

## 葡萄籽多酚纯化及体外厌氧发酵对肠道菌群的影响

范利君, 王志鹏, 宋安康, 李学文, 王伟\*  
(新疆农业大学食品科学与药学院 乌鲁木齐 830000)

**摘要** 以酿酒后赤霞珠葡萄籽为原材料提取葡萄籽多酚,研究 AB-8 大孔吸附树脂对葡萄籽多酚的静态、动态吸附-解吸能力,筛选出适合葡萄籽多酚分离纯化的工艺条件,并在此基础上构建人粪样体外发酵模型,探讨不同质量浓度葡萄籽多酚对肠道菌群的影响。结果表明:AB-8 大孔吸附树脂纯化葡萄籽多酚的最适工艺条件为:上样质量浓度 8 mg/mL、乙醇体积分数 80%、上样流速 2 mL/min、洗脱流速 1 mL/min,在此纯化条件下,多酚纯度由 32.16%提高至 80.35%。肠道微生物测序结果显示,葡萄籽多酚质量浓度的变化并不会显著影响肠道细菌总数( $P>0.05$ ),而会显著影响肠道菌群的多样性( $P<0.05$ )。门水平下,发酵 24 h 后,与空白对照组(CK)相比,不同质量浓度加酚组提高了变形菌门和放线菌门的相对丰度,降低了拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度。低质量浓度组(LG)、中质量浓度组(MG)和高质量浓度组(HG)F/B 值分别下降了 8.21%,39.81%,57.49%。属水平下,多酚质量浓度的变化会影响肠道中不同菌群的生长、增殖,表现为随着质量浓度的增加对菌群有促进或抑制作用,如提高了埃希氏杆菌属/志贺氏杆菌属、克雷伯氏菌属、副杆菌属、乳酸杆菌属、双歧杆菌属、链球菌属等菌的相对丰度,降低了拟杆菌属、梭状芽胞杆菌 XIVa、肠球菌属、嗜胆菌属等菌的相对丰度,随多酚质量浓度的变化表现出浓度效应,且不同发酵时间有明显波动。结论:不同质量浓度葡萄籽多酚通过调节不同菌群结构组成来改善肠道内环境,其中低质量浓度组(LG,4 mg/mL)效果最好。

**关键词** 葡萄籽多酚; 体外厌氧发酵; 肠道菌群; 高通量测序

**文章编号** 1009-7848(2024)08-0143-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.014

肠道菌群是一个既稳定又多变的复杂微生态系统,由大量微生物组成,主要位于人体的结肠和直肠部位,被誉为“人体的活器官”,它们与宿主细胞相互作用,参与调节宿主多种生理过程,如机体营养物质的消化吸收、免疫反应等,对人体健康具有至关重要的作用<sup>[1-2]</sup>。在健康状态下,肠道菌群系统处于动态平衡状态,若肠道菌群失衡,则会增加如 2 型糖尿病、肥胖、炎性肠病、肠道癌症以及代谢性疾病的患病风险<sup>[3-4]</sup>。近年来,大量研究表明,植物中的多酚类物质具有潜在的益生元效应,对于调控人体肠道菌群结构具有积极效应<sup>[5]</sup>。如 Sun 等<sup>[6]</sup>研究发现,茶多酚能显著提高双歧杆菌(*Bifidobacterium*)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)的相对丰度,抑制拟杆菌-普雷沃氏菌(*Bacteroides-Prevotella*)和溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)的增殖。Yuan 等<sup>[7]</sup>探讨猕猴桃多酚提取物对高脂饮食所致大鼠肠道屏障损伤和炎症的影响,结果发

现猕猴桃多酚提取物可增加乳酸杆菌和双歧杆菌的相对丰度,降低梭菌(*Clostridium*)和硫化弧菌(*Desulfovibrionaceae*)的相对丰度,对抑制肠道炎症和预防肠道损伤有一定的积极作用。

葡萄皮渣是葡萄酒酿造过程中产生的副产物,占葡萄总质量的 20%~25%,由葡萄皮、葡萄籽和少量果肉组成<sup>[8]</sup>。研究发现葡萄皮渣中的葡萄籽具有很高的应用价值,如提取葡萄籽中的蛋白质、油脂、原花青素等,其中以酚类物质最受关注,而目前关于葡萄籽中多酚类物质的综合利用仍处于较低水平<sup>[9]</sup>。研究发现,葡萄籽中的多酚类物质具有抗氧化、抗炎、抑菌、预防糖尿病等生理功效<sup>[10]</sup>。近年来,天然产物中多酚类物质的纯化技术包括柱色谱技术、薄层色谱技术、液相色谱技术、高速逆流色谱(HSCCC)技术等。考虑到需要用于实际生产,具有成本低、吸附容量大、可重复循环利用等特点的大孔吸附树脂近年来被广泛应用于天然产物活性成分的分离纯化<sup>[11]</sup>。朱延盛等<sup>[12]</sup>利用 AB-8 大孔吸附树脂纯化紫山药多酚,纯化后多酚纯度为 59.06%,提升了 3.25 倍。陈明威等<sup>[13]</sup>利用 AB-8 大孔吸附树脂纯化霍山石斛多酚,纯化后总

收稿日期: 2023-08-01

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发项目(2022B02045-3)

第一作者: 范利君,女,硕士生

通信作者: 王伟 E-mail: ww2shz@163.com

酚纯度达到 76.2%。

目前,国内外关于葡萄籽多酚的纯化以及葡萄籽多酚对人体肠道菌群多样性的影响尚未得到充分研究。本研究通过采用 AB-8 大孔吸附树脂对葡萄籽多酚最佳纯化条件进行筛选,在此基础上构建人粪样发酵模型,探讨不同质量浓度葡萄籽多酚对人体肠道菌群多样性的影响,以期为葡萄籽多酚的功能性评价以及提高葡萄籽综合利用率提供试验参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

酿酒后赤霞珠葡萄籽脱脂粉:由实验室自制;福林酚试剂、AB-8 大孔吸附树脂、酵母粉,北京索莱宝科技有限公司;L-半胱氨酸、刃天青、维生素 K<sub>1</sub>、胆盐、没食子酸(纯度>99%),源叶生物科技有限公司;蛋白胨,青岛海博生物科技有限公司;碳酸氢钠、氯化钠、氯化血红素、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、吐温-80、六水三氯化铁、七水硫酸镁、无水乙醇等,国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

KQ-250DE 数控超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司;P4PC 紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;xianda-2000A 旋转蒸发器:上海贤德实验仪器有限公司;Alpha 2-4 LSCplus 冷冻干燥机,上海比朗仪器制造有限公司;3H16RI 智能高速冷冻离心机,湖南赫西仪器装备有限公司;SW-CJ-2FD 超净工作台,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;HPX-9162MBE 电热恒温培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

### 1.3 试验方法

1.3.1 葡萄籽多酚粗提物的制备 参照课题组前期确定提取工艺方法<sup>[4]</sup>进行葡萄籽多酚粗提物的提取。其中原材料葡萄籽脱脂粉的制备工艺为:将收集的葡萄籽筛分、清洗、烘干,用高速粉碎机破碎,过筛 40 目后在温度 45 °C、CO<sub>2</sub> 流量 10 L/h、萃取压力 30 MPa 条件下进行脱脂处理,随后将样品密封,置于-20 °C 冰箱保存。

