时间对酶法降

解结冷胶效率的影响如图 3-3b 所示, 同样的还原糖产量也随发酵时间增加而增多, 但当发酵 96 h 后, 还原糖不继续增加, 可能是发酵后期一些细胞产生自噬现象^[101], 限制了甲醇利用效率, 导致发酵后期还原糖产量基本不再增加, 最终确定发酵 96 h 为最佳发酵时间。

酶活力对于寡糖产量至关重要, 酶活力越高则产物产量越高, 因此有必要对发酵条件进行优化使酶活力更高。毕赤酵母表达外源蛋白时, 氮源、碳源与 pH 等培养条件对目标蛋白的完整性及产量都有较大的影响, 大量研究证明甲醇浓度对目的蛋白的表达起着重要作用。重组结冷胶裂解酶是在毕赤酵母中以 AOX1 为启动子进行表达的, 在发酵过程中该菌以甲醇为唯一碳源诱导表达蛋白。因此, 对甲醇添加量进行优化有利于提高结冷胶寡糖的产量。如图 3-3c 所示, 还原糖产量随甲醇添加量的增加而增加, 但当甲醇添加量大于 1% 时, 还原糖产量开始降低, 因此 1% 的甲醇添加量较为合适。

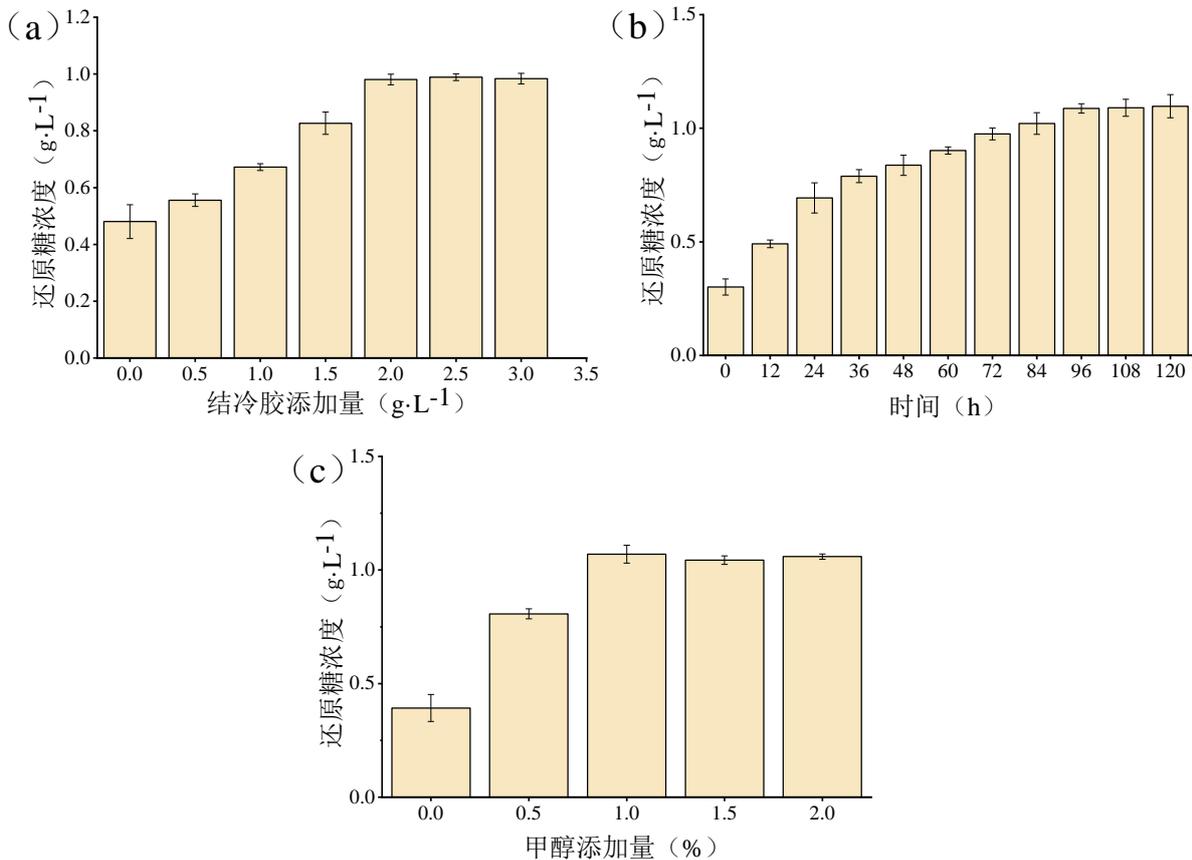


图 3-3 酶降解制备结冷胶寡糖及其条件优化

(a) 结冷胶添加量优化; (b) 降解时间优化; (c) 甲醇添加量优化

Fig. 3-3 Preparation of gellan oligosaccharides by enzymatic degradation and optimization of its conditions
(a) Optimization of gellan gum addition; (b) Optimization of degradation time; (c) Optimization of methanol addition

