

果胶改善辣椒素对肠道发酵环境的影响

吕 娇, 苏昕峰, 方国珊, 刘 雄*

(西南大学食品科学学院, 重庆 400715)

摘 要: 以薛荔果胶为原料, 探讨果胶对辣椒素引起的肠道内环境不适的改善作用。取健康大鼠盲肠内容物制作发酵液, 按发酵液体积添加辣椒素、果胶, 分别配制空白、5%果胶、5%果胶+0.1%辣椒素、0.1%辣椒素4种发酵液, 37℃条件下恒温摇床培养。结果表明: 辣椒素明显降低盲肠内容物发酵液中乳酸杆菌、双歧杆菌数量, 增加大肠杆菌数量, 降低肠道短链脂肪酸浓度, 升高游离氨含量和pH值。果胶明显增加盲肠内容物发酵液中乳酸杆菌、双歧杆菌数量, 减少大肠杆菌数量, 升高肠道短链脂肪酸浓度, 降低游离氨含量和pH值。因此果胶可以缓解辣椒素引起的肠道环境恶化。

关键词: 辣椒素; 果胶; 短链脂肪酸; 微生物

Pectin Ameliorates the Impact of Capsaicin on Intestinal Fermentation Environment

LÜ Jiao, SU Xin-feng, FANG Guo-shan, LIU Xiong*

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The chili pepper has a wide range of consumers; however, the consumption of chili will cause a discomfort reaction of intestinal environment with a potential hazard. As an intestinal prebiotic factor, pectin is beneficial to the improvement of the intestinal environment. In this study, *Ficus pumila* Linn pectin was used as the raw material to explore the improvement of pectin on capsaicin-induced intestinal discomfort reaction. Supernatants from cecal contents of healthy rats were fermented on a thermostat shaker at 37 °C along with blank, 5% pectin, 5% pectin + 0.1% capsaicin and 0.1% capsaicin, respectively. Based on these experiments, we found that capsaicin significantly decreased the amount of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, increased *Enterobacter*, also reduced the concentration of intestinal short-chain fatty acids, and increased free ammonia concentration and pH. The pectin resulted in a significant increase in the amount of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and an obvious decrease in *Enterobacter*; moreover the concentration of intestinal short-chain fatty acids was increased and free ammonia concentration and pH were decreased. These results show that *Ficus pumila* Linn pectin could ameliorate capsaicin-induced deterioration of the intestinal environment.

Key words: capsaicin; pectin; short-chain fatty acids; microbe

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)17-0273-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201317058

辣椒作为世界上重要而普遍的香辛料, 在世界许多国家大量种植和利用。我国是辣椒生产大国, 又是辣椒食用大国, 食辣人群高达40%, 主要集中在湖南、湖北、江西、四川、重庆、云南、贵州等省份。然而, 许多食用辣椒的消费者会出现肠道不适, 尤其是初次食用或过量食用的消费者, 会出现腹痛、拉肚、肛部灼烧感等症状。Hammer等^[1]报道给健康人灌胃5、10、50μg/mL辣椒素, 10、50μg/mL两组产生腹部痉挛和疼痛现象。

Johnson^[2]研究发现对断奶大鼠喂食8周5%的辣椒素会引起胃肠道角质化和侵蚀斑。在对大鼠连续30d饲喂80mg/kg的辣椒素后大鼠小肠、大肠内出现肿瘤。有研究发现^[3]饲喂辣椒素的大鼠大肠末端和末端小肠、肝脏及大肠内容物中会产生类似饲喂1,2-二甲基胂的现象, 释放有毒物质。本研究室前期研究表明, 辣椒素能明显影响肠道发酵环境, 抑制肠道乳酸菌、双歧杆菌生长, 降低肠道短链脂肪酸产生^[4]。大量研究表明, 肠道健康的改善与增

收稿日期: 2012-08-07

基金项目: 教育部留学归国人员科研启动基金项目(教外司留[2010]174); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2009B004);

国家自然科学基金项目(2011GA31071529)

作者简介: 吕娇(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: lvjiaojoy@163.com

*通信作者: 刘雄(1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为碳水化合物功能与利用, 食品营养学。E-mail: liuxiong848@hotmail.com

加短链脂肪酸(SCFA)产量、降低肠道pH值、降低肠道中氨和苯酚浓度、降低肠道中次级胆汁酸分泌、粪水中细胞毒素的量、减少排空时间和改善细菌活性等方面相关^[5]。那么如何改善辣椒素引起的肠道发酵环境的不适呢?

