

籽用南瓜果胶的提取及其对体外发酵肠道菌群的影响

陈思梦¹, 王楠斌^{1,2}, 杜明璇¹, 陆文婷¹, 孙海龙^{1*}, 倪永清¹

(¹石河子大学食品学院 新疆石河子 832003)

(²新疆农垦科学院农产品加工研究所 新疆石河子 832000)

摘要 以新疆籽用南瓜为原料,在优化超声辅助酸提法制备籽用南瓜果胶工艺、表征其结构的基础上,采用体外模拟发酵探究裸仁南瓜果胶对发酵过程中肠道微生物群落结构的影响。结果表明,利用超声波辅助酸提法可显著提高籽用南瓜果胶的制备效率,使板栗南瓜和裸仁南瓜果胶得率分别达到 16.10% 和 9.14%。解析其结构表明,籽用南瓜果胶酯化度介于 31.8%~40% 范围,均为低酯果胶;裸仁南瓜果胶分子质量最低,总糖(86.2%)和半乳糖醛酸(55.3%)含量均远高于板栗南瓜。相比商业果胶,裸仁南瓜果胶在体外模拟发酵过程中能显著促进粘液乳杆菌属、双歧杆菌属、乳杆菌属和巨单胞菌属等有益菌属的增殖,降低大肠埃希氏菌-志贺氏菌属等条件致病菌的相对丰度。本研究结果为籽用南瓜果胶的高效制备提供技术支持,也为其实验室益生元在食品、医药等领域的应用提供了数据支撑。

关键词 籽用南瓜; 果胶; 超声辅助酸提取; 体外发酵; 肠道菌群

文章编号 1009-7848(2025)05-0275-15 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.05.026

果胶是由 α -1,4 糖苷键连接半乳糖醛酸与鼠李糖、阿拉伯糖等聚合而成的酸性杂多糖,主要存在于植物初生细胞壁和细胞间片层中的天然多糖,在水果和蔬菜中含量丰富^[1]。作为一种大分子可溶性膳食纤维,果胶结构的复杂性决定了其功能的多样性。大量研究表明果胶的生物学功能与其甲氧基含量、分子质量(Mw)和单糖组成等自身结构及特性密切相关,而其结构又严格依赖于植物来源和提取方法^[2]。酯化度(DE)是影响果胶多糖生物活性的关键因素之一,果胶按酯化度可划分为高酯果胶(DE>50%)和低酯果胶(DE<50%)^[3]。低酯果胶含有较多羧基,具有良好的水溶性和凝胶性,多用于低糖果酱、果冻和烘烤食品生产中^[4];高酯果胶因含有较多酯基而多用于制作油性食品,以增加食品的稠度和稳定性^[5]。果胶的生物黏附性、低毒及重金属吸附等特性,使其在作为靶向载体材料方面的研究得到迅速发展^[6],作为一种极具潜力的微胶囊壁材,果胶在食品、医药等领域具有广阔的应用前景。同时,越来越多的研究发现果

胶具有促进肠道蠕动,降低胆固醇,调节免疫和促进益生菌增殖等作用,被视为新型益生元之一^[7]。

柑橘皮、苹果渣和甜菜渣是制备商业果胶的主要来源,因果胶在食品、医药等领域中研究和应用的不断深入,故果胶的需求逐年上升^[8],迫切需要寻找新的果胶来源。有研究表明南瓜果肉、瓜皮中果胶的含量约为干质量的 13%~14%,是果胶的良好来源。籽用南瓜是取食种子的一类南瓜,广泛种植于新疆、内蒙古、黑龙江等高寒、光热充足地区。我国籽用南瓜年产量约 40 万 t,位居世界第一。籽用南瓜果肉富含果胶、蛋白质、矿物质等营养素^[9]。然而,籽用南瓜取籽后剩余的果肉常被丢弃,造成环境污染和严重的资源浪费。开发和利用籽用南瓜中的果胶对于提升其附加值,促进农民增收具有重要价值。尽管已报道了酸提取和盐析等传统手段制备南瓜果胶的方法,但这些报道均集中于单一的提取方法,果胶得率偏低,而利用籽用南瓜制备果胶相关的研究鲜有报道。

研究表明制备过程不仅影响果胶多糖的提取效率和得率,也影响果胶的分子结构、功能和生物活性^[10]。传统的酸、热水和碱提取等方法不仅耗时、提取率低,还会产生大量的废水。近年出现的超声复合提取法具有提取时间短,溶剂消耗少,产生不良产物少,生产效率和提取率高等优点,有助于提高果胶的营养功能和生物活性保留程度^[11]。

收稿日期: 2024-05-30

基金项目: 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关项目
(2022DB008, 2024AB050); 自治区天池英才计划项目(CZ002309)

第一作者: 陈思梦,女,硕士生

通信作者: 孙海龙 E-mail: sunhl610@shzu.edu.cn

然而,目前关于超声辅助酸提法制备籽用南瓜果胶的研究尚未见报道。本文在传统酸提法的基础上,利用响应面法优化并建立通过超声辅助酸提法制备籽用南瓜果胶的工艺流程,并在表征其结构和性质的基础上,以商业果胶为对照,利用体外粪便模拟发酵探究籽用南瓜果胶对健康人体肠道微生物群落结构的影响,为实现籽用南瓜资源的高值化利用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

板栗南瓜、裸仁南瓜购自新疆阿勒泰地区北屯市;葡萄糖醛酸、间羟基联苯、聚酰胺、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝等,北京索莱宝科技有限公司;维生素K₁、血红素和苹果果胶,上海麦克林生化科技有限公司;半乳糖醛酸、甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸等标准品,Sigma-Aldrich公司;盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、活性炭等其它试剂,国药集团化学试剂有限公司。粪便基因组DNA提取试剂盒,北京天根生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

pHSJ-4A型pH计,上海雷磁精科有限公司;B250智能数显恒温油水浴锅,上海予卓仪器有限公司;Fresco 21型高速冷冻离心机,Nicolet 6700傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;JY92-2N型超声波细胞粉碎仪、SCI-ENTZ-20F/B型真空冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;RE-5205型旋转蒸发仪,上海亚荣有限公司;EON多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;日立SU8010场发射扫描电子显微镜,日本日立有限公司。

1.3 方法

1.3.1 粒用南瓜果胶的制备工艺流程 粒用南瓜经去籽、洗净、切块、烘干后粉碎并过80目筛得到南瓜粉。称取若干南瓜粉,按一定的料液比加入适宜pH值的盐酸提取液,于恒温水浴锅中加热后,利用超声仪进行提取,所得提取液经抽滤后,加入0.5%的活性炭,于50℃水浴加热30 min,经再次抽滤后,将滤液蒸发浓缩至原体积的十分之一,加入2倍体积无水乙醇,于4℃静置2 h后,8 000 r/min离心20 min,弃上清得到粒用南瓜果胶粗提

物。果胶粗提物经适量无水乙醇清洗2次后,得到几乎透明的胶状物质,利用真空冷冻干燥法对其进行干燥后得到所需南瓜果胶样品,果胶得率计算公式如下:

$$\text{果胶得率}(\%) = \frac{\text{果胶质量}}{\text{南瓜粉质量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 响应面法优化超声辅助酸提取法制备籽用南瓜果胶的工艺 以溶液的料液比、pH值、提取温度、提取时间为试验因素优化传统酸提法制备果胶的工艺,考察不同料液比(1:20,1:25,1:30,1:35,1:40)、pH值(1.0,1.25,1.5,1.75,2.0)、温度(70,75,80,85,90℃)、提取时间(20,30,40,50,60 min)对果胶提取率的影响。在酸提法的基础上结合超声辅助提取,进一步优化超声功率(195,260,325,390,455 W)、超声时间(5,10,15,20,25 min)、超声占空比(30%,40%,50%,60%,70%)对籽用南瓜果胶得率的影响。采用Box-Behnken Design对籽用南瓜果胶提取工艺进行三因素三水平的响应面优化设计(Response surface methodology),试验因素水平及编号见(表1)。