以上述最优酶解条件对结冷胶进行降解, 还原糖含量随发酵时间增加而增加, 发酵 96 h 后还原糖浓度停止增加, 此时还原糖浓度达到 1.12 g·L⁻¹ (图 3-4a)。通过薄层色谱图可以看出通过结冷胶裂解酶对结冷胶进行降解能够制备出单一聚合度的结冷胶

寡糖（图 3-4b）。

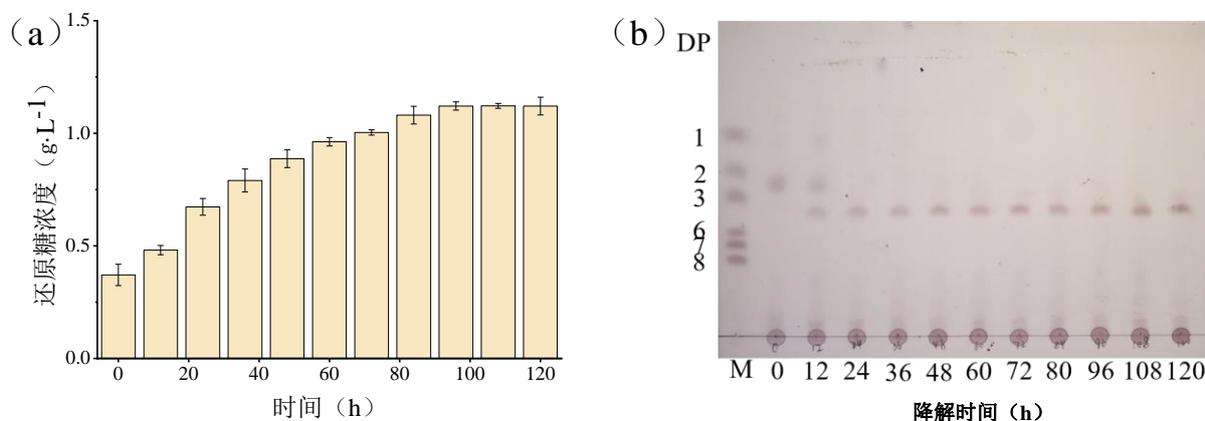


图 3-4 最优酶降解条件验证

(a) 还原糖含量; (b) 薄层色谱分析

Fig. 3-4 Verification of optimal enzymatic degradation conditions
(a) Reducing sugar content; (b) Analysis of thin layer chromatography
注：薄层色谱展开剂为正丙醇:乙酸:水=5:2:3

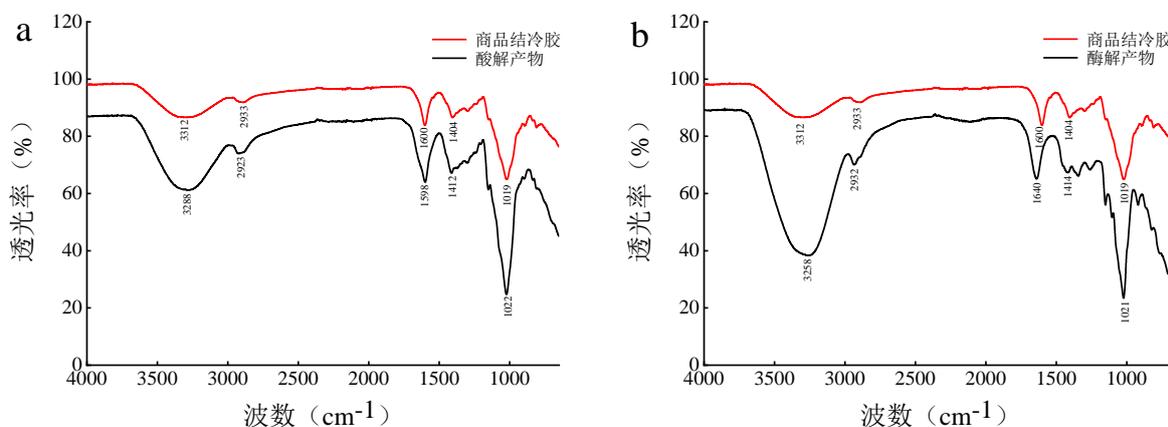


图 3-5 结冷胶寡糖红外光谱分析

(a) 酸解结冷胶寡糖; (b) 酶解结冷胶寡糖

Fig. 3-5 FT-IR analysis of gellan oligosaccharides

(a) Acid hydrolyzed gellan oligosaccharides; (b) Enzymatic degradation gellan oligosaccharides

