

改性葡萄皮渣膳食纤维体外发酵特性研究

令 博¹, 蔡昱杰¹, 吴洪斌², 赵国华^{1,3}, 明 建^{1,3,*}

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2.新疆农垦科学院农产品加工研究所, 新疆 石河子 832000;

3.重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715)

摘 要: 采用人粪便提取液为接种物, 通过体外发酵技术研究不同改性处理的葡萄皮渣膳食纤维在模拟人体大肠环境条件下的发酵过程, 测定不同发酵时间的 pH 值和短链脂肪酸(SCFA)的含量。结果表明: 葡萄皮渣膳食纤维是一种理想的可被大肠微生物所利用的碳源, 能够在体外模拟环境下发酵产生乙酸、丙酸、丁酸和异丁酸等短链脂肪酸; 葡萄皮渣膳食纤维经过不同改性处理后对其发酵液 pH 值的变化无明显影响, 但对发酵液中短链脂肪酸的总量和各组分含量均有一定影响。

关键词: 葡萄皮渣; 改性膳食纤维; 体外发酵; 短链脂肪酸

in vitro Fermentation Characteristics of Modified Dietary Fiber from Grape Pomace

LING Bo¹, CAI Yu-jie¹, WU Hong-bin², ZHAO Guo-hua^{1,3}, MING Jian^{1,3,*}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Institute of Agro-food Science and Technology,

Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China; 3. Chongqing Special Food Programme and

Technology Research Center, Chongqing 400715, China)

Abstract: Human excrement extract was used as the inoculum to modify grape pomace dietary fiber in a mimic human intestinal environment by *in vitro* fermentation. The pH and the content of short-chain fatty acids (SCFAs) in modified dietary fiber obtained after different times of fermentation were determined. The results indicated that grape pomace dietary fiber was one of ideal carbon sources that could be exploited by intestinal microflora. SCFAs including acetic acid, propionic acid, butyrate acid and isobutyrate acid were produced during fermentation *in vitro*. Meanwhile, no obvious pH change in the fermentation broth of modified grape pomace dietary fiber was observed. However, the contents of total SCFAs and each SCFA were affected due to fermentation treatment.

Key words: grape pomace; modified dietary fiber; *in vitro* fermentation; short-chain fatty acids

中图分类号: R972.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)19-0147-05

葡萄是仅次于柑橘之后的世界第二大水果, 据联合国粮食与农业组织(FAO)统计 2004 年全球葡萄总产量约 6500 万 t, 其中约 71% 用来酿酒, 产生的副产物皮渣占到总加工量的 20%^[1], 长期以来被用作饲料、肥料甚至填埋处理, 利用率很低, 给生态环境也造成了一定破坏^[2]。研究显示葡萄皮渣中的总膳食纤维可达 75%, 并且含有大量多酚类物质^[3-4], 是一种具有抗氧化特性的膳食纤维(antioxidant dietary fiber, ADF)^[5-6], 因此对葡萄皮渣进行深度开发研究具有重要的经济价值和社会意义。

膳食纤维(dietary fiber, DF)作为人类第七大营养

素, 在维持膳食平衡方面发挥着重要作用而倍受关注^[7]。研究显示膳食纤维可被大肠有益菌群部分或全部发酵, 产生大量短链脂肪酸(SCFA), 起到调节肠道 pH 值, 改善有益菌繁殖环境的作用^[8]。以动物粪便提取液为接种物进行体外发酵是预测 DF 营养价值的一种简捷、经济的方法^[9]。本实验以健康人的粪便提取液为接种物, 通过体外发酵技术研究葡萄皮渣 DF 的体外发酵特性, 并比较不同改性处理对 DF 发酵特性的影响, 旨在了解葡萄皮渣 DF 的改性效果及被肠道微生物利用的情况, 为提高酿酒葡萄皮渣的综合利用, 改善 DF 的功能特性提供参考。

收稿日期: 2011-03-31

基金项目: 新疆生产建设兵团工业科技攻关项目(2009GG39); 新疆生产建设兵团博士基金项目(2009JC12)