表1 超声波辅助提取法响应面设计中各因素水平及编号

Table 1 Levels and numbers of each factor in response surface design of ultrasonic assisted extraction method

因素	水平		
	-1	0	1
板栗南瓜超声波功率(A ₁)/W	195	325	455
板栗南瓜超声波时间(B ₁)/min	5	15	25
板栗南瓜占空比(C ₁)%	30	50	70
裸仁南瓜超声波功率(A ₂)/W	195	325	455
裸仁南瓜超声波时间(B ₂)/min	5	15	25
裸仁南瓜占空比(C ₂)%	30	50	70

1.3.3 扫描电镜图像分析 果胶样品经导电胶均匀粘贴、喷金90 s镀膜后,上机观测果胶样品的表面形态。

1.3.4 粒用南瓜果胶理化特性测定 以牛血清蛋白为标准品,采用Bradford法测定蛋白质含量^[10];以半乳糖醛酸为标准品,采用间羟基联苯法测定糖醛酸含量^[12];以没食子酸为标准品,采用福林酚法测定多酚含量^[13];总糖的测定采用蒽酮比色法^[14];酯化度的测定参照Yang等^[15]的方法进行。

1.3.5 粒用南瓜果胶分子质量及其分布测定 配制质量浓度 10.0 mg/mL 果胶溶液,采用高效凝胶渗透色谱法 (HPLC) 进行分子质量和纯度的分析。采用 TSK-GEL G4000SWxl 色谱柱 (300 mm×7.8 mm),去离子水为流动相,流速 1.0 mL/min,柱温 30 °C,进样量 20 μL,RID 检测。

1.3.6 果胶单糖组成的测定 采用外标法通过液相色谱法测果胶样品中的单糖组成。用 3.0 mL 2 mol/L 三氟乙酸(TFA) 将 3.0 mg 果胶样品于 10 mL 安培瓶中,120 °C 酸解 4 h 后,吸取 1.0 mL 水解溶液,调 pH 值至 7.0,定容至 2.0 mL 容量瓶。利用三氟乙酸降解法制备果胶水解溶液,吸取 250 μL 水解溶液于 5 mL EP 管中,加入 250 μL 0.6 mol/L NaOH 溶液,500 μL 0.4 mol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP)-甲醇,70 °C 反应 1 h;冷却后加入 500 μL 0.3 mol/L HCl 溶液中和,再加入 1 mL 氯仿漩涡 1 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上清进行液相色谱检测。色谱条件:流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 值为 6.70) 和乙腈混合液 ($V_{\text{磷酸二氢钾溶液}}:V_{\text{乙腈}}=83:17$),柱温 30 °C,流速 1.0 mL/min,检测波长 250 nm,进样量 20 μL,色谱柱 Xtimate C18 4.6 mm×200 mm (5 μm)。

1.3.7 傅里叶变换红外光谱分析 取 1 mg 待测样品与适量的 KBr 混匀,研磨均匀制成薄片用于上机分析,扫描波数范围为 400~4 000 cm⁻¹,分辨率为 4 cm⁻¹。

1.3.8 裸仁南瓜果胶对体外发酵过程中肠道微生物群落结构的影响

1.3.8.1 样品采集及体外模拟发酵 采集 4 名近 3 个月内未摄食益生元或益生菌产品、未接受过抗生素治疗的健康个体的粪便样品。将收集的样品按质量比 1:10 与无菌生理盐水混匀制成粪便悬浮液备用,参照 Wu 等^[16]的方法进行体外模拟发酵,试验组(NUP)以裸仁南瓜果胶为碳源(质量浓度为 10 mg/mL),以商业果胶(AP)为阳性对照。将 1.0 mL 粪便悬浮液注入装有 9.0 mL 培养基的青霉素瓶中,并于厌氧工作站中发酵 48 h 后,以 1% 的接种量进行二次转接发酵,所有操作均在厌氧箱中完成,每组试验 3 个平行。取 0,48,96 h 发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清后所得菌体

沉淀用于 DNA 的提取和测序分析。

1.3.8.2 发酵样品的 DNA 提取及 16S rRNA 基因高通量测序分析 使用粪便基因组 DNA 提取试剂盒提取样品中的总 DNA。DNA 经质检测合格后,利用引物 338F (5'-ACTCCTACGGAG GCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTC TAAT-3') 对其 16S rRNA 基因 V3-V4 区进行 PCR 扩增,并利用 Illumina MiSeq 测序平台对扩增产物进行高通量测序分析^[17]。数据经质控和过滤后使用 vsearch 工具排除嵌合序列,以 97% 的相似性对剩余序列进行 OUT 聚类分析,利用 SILVA ribosomal RNA database (Sliva) 数据库对代表性 OUT 进行物种注释,使用 R 语言对数据进行可视化分析。

1.4 数据分析

利用 SPSS 26.0 对数据进行显著性和单因素方差(ANOVA)检验分析,用 Origin 2021 对数据进行可视化处理。

2 结果与分析

2.1 传统酸提法单因素实验结果分析

大量研究表明,料液比、pH 值、提取温度和时间是影响传统酸提法制备果胶过程中的几个关键因素^[9]。料液比过大增加提取液的黏度导致过滤不完全,从而使部分果胶产物流失;而料液比过小,提取液中果胶浓度较低会导致浓缩时间较长,从而破坏果胶成分^[7]。提取液中 H⁺浓度的增加可以促进原果胶的水解,而提取液中 H⁺的浓度和其 pH 值直接相关,pH 值越小 H⁺浓度越高。pH 值过低会导致水解得到的果胶被继续裂解,pH 值过高则会使原果胶水解不充分^[1]。温度升高有助于果胶的溶解,而过高温度会使已溶解的果胶继续降解^[3,18]。提取时间过短,籽用南瓜果胶溶解不够充分,提取时间过长则会导致部分溶解出来的果胶过度水解,使得果胶得率降低。本文首先对比研究了料液比、pH 值、提取温度和时间对传统酸提法对果胶得率的影响(图 1)。酸提取过程中,pH 值、提取温度和时间对 2 种籽用南瓜果胶得率的影响表现出一致性。当 pH 值为 1.5、提取温度为 80 °C、提取时间为 40 min 时,2 种籽用南瓜的果胶得率最高。料液比对 2 种籽用南瓜果胶得率的影响