3.2 结冷胶寡糖的结构表征

3.2.1 傅里叶红外光谱分析

红外光谱可以通过基团的特征吸收频率对有机化合物的结构进行解析。为了解析两种不同降解方式制备的结冷胶寡糖在结构方面的差异，将酸水解与酶降解后得到的寡糖进行纯化，纯化后的样品分别进行红外光谱分析。3288 cm⁻¹、2932 cm⁻¹ 分别代表 OH 和 C-H 的伸缩振动峰^[102]，1414 cm⁻¹、1021 cm⁻¹ 分别代表 C-O 和 C-O-C 的伸缩振动峰^[103]，1600 cm⁻¹、1640 cm⁻¹ 分别代表 COOH^[104]和 C=C^[105, 106]的伸缩振动峰。如图 3-5a、b 所示，分别为商品结冷胶，酸水解结冷胶寡糖，酶降解结冷胶寡糖的红外光谱结果，从图中可看出酸水解后的寡糖与商品结冷胶的特征吸收峰位置基本保持一致，所

以酸水解得到的寡糖的结构并未被改变。来源于 *Bacillus* sp. GL1 的结冷胶裂解酶能够作用于结冷胶中葡萄糖与葡萄糖醛酸之间的 β -1,4 糖苷键，从而达到降解结冷胶的目的，产生由不饱和葡萄糖醛酸-葡萄糖-鼠李糖-葡萄糖构成的四糖^[107, 108]。而酶水解后的产物在 1640 cm^{-1} 处出现了一个新的特征吸收峰，因此酶水解后得到的结冷胶寡糖结构中出现了新的 C=C 结构，这一现象正是结冷胶裂解酶作用于结冷胶后生成了含有不饱和葡萄糖醛酸的结冷胶寡糖的结果。

3.2.2 单糖组成分析

不同结构的寡糖可能具有不同的生物活性，其中分子量被认为是影响分子功能特性的重要参数之一。前期利用酸水解多糖是无规则降解的特点制备出多聚合度的结冷胶寡糖混合物，为探索不同分子质量结冷胶寡糖对功能特性的影响，通过凝胶过滤层析的方法从酸解结冷胶寡糖中分离出 $M_w < 1000$ 的 GOS1 (Gellan oligosaccharides 1, GOS1), $M_w > 1000$ 的 GOS2 (Gellan oligosaccharides 2, GOS2) 两种组分。另外，酶解得到的结冷胶寡糖为 GOS3 (Gellan oligosaccharides 3, GOS3)。

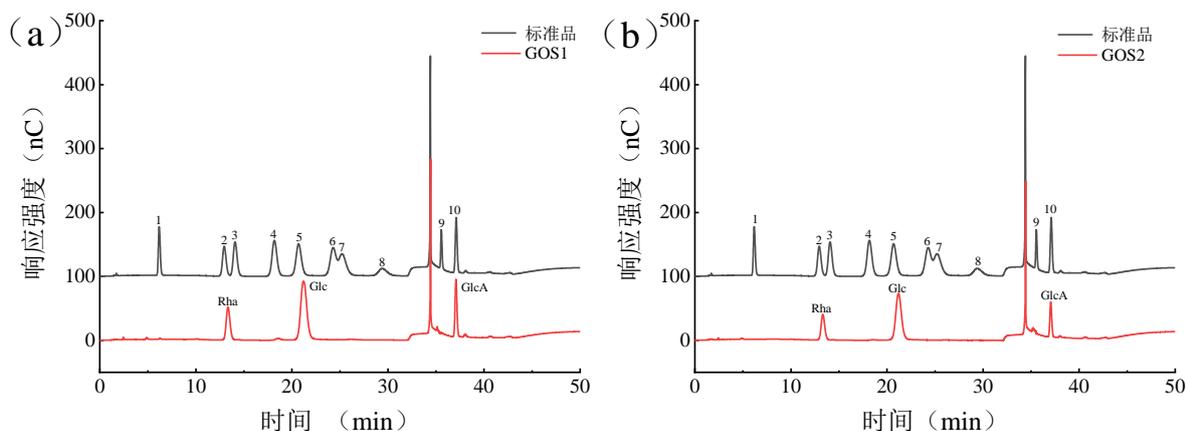


图 3-6 GOS1 与 GOS2 的单糖组成分析

(a) GOS1; (b) GOS2

Fig. 3-6 Monosaccharide composition analysis of GOS1 and GOS2

(a) GOS1; (b) GOS2

注：1-10 号峰分别代表岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸；Rha-鼠李糖、Glc-葡萄糖、GlcA-葡萄糖醛酸

为探索两种降解方式得到的结冷胶寡糖的单糖组成是否发生了改变，本研究将纯化后的结冷胶寡糖用三氟乙酸彻底水解为单糖，然后用离子色谱对其单糖成分进行检测。如图 3-6a、b 所示，分别是 GOS1 和 GOS2 的单糖组成分析，图中 1-10 号峰分别代表岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸。从图中可以看出，与单糖标准品各峰进行对比，GOS1 与 GOS2 的单糖组成为鼠李糖，葡萄糖与葡萄糖醛酸，与结冷胶多糖的单糖组成保持一致。如图 3-7 所示，GOS3 的单糖组成只有鼠李糖与葡萄糖，与结冷胶多糖的单糖组成对比，其中葡萄糖醛酸在酶解结冷胶寡糖中没有被检测到。与红外光谱的结果结合分析，推测是结冷

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/288061104024006042>