

酸面团发酵煎饼对 2 型糖尿病小鼠的影响

唐天培¹, 黄自伟², 张娜娜¹, 闫博文^{1*}, 赵建新¹, 张灏¹, 陈卫¹, 范大明¹

(¹江南大学食品学院 江苏无锡 214122

²泰安市强德食品有限公司 山东泰安 271000)

摘要 目的:山东煎饼是我国北方地区的传统主食之一。本研究旨在探讨植物乳杆菌发酵酸面团山东煎饼对高脂饮食结合链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病小鼠的缓解作用。方法:在 2 型糖尿病小鼠模型建立后,设立空白组(NC)、模型组(MC)、阳性组(PC)、未发酵煎饼组(NFP)和发酵煎饼组(FP)。连续干预 6 周,在此期间每周测定小鼠空腹体重和空腹血糖值。在试验末期,检测小鼠空腹血清胰岛素、血脂、胰腺组织病理状况、短链脂肪酸和肠道菌群等指标。结果:与模型组(25.44 mmol/L ± 1.42 mmol/L, 13.99 ± 1.72)和未发酵煎饼组(23.84 mmol/L ± 1.84 mmol/L, 12.47 ± 1.15)小鼠相比,发酵山东煎饼可降低糖尿病小鼠空腹血糖水平(16.63 mmol/L ± 1.79 mmol/L)和胰岛素抵抗(7.47 ± 0.74),改善血脂异常,缓解胰腺损伤。此外,发酵山东煎饼的摄入促进了短链脂肪酸的产生,调节了肠道菌群,这可能与酸面团发酵过程中形成的发酵产物有关。结论:植物乳杆菌发酵酸面团山东煎饼可作为抗 2 型糖尿病的功能性主食。

关键词 山东煎饼; 酸面团; 血糖; 2 型糖尿病; 肠道菌群

文章编号 1009-7848(2023)06-0121-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.014

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病,主要分为 1 型糖尿病(type 1 diabetes, T1D)、2 型糖尿病(type 2 diabetes, T2D)和妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)^[1]。其中 2 型糖尿病是最常见的糖尿病类型,占到所有糖尿病病例的 90% 以上。目前,对 2 型糖尿病的临床治疗主要使用双胍类、磺脲类、噻唑烷酮类和糖苷酶抑制剂等药物^[2]。此外,饮食控制也是治疗 2 型糖尿病的重要环节。以杂粮谷物制品为代表的低升糖指数(GI)食品能有效减缓餐后血糖的迅速上升,调节胰岛素反应,近年来受到越来越多的关注。

山东煎饼作为我国北方地区的传统主食之一,主要由玉米、小米、高粱等杂粮制成。山东煎饼的制作过程虽较为简单但极需技巧,将谷物原料浸泡一段时间后,研磨成面糊,经发酵或不发酵,在鏊子上用刮板快速均匀地摊制成薄薄的圆饼^[3]。高温、短时、低水分接触的加工方式使得山东煎饼的淀粉糊化度显著低于馒头、干饭、粥等其它主食。淀粉糊化度越低,进食后消化吸收速度越慢,有利于减缓餐后血糖反应^[4]。因此,山东煎饼因独

特的加工方式和杂粮谷物原料而被认为是适合糖尿病患者食用的主食。

酸面团是由谷物和水的混合物经有活性的微生物(如酵母菌和乳酸菌)发酵后的产物,又被称为“酵子”或“老面”,在米面食品的加工中通常被当作“引子”以促进米面食品的发酵^[5]。酸面团技术不仅可以改善食品的质构和风味,也能赋予食品一定的功能特性。有研究表明,用乳酸菌酸面团发酵小麦和黑麦粉可以降低全麦面包的淀粉消化率^[6],这可能与酸面团发酵能降低淀粉糊化度相关。此外,在酸面团发酵过程中,乳酸菌通过糖基水解酶的催化合成大量的有机酸和胞外多糖。有机酸尤其是乳酸能降低淀粉消化率,乙酸和丙酸能延迟胃排空时间^[7]。很多研究报道了多糖对糖尿病的缓解作用,主要集中在植物多糖如燕麦多糖、枸杞多糖和桑叶多糖等,而关于乳酸菌胞外多糖对糖尿病影响的研究较少。部分体外试验表明,乳酸菌胞外多糖具有潜在的降血糖活性^[8]。也有研究指出植物乳杆菌 X1 的无细胞上清液通过抑制 α 葡萄糖苷酶活性显示出潜在的抗糖尿病能力^[9]。为了充分了解植物乳杆菌酸面团发酵对山东煎饼抗糖尿病特性的影响,需进行体内试验。

本研究以高脂饮食结合链脲佐菌素诱导的 T2D 小鼠为试验对象,研究植物乳杆菌发酵酸面

收稿日期: 2022-06-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD2100100)

第一作者: 唐天培,男,硕士

通信作者: 闫博文 E-mail: yanbowen@jiangnan.edu.cn

团山东煎饼对 T2D 小鼠体重、血糖、胰岛素抵抗、血脂、胰腺组织、短链脂肪酸水平及肠道菌群等方面的影响,为开发适合糖尿病患者的功能性主食提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米:购自中国无锡欧尚超市。

试剂:链脲佐菌素(STZ),美国 Sigma 公司;60%高脂饲料,南通特洛菲饲料科技有限公司;二甲双胍,阿拉丁试剂有限公司;蔗糖、牛肉膏、葡萄糖、酵母粉、乙酸钠、柠檬酸氢二铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、吐温 80、无水乙醇、乙醚、浓硫酸、乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、戊酸,国药集团化学试剂有限公司;胰岛素检测试剂盒,南京森贝伽生物科技有限公司;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒,南京建成生物工程研究所;PCR 扩增引物及合成序列,上海生工生物工程有限公司;FastDNA Spin Kit for Feces 粪便基因组提取试剂盒,美国 MP 公司;QIAquick Gel Extraction Kit 胶纯化回收试剂盒,德国 Qiagen 公司。

1.2 仪器与设备

恒温恒湿培养箱,上海森信实验仪器有限公司;胶体磨,河北廊坊科技有限公司;罗氏活力型血糖仪和血糖试纸,美国罗氏有限公司;MLS-3750 高压蒸汽灭菌锅,日本 Sanyo 公司;5415R 型台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;SW-CJ-1FD 型超净工作台,上海智诚科技有限公司;Leica ASP300S 型全自动脱水机、Leica RM2245 型半自动切片机,德国 LEICA 公司;Pannoramic MIDI 型组织切片扫描仪,匈牙利 3D Histech Kft 公司;1300-ISQ 型 Thermo/Trace GC-MS、3020 型多功能酶标仪,美国 Thermo 公司;PE300 型 MiSeq 高通量测序平台,美国 Illumina 公司;2100 型 Agilent(安捷伦)生物分析仪,美国 Agilent 科技有限公司。

