

# 抗性淀粉在双歧杆菌作用下的体外降解

范媛媛<sup>1</sup>, 王树祥<sup>1</sup>, 谭梅青<sup>1</sup>, 杨公明<sup>2</sup>

(1. 顺德出入境检验检疫局, 广东 顺德 528303; 2. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 探寻天然香蕉抗性淀粉在双歧杆菌作用下的体外降解规律。以天然香蕉抗性淀粉为原料, 以抗性淀粉的残留率为指标, 在单因素试验的基础上, 采用响应曲面法研究菌液浓度、底物质量浓度及发酵时间对抗性淀粉残留率的影响, 建立各种因素与抗性淀粉残留率关系的数学回归模型。确定香蕉抗性淀粉被完全降解的条件为: 发酵时间14h、菌液浓度 $10^{11}$  CFU/mL、底物质量浓度4g/mL。

**关键词:** 抗性淀粉; 双歧杆菌; 降解

## *in vitro* Degradation of Resistant Starch by Bifidobacteria

FAN Yuan-yuan<sup>1</sup>, WANG Shu-xiang<sup>1</sup>, TAN Mei-qing<sup>1</sup>, YANG Gong-ming<sup>2</sup>

(1. Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shunde 528303, China;

2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the *in vitro* degradation of resistant starch II (RS<sub>2</sub>) from banana by bifidobacteria. The residual starch in the degraded product was measured. Response surface methodology (RSM) was applied to study the effect of bacterial concentration, substrate concentration and fermentation time on the degradation of RS. A mathematical regression model was established between residual rates of RS and the three factors. The optimal degradation condition of banana RS was obtained as follows: fermentation time 14 h, bacterial concentration  $10^{11}$  CFU/mL and substrate concentration 4 g/mL.

**Key words:** resistant starch; bifidobacteria; degradation

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)17-0161-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201317035

微生态学研究发现, 在健康人体消化道中的细菌约有500多种<sup>[1]</sup>, 其数量达 $1.0 \times 10^8$ 以上, 其中双歧杆菌是肠内最有益的菌群, 可以预防肿瘤、治疗便秘、防治心血管疾病、提高乳制品消化率等<sup>[2-3]</sup>。双歧杆菌数量的减少或消失是“不健康”状态的标志, 双歧杆菌是人体健康的晴雨表<sup>[4-11]</sup>。抗性淀粉<sup>[12]</sup>是1992年才被联合国粮农组织FAO定义的。Englyst等<sup>[13]</sup>在体外模拟的条件下依据淀粉的生物可利用性将淀粉分为三类: 快速消化淀粉、缓慢消化淀粉、抗性淀粉, 抗性淀粉是指在人体小肠内无法消化吸收的淀粉, 属高档膳食纤维<sup>[14]</sup>。食用不仅可直接减肥, 还可增殖有益菌、抑制有害菌、降低胰岛素反应和肠道pH值、增强肠蠕动、治疗及预防溃疡等<sup>[15-19]</sup>。

本实验利用双歧杆菌对抗性淀粉的分解作用, 探寻体外抗性淀粉最大程度被降解的条件及规律, 为微生态制剂和抗性淀粉保健品的开发提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

香蕉抗性淀粉(抗性淀粉含量81.32%) 本实验室自制; 婴儿双歧杆菌(CICC6069) 工业微生物菌种保藏中心; 葡萄糖测定试剂盒、迈瑞BS-300生化分析仪 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 发酵基础培养基的配制

发酵基础培养基: 蛋白胨2g、酵母浸膏2g、氯化钠0.1g、 $K_2HPO_4$  0.04g、 $KH_2PO_4$  0.04g、 $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  0.01g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01g、 $NaHCO_3$  2g、吐温-80 2g、氯化血红素0.05g、VK<sub>1</sub> 10 $\mu$ L、半胱氨酸盐酸盐0.5g、胆盐0.5g, 蒸馏水加至1000mL。调至pH7.0左右, 121 $^\circ$ C、15min高压灭菌<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.2 建立体外模拟发酵实验微生态

取100mL配制好的发酵基础培养基, 加入1g/100mL

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 粤港澳关键领域重点突破项目(200849861007)

作者简介: 范媛媛(1977—), 女, 高级工程师, 博士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: yuanyuanfan2006@163.com

的抗性淀粉,再加入体积分数2%的双歧杆菌菌悬液,振荡均匀。

### 1.2.3 菌液制备

无菌条件下,从纯培养的平板中挑取单个菌落,接种于无菌生理盐水,搅拌均匀后,用无菌吸头吸取50 $\mu$ L涂布于相应的琼脂平板,于一定温度和时间培养,然后计数<sup>[21]</sup>。

### 1.2.4 抗性淀粉含量测定

抗性淀粉的含量测定采用文献[22]方法。

### 1.2.5 抗性淀粉残留率测定

$$\text{淀粉残留率}/\% = \frac{m}{m_0} \times 100$$

式中: $m$ 为发酵相同时间点的淀粉平均残留质量/g;  
 $m_0$ 为发酵前淀粉的质量/g。

### 1.2.6 发酵时间对抗性淀粉残留率的影响

将约1g的抗性淀粉和2mL的双歧杆菌菌悬液,加入100mL发酵基础培养基中,混匀,于37 $^{\circ}$ C厌氧培养24h<sup>[23]</sup>。发酵期间,选择不同的时间点,每隔4h取出3支离心管,分别测定培养液的淀粉残留量,以测得的淀粉残留率的平均值对时间作图,可得到抗性淀粉含量的变化曲线,从而得到抗性淀粉最大程度被分解的时间点。

