DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251127001
引用格式: 邢军梅, 张涛, 蔡宏芳. 核桃花多糖提取工艺优化及对肠道菌群的调节作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(13): 122–133.
Xing Junmei, Zhang Tao, Cai Hongfang. Optimization of extraction process for walnut flower polysaccharides and its regulatory effect on gut microbiota [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(13): 122–133. (in Chinese with English abstract).

核桃花多糖提取工艺优化及对肠道菌群的调节作用

邢军梅*, 张 涛, 蔡宏芳

(甘肃林业职业技术大学, 天水 741020)

摘 要: 目的 优化核桃花多糖的提取工艺, 探究其潜在的肠道菌群调节作用。**方法** 采用酶解辅助低共熔溶剂法提取多糖。在单因素基础上, 以含水量、酶浓度、提取温度、液料比为变量, 通过响应面实验优化工艺参数; 利用傅里叶红外光谱和紫外分光光度计初步探究其结构, 并进一步开展体外发酵实验, 分析核桃花多糖对高脂血症相关肠道菌群多样性、结构及短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)生成的影响, 结合相关性热图解析菌群与 SCFAs 的关联。**结果** 核桃花多糖最优提取工艺为含水量 30%、酶浓度 2%、提取温度 50 ℃、液料比 21:1 (mL:g), 提取率达(5.91±0.42)%, 所建模型可有效预测工艺效果, 经测定多糖含量为 88.03%, 含有糖醛酸基团、吡喃环结构, 且同时存在 α-型与 β-型两种糖苷键。体外发酵实验表明核桃花多糖可明显改善肠道菌群多样性及结构组成, 促进有益菌增殖, 抑制致病菌生长, 同时提升乙酸、丙酸、丁酸等 SCFAs 产量; 相关性分析表明上述有益菌属与核心 SCFAs 呈强正相关, 可作为肠道有益代谢恢复的生物标志物。**结论** 核桃花多糖提取工艺可行, 具有良好的肠道菌群调节作用, 为其在肠道健康领域的功能食品开发提供理论依据。

关键词: 核桃花; 多糖; 提取; 发酵; 短链脂肪酸

中图分类号: TS201.4 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)13–0122–12

Optimization of extraction process for walnut flower polysaccharides and its regulatory effect on gut microbiota

XING Jun-Mei*, ZHANG Tao, CAI Hong-Fang

(*Gansu Forestry Voctech University*, *Tianshui* 741020, *China*)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction process of walnut flower polysaccharides and explore its potential regulatory effect on intestinal flora. **Methods** Walnut flower polysaccharides was extracted by enzyme-assisted deep eutectic solvent method. Based on single-factor experiments, response surface methodology was employed to optimize the extraction parameters with moisture content, enzyme concentration, extraction temperature and liquid-to-solid ratio as independent variables. Fourier transform infrared spectroscopy and ultraviolet spectrophotometry were employed for the preliminary structural characterization of walnut flower polysaccharides.

收稿日期: 2025-11-27
基金项目: 甘肃省高校教师创新基金项目(2025A-330); 甘肃省职业教育教学改革研究项目(2024GSZYJY–084)
第一作者/*通信作者: 邢军梅(1989—), 女, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食品加工副产物转化利用。E-mail: 1078836212@qq.com

Furthermore, *in vitro* fermentation experiments were conducted to analyze the effects of walnut flower polysaccharides on the diversity, structure and short-chain fatty acids (SCFAs) production of hyperlipidemia-related intestinal microbiota. The correlation between microbiota and SCFAs was elucidated using a correlation heatmap. **Results** The optimal extraction conditions were determined as follows: moisture content of 30%, enzyme concentration of 2%, extraction temperature of 50 ℃, and liquid-to-solid ratio of 21:1 (mL:g). Under these conditions, the extraction yield of walnut flower polysaccharides reached (5.91±0.42)% and the established model exhibited reliable predictive ability. The polysaccharide content of the extracted walnut flower polysaccharides was determined to be 88.03%. Structural characterization indicated that WFP contained uronic acid groups and pyranose ring structures, as well as both *α*- and *β*-glycosidic bonds. *In vitro* fermentation results showed that walnut flower polysaccharides significantly improved the diversity and structural composition of the intestinal microbiota, promoted the proliferation of beneficial bacteria, inhibited the growth of pathogenic bacteria and increased the production of SCFAs including acetate, propionate and butyrate. Correlation analysis indicated that the aforementioned beneficial genera were strongly positively correlated with core SCFAs, which could serve as biomarkers for the recovery of intestinal beneficial metabolic functions. **Conclusion** The extraction process of walnut flower polysaccharides is feasible and walnut flower polysaccharides exhibits regulatory effects on the intestinal microbiota. This study provides a theoretical basis for the development of functional foods in the field of intestinal health.

KEY WORDS: walnut flower; polysaccharides; extraction; fermentation; short-chain fatty acids

0　引　言

核桃花是核桃的繁殖器官(包括雄花与雌花), 在贵州、云南等少数民族地区常被作为特色蔬菜食用[1]。其蕴含蛋白质、脂肪、多酚、黄酮等功能营养成分, 是开发功能食品的天然原料。然而当前核桃相关研究多聚焦于核桃仁、核桃皮、核桃叶等部位[2], 针对核桃花的系统研究相对匮乏, 导致其市场认知度偏低, 资源始终未得到高效开发利用[3]。

现有核桃花功能成分研究以黄酮、多酚为主, 而针对多糖却鲜有研究报道。多糖具有广泛的生物活性, 如抗氧化、降糖、抗肿瘤等, 研究表明多糖的糖苷键类型、分子质量、分支度等结构特征与其功能作用密切相关[4]。而不同提取方法会直接改变多糖结构, 进而影响其生物活性[5]。传统的提取方法如水提、醇沉、超声、微波等, 提取率较低, 易破坏多糖结构[6]。相比之下, 酶解法因条件温和、提取率高、绿色环保等优点备受关注[7]。近年来, 低共熔溶剂(deep eutectic solvents, DES)在天然产物分离提取领域展现出巨大的应用潜力, 其具有操作简单、成本低廉、循环使用、提取率高等优点[8]。目前物理(超声、微波等)辅助低共熔溶剂法已应用于多糖提取, 而关于酶法低共熔溶剂联用的研究较少, 两种方法协同能够同时兼顾提取效率、产物活性与工艺绿色性, 因此, 有必要对其开展研究。

肠道菌群是由数万亿微生物构成的动态生态系统, 大量研究证实炎症性肠病、自身免疫性疾病、高脂血症等多种疾病与肠道菌群失衡密切相关[9]。多糖被证实具有调节肠道菌群组成和比例, 促进有益菌生长, 维持肠道菌群平衡等作用[10]。枸杞、黄芪等植物多糖可促进特定有益菌群增殖, 调节短链脂肪酸代谢, 增强免疫力预防[11−12]。但截至目前, 关于核桃花多糖的益生作用相关研究鲜少见系统报道。

鉴于此, 本研究以核桃花为原料, 采用酶法辅助低共熔溶剂提取核桃花多糖, 并借助体外发酵模型探究其对肠道菌群结构及代谢产物的调节作用, 以期为核桃花资源的高值化开发与利用提供理论支撑和技术参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

核桃花采自陕西商洛核桃种植基地(品种: 香玲), 去除杂质后于 60 ℃烘箱烘干至恒重, 粉碎过 40 目筛, 密封后置于–20 ℃冷藏备用。

氯化胆碱(纯度 98%)、甘油、纤维素酶(50 U/mg)、果胶酶(50 U/mg)(上海源叶生物科技有限公司); 无水乙醇、苯酚、硫酸、碳酸钠、硫酸镁、氯化钙、硫酸铵、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙腈、甲醇、甲酸[色谱级, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 短链脂肪酸标品(纯度均≥99%, 上海麦克林生化科技有限公司); 牛肉膏、蛋白胨(北京奥博星生物技术有限责任公司); 琼脂粉、*L*-抗坏血酸、*L*-半胱氨酸(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.2　仪器与设备