作者简介: 令博(1986 —), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品化学与营养学。E-mail: 61b61b@163.com

* 通信作者: 明建(1972 —), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品化学与营养学。E-mail: mingjian1972@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酿酒葡萄皮渣由新疆中基西域葡萄酒公司提供。

乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、2-乙基丁酸(色谱纯) 美国 Sigma 公司; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 均为分析纯。

1.2 仪器与设备

GC2010 型气相色谱 日本岛津公司; TGL-16G 型离心机 上海安亭科学仪器厂; JA2003 型电子天平 上海精天电子仪器有限公司; HH·B11·600-S 型电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂; HH-6 型数显恒温水浴锅 金坛市富华仪器有限公司; PB-10 型酸度计 德国 Sartorius 公司; 其他均为实验室常用仪器。

1.3 方法

1.3.1 葡萄皮渣 DF 的制备

采用 Sanchez 等^[10]的方法将葡萄皮渣(去除籽粒)清洗干净后冷冻干燥, 然后经涡轮自冷式粉碎机粉碎后过 100 目筛收集粉末, 即为葡萄皮渣 DF 粗粉碎样品, 密封储存于阴凉干燥处。

1.3.2 葡萄皮渣 DF 的改性处理

超微粉碎处理: 取粗粉碎样品经超微粉碎机在 -10°C 进行超微粉碎 15min, 作为超微粉碎 DF 样品备用。

挤压膨化复合超微粉碎处理: 取粗粉碎样品使用双螺杆挤压膨化机进行挤压膨化, 挤压膨化条件: 原料水分含量 60%、螺杆转速 130r/min, 挤压温度 140°C 、样品挤压处理后再采用上述超微粉碎条件进行处理, 所得样品即为膨化超微粉碎 DF 样品。

1.3.3 体外发酵培养液的制备

体外发酵培养液按文献[11]所述方法进行配制, 其配方见表 1。使用前在 1L 微量培养液中加入 10mL 痕量缓冲液, 混匀备用。

表 1 体外发酵培养液的组成

Table 1 Medium composition for grape pomace dietary fiber fermentation

痕量缓冲液	质量浓度/(mg/L)	微量培养液	质量浓度/(g/L)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3680	NaHCO_3	9.240
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1159	Na_2HPO_4	7.125
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	440	NaCl	0.470
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	120	KCl	0.450
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	98	尿素	0.400
NiCl_2	100	CaCl_2	0.108
$\text{Mo}_7(\text{NH}_4)_6\text{O}_{24}$	17	Na_2SO_4 任何结晶水	0.100
		MgCl_2	0.100

1.3.4 肠道菌群发酵液的制备

参考 Shimotoyodome 等^[12]的方法, 取 2000mL 的塑料烧杯一个, 于 $40\sim 50^\circ\text{C}$ 的水浴中保持温热, 然后将健康年轻男性(要求粪便捐献者的日常摄食要正常; 没有消化系统疾病; 至少有 3 个月没有服用或注射过抗生素)的新鲜粪便直接收集到烧杯中, 立即充 CO_2 气体并密封, 称质量。按粪便和培养液 1:5(m/V)的比例向烧杯中加入 37°C 的体外发酵培养液, 期间不断向烧杯中吹 CO_2 气体以保持厌氧环境。然后用玻璃棒充分搅拌均匀, 用 4 层医用纱布过滤。所得滤液就是肠道菌群发酵液, 置于 37°C 的恒温环境中备用。

1.3.5 底物发酵^[13]

发酵过程在 50mL 的离心管中完成。实验分 4 组, 第 1 组不加葡萄皮渣为对照组, 其他 3 组为实验组, 分别加入经粗粉碎、超微粉碎和膨化超微粉碎的葡萄皮渣 DF100mg(精确至 0.001g)作为发酵底物, 然后向所有离心管中加入 10mL 接种体(肠道菌群发酵液)并吹入 CO_2 后密封, 再将离心管放在充满 CO_2 气体的密闭容器中, 置于 37°C 恒温培养箱中分别培养 0、6、10、24、48h, 发酵结束后立即收集各阶段发酵液置于 -20°C 冰箱中待分析。