1.3 菌悬液的制备

植物乳杆菌 X1 因其高产胞外多糖的特性和潜在的降血糖能力^[9-10]被选择用来发酵酸面团,其由江南大学食品生物技术中心菌种库提供。菌株

通过划线分离,挑取单菌落于液体 MRS 培养基中,于 37 °C 条件下培养 18 h,再按 2%接种量在液体 MRS 培养基中 37 °C 二代培养 18 h。然后接种于液体 MRS 培养基中 37 °C 培养 24 h 进行扩培。将扩培好的植物乳杆菌 X1 在 4 °C、6 000 r/min 条件下离心 10 min,所得菌泥用无菌水通过菌落计数方法调整活菌量在 10⁹ CFU/mL 得到菌悬液,用于接下来的酸面团发酵。

1.4 酸面团发酵及山东煎饼的制备

将玉米按 1:1.2(质量比)浸泡在水中 6 h,然后用胶体磨研磨成玉米面糊。将上述菌悬液加入面糊中混匀达到最终浓度 10⁸ CFU/g,然后 37 °C 发酵 12 h 获得酸面团(pH 3.72 ± 0.10, 10¹⁰ CFU/g)。

未发酵山东煎饼是用 100%未发酵玉米面糊在鏊子上摊制而成(140 °C, 40 s)。发酵山东煎饼是用 80.0%的未发酵玉米面糊和 20.0%的酸面团混合均匀后在鏊子上摊制而成(140 °C, 40 s)。

1.5 动物实验方案设计

所有动物实验的操作均严格遵守江南大学动物管理和使用委员会的章程(SYXK 2012-0002)。动物实验的伦理审核号为 JN.No20210615c0600922[189]。60 只 C57BL/6J 小鼠(SPF 级,雄性,3 周龄)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。适应性喂养 1 周后,随机分为空白组(8 只)饲喂正常小鼠饲料和糖尿病造模组(52 只)饲喂 60%高脂饲料。4 周高脂饲料喂养后糖尿病组 52 只小鼠禁食不禁水 12 h,腹腔注射 STZ 溶液(100 mg/kg 体重,溶于 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液,pH 4.5),同时空白组小鼠注射柠檬酸盐缓冲液。继续高脂饲料喂养 1 周后,测定空腹血糖(FBG),FBG>11.1 mmol/L 即为造模成功^[11]。

将造模成功的 32 只 T2D 小鼠随机分成 4 组,每组 8 只,分别是模型组(MC)、阳性对照组(PC)、未发酵煎饼组(NFP)和发酵煎饼组(FP)。空白组(NC)为正常小鼠始终饲喂标准饲料,模型组(MC)为 T2D 小鼠饲喂标准饲料,阳性对照组(PC)为 T2D 小鼠饲喂标准饲料同时每天灌胃二甲双胍(200 mg/kg 体重),未发酵煎饼组(NFP)和发酵煎饼组(FP)为 T2D 小鼠分别饲喂未发酵山东煎饼和发酵山东煎饼制成的饲料(煎饼样品冻干后由江苏协同生物有限公司按 73%的对应样品

加 27% 的标准饲料制成棒状饲料)。干预持续 6 周,小鼠可以自由获得食物和水。每周禁食 12 h 后记录体重。实验结束前,用 2 mL 灭菌干燥 EP 管收集新鲜粪便样本,立即冰上放置,并迅速转移到 -80°C 的冰箱中。小鼠禁食不禁水 12 h 后腹腔注射戊巴比妥钠溶液麻醉(0.5 mL/10 g 体重),摘除眼球取血后颈椎脱臼处死。血液在 4°C ,3 000 r/min 离心 15 min,收集血清保存在 -80°C 冰箱中。胰腺组织用 4°C 预冷的生理盐水漂洗后固定在 4% 多聚甲醛溶液中。

1.6 空腹血糖、胰岛素和胰岛素抵抗指数的检测

每周一小鼠禁食不禁水 12 h 后采用尾部取血方式,使用罗氏血糖仪检测空腹血糖值。

胰岛素水平的检测采用胰岛素检测试剂盒,检测方法按照说明书进行。

胰岛素抵抗指数按下列公式计算:

胰岛素抵抗指数=(空腹胰岛素含量 \times 空腹血糖值)/22.5

1.7 血脂分析

总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平使用试剂盒测定。

1.8 胰腺组织病理学分析

用 4% 多聚甲醛溶液固定的胰腺组织经过夜洗涤后,脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色。观察并拍摄组织具有代表性的显微照片。

1.9 粪便短链脂肪酸含量的测定

小鼠粪便冻干后称取约 50 mg 粪便样品加入 0.5 mL 饱和 NaCl 溶液,再用 20 μL H_2SO_4 溶液酸化后加入 1 mL 乙醚旋涡萃取,混合物 12 000 r/min 离心 15 min 并脱水后得到上层乙醚相,用气质联用仪(GC-MS)仪器测定乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸的含量。

1.10 肠道菌群的测定

小鼠粪便中细菌基因组的提取按照 Fast DNA Spin 试剂盒说明书进行。对细菌 16S rDNA 的 V4 区进行 PCR 扩增,扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 120 V,30 min。按照胶回收试剂盒的说明书进行 V4 区 PCR 产物的胶回收。按等质量浓度原则混样并用 MiSeq 测序仪上机测序。获得下机数据地址后,利用 SSH Secure Shell

Client 软件进行数据提取和合并。去除嵌合体序列,进行 OTU 聚类,选取 OTU 代表性序列以进行后续分析。通过对序列进行分类,制定 biom 格式的 OTU 表。根据 otu_table.biom 进行 α 、 β 多样性和肠道菌群门属水平种类与丰度的分析。

1.11 统计分析

试验数据以平均值 \pm 标准差表示,用 SPSS 的单因素 ANOVA 和邓肯式多重比较对各组数据的差异进行分析,不同字母标注代表具有显著差异($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 空腹体重

小鼠空腹体重的变化如图 1a 所示。在 6 周的干预过程中,空白组小鼠的体重不断增加,而所有 T2D 小鼠均出现体重减轻的典型病理特征^[17]。阳性组小鼠从第 2 周开始,体重开始回升并保持相对稳定,说明二甲双胍能缓解 T2D 小鼠的体重快速下降。发酵煎饼组小鼠体重下降的幅度低于模型组和未发酵煎饼组,但这 3 组小鼠的体重之间没有显著性差异($P>0.05$)。