目前膳食纤维被公认为人体第七大营养素,是一种不能被人体直接消化吸收的多糖类大分子物质,其中果胶又属于膳食纤维中水溶性膳食纤维的一种。大量的研究表明,果胶作为肠道益生因子,有利于肠道中乳酸菌、双歧杆菌的生长,产生丰富的SCFA改善肠道pH值,促进肠细胞生长,抑制结肠癌等^[6-9]。以前的研究结果暗示果胶可能具有改善辣椒素引起的肠道环境的不适症状。薛荔作为一种野生常绿攀援植物常见于我国各省,适应力强,易于种植。并且瘦果籽中含有丰富的果胶,研究表明薛荔籽果胶酯化度为38.57%,属于酸性低酯果胶^[10]。因此,本实验选择薛荔籽果胶作为添加物,考察果胶添加是否会改善辣椒素引起的肠道不适。

由于体外发酵作为动物实验的补充有很多优点:它可以跟踪发酵过程中物质的变化及研究发酵产物的形成过程,弥补了体内发酵不能实现动力学检测的缺点;它还可以实现标准化操作,实验的重复性强。因此,本实验拟采用体外发酵实验观察果胶与辣椒素对肠道发酵环境的影响,以期对辣椒的科学消费提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

薛荔果胶由实验室研究自制。天然辣椒素(辣椒碱含量为95.7%)由河南倍特生物科技有限公司提供。

氯化钠、氢氧化钠、硫酸、亚硝基铁氰化钠、苯酚、次氯酸钠、冰乙酸、吐温-80、氯化铵、吡啶均为分析纯 成都市科龙化工试剂厂;乙酸(色谱级) 英国Johnson Matthey公司;巴豆酸、丙酸、丁酸、异丁酸梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;EMB培养基(生化试剂) 北京奥博星生物技术有限公司;BS培养基(生化试剂)、LBS培养基(生化试剂) 青岛海博生物技术有限公司;D-半乳糖醛酸(分析纯) 北京索莱宝科技有限公司;高纯二氧化碳气体(99.999%) 重庆朝阳气体有限公司。

1.2 仪器与设备

Sepectrumlab 22可见分光光度计 上海棱光技术有限公司;WH-1微型旋涡混合仪 上海沪西分析仪器有限公司;JA2003A电子天平 上海精天电子仪器有限公司;DHG-9070电热恒温鼓风干燥箱 上海齐欣科学仪器有限公司;PHS-3C精密酸度计 上海大普仪器有限公司;HH-6数显恒温水浴锅 金坛市富华仪器有限公司;5810型台式离心机 德国Eppendorf公司;低温离心机 美国Sigma公司;ARI14紫外分光光度计 上

海爱朗仪器有限公司;GC-2010气相色谱 日本岛津公司;KQ-100超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;SW-CJ-1FD洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;HH-B11电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂;BC-J160S二氧化碳细胞培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;ES-315 高压蒸汽灭菌锅 日本Kagoshima Seisakusyo公司;ZHWY-100C恒温培养振荡器 上海智诚分析仪器制造有限公司;Stabilwax-DA毛细色谱柱 美国Restek公司。

1.3 方法

1.3.1 果胶提取与测定

1.3.1.1 果胶提取^[11]