略有差异,当料液比分别为1:30和1:35时,板栗南瓜和裸仁南瓜果胶得率分别达到最高。然而,考虑到料液比过大会造成部分果胶产物的流失、增

加浓缩时间,因此将2种籽用南瓜果胶在酸提取过程中的最终料液比定为1:30。

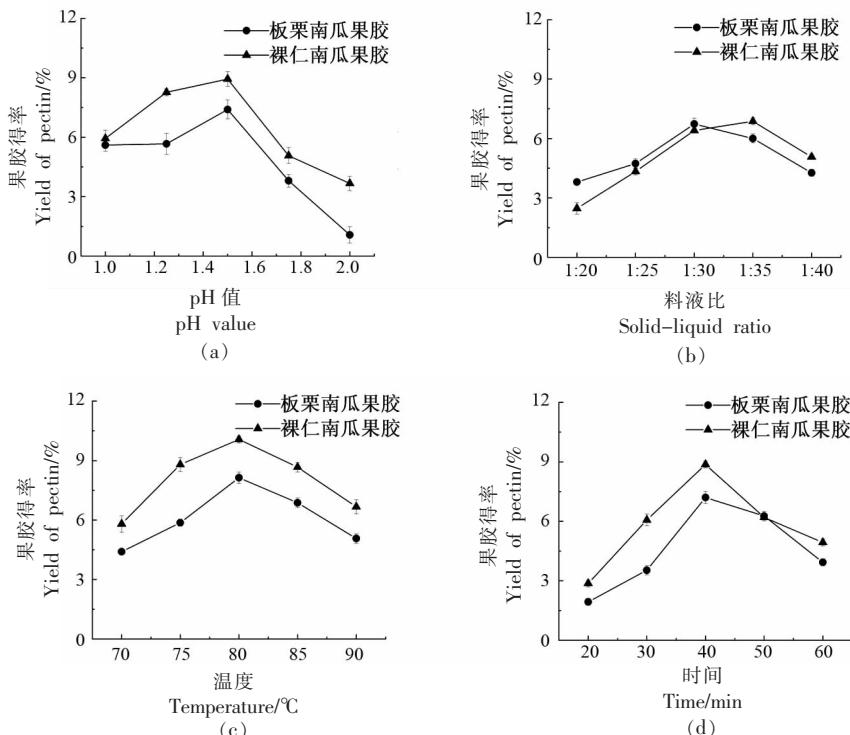


图1 不同酸提取条件对果胶得率的影响

Fig.1 Effects of different acid extraction conditions on the yield of pectin

2.2 超声辅助酸提法单因素实验结果分析

超声波能在液体传播过程中形成大量能量并释放出来产生“空化效应”,空化效应能够从内部增强细胞组织的能量,加速细胞壁的破碎和提取物中有效成分的溶解。研究表明,超声功率、时间和占空比是影响超声提取法制备果胶的主要因素^[10]。尽管随着超声功率的增大,超声波空化效应和对

细胞壁的破碎作用也随之增强,会使果胶的溶解速率有所提高,但功率过大也会导致空化泡个数和体积上升,反而使得空化效应降低、果胶过度溶解;而功率过低,则会使果胶提取不完全^[19]。超声时间短产生的能量较低,超声波空化效应不明显,对细胞壁的破碎力度小,会使果胶释放量不足;而时间过长则会促使果胶在高浓度的空化泡和高温

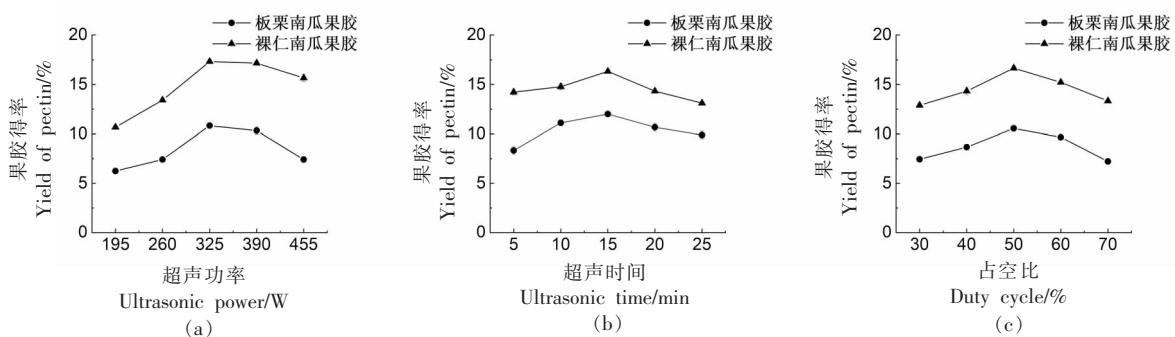


图2 不同因素对超声辅助酸提法对果胶得率的影响

Fig.2 Effects of different factors on the yield of pectin by ultrasound-assisted acid extraction

下降解^[11]。占空比较低会使有效提取时间缩短、空化效应减弱,细胞壁中的果胶流出量减少,然而占空比过大则会使超声过程中形成过多且过大的空化泡,空化泡之间相互影响反而会降低爆破率,导致果胶释放不完全^[20]。超声辅助提取过程中,超声功率、时间和占空比对 2 种籽用南瓜果胶得率的影响同样表现出一致性。当超声功率为 325 W、超声时间为 15 min、占空比为 50% 时,2 种籽用南瓜得率分别达到最高。

2.3 超声辅助酸提法制备籽用南瓜果胶工艺的响应面设计

利用 Design Expert software 10.0 对数据进行多元回归分析,籽用南瓜响应面设计结果见表 2,得到籽用南瓜果胶得率的预测回归模型: $Y_1 = 16.20 - 1.02A_1 - 0.04B_1 - 0.17C_1 - 1.52A_1^2 - 0.81B_1^2 - 0.68C_1^2 - 0.41A_1B_1 - 0.17A_1C_1 - 0.19B_1C_1$ [其中 $Y_1(\%)$ 为板栗南瓜果胶得率, A_1, B_1, C_1 分别为超声功率、超声时间、占空比]; $Y_2 = 9.32 - 0.64A_2 - 0.40B_2 - 0.01C_2 - 1.07A_2^2 - 0.79B_2^2 - 0.81C_2^2 - 0.41A_2B_2 - 0.17A_2C_2 - 0.19B_2C_2$ [其中 $Y_2(\%)$ 为裸仁南瓜果胶得率, A_2, B_2, C_2 分别为超声功率、超声时间、占空比]。方差分析

结果表明模型的回归方程具有极显著差异 ($P < 0.0001$)(表 3 和 4),二次回归模型计算确定系数 (R^2) 分别为 0.992, 0.983, 调整后的确定系数 (R^2_{Adj}) 分别为 0.981, 0.960 接近 R^2 ,表明模型拟合程度较好,可真实反映响应值与影响因素的变化情况^[21]。进一步分析发现,一次项系数和二次项系数显著影响果胶释放率($P < 0.05$),影响因素的强弱顺序依次是占空比、超声功率和超声时间。响应面分析发现占空比和超声功率是显著影响籽用南瓜果胶得率的 2 个主要因素,而两因素之间的作用对裸仁南瓜果胶得率的显著性影响明显高于板栗南瓜(图 3 和 4)。响应面法优化得到籽用南瓜果胶的最佳提取条件如表 5 所示,板栗南瓜果胶和裸仁南瓜果胶得率分别为 16.15% 和 9.18%。为检验模型的可靠性,分别选取超声功率 259 W、超声时间 19 min、占空比 49% 和超声功率 339 W、超声时间 9.50 min、占空比 45% 制备板栗南瓜果胶和裸仁南瓜果胶,果胶的得率分别达到 16.10% 和 9.14%,结果进一步验证了预测模型的高度准确性。

表 2 响应面方案及其结果

Table 2 Response surface scheme and results

编号	A_1 或 A_2 /W	B_1 或 B_2 /min	C_1 或 C_2 /%	板栗南 瓜果胶 得率/%	裸仁南 瓜果胶 得率/%	编号	A_1 或 A_2 /W	B_1 或 B_2 /min	C_1 或 C_2 /%	板栗南 瓜果胶 得率/%	裸仁南 瓜果胶 得率/%
1	195	15	70	15.22	8.27	10	325	15	50	16.15	9.29
2	325	15	50	16.17	9.12	11	455	25	50	13.12	5.87
3	325	25	70	14.58	7.23	12	325	5	70	14.98	8.13
4	325	25	30	14.75	7.70	13	455	15	70	13.30	6.65
5	455	5	50	12.42	7.77	14	325	15	50	16.21	9.60
6	195	15	30	14.65	7.90	15	325	15	50	16.38	9.36
7	195	5	50	15.09	8.24	16	325	5	30	14.49	7.84
8	325	15	50	16.07	9.22	17	455	15	30	12.81	6.96
9	195	25	50	14.83	7.98						

表 3 板栗南瓜多元回归模型的方差分析(ANOVA)及参数显著性检验

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) and parameter significance test of chestnut pumpkin multiple regression model