1.3.2 葡萄籽多酚含量测定 多酚含量测定参照黄艳等<sup>[5]</sup>的方法并稍作修改。具体为:配置质量浓度为 0.1 mg/mL 没食子酸标准溶液,分别吸取 0.0,

0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mL 上述没食子酸标准溶液于 10 mL 棕色容量瓶中,各加入蒸馏水 10 mL、福林酚 0.5 mL,混合均匀,室温下静置反应 2 min 后再加入 15%碳酸钠溶液 1.5 mL,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,30 °C 水浴锅中避光反应 30 min,在波长 760 nm 处测定吸光值,得到标准曲线方程为: $y = 0.1317x - 0.0029 (R^2=0.9992)$ ,按照上述试验方法测定样品吸光值,计算多酚含量。

1.3.3 大孔吸附树脂预处理 AB-8 大孔吸附树脂预处理参照文献[13]的方法进行,随后将预处理好的树脂于蒸馏水中保存待用。

1.3.4 静态吸附与解吸曲线绘制 取 1.00 g 预处理好的大孔吸附树脂置于 100 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 质量浓度为 8 mg/mL 的葡萄籽多酚粗提液,恒温振荡箱中的避光振荡吸附 24 h(25 °C, 120 r/min),在 0,1,2,4,6,8,10,12,14,24 h 分别取 1 mL 上清液测定多酚含量,并根据公式(1)计算不同时间的吸附率。然后,将吸附饱和后的大孔树脂过滤,用适量蒸馏水冲洗至表面无吸附残留液,加入 20 mL 80%乙醇溶液,恒温振荡箱中避光充分振荡解吸 10 h(25 °C, 120 r/min),在 0,1,2,4,6,8,10 h 分别取 1 mL 上清液测定多酚含量,并根据公式(2)计算不同时间的解吸率,绘制静态吸附与解吸动力学曲线。

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{解吸率}(\%) = \frac{C_2}{C_0 - C_1} \times 100 \quad (2)$$

式中: $C_0$  为吸附前葡萄籽多酚初始质量浓度,mg/mL; $C_1$  为吸附平衡后葡萄籽多酚质量浓度,mg/mL; $C_2$  为解吸后葡萄籽多酚质量浓度,mg/mL。

1.3.5 AB-8 树脂静态、动态吸附-解吸条件筛选

1.3.5.1 上样质量浓度对 AB-8 大孔树脂吸附率的影响 取 6 份 AB-8 大孔吸附树脂,每份 1.00 g,分别置于锥形瓶中,各加入 20 mL 质量浓度为 2,4,6,8,10,12 mg/mL 的葡萄籽粗多酚溶液,恒温振荡吸附 24 h(25 °C, 120 r/min),测定锥形瓶中溶液多酚含量,计算吸附率。

1.3.5.2 乙醇体积分数对 AB-8 大孔树脂解吸率的影响 取 6 份 AB-8 大孔吸附树脂,每份 1.00 g,分别置于锥形瓶中,各加入 20 mL、8 mg/mL 葡

葡萄籽粗多酚溶液,恒温振荡吸附24 h (25 ℃,120 r/min),测定锥形瓶中溶液多酚含量,过滤后分别加入体积分数为20%,40%,60%,80%,90%,100%乙醇溶液,恒温振荡解吸24 h,测定锥形瓶中溶液多酚含量,计算解吸率。

**1.3.5.3 上样流速对 AB-8 大孔树脂吸附能力的影响** 取适量大孔吸附树脂湿法装柱,用蒸馏水平衡层析柱,然后将质量浓度为8 mg/mL的葡萄籽多酚粗提液,以恒流泵控制上样流速为1,2,3 mL/min进行上样,收集流出液,每10 mL一管测定多酚质量浓度,考察上样流速对吸附效果的影响。

**1.3.5.4 洗脱流速对 AB-8 大孔树脂解吸能力的影响** 取适量大孔吸附树脂湿法装柱,用蒸馏水平衡层析柱至无气泡,然后将质量浓度为8 mg/mL的葡萄籽多酚粗提液,以恒流泵控制上样流速进行上样,待树脂吸附饱和后,用5~6 BV蒸馏水洗柱,至流出液Molish反应为阴性,再用80%乙醇溶液分别以1,2,3 mL/min流速洗脱,收集流出液,每10 mL一管测定多酚质量浓度,考察洗脱流速对解吸效果的影响。

**1.3.6 纯度测定** 根据所筛选的AB-8大孔吸附树脂纯化葡萄籽多酚的最优工艺条件对葡萄籽粗多酚进行纯化,并根据公式(3)计算纯化后多酚纯度。

$$\text{样品纯度}(\%) = \frac{C \times V}{m} \times 100 \quad (3)$$

式中: $C$ 为样品多酚质量浓度,mg/mL; $V$ 为溶液体积,mL; $m$ 为冻干粉质量,mg。

**1.3.7 基础发酵液的配置** 基础发酵液配制及后续灭菌、厌氧处理方法参照刘梦瑶<sup>[19]</sup>的方法进行。

**1.3.8 体外发酵菌液的制备** 试验当天用无菌粪便采集管采集6名志愿者(男:女=1:1)的新鲜粪便样品,在无菌操作条件下,立即等量称取各2 g,将6份样品混合,加入灭菌后改性生理盐水(NaCl 9.0 g/L,L-半胱氨酸 0.5 g/L)稀释10倍搅拌均匀制成粪便悬浮液,悬浮液在低温低速(4 ℃,300 r/min,5 min)下离心,上清液为初始发酵粪便菌液。

**1.3.9 葡萄籽多酚体外厌氧发酵** 体外厌氧发酵参照Zhou等<sup>[17]</sup>的方法并稍作修改。具体为:将配置好的样品培养基(含有纯化后的葡萄籽多酚提

取物)与人新鲜粪便菌液按体积比9:1充分混合,于37 ℃下避光厌氧培养24 h(发酵过程中每3 h轻摇一次),除初始条件(OR)外,分别于发酵的12 h和24 h收集样品,液氮速冻后于-80 ℃保存以待进一步分析。试验设置空白对照组(CK)、低质量浓度组(LG,4 mg/mL)、中质量浓度组(MG,8 mg/mL)、高质量浓度组(HG,12 mg/mL)。所有处理组均设3组平行试验。

**1.3.10 肠道菌群检测** 将收集的发酵液样本送至上海天昊生物科技有限公司完成16S rDNA基因测序。

## 1.4 数据处理与分析

所有试验均重复3次,试验结果采用平均值+标准差的形式表示,使用IBM SPSS Statistics 19软件对数据进行显著性分析,利用Origin 2021软件进行图形绘制。高通量测序原始数据处理通过生物信息云GS Online平台对测序数据进行处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 AB-8 大孔树脂静态吸附与解吸动力学曲线

如图1a所示,0~6 h,AB-8大孔吸附树脂对葡萄籽多酚的吸附率随时间的推移呈快速上升趋势,这是因为树脂经乙醇浸泡后,其吸附表面积增大,会暴露大量吸附位点与葡萄籽多酚迅速结合<sup>[18]</sup>。在6 h达到90.08%之后,吸附率趋于平缓,说明吸附6 h左右树脂即可达到吸附平衡。如图1b所示,解吸率在初始阶段(1 h内)迅速增加,在2 h达到79.65%后趋于稳定,说明葡萄籽多酚在2 h时达到解吸平衡。