KQ-500DE 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 国产 MiniAmp Plus 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; WGL-45B 电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司); Agilent 7890B 气相色谱仪、AT-WAX 色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)(美国安捷伦科技有限公司); HT300R 高速台式冷

冻离心机(湖南湘仪仪器有限公司); PHS-3E 上海雷磁精密酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅(广州标际包装设备有限公司); UV1902PC 双光束紫外可见分光光度计(上海奥析科学仪器有限公司); LB-620 厌氧培养箱(青岛路博建业环保科技有限公司)。

1.3 核桃花多糖的提取

低共熔溶剂制备: 在前期预实验基础, 选择氯化胆碱(氢受体)-甘油(氢供体)体系进行多糖提取, 按照一定摩尔比和含水量, 于 60 ℃下混合至完全溶解, 获得低共熔溶剂。

称取一定量核桃花干粉加至 50 mL 烧杯, 按照一定料液比加入低共熔溶剂和复合酶[纤维素酶:果胶酶=1:1 (U:U)], 60 ℃下恒温水浴 2 h, 取出置于 80 ℃下灭酶 5 min, 冷却至室温, 6000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 得到多糖提取溶液, 减压浓缩至原体积 1/5, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 静置 12 h, 6000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, –50 ℃冷冻干燥, 得核桃花多糖粉末, 用于后续实验, 采用苯酚-硫酸法测定多糖提取率[13]。

多糖提取率计算公式见式(1):

$$\text{多糖提取率}/\% = \frac{C \times V \times n \times f}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 为多糖质量浓度, mg/mL; V 为多糖溶液体积, mL; f 为转化因子, 0.9; n 为稀释倍数; m 为核桃花干粉重量, g。

1.4 总糖含量测定

采用苯酚-硫酸比色法[13]测定总糖含量。

1.5 紫外光谱分析

参考郑玉凤等[14]方法对 200~400 nm 范围内进行紫外光谱扫描。

1.6 红外光谱分析

精确称取 2 mg 核桃花多糖, 加入 0.2 g KBr 固体粉末, 混均, 20~22 kPa, 30 s 条件下压片, 取 80 mg 压片, 在 4000~400 cm^{-1} 波长范围内进行红外光谱测定。

1.7 单因素实验

分别考察酶浓度(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)、低共熔溶剂配比(氯化胆碱与甘油摩尔比 1:1、1:2、1:3、2:1、3:1)、提取温度(40、50、60、70、80 ℃)、提取时间(1、2、3、4、5 h)和液料比(10:1、20:1、30:1、40:1:、50:1, mL:g)对多糖得率的影响。

1.8 响应面优化实验

基于单因素实验结果, 选取对多糖得率影响显著的 4 个因素(酶浓度、含水量、提取温度、料液比), 设计 4 因素 3 水平响应面实验, 因素与水平见表 1。

1.9 体外发酵实验

粪便样品制备: 参考万楚[15]方法, 随机抽样选取 4 名健康志愿者和 4 名高脂血症患者(年龄 22~30 岁), 采集新鲜粪便样品, 迅速置于厌氧袋中, 按 1:10 (m:V)加入无菌生理盐水, 涡旋振荡 10 min, 4 层无菌纱布过滤, 再用 0.22 μm 滤膜过滤(保留菌群, 去除杂质), 得粪便悬液(10%)。

表 1 因素与水平
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	含水量 /%	酶浓度 /%	提取温度 /℃	液料比 (mL:g)
–1	20	1	40	10:1
0	30	2	50	20:1
1	40	3	60	30:1

发酵体系构建: 采用 AMB 培养基(牛肉膏 1 g, 蛋白胨 1 g, 琼脂 1 g, 碳酸钠 4 g, *L*-抗坏血酸 0.5 g, *L*-半胱氨酸 0.5 g, 硫酸镁 0.1 g, 氯化钙 0.05 g, 硫酸铵 0.45 g, 氯化钠 0.45 g, 磷酸二氢钾 0.2 g, 磷酸氢二钾 0.3 g, 配成 1 L 体积), 调节 pH 至 7.0, 分装至 15 mL 无菌厌氧离心管(每管 10 mL), 121 ℃灭菌 20 min, 冷却至 37 ℃后移入厌氧培养箱平衡 1 h。每管加入 1 mL 粪便菌群悬液(终浓度 10%, V:V), 空白组加入等量无菌厌氧水; 拧紧离心管盖(留微量透气孔, 避免胀气), 置于 37 ℃厌氧培养箱, 分别培养 48 h。实验分为 3 组: 健康志愿者粪便做空白对照(CON 组); 高脂血症患者粪便做模型组(MODEL 组); 高脂血症粪便组加入 0.5%的核桃花多糖(WFP 组)。

样品采集与检测: 取 1 mL 培养液, 离心(8000×g, 10 min, 4 ℃), 收集菌体, –80 ℃冻存, 用于 16S rRNA 高通量测序(检测 Shannon、Simpson 指数等)[16–17]。取 2 mL 培养液, 离心(12000×g, 15 min, 4 ℃), 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 参考王闪闪[18]方法采用气相色谱法检测短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸)浓度。

1.10 数据处理

采用 SPSS 26.0 进行统计分析, 数据以平均值±标准偏差表示, 组间差异采用单因素方差分析, P<0.05 为差异显著; 高通量测序数据通过 QIIME 2 软件处理, 进行 Alpha 多样性(Shannon、Simpson 指数)、Beta 多样性及物种丰度分析; 采用 Origin 2019b 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 不同因素对核桃花多糖提取率的影响

为探究含水量、低共熔溶剂摩尔配比、复合酶(纤维素酶:果胶酶, U:U)比例、酶浓度、提取时间、提取温度及液料比对核桃花多糖提取率的影响, 开展单因素实验, 结

果见图 1。由图 1(A)可知: 随着含水量的增加, 核桃花多糖提取率先升后降, 当含水量为 30%时, 多糖提取率最高为(5.63±0.78)%。这可能是因为低共熔溶剂体系具有较高的黏度, 在含水量较低时, 体系黏度大, 限制多糖的溶出与传质[19]; 随着水分加入, 体系黏度减小, 传质阻力降低, 且水可调节低共熔溶剂的极性, 使其极性与核桃花多糖极性更接近, 从而促进多糖的溶解与释放, 提高提取率; 然而当水分过多时, 溶剂极性过大, 与多糖的极性差距增大, 二者间的相互作用减弱, 提取率反而下降。基于此, 可选择含水量 20%、30%、40%进行后续响应面实验。

由图 1(B)可知: 随着氯化胆碱与甘油摩尔比从 2:1 递增至 1:2, 多糖提取率呈递增趋势, 在摩尔比 1:2 时达到最高为(5.14±0.47)%; 当摩尔比继续增大, 提取率小幅下降并趋于稳定。低共熔溶剂的摩尔比直接决定其氢键网络结构、溶解性及黏度等关键特性[20]。当摩尔比为 1:2 时, 溶剂的氢键作用强度与传质效率最匹配, 可高效破坏核桃花的细胞结构, 促进多糖溶出; 而当摩尔比偏离 1:2 时, 溶剂的氢键强度、溶解性或黏度发生显著改变, 致使其对多糖的溶解能力下降, 因此摩尔比选择 1:2 时较好, 选择为固定条件。

