

基于小鼠粪便气味信息的牛乳清蛋白功能效果的鉴别区分

龙 鸣^{1,2}, 张 棚^{1,2}, 刘元林^{1,2}, 摆小琴^{1,2}, 张福梅², 田晓静^{1,2,*}, 曹 竑¹, 周雪雁¹, 马忠仁², 罗 丽³, 宋 礼³, Nurul Izza NORDIN⁴

(1. 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730124; 2. 西北民族大学 生物医学研究中心中国-马来西亚国家联合实验室, 甘肃 兰州 730030; 3. 甘南州牦牛乳研究院, 甘肃 合作 747000; 4. Industrial Biotechnology Research Centre, SIRIM Berhad, Shah Alam, Selangor 40700, Malaysia)

摘 要:以电子鼻气敏传感器阵列跟踪牛乳清蛋白干预小鼠粪便气味,以期建立基于气味信息无损评价牛乳清蛋白功能的新方法。动物实验结果表明,与 NS 组比较,给药牛乳清蛋白试验组血清中的超氧化物歧化酶(SOD)活性上升,丙二醛(MDA)含量显著下降,牛乳清蛋白在小鼠血清中具有抗氧化的能力。电子鼻实验单因素方差分析发现,样品量、顶空生成时间、顶空生成体积和载气流速对传感器 S5 影响均不显著,对其他传感器响应信号的影响显著。结合典则判别分析获得电子鼻检测较佳条件为:样品量 1 粒,顶空生成时间 10 min,顶空生成体积 150 mL,载气流速 200 mL·min⁻¹。结合主成分分析和典则判别分析,电子鼻基本可将牛乳清蛋白不同灌胃剂量与对照组小鼠粪便样品区分,并区分不同灌胃剂量的不同周期组小鼠粪便样品。采用多元线性回归分析建立了小鼠体重的预测($R^2=0.1227$),效果尚可。典型相关分析结果表明,粪便电子鼻气味信息与其生理指标两者有着极好的相关性,关联性较强。基于干预小鼠粪便气味信息,可以实现牛乳清蛋白干预与对照药物处理的区分,为食品体内功能性无创评价提供了方法思路。

关键词:电子鼻;牛乳清蛋白;气味信息;衰老小鼠;无创评价

中图分类号:S818

文献标志码:A

文章编号:1004-1524(2021)04-0714-10

Identification of functional effects of bovine whey protein based on odor information of mouse feces

LONG Ming^{1,2}, ZHANG Peng^{1,2}, LIU Yuanlin^{1,2}, BAI Xiaoqin^{1,2}, ZHANG Fumei², TIAN Xiaojing^{1,2,*}, CAO Hong¹, ZHOU Xueyan¹, MA Zhongren², LUO Li³, SONG Li³, Nurul Izza NORDIN⁴

(1. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730124, China; 2. China-Malaysia National Joint Laboratory, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 3. Gannan Research Institute of Yak Milk, Hezuo 747000, China; 4. Industrial Biotechnology Research Centre, SIRIM Berhad, Shah Alam, Selangor 40700, Malaysia)

Abstract: In order to establish a new method for nondestructive evaluation of bovine whey protein function based on odor information, the gas sensor array of electronic nose (E-nose) was used to track the flavor of fecal samples of

收稿日期:2020-08-05

基金项目:甘肃省科技计划(18JR3RA371);西北民族大学中央高校基本科研业务费资金(31920190022);科技部援助项目(KY201501005);教育部动物医学生物工程创新团队(IRT_17R88)

作者简介:龙鸣(1994—),女,广西柳州人,硕士研究生,研究方向为预防兽医食品质量控制与检测。E-mail:1450290267@qq.com

* 通信作者,田晓静,E-mail:smile_tian@yeah.net

mice affected by bovine whey. The results showed that compared with the NS group, the superoxide dismutase (SOD) activity in the serum of the bovine whey protein test group was increased, and the malondialdehyde (MDA) content was significantly decreased. The bovine whey protein has antioxidant capacity in the mouse serum. The electronic nose experiment showed that the effects of sample weight, headspace generation time, headspace generation volume and flow rate carrier gas on the response signal of the sensor were studied by one-way ANOVA. It was found that the response of E-nose sensors was affected by sample weight, headspace generation time, headspace generation volume and flow rate carrier gas significantly, except for S5. The experiment condition for E-nose was optimized as followed: 1 sample, 10 min of headspace generation time, 150 mL of headspace generation volume and 200 mL·min⁻¹ of carrier gas flow rate. To distinguish the difference of doses of bovine whey protein and control group, principle component analysis (PCA) and canonical discriminant analysis (CDA) could discriminate the samples of different groups, and could distinguish the fecal samples of mice of different cycle groups with different gavage doses. For the prediction of the weight, the multiple linear regression analysis (MLR) was employed, and effect predictive model was built for weight ($R^2 = 0.1227$), the effect was acceptable. The typical correlation analysis results showed that the odor information of electronic stool had an excellent correlation with its physiological indicators, and the correlation was strong. Based on the odor of fecal samples of mice, it's possible to distinguish the effect of bovine whey protein treatment with the controls, providing an idea for the non-invasive evaluation of functional food *in vivo*.