2.2 空腹血糖

空腹血糖是 T2D 最常规的检测指标,能够反映患者糖代谢情况及胰岛 β 细胞功能状态^[12]。由图 1b 可知,在干预开始前,T2D 小鼠的空腹血糖值均明显高于空白组小鼠($P<0.05$)。6 周的干预过程中,空白组小鼠空腹血糖值始终正常且稳定,而模型组和未发酵煎饼组小鼠空腹血糖值始终保持上升趋势。发酵煎饼组小鼠的空腹血糖值在干预后期(4~6 周)上升趋势逐渐减缓甚至开始下降,表明发酵煎饼具有一定的降血糖作用。有研究表明,有活性的和经过高温处理杀死的乳酸菌均表现出一定程度的降低 T2D 小鼠空腹血糖和餐后血糖的能力^[13]。因此,发酵煎饼组观察到的小鼠空腹血糖的下降可能与死菌和酸面团发酵过程中高产的胞外多糖等发酵产物有关,即使在煎饼加工过程中高温杀死了绝大多数的活菌。

2.3 胰岛素和胰岛素抵抗

胰岛素是由胰腺 β 细胞分泌的一种参与血糖调节的蛋白质激素。胰岛素抵抗是 T2D 典型的特征,主要表现为胰岛素敏感性下降,胰岛素过度积

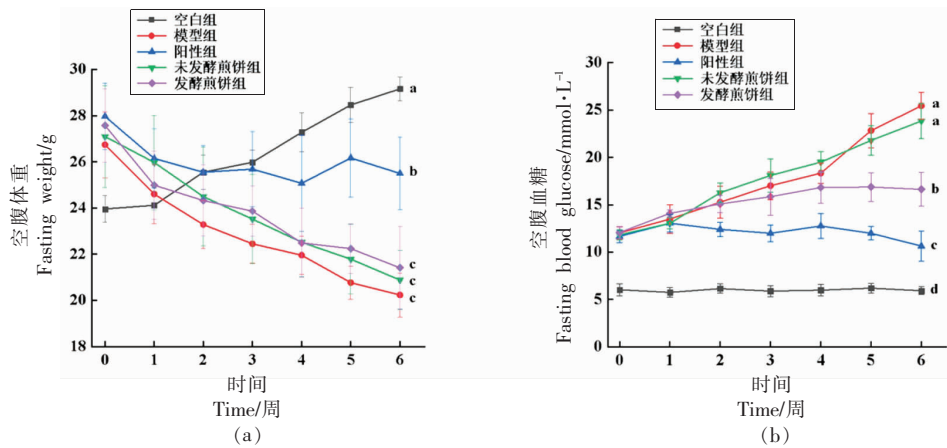


图1 饮食干预期间小鼠空腹体重(a)和空腹血糖(b)水平的变化

Fig.1 Changes in fasting body weight (a) and fasting blood glucose (b) levels of mice during the dietary intervention

累却没有发挥降血糖的作用^[14]。如图 2a 和 2b 所示,模型组小鼠的胰岛素水平和胰岛素抵抗指数均显著高于空白组($P<0.05$),表明模型组小鼠出现了严重的胰岛素抵抗。与模型组和未发酵煎饼组相比,发酵煎饼组小鼠的胰岛素抵抗指数显著降低($P<0.05$),表明发酵煎饼的干预在一定程度上可以改善 T2D 小鼠的胰岛素抵抗。有研究报道

过,灌胃植物乳杆菌 K68 发酵的果蔬汁比单纯灌胃植物乳杆菌 K68 或果蔬汁更能降低糖尿病大鼠的胰岛素抵抗^[15]。植物乳杆菌发酵果蔬汁过程中额外产生的胞外多糖可能是发酵果蔬汁更能改善胰岛素抵抗的原因,这与我们观察到的试验结果相一致。

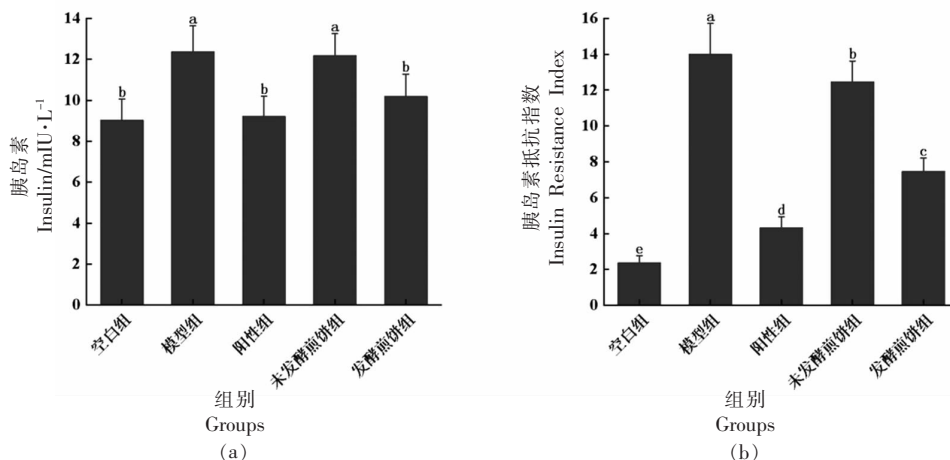


图2 发酵煎饼对小鼠胰岛素水平(a)和胰岛素抵抗(b)的影响

Fig.2 Effect of FP on insulin level (a) and homeostasis model assessment of insulin resistance (b) in mice

2.4 血脂

血脂异常也是 T2D 的常见特征,通常通过血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 来表征。由表 1 可知,相比于空白组,模型组小鼠的血脂异常主要表现为 TC、TG 和 LDL-C 的显著升高 ($P<0.05$),而

HDL-C 显著降低($P<0.05$)^[9]。与模型组相比,发酵煎饼组小鼠的 LDL-C 水平没有显著性差异 ($P>0.05$),但 TC 和 TG 水平显著降低 ($P<0.05$),HDL-C 水平显著升高 ($P<0.05$),表明长期饲喂发酵煎饼虽然没有达到全面调节 T2D 小鼠血脂 4 项的效