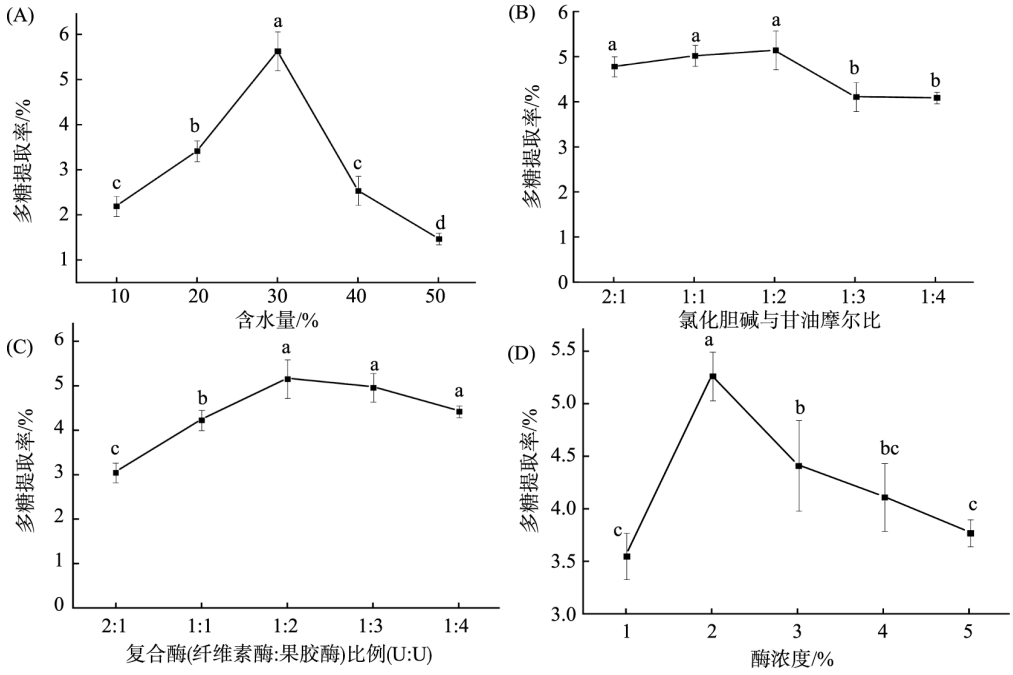
由图 1(C)可知: 复合酶(纤维素酶:果胶酶)比例为 1:2 时, 核桃花多糖提取率最高为(5.17±0.62)%; 当酶比例变大时, 提取率略有下降。这是由于酶比例为 1:2 时, 双酶间的协同作用最佳, 可高效降解细胞结构以促进多糖释放。因此选择酶比例 1:2 为最佳比例, 且为固定条件。

由图 1(D)可知: 酶浓度对核桃花多糖提取率呈现先升后降的趋势, 在酶浓度为 2%时提取率达到峰值为(5.27±0.44)%, 此后随酶浓度增加提取率逐渐下降。当酶浓度过低时, 催化反应进程缓慢, 多糖溶出不充分; 酶浓度过高时, 一方面酶分子间竞争加剧[21], 另一方面可能因酶解过度破坏多糖结构, 最终使得提取率反而下降。基于此, 可选择酶浓度 1%、2%、3%进行后续响应面实验。

由图 1(E)可知: 核桃花多糖提取率随提取时间延长呈先升高后稳定的趋势, 在提取时间为 2 h 时提取率达到最高水平为(5.76±0.36)%; 继续延长时间, 提取率基本保持稳定。这是因为提取初期, 多糖溶出量随时间增加而持续上升; 当提取时间继续延长, 多糖溶出已趋于平衡, 因此选择提取时间 2 h 时作为固定条件。

由图 1(F)可知: 提取温度对核桃花多糖提取率的影响呈现先升后降的规律, 在 50 ℃时提取率达到最大值为(5.66±0.52)%; 温度过低或过高, 提取率均呈下降趋势。随着温度升高, 提取体系溶剂的黏度与表面张力降低, 减少了多糖与样品基质间的相互作用, 有利于核桃花多糖的持续溶出; 同时, 温度对酶活性具有显著调控作用(P<0.05), 50 ℃时酶活性处于最佳状态, 可高效辅助多糖溶出; 当温度过低时, 分子运动速率缓慢, 溶出效率低下; 而温度过高时, 酶活性会因热变性降低, 进而影响多糖提取率[22]。基于此, 可选择提取温度 40、50、60 ℃进行后续响应面实验。

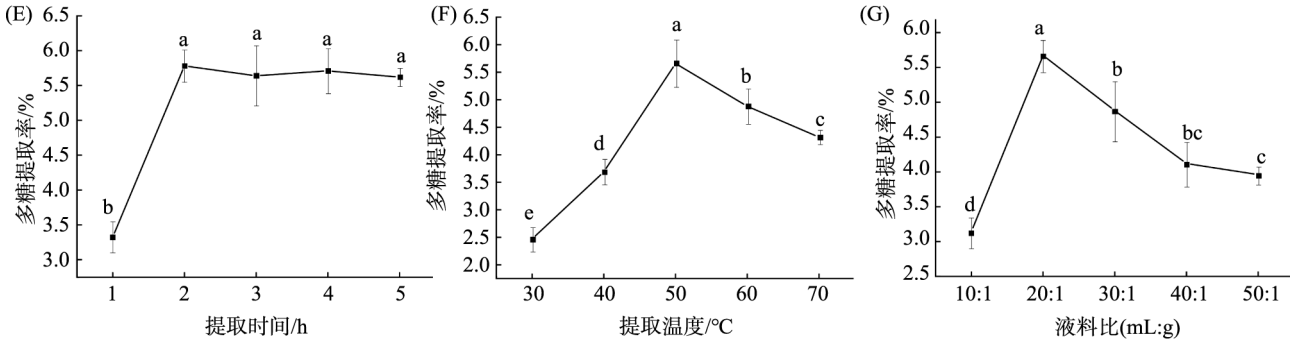
由图 1(G)可知: 核桃花多糖提取率随液料比的变化呈先升后降的趋势, 在液料比为 20:1 (mL:g)时提取率最高为(5.67±0.26)%, 此后随液料比继续增大, 提取率逐渐下降。当液料比为 20:1 (mL:g)时, 溶剂相对充足, 传质效果良好, 可



注: 图中不同小写字母代表组间差异显著, P<0.05。

图 1　单因素实验结果

Fig.1　Results of single-factor experiments



注: 图中不同字母代表组间差异显著, $P<0.05$。

图 1(续) 单因素实验结果

Fig.1 Results of single-factor experiments

保障多糖充分溶出; 液料比过小时(溶剂不足), 多糖溶出过程受限; 液料比过大时, 体系中其他杂质溶出量增加[23], 可能引发多糖降解, 最终导致提取率降低。基于此, 可选择液料比 10:1、20:1、30:1 (mL:g)进行后续响应面实验。

2.2 响应面实验结果

2.2.1 实验结果与方差分析

根据设定条件开展实验, 经 Design expert 12 软件分析, 结果见表 2。各因素与多糖提取率之间的二次多项式方程为: $Y=5.87-0.015A+0.0633B-0.015C+0.0833D-0.0375AB+0.0325AC-0.01AD+0.0775BC-0.05BD+0.06CD-0.6439A^2-0.5364B^2-0.4114C^2-0.3614D^2$

由方差分析表的结果(表 3)可知模型整体表现优异, 具备良好的预测能力, 回归模型的 F 为 213.2064, $P<0.0001$(极显著), 说明建立的二次回归方程能够准确描述含水量(A)、酶浓度(B)、提取温度(C)、液料比(D)与多糖得率(Y)之间的关系。残差为 0.0213, 表明模型能解释绝大部分响应值的变异。失拟项 $P=0.9472>0.05$(不显著), 说明拟合曲线与实际实验数据的偏差无统计学意义, 模型的预测精度可靠。

通过方差分析中 F 可判断各因素对多糖得率的影响强度为 D(液料比)>B(酶浓度)>A(含水量) = C(提取温度)。交互项 BC、CD 均为极显著($P<0.01$), 交互作用较强, 酶浓度的效果依赖提取温度, 提取温度对得率的影响随液料比变化, BD 交互作用为中等强度, 表明酶浓度与液料比存在协同效应。

