

改性魔芋葡甘露聚糖对齐口裂腹鱼脂质代谢及 相关基因表达的影响

吕珍珍, 邬应龙*, 何梅, 严秋萍, 陈明睿, 冯莉梅, 赵嘉琪, 王冰莹
(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 对比了两种改性魔芋葡甘露聚糖对齐口裂腹鱼生长性能、肝脏基础成分、血清生化指标及肝脏相关基因表达的影响,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)对齐口裂腹鱼血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(T-CHO)及甘油三酯(TG)进行分析,利用实时荧光定量PCR技术对鱼类脂肪合成和沉积过程的关键基因肝脏脂蛋白酯酶(*lpl*)、肝酯酶(*hl*)、脂肪合成酶(*fas*)相对表达量进行定量分析。结果表明:改性魔芋葡甘露聚糖种类、添加剂量以及两者交互水平对齐口裂腹鱼生长均无显著影响。在魔芋葡甘露聚糖硫酸酯(OKGMS)改性条件下,随着添加剂量的增加肝脏脂肪、血清 LDL-C、T-CHO、TG 含量显著降低,当添加质量分数 1.6%OKGMS 达到最低;在酸解魔芋葡甘露聚糖改性条件下(AOKGM),随着添加剂量的增加血清 LDL-C、T-CHO、TG 质量分数呈先降低后增加趋势,当添加质量分数 0.8% AOKGM 达到最低,均与对照组达到显著差异。与基础组相比,添加质量分数 1.6%OKGMS、0.8% AOKGM 血清 HDL-C 显著增加,肝脏 *lpl* mRNA 表达量分别增加 7.7 和 2.7 倍。

关键词: 改性魔芋葡甘露聚糖 ; 齐口裂腹鱼 ; ELISA ; 荧光定量 PCR ; 脂质代谢

中图分类号:Q 539 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2018)07—0758—06

Effect of Modified Konjac Glucomannan on Lipid Metabolism and Related Gene Expression of *Schizothorax prenanti*

LV Zhenzhen, WU Yinglong*, HE Mei, YAN Qiuping,
CHEN Mingrui, FENG Limei, ZHAO Jiaqi, WANG Bingying
(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: To study the effect of two modified konjac glucomannan on the growth performance, the liver based ingredients, serum biochemical indicators and lipid metabolism-related gene expression of *Schizothorax prenanti*. *Schizothorax prenanti* serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), total cholesterol (T-CHO) and triglyceride (TG) were determined based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The number of lipoprotein lipase (*lpl*), hepatic lipase (*hl*) and fatty acid synthetase (*fas*) in the liver were quantified

收稿日期: 2016-05-20

基金项目: 四川农业大学“211”工程双支计划项目(2016)。

* 通信作者: 邬应龙(1963—),男,四川雅安人,工学博士,教授,主要从事功能性食品研究。E-mail:wuyinglong99@163.com

引用本文: 吕珍珍, 邬应龙, 何梅, 等. 改性魔芋葡甘露聚糖对齐口裂腹鱼脂质代谢及相关基因表达的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(07):758-763.

by real-time quantitative PCR. The results showed as follows: modified konjac glucomannan type, adding dose and the interaction level had no significant influence on *Schizothorax prenanti* growth, grossness degree. In konjac glucomannan sulfate (OKGMS) modification conditions, with the increase of adding dose liver fat, serum LDL - C and T - CHO and TG content decreased significantly, when adding 1.6% OKGMS reached the lowest; In Acid oxidation of konjac glucomannan (AOKGM), with the increase of adding dose serum LDL - C, T - CHO and TG content is increased after lower first, when adding 0.8% AOKGM reached the lowest, all groups significant differences with the control group. Compared with the basic group, adding 1.6% OKGMS, 0.8% AOKGM significantly increase serum HDL-C level, liver LPL mRNA expression quantity increased by 7.7 and 2.7 times respectively.