称量薛荔籽,在水浴锅中提取(料液比1:10(m/V),60℃搅拌2h)。方法1:真空浓缩滤液→真空冷冻干燥→粉碎→成品薛荔籽胶。方法2:AB-8型大孔树脂脱色过滤→真空旋转浓缩至1/3→用95%乙醇沉析,静置过夜→用65%乙醇洗涤2次→真空冷冻干燥→粉碎→成品薛荔籽果胶。

1.3.1.2 果胶纯度测定^[12]

标准曲线绘制:精确称取D-半乳糖醛酸标准品10mg,用蒸馏水定容于100mL容量瓶中,制成100μg/mL的标准溶液。移取上述标准液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL置于25mL具塞刻度试管中,再加入蒸馏水稀释至1mL,即得一组质量浓度为0、20、40、60、80、100μg/mL的半乳糖醛酸标准液。然后小心沿管壁分别加入6.0mL浓硫酸,在沸水浴中加热20min,取出冷却至室温,再分别加入0.2mL 1.5g/L吡啶-乙醇溶液,摇匀。在暗处放置30min,取出测定反应液在波长526nm处的吸光度,用蒸馏水作空白实验,制作标准曲线: $y = 0.0116x - 0.002 (R^2 = 0.9981)$ 。

称取10mg实验室自制薛荔籽果胶,溶解后定容至100mL容量瓶中,吸取1mL果胶溶液至25mL比色管作上述处理,根据标准曲线计算D-半乳糖含量。

$$\text{果胶纯度}/\% = \frac{m}{m_1} \times 100$$

式中: m 为D-半乳糖醛酸质量/μg; m_1 为薛荔籽果胶干质量/μg。

1.3.2 发酵液制备

1.3.2.1 发酵液配比

通过查阅大量相关文献及本研究室前期的实验表明,对采用不同剂量灌喂1个月后的大鼠进行详细的检测后,发现添加5%果胶就能明显增加大鼠盲肠内容物中SCFA总量,而添加0.1%辣椒素的大鼠其血脂变化及对肠道的伤害作用最为明显。发酵液各物质添加量见表1。

表1 发酵液配比
Table 1 Inoculum size and fermentation media

瓶号	组别	基础培养液/mL	接种量/mL	果胶量/g	辣椒素量/mg
1	CN	空白	45	5	
2	P	5%果胶	45	5	0.025
3	C	0.1%辣椒素	45	5	50
4	P+C	5%果胶+0.1%辣椒素	45	5	0.025 50

1.3.2.2 体外发酵步骤

1) 无菌条件下取出6只雄性大鼠的盲肠内容物, 装入预先灭菌的50mL带盖离心管中, 称质量, 鼓入高纯CO₂气体5min, 盖上盖子待用。2) 用9倍(*V/m*)无菌生理盐水稀释盲肠内容物, 涡旋振荡5min混匀, 4层纱布过滤。3) 取12支100mL高温灭菌后的高温瓶, 每支高温瓶中加入5mL盲肠内容物滤液和45mL灭菌基础培养液(牛肉膏3g、蛋白胨10g、NaCl 5g, pH7.0~7.2, 定容至1000mL), 将高温瓶分为4组(每组3支), 按实验要求分别加入果胶或辣椒素(表1), 鼓入高纯CO₂气体20min, 盖好橡胶塞后蜡封。在60~80r/min转速的恒温培养振荡器上37℃摇床培养10h, 终止发酵, 检测发酵液中pH值、游离氨、SCFA及微生物。

1.3.3 生化指标检测

1.3.3.1 pH值测定

发酵液样品5mL于4000r/min条件下离心5min, 吸取上清液2mL, 用精密酸度计测上清液pH值。

1.3.3.2 发酵液游离氨测定

无氨水制备^[13]: 在1000mL蒸馏水中, 加入0.10mL硫酸($\rho=1.84\text{g/mL}$)。并在全玻璃蒸馏器中重蒸馏, 弃去前50mL馏出液, 然后将馏出液收集在带有玻璃塞的玻璃瓶中。