2.2.2 交互作用分析

由表 3 方差分析可知 BC、BD、CD 存在明显的交互作用, 其等高线图和 3D 曲面图见图 2。其中等高线图均呈椭圆, 表明存在交互作用, 其对应的 3D 曲面图也表现出较明显的陡峭, BC 交互作用中, B(酶浓度)方向较陡峭, 表明相比 C(提取温度), 酶浓度对多糖提取率影响更大。BD 交互作用中, B 方向较陡峭, 表明相比 D(液料比), 酶浓度对多糖提取率影响更大。CD 交互作用中, D 方向较陡峭, 表明相比 C(提取温度), 液料比对多糖提取率影响更大。以上结果与表 3 方差分析结果一致。

表 2 响应面结果

Table 2 Results of response surface methodology

实验序号	A(含水量)	B(酶浓度)	C(提取温度)	D(液料比)	Y(多糖得率)/%
1	0	0	0	0	5.85
2	–1	–1	0	0	4.61
3	0	0	–1	1	5.15
4	0	1	0	–1	5.01
5	0	0	0	0	5.81
6	–1	0	1	0	4.78
7	0	0	0	0	5.88
8	0	–1	–1	0	4.97
9	0	0	–1	–1	5.12
10	0	1	–1	0	4.90
11	0	0	1	1	5.25
12	0	0	0	0	5.95
13	–1	0	0	1	5.00
14	1	–1	0	0	4.67
15	1	0	1	0	4.80
16	0	–1	1	0	4.80
17	0	1	0	1	5.08
18	0	–1	0	1	5.04
19	0	0	0	0	5.92
20	–1	0	–1	0	4.90
21	1	0	0	1	4.95
22	0	–1	0	–1	4.77
23	–1	1	0	0	4.84
24	0	0	1	–1	4.98
25	1	0	–1	0	4.79
26	0	1	1	0	5.04
27	–1	0	0	–1	4.77
28	1	0	0	–1	4.76
29	1	1	0	0	4.75

表 3　方差分析

Table 3　Analysis of variance

来源	方差和	*df*	均方	*F*	*P*	显著性
模型	4.5406	14	0.3243	213.2064	<0.0001	显著
A	0.0027	1	0.0027	1.7749	0.2041	
B	0.0481	1	0.0481	31.6419	<0.0001	**
C	0.0027	1	0.0027	1.7749	0.2041	
D	0.0936	1	0.0936	61.5527	<0.0001	**
AB	0.0056	1	0.0056	3.6978	0.0751	
AC	0.0042	1	0.0042	2.7774	0.1178	
AD	0.0004	1	0.0004	0.2630	0.6161	
BC	0.0240	1	0.0240	15.7936	0.0014	**
BD	0.0100	1	0.0100	6.5738	0.0225	*
CD	0.0144	1	0.0144	9.4663	0.0082	**
A^2	2.6895	1	2.6895	1768.0122	<0.0001	**
B^2	1.8664	1	1.8664	1226.9601	<0.0001	**
C^2	1.0979	1	1.0979	721.7548	<0.0001	**
D^2	0.8473	1	0.8473	556.9834	<0.0001	**
残差	0.0213	14	0.0015			
失拟项	0.0090	10	0.0009	0.2937	0.9472	不显著
纯误差	0.0123	4	0.0031			
总误差	4.5619	28				
R^2	0.9679					

注: *表示具有显著性差异, P<0.05, **表示具有极显著差异, P<0.01。

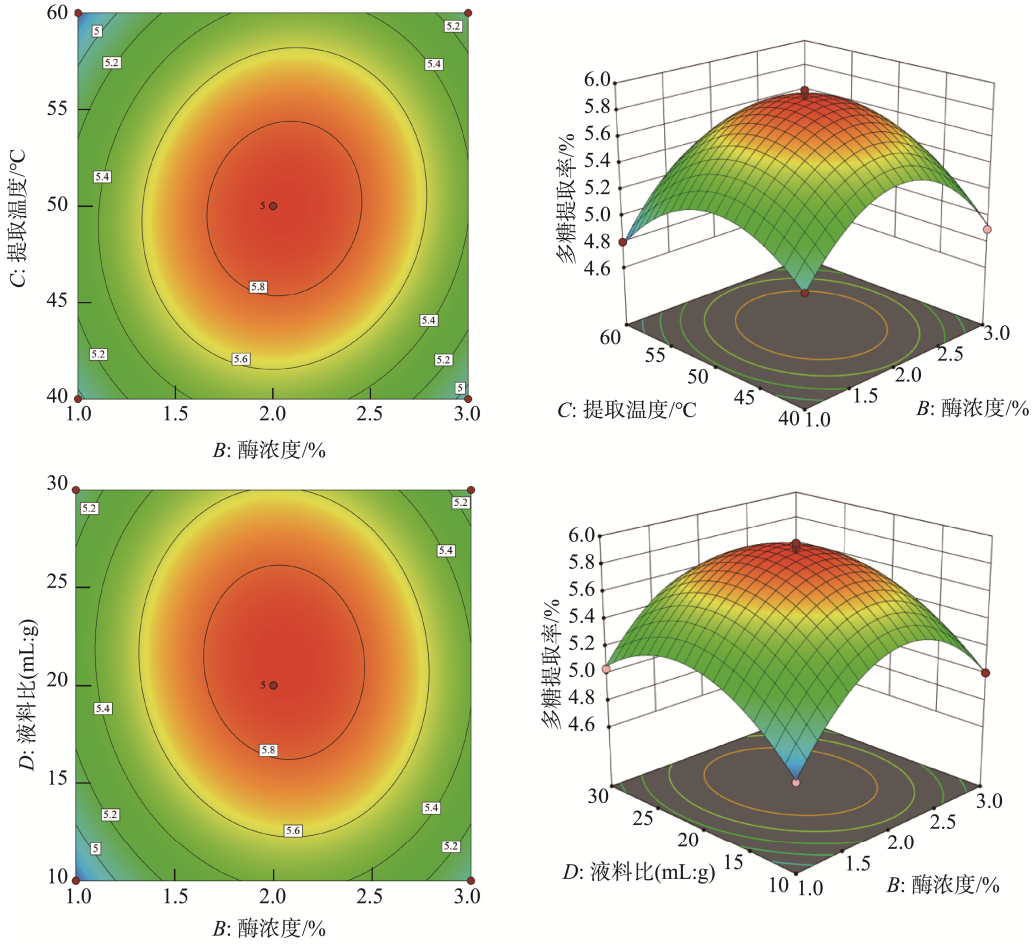


图 2　交互作用分析

Fig.2　Analysis of interaction effects

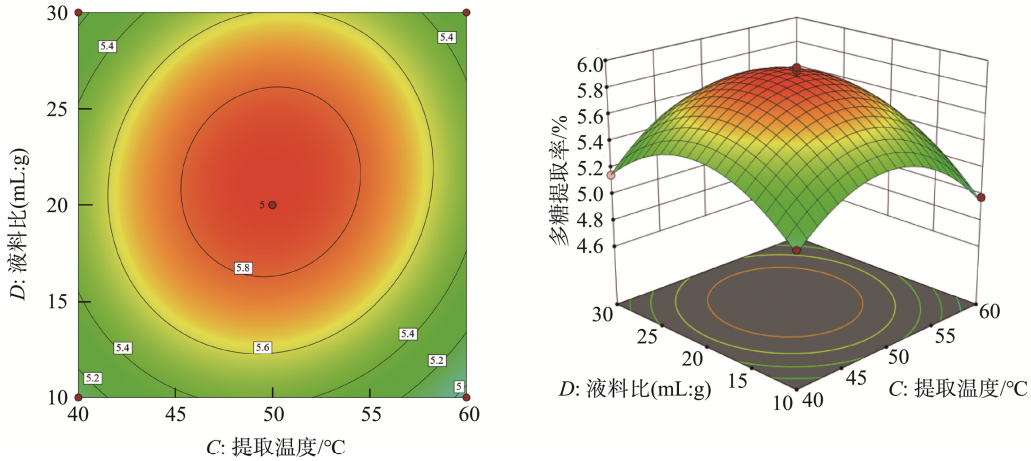


图 2(续) 交互作用分析

Fig.2 Analysis of interaction effects

2.2.3 最优条件

通过优化得到最优的提取工艺参数为含水量 29.85%、酶浓度 2.05%、提取温度 49.95 ℃、液料比 21.18:1 (mL:g), 理论多糖提取率为 5.889%。为了方便生产, 设定含水量 30%、酶浓度 2%、提取温度 50 ℃、液料比 21:1 (mL:g), 经过 3 次平行实验验证, 测得多糖提取率为(5.91±0.42)%, 与理想值无明显差异, 表明所建回归模型可靠、拟合度高, 能有效预测多糖得率。