Key words: electronic nose; bovine whey protein; odor information; aging mice; non-invasive evaluation

乳清蛋白(whey protein)是乳中除酪蛋白外多种蛋白质组分的统称,具有促进蛋白质合成、矿物质吸收、降低血糖^[1]、降低血压^[2]和血脂水平^[3]、抑菌^[4]、抗癌^[5]和抗氧化^[6]等功能,可维持机体健康和修复损伤,还可提高菌群多样性,提高或维持肠道益生菌的相对丰度,同时降低肠道有害菌群的丰度^[7-8]。作为公认的人体优质蛋白质补充剂之一,乳清蛋白在临床治疗上适用于维持和提高机体免疫力,抗自由基、延缓人体衰老进程,提升肾功能,促进伤口愈合等疾病^[9-10]。目前,对于乳清蛋白的功能特性研究,主要是通过建立动物模型实验和人体临床试验进行探究,对实验动物的依赖大^[11],为获取生理生化与形态学指标需处死实验动物,与动物保护主义背道而驰,且分析过程繁琐,消耗大量人力、物力和财力;因此,对实验动物实施快速、无创的评价具有重要的科学意义。

电子鼻(electronic nose, E-nose)利用气敏传感器阵列对挥发性气味物质的响应来识别简单和复杂气味信息^[12],已在食品^[13]、农产品品质^[14]中广泛应用。粪便是机体整体代谢终产物输出的主要途径之一,其代谢物的变化不仅能够反映机体整体代谢的特征,还是膳食和营养调节影响的外在表现^[15]。目前,基于代谢物中挥发性成分呈味电子鼻检测的研究主要包含食品功

能性成分体内功效评价及其代谢监控等,仅限于针对外部条件对粪便挥发性代谢物气味的影响^[16-18]、功能成分体内评价^[19-20]、肠道菌群结构预测^[21]等方面。利用粪便挥发性气味物质的气味信息无创评价食品体内功能性的研究较少。

本研究旨在探讨通过电子鼻监测小鼠粪便样品气味信息快速无损评价牛乳清蛋白干预对衰老小鼠的影响,进而为基于粪便气味评价食品功能性奠定基础。本文以衰老模型小鼠为研究对象,采用电子鼻追踪牛乳清蛋白干预小鼠粪便气味,同时监测小鼠体重、周龄;结合模式识别方法评价气味信息对小鼠的影响,并建立小鼠体重的定量预测模型。本研究的结果可为突破依靠传统生化指标进行功效区分评价的模式提供思路与技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

健康成年雌性 C57BL/6 小鼠,54 只,体重 23 ~ 27 g,由兰州大学实验动物中心提供。小鼠饲养于昼夜分明洁净的环境中,按时添加鼠粮与水源,动物实验符合国家动物伦理的规范与准则。

1.1.2 实验试剂

D-半乳糖与维生素 C(V_C)购买自美仑生物,

生理盐水(NS)购买自四川科伦药业股份有限公司,鲜牛乳购于兰州伊利乳业有限责任公司,超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.1.3 检测指标

SOD 活性测定采用羟胺法;MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸比色(TBA)法。体重增长率(%)=(乳清蛋白干预不同周数后体重-乳清蛋白干预前体重)/乳清蛋白干预前体重×100。胸腺/体重($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)=乳清蛋白干预后胸腺质量(mg)/乳清蛋白干预后体重(g)。

1.1.4 仪器

检测仪器采用德国 AIRSENSE 公司的 PEN3 型便携式电子鼻。主要包括以下硬件部分:传感

器阵列(包含10个金属传感器,其属性见表1)、采样与清洗通道、数据采集系统和计算机组成。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组

按随机数字表将实验小鼠分为6组,每组9只小鼠,分组见表2。

1.2.2 牛乳清蛋白制备

鲜牛乳于4℃、5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心30 min,弃去上层乳脂,脱脂乳在室温下用1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的HCl调pH至4.6,40℃水浴20 min后于4℃、8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min,收集上清液。将上清液冷冻干燥,备用。

1.2.3 衰老动物模型制备与牛乳清蛋白抗衰老治疗

表1 电子鼻传感器阵列与性能

Table 1 E-Nose sensor array and performance

传感器简称 Abbreviation	传感器名称 Sensor name	性能特点 Sensor properties	灵敏物质及阈值 Limitations/($\text{mL} \cdot \text{cm}^{-3}$)
S1	W1C	对芳香类成分灵敏 Sensitive to aromatic components	甲苯 Toluene,10
S2	W5S	对氮氧化合物很敏感 Very sensitive to nitrogen oxide	二氧化氮 Nitrogen dioxide,1
S3	W3C	对氨水,对芳香类化合物敏感 Sensitive to ammonia and aromatic compounds	苯 Benzene,10
S4	W6S	对氢气有选择性 Selective to hydrogen	氢气 Hydrogen,100
S5	W5C	对烷烃和芳香类化合物灵敏 Sensitive to alkanes and aromatic compounds	丙烷 Propane,1
S6	W1S	对甲烷灵敏 Sensitive to methane	甲烷 Methane,100
S7	W1W	对硫化物灵敏 Sensitive to sulfide	硫化氢 Hydrogen sulfide,1
S8	W2S	对乙醇灵敏,对部分芳香类化合物也有响应 Sensitive to ethanol and response to some aromatic compounds	一氧化碳 Carbon monoxide,100
S9	W2W	对芳香成分和有机硫化物灵敏 Sensitive to aromatic components and organic sulfides	硫化氢 Hydrogen sulfide,1
S10	W3S	对烷烃灵敏 Sensitive to alkanes	甲烷 Methane,10

表2 动物分组表

Table 2 Animal grouping table

分组 Grouping	组名 Group name	小鼠灌胃药物 Intragastric administration of drugs in mice	D 半乳糖灌胃 D-galactose intragastric administration/ ($12.5 \text{ mg} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	抗衰老治疗 Anti-aging therapy/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)
自然空白组 Natural blank group	NS-N	NS	-	-
衰老空白对照组 Senile blank control group	NS	NS	+	同等体积 Equal volume
抗衰老阳性对照组 Anti-aging positive control group	VC	V _C	+	300
抗衰老实验组 Anti-aging experimental group	CWP-L	牛乳清蛋白低浓度组 Low concentration group of bovine whey protein	+	100
	CWP-M	牛乳清蛋白中浓度组 Medium concentration group of bovine whey protein	+	200
	CWP-H	牛乳清蛋白高浓度组 High concentration group of bovine whey protein	+	400