1.3.6 发酵终产物分析

1.3.6.1 体外发酵样品的制备^[14]

各发酵阶段结束后直接用酸度计测定发酵液 pH 值, 然后吸取 1mL 发酵液置于 5mL 的离心管中, 并加入 2mL 的 2-乙基丁酸内标溶液(内标最终浓度在 1mmol/L 左右), 然后在 5000r/min 离心 20min, 上清液置于 -20°C 的冰箱中用于气相色谱分析。

1.3.6.2 气相色谱法测定短链脂肪酸^[15]

标准曲线的制作: 分别配制不同浓度的乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、2-乙基丁酸(内标)标准溶液后, 用带有火焰离子化检测器和自动进样器的岛津 GC2010 仪器进行气相色谱分析。最后以峰面积为纵坐标, 以浓度为横坐标制作标准曲线。并采用相同方法测定体外发酵液中的短链脂肪酸含量。

色谱条件: 色谱柱: DB-FFAP 石英毛细管柱(30m \times 0.53mm, 0.50 μm); 测定采用程序升温, 载气为氮气, 流速 14.4mL/min; 初温 100°C , 保持 0.5min, 然后以 $8^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 180°C , 保持 1min, 最后以 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 200°C , 保持 5min; FID 和进样口温度分别为 240°C 和 200°C ; 氢气、空气和氮气的流速分别为 30、300、20mL/min; 进样量为 1 μL ; 每个样品运行时间为 17.5min。数据处理在 HP ChemStation 气相色谱工作站中进行。

1.3.7 数据处理

数据采用 Excel 2000 统计分析, 重复 3 次, 结果用“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 改性对葡萄皮渣 DF 体外发酵液 pH 值的影响

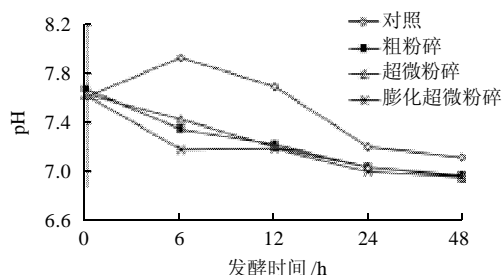


图1 改性对葡萄皮渣 DE 体外发酵液 pH 值的影响

Fig.1 Effect of modification on pH of in fermentation broth of grape pomace dietary fiber

由于膳食纤维具有发酵性能,可以被肠道中的微生物利用而转化为 SCFA,使肠道得以营养,同时引起肠道内容物 pH 值下降,因此可以通过测定 pH 值来预测 SCFA 的生成量^[16]。由图 1 可知,改性处理对发酵液 pH 值的变化无明显影响。在 0~48h 内,随发酵时间延长,对照组和实验组 pH 值都呈下降趋势,其中实验组下降趋势较为明显,在发酵 0~24h 内下降速度较快,24h 后下降速度减缓,可推测实验组发酵 24h 脂肪酸生成量达到最大值;而对照组 pH 值在发酵 0~6h 内略升高,6~24h 间明显下降,24h 后 pH 值下降速度趋缓,且在整个发酵过程中 pH 值始终高于实验组,这可能与其脂肪酸的生成量较少有关。

2.2 改性对葡萄皮渣 DF 体外发酵液中短链脂肪酸含量的影响

2.2.1 对乙酸含量的影响

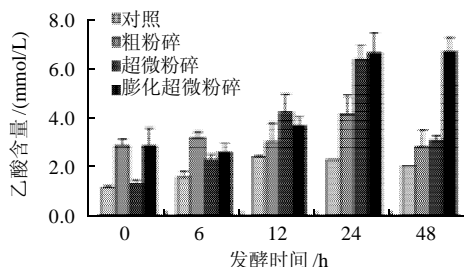


图2 改性对葡萄皮渣 DF 体外发酵液中乙酸含量的影响

Fig.2 Effect of modification on the content of acetic acid in fermentation broth of grape pomace dietary fiber