### 2.2 树脂静态、动态吸附-解吸条件筛选结果

**2.2.1 上样质量浓度对 AB-8 大孔树脂吸附率的影响** 如图2所示,AB-8大孔吸附树脂吸附率随上样质量浓度的增加呈先上升后下降趋势,在质量浓度为8 mg/mL时,吸附率有最大值95.42%,继续增加上样质量浓度,吸附率下降明显。当上样质量浓度较低时,树脂未能达到饱和,继续增加上样质量浓度,树脂吸附率增加,当上样质量浓度大于8 mg/mL时,树脂吸附率下降,可能是因为多酚质量浓度增加,使得溶液中杂质含量增加,产生絮状沉淀堵塞树脂空隙,从而降低树脂吸附能力<sup>[19]</sup>。

2.2.2 乙醇体积分数对 AB-8 大孔树脂吸附率的影响 多酚类物质的纯化质量浓度受乙醇浓度的影响很大。乙醇是一种极性化合物,很容易将吸附的多酚类物质从树脂中洗出,而乙醇体积分数不同,其极性会存在明显差异,对多酚类物质的溶解性也会不同<sup>[20]</sup>。如图 3 所示,当乙醇体积分数小于 80% 时,随着乙醇体积分数增加,解吸率逐渐上

升,当乙醇体积分数达到 80% 时,解吸率达到最大值 85.48%,继续增加乙醇体积分数,解吸率降低。推测 80% 的乙醇体积分数与葡萄籽中多酚的极性相近,当乙醇体积分数较低时,多酚不易溶出,当乙醇体积分数过高时,溶剂与多酚极性相差变大,导致解吸率下降,因此选择 80% 乙醇溶液作为葡萄籽多酚纯化的最佳洗脱剂。

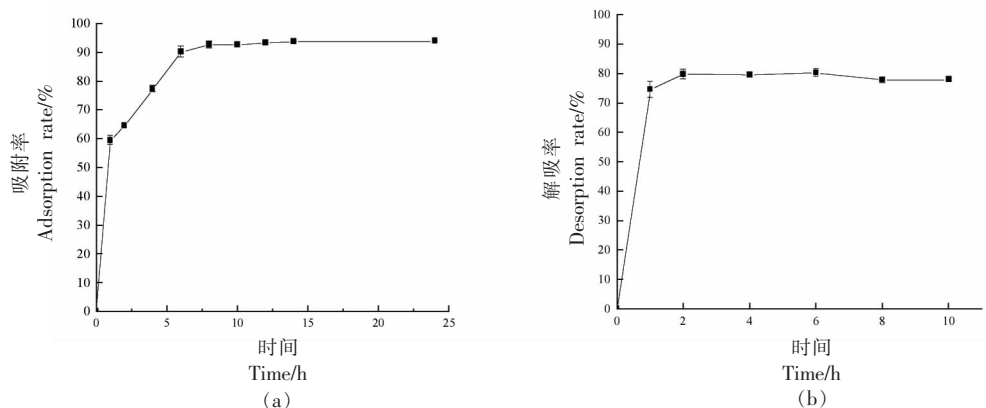


图 1 葡萄籽多酚静态吸附(a)-解吸(b)动力学曲线

Fig.1 Static adsorption (a) - desorption (b) kinetic curves of grape seed polyphenols

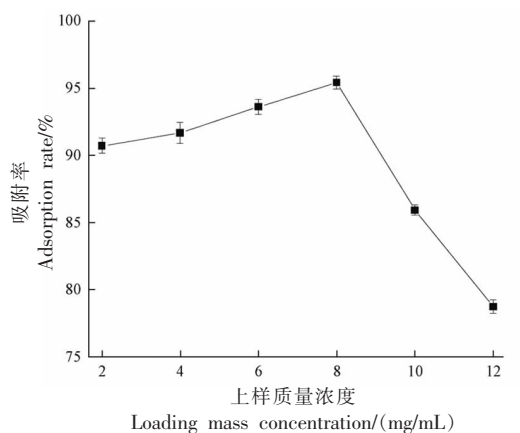


图 2 上样质量浓度对 AB-8 大孔树脂吸附率的影响

Fig.2 Effects of loading mass concentration on adsorption rate of AB-8 macroporous resin

2.2.3 上样流速对 AB-8 大孔树脂吸附能力的影响 液体流速会影响溶质和树脂之间的反应,并进一步影响树脂的吸附和解吸能力,而上样流速一般由树脂泄漏点出现的时间来确定,泄漏点出现越早则说明大孔树脂出现吸附不完全的现象越早<sup>[13]</sup>。如图 4 所示,随着上样流速的增加,泄漏点出现时间逐渐提前,考虑到当上样流速过快时,部

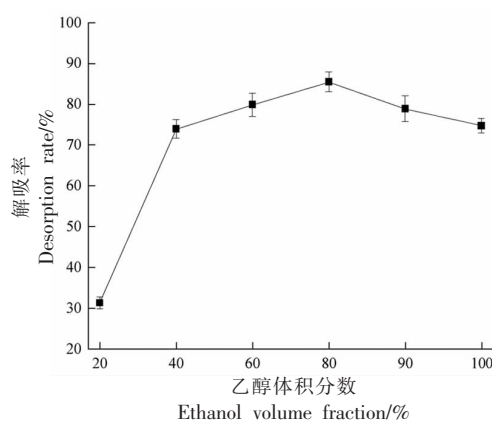


图 3 乙醇体积分数对 AB-8 大孔树脂解吸率的影响

Fig.3 Effects of ethanol volume fraction on desorption rate of AB-8 macroporous resin

分多酚未被树脂吸附就已流出,造成原料浪费,当流速过慢时,泄漏点出现较晚,会增加生产周期,降低工作效率。因此,选择 2 mL/min 为最佳上样流速。

2.2.4 洗脱流速对 AB-8 大孔树脂解吸能力的影响 如图 5 所示,当以流速为 1 mL/min 对葡萄籽多酚进行洗脱时,解吸曲线的收敛性最好,且多酚

溶液质量浓度较高。当洗脱流速增大时,解吸曲线峰型较宽,且有拖尾现象,解吸效果较差,因此综合考虑选择 1 mL/min 为最佳洗脱流速。

2.2.5 AB-8 大孔吸附树脂对葡萄籽多酚的纯化效果 采用福林酚法对葡萄籽多酚粗提物和纯化物进行测定,结果显示,经纯化后的葡萄籽多酚纯度从 32.16% 提高至 80.35%,说明 AB-8 大孔吸附树脂对葡萄籽多酚有较好的纯化效果。

## 2.3 葡萄籽多酚对肠道菌群结构的影响

### 2.3.1 Alpha 多样性分析

2.3.1.1 稀释性曲线 稀释性曲线能够直观显示样本间物种丰富度的差异,也可以用来评估样本的测序量是否合理,当曲线随抽取序列数的增加而趋于平缓时,说明样本的测序数据量合理,测序深度可以反应样品中绝大部分微生物多样性信息<sup>[21]</sup>。由图 6 可以看出,随着抽样深度增加,样本中被检测到的 OTU 数也在增加,而随着抽样深度的加大,曲线趋于平缓,表明如果进一步增加测序深度,虽然可能出现新的 OTU,但大部分种属已被捕捉到,数据可用于后续统计分析且真实可信。