对 VC 组、NS 组、CWP-L 组、CWP-M 组和 CWP-H 组实验小鼠,颈背部皮下注射 10% *D*-半乳糖生理盐水注射液 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续 6 周制备衰老小鼠。实验组牛乳清蛋白灌胃给药按照低(每只 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中(每只 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、高(每只 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)3 个浓度梯度;VC 阳性对照组按每只 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药,衰老空白对照组给予同等体积的 NS,自然空白组给予同等体积的 NS。持续 7 周,各组在给药的同时,持续给予 *D*-半乳糖生理盐水颈背部皮下注射。

1.2.4 指标检测

乳清蛋白干预 7 周后,检测体重。小鼠断头采血,4 ℃ 静置 2 h, $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min。检测血清中 SOD 和 MDA,小鼠解剖分离胸腺,称重。

1.2.5 电子鼻检测方法

样品收集:将小鼠置于洁净鼠笼,以牛乳清蛋白干预 7 周,每隔 7 d 收集粪便每笼收集 40 粒粪便,置于 5 mL 无菌离心管, -80 ℃ 保存备用。实验前,将样品恢复至室温,进行电子鼻检测。

电子鼻检测:电子鼻响应信号受样品量、顶空生成时间、顶空生成体积及载气流速等因素影响,故采用单因素实验优化实验条件(表 3)。每次检测,取粪便样品于烧杯中,保鲜膜封口静置一定时间,使其生成一定的顶空气体,后进行电子鼻检测,每组样品 40 个平行,设定电子鼻信号采集时间 60 s,清洗时间 80 s,本研究均选取传感器稳态第 59 秒响应值进行后续分析。

1.3 数据统计分析方法

表 4 小鼠生理指标检测结果

Table 4 Test results of physiological indexes of mice

组别 Group	SOD/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA/($\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	体重增长率 Weight growth rate/%	胸腺指数 Thymus index/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
NS-N	$82.444 \pm 0.296 \text{ ac}$	$2.000 \pm 0.544 \text{ a}$	$17.626 \pm 2.909 \text{ ac}$	$2.967 \pm 0.208 \text{ a}$
NS	$42.500 \pm 1.516 \text{ bc}$	$5.763 \pm 0.690 \text{ bc}$	$0.356 \pm 0.311 \text{ bc}$	$2.367 \pm 0.116 \text{ bc}$
VC	$76.125 \pm 4.788 \text{ ab}$	$3.051 \pm 0.963 \text{ a}$	$3.516 \pm 1.576 \text{ ab}$	$2.967 \pm 0.252 \text{ a}$
CWP-L	$62.625 \pm 3.123 \text{ abc}$	$3.177 \pm 1.434 \text{ a}$	$5.932 \pm 0.547 \text{ abc}$	$3.067 \pm 0.404 \text{ a}$
CWP-M	$63.833 \pm 1.650 \text{ abc}$	$3.307 \pm 0.299 \text{ a}$	$3.605 \pm 1.562 \text{ ab}$	$2.967 \pm 0.379 \text{ a}$
CWP-H	$70.625 \pm 4.330 \text{ abc}$	$2.943 \pm 0.728 \text{ a}$	$5.042 \pm 1.277 \text{ ab}$	$2.967 \pm 0.416 \text{ a}$

数据后标有字母 a、b、c 分别表示与衰老空白对照组(NS)、自然空白组(NS-N)、抗衰老阳性对照组(VC)相比差异显著($P < 0.05$)。

The letters a, b and c after the data indicated that there were significant differences compared with the senile blank control group (NS), natural blank group (NS-N) and anti-aging positive control group (VC) ($P < 0.05$).

表 3 电子鼻单因素试验水平表

Table 3 Single factor test level table for E-nose

因素 Factor	水平 Level		
	1	2	3
样品量(粒数) Sample volume(grain number)	1	2	3
顶空生成时间 Headspace-generated time/min	5	10	15
顶空生成体积 Headspace-generated volume/mL	150	250	500
载气流速 Carrier gas velocity/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	200	300	400

采用典则判别分析(canonical discriminant analysis, CDA)和方差(one-way ANOVA)分析,以确定较佳的电子鼻检测参数。采用 CDA 和主成分分析(principal component analysis, PCA)综合判别不同灌胃给药物和不同灌胃给药周数小鼠粪便的差异。采用典型相关分析(canonical correlation analysis, CCA),综合判别小鼠粪便电子鼻气味信息与其生理指标的相关性。采用多元线性回归模型(multiple linear regression, MLR)建立电子鼻信号与小鼠的体重变化和衰老周期的关联关系。数据分析采用 Excel、SPSS 16 软件和 SAS V8 软件分析,由 Origin8 Pro 制图。

2 结果与分析

2.1 小鼠生理指标检测结果

牛乳清蛋白对小鼠血清中 SOD、MDA 和脏器指数、体重变化率的影响,结果见表 4。NS-N 组、VC 组、CWP-L 组、CWP-M 组和 CWP-H 组与 NS 组相比,血清中的 SOD 活性均升高,MDA 显著含量均降低,表明牛乳清蛋白和 V_c 在小鼠血清中一样具有抗氧化的能力,且抗氧化能力的强弱与小鼠的给药量存在一定关系。给药牛乳清蛋

白各试验组小鼠的胸腺指数与 NS 组比较,差异均显著,与 NS-N 组比较,差异均不显著,说明牛乳清蛋白对小鼠胸腺指数没有影响,对小鼠的组织器官没有毒害作用。

2.2 电子鼻检测较佳条件优化确定

2.2.1 样品量对电子鼻响应信号的影响

取粪便样品于顶空生成时间为 10 min、顶空生成体积 250 mL、300 mL·min⁻¹载气流速、采样 60 s,清洗 80 s,研究样品量(1、2、3 粒)对电子鼻传感器响应信号的影响。方差分析和 CDA 结果见表 5 和图 1-a。方差分析结果表明:样品量对传感器 S4、S7、S8 和 S9 的影响统计学差异极显