由图 2 可知,在整个发酵过程中乙酸浓度较高,各实验组乙酸浓度随发酵时间延长呈上升趋势,在发酵 24h 时膨化超微粉碎组为 6.7mmol/L,超微粉碎组为

6.4mmol/L,粗粉碎组为 4.2mmol/L 均达到了最大值,发酵 24h 时膨化超微粉碎组乙酸浓度逐渐稳定,而粗粉碎组和超微粉碎组乙酸浓度在发酵 24~48h 内为逐渐降低的过程,且最终浓度远小于膨化超微粉碎组。整个发酵过程中对照组的乙酸浓度也表现为先增加后减小的趋势,在发酵 12h 时达到峰值,但浓度远小于实验组。可推测改性处理样品发酵 24h 能够明显提高发酵液中乙酸的浓度。

2.2.2 对丙酸含量的影响

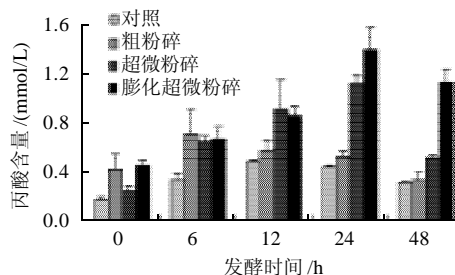


图3 改性对葡萄皮渣 DF 体外发酵液中丙酸含量的影响

Fig.3 Effect of modification on the content of propionic acid in fermentation broth of grape pomace dietary fiber

由图 3 可知,在整个发酵过程中各实验组丙酸浓度随发酵时间延长呈先增加后减小的趋势,改性处理后超微粉碎组和膨化超微粉碎组丙酸浓度在发酵 24h 时达到最高,分别为 1.12mmol/L 和 1.41mmol/L,粗粉碎组丙酸浓度较低,在发酵 6h 时出现峰值,仅为 0.7mmol/L。在发酵 24~48h 时间段内,各实验组丙酸浓度逐渐降低,其中膨化超微粉碎组浓度显著高于粗粉碎组和超微粉碎组;对照组丙酸浓度变化趋势在整个发酵过程中与实验组大致相同,但浓度始终很低,在发酵 12h 时出现峰值。可推测,在以丙酸为目的产物的发酵中,改性处理样品能够在发酵 24h 后使丙酸浓度有一定程度提高,且膨化超微处理效果优于超微粉碎处理。

2.2.3 对丁酸含量的影响

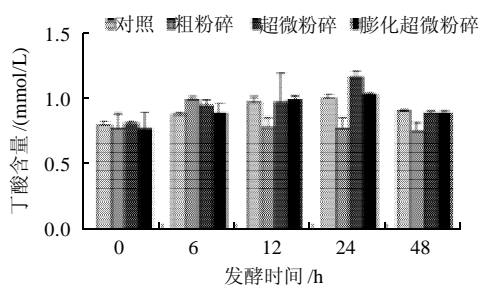


图4 改性对葡萄皮渣 DF 体外发酵液中丁酸含量的影响

Fig.4 Effect of modification on the content of butyric acid in fermentation broth of grape pomace dietary fiber

由图4可知,整个发酵过程中各组丁酸浓度变化不明显,其中粗粉碎组在发酵6h后丁酸浓度出现峰值,之后逐渐减小并趋于稳定。其余各组在发酵24h后丁酸浓度达最大值,其中超微粉碎组丁酸浓度最高,对照组和膨化超微粉碎组浓度相当,在发酵48h后各组丁酸浓度降至最低;总体来看,在发酵24h后改性处理组较对照组和粗粉碎组发酵液中丁酸浓度有一定增加,但变化不明显。

2.2.4 对异丁酸含量的影响

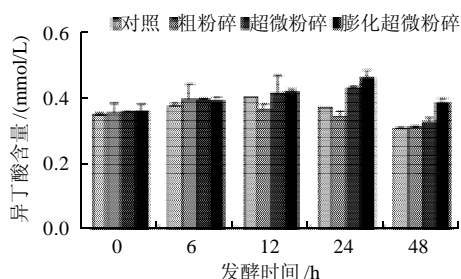


图5 改性对葡萄皮渣DF体外发酵液中异丁酸含量的影响

Fig.5 Effect of modification on the content of isobutyric acid in fermentation broth of grape pomace dietary fiber