表 1 发酵煎饼对小鼠血脂的影响

Table 1 Effect of FP on levels of serum lipids in mice

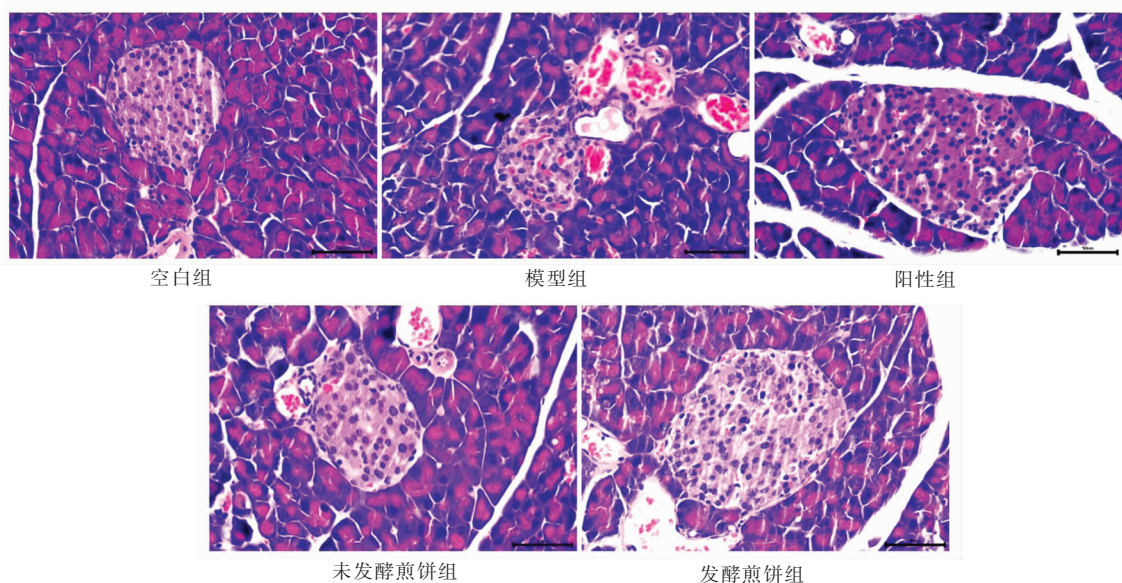
组别	TC/mm \cdot L $^{-1}$	TG/mm \cdot L $^{-1}$	HDL-C/mm \cdot L $^{-1}$	LDL-C/mm \cdot L $^{-1}$
空白组	2.33 \pm 0.33 ^d	0.95 \pm 0.23 ^e	2.44 \pm 0.32 ^a	0.25 \pm 0.05 ^e
模型组	3.54 \pm 0.25 ^a	1.97 \pm 0.34 ^a	1.77 \pm 0.31 ^b	0.49 \pm 0.07 ^a
阳性组	2.85 \pm 0.37 ^e	0.79 \pm 0.25 ^e	2.40 \pm 0.25 ^a	0.34 \pm 0.07 ^b
未发酵煎饼组	3.21 \pm 0.23 ^{ab}	1.87 \pm 0.29 ^a	2.20 \pm 0.17 ^a	0.46 \pm 0.09 ^a
发酵煎饼组	3.03 \pm 0.32 ^{bc}	1.46 \pm 0.31 ^b	2.35 \pm 0.27 ^a	0.42 \pm 0.06 ^a

果,但在一定程度上改善了血脂异常的状态。

2.5 胰腺组织病理学分析

胰岛损伤是高脂饮食和 STZ 诱导 T2D 小鼠模型的一个重要组织学特征。在模拟 T2D 模型中,胰岛细胞的损伤主要是由 STZ 引起的^[16]。各组小鼠胰腺组织切片 HE 染色结果如图 3 所示。空白组小鼠胰岛呈规则的圆形或近圆形,轮廓清晰,胰岛细胞数目丰富,形态饱满且排列整齐^[17]。而模

型组小鼠的胰岛受到了严重的损伤,胰岛体积变小,结构皱缩,分布较松散,胰岛细胞数量减少,细胞空泡化现象严重。阳性药物二甲双胍对 T2D 小鼠的胰岛萎缩有明显的缓解作用。与模型组和未发酵煎饼组相比,发酵煎饼组小鼠胰岛受损情况得到了一定程度的改善,胰岛大小显著恢复,胰岛细胞数量显著增加。此外,胰岛的形态和结构也趋向于完整^[16,18]。

图 3 发酵煎饼对小鼠胰腺组织的影响(放大倍数,400 \times)Fig.3 Effect of FP on the pancreas in mice (magnification, 400 \times)

2.6 短链脂肪酸

短链脂肪酸是未消化的淀粉和纤维经过厌氧微生物发酵的主要产物,包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸和戊酸等,在调节肠道健康、保护肠道微生态平衡方面发挥着重要的作用^[16]。不同干预组小鼠粪便中短链脂肪酸的水平如图 4 所示,模型组小鼠 5 种短链脂肪酸的水平都低于空白组,这与 Wang 等^[17]报道的结果相一致。与模型组相比,未

发酵煎饼组的丙酸、丁酸水平显著升高($P < 0.05$),这可能与玉米作为煎饼的原料粗纤维含量较高相关。发酵煎饼组 5 种短链脂肪酸的水平均高于未发酵煎饼组和模型组,尤其是异丁酸和戊酸表现出显著性的差异($P < 0.05$)。有研究表明,补充植物乳杆菌 NCU116 发酵胡萝卜汁的大鼠粪便中短链脂肪酸水平显著高于补充未发酵胡萝卜汁^[18]。类似于发酵胡萝卜汁体系,植物乳杆菌发酵酸面团

过程中同样产生大量胞外多糖,这些多糖在肠道内经过厌氧微生物发酵产生一定量的短链脂肪酸因而导致了我们的观察到的结果。据报道,乙酸可以降低食欲,抑制体内脂肪堆积^[17]。丙酸可以降低胆固醇和甘油三酯水平,提高胰岛素敏感性,从而改善葡萄糖代谢^[19]。补充丁酸可以缓解小鼠的胰岛

素抵抗并增加能量消耗。此外,丁酸已被证明能激活胚胎干细胞中调节胰腺早期发育的基因,从而增加胰腺 β 细胞的分化和胰岛素相关基因的表达^[20]。因此,可以推测,酸面团发酵煎饼能改善T2D小鼠糖脂代谢紊乱,进一步缓解胰岛素抵抗,可能是通过调控短链脂肪酸水平实现的。