著($P < 0.01$),传感器 S2 和 S3 的影响统计学差异显著($P < 0.05$),其他传感器影响不显著。图 1-a 中,CDA 分析结果第一主成分占 72.51%,第二主成分占 27.49%,总贡献率为 100%,能反映全部原始数据信息。样品量 2 粒和样品量 3 粒组数据点有部分重叠,样品量 1 粒的数据能与样品量 2 粒和样品量 3 粒组的数据有很好的区分,且样品量 1 粒组的数据点较为集中,所以选择 1 粒老鼠粪便作为较佳的样品量。

2.2.2 顶空生成时间对电子鼻响应信号的影响

取粪便样品 1 粒、顶空生成体积 250 mL、载气流速 300 mL·min⁻¹、采样时间 60 s,清洗 80 s,

表 5 单因素方差分析结果

Table 5 Results for one-way analysis of variance

因素 Factor		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
样品量	<i>F</i>	2.25	6.04	3.86	22.95	2.87	2.21	36.73	9.40	43.30	1.38
Sample volume	<i>P</i>	0.110 2	0.003 2	0.023 9	<0.000 1	0.060 7	0.114 2	<0.000 1	0.000 2	<0.000 1	0.256 8
顶空生成时间	<i>F</i>	23.15	3.31	35.14	3.78	1.30	15.57	6.32	18.09	5.82	15.66
Headspace-generated time	<i>P</i>	<0.000 1	0.040 0	<0.000 1	0.025 7	0.275 6	<0.000 1	0.002 5	<0.000 1	0.003 9	<0.000 1
顶空生成体积	<i>F</i>	19.00	1.60	30.66	39.14	3.63	34.10	20.56	18.83	12.05	32.64
Headspace-generated volume	<i>P</i>	<0.000 1	0.206 6	<0.000 1	<0.000 1	0.029 6	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1
载气流速	<i>F</i>	12.66	24.22	21.06	79.43	0.49	34.16	47.93	15.68	50.64	12.78
Carrier gas velocity	<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	0.613 5	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

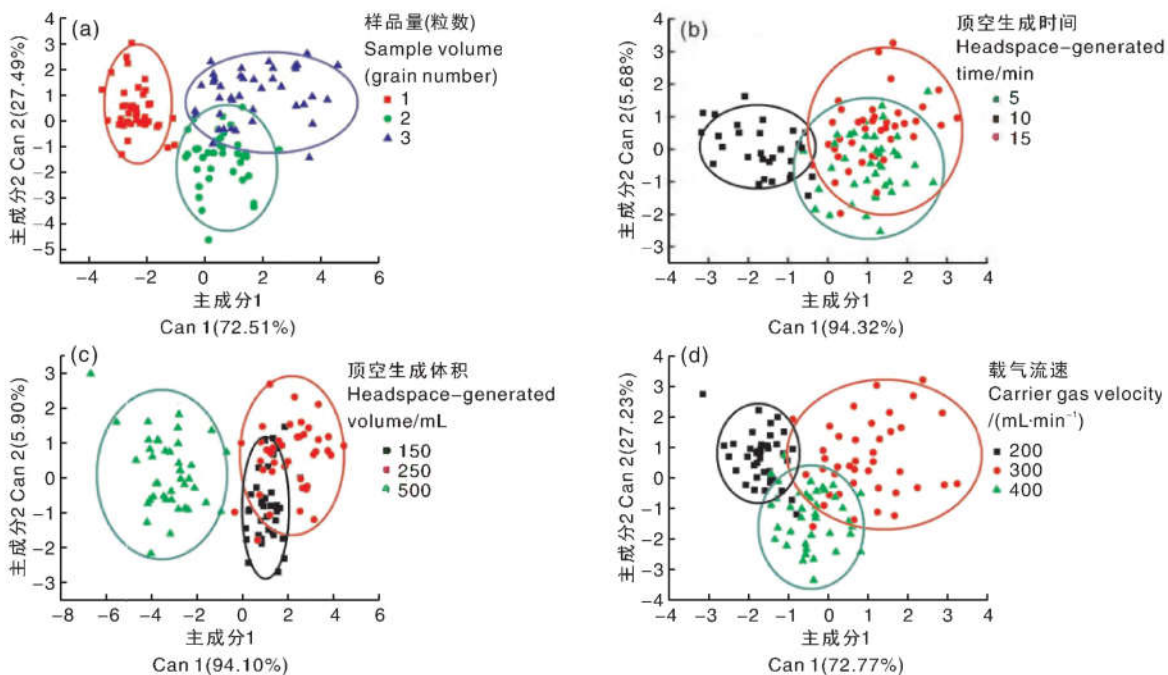


图 1 电子鼻单因素实验的 CDA 分析结果

Fig.1 CDA analysis results of E-nose single factor experiment

研究顶空生成时间(5、10、15 min)对电子鼻传感器响应信号的影响。方差分析和 CDA 结果见表 5 和图 1-b。方差分析结果表明:顶空生成时间对传感器 S1、S3、S6、S7、S8、S9 和 S10 影响极显著($P < 0.01$);对传感器 S2 和 S4 的影响显著($P < 0.05$),对传感器 S5 影响不显著。CDA 结果中第一成分占 94.32%,第二主成分占 5.68%,总贡献率为 100%,能反映全部的原始数据信息。图 1-b 中,5 min 和 15 min 彼此有较多重叠;10 min 数据组能与 5 min 和 15 min 组的数据有很好的区分;且 10 min 组的数据点聚集性较好,故选择 10 min 作为最佳的顶空生成时间。