由图5可知,在发酵0~12h时间段内对照组和实验组异丁酸的浓度相当,且变化不显著,其中在发酵6h时粗粉碎组出现浓度峰值,对照组在发酵12h出现浓度峰值;发酵24h超微粉碎组和膨化超微粉碎组出现浓度峰值,浓度略高于对照组和粗粉碎组;总体来看,改性处理对发酵液中异丁酸浓度影响不大,并且在发酵过程中异丁酸浓度始终很低,可推测异丁酸可能不是葡萄皮渣DF发酵的主要产物。

2.2.5 对戊酸含量的影响

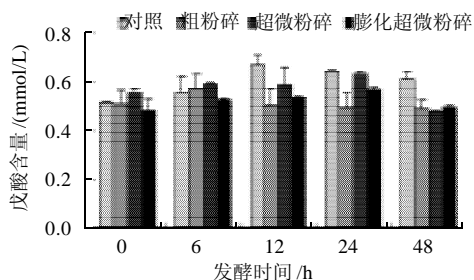


图6 改性对葡萄皮渣DF体外发酵液中戊酸含量的影响

Fig.6 Effect of modification on the content of valeric acid in fermentation broth of grape pomace dietary fiber

由图6可知,在整个发酵过程中戊酸的浓度变化趋势各异,对照组和实验组浓度峰值分别出现在不同时间段且对照组戊酸浓度偏高,实验组中超微粉碎改性样品对戊酸浓度有一定提高,其余各组浓度无明显变化;总

体来看,整个发酵过程中戊酸浓度较低,且在发酵12h之后对照组戊酸浓度始终大于实验组,因此推断戊酸不是葡萄皮渣DF发酵的主要产物,改性处理后发酵液中戊酸浓度没有明显变化。

2.2.6 对异戊酸含量的影响

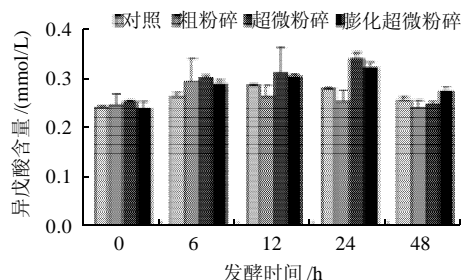


图7 改性对葡萄皮渣DF体外发酵液中异戊酸含量的影响

Fig.7 Effect of modification on the content of isovaleric acid in fermentation broth of grape pomace dietary fiber

由图7可知,在整个发酵过程中各组异戊酸浓度大致呈先增加后减小的趋势,但异戊酸的浓度均很低,发酵6h时粗粉碎组浓度达最大值,发酵24h时超微粉碎组和膨化超微粉碎组浓度达最大值,其中超微粉碎组与膨化超微粉碎组明显高于其余两组,发酵48h各组浓度相当;说明改性处理样品发酵24h对发酵液中异戊酸浓度有一定提高,但由于整个发酵过程中异戊酸浓度很低,因此异戊酸可能不是葡萄皮渣DF发酵的主要产物。

3 结论

3.1 葡萄皮渣膳食纤维和改性处理后的葡萄皮渣DF在体外均具有良好的发酵性能,其发酵产物主要有乙酸、丙酸、丁酸。其中乙酸浓度最高,丙酸和丁酸次之,其他短链脂肪酸浓度很低;整体来看随发酵时间延长,发酵液中短链脂肪酸浓度呈上升趋势,其中在12~24h之间浓度最大,24~48h内浓度逐渐下降至最低,且pH值的变化趋势与短链脂肪酸浓度变化趋势大致呈线性关系。

3.2 葡萄皮渣DF经不同改性处理后,对其体外发酵水平有一定影响。总体来看,改性处理后的葡萄皮渣膳食纤维比原膳食纤维发酵水平更高,并且样品经不同改性处理后发酵液中短链脂肪酸变化趋势略有不同,其中乙酸和丙酸浓度发酵24h有明显提高,而丁酸浓度无明显变化,且膨化超微粉碎处理效果略高于超微粉碎效果。其余几种脂肪酸不仅生成量很少,且改性处理对其浓度变化的影响也不明显。