2.2.4 总糖含量测定结果分析

通过最优工艺制备核桃花多糖提取物, 并对其多糖含量测定为 88.03%。

2.2.5 紫外光谱分析结果

核桃花多糖的紫外光谱见图 3。由图 3 可知, 多糖在 260 nm 和 280 nm 处均无明显吸收峰, 表明多糖样品中不存在或存在极少量蛋白质和核酸类物质。

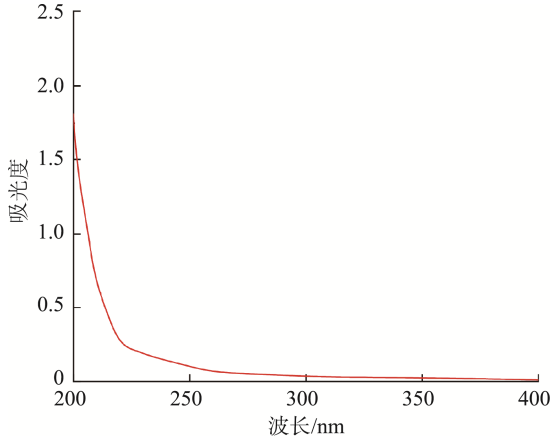


图 3 紫外光谱图

Fig.3 ultraviolet spectrogram

2.2.6 红外光谱分析结果

核桃花多糖的红外光谱图见图 4, 其特征吸收峰分析如下: 3424 cm^{-1} 处出现宽强吸收峰, 对应羟基(-OH)的伸缩振动; 2930 cm^{-1} 处出现特征吸收峰, 归因于 C-H 键的伸缩振动, 上述两类特征峰共同证实该物质为多糖类化合物。1613 cm^{-1} 和 1422 cm^{-1} 处的强吸收峰, 分别对应糖醛酸结构中 C=O 键的不对称伸缩振动与对称伸缩振动, 表明核桃花多糖中含有糖醛酸基团。1328 cm^{-1} 附近的特征吸收峰, 由烷基 C-H 键的弯曲振动引起。1100 cm^{-1} 和 1012 cm^{-1} 处的特征吸收峰, 是吡喃环的典型特征峰, 提示该多糖分子中存在吡喃环结构。此外, 877 cm^{-1} 附近的吸收峰对应 β-型糖苷键的特征振动, 834 cm^{-1} 处的吸收峰则表明分子中存在 α-型糖苷键, 证实核桃花多糖同时含有 α-型与 β-型两种糖苷键。

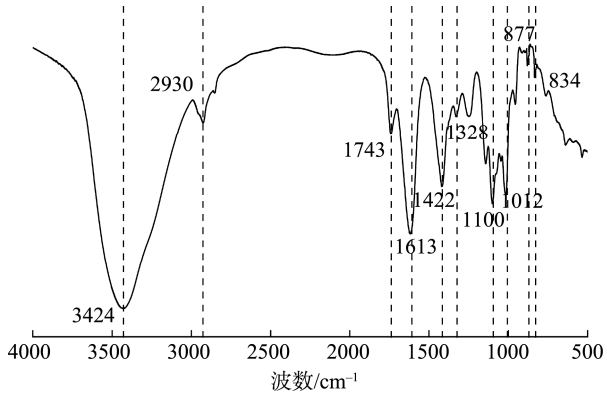


图 4 红外光谱图

Fig.4 Infrared spectrum

2.3 核桃花多糖对体外发酵模型的菌群结构的影响

2.3.1 多样性分析

WFP 组、CON 组、MODEL 组的菌群操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)数量分布见图 5。由图 5(A)韦恩图可知 3 个组共有的 OTU 数量为 456 个, 说明存在大量核心菌群, 这些菌群在对照组、模型组和核桃花多糖干预组中均稳定存在。WFP 组、CON 组、MODEL 组分别具有 100、144、37 个特有 OTU, 表明 3 者菌群结构存在特

异性。此外，3 个组两两之间存在重叠，具有共有菌群。采用主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)降维展示微生物群落的 β 多样性差异，由图 5(B)可知，WFP 组与 CON、MODEL 组均无重叠，说明核桃花多糖干预后，微生物群落结构形成了独特的聚类模式，与对照组、模型组存在显著差异。

α 多样性从物种丰富度(ACE、Chao1)、测序可靠性(goods coverage)、群落多样性与均匀度(Shannon、Simpson) 3 个维度反映核桃花多糖对体外发酵微生物群落的影响，结果见图 6，由图 6(A)、6(B)可见 ACE 和 Chao1 是衡量菌群物种数量(丰富度)的核心指标，两者趋势完全一致，CON 组丰富度显著最高，WFP 组丰富度与 MODEL 组无明显差异，说明模型处理和核桃花多糖干预对“物种数量”的影响方向一致，且强度相近。图 6(C)中 Goods coverage 指数值越接近 1，说明测序越充分、数据可靠性越强，WFP 和 MODEL 组略高于 CON 组，因两者物种丰富度更低。图 6(D)、6(E)为 Shannon 与 Simpson 指数，共同反映物种丰富度、均匀度，Shannon 指数与 Simpson 指数结果一致，WFP 组最高，MODEL 组最低，表明核桃花多糖干预后，菌群多样性显著提升(P<0.05)。