2.3.1.2 Alpha 多样性指数 Alpha 多样性可以反应样本菌群丰度和菌群多样性,有多种衡量指标。包括 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数、Simpson 指数和 Coverage 指数,其中 Chao1 指数、ACE 指数用于评价样本菌群丰富度,数值越大代表物种越多;Shannon 指数、Simpson 指数用于评价样本菌群多样性,Shannon 指数越大、Simpson 指数越小,说明样本物种多样性越高;Coverage 指数为各样本文库的覆盖率,数值越高,表明样本中序列被测出的概率越高<sup>[22]</sup>。表 1 为各组样本体外发酵 24 h 后的 Alpha 多样性指数,从表中可以看出,所有样本 Coverage 指数均接近 1,表明样本中序列基本被全部测出,测序结果可以代表样本的真实情况。从整体来看,与 CK 组相比,LG、MG 和 HG 组 Chao1 指数、ACE 指数虽然有明显变化,但并无显著差异( $P>0.05$ ),而 Shannon 指数随质量浓度的增加显著降低( $P<0.05$ ),说明葡萄籽多酚的加入虽对肠道细菌总数并无显著影响,但对菌群结构具有一定调节作用,这与 Zhou 等<sup>[23]</sup>、Dolara 等<sup>[24]</sup>的研究结果一致。通过对比不同质量浓度组

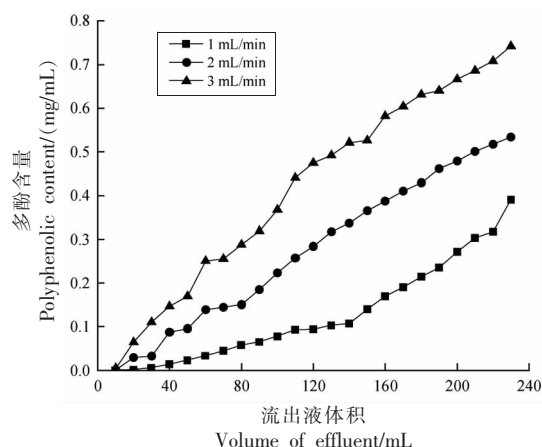


图 4 上样流速对 AB-8 大孔树脂吸附能力的影响

Fig.4 Effects of loading velocity on adsorption capacity of AB-8 macroporous resin

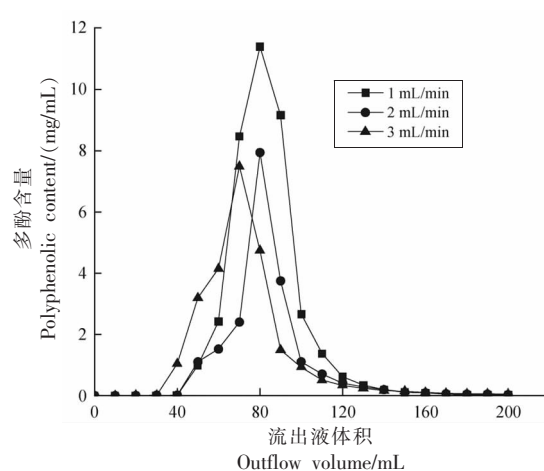


图 5 洗脱流速对 AB-8 大孔树脂吸附能力的影响

Fig.5 Effects of elution flow rate on adsorption capacity of AB-8 macroporous resin

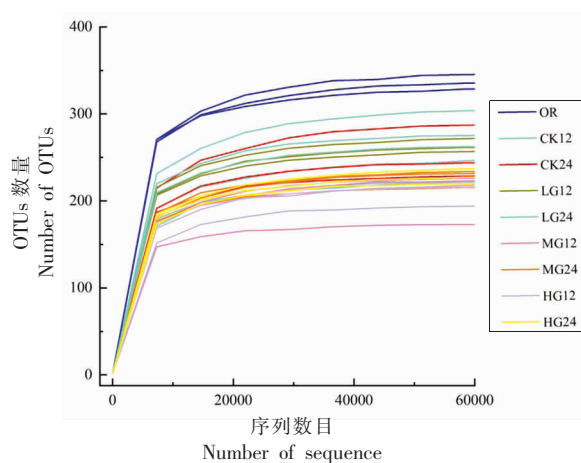


图 6 体外发酵样本稀释性曲线

Fig.6 Dilution curve of *in vitro* fermentation sample

组( $P<0.05$ ),呈现一定的质量浓度效应。同时, LG组物种丰度显著高于MG组和HG组,这与王伟等<sup>[25]</sup>的研究结果一致。出现这种现象可能是因为MG组和HG组葡萄籽多酚样品组中含有较多的

黄烷醇单体。有研究表明黄烷醇单体会与肽聚糖结合,破坏微生物细胞膜结构,从而抑制某些菌群的生长<sup>[26]</sup>。

表1 葡萄籽多酚对肠道菌群 Alpha 多样性指数的影响

Table 1 Effects of grape seed polyphenols on alpha diversity index of intestinal flora

	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage
CK 组	254.07 ± 30.66 <sup>ab</sup>	254.86 ± 30.97 <sup>ab</sup>	3.45 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.9999 ± 0.0000 <sup>a</sup>
LG 组	281.93 ± 22.01 <sup>a</sup>	282.88 ± 22.42 <sup>a</sup>	3.87 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.9999 ± 0.0000 <sup>a</sup>
MG 组	227.66 ± 10.13 <sup>b</sup>	228.28 ± 10.23 <sup>b</sup>	2.86 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.9999 ± 0.0000 <sup>a</sup>
HG 组	229.49 ± 10.11 <sup>b</sup>	230.38 ± 10.65 <sup>b</sup>	2.59 ± 0.06 <sup>d</sup>	0.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.9999 ± 0.0000 <sup>a</sup>

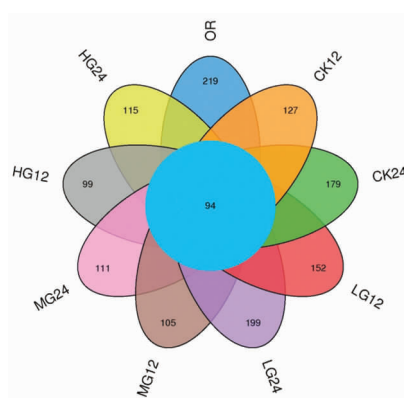
注:组间不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。CK、LG、MG、HG 分别表示空白对照组、低质量浓度组、中质量浓度组、高质量浓度组。

2.3.2 Beta 多样性分析 利用 Venn 图统计不同分组粪便样本中共有和独有的 OTU 数目,可以直观的展示出不同处理组样本中的 OTU 组成情况。结果如图 7 所示,所有样本组中共有 OTU 数为 94 个,不同样本组(OR、CK12、CK24、LG12、LG24、MG12、MG24、HG12、HG24)所特有的 OTU 数分别为 219, 127, 179, 152, 199, 105, 111, 99, 115 个。通过以上数据可以得知, LG 组与 MG 组和 HG 组相比对肠道菌群的丰度和多样性影响更强烈。