发酵液样品于4000r/min条件下离心5min, 吸取上清液1mL, 依次加入1mL含有0.001mol/L亚硝基铁氰化钠的0.5mol/L苯酚溶液和1mL含有0.03mol/L次氯酸钠的0.625mol/L氢氧化钠溶液, 60℃保温5min, 625nm波长处测吸光度^[14]。

配制5mmol/L氯化铵溶液, 分别移取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL溶液于4mL比色皿中, 无氨水稀释至1.0mL, 按上述步骤测吸光度, 绘制标准曲线: $y = 0.108x + 0.008 (R^2 = 0.9991)$ 。

1.3.3.3 发酵液SCFA测定

盲肠内容物发酵液样品在4000r/min转速条件下离心15min, 吸取上清液转移至超纯水预处理过的10mL离心管中, 10000r/min继续离心15min, 1mL一次性注射器吸取上清液1mL, 0.22 μm 滤膜过滤至2mL进样小瓶中待测^[15]。

气相色谱条件: 进样量1 μL ; 进样口温度220℃; 柱流量0.95mL/min, 柱温90℃、平衡时间0.5min, 5℃/min升温至150℃, 保留时间7min; 检测器温度230℃; 氢气流量40mL/min, 空气流量400mL/min, 尾吹流量40mL/min^[16]。

1.3.3.4 发酵液微生物测定

取发酵液1mL, 加入9mL无菌生理盐水, 依次10倍稀释至10⁻⁷。选择10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷3个稀释度, 用于大肠杆菌、双歧杆菌和乳酸杆菌的培养计数, 接种量为100 μL 。大肠杆菌培养选用EMB培养基, 37℃条件下恒温培养箱中培养48h计数。双歧杆菌和乳酸杆菌分别选用BS培养基和LBS培养基, 将培养皿蜡封后, 在37℃条件下二氧化碳细胞培养箱中厌氧培养72h计数。结果以lg(CFU/mL)表示。

1.4 统计分析

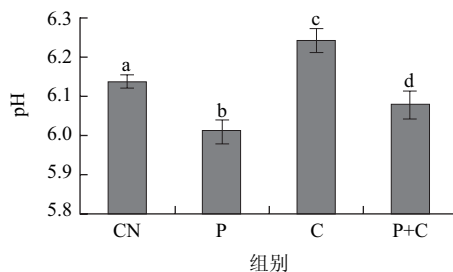
实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间显著性差异采用SPSS分析, $P < 0.05$ 表示有显著差异。

2 结果与分析

2.1 薛荔籽果胶纯度

称取10mg薛荔籽果胶溶于100mL蒸馏水中, 取1mL果胶溶液, 按照1.3.1.2节方法测得吸光度为0.11, 对应D-半乳糖醛酸含量为9.655 $\mu\text{g/mL}$ 。果胶纯度为96.55%。

2.2 发酵液pH值变化趋势



不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

图1 不同剂量组对发酵液pH值的影响

Fig.1 Effects of pectin and/or capsaicin on pH in fermented products

pH值以盲肠内容物量计算。由图1可知, 在各发酵液的初始pH值为5.9的条件下, 结果显示, 相比空白组, 添加5%果胶的发酵液(P组)pH值显著降低, 而添加0.1%辣椒素的发酵液(C组)pH值则显著升高($P < 0.05$)。添加5%果胶+0.1%辣椒素的发酵液(P+C组)pH值相比0.1%辣椒素组(C组)显著降低。发酵液中pH值的变化主要是由发酵产生的有机酸和游离氨所影响, pH值的降低或升高表明有机酸含量或游离氨浓度可能发生了显著的变化。

2.3 发酵液游离氨变化趋势

由图2可知, 相对于空白组, 添加5%果胶(P组)能显著降低发酵液中游离氨浓度, 而添加0.1%辣椒素(C组)则明显增加了发酵液游离氨浓度($P < 0.05$)。相对于辣椒素(P组), 添加5%果胶+0.1%辣椒素(P+C组)则明显降低了辣椒素引起的游离氨浓度的升高($P < 0.05$)。这与发酵液中pH值的升高和降低相对应。