变量	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值
模型	24.740	9	2.750	91.470	< 0.0001
A_1	8.280	1	8.280	275.500	< 0.0001
B_1	0.010	1	0.011	0.370	0.5621
C_1	0.240	1	0.243	8.100	0.0248
A_1B_1	0.230	1	0.231	7.670	0.0277

(续表3)

变量	平方和	自由度	均方值	F值	P值
A_1C_1	0.001	1	0.001	0.045	0.8373
B_1C_1	0.107	1	0.107	3.570	0.1007
A_1^2	9.700	1	9.700	322.870	< 0.0001
B_1^2	2.780	1	2.780	92.480	< 0.0001
C_1^2	1.970	1	1.970	65.530	< 0.0001
残差	0.210	7	0.030		
纯误差	0.156	3	0.052	0.114	
总和	0.054	4	0.014		
R^2	0.992				
R^2_{Adj}	0.981				
CV/%	1.170				

表4 裸仁南瓜多元回归模型的方差分析(ANOVA)及参数显著性检验

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) and significance test of parameters of multiple regression model of naked kernel pumpkin

变量	平方和	自由度	均方值	F值	P值
模型	16.800	9	1.870	43.950	< 0.0001
A_2	3.300	1	3.300	77.690	< 0.0001
B_2	1.280	1	1.280	30.170	0.0009
C_2	0.001	1	0.001	0.033	0.8619
A_2B_2	0.672	1	0.672	15.820	0.0053
A_2C_2	0.114	1	0.114	2.670	0.1460
B_2C_2	0.143	1	0.143	3.360	0.1096
A_2^2	4.790	1	4.790	112.740	< 0.0001
B_2^2	2.600	1	2.600	61.220	0.0001
C_2^2	2.740	1	2.740	64.620	< 0.0001
残差	0.297	7	0.043		
纯误差	0.165	3	0.055	1.670	0.3095
总和	17.100	16			
R^2	0.983				
R^2_{Adj}	0.960				
CV/%	2.550				

表5 不同品种南瓜果胶超声波辅助酸提取法的果胶得率响应面预测最优值与实际最优值的比较

Table 5 Comparison of optimal response surface predicted value and actual value of pectin yield of different pumpkin varieties by ultrasonic assisted acid extraction method

提取条件	超声功率/W	超声时间/min	占空比%	果胶得率%
板栗南瓜模型最优	258.46	18.95	48.50	16.15
板栗南瓜实际最优	259.00	19.00	49.00	16.10
裸仁南瓜模型最优	339.03	9.45	45.51	9.18
裸仁南瓜实际最优	339.00	9.50	45.00	9.14

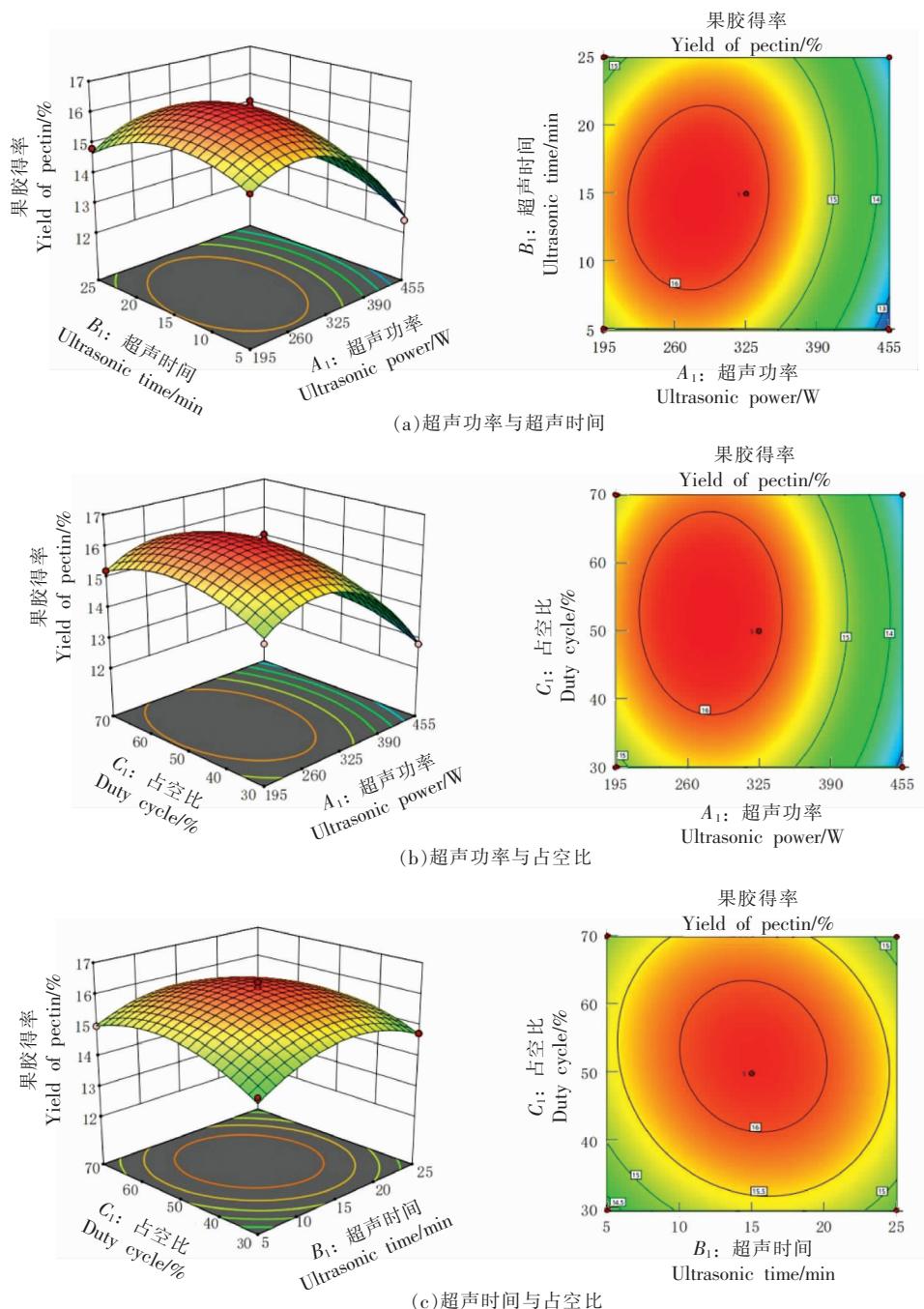


图3 超声功率、超声时间、占空比对板栗南瓜果胶得率影响的响应曲面和等高线图

Fig.3 Response surface and contour diagram of the influence of ultrasonic power, ultrasonic time and duty cycle on the yield of chestnut pumpkin pectin

2.4 粒用南瓜果胶的扫描电镜图像分析

从果胶的微观结构图可以看出,商业果胶AP结构较为致密,未经过超声处理的籽用南瓜果胶呈较大片状结构(图5a、5c),而经过超声辅助酸提法得到的果胶较为粗糙,呈现较小的球形结构,碎