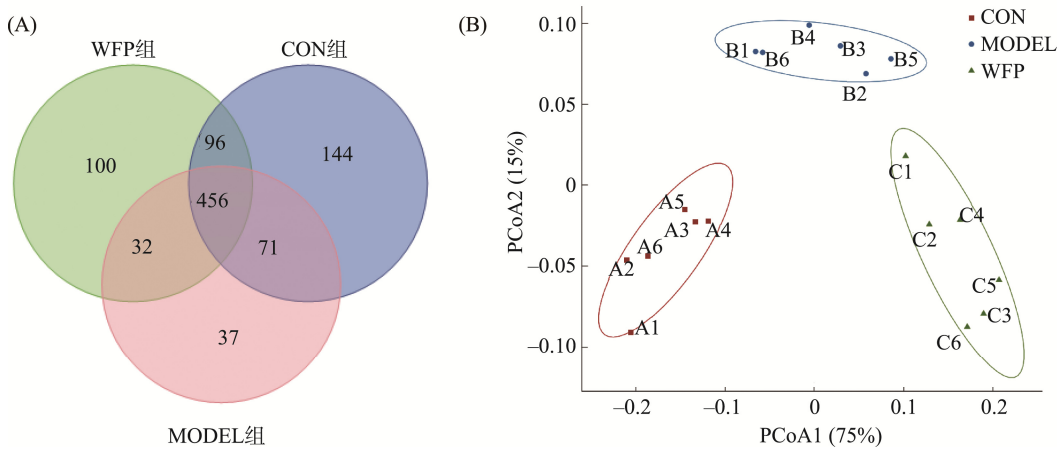


图 5　韦恩图和主成分分析

Fig.5　Venn diagram and principal component analysis

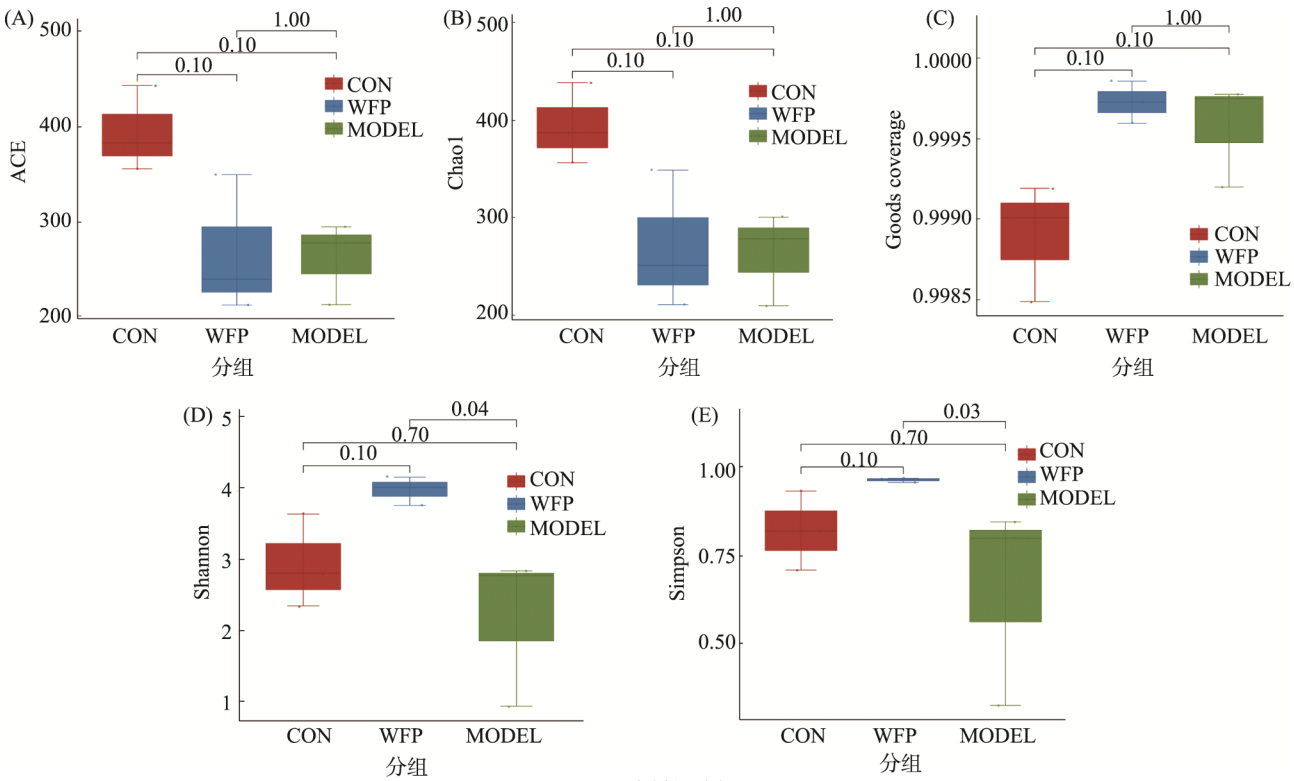


图 6　α-多样性分析

Fig.6　α-diversity analysis

2.3.2 菌群结构分析

从门水平堆叠柱状图[图 7(A)]可见，菌群主要由变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)等门构成，3 组的菌群结构差异显著，CON 组组成符合健康肠道菌群的门水平特征，梭杆菌门等有益菌门占比高，MODEL 组的变形菌门占比急剧升高，成为优势菌门，梭杆菌门占比大幅降低，表明肠道菌群发生严重紊乱。WFP 组梭杆菌门占比显著回升，变形菌门占比明显降低，菌群结构向 CON 组趋近，说明多糖可有效逆转模型组的门水平菌群紊乱。

从属水平堆叠柱状图[图 7(B)]可见，核心属包括鲸杆菌属(*Cetobacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)等，3 组的属水平差异直接反映菌群功能的紊乱与修复，CON 组以鲸杆菌属(属于 *Fusobacteria* 门)为绝对优势属，该属为产丁酸菌，对维持肠道稳态至关重要气单胞菌属、寡养单胞菌属等有害属占比极低。MODEL 组的鲸杆菌属占比大幅下降，气单胞菌属、寡养单胞菌属等有害属占比急剧升高，潜在致病菌大量繁殖会引发肠道炎症、破坏屏障功能[23]。相比 MODEL 组，WFP 组鲸杆菌属占比显著回升(P<0.05)，气单胞菌属、寡养单胞菌属等有害属占比明显降低，菌群结构向空白组恢复，说明核桃花多糖可在属水平精准调节菌群，促进有益产酸属，抑制有害致病菌属生长。

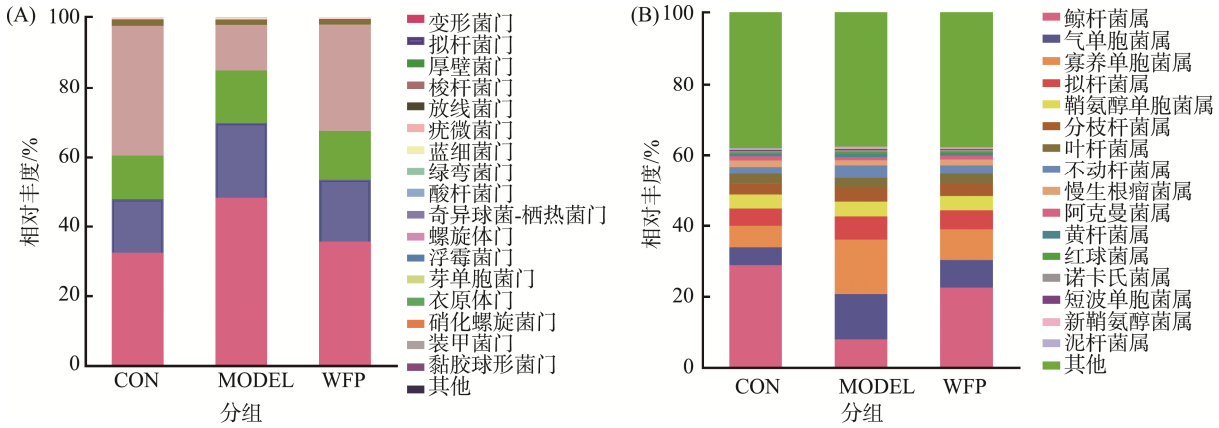


图 7 多糖干预后发酵微生物样本的物种组成门水平分析(A)和属水平分析(B)

Fig.7 Analysis of species composition at the phylum level (A) and genus level (B) of post-fermentation microbial samples after polysaccharide intervention

2.4 体外发酵模型中核桃花多糖对 SCFAs 产量的影响

乙酸、丙酸、丁酸是由肠道有益菌发酵碳水化合物产生的，其含量直接反映菌群的有益代谢功能[24–26]。由表 4 可知，CON 组的乙酸、丙酸、丁酸含量与 MODEL 组差异极显著(P<0.05)，MODEL 与 WFP 组差异显著(P<0.05)，WFP 组乙酸含量较 MODEL 组升高 111.1%，是 CON 组的 87.6%，丙酸含量较 MODEL 组升高 127.1%，是 CON 组的 85.3%，丁酸含量较 MODEL 组升高 170.7%，是 CON 组的 77.5%，乙酸主要由拟杆菌属、阿克曼菌属等发酵多糖生成[27]。MODEL 组有益菌[拟杆菌属、阿克曼菌属(*Akkermansia*)等]丰度降低，导致乙酸合成受阻；WFP 组多糖补充促进有益菌增殖，乙酸产量显著回升(P<0.05)；丙酸由梭菌属、真杆菌属等发酵多糖或乳酸生成[28–29]。MODEL 组菌群紊乱导致丙酸合成通路破坏；WFP 组多糖为丙酸生成提供充足底物，同时促进产丙酸菌(*Roseburia*)丰度升高；丁酸是肠道健康的核心标志物，主要由鲸杆菌属、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)发酵多糖生成[30–31]。MODEL 组鲸杆菌属丰度骤降，导致丁酸合成严重受阻；WFP 组多糖显著促进鲸杆菌属增殖(P<0.05)，丁酸产量大幅回升。