### 2.3.3 肠道菌群结构分析

2.3.3.1 门水平肠道菌群结构分析 由图 8 可知,在本研究中,门水平上肠道菌群主要由变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)这 4 大门类构成,其中主要以变形菌门(45.86%)、拟杆菌门(27.24%)、厚壁菌门(23.80%)这 3 大门类为主。这与前人研究中健康成人肠道菌群组成一致<sup>[27]</sup>。从整个发酵过程来看,与 CK 组相比,所有质量浓度组增加了变形菌门和放线菌门的相对丰度,降低了拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度,这与 Lee 等<sup>[28]</sup>研究蓝莓粉对高脂饮食喂养大鼠肠道微生物区系组成的变化趋势一致,也与刘梦瑶<sup>[19]</sup>研究宁夏黄果枸杞多酚对人体肠道菌群的影响中门水平优势菌群变化趋势一致。

由图 9 可知,当添加不同质量浓度的葡萄籽多酚后,会显著影响肠道菌群中不同菌门的相对丰度。其中,变形菌门的相对丰度存在一定质量浓度效应,其相对丰度随多酚质量浓度的增加而增



注:OR. 初始条件,即 0 h 取样;CK12. 空白对照组 12 h 取样;CK24. 空白对照组 24 h 取样;LG12. 低质量浓度组 12 h 取样;LG24. 低质量浓度组 24 h 取样;MG12. 中质量浓度组 12 h 取样;MG24. 中质量浓度组 24 h 取样;HG12. 高质量浓度组 12 h 取样;HG24. 高质量浓度组 24 h 取样;下同。

图 7 不同分组样本 Venn 图

Fig.7 Venn diagram of samples in different groups

加,且不同质量浓度组间差异显著( $P<0.05$ ),同时不同发酵时间的丰度变化也存在显著差异( $P<0.05$ )。变形菌门为革兰氏阴性菌,包含多种致病菌(如大肠杆菌、沙门氏菌等),其丰度的增加可能导致宿主肠道微生态失衡,从而增加糖尿病和炎症反应的发生,被认为是炎肠性疾病和肠道紊乱的标志物,因此,肠道中变形菌门的增加也被认定为肠道菌群结构失衡<sup>[29]</sup>。与 CK 组相比,变形菌门的相对丰度随多酚质量浓度的增加而显著增加( $P<0.05$ ),而从不同发酵时间来看,在发酵 24 h 结束

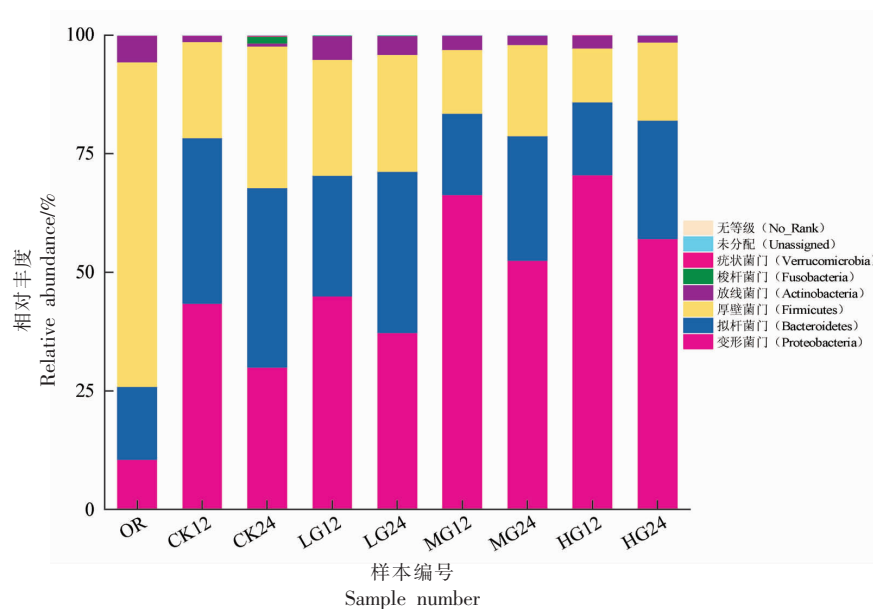


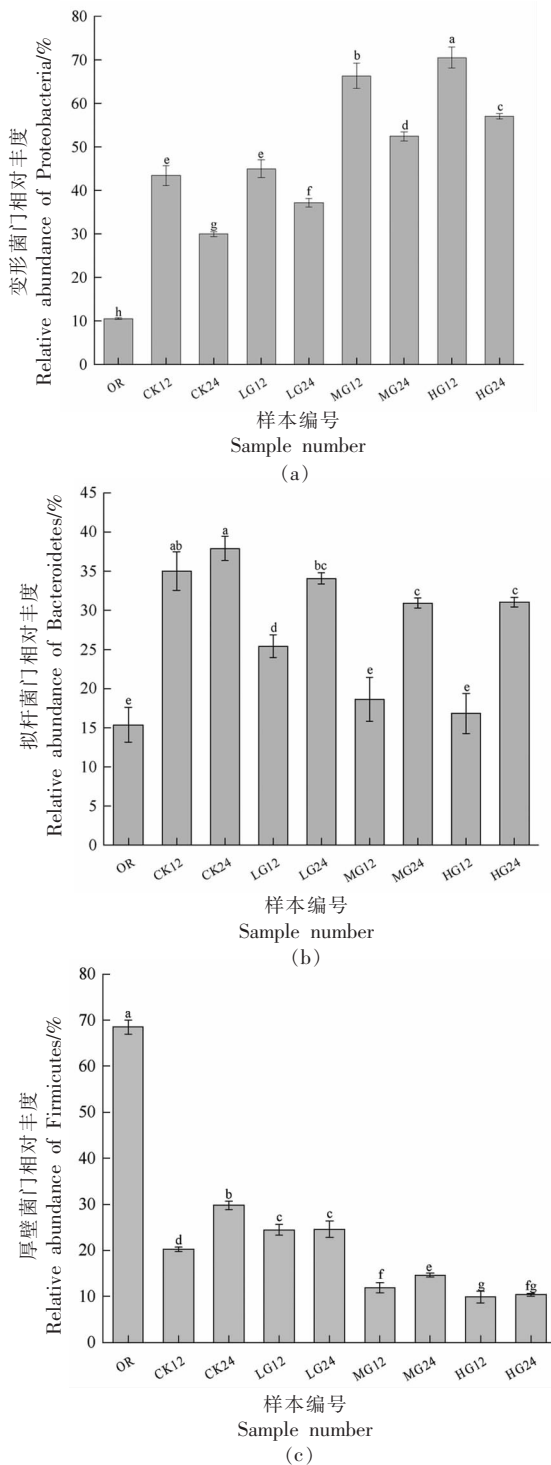
图 8 门水平肠道菌群物种相对丰度柱状图

Fig.8 Histogram of relative abundance of intestinal flora species at phyla level

后,各质量浓度组变形菌门相对丰度均有下降趋势,因此认为本研究发酵过程中变形菌门的大幅增加可能与葡萄籽多酚的加入改变了发酵环境有关,这也说明了变形菌门对环境变化具有一定敏感性,Faith 等<sup>[30]</sup>的研究中也有相关表述。拟杆菌门在整个发酵过程中并没有表现出显著的质量浓度效应,LG 组相对丰度在发酵 12 h 时显著高于 MG 组和 HG 组( $P < 0.05$ ),而 MG 组与 HG 组两者之间并无显著差异( $P > 0.05$ )。随着发酵时间延长,在发酵 24 h 结束后,3 个质量浓度组拟杆菌门的相对丰度虽有变化但差异并不显著( $P > 0.05$ )。厚壁菌门在发酵 24 h 结束后不同质量浓度组之间呈现一定质量浓度效应,其相对丰度随质量浓度的增加而降低,且不同质量浓度组之间有显著差异( $P < 0.05$ ),而通过对比不同发酵时间试验结果发现,LG 组与 HG 组在发酵的 12 h 和 24 h 并无显著差异( $P > 0.05$ ),而 MG 组却差异显著( $P < 0.05$ )。同时本研究中,与 CK 组相比,虽然在发酵结束后均降低了不同质量浓度组拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度,但  $F/B$  值却随多酚质量浓度的增加而降低,各质量浓度组(LG、MG、HG)分别下降了 8.21%,39.81%,57.49%。 $F/B$  值的比例被认为与机体能量代谢息息相关,正常情况下, $F/B$  值维持在相对稳定的状态(1:1),当两者比例升高,则