片大小分布更均匀,颗粒间空隙的数量和大小增加(图5b、5d)。研究表明,超声处理对植物细胞壁的表面网状结构破碎会更加充分,能显著提高果胶的提取效率^[22]。

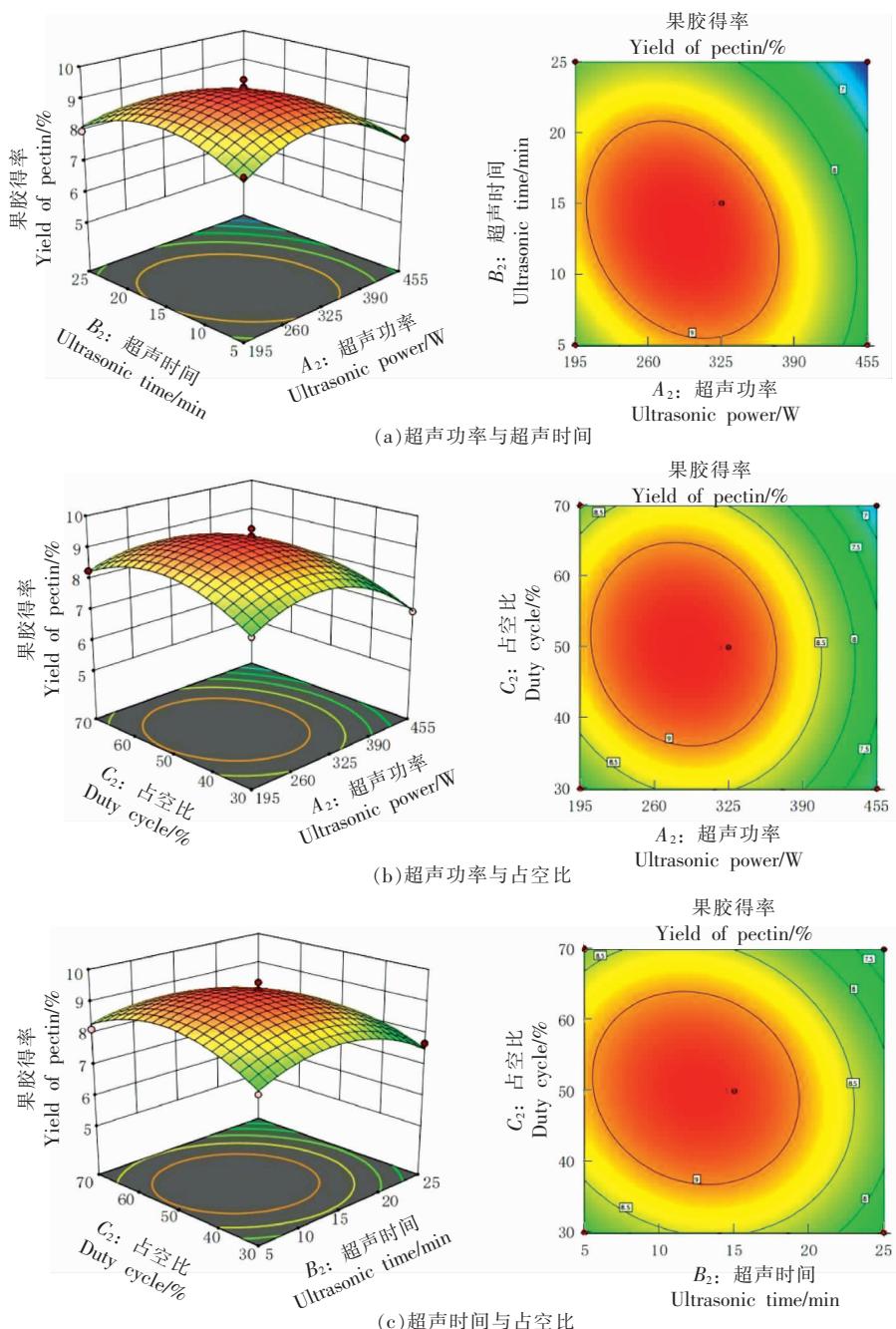


图 4 超声功率、超声时间、占空比对裸仁南瓜果胶得率影响的响应曲面和等高线图

Fig.4 Response surface and contour diagram of the influence of ultrasonic power, ultrasonic time and duty cycle on pectin yield of hull-less pumpkin

2.5 粟用南瓜果胶的理化性质

原料的种类、制备方法等因素将直接影响果胶的结构和理化性质,而溶解性、酯化度、分子质量及流变凝胶特性等决定了果胶的应用范围和经济价值^[18]。半乳糖醛酸含量是表征果胶纯度的主要指标^[17],研究发现超声辅助酸提法制备的裸仁

南瓜果胶半乳糖醛酸含量最高,且不同方法制备的裸仁南瓜果胶半乳糖醛酸含量均高于板栗南瓜(表6)。相比高酯果胶,低酯果胶因可以通过与Ca²⁺交联形成水凝胶而不需要添加高浓度的糖被广泛应用于低热量食品的开发^[4]。本文利用不同方法制备的同种籽用南瓜果胶酯化度间无明显差

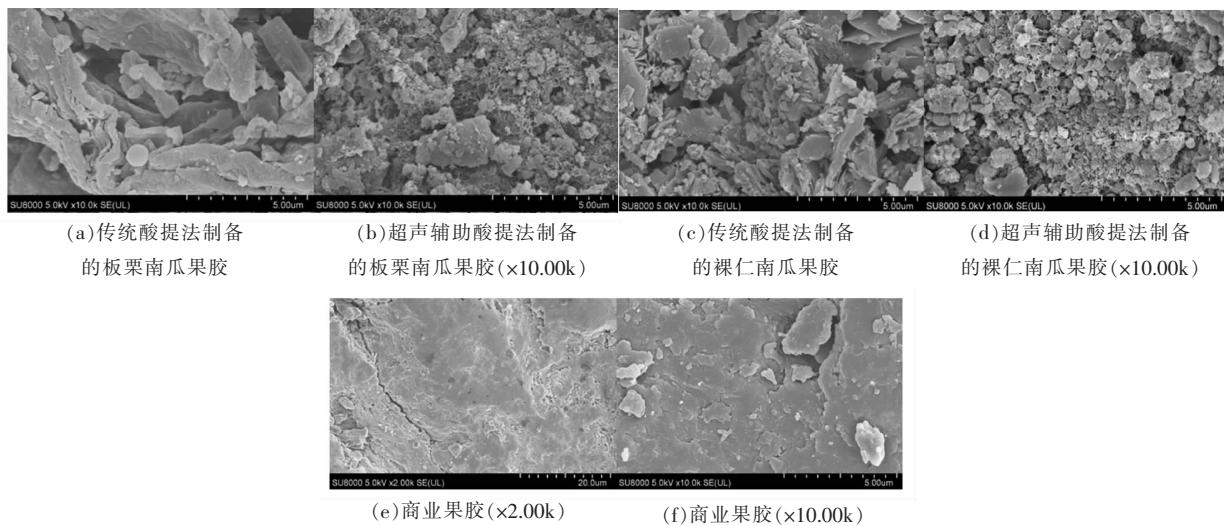


图5 不同来源和提取方法下得到果胶的扫描电镜图

Fig.5 SEM images of pectin obtained from different sources and extraction methods

异,均为低酯果胶,且裸仁南瓜果胶酯化度均显著低于板栗南瓜果胶。果胶作为增稠剂、胶凝剂和稳定剂依赖于其平均分子质量和分子质量分布,分子质量越大其胶凝强度越高,而分子质量较小的果胶则水溶性更好,在大肠中表现出更高的发酵

速率和产生更多的短链脂肪酸(SCFA)^[16]。本研究发现提取方法对裸仁南瓜果胶的分子质量影响较大,超声辅助酸提法制备的裸仁南瓜果胶分子质量最小,而传统酸提取的裸仁南瓜果胶分子质量最大。

表6 粒用南瓜果胶的理化指标及分子质量

Table 6 Physicochemical index and molecular weight of seed pumpkin pectin

	CUP	NUP	CCP	NCP	AP
总糖含量/%	69.20	86.20	33.80	37.40	49.90
半乳糖醛酸含量/%	28.10	55.30	24.80	39.90	50.80
蛋白质含量/%	0.60	0.40	0.30	0.20	0.10
酯化度/%	40.00	33.30	38.00	31.80	50.00
总酚含量/%	0	0	0	0	0
分子质量(Mw)/ku	793.08	743.62	760.75	920.02	—