2.2.3 顶空生成体积对电子鼻响应信号的影响

取粪便样品 1 粒、顶空生成时间 10 min、载气流速 $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、采样时间 60 s、清洗 80 s,研究顶空生成体积(150、250、500 mL)对电子鼻传感器响应信号的影响。方差分析和 CDA 结果见表 5 和图 1-c。由方差分析结果表明:顶空生成体积对传感器 S2 影响不显著($P > 0.05$),对传感器 S5 影响显著($P < 0.05$),对其余 8 个传感器的影响极显著($P < 0.01$)。CDA 结果中第一主成分占 94.10%,第二主成分占 5.90%,总贡献率为 100%,能代表全部原始数据信息。图 1-c 中,不同顶空生成体积的数据点中,虽 150 mL 和 250

mL 彼此有重叠;但从数据点的聚集性来看,150 mL 的数据点相较于另两组数据点更为集中,所以选择 150 mL 作为最佳的顶空生成体积。

2.2.4 载气流速对电子鼻响应信号的影响

取粪便样品 1 粒、顶空生成时间 10 min、顶空生成体积 250 mL、采样时间 60 s、清洗 80 s,研究载气流速(200 、 300 、 $400 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)对电子鼻传感器响应信号的影响。方差分析和 CDA 结果见表 5 和图 1-d。方差分析结果表明:除载气流速对传感器 S5 影响不显著($P > 0.05$)外,对其余 9 个传感器的影响极显著($P < 0.01$)。CDA 结果中第一主成分占 72.77%,第二主成分占 27.23%,总贡献率为 100%,能反映全部的原始数据信息。图 1-d 中,不同载气流速数据点较为分散且相互之间都有交叠;但从数据点的聚集性来看, $200 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 数据组优于另外两组,故选择 $200 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 作为最佳的载气流速。

2.3 小鼠粪便气味信息传感器特征响应曲线

在 2.2 节优化的检测条件下,每隔 1 周检测采集的表 2 中不同灌胃给药小鼠的粪便样品气味信息。图 2 给出了 NS-N、VC、NS、CWP-L、CWP-M、CWP-H 组小鼠粪便样品第 7 周的电子鼻特征响应曲线。如图 2 所示,横坐标为检测时间,纵坐标为 10 根传感器响应信号。检测初期,

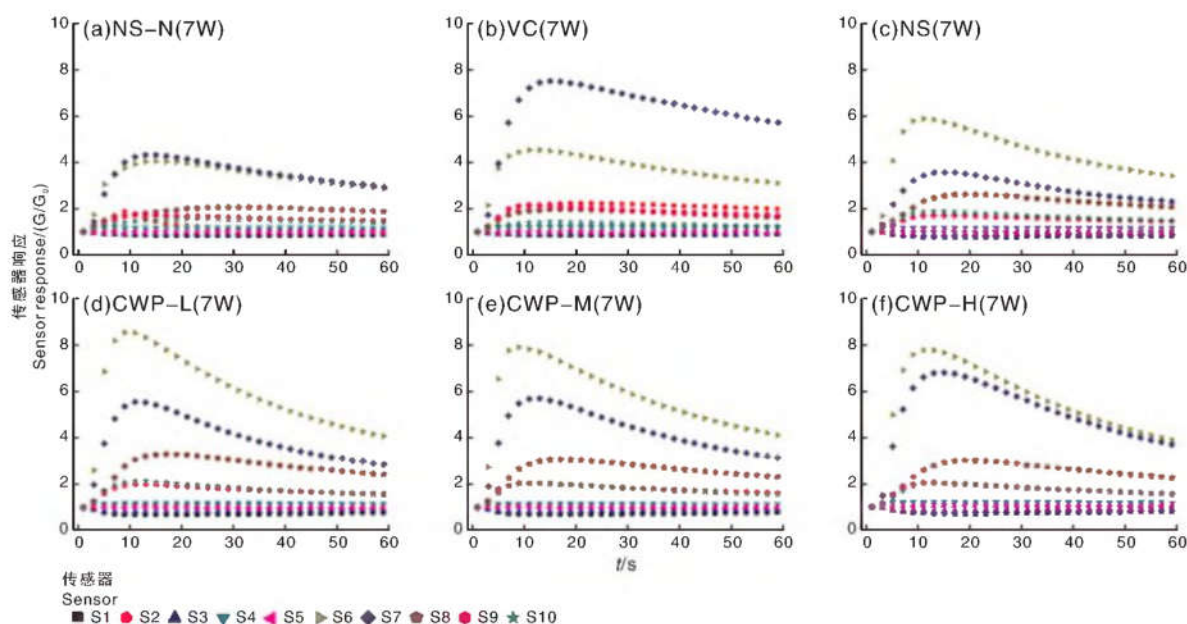


图2 不同灌胃给药组小鼠粪便样品的电子鼻特征响应信号(第7周)

Fig.2 Characteristic sensor response signals of fecal samples of mice in different groups (7th week)

传感器对小鼠粪便样品中的挥发物迅速响应,但基本都在40 s之后逐渐趋于平衡;而不同灌胃给药的小鼠粪便样品对信号强度的响应信号有所不同:对NS-N组和VC组小鼠粪便样品对传感器S7的响应最为强烈,其次为S6;而NS、CWP-L、CWP-M和CWP-H组的小鼠粪便样品对S6传感器的响应最为强烈,其次为S7。这为基于电子鼻信息检测区分不同灌胃给药的小鼠粪便及其7周变化的判别区分奠定了基础。

2.4 定性识别不同灌胃给药小鼠粪便样品

对NS-N组、VC组、NS组、CWP-L组、CWP-M组和CWP-H组小鼠粪便样品传感器第59秒响应,采用SAS软件进行PCA和CDA判别,结果见图3。从图3-a可知,第一主成分61.48%、第二主成分23.85%和第三主成分9.89%,共解释了原始变量95.22%的信息;PCA基本可将6种

干预小鼠粪便有效区分,且不同干预组数据点呈现规律性分布,即右侧的牛乳清蛋白组(CWP-L组、CWP-M组和CWP-H组)和左侧对照组(NS-N组、VC组和NS组)。图3-b CDA结果,第一主成分为65.62%,第二主成分为17.35%,共解释了原始变量82.97%的信息;除部分数据点重叠外,CDA基本可将6种干预小鼠粪便样品彼此区分,且数据点组内集聚,结合PCA和CDA,利用粪便的电子鼻气味可以实现鉴别不同干预小鼠粪便的气味,为基于气味信息的食品体内功能性评价提供基础。