可能会增加肥胖、2 型糖尿病等代谢疾病的发生风险<sup>[31]</sup>。因此,比提高肠道菌群中拟杆菌门相对丰度,降低厚壁菌门相对丰度更重要的是维持两者之间比例的平衡。在本研究中,葡萄籽多酚的加入降低了  $F/B$  值,说明葡萄籽多酚可以通过调节肠道菌群结构达到降低宿主发生肥胖和缓解 2 型糖尿病的效果,且存在一定质量浓度效应。

2.3.3.2 属水平肠道菌群结构分析 由图 10 可知,与 CK 组相比,葡萄籽多酚的加入,提高了埃希氏杆菌属/志贺氏杆菌属(*Escherichia/Shigella*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、副杆菌属(*Parabacteroides*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)等菌属的丰度,其中副杆菌属表现为随多酚质量浓度的增加而降低,普雷沃氏菌属含量随多酚质量浓度增加并无明显变化,而其它菌属则表现为随多酚质量浓度的增加而上升。同时葡萄籽多酚的加入也降低了拟杆菌属(*Bacteroides*)、梭状芽胞杆菌属 XIVa(*Clostridium XIVa*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、嗜胆菌属(*Bilophila*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、韦荣球菌属(*Veillonella*)等菌属的丰度,且随多酚质量浓度的增加而降低。



注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图9 门水平肠道菌群相对丰度变化

Fig.9 Relative abundance change of intestinal microflora at portal level

在本研究中,与OR相比,不同质量浓度葡萄籽多酚样品组均表现出变形菌门相对丰度的大幅

增加,主要是埃希氏杆菌属/志贺氏杆菌属相对丰度的显著上升导致。研究发现,埃希氏杆菌属/志贺氏杆菌属是胃肠道疾病的主要病原体,其相对丰度的增加易导致机体发生腹泻、肠道感染以及肠道并发症等,因此,目前研究认为该菌群丰度的增加与肠道菌群失调有关<sup>[32]</sup>。然而,本研究发现,发酵24h后,不同质量浓度葡萄籽多酚样品组均表现出抑制该菌生长的趋势。陈思宇<sup>[33]</sup>在研究黑枸杞对人体肠道菌群的影响中也发现,不同剂量组在发酵的0~24h内埃希氏杆菌属/志贺氏杆菌属呈先增加后降低趋势,与本研究结果趋势一致。乳酸杆菌(*Lactobacillus*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是人体肠道中的益生菌,大量研究表明,它们可以通过抑制有害菌的生长,调节肠道内环境,从而达到增强机体免疫功能、抗肿瘤、抗氧化、减轻肥胖等功效<sup>[34]</sup>。本研究中,不同质量浓度葡萄籽多酚样品组均提高了乳酸杆菌属和双歧杆菌属的相对丰度,且随多酚质量浓度的增加而上升,Zhou等<sup>[23]</sup>的研究也发现葡萄籽多酚对肠道有益菌双歧杆菌属(*Bifidobacterium* spp.)和乳酸杆菌-肠球菌属(*Lactobacillus-Enterococcus* group)生长有显著增殖作用。前人大量研究也表明,植物多酚类物质可以促进有益菌乳酸杆菌和双歧杆菌的增长,如茶多酚<sup>[6]</sup>、枸杞多酚<sup>[16]</sup>、猕猴桃多酚<sup>[7]</sup>等。副杆菌属可以通过产生琥珀酸和次级胆汁酸减轻肥胖和代谢紊乱<sup>[35]</sup>,还可以通过抑制TLR4和Akt信号传导以及促进细胞凋亡达到一定抗炎和抗癌特性<sup>[36]</sup>,说明副杆菌属相对丰度的增加有利于人体健康。本研究中,葡萄籽多酚的加入提高了副杆菌属的相对丰度,而LG组与MG组和HG组相比,相对丰度较高,且该菌属随质量浓度的增加相对丰度降低,说明多酚质量浓度对副杆菌属的影响较大,低质量浓度葡萄籽多酚可能更适合该菌属的生长。此外,葡萄籽多酚的加入还增加了普雷沃氏菌属(*Prevotella*)的相对丰度,有研究表明普雷沃氏菌属可以提高肠道细菌降解复合多糖和纤维的能力<sup>[37]</sup>,而本研究发现该菌属在不同质量浓度组之间差异并不显著( $P>0.05$ ),同时研究中也发现拟杆菌属相对丰度随多酚浓度的增加而降低,有研究表明普雷沃氏菌属与拟杆菌属比例的增加,可以提高机体降解碳水化合物、多糖的能力,达到减