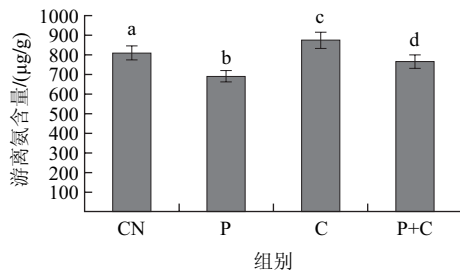


图2 不同剂量组对发酵液游离氨含量的影响

Fig.2 Effects of pectin and/or capsaicin on free ammonia in fermented products

2.4 发酵液短链脂肪酸变化趋势

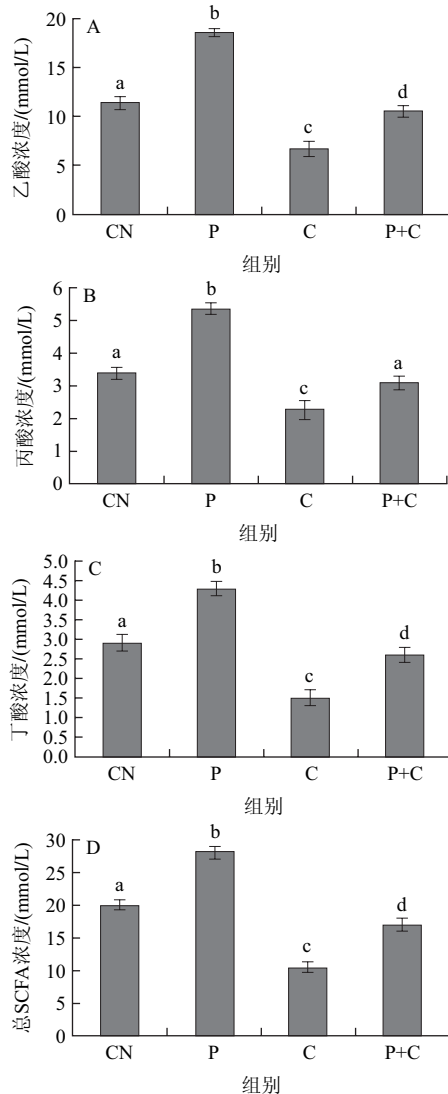


图3 不同剂量组对发酵液有机酸和短链脂肪酸浓度的影响

Fig.3 Effect of pectin and/or capsaicin on acetic acid, propanic acid, butyric acid and SCFA

果胶对辣椒素引起的盲肠有机酸发酵产物减少的改善效果见图3A~C及图3D,可以看出:与对照组相比,添加5%果胶(P组)的盲肠内容物发酵液中乙酸、丁酸、丙酸和总短链脂肪酸浓度均显著升高($P<0.05$),而添加

0.1%辣椒素组(C组)则显著降低了盲肠内容物发酵液中乙酸、丁酸、丙酸和总短链脂肪酸浓度($P<0.05$)。添加5%果胶+0.1%辣椒素的发酵液(P+C组)的短链脂肪酸含量相比0.1%辣椒素组(C组)显著升高($P<0.05$)。此结果表明,辣椒素抑制了肠道益生菌对碳水化合物的发酵,减少有机酸的产生,而添加果胶能够有效改善辣椒素对肠道益生菌发酵所产生的不利影响。