Keywords: modified konjac glucomannan, *Schizothorax prenanti*, ELISA, real-time quantitative PCR, lipid metabolism

葡甘露聚糖广泛存在于魔芋中,是一种不可消化的可溶性膳食纤维,但魔芋葡甘露聚糖在水中粘度大、溶解度低、流动性和溶胶稳定性差,使其应用受到限制。目前主要采用酶法、物理和酶酸结合的方法对葡甘露聚糖进行降解,提高其在水中的溶解度,扩大葡甘露聚糖的应用范围^[1]。

齐口裂腹鱼是中国特有的重要冷水性经济鱼类,肉质鲜嫩,营养价值高。鱼类营养性脂肪肝及腹腔脂肪过度蓄积的情况极易发生,这不仅会妨碍鱼类的生长,甚至还可能引发鱼类疾病,增加养殖成本^[2]。对齐口裂腹鱼脂质代谢方面的研究,主要集中在养殖中摄食蛋白质及脂肪含量等对鱼肉品质及脂质代谢影响,有关不同改性魔芋葡甘露聚糖对齐口裂腹鱼脂质代谢影响研究较少。

作者分别参考张辽^[3]、高松^[4]方法制备较低相对分子质量的酸解氧化魔芋和魔芋葡甘露聚糖硫酸酯,探讨在饲料中添加不同剂量两种不同改性方式的魔芋葡甘露聚糖对齐口裂腹鱼生长、血液、基因等脂质代谢方面的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氧化魔芋葡甘露聚糖(OKGM):四川农业大学食品学院功能性食品实验室提供。

高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(T-CHO)、甘油三酯(TG)试剂盒:南京建成生物工程研究所产品;琼脂糖:Sigma 公司产品;Golden view 染料、2×Taq PCR

Master Mix、DEPC -H₂O、Loading Buffer、DL 2000 Marker:天根(Tian gen)试剂公司产品;SYBR 荧光定量试剂盒、cDNA 反转录试剂盒均、RNA 提取 Trizol:Vazyme 试剂公司产品。

1.2 主要仪器

Bio-Rad 实时荧光定量 PCR 仪、Bio-Rad C1000 普通 PCR 仪、Bio-Rad 电泳仪、Varioskan Flash 全波长扫描式多功能读数仪(多功能酶标仪)、微量移液枪、ThermoFisher 高速低温离心机等。

1.3 实验动物

从雅安市天全县鱼泉乡购得 420 尾平均鱼体质量为(80±1.21) g 齐口裂腹鱼,购买后于作者所在实验室驯养 15 d。

1.4 试验设计与饲养管理

驯养结束后,按试验设计将实验动物分为 7 个组(每组 3 个重复,每个重复 20 尾),分别为对照组(基础饲料)、质量分数 0.4%OKGMS、0.8%OKGMS、1.6%OKGMS、0.4%AOKGM、0.8%AOKGM 和 1.6%AOKGM。每天按每缸体质量 2%投喂饲料,每日 3 次;早、晚对鱼缸进行换水,并清除缸内不溶物。饲养期 60 d(12 h 白昼,12 h 夜晚),24 h 不间断充氧,保持微流水。

1.5 生长性能指标测定

饲养 60 d 后,鱼体饥饿 24 h,从每缸中选取 5 尾鱼称量鱼体质量,解剖后取出肝胰脏、背肌及肠道脂肪的质量,用预冷的无菌生理盐水冲洗干净,滤纸吸干水分,称质量,置于-20 ℃冰箱,备用。测定鱼的肥满度,肝体比和肠脂比。

1.6 肌肉、肝脏基础成分的测定

肝脏基础成分测定参照食品安全国家标准 GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》105 ℃直接干燥法、GB/T 5009.6—2003《食品中脂肪的测定》索氏抽提法、GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》凯氏定氮法进行测定。

1.7 样品的采集和制备

称重后,尾静脉取血。将每尾鱼的血液,4 ℃条件下静置30 min待血液凝固后,于4 ℃条件下以3 000 g/min离心15 min,分离血清以用于血清中高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇、及甘油三酯的测定。测定方法参照试剂盒说明书方法进行。

每缸另取5尾鱼取血后,解剖鱼体,分别迅速

取出肝胰脏,迅速置于液氮中冷冻,再转入-80 ℃冰箱中保存,用于RNA提取。

1.8 肝脏脂质代谢相关基因定量分析

1.8.1 RNA提取 肝脏中RNA提取及纯化参照TaKaRa试剂盒方法进行。

1.8.2 后续实验为RT-PCR的cDNA合成 参照HiScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒说明书进行操作。