注:CUP. 超声辅助酸提取板栗南瓜果胶;NUP. 超声辅助酸提取裸仁南瓜果胶;CCP. 传统酸提取板栗南瓜果胶;NCP. 传统酸提取裸仁南瓜果胶;AP. 商业果胶;—. 未检测。

2.6 超声辅助酸提法制备籽用南瓜果胶的单糖组成

果胶主要由长链半乳糖醛酸段和其它中性糖侧链组成,单糖组成能反映其结构特征差异,对其生物活性及性质有重要影响^[17]。本研究发现超声辅助酸提法制备的裸仁南瓜果胶的单糖含量均高于板栗南瓜果胶。超声辅助酸提法制备的裸仁南瓜果胶和板栗南瓜果胶的单糖组成种类基本相同(表7),主要由半乳糖醛酸(GalA)、半乳糖(Gal)、阿拉伯糖(Ara)、葡萄糖(Ghl)等单糖组成,木糖

(Xyl)、鼠李糖(Rha)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fur)等含量较低,通常存在于果胶的侧链中。

2.7 粒用南瓜果胶的红外光谱分析

使用傅里叶变换红外光谱测定不同方法制备的籽用南瓜果胶及商业果胶的特征吸收峰,发现5种果胶的傅里叶红外光谱变化基本一致,主要在3 420, 2 930, 1 600~1 750, 1 330, 1 010~1 150, 950, 830 cm⁻¹处有明显的特征吸收峰(图6)。3 420 cm⁻¹处的吸收峰主要由分子内O-H的拉伸振动引起;2 930 cm⁻¹处的吸收峰主要是C-H基的拉

伸振动,证明可能有CH、CH₂或CH₃的存在^[23]。在1 600 cm⁻¹和1 750 cm⁻¹处有2个较为强烈吸收峰,分别是游离的羧基与被酯化的羧基^[24],通过这2个吸收峰的面积之比来评价酯化程度,发现比值结果与滴定法所得的结果一致。在1 330 cm⁻¹附近的吸收峰是蛋白质的特征吸收峰^[25],图中此处的吸收峰并不明显,说明样品中蛋白质含量较低。1 010~1 150 cm⁻¹处的吸收峰说明有吡喃糖的存在,950 cm⁻¹处是D-吡喃葡萄糖基的吸收峰,在830 cm⁻¹处是甘露糖的吸收峰^[26]。红外光谱分析说明超声辅助酸提法没有改变果胶的吸收峰和主要官能团,而超声波提取法会降低果胶的酯化度。

2.8 裸仁南瓜果胶对体外发酵过程中肠道微生物群落结构的影响

研究证明,果胶在上消化道中不可被消化,而是经肠道微生物分泌的多种糖苷水解酶降解后被微生物利用^[16]。果胶许多与改善机体健康相关的特性都是基于它们在肠道中的可发酵性及其对肠道益生菌种群结构及代谢的影响^[27],低分子质量和高半乳糖醛酸含量的果胶在发酵过程中可以产生更多的SCFA等有益代谢物^[17]。本研究发现,超声辅助酸提法得到的裸仁南瓜果胶为低酯果胶且分子质量最小、半乳糖醛酸含量最高。因此,本文基于16S rRNA基因高通量测序技术,利用体外模拟发酵试验进一步探究了裸仁南瓜果胶(NUP)对健康个体粪便体外发酵过程中微生物群落结构组成的影响。

数据经质控、过滤后以97%的相似性进行OUT聚类分析,所有序列共被划分为362个OUT。物种注释结果发现,所有OUT分属于7个门,11个纲,86个属。多样性分析结果如表8所示,所有样本的覆盖率为99%,表明测序结果可以真实反映样品中微生物群落的情况,商业果胶(AP)与裸仁南瓜果胶(NUP)发酵过程中微生物的α-多样性无明显差异。在门水平上(图7a),AP与NUP发酵过程中主要以厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteriota)为主,疣微菌门(Verrucomicrobiota)、互养菌门(Synergistota)、梭杆菌门(Fusobacteriota)和脱硫杆菌门(Desulfobacteriota)则以小比例存在。随着发酵时间的变化,NUP

表7 超声辅助酸提法制备的裸仁南瓜果胶和板栗南瓜果胶的单糖组成

Table 7 Monosaccharide composition of CUP and NUP

成分名称	板栗南瓜果胶 (CUP)中含量/%	裸仁南瓜果胶 (NUP)中含量/%
甘露糖(Man)	0.113	0.144
核糖(Rib)	0.159	0.185
鼠李糖(Rha)	0.281	0.392
葡萄糖醛酸(GlA)	0.127	0.115
半乳糖醛酸(GalA)	1.024	1.327
葡萄糖(Ghl)	5.754	7.090
半乳糖(Gal)	0.900	1.289
木糖(Xyl)	0.005	0.015
阿拉伯糖(Ara)	0.427	0.848
岩藻糖(Fur)	0.187	0.209

注:CUP. 超声辅助酸提法制备的板栗南瓜果胶;NUP. 超声辅助酸提法制备的裸仁南瓜果胶。

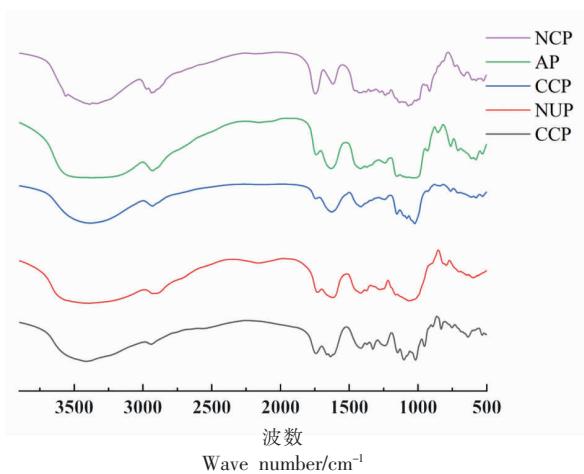


图6 不同来源及提取方法的果胶红外光谱图

Fig.6 FTIR analysis of pectin from different sources and extraction methods

发酵过程中变形菌门的相对丰度相比AP显著降低。在属水平上(图7b),发酵初期粪便中的微生物主要以巨单胞菌属(*Megamonas*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、柯林斯菌属(*Collinsella*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、罗氏氏菌属(*Roseburia*)、直肠真杆菌属(*Agathobacter*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、大肠埃希氏菌-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、经粘液真杆菌属(*Blautia*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和霍

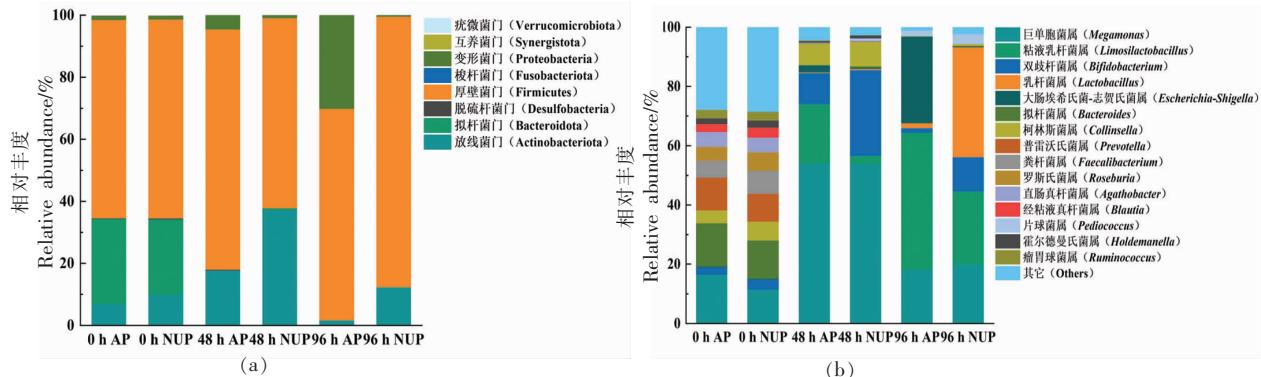
尔德曼氏菌属(*Holdemaniella*)等为主。随着发酵的不断进行,巨单胞菌属、粘液乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、柯林斯菌属和大肠埃希氏菌-志贺氏菌属成为了 AP