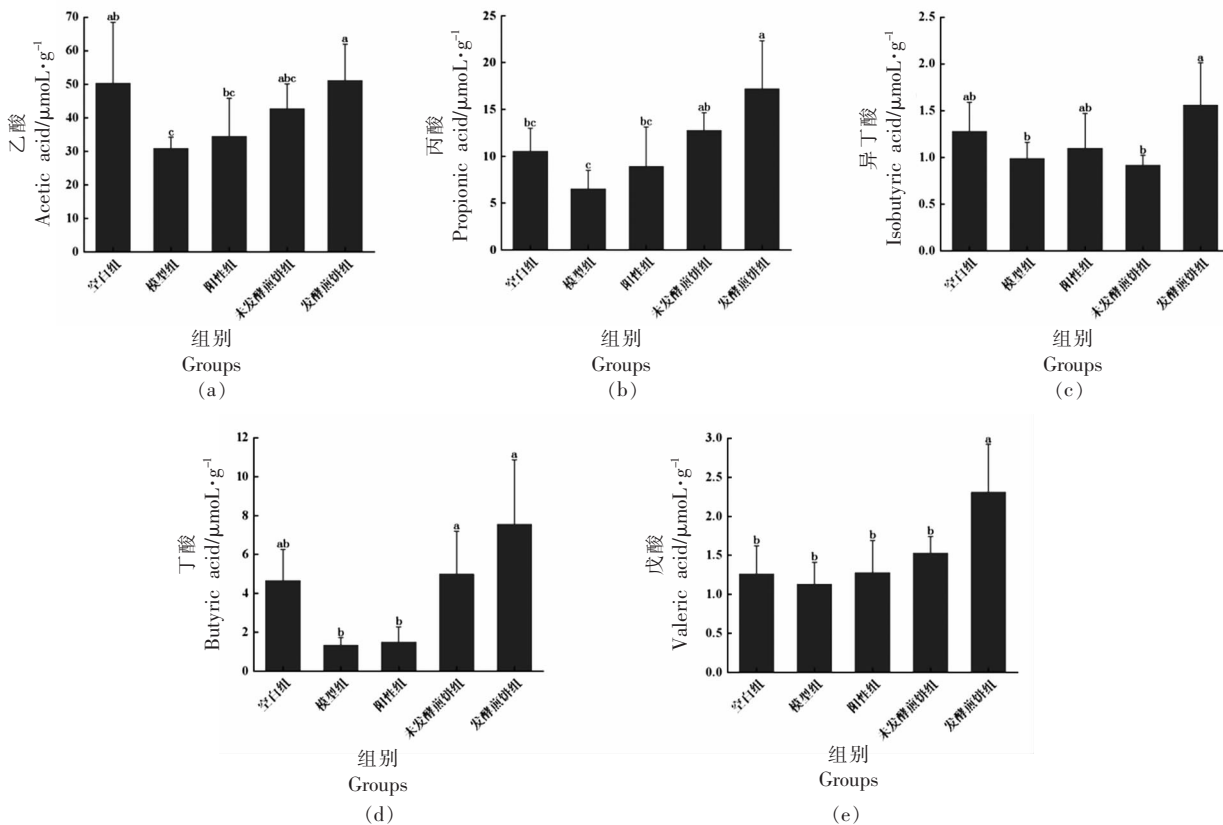


图4 发酵煎饼对小鼠粪便短链脂肪酸含量的影响

Fig.4 Effect of FP on fecal short-chain fatty acids content in mice

2.7 肠道菌群

T2D 的发生发展与肠道菌群有着密切的联系,饮食对肠道菌群结构的形成也起着至关重要的作用,不同饮食干预对 T2D 小鼠肠道菌群 α 多样性的影响如图 5 所示,包括 Shannon,Evenness, Faith_pd 和 Observed_otus。相比于模型组,发酵煎饼组的 Shannon 指数和 Observed_otus 均有上升,表明长期饲喂发酵煎饼可以提高 T2D 小鼠肠道菌群的多样性和丰富度。为了更直观地了解不同干预组小鼠肠道菌群组成的差异情况,我们对各组样本的所有分类水平结果进行了主坐标成分(PCoA)分析如图 6 所示。空白组和模型组完全分

开,没有重叠,说明高脂饮食和 STZ 注射造模导致模型组小鼠的肠道菌群结构发生了显著变化。未发酵煎饼的干预对 T2D 小鼠的菌群结构产生一定的影响,但没有显著差异。发酵煎饼组与阳性组产生较大重叠,即其肠道菌群表现出与阳性组较大的相似性,且其与未发酵煎饼组和模型组的差异显著,表明发酵煎饼干预在一定程度上改善了小鼠肠道菌群多样性,这可能有助于缓解糖尿病^[21]。

图 7 显示了各组在门水平上的相对丰度,小鼠的肠道微生物主要由厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)组成。与之前的报道

一致^[17],相比于空白组,模型组小鼠肠道微生物中厚壁菌门相对丰度上升,拟杆菌门相对丰度下降,厚壁菌门/拟杆菌门的值升高,变形菌门相对丰度增加。厚壁菌门/拟杆菌门的值已被证明与血糖水

平呈正相关^[22]。与模型组相比,发酵煎饼组的小鼠厚壁菌门相对丰度下降,拟杆菌门相对丰度上升,厚壁菌门/拟杆菌门的值降低,这与发酵煎饼组小鼠观察到的较低的血糖水平相符合。