将产物cDNA稀释10倍保存于-20 ℃冰箱,用于后续荧光定量PCR反应。

1.8.3 脂质代谢相关引物 参照郑俏然^[4]等设计的齐口裂腹鱼脂质代谢相关引物 β -actin,fas,lpl,hl,选用 β -actin作为齐口裂腹鱼内参基因(引物设计见表1)。

表1 实时定量PCR引物序列

Table 1 Real-time quantitative PCR primer sequence

基因	引物	引物序列(5'-3')	扩增产物大小/bp	退火温度/℃
β -actin	F	GATTCGCTGGAGATGATGCT	218	55.8
	R	CGTTGTAGAAGGTGTGATGCC		
fas	F	CTGCCGAGTCTTCACAAC	145	55.8
	R	TCCTTGCCTTGAGTCTG		
lpl	F	GCAACAAACTACCCCTACATC	166	56
	R	GGTGAGAACGACCAGCAAT		
hl	F	CACACGAATACTGGGACAGG	268	56.2
	R	AGGGTAAATGTATGGATGGC		

1.8.4 荧光定量PCR 参考Tian等^[5]已报道的方法稍作修改,每个样品3个平行。采用SYBR Green I荧光染料法,对 β -actin,fas,lpl,hl引物进行荧光定量分析:10 μL反应体系,含5 μL SYBR® Premix Ex TaqTM (2×),cDNA 1 μL、上下游引物各0.25 μL、DEPC水3.50 μL。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s,相应退火温度30 s,39个循环后,进行95 ℃处理10 s;扩增完毕后,迅速降温到65 ℃进行溶解曲线分析,然后以0.5 ℃/s的速率从65 ℃升温到95 ℃,连续测定样品荧光强度以获取溶解曲线。

参考Livak等^[6]数据分析方法:比较对照组和基础组样本数据,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相关定量进行计算。

1.9 数据处理

采用SPSS22.0软件进行单因素方差分析,多重比较采用Duncan's检验法($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 OKGMS及AOKGM对齐口裂腹鱼基础生长指标的影响

与基础相比,OKGMS及AOKGM各添加剂量对鱼体体重、肥满度均无显著影响,当添加质量分数0.4%AOKGM时,显著增加鱼体的肝体比与肠脂比。

2.2 OKGMS及AOKGM对齐口裂腹鱼肝脏基础成分及血清生化指标的影响

与基础组相比,在OKGMS改性条件下,肝脏脂肪质量分数均有所降低,其中质量分数1.6%OKGMS差异显著;血清T-CHO质量分数均显著降低;血清HDL-C、TG含量均有所增加,其中0.4%OKGMS及0.8%OKGMS差异显著。与基础组相比,在AOKGM改性条件下,肝脏水分质量分数有所降低,其中0.4%AOKGM及0.8%AOKGM差异显著;

肝脏脂肪、血清 T-CHO 均显著降低;0.8%AOKGM 及 1.6%AOKGM 显著增加血清 HDL-C 及显著降低血清 TG 质量分数。

2.3 OKGMS 及 AOKGM 对肝脏相关基因 q-PCR 的影响

2.3.1 齐口裂腹鱼 *lpl*,*hl*,*fas* PCR 扩增结果 以反转录肝脏 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,产物通过 1 g/dL 琼脂糖凝胶检测后发现,分别得到 *fas* 145 bp, *lpl* 166 bp, *hl* 268 bp 目的产物,且条带清晰明亮,满足 PCR 分析要求。

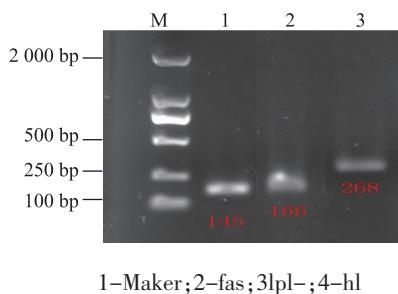


图 1 齐口裂腹鱼肝脏 *fas*,*lpl*,*hl* PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification results of *fas*,*lpl*,*hl* of Schizothorax prenanti

2.3.2 OKGMS 及 AOKGM 对肝脏 *lpl*,*hl*,*fas* 荧光定量的影响 *lpl* mRNA 在肝脏中相对表达量见图 2。与基础组相比,不同剂量 OKGMS、质量分数 0.4% AOKGM 及 1.6% AOKGM 组肝脏中 *lpl* mRNA 表达显著增加,0.8% AOKGM 组增加 2.7 倍。