2.5 定性识别不同灌胃给药周期小鼠粪便样品

对CWP-L组、CWP-M组和CWP-H组灌胃给药7周小鼠粪便样品传感器第59秒响应,采用SAS软件进行CDA判别,结果见图4。从图4-a可知,CWP-L组CDA结果第一主成分61.74%、

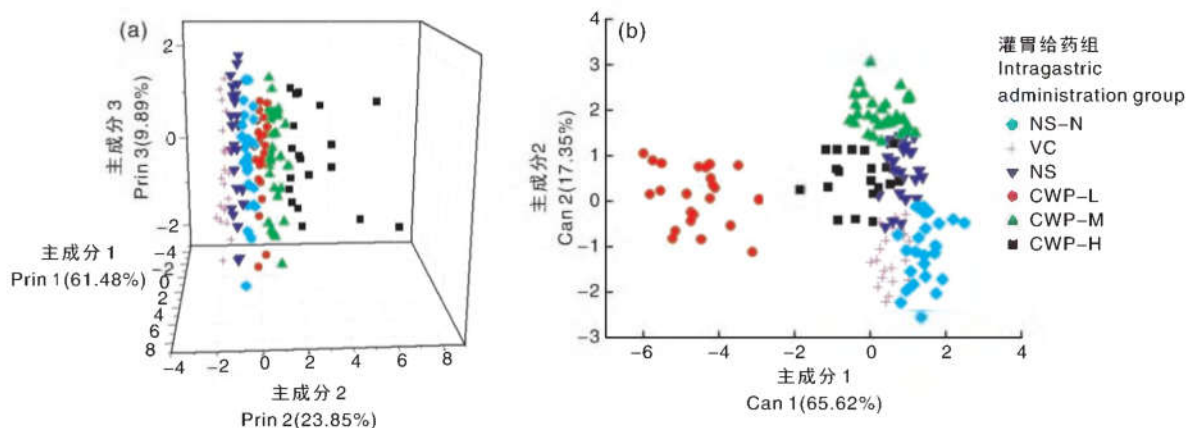


图3 不同灌胃给药小鼠粪便样品的电子鼻PCA(a)和CDA(b)判别结果(第7周)

Fig. 3 The results of PCA(a) and CDA(b) discrimination of mice feces treated by different intragastric administration(7th week)

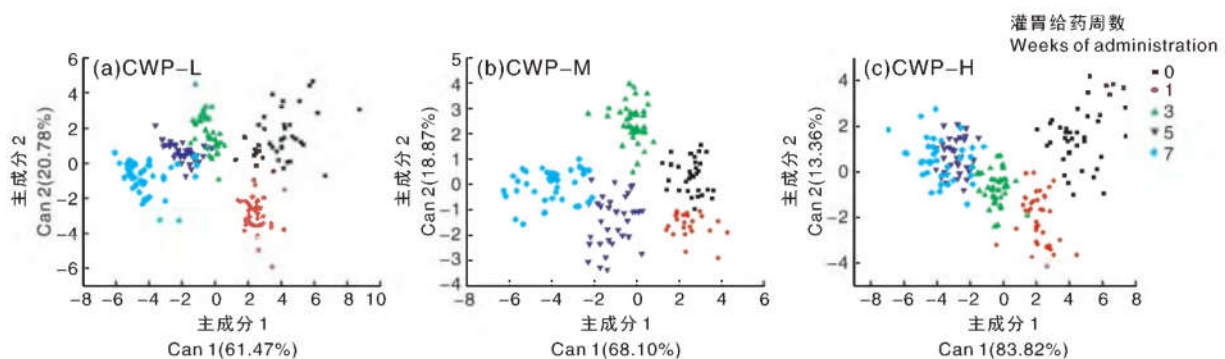


图4 灌胃给药低(a)、中(b)、高(c)浓度牛乳清蛋白的小鼠粪便样品7周气味信息变化的电子鼻CDA判别结果

Fig. 4 The results of electronic nose CDA discriminating the change of odor information in the fecal samples of mice with bovine whey protein at low (a), medium (b) and high (c) concentrations administered by gavage for 7 weeks

第二主成分 20.78%, 共解释了原始变量 82.52% 的信息; CWP-M 组 CDA 结果第一主成分 68.10%、第二主成分 18.87%, 共解释了原始变量 86.97% 的信息; CWP-H 组 CDA 结果第一主成分 83.82%、第二主成分 13.36%, 共解释了原始变量 97.18% 的信息; 除部分数据点重叠外, CDA 基本可将灌胃给药低(a)、中(b)、高(c)浓度牛乳清蛋白的小鼠粪便样品 7 周小鼠粪便有效区分, 且不同周数组数据点呈现规律性分布, 即从右向左依次递增灌胃给药周数(0 周组、1 周组、3 周组、5 周组和 7 周组), 数据点组内集聚。通过 CDA, 可利用粪便的电子鼻气味实现鉴别不同于干预周数小鼠粪便的气味。

2.6 与其生理指标相关关系

S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
0.2909**	0.3215**	0.2267**	0.1501*	-0.1456*	-0.1749**	0.2279**	-0.2419**	-0.0150	-0.2795**	SOD
0.000	0.000	0.000	0.020	0.024	0.007	0.000	0.000	0.818	0.000	
0.0360	-0.1499*	0.0966	-0.3021**	0.0857	-0.1478*	-0.2814**	-0.0944	-0.2553**	-0.0540	MDA
0.579	0.020	0.136	0.000	0.186	0.022	0.000	0.145	0.000	0.405	
0.2288**	0.3740**	0.1555*	0.2026**	-0.0953	-0.0955	0.3038**	-0.1711**	0.1031	-0.2179**	体重增长率
0.000	0.000	0.016	0.002	0.141	0.140	0.000	0.008	0.111	0.001	Weight growth rate
-0.1722**	0.0109	-0.2183**	0.2571**	-0.0798	0.2469**	0.1983**	0.2119**	0.2743**	0.1835**	胸腺指数
0.007	0.867	0.001	0.000	0.218	0.000	0.002	0.001	0.000	0.004	Thymus index