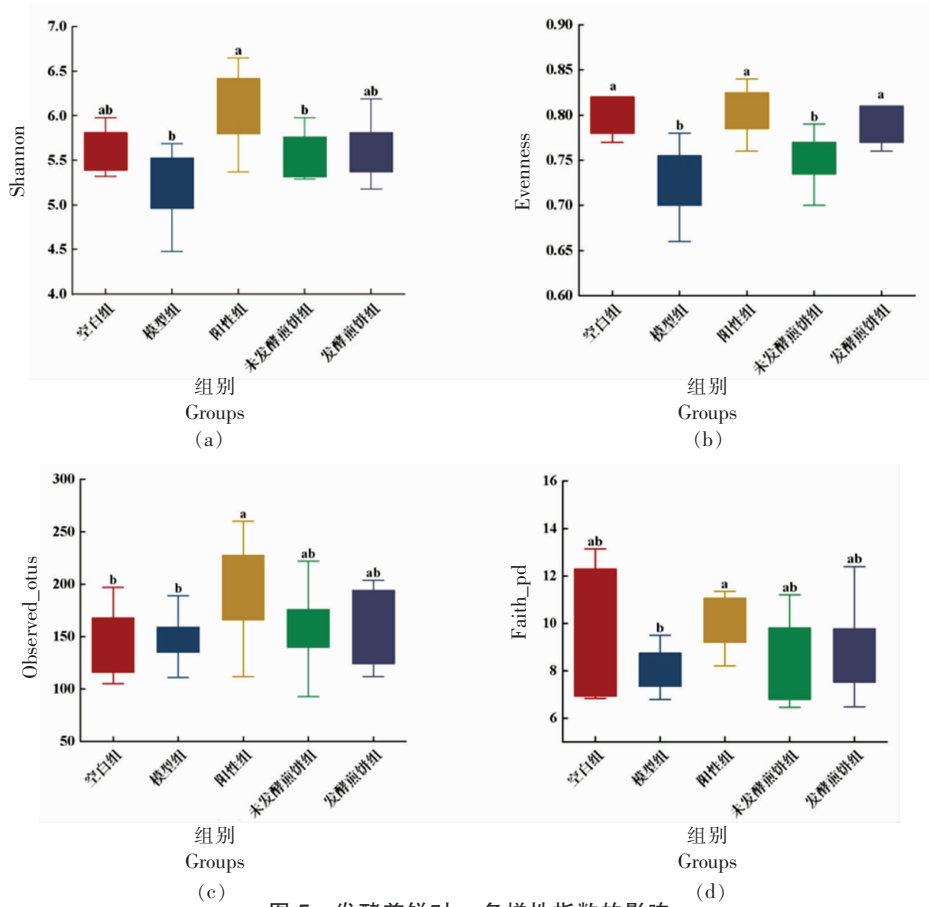


图 5 发酵煎饼对 α 多样性指数的影响
Fig.5 Effect of FP on α diversity index

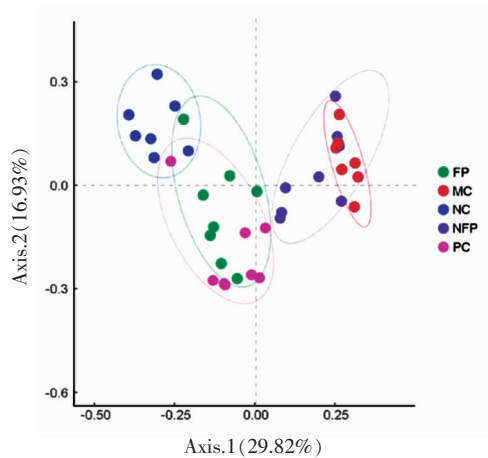


图 6 发酵煎饼对 β 多样性的影响
Fig.6 Effect of FP on β diversity

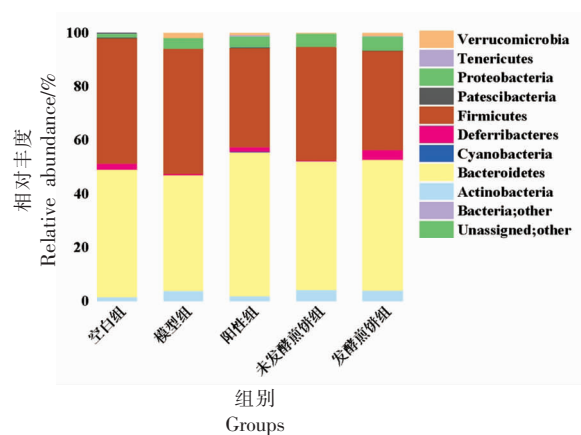
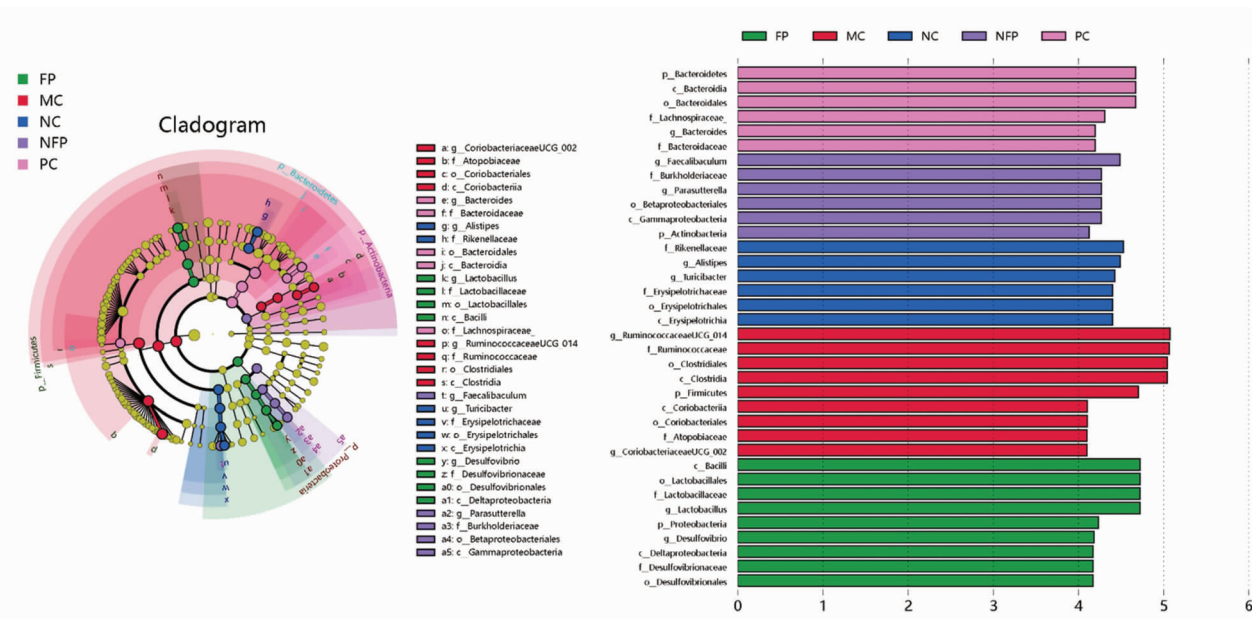
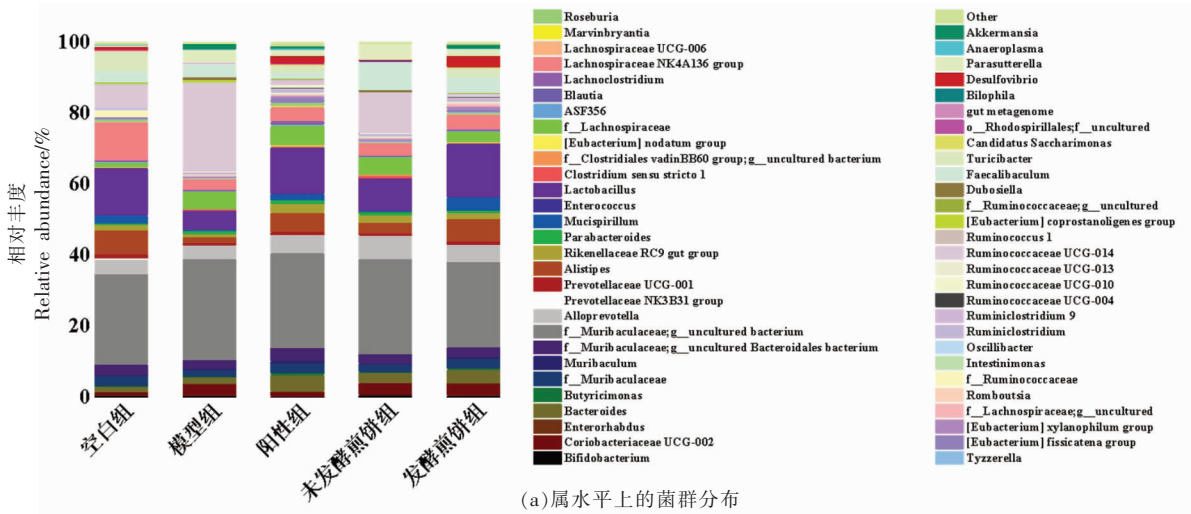


图 7 不同组别小鼠肠道菌群门水平变化
Fig.7 Changes at phylum level of mice fecal microbiota in different groups

图 8a 显示了各组在属水平上的相对丰度。为明确饮食干预对小鼠属水平上的肠道菌群造成的影响,采用 LEfSe 对不同组小鼠的肠道菌群进行差异性分析(设定 LDA 值大于 4),结果如图 8b 所示。阳性组的标记菌属为拟杆菌属,拟杆菌属是重要的短链脂肪酸产生菌^[23],许多证据表明机体肠道微生物自发形成的短链脂肪酸对宿主健康具有十分重要的作用,二甲双胍缓解 T2D 的良好作用可能与其提高产短链脂肪酸菌群的丰度密切相关。未发酵煎饼组的标记菌属为粪杆菌属和副沙门氏菌属,发酵煎饼组的标记菌属为乳杆菌属和脱硫弧菌属。据报道,乳杆菌属丰度的增加可促进