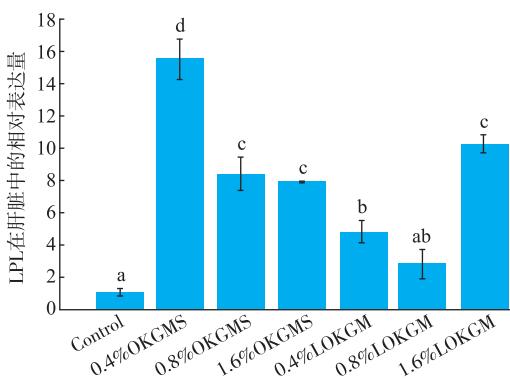


图 2 *lpl* mRNA 在肝脏中荧光定量 PCR 相对表达

Fig. 2 *lpl* mRNA Real-time quantitative PCR relative expression in the liver

hl mRNA 在肝脏中相对表达量见图 3。与基础组相比,不同剂量 OKGMS 及 AOKGM,*hl* mRNA 相对表达量没有显著差异。

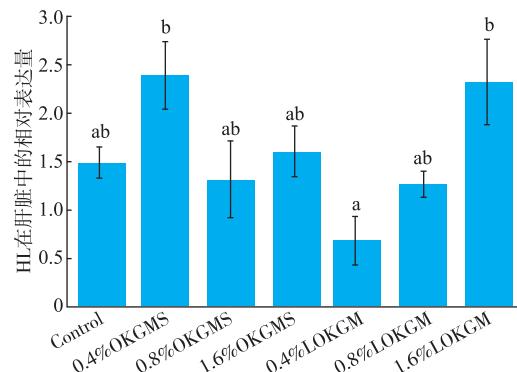


图 3 *hl* mRNA 在肝脏中荧光定量 PCR 相对表达

Fig. 3 *hl* mRNA Real-time quantitative PCR relative expression in the liver

fas mRNA 在肝脏中相对表达量见图 4。与基础组相比,1.6%AOKGM 显著增加了肝脏中 *fas* mRNA 相对表达量,其他各组没有显著差异。

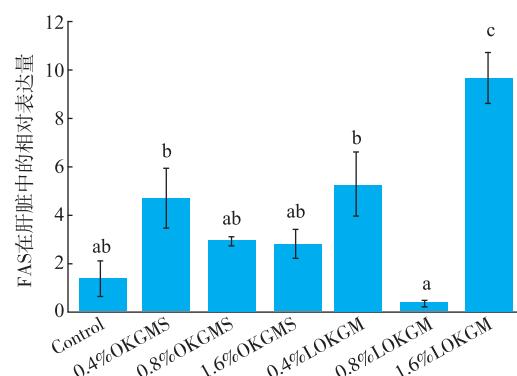


图 4 *fas* mRNA 在肝脏中荧光定量 PCR 相对表达

Fig. 4 *fas* mRNA Real-time quantitative PCR relative expression in the liver

3 讨论

肝脏是鱼体脂类代谢的重要器官^[7],在鱼体脂类消化、吸收、合成、分解等过程中起重要作用。

在陆地生物中发现,供给甘露寡糖(MOS)影响胆汁酸排泄、食糜上清液粘度或微生物方面变化影响肠脂质吸收,进而影响游离脂肪酸进入肝脏进行消耗^[8]。然而在鱼体方面,膳食纤维对脂质消化吸收的机制还不太清楚。肥满度、肝体比、肠脂比反应鱼体脂肪含量,过多脂肪在鱼肉、肝胰脏及肠系膜等处积累,不仅造成鱼肉品质差,鱼体利用率下降影响鱼体品质,且易形成脂肪肝造成病害。添加一定剂量 OKGMS 及 AOKGM 不会影响齐口裂腹鱼生长

效果,质量分数 0.4%AOKGM 显著增加齐口裂腹鱼肝体比、肠脂比。这与 Mansour 等^[9]证实巨鲟鱼摄食质量分数 0.2%active MOS 46 d 脂质质量分数增加,而摄食质量分数 0.3%Immunoster 8 周脂质不变结果一致。然而 Ye JD 等^[10]研究证实牙鲆鱼摄食质量分数 0.5%Bio-MOS 56 d,降低了脂质沉积。这表明膳食纤维种类、饲喂时间、添加剂量等可能影响鱼体脂质消化与生长。