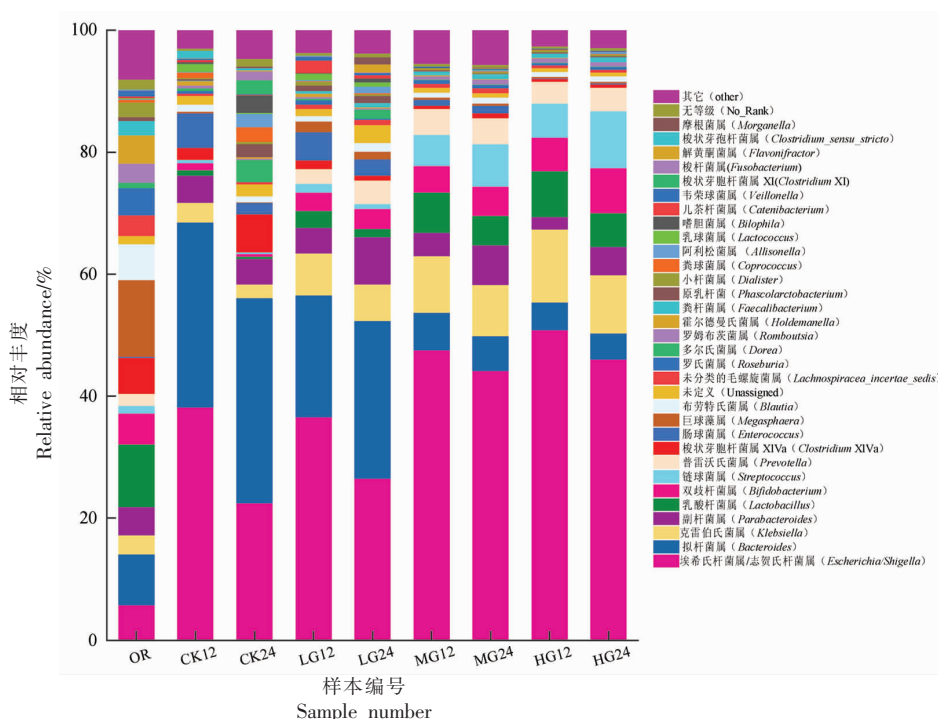


图 10 属水平肠道菌群物种相对丰度柱状图

Fig.10 Relative abundance histogram of intestinal flora species at genus level

轻肥胖的效果<sup>[38]</sup>。因此,该结果再次表明葡萄籽多酚可以通过调节肠道菌群结构减轻宿主肥胖。然而,也有研究发现,茶多酚<sup>[9]</sup>的加入则降低了拟杆菌-普雷沃氏菌的相对丰度,因此不同来源的酚类物质其酚类物质组成的不同可能会导致菌群有不同的变化趋势。同时,在本研究中,葡萄籽多酚的加入也改变了部分致病菌和中性菌的相对丰度,如降低了肠球菌属、嗜胆菌属、韦荣球菌属的相对丰度,增加了克雷伯氏菌属、链球菌属的相对丰度,且都具有一定质量浓度效应。以上分析结果说明葡萄籽多酚质量浓度的变化会影响肠道中不同菌群的生长、增殖,表现为随质量浓度的增加对菌群有促进或抑制作用。

虽然在本研究质量浓度范围内部分有益菌相对丰度随葡萄籽多酚质量浓度的增加而增加,有害菌相对丰度随葡萄籽多酚质量浓度的增加而减少,但研究发现,MG组和HG组在试验研究发酵时间内,埃希氏杆菌属/志贺氏杆菌属、克雷伯氏菌属等致病菌和条件致病菌与空白对照组(CK)相比相对丰度显著增加,且二者在整个菌群中的占比超过50%。因此,从整体来看,LG组与MG组

和HG组相比更利于肠道菌群结构的稳定以及具有最佳改善肠道内环境的能力。

### 3 结论

本研究对葡萄籽多酚的纯化工艺进行了筛选,纯化后的葡萄籽多酚纯度为80.35%。同时利用体外厌氧发酵模型,探讨了不同质量浓度葡萄籽多酚对肠道菌群多样性的影响,结果表明:体外发酵24h后,与空白对照组(CK)相比,不同质量浓度葡萄籽多酚的加入对肠道菌群丰度影响并不显著( $P>0.05$ ),而主要对肠道菌群的多样性有显著影响( $P<0.05$ ),低质量浓度组(LG)表现出具有较高的菌群丰度与菌群多样性。门水平下,葡萄籽多酚的加入提高了变形菌门和放线菌门的相对丰度,降低了拟杆菌门和厚壁菌门的相对丰度,呈现一定的质量浓度效应,同时肠道菌群的F/B值也随多酚质量浓度的增加而降低。属水平下,不同菌属随多酚质量浓度变化呈现一定质量浓度效应,如埃希氏杆菌属/志贺氏杆菌属、克雷伯氏菌属、乳酸杆菌属、双歧杆菌属等菌的相对丰度随多酚质量浓度的增加而增加;拟杆菌属、梭状芽胞杆菌

XIVa、肠球菌属、嗜胆菌属、韦荣球菌属等菌的相对丰度随多酚浓度的增加而降低,且不同发酵时间有明显波动。因此,葡萄籽多酚可以通过质量浓度变化调节肠道菌群多样性及菌群结构组成改善肠道内环境,从而发挥维持肠道健康的积极作用,而低质量浓度组(LG,4 mg/mL)葡萄籽多酚则更利于肠道菌群结构稳定及最佳改善肠道内环境的能力。

### 参 考 文 献

- [1] DOMINGUEZ-BELLO M G, GODOY-VITORINO F, KNIGHT R, et al. Role of the microbiome in human development[J]. *Gut*, 2019, 68(6): 1108-1114.
- [2] DURACK J, LYNCH S V. The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2019, 216(1): 20-40.
- [3] SONG Q Q, WANG Y K, HUANG L X, et al. Review of the relationships among polysaccharides, gut microbiota, and human health[J]. *Food Research International*, 2021, 140(2): 109858.
- [4] SHANG Q S, JIANG H, CAI C, et al. Gut microbiota fermentation of marine polysaccharides and its effects on intestinal ecology: An overview[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 179: 173-185.
- [5] GUO X J, CHENG M, ZHANG X, et al. Green tea polyphenols reduce obesity in high-fat diet-induced mice by modulating intestinal microbiota composition[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2017, 52(8): 1723-1730.
- [6] SUN H Y, CHEN Y H, CHENG M, et al. The modulatory effect of polyphenols from green tea, oolong tea and black tea on human intestinal microbiota *in vitro*[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 5(1): 399-407.
- [7] YUAN M L, CHEN X, SU T X, et al. Supplementation of kiwifruit polyphenol extract attenuates high fat diet induced intestinal barrier damage and inflammation via reshaping gut microbiome[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 702157.
- [8] MACHADO N, DOMINGUEZ-PERLES R. Addressing facts and gaps in the phenolics chemistry of winery by-products[J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 286.
- [9] 温建辉, 刘冷. 葡萄籽成分的开发与综合利用[J]. 晋中学院学报, 2014, 31(3): 32-36, 81.  
WENG J H, LIU L. Development and comprehensive utilization of grape seed components[J]. *Journal of Jinzhong University*, 2014, 31(3): 32-36, 81.
- [10] GUPTA M, DEY S, MARBANIANG D, et al. Grape seed extract: Having a potential health benefits[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(4): 1205-1215.
- [11] 夏雅俊, 闫维国. 制备色谱技术分离纯化天然产物中多酚类化合物的研究进展[J]. 山东化工, 2020, 49(18): 35-40.  
XIA Y J, YAN W G. Research progress in separation and purification of polyphenols from natural products by preparative chromatography[J]. *Shandong Chemical*, 2020, 49(18): 35-40.
- [12] 朱延胜, 魏明, 钱森和, 等. 紫山药多酚分离纯化及其对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(16): 182-187.  
ZHU Y S, WEI M, QIAN S H, et al. Isolation and purification of purple yam polyphenol and its effect on  $\alpha$ -inhibition of glucosidase activity[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2022, 48(16): 182-187.
- [13] 陈明威, 魏明, 陶良凡, 等. 大孔树脂分离纯化霍山石斛多酚及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(11): 148-153.  
ZHANG M W, WEI M, TAO L F, et al. Isolation and purification of polyphenols from *Dendrobium huoshanense* by macroporous resin and their antioxidant activity [J]. *Food and Machinery*, 2020, 36(11): 148-153.
- [14] 范利君, 宋安康, 王志鹏, 等. 葡萄籽多酚提取物在体外模拟消化过程中抗氧化成分及抗氧化活性的变化[J]. 食品科技, 2022, 47(6): 235-242.  
FAN L J, SONG A K, WANG Z P, et al. Changes of antioxidant components and antioxidant activity of grape seed polyphenol extract during simulated digestion *in vitro*[J]. *Food Technology*, 2022, 47(6): 235-242.
- [15] 黄艳, 孙怡婷, 张见明, 等. 松毛菇多酚的提取及纯化工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(21): 106-114.  
HUANG Y, SUN Y T, ZHANG J M, et al. Study on the extraction and purification process of *Pleurotus edodes* polyphenols[J]. *Food Research and De-*