胰岛素的分泌,在 T2D 患者中乳杆菌属的比例与血糖水平呈负相关^[23]。此外,乳杆菌属能增强胆汁水解酶的活性,增加粪便中脂类的排泄,减少脂类堆积^[24],这与本研究中观察到的发酵煎饼组小鼠血脂的改善相符合。因此,乳杆菌属可能是调节 T2D 小鼠血糖水平,缓解血脂异常的靶向菌之一。Yan 等^[11]也报道过嗜酸乳杆菌干预导致 T2D 小鼠脱硫弧菌属丰度的增加,脱硫弧菌属是人体肠道中主要的硫酸盐还原菌,虽然有研究推测脱硫弧菌属与肠道疾病有关,但二者之间的关系尚存争议。属水平上不同组之间具体的菌群差异如图 8c~8f 所示,除乳杆菌属和脱硫弧菌属外,与模型



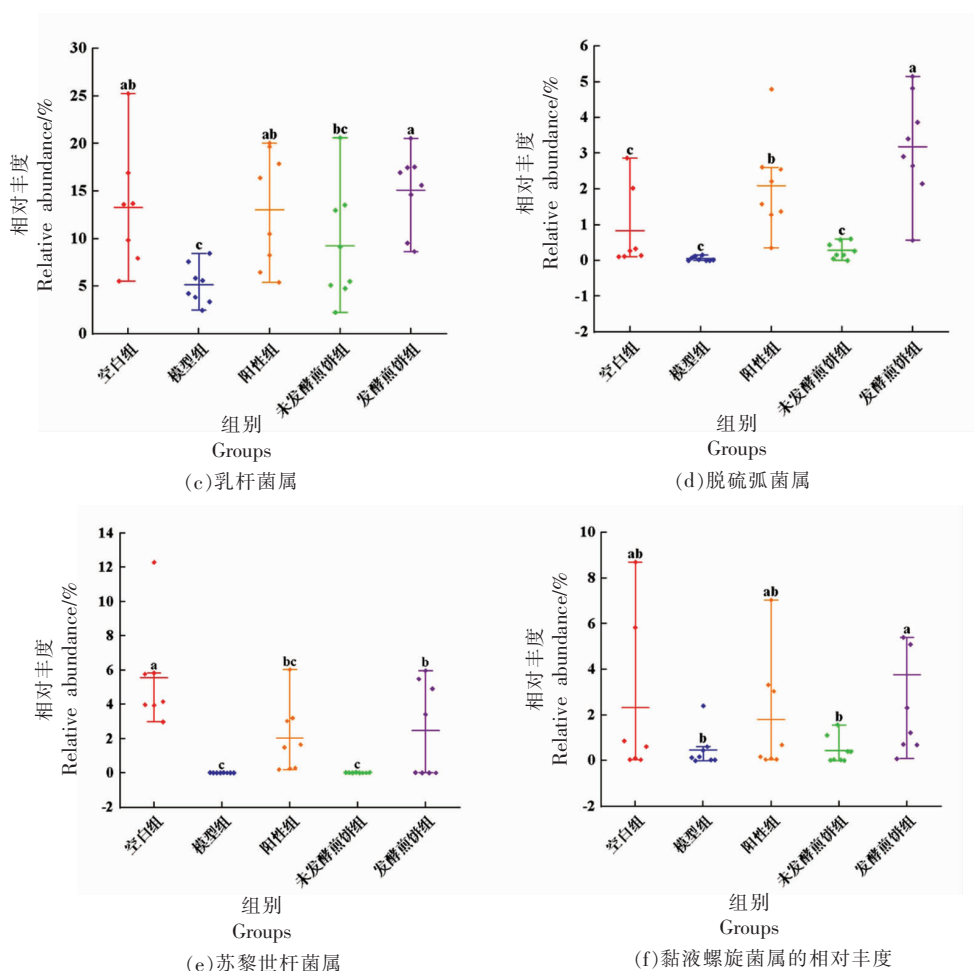


图 8 不同组别小鼠肠道菌群属水平变化

Fig.8 Changes at genus level of mice fecal microbiota in different groups

组和未发酵煎饼组相比,发酵煎饼组中的苏黎世杆菌属和黏液螺旋菌属的相对丰度也显著升高 ($P < 0.05$)。苏黎世杆菌属被报道与肠道丁酸水平相关,而丁酸盐的增加与胰岛素敏感性的改善有关^[25-26]。黏液螺旋菌属也属于短链脂肪酸产生菌,有研究认为黏液螺旋菌属,粪球菌属,拟杆菌属和副杆菌属等短链脂肪酸产生菌通过肠道菌群-短链脂肪酸-炎症通路缓解胰岛素抵抗,进一步改善糖代谢^[17,27]。此外,Galle 等^[8]报道过酸面团来源的胞外多糖能刺激结肠碳水化合物发酵产生短链脂肪酸,并增加肠道菌群的数量。因此,我们认为植物乳杆菌发酵酸面团过程中产生的发酵产物,如有机酸和胞外多糖等,是饲喂发酵煎饼能显著改变 T2D 小鼠肠道菌群结构,增加乳杆菌属和产短

链脂肪酸菌属苏黎世杆菌属及黏液螺旋菌属的丰度,并进一步影响其病理生理指标的主要原因。

3 结论

本试验研究了植物乳杆菌发酵酸面团山东煎饼对 T2D 小鼠的缓解作用。6 周的发酵煎饼干预可以降低 T2D 小鼠空腹血糖水平和胰岛素抵抗、改善血脂异常、保护胰岛功能、调节 SCFA 水平和肠道菌群。酸面团发酵过程中产生的发酵产物如有机酸和胞外多糖等,可能是发酵煎饼表现出显著的抗糖尿病作用的原因。以上结果表明,植物乳杆菌发酵酸面团山东煎饼有望成为 T2D 患者的功能性主食。