表 4 不同组间 SCFAs 含量差异

Table 4 Differences in SCFAs content among different groups

SCFAs 类别 /(μmol/g)	CON 组	MODEL 组	WFP 组
乙酸	52.3±4.5^a	21.7±3.1^b	45.8±3.9^a
丙酸	15.7±2.1^a	5.9±1.2^b	13.4±1.8^a
丁酸	28.5±3.2^a	8.2±1.5^b	22.1±2.8^a
异丁酸	0.8±0.2^a	1.9±0.3^b	1.0±0.2^a
戊酸	1.2±0.3^a	2.7±0.4^b	1.4±0.3^a
异戊酸	0.9±0.2^a	2.1±0.3^b	1.1±0.2^a
合计(总 SCFAs)	99.2±7.1^a	42.5±6.2^b	84.8±6.5^a

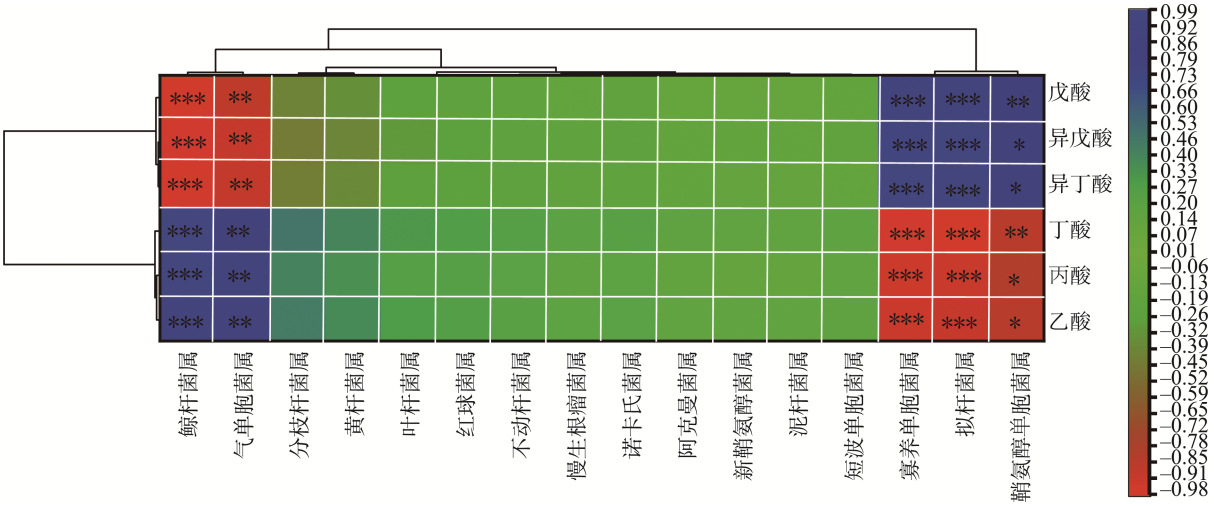
注：表中不同小写字母代表组间差异显著，P<0.05。

异丁酸、戊酸、异戊酸由肠道菌群发酵蛋白质/支链氨基酸产生，其含量反映菌群异常发酵程度[32–33]。WFP 组异丁酸含量较 MODEL 组降低 47.4%，是 CON 组的 125%，表明 MODEL 组菌群紊乱时蛋白质异常发酵增强。WFP 组的戊酸含量较 MODEL 组降低 48.1%，是 CON 组的 116.7%，相比 MODEL 组，WFP 组多糖调节菌群结构，抑制蛋白质异常发酵，戊酸含量回落。WFP 组的异戊酸变化趋势与异

丁酸、戊酸一致，表明 MODEL 组菌群发酵减少了对碳水的依赖，增强了蛋白质消耗。综上，MODEL 组 SCFAs 降低反映菌群功能严重受损；WFP 组总 SCFAs 大幅回升，表明核桃花多糖可有效修复肠道菌群的整体代谢能力。

2.5　肠道菌群与 SCFAs 相关性分析

肠道菌群属与 SCFAs 相关性热图分析见图 8，热图颜色梯度(蓝→红表示正相关→负相关)。鲸杆菌属、阿克曼菌属、拟杆菌属与乙酸、丙酸、丁酸含量呈强正相关，气单胞菌属、寡养单胞菌属、不动杆菌属(*Acinetobacter*)与异丁酸、戊酸、异戊酸含量呈强正相关。因此，前 3 种菌群属反映了有益代谢恢复程度，后 3 种菌群属反映了菌群紊乱缓解程度。



注：*表示具有显著性差异，P<0.05，**表示具有极显著差异，P<0.01，***表示具有强极显著差异，P<0.0001。

图 8　肠道菌群属与 SCFAs 相关性热图

Fig.8　Correlation heatmap between intestinal bacterial genera and SCFAs

3　结　论

本研究以核桃花为原料，采用酶解辅助低共熔溶剂法提取多糖成分。在单因素实验基础上，选取含水量、酶浓度、提取温度及液料比 4 个关键影响因素，进一步设计响应面优化实验，最终确定最优提取工艺参数为：含水量 30%、酶浓度 2%、提取温度 50 ℃、液料比 21:1 (mL:g)。在此条件下，核桃花多糖提取率达(5.91±0.42)%，所构建的预测模型可行性良好，可有效表征各因素与提取率的关系。所得核桃花多糖含量为 88.03%，不存在或极少量存在蛋白质或核酸类物质，红外光谱图显示核桃花多糖含有糖醛酸基团、吡喃环结构，且同时存在 α-型与 β-型两种糖苷键。

基于上述优化工艺，本研究进一步探究了核桃花多糖的体外发酵菌群调节活性。结果显示，核桃花多糖可有效改善高脂血症相关肠道菌群多样性降低、丰度失衡及结构紊乱问题，具体表现为促进鲸杆菌属、阿克曼菌属等有益菌增殖，抑制气单胞菌属等致病菌过度生长，同时显著促进 SCFAs 的生成。相关性热图分析表明，鲸杆菌属、阿克曼菌属及拟杆菌属与乙酸、丙酸、丁酸等核心 SCFAs 含量呈强正相关，可作为反映肠道有益代谢功能恢复程度的关键生物标志物。

参考文献

[1] 李倩. 核桃花化学成分的研究[J]. 中草药, 2021, 52 (24): 7413–7419.
Li Qian. Chemical constituents from flowers of *Juglans regia* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(24): 7413–7419.

[2] 于晨晨. 核桃雄花多酚的分离纯化及其对褐变的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2022: 25–29.
Yu Chenchen. Isolation, purification of polyphenols from walnut male flowers and their effects on browning [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2022: 25–29.

[3] 曹智翔. 核桃雄花营养价值及其应用研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2020: 30–35.
Cao Zhixiang. Study on the nutritional value and application of walnut male flowers [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2020: 30–35.

[4] 陈柳, 段傲宜, 李宜静, 等. 枸杞多糖的生物活性及应用研究进展[J]. 食品工业科技,2025, 46(19): 455–467.
Chen Liu, Duan Aoyi, Li Yijing, et al. Research progress on biological activity and application of *Lycium barbarum* polysaccharide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(19): 455–467.

[5] 梁小飞, 张芳, 姜胤秀, 等. 枸杞多糖构-效关系研究进展与展望[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(9): 2387–2395.
Liang Xiaofei, Zhang Fang, Jiang Yinxiu, et al. Structure-activity

relationship of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(9): 2387–2395.

[6] 仇鸿雨, 刘畅, 任国领, 等. 超声辅助低共熔溶剂提取蒲公英粗多糖及其抗炎活性分析[J]. 粮食与油脂, 2025, 38(11): 102–108.
Qiu Hongyu, Liu Chang, Ren Guoling, et al. Ultrasonic assisted extraction of crude polysaccharides from dandelion using deep eutectic solvents and analysis of the anti-inflammatory activity [J]. Cereals & Oils, 2025, 38(11): 102–108.