和 NUP 发酵过程中的优势菌群;拟杆菌属、普雷沃氏菌属、粪杆菌属、罗斯氏菌属、直肠真杆菌属、经粘液真杆菌属、瘤胃球菌属和霍尔德曼氏菌属的相对丰度则逐渐降低,96 h 后的发酵液中几乎检测不到这些菌属的存在。

表 8 α -多样性分析
Table 8 α -Diversity analysis

发酵时间	α -多样性指数					
	辛普森指数	香农指数	贝格-派克指数	Chao1	测序覆盖率指数	Ace
0 h AP	0.9845	6.8321	0.0429	309.4000	0.9973	300.0047
0 h NUP	0.9845	6.8336	0.0521	307.1053	0.9971	300.3131
48 h AP	0.9335	4.6269	0.1249	155.8846	0.9976	160.8458
48 h NUP	0.9257	4.5542	0.1304	213.9354	0.9950	224.1326
96 h AP	0.8344	3.4226	0.2834	115.0000	0.9976	116.8457
96 h NUP	0.9192	4.3570	0.1679	88.0000	0.9987	88.2953

注:AP. 商业果胶;NUP. 超声辅助酸提法制备的裸仁南瓜果胶。



注:0 h AP. 商业果胶发酵 0 h;0 h NUP. 裸仁南瓜果胶发酵 0 h;48 h AP. 商业果胶发酵 48 h;48 h NUP. 裸仁南瓜果胶发酵 48 h;96 h AP. 商业果胶发酵 96 h;96 h NUP. 裸仁南瓜果胶发酵 96 h。

图 7 细菌群落在门(a)和属(b)水平上的相对丰度

Fig.7 Relative abundance of bacterial communities at the phylum (a) and genus (b) levels

大量研究已经报道了柑橘皮、苹果皮、柠檬皮等来源的果胶促进肠道有益菌增殖和 SCFA 产生等对肠道菌群的有益影响,然而研究也表明不同来源和结构的果胶对肠道菌群的益生元效应存在种属特异性,如:秋葵果胶可以显著促进拟杆菌属和巨单胞菌属的增殖^[28],柑橘皮果胶可以促进发酵过程中粪杆菌属、罗斯氏菌属、*Lachnoclostridium* 属和毛螺菌属(*Lachnospira*)丰度的增加^[29]。大量报道称果胶在发酵过程中能被拟杆菌属分解利用并促进其增殖^[30],然而本研究发现 AP 和 NUP 发酵过程中拟杆菌属的相对丰度均随着发酵时间

迅速降低。NUP 和 AP 均能促进发酵过程中巨单胞菌属、双歧杆菌属、粘液乳杆菌属、乳杆菌属、柯林斯菌属和片球菌属的增殖,而在连续转接发酵过程中只有粘液乳杆菌属、乳杆菌属和片球菌属的相对丰度持续增加,而巨单胞菌属、双歧杆菌属和柯林斯菌属的相对丰度则呈先增加后降低的趋势,尤其是柯林斯菌属在发酵 96 h 后已几乎检测不到。与 NUP 相比,AP 对 *Lachnoclostridium* 属的增殖具有特异性,而 NUP 对促进发酵过程中双歧杆菌属、乳杆菌属和片球菌属相对丰度的增加则更具优势。

巨单胞菌属、粪杆菌属、瘤胃球菌属、经粘液真杆菌属、普雷沃氏菌属和直肠真杆菌属是人类肠道的核心菌群，在碳水化合物代谢、短链脂肪酸(SCFA)产生方面发挥着重要作用。然而，不少研究表明粪杆菌属、瘤胃球菌属、普雷沃氏菌属和直肠真杆菌属中的部分物种在肠道内的丰度与结肠癌(IBD)、肠应激综合征(IBS)和便秘、克罗恩病等疾病的发病率呈正相关关系^[31]，本研究的结果发现在NUP和AP发酵过程中这些菌属的相对丰度均显著降低。巨单胞菌属和经粘液真杆菌属被证明可以分解多糖类物质并通过竞争能量摄入抑制有害菌的生长，与IBD、IBS等疾病的发病呈负相关关系^[32]，而本研究发现NUP和AP发酵过程中经粘液真杆菌属的相对丰度随着发酵时间的增加逐渐降低，而巨单胞菌属的相对丰度显著增加，发酵48 h后AP和NUP中巨单胞菌属的相对丰度分别增加了37.6%、42.4%。乳杆菌属和双歧杆菌属是肠道中的益生菌，已被证明在降解果胶片段的同时能大量产生SCFA和二氧化碳等代谢产物，可以改变肠道环境并抑制非优势或有害微生物的增殖，常被用作大肠杆菌感染的辅助疗法^[33]。NUP转接发酵后，乳杆菌属和双歧杆菌属的相对丰度分别达到了37%和11.28%，分别是AP发酵过程中乳杆菌属和双歧杆菌属相对丰度的22倍和7.3倍。大肠埃希氏菌-志贺氏菌属是一种常存在于人体肠道内条件致病菌，与IBD、IBS和便秘等肠道疾病的发生显著相关，AP发酵过程中大肠埃希氏菌-志贺氏菌属的相对丰度呈上升趋势，NUP发酵过程中大肠埃希氏菌-志贺氏菌属的生长受到明显抑制，而这则可能与NUP显著促进发酵过程中乳杆菌属和双歧杆菌属等有益菌的增殖有关。

3 结论

作为一种天然生物可降解多糖，果胶由于其良好的水溶性、凝胶性、生物黏附性及耐酸和耐高温特性及其在促进胃肠蠕动和营养吸收、预防和改善腹泻、便秘等炎症性肠病中的有效性，已被视为新型益生元广泛应用于食品加工和药物靶向递送。南瓜皮瓢中果胶含量丰富，我国籽用南瓜资源丰富，而其加工方式单一、产业链短造成了资源浪

费和环境污染。因此，开发和利用籽用南瓜中的果胶对于提升籽用南瓜附加值、促进农民增收具有重要价值。本文采用响应面法优化了超声辅助酸提法制备籽用南瓜果胶的工艺，板栗南瓜和裸仁南瓜果胶得率分别高达16.10%和9.14%，相较于传统酸提法分别提高了89.04%和20.31%。目前商业低酯果胶主要由柑橘皮、苹果渣中提取的高酯果胶经酸或碱脱酯处理所得，不仅生产成本较高，且易导致果胶降解、影响其性能。本研究制备的籽用南瓜果胶酯化度(31.8%~40%)显著低于商品果胶(50%)；且相比商业果胶，裸仁南瓜果胶在促进体外发酵过程中乳杆菌属和双歧杆菌属等有益菌增殖方面更具优势，可成为低酯果胶的良好来源。本研究的结果不仅为促进我国籽用南瓜的高值化利用提供了技术支撑，也为基于籽用南瓜果胶的肠道益生菌靶向调控和精准营养设计提供了数据支撑。

【致谢】

本文受到第七师-石河子大学科技创新专项(QS2023014)；石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZK202352)；石河子大学青年创新人才计划(CXPY202309)的支持。

参 考 文 献

- [1] ADETUNJI L R, ADEKUNLE A, ORSAT V, et al. Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 62: 239–250.
- [2] BANERJEE J, SINGH R, VIJAYARAGHAVAN R, et al. Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals[J]. Food Chemistry, 2017, 225: 10–22.
- [3] CHEN J, CHENG H, ZHI Z, et al. Extraction temperature is a decisive factor for the properties of pectin[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 1–12.
- [4] KPODO F M, AGBENORHEVI J K, ALBA K, et al. Structure-function relationships in pectin emulsification[J]. Food Biophysics, 2018, 13(1): 71–79.
- [5] SCHMIDT U, SCHÜTZ L, SCHUCHMANN H. Interfacial and emulsifying properties of citrus pectin: Interaction of pH, ionic strength and degree of es-