参 考 文 献

- [1] HARDING J L, PAVKOV M E, MAGLIANO D J, et al. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(1): 3–16.
- [2] HALLAKOU-BOZEC S, VIAL G, KERGOAT M, et al. Mechanism of action of imeglimin: A novel therapeutic agent for type 2 diabetes[J]. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2021, 23(3): 664–673.
- [3] 马涛, 王勃. 自然发酵对糙米煎饼理化性质的影响[J]. *食品科技*, 2012, 37(9): 88–92.
- MA T, WANG B. The influence of natural fermentation has on the physical and chemical properties of brown rice pancakes[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(9): 88–92.
- [4] REN X, CHEN J, MOLLA M M, et al. In vitro starch digestibility and in vivo glycemic response of foxtail millet and its products[J]. *Food & Function*, 2016, 7(1): 372–379.
- [5] 王榕, 朱天园, 赵闪闪, 等. 酸面团在馒头发酵中的应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(15): 389–394.
- WANG R, ZHU T Y, ZHAO S S, et al. Research progress on the application of sourdough in steamed bread fermentation [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(15): 389–394.
- [6] GOBBETTI M, RIZZELLO C G, DI CAGNO R, et al. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods[J]. *Food Microbiology*, 2014, 37: 30–40.
- [7] POUTANEN K, FLANDER L, KATINA K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective[J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(7): 693–699.
- [8] GALLE S, ARENDT E K. Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, 54(7): 891–901.
- [9] LI X, WANG N, YIN B, et al. *Lactobacillus plantarum* X1 with α -glucosidase inhibitory activity ameliorates type 2 diabetes in mice[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(68): 63536–63547.
- [10] 李向菲, 周炜, 印伯星, 等. 产胞外多糖能力不同的混合乳酸菌对二型糖尿病的影响[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(9): 16–24.
- LI X F, ZHOU W, YIN B X, et al. Effects of mixed lactic acid bacteria which produced exopolysaccharide on type 2 diabetic mice[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(9): 16–24.
- [11] YAN F, LI N, SHI J, et al. *Lactobacillus acidophilus* alleviates type 2 diabetes by regulating hepatic glucose, lipid metabolism and gut microbiota in mice[J]. *Food & Function*, 2019, 10(9): 5804–5815.
- [12] 魏奇, 钟鑫荣, 陈炳智, 等. 姬松茸提取物的降血糖作用及对糖尿病大鼠肠道菌群的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(6): 131–137.
- WEI Q, ZHONG X R, CHEN B Z, et al. Effect of agaricus blazei murrill extracts on gut microbiota in diabetic rats and its hypoglycemic activity[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(6): 131–137.
- [13] LI X, XU Q, JIANG T, et al. A comparative study of the antidiabetic effects exerted by live and dead multi-strain probiotics in the type 2 diabetes model of mice[J]. *Food & Function*, 2016, 7(12): 4851–4860.
- [14] KODAMA K, TODA K, MORINAGA S, et al. Anti-CD44 antibody treatment lowers hyperglycemia and improves insulin resistance, adipose inflammation, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice[J]. *Diabetes*, 2015, 64(3): 867–875.
- [15] HUANG H Y, KORIVI M, TSAI C H, et al. Supplementation of *Lactobacillus plantarum* K68 and fruit-vegetable ferment along with high fat-fructose diet attenuates metabolic syndrome in rats with insulin resistance [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 6: 943020.
- [16] 司倩, 焦婷, 杨树荣, 等. 两歧双歧杆菌缓解 II 型糖尿病的效果差异及机制分析[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(22): 12–19.
- SI Q, JIAO T, YANG S, et al. Effects and mechanisms of *Bifidobacterium bifidum* in alleviating type II diabetes [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(22): 12–19.
- [17] WANG G, SI Q, YANG S, et al. Lactic acid bacteria reduce diabetes symptoms in mice by alleviating gut microbiota dysbiosis and inflammation in different manners [J]. *Food & Function*, 2020, 11(7): 5898–5914.

- [18] LI C, DING Q, NIE S P, et al. Carrot juice fermented with *Lactobacillus plantarum* NCU116 ameliorates type 2 diabetes in rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62 (49): 11884–11891.
- [19] GAO H, WEN J J, HU J L, et al. Polysaccharide from fermented *Momordica charantia* L. with *Lactobacillus plantarum* NCU116 ameliorates type 2 diabetes in rats[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 201: 624–633.
- [20] LIU J L, SEGOVIA I, YUAN X L, et al. Controversial roles of gut microbiota-derived short-chain fatty acids (SCFAs) on pancreatic beta-cell growth and insulin secretion [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 910.
- [21] 周兴婷, 于雷雷, 翟齐啸, 等. 益生菌复配富铬酵母缓解2型糖尿病的作用机制涉及调节肠道菌群失调[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 29–36.
- ZHOU X T, YU L L, ZHAI Q X, et al. Antidiabetic effects of probiotics compounded with chromium-rich yeast alleviate type 2 diabetes symptoms via regulating gut microbiota imbalance[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(23): 29–36.
- [22] KARLSSON F H, 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.
- [23] WU R, ZHAO D, AN R, et al. Linggui Zhugan Formula improves glucose and lipid levels and alters gut microbiota in high-fat diet-induced diabetic mice[J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 918.
- [24] YE J, ZHAO Y, CHEN X, et al. Pu-erh tea ameliorates obesity and modulates gut microbiota in high fat diet fed mice[J]. Food Research International, 2021, 144: 110360.
- [25] XIAO C, JIAO C, XIE Y, et al. Grifola frondosa GF5000 improves insulin resistance by modulation the composition of gut microbiota in diabetic rats[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 77: 104313.
- [26] ZHONG Y, NYMAN M, FAK F. Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2015, 59(10): 2066–2076.
- [27] SUNG M M, KIM T T, DENOU E, et al. Improved glucose homeostasis in obese mice treated with resveratrol is associated with alterations in the gut microbiome[J]. Diabetes, 2016, 66(2): 418–425.

Effects of Pancake with Sourdough Fermentation on Type 2 Diabetic Mice

Tang Tianpei¹, Huang Ziwei², Zhang Nana¹, Yan Bowen^{1*}, Zhao Jianxin¹,
Zhang Hao¹, Chen Wei¹, Fan Daming¹

¹School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

²Taian Qiangde Food Co., Ltd., Taian 271000, Shandong)

Abstract Objective: Shandong pancake is one of the traditional staple foods in northern China. This study aimed to investigate the alleviating effects of Shandong pancake with sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* on type 2 diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin. Methods: After building the type 2 diabetic mice model successfully, test in groups with normal control (NC), model control (MC), positive control (PC), non-fermented pancake (NFP) and fermented pancake (FP). The intervention was continued for 6 weeks, during which the fasting body weight and fasting blood glucose of the mice were measured weekly. At the end of the experiment, the mice were tested for fasting serum insulin, blood lipids, pancreatic tissue pathology, short-chain fatty acids, and gut microbiota. Results: Compared with mice in the MC group and NFP group, FP can reduce fasting blood glucose levels and insulin resistance in diabetic mice, improve dyslipidemia, and relieve pancreatic damage. Moreover, the intake of FP promoted the production of short-chain fatty acids and regulated the gut microbiota, which may be related to the fermentation products formed during the fermentation of sourdough. Conclusion: Shandong pancake with sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* can be used as a functional staple food for combating type 2 diabetes.

Keywords Shandong pancake; sourdough; blood glucose; type 2 diabetes; gut microbiota