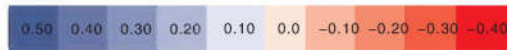


图5 小鼠粪便电子鼻气味信息与其生理指标的相关关系(第7周)

Fig.5 Correlation between the odor information of mouse fecal electronic nose and its physiological indicators (7th week)

2.7 定量预测小鼠的周期体重变化

为跟踪不同干预阶段小鼠体内变化, 采用多元性回归分析(MRL)建立了老小鼠周期体重的预测模型(图6)。

对小鼠体重, 建立的 MRL 预测模型方程为:

$$y_1 = 12.002S_1 - 1.119S_2 - 71.716S_3 - 5.095S_4 + 3.075S_5 + 0.303S_6 + 0.239S_7 - 1.252S_8 - 10123S_9 - 8.621S_{10} + 110.732. \quad (1)$$

式(1)中: y_1 为小鼠体重; S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 、 S_5 、 S_6 、 S_7 、 S_8 、 S_9 、 S_{10} 为各传感器的特征值。

所建预测模型的 $R_c^2 = 0.1227$, $RMSE_c = 2.0252$; 采用此模型进行预测时, $R_p^2 = 0.1161$, $RMSE_p = 2.8862$, 粪便气味信息与其形态具有一定的生物相关性。

结合小鼠第 7 周的粪便气味信息与生理指标, 通过典型相关分析, 如图 5 所示, 热图中表明生理指标 SOD 与传感器 S1、S2、S3、S6、S7、S8 和 S10 有极显著 ($P < 0.01$) 相关性, 与 S4、S5 有显著 ($P < 0.05$) 相关性; MDA 与传感器 S4、S7 和 S9 有极显著 ($P < 0.01$) 相关性, 与 S2、S6 有显著 ($P < 0.05$) 相关性; 体重增长率与 S1、S2、S4、S7、S8、S10 有极显著 ($P < 0.01$) 相关性, 与 S3 有显著 ($P < 0.05$) 相关性; 胸腺指数与传感器 S1、S3、S4、S6、S7、S8、S9、S10 有极显著 ($P < 0.01$) 相关性; 表明小鼠的粪便电子鼻气味信息与其生理指标两者有着极好的相关性, 为通过基于电子鼻信息检测不同灌胃给药物的小鼠粪便气味信息构建预测其体重变化率模型奠定了基础。

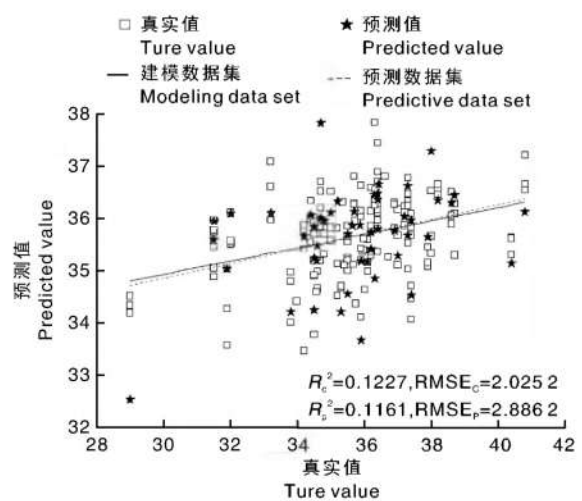


图6 MRL 定量预测小鼠体重变化模型

Fig.6 Predictive model built by MLR for body weight

3 结论与讨论

营养补充可影响肠道菌群结构,乳清蛋白可提高菌群多样性,还可提高或维持肠道益生菌的相对丰度,同时降低了肠道有害菌群的丰度^[7]。肠道菌群结构的变化进而影响代谢产物组成和含量的差异^[22-23],外部表现为气味的变化。通过电子鼻监控粪便气味变化,反映肠道菌群结构的变化,进而反应营养补充或膳食干预的作用仅有初步尝试研究。

因粪便中挥发性代谢物的电子鼻响应信号受外部条件的影响,如性别、年龄、体质指数(BMI)、抽烟史、饮食、合并疾病及用药等生活方式^[17],本研究通过方差分析结合 CDA 研究了不同因素对电子鼻传感器响应的影响,优化获得小鼠粪便气味信息电子鼻检测的条件为:粪便样品 1 粒、顶空生成时间 10 min、顶空生成体积 150 mL 和进样流速 200 mL·min⁻¹。对粪便气味信息,李书艺等^[19]在其研究中发现的荔枝壳原花青素低聚体灌胃 SD 大鼠粪便的气味响应明显低于空白组样品;综合 3 个观测时间点粪便气味信息,El Manouni el Hassani 等^[18]发现母乳(BM)和配方奶粉(FM)2 种喂养方式早产儿粪便挥发性组分气味差异显著;本研究发现,对不同干预小鼠粪便,其电子鼻气味信息强度均有差异。结合多元统计分析方法综合分析电子鼻气味信息时发现,电子鼻信息结合 PCA 和 CDA,均可将对应小鼠粪便样品判别区分,基于气味评价不同营养干预具有可信性,这与葛茵等^[21]对肠道发酵液气味的定性区分效果相似。基于肠道发酵液样品的气味指纹,葛茵等^[21]构建了菌门数据的预测模型;本研究采用多元线性回归模型建立了小鼠体重预测模型,其决定系数(R^2)值为 0.122 7,效果尚可;但通过典型相关分析结果表明,粪便电子鼻气味信息与其生理指标两者有着极好的相关性,关联性较强,为今后基于气味信息评价体内指标提供理论支撑,基于粪便中挥发性代谢物的传感器响应无创评价乳清蛋白体内活性具有可行性。

参考文献 (References):