- terification[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 62: 288–298.
- [6] WUSIGALE, LIANG L, LUO Y. Casein and pectin: Structures, interactions, and applications[J]. Trends in Food Science Technology, 2020, 97: 391–403.
- [7] CHAHARBAGHI E, KHODAIYAN F, HOSSEINI S S. Optimization of pectin extraction from pistachio green hull as a new source[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 173: 107–113.
- [8] 单杨, 丁胜华, 苏东林, 等. 柑橘副产物资源综合利用现状及发展趋势[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(4): 1–13.
- SHAN Y, DING S H, SU D L, et al. Status quo of comprehensive utilization and development trend of citrus by-product resources[J]. J Food Sci Technol, 2021, 39(4): 1–13.
- [9] SIMPSON R, MORRIS G A. The anti-diabetic potential of polysaccharides extracted from members of the cucurbit family: A review[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2014, 3(2): 106–114.
- [10] ZOU X Q, XIAO J X, CHI J W, et al. Physico-chemical properties and prebiotic activities of polysaccharides from *Zizyphus jujube* based on different extraction techniques[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 223 (PA): 663–672.
- [11] BAYAR N, BOUALLEGUE T, ACHOUR M, et al. Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties [J]. Food Chemistry, 2017, 235: 275–282.
- [12] VÁZQUEZ V C, ROJAS V G M, RAMÍREZ A C, et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method [J]. Food Chemistry, 2015, 176: 480–486.
- [13] LI F, WEI Y L, LIANG L, et al. A novel low-molecular-mass pumpkin polysaccharide: Structural characterization, antioxidant activity, and hypoglycemic potential[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 251: 117090.
- [14] 翁霞, 辛广, 李云霞. 蔗酮比色法测定马铃薯淀粉总糖的条件研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34 (17): 86–88.
- WENG X, XIN G, LI Y X. Study on determination conditions of total sugar from potato starch by anthrone colorimetry[J]. Food Research and Development, 2013, 34(17): 86–88.
- [15] YANG Y S, WANG Z M, HU D, et al. Efficient extraction of pectin from sisal waste by combined enzymatic and ultrasonic process[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 79: 189–196.
- [16] WU D T, HE Y, YUAN Q, et al. Effects of molecular weight and degree of branching on microbial fermentation characteristics of okra pectic–polysaccharide and its selective impact on gut microbial composition [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 132: 107897.
- [17] 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.
- [18] LI W, LI J, WANG J, et al. Effects of various degrees of esterification on antioxidant and immunostimulatory activities of okra pectic–polysaccharides[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1025897.
- [19] LIEW S Q, TEOH W H, YUSOFF R, et al. Comparisons of process intensifying methods in the extraction of pectin from pomelo peel[J]. Chemical Engineering and Processing –Process Intensification, 2019, 143: 107586–107599.
- [20] SENGAR S A, RAWSON A, MUTHIAH M, et al. Comparison of different ultrasound assisted extraction techniques for pectin from tomato processing waste [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 61: 104812.
- [21] SUNDARRAJ A A, THOTTIAM VASUDEVAN R, SRIRAMULU G. Optimized extraction and characterization of pectin from jackfruit (*Artocarpus integer*) wastes using response surface methodology[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 698–703.
- [22] SHEN Y, LIANG J, GUO Y L, et al. Ultrafiltration isolation, structures and anti-tumor potentials of two arabinose– and galactose–rich pectins from leaves of *Aralia elata* [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 255: 117326.
- [23] WANG C, LI J, CAO Y, et al. Extraction and characterization of pectic polysaccharides from *Chorospondias axillaris* peels: Comparison of hot water

- and ultrasound-assisted extraction methods[J]. Food Chemistry, 2022, 40: 134156.
- [24] YANG N X, WANG D P, GENG Y Y, et al. Structure, physicochemical characterization and properties of pectic polysaccharide from *Premma puberula* pamp [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 128: 107550.
- [25] CONCHA OLMOS J, ZÚÑIGA HANSEN M E. Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for functional carbohydrates[J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 192: 29–36.
- [26] PHAVIPHU K, KAMLAJ L, PAIBOOLYA G, et al. Characterization of pectin extracted from banana peels of different varieties [J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(3): 623–629.
- [27] ZHAO Y Y, WANG D, WANG P, et al. Microbiota response of pectin determined by its structural characteristics during *in vitro* fecal fermentation: A comparative study of various pectin sources[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 150: 109730.
- [28] TAO D W, RUI X N, YOU R G, et al. *In vitro* digestion and fecal fermentation behaviors of a pectic polysaccharide from okra (*Abelmoschus esculentus*) and its impacts on human gut microbiota [J].
- Food Hydrocolloids, 2020, 114: 106577.
- [29] WU J X, SHEN S H, GAO Q, et al. RG-I domain matters to the *in vitro* fermentation characteristics of pectic polysaccharides recycled from citrus canning processing water[J]. Foods, 2023, 12(5): 943–943.
- [30] YAO T, DEEMER D G, CHEN M H, et al. Differences in fine arabinoxylan structures govern microbial selection and competition among human gut microbiota [J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 316: 121039.
- [31] CLAUDIA H, ENCARNA V, GUILLAUME S, et al. Gut microbiota composition in long-remission ulcerative colitis is close to a healthy gut microbiota [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2023, 29 (9): 1362–1369.
- [32] LIU C, DU P, CHENG Y L, et al. Study on fecal fermentation characteristics of aloe polysaccharides *in vitro* and their predictive modeling[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 256: 117571.
- [33] FIJAN S, ŠULC D, STEYER A. Study of the *in vitro* antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2018, 15(7): 1539–1539.

Extraction of Seed Pumpkin Pectin and Its Effect on Intestinal Microbial during *in Vitro* Fermentation

CHEN Simeng¹, WANG Nanbin^{1,2}, DU Mingxuan¹, LU Wenting¹, SUN Hailong^{1*}, NI Yongqing¹

(¹School of Food Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang

²Institute of Agricultural Products Processing, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi 832000, Xinjiang)

Abstract In this study, the ultrasound-assisted acid extraction for seed pumpkin pectin preparation was optimized and the structure of seed pumpkin pectin was characterized. And then the effect of hull-less pumpkin pectin on changes of the intestinal microbial community structure during fermentation was investigated by simulated fermentation *in vitro*. The results showed that ultrasonic assisted acid extraction could significantly improve the preparation efficiency of seed pumpkin pectin, and the pectin yield of chestnut pumpkin and hull-less pumpkin was 16.10% and 9.14%, respectively. The methyl-esterification reaction showed that all of the two kinds of pectin were low-methoxyl, and the esterification degree of them was between 31.8% and 40%. The molecular weight of hull-less pumpkin pectin was the lowest, and the contents of total sugar (86.2%) and galacturonic acid (55.3%) were much higher than those of chestnut pumpkin pectin. Compared with commercial pectin, hull-less pumpkin pectin promoted the proliferation of beneficial bacteria such as genus of *Limosilactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Megamonas*, and reduced the relative abundance of *Es-*

cherichia-Shigella and other opportunistic pathogens during simulated fermentation *in vitro*. The results of this study not only provided technical support for the efficient preparation of seed pumpkin pectin, but also provided data support for the application of seed pumpkin pectin, as a new prebiotics in functional foods, medicine and other fields.

Keywords seed pumpkin; pectin; ultrasound-assisted acid extraction; *in vitro* fermentation; gut microbiota