在鱼类脂肪合成和沉积过程中,*lpl*,*hl*,*fas* 等发挥着重要作用。*lpl* 和 *hl* 是调节机体脂肪沉积和脂质代谢的关键因子,*fas* 是脂肪合成的关键酶,所以研究 *lpl*,*hl*,*fas* 基因表达量对研究鱼类脂肪代谢至关重要^[11]。脂肪合成为两个部分,第一部分:乙酰辅酶-A 羧化酶通过碳酸氢盐和 ATP 催化羧化乙酰辅酶-A 形成丙二酰辅酶-A;第二部分:脂肪酸合成酶在 NADPH 条件下催化缩合乙酰辅酶-A 和 C2 结构形成丙酰辅酶 A,然后形成棕榈酸^[12]。*fas* 在脂肪酸的从头合成中发挥重要作用,它能催化乙酰辅-A 和丙二酸单酰辅酶-A 合成长链饱和脂肪酸,对动物脂肪沉积有着重要意义。OKGMS 及 AOKGM 增加了肝脏中 *lpl* mRNA 表达,当添加质量分数 1.6% AOKGM *fas* 表达显著增加。Yokota 等^[13]证实了岩藻多糖对 *lpl* 基因表达的影响,其结果指出岩藻多糖能诱导脂肪细胞 *lpl* 基因表达,且其表达量随着岩藻多糖剂量增多及作用时间延长而增加。目前关于多糖对水生动物 *hl*,*fas* 基因表达的影响研究还很少。夏晓杰等^[7]证实大中小鱼中 *lpl* 与 *fas* 表达成正相关关系,对肌间脂肪沉积有积极作用而 *hl* 作用不大。这表明 OKGMS 及 AOKGM 调控了 *lpl* 表达,在一定范围内影响 *fas* 表达,且随着膳食纤维种类及添加剂量不同表达不同。

脂肪在鱼类细胞内主要以甘油三酯形式存在,甘油三酯是鱼类脂类代谢的主要产物^[14]。血浆中甘油三酯的含量是通过极低密度脂蛋白和乳糜微粒颗粒的合成与分解来调控。血液循环中是通过 *lpl* 和 *hl* 作用以及利用胆固醇酯酶转移蛋白使内脂蛋白与甘油三酯进行置换来清除富含甘油三酯的脂蛋白^[15]。OKGMS 能显著降低肝脏脂肪及血清胆固醇含量,增加血清高密度脂蛋白含量,当添加质量分数为 1.6%OKGMS 效果明显;AOKGM 显著降低肝脏水分、脂肪及血清胆固醇、甘油三酯含量,增加血

清高密度脂蛋白含量,当添加剂量为 0.8%AOKGM 效果明显。与 Fiordaliso 等^[15]研究低聚木糖和低聚果糖减少了肝脏脂肪生成,血液和肝脏胆固醇和甘油三酯水平,增加了血液中 HDL/LDL 比率结果一致。Lahoz 等^[16]证实在哺乳动物中 *hl* 作为高密度脂蛋白配体是一种脂肪分解酶,促进肝脏对它吸收。而且鱼体中 *lpl* 和 *hl* 促进了肝脏对脂蛋白吸收,所以鱼血清中高密度脂蛋白水平比其他脊椎动物高几倍。Tian^[5]等证实 *lpl* 表达增加,血清中高密度脂蛋白含量增加,甘油三酯含量降低。Delzenne 等^[17]证实较低肝脏脂肪可能与摄食中低聚木糖通过鱼肠道微生物菌群发酵,生成葡萄糖激酶与结肠中短链脂肪酸。因此 Campbell 等^[18]证实老鼠饮食中含有低聚木糖增加了盲肠中短链脂肪酸即醋酸盐、丙酸盐、丁酸盐和乳酸盐浓度。然而主要短链脂肪酸产物醋酸盐和丙酸盐对脂质代谢调控是相反的。醋酸盐是脂肪生成的基质,丙酸盐竞争性抑制醋酸盐进入肝脏细胞。益生元被肠道微生物发酵的模式和肝脏醋酸盐与丙酸盐比例将决定其低脂肪性能,同时醋酸盐与丙酸盐比例因鱼种类的不同而改变。由此推测添加一定剂量 OKGMS 或 AOKGM,可能会增加食物体积,稀释肠道内容物,促进有益菌乳酸菌、双歧杆菌生长,产生短链脂肪酸并提高肠道短链脂肪酸浓度及比例,调控齐口裂腹鱼肝脏中 *lpl* 表达,影响肝脏脂蛋白酯酶的活性,增加高密度脂蛋白含量促进高密度脂蛋白反向运输胆固醇进入肝脏,加速胆固醇转运与代谢,降低肝脏脂肪、血液中胆固醇和甘油三酯含量,增加高密度脂蛋白含量,调节鱼体脂质代谢。