- velopment, 2019, 40(21): 106–114.
- [16] 刘梦瑶. 宁夏黄果枸杞酚类物质分析及抗氧化、体外消化和发酵特性研究[D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2021.
- LIU M Y. Analysis of phenolic compounds and study on antioxidant, *in vitro* digestion and fermentation characteristics of Ningxia Huangguo *Lycium barbarum*[D]. Shanxi: Northwest Agricultural and Forestry University, 2021.
- [17] ZHOU L, XIE M H, YANG F, et al. Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota[J]. LWT, 2020, 117: 108621.
- [18] 朱俊玲, 梁凯, 闫巧珍, 等. 小米多酚的分离纯化及其组分分析[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(2): 34–40.
- ZHU J L, LINAG K, YAN Q Z, et al. Isolation, purification and component analysis of millet polyphenols[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2021, 36(2): 34–40.
- [19] XI L S, MU T H, SUN H N. Preparative purification of polyphenols from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves by AB-8 macroporous resins[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 166–174.
- [20] GAO Z P, YU Z F, YUE T L, et al. Optimization of polyphenols removal from kiwifruit juice using a macroporous resin[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 97(8): 2498–2507.
- [21] 谢旻皓. 苦丁茶二咖啡酰奎尼酸与肠道微生物的相互作用[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- XIE W H. Interaction between *Kudingcha dicaffeoyl* quinic acid and intestinal microorganisms[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [22] JIANG X T, PENG X, DENG G H, et al. Illumina sequencing of 16S rDNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland[J]. Microbial Ecology, 2013, 66(1): 96–104.
- [23] ZHOU L, WANG W, HUANG J, et al. *In vitro* extraction and fermentation of polyphenols from grape seeds (*Vitis vinifera*) by human intestinal microbiota[J]. Food & Function, 2016, 7(4): 1959–1967.
- [24] DOLARA, LUCERI C, DE FILIPPO C, et al. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats[J]. Mutation Research, 2005, 591(1): 237–246.
- [25] 王伟, 布丽根·加冷别克, 祖丽普努尔·麦提赛伊迪, 等. 葡萄籽多酚对免疫抑制小鼠肠道菌群的影响[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(7): 116–124.
- WANG W, BULIGENG J, ZULIPUNUER M, et al. Effect of grape seed polyphenols on intestinal flora in immunosuppressed mice[J]. Preservation and Processing, 2021, 21(7): 116–124.
- [26] 费鹏, 赵胜娟, 陈曦, 等. 植物多酚抑菌活性、作用机理及应用研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(7): 226–230.
- FEI P, ZHAO S J, CHEN X, et al. Research progress in bacteriostatic activity, mechanism and application of plant polyphenols[J]. Food and Machinery, 2019, 35(7): 226–230.
- [27] SENDER R, FUCHS S, MILO R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans[J]. Cell, 2016, 164(3): 337–340.
- [28] LEE S, KEIRSEY K I, KIRKLAND R, et al. Blueberry supplementation influences the gut microbiota, inflammation, and insulin resistance in high-fat-diet-fed rats[J]. The Journal of Nutrition, 2018, 148(2): 209–219.
- [29] GOWD V, KARIM N, SHISHIR M R I, et al. Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 93: 81–93.
- [30] FAITH J J, GURUGE J L, CHARBONNEAU M, et al. The long-term stability of the human gut microbiota[J]. Science, 2013, 341(6141): 1237439.
- [31] QIAO Y, SUN J, XIA S F, et al. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity[J]. Food & Function, 2014, 5(6): 1241–1249.
- [32] FARZAD E H, MOJTABA B, HAMDALLAH M, et al. Prevalence and antibiotic resistance profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrheal samples[J]. Iranian Journal of Microbiology, 2020, 12(4): 289–295.
- [33] 陈思宇. 不同干燥方式对黑枸杞抗炎、抗氧化活性及肠道体外发酵的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- CHEN S Y. Effects of different drying methods on anti-inflammatory, antioxidant activities and intestinal fermentation *in vitro* of *Lycium barbarum* [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022.

- [34] SAADAT Y R, KHOSROUSHAHI A Y, GARGARI B P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 217: 79–89.
- [35] WANG K, LIAO M F, ZHOU N, et al. Parabacteroides distasonis alleviates obesity and metabolic dysfunctions via production of succinate and secondary bile acids[J]. Cell Reports, 2019; 26(1): 222–235.e5.
- [36] KOH G Y, KANE A, LEE K, et al. Parabacteroides distasonis attenuates toll-like receptor 4 signaling and Akt activation and blocks colon tumor formation in high-fat diet-fed azoxymethane-treated mice[J]. International Journal of Cancer, 2018, 143(7): 1797–1805.
- [37] PETIA K D, ANNE N, ROZITA A, et al. Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with increased abundance of prevotella[J]. Cell Metabolism, 2015, 22(6): 971–982.
- [38] HJORTH M F, BLADEL T, BENDTSEN L Q, et al. Prevotella-to-Bacteroides ratio predicts body weight and fat loss success on 24-week diets varying in macronutrient composition and dietary fiber: Results from a post-hoc analysis[J]. International Journal of Obesity, 2018, 5(43): 149–157.

### Effects of Purification of Grape Seed Polyphenols and *in Vitro* Anaerobic Fermentation on Intestinal Flora

Fan Lijun, Wang Zhipeng, Song Ankang, Li Xuewen, Wang Wei\*

(College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000)

**Abstract** Grape seed polyphenols were extracted from *Cabernet Sauvignon* grape seeds after winemaking. The static and dynamic adsorption-desorption capacity of AB-8 macroporous adsorption resin on grape seed polyphenols was studied, and the technological conditions suitable for the separation and purification of grape seed polyphenols were selected. On this basis, human fecal fermentation model was constructed *in vitro* to explore the effects of different concentrations of grape seed polyphenols on intestinal flora. The results showed that the optimal process conditions for purification of grape seed polyphenols by AB-8 macroporous adsorption resin were as follows: Loading mass concentration 8 mg/mL, ethanol volume fraction 80%, loading flow rate 2 mL/min, elution flow rate 1 mL/min. Under these purification conditions, the purity of polyphenols increased from 32.16% to 80.35%. Gut microbes sequencing results showed that the grape seed polyphenols concentration changes will not significantly affect the intestinal bacteria ( $P>0.05$ ), and will significantly influence the diversity of intestinal flora ( $P<0.05$ ). At phylum level, after 24 h of fermentation, compared with blank control group (CK), the relative abundance of Proteobacteria and Actinomycetes was increased in groups with different concentrations of phenol, while the relative abundance of Bacteroidetes and Firmicutes was decreased. However, *F/B* values in low concentration group (LG), medium concentration group (MG) and high concentration group (HG) were decreased by 8.21%, 39.81% and 57.49%, respectively. At the genus level, the change of polyphenol concentration can affect the growth and proliferation of different intestinal flora, which could be shown as promoting or inhibiting the flora with the increase of the concentration, such as increasing the relative abundance of *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and reducing the relative abundance of *Bacteroides*, *Clostridium* XIVa, *Enterococcus*, *Bilophila* and other bacterial genera. Concentration effects were observed with changes in polyphenol mass concentration, and different fermentation time had obvious fluctuation. Therefore, different mass concentrations of grape seed polyphenols could improve the intestinal environment by regulating different bacterial community composition, and the low mass concentration group (LG, 4 mg/mL) had the best effect.

**Keywords** grape seed polyphenols; *in vitro* anaerobic fermentation; intestinal flora; high-throughput sequencing