[7] 孙玉玉, 任子钰, 苏娟, 等. 植物多糖的提取及生物学功能研究进展[J]. 中国果菜, 2025, 45(1): 31–37.
Sun Yuyu, Ren Ziyu, Su Juan, et al. Advances in extraction and biological functions of plant polysaccharides [J]. China Fruit & Vegetable, 2025, 45(1): 31–37.

[8] 乔金为, 陈陈, 张贺廷, 等. 超声辅助低共熔溶剂提取合欢花总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 现代中药研究与实践, 2025, 39(5): 51–57, 64.
Qiao Jinwei, Chen Chen, Zhang Heting, et al. Study on the extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from Albiziae Flos using ionic liquid assisted ultrasound method [J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2025, 39(5): 51–57, 64.

[9] Marwa O E, Ghoson M D. Nutritive profile, pharmaceutical potentials, and structural analysis of multifunctional bioactive fungal polysaccharides—a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 266: 130893.

[10] 牧丹, 白文明, 张曼, 等. 植物多糖调控肠道菌群干预免疫功能研究进展[J]. 中国食品学报, 2025, 25(8): 404–416.
Mu Dan, Bai Wenming, Zhang Man, et al. Research progress on plant polysaccharides regulating gut microbiota and intervening in immune function [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2025, 25(8): 404–416.

[11] 李婧. 枸杞多糖调节肠道菌群和 Tfh 细胞缓解类风湿关节炎的实验研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2025: 28–32.
Li Jing. Experimental study on *Lycium barbarum* polysaccharides alleviating rheumatoid arthritis by regulating intestinal flora and Tfh cells [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2025: 28–32.

[12] 郑俊, 段晨晨, 吕琴, 等. 基于粪菌移植探讨黄芪多糖对脾虚水湿不化模型大鼠肠道免疫炎症的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41(5): 1135–1139.
Zheng Jun, Duan Chenchen, Lv Qin, et al. Effect of astragalus polysaccharides on intestinal immune inflammation of rats with dampness stagnancy due to spleen deficiency syndrome based on fecal microbiota transplantation [J]. Chinese Journal of Immunology, 2025, 41(5): 1135–1139.

[13] 包钰菡, 郑伊琦, 陈雪昌, 等. 响应面法优化紫贻贝粗多糖酶解蛋白质脱除工艺及其抗氧化活性分析[J]. 粮食与油脂, 2025, 38(11): 123–130.
Bao Yuhan, Zheng Yiqi, Chen Xuechang, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis protein removal process of crude polysaccharides from *Mytilus edulis* by response surface method and analysis of its antioxidant activity [J]. Cereals & Oils, 2025, 38(11): 123–130.

[14] 郑玉凤, 陈兆媛, 喻丹丹, 等. 超声波辅助纤维素酶提取佛手山药多糖及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(23): 115–123.
Zheng Yufeng, Chen Zhaoyuan, Yu Dandan, et al. Ultrasound-assisted cellulase extraction of *Dioscorea polystachya* polysaccharides and its antioxidant activity [J]. Food Research and Development, 2025, 46(23): 115–123.

[15] 万楚. 肠道菌群体外发酵模型构建及多糖类益生元调控菌群的构效关系探究[D]. 南宁: 广西大学, 2024: 28–32.
Wan Chu. Construction of *in vitro* intestinal flora fermentation model and exploration of structure-activity relationship of polysaccharide prebiotics regulating flora [D]. Nanning: Guangxi University, 2024: 28–32.

[16] 凌冰清, 刘利平, 冯杰, 等. 灵芝多糖的体外发酵特性及其对肠道菌群的调节作用[J]. 中国食品学报,2025, 25(8): 33–44.
Ling Bingqing, Liu Liping, Feng Jie, et al. *In vitro* fermentation characteristic of polysaccharides from Ganoderma lucidum and regulatory effects on gut microbiota [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2025, 25(8): 33–44.

[17] 曾越. 蓝莓叶多酚对抗生素所致肠道菌群紊乱的调节作用[D]. 成都: 成都大学, 2025: 42–45.
Zeng Yue. Regulatory effect of blueberry leaf polyphenols on intestinal flora disturbance induced by antibiotics [D]. Chengdu: Chengdu University, 2025: 42–45.

[18] 王闪闪. 基于人肠道微生物体外发酵模型的益生元和益生菌的功能评价和配伍研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020: 52–55.
Wang Shanshan. Functional evaluation and compatibility study of prebiotics and probiotics based on human intestinal microbiota *in vitro* fermentation model [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020: 52–55.

[19] 屠寒, 蔡旭, 柳鑫. 酶-超声辅助低共熔溶剂提取莓茶总黄酮的工艺优化及降糖活性研究[J]. 食品科技, 2025, 50(7): 188–197.
Tu Han, Cai Xu, Liu Xin. Optimization and hypoglycemic activity of enzyme-ultrasonic assisted deep eutectic solvent extraction of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* [J]. Food Science and Technology, 2025, 50(7): 188–197.

[20] Lin Sixu, Meng Xianjun, Tan Chang, et al. Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* extracted using an ultrasonic-microwave-assisted natural deep eutectic solvent extraction method [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 89: 106102.

[21] 于秋菊, 王晓丽. 复合酶辅助低共熔溶剂提取枸杞子多糖的工艺优化及活性研究[J]. 食品科技, 2022, 47(12): 171–179.
Yu Qiuju, Wang Xiaoli. Optimization and activity of complex enzyme assisted deep eutectic solvents of polysaccharide extraction from *Lycium barbarum* [J]. Food Science and Technology, 2022, 47(12): 171–179.

[22] Wang Xinyue, Sheng Yijie, Cui Haiyang, et al. Corner engineering:

tailoring enzymes for enhanced resistance and thermostability in deep eutectic solvents [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2024, 63(2): e202315125.

[23] Gao Jingyu, Xie Longli, Peng Yu, et al. Deep eutectic solvents as new extraction media for flavonoids in mung bean [J]. Foods, 2024, 13(5): 777.

[24] Wan Yuyue, Huang Minyi, Xu Xiang, et al. Effects of short-term continuous and pulse cadmium exposure on gut histology and microbiota of adult male frogs (*Pelophylax nigromaculatus*) [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2022, 94. https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103926.

[25] Parada V D, De La Fuente M K, Landskron G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 277.

[26] Moens F, Verce M, Devuyst L. Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 241: 225–236.

[27] Marchesi J R, Adams D H, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier [J]. Gut, 2016, 65(2): 330–339.

[28] Li Wenbin, Zhang Yanyan, He Lihua, et al. *Oral astragalus* polysaccharide alleviates adenine-induced kidney injury by regulating gut microbiota-short-chain fatty acids-kidney G protein-coupled receptors axis [J]. Renal Failure, 2024, 46(2): 145–158.

[29] Xu Hui, Zhang Dan, Liu Dong, et al. The multifaceted roles of common gut microbiota in immune checkpoint inhibitor-mediated colitis: from mechanism to clinical application [J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 897654.

[30] Kinoshita O, Yun J W, Choe K S, et al. Quinone-dependent D-lactate dehydrogenase dld (cg1027) is essential for growth of Corynebacterium glutamicum on D-lactate [J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 56.

[31] Sha Ying, Gao Jing, Kong Zhen, et al. Causal effects of gut microbiota on sepsis and sepsis-related death: insights from genome-wide mendelian randomization, single-cell RNA, bulk RNA sequencing, and network pharmacology [J]. Journal of Translational Medicine, 2024, 22(1): 123.

[32] Shi Yong, Liu Yuanxiang, Xie Kai, et al. Sanguinarine improves intestinal health in grass carp fed high-fat diets: involvement of antioxidant, physical and immune barrier, and intestinal microbiota [J]. Antioxidants, 2023, 12(7): 1689.

[33] Huang Liqing, Abdelaziz M, Yang Feng, et al. Simultaneous quantification of straight-chain and branched-chain short chain fatty acids by gas chromatography mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2018, 1092: 359–367.

(责任编辑: 韩晓红　曹岱琳)