3.3 葡萄皮渣DF经超微粉碎和挤压膨化改性处理后其体外发酵特性发生改变,主要原因可能是由于DF经改

性处理后, 平均粒径、颗粒比表面积、空隙率和组成等发生变化, 能够显著完善膳食纤维的物化性质, 更好发挥其生理功能^[17-19], 进而影响在动物体内的发酵特性。

综上所述, 葡萄皮渣 DF 可以对肠道 SCFA 的代谢产生一定影响, 通过对 DF 进行一定的改性加工还可以进一步提高其生理功能, 进而达到调控肠道微生物菌群的作用, 对预防和治疗肠道疾病的发生起到积极效果, 显示了其在保健功能上的可开发性。

参考文献:

- [1] MARIA A, HARRIS P, SERKOS A H, et al. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification byproducts: evaluation of the antioxidant activities of their extracts[J]. Food Research International, 2010, 43: 805-813.
- [2] BAUMGARTEL T, KLUTH H, RODEHUTSCORD M, et al. A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace[J]. Small Ruminant Research, 2007, 67: 302-306.
- [3] 吴丹, 陈健初. 葡萄多酚的应用研究进展[J]. 食品科技, 2003(5): 57-59.
- [4] ANTONIA L, JAIME C. Dietary fiber content and antioxidant activity of Manto negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem[J]. Food Chemistry, 2007, 101: 659-666.
- [5] SHRIKHANDE A J. Wine byproducts with health benefits[J]. Food Research International, 2000, 33: 469-474.
- [6] SAURA C F. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(10): 4303-4306.
- [7] 谢碧霞, 李安平, 丁之恩, 等. 膳食纤维[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 1-4.
- [8] 赵贵兴, 陈霞, 赵春杰. 膳食纤维的功能及其在食品中的应用[J]. 农产品加工: 学刊, 2008, 42(7): 30-33.
- [9] MAURICIO R M, MOULD F L, DHANOA M S, et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation[J]. Animal Feed Science and Technology, 1999, 79: 321-330.
- [10] SANCHEZ A I, JIMENEZ E A, SAURA C F, et al. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the prevention of lipid oxidation in minced fish: evaluation by different methodologies[J]. Food Chemistry, 2007, 101: 372-378.
- [11] 何李. 加工处理对膳食纤维理化特性及发酵特性的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [12] SHIMOTOYODOME A, YAJIMA N, SUZUKI J, et al. Effects of coingestion of different fibers on fecal excretion and cecal fermentation in rats[J]. Nutrition Research, 2005, 25: 1085-1096.
- [13] BARRY J L, HOEBLER C, MACFARLANE G T, et al. Estimation of the ferment ability of dietary fiber *in vitro*: a European interlaboratory study[J]. The British Journal of Nutrition, 1995, 74(3): 303-322.
- [14] VINCENT L, EVA A, RENATO A. Measurement of fermentation products and substrate disappearance during incubation of dietary fiber sources with human faecal flora[J]. Lebensmittel Wissenschaft und Technologies, 1998, 31(5): 473-479.
- [15] ZHAO Guohua, NYMAN M, JONSSON J A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography[J]. Biomedical Chromatography, 2006, 20(8): 674-682.
- [16] 房翠兰, 赵国华. 浸泡、蒸煮和发酵对大豆中膳食纤维理化性质及发酵特性的影响[J]. 粮油加工, 2008(2): 120-123.
- [17] 朱国君, 赵国华. 膳食纤维改性研究进展[J]. 粮食与油脂, 2008(4): 40-42.
- [18] CHAU C F, WEN Yuling, WANG Yiting. Effects of micronisation on the characteristics and physicochemical properties of insoluble fibers[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 86(14): 2380-2386.
- [19] THAVA V, JIANG Gaosong, JUDY Y, et al. Dietary fiber profile of barley flour as affected by extrusion cooking[J]. Food Chemistry, 2002, 77(1): 35-40.