4 结语

对比了两种改性魔芋葡甘露聚糖对齐口裂腹鱼脂质代谢及肝脏相关基因的表达,发现在 OKGMS 改性条件下,不同添加剂量降低齐口裂腹鱼肝脏脂肪及血清胆固醇含量,显著增加血清高密度脂蛋白含量及肝脏 *lpl* 表达,且添加质量分数为 1.6%效果更好。在 AOKGM 改性条件下不同添加剂量降低肝脏脂肪;对血清胆固醇、甘油三酯含量呈先降低后增加趋势;增加血清高密度脂蛋白含量及肝脏 *lpl* 表达,且添加质量分数为 0.8%效果更好。

参考文献:

- [1] 吴海燕.魔芋葡甘露聚糖的改性及其应用性能研究[D].无锡:江南大学,2007.
- [2] ZHANG L. Effects of Oxidized Konjac glucomannan(OKGM) on growth and immune function of Schizothorax prenanti. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(4):1105-1110.
- [3] 高松.改性魔芋葡甘露聚糖硫酸酯的制备及其性能研究[D].武汉:武汉理工大学,2012.
- [4] ZHENG Q. The effects of dietary oxidized konjac glucomannan and its acidolysis products on the immune response, expression of immune related genes and disease resistance of Schizothorax prenanti[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2):551-559.
- [5] TIAN J. Changes in the activities and mRNA expression levels of lipoprotein lipase (LPL),hormone-sensitive lipase (HSL) and fatty acid synthetase (FAS) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during fasting and re-feeding [J]. *Aquaculture*, 2013, 400-401:29-35.
- [6] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [7] GREENE D H S,SELIVONCHICK D P. Lipid metabolism in fish[J]. *Progress in Lipid Research*, 1987, 26(26):53-85.
- [8] TORRECILLAS S,MONTERO D,IZQUIERDO M. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(2):525-544.
- [9] MANSOUR M R. Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile[J]. *Fish Physiology & Biochemistry*, 2011, 38(3):829-835.
- [10] YE J D. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder Paralichthys[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(4):902-911.
- [11] GOLDBERG I J. Lipoprotein lipase and lipolysis:central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis [J]. *Journal of Lipid Research*, 1996, 37(4):693-707.
- [12] HIRATA M,HISAI T,KAYAMA M. Fatty Acid Synthesis in Aquatic Animals and Its Metabolism in Carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Journal of Japan Oil Chemists Society*, 1985, 34(9):673-680.
- [13] YOKOTA T. Increased effect of fucoidan on lipoprotein lipase secretion in adipocytes[J]. *Life Sciences*, 2009, 84(84):523-529.
- [14] Fu-Lin,H.E., et al. Preliminary study on the effect of water temperature on hematology indices of rainbow trout [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(3):363-369.
- [15] FIORDALISO M. Dietary oligofructose lowers triglycerides,phospholipids and cholesterol in serum and very low density lipoproteins of rats[J]. *Lipids*, 1995, 30(2):163-167.
- [16] LAHOZ C. Polymorphism of the hepatic lipase gene significantly modulates the HDL-cholesterol response to statin treatment[J]. *Atherosclerosis*, 2005, 182(1):129-134.
- [17] DELZENNE N M. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals:review of biochemical events and future prospects[J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 87 Suppl 2(5):S255-S259.
- [18] CAMPBELL J M,FAHEY G C,WOLF B W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass,cecal and fecal short-chain fatty acids,pH and microflora in rats[J]. *Journal of Nutrition*, 1997, 127(127):130-136.