- [1] 童星,董加毅,邬志薇,等. 乳清蛋白通过抗氧化作用改善模型大鼠的胰岛素抵抗[J]. 卫生研究, 2011, 40(5): 617-619.
- [2] TONG X, DONG J Y, WU Z W, et al. Whey protein improves insulin resistance via the increase of antioxidant capacity in model rats[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2011, 40(5): 617-619. (in Chinese with English abstract)
- [3] 杨晶. 乳清蛋白对高血压前期及 1 级高血压患者血压及血管内皮的作用效果[D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
- [4] YANG J. Effect of whey protein on blood pressure and vascular endothelium in prehypertension and Stage I hypertension patients[D]. Suzhou: Soochow University, 2017. (in Chinese with English abstract)
- [5] 孙海岚, 许红霞, 蒋宝泉. 乳清蛋白与水解乳清蛋白的研究进展与临床应用现状[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(23): 3364-3366.
- [6] SUN H L, XU H X, JIANG B Q. Research progress and clinical application of whey protein hydrolysis[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2014, 11(23): 3364-3366. (in Chinese)
- [7] HATI S, PATEL N, SAKURE A, et al. Influence of whey protein concentrate on the production of antibacterial peptides derived from fermented milk by lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2018, 24(1): 87-98.
- [8] 夏超, 许慧卿. 乳清蛋白的功能特性及在可食性膜中的应用[J]. 中国乳业, 2019(11): 82-84.
- [9] XIA C, XU H Q. Functional properties of whey protein and its application in edible membrane [J]. *China Dairy*, 2019(11): 82-84. (in Chinese)
- [10] GARG G, SINGH S, SINGH A K, et al. Whey protein concentrate supplementation protects rat brain against aging-induced oxidative stress and neurodegeneration [J]. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2018, 43(5): 437-444.
- [11] WANG H H, SHOU Y K, ZHU X, et al. Stability of vitamin B₁₂ with the protection of whey proteins and their effects on the gut microbiome[J]. *Food Chemistry*, 2019, 276: 298-306.
- [12] BIAGI E, FRANCESCHI C, RAMPELLI S, et al. Gut microbiota and extreme longevity[J]. *Current Biology*, 2016, 26(11): 1480-1485.
- [13] 冯晓慧, 蔡东联. 乳清蛋白在临床营养中的应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32(2): 55-58.
- [14] FENG X H, CAI D L. The application of whey protein in clinical nutrition[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2010, 32(2): 55-58. (in Chinese with English abstract)
- [15] 苏金玉. 乳清蛋白在临床营养中的应用分析[J]. 养生保健指南, 2016(43): 48.
- [16] SU J Y. Application of whey protein in clinical nutrition[J]. *Health Care Guide*, 2016(43): 48. (in Chinese)
- [17] 王锡乐, 巩薇, 贺争鸣, 等. 中国大陆地区实验动物使用

- 现状分析[J]. 实验动物科学, 2017, 34(6): 42-48.
- WANG X L, GONG W, HE Z M, et al. Investigation on the current situation of laboratory animal usage in China mainland [J]. *Laboratory Animal Science*, 2017, 34(6): 42-48. (in Chinese with English abstract)
- [12] 何国泉, 刘木华. 基于电子鼻的气敏传感器及其阵列[J]. 传感器世界, 2008, 14(7): 6-9.
- HE G Q, LIU M H. Gas sensors and array based on electronic nose[J]. *Sensor World*, 2008, 14(7): 6-9. (in Chinese with English abstract)
- [13] 吴守一, 邹小波. 电子鼻在食品行业中的应用研究进展[J]. 江苏理工大学学报(自然科学版), 2000, 21(6): 13-17.
- WU S Y, ZOU X B. Progress in the application research of electronic nose for foods[J]. *Journal of Jiangsu University of Science and Technology*, 2000, 21(6): 13-17. (in Chinese with English abstract)
- [14] 陈静, 孙宇, 沈丽. 电子鼻在农产品品质检测中的应用进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(3): 364-366.
- CHEN J, SUN Y, SHEN L. Application of electronic nose in detecting the quality of agriculture products[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(3): 364-366. (in Chinese with English abstract)
- [15] 李佳琪, 高丽, 王珂欣, 等. 快速老化小鼠 SAMP8 模型粪便代谢物和肠道菌群改变的研究[J]. 中草药, 2018, 49(10): 2265-2273.
- LI J Q, GAO L, WANG K X, et al. Fecal metabolome and gut microbiome alterations in a mouse model of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(10): 2265-2273. (in Chinese with English abstract)
- [16] BERKHOUT D, BENNINGA M, VAN STEIN R, et al. Effects of sampling conditions and environmental factors on fecal volatile organic compound analysis by an electronic nose device[J]. *Sensors*, 2016, 16(11): 1967.
- [17] BOSCH S, LEMMEN J P, MENEZES R, et al. The influence of lifestyle factors on fecal volatile organic compound composition as measured by an electronic nose[J]. *Journal of Breath Research*, 2019, 13(4): 046001.
- [18] EL MANOUNI EL HASSANI S, NIEMARKT H, SAID H, et al. Fecal volatile organic compounds in preterm infants are influenced by enteral feeding composition [J]. *Sensors*, 2018, 18(9): 3037.
- [19] 李书艺, 吴茜, 汪荣, 等. 膳食补充剂荔枝壳原花青素对大鼠排泄物的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 267-271.
- LI S Y, WU Q, WANG R, et al. Effect of *Litchi* pericarp procyanidins as a dietary supplement on excreta of rats [J]. *Food Science*, 2013, 34(15): 267-271. (in Chinese with English abstract)
- [20] OU J Z, COTTRELL J J, HA N, et al. Potential of *in vivo* real-time gastric gas profiling: a pilot evaluation of heat-stress and modulating dietary cinnamon effect in an animal model [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 33387.
- [21] 葛茵, 包璇, 刘诗语, 等. 通过电子鼻快速预测肠道菌群结构的方法研究[C]//中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十六届年会暨第十届中美食品业高层论坛论文摘要集. 北京: 中国食品科学技术学会, 2019: 385-386.
- [22] LESCHELLE X, GOUBERN M, ANDRIAMIHAJA M, et al. Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2005, 1725(2): 201-212.
- [23] HAMER H M, JONKERS D M A E, BAST A, et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans [J]. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 2009, 28(1): 88-93.

(责任编辑 张 韵)