2.5 发酵液微生物数量变化趋势

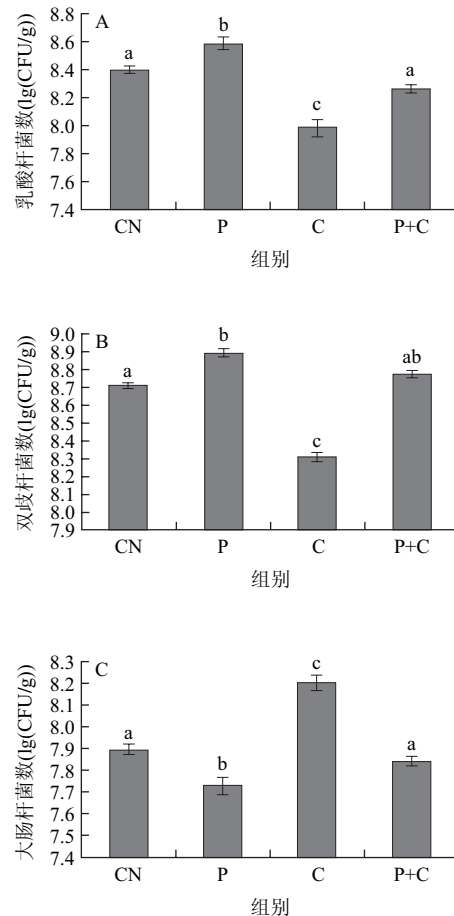


图4 果胶和辣椒素对盲肠内容物发酵液中微生物组成的影响

Fig.4 Effects of pectin and/or capsaicin on *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterobacter* in fermented products

由图4可知,相对于对照组,添加5%果胶组(P组)能显著增加发酵液中乳酸杆菌和双歧杆菌的数量,减少大肠杆菌的数量,而添加0.1%辣椒素(C组)则减少了发酵液中乳酸杆菌和双歧杆菌的数量,增加大肠杆菌的数量($P<0.05$)。添加5%果胶+0.1%辣椒素发酵液(P+C组)的乳酸杆菌和双歧杆菌的数量相比0.1%辣椒素(C组)显著升高,而大肠杆菌数量则显著降低($P<0.05$)。此结果表明,辣椒素抑制了肠道益生菌的生长,同时使得有害菌的数量增加,而添加果胶能够有效改善辣椒素对肠道微生物菌群所产生的有害作用。

3 讨论与结论

随着人们健康意识的增强,以及营养科学和医药科学的发展,有关食用辣椒对人体健康的利与弊的话题,成为人们关注的一个焦点。国内外研究表明辣椒素药理作用广泛,在镇痛方面有重要作用,同时具有防治心血管疾病、呼吸道疾病的作用,还能用于减肥^[17]、治疗风湿性关节炎、银屑病等^[18]。然而,许多食用辣椒的消费者会出现肠道不适,尤其是初次食用或过量食用的消费者,会出现腹痛、拉肚、肛部灼烧感等症状。多数研究表明灌喂辣椒素对人体肠道有不良影响,且与食用剂量有正相关关系,辣椒素主要通过通过对肠道的化学刺激起作用^[19-20]。也有研究发现辣椒素可以刺激肠绒毛增生,促进小肠对营养物质的吸收,从而对肠道健康也起到积极的改善作用^[21-22]。然而,肠道菌群对肠道健康至关重要。本研究结果表明,辣椒素可以使盲肠内容物发酵液中有益生菌(乳酸杆菌、双歧杆菌)数量减少,有害菌(大肠杆菌)数量增加,导致肠道短链脂肪酸浓度降低,游离氨浓度升高,pH值升高。这可能是辣椒素会引起消费者出现肠道不适症状的原因。而相同剂量辣椒素的盲肠内容物发酵液中,添加果胶可以使发酵液pH值和游离氨浓度降低、短链脂肪酸浓度升高,说明果胶体外发酵对辣椒素引起的盲肠内容物发酵环境恶化有一定的改善作用。其原因可能是果胶体外发酵产生大量短链脂肪酸,使发酵液中pH值降低,有益菌(乳酸杆菌、双歧杆菌)数量增加、有害菌(大肠杆菌)数量减少,游离氨浓度升高。因此,添加果胶可以缓解由辣椒素引起的肠道环境恶化。

参考文献:

- [1] HAMMER J, HAMMER H F, EHERER A J, et al. Intraluminal capsaicin does not affect fluid and electrolyte absorption in the human jejunum but does cause pain[J]. Gut, 1998, 43: 252-255.
- [2] JOHNSON W J. Final report on the safety assessment of capsicum annum extract, capsicum annum fruit extract, capsicum annum resin, capsicum annum fruit powder, capsicum frutescens fruit, capsicum frutescens fruit extract, capsicum frutescens resin, and capsaicin[J]. Inter J Toxic, 2007, 26: 3-106.
- [3] NALINI N, SABITHA K, VISWANATHAN P, et al. Influence of spices on the bacterial (enzyme) activity in experimental colon cancer[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1998, 62(1): 15-24.
- [4] 任文瑾, 吕娇, 苏昕峰, 等. 辣椒素对肠道菌体外发酵的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 58-61.
- [5] BUGAUT M, BENTEJAC M. Biological effects of short-chain fatty acids in nonruminant mammals[J]. Annu Rev Nutr, 1993, 13: 217-241.
- [6] GREGER J L. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability[J]. J Nutr, 1999, 129(Suppl 7): 1434-1435.
- [7] EL-ZOGHBI M, SITOHY M Z. Mineral absorption by albino rats as affected by some types of dietary pectin with different degrees of esterification[J]. Nahrung, 2001, 45(1): 114-117.
- [8] COUDRAY C, BELLANGER J, CASTIGLIA-DELAUVAUD C. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men[J]. Eur J Clin Nutr, 1997, 51: 375-380.
- [9] OHTA A, OHTSUKIM, BABA S. Effects of fructo-oligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron deficient anemic rats[J]. J Nutr Sci Vitam, 1995, 41(3): 281-291.
- [10] FAJARDO O, NAIM H Y, LACEY S W. The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level[J]. Gastroenterology, 1994, 106(5): 1233-1241.
- [11] 冯媛媛. 薛荔籽果胶理化性质及其功能特性的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [12] 无锡轻工大学, 天津工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [13] 国家环境保护局, 中国国家标准化管理委员会. GB 11894—1989 水质总氮的测定[S]. 2003.
- [14] CHANEY A L, MARBACH E P. Modified reagents for determination of urea and ammonia[J]. Clinical Chemistry, 1962, 8: 130-132.
- [15] KISHIDA T, NAKAI Y, EBIHARA K. Hydroxypropyl-distarch phosphate from tapioca starch reduces zinc and iron absorption, but not calcium and magnesium absorption, in rats[J]. J Nutr, 2001, 131: 294-300.
- [16] 苏昕峰, 向晨茜, 文红丽, 等. 辣椒素灌喂剂量对大鼠肠道发酵产物的影响[C]//2011年中国农业工程学会农产品加工及贮藏工程分会学术年会暨全国食品科学与工程博士学术论坛管产学研助推食品安全重庆高峰论坛, 西南大学, 2011: 136-140.
- [17] 张莉莉. 辣椒素及其受体TRPV1预防肥胖的机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2006: 10.
- [18] 苏昕峰, 文红丽, 刘雄. 辣椒素对胃肠道健康的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 443-446.
- [19] SCHMIDT B, HAMMER J, HOLZER P, et al. Chemical nociception in the jejunum induced by capsaicin[J]. Gut, 2004, 53: 1109-1116.
- [20] HAMMER J, HAMMER H F, EHERER A J, et al. Intraluminal capsaicin does not affect fluid and electrolyte absorption in the human jejunum but does cause pain[J]. Gut, 1998, 43: 252-255.
- [21] PRAKASH U N, SRINIVASAN K. Beneficial influence of dietary spices on the ultrastructure and fluidity of the intestinal brush border in rats[J]. Br J Nutr, 2010, 2: 1-9.
- [22] 钟金凤, 何华西, 许美解, 等. 辣椒素对湘黄鸡肠道绒毛长度及微生态的研究[J]. 饲料研究, 2010(7): 37-39.