### 1.2.7 接种菌液浓度对抗性淀粉残留率的影响

将约1g的抗性淀粉和不同浓度的双歧杆菌菌悬液( $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{12}$ CFU/mL),加入100mL发酵基础培养基中,混匀,于37 $^{\circ}$ C厌氧培养12h。从而得到使抗性淀粉最大程度被分解的菌液浓度。

### 1.2.8 底物质量浓度(抗性淀粉添加量)对抗性淀粉残留率的影响

将不同质量浓度的抗性淀粉(2~10g/mL)和一定浓度的菌悬液,加入100mL发酵基础培养基中,混匀,于37 $^{\circ}$ C厌氧培养12h。从而可知抗性淀粉分解率最高时的添加质量浓度。

### 1.2.9 响应面试验设计

以发酵时间( $X_1$ )、菌液浓度( $X_2$ )和底物质量浓度( $X_3$ )为考察因素,采用Box-Behnken设计法设计响应面试验:考察多因素条件下香蕉抗性淀粉残留率变化情况。依据响应面试验获得的回归模型,研究香蕉抗性淀粉临界转化条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵时间对抗性淀粉残留率的影响

由图1可知,将约1g的抗性淀粉和 $1.0 \times 10^9$ CFU/mL的双歧杆菌菌悬液接种于基础培养,发酵阶段的前8h内,抗性淀粉的残留率比较高,在80%以上,发酵12h的时候,残留率几乎达到最低点,而且在12~24h内,残留率

一直都维持在30%左右,没有继续降低,说明用2mL菌液为 $10^8$ CFU/mL的双歧杆菌菌悬液,在37 $^{\circ}$ C厌氧作用于1g的抗性淀粉时,12h达到了抗性淀粉最大的分解率。这可能是由于发酵12h后,双歧杆菌数量逐渐降低,对抗性淀粉的分解能力也随之减弱,导致抗性淀粉的残留率不再降低,而是基本保持不变。

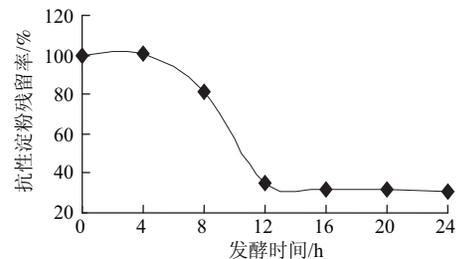


图1 发酵时间对抗性淀粉残留率的影响

Fig.1 Effect of fermentation time on residual rates of RS

### 2.2 接种菌液浓度对抗性淀粉残留率的影响

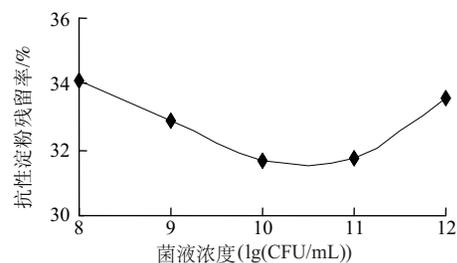


图2 菌悬液浓度对抗性淀粉残留率的影响

Fig.2 Effect of bacteria concentration on residual rates of RS

由图2可知,1g的抗性淀粉发酵12h阶段内,在菌悬液浓度为 $10^{10}$ CFU/mL时,抗性淀粉的残留率最低,也就是说此时抗性淀粉的分解程度最高。

通过分析推断,当菌液浓度超过 $10^{10}$ CFU/mL时,残留率反而提高。这可能是由于细菌的新陈代谢及生长繁殖必须有充足的营养物质和足够的能量,而菌液浓度过高时,菌体间会产生竞争性抑制,导致菌体数量的平衡或降低,从而使抗性淀粉的残留率升高。而当菌液浓度过低时,对抗性淀粉的分解速度变慢,分解能力相应也低,因此残留率较高。

### 2.3 底物质量浓度(抗性淀粉添加量)对抗性淀粉残留率的影响

由图3可知,在菌悬液的浓度为 $10^{10}$ CFU/mL时,发酵12h阶段内,随抗性淀粉质量浓度的增加,抗性淀粉的残留率也随之增加,当底物质量浓度为4g/mL时,残留率最低,可达30.02%,说明此时抗性淀粉的分解率最高。产生此结果的原因可能是由于当底物的质量浓度过高时,在细菌数量有限的情况下,不能完全把抗性淀粉分解掉。当底物质量浓度小于细菌的分解能力时,残留率基本保持不变。

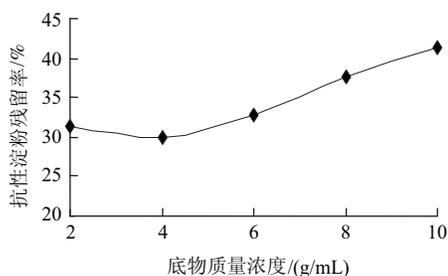


图3 底物质量浓度对抗性淀粉残留率的影响

Fig.3 Effect of substrate concentration on residual rates of RS

2.4 响应面试验结果

按照Box-Behnken的中心组合试验设计方案进行三因素三水平试验, +1、0、-1分别代表着自变量的高、中、低水平, 每个处理测定3次, 取平均值。试验因素以及水平编码表见表1。

表1 响应面试验设计与结果

Table 1 Box-Behnken design and experimental results

试验号	因素			Y抗性淀粉残留率/%
	X <sub>1</sub> 发酵时间/h	X <sub>2</sub> 菌液浓度(lg(CFU/mL))	X <sub>3</sub> 底物质量浓度/(g/mL)	
1	-1(10)	+1(12)	0(4)	62.73
2	-1	0(11)	+1(6)	82.14
3	0(12)	+1	-1(2)	67.21
4	-1	-1(10)	0	54.74
5	0	0	0	37.19
6	0	-1	+1	80.43
7	0	0	0	45.27
8	+1(14)	+1	0	27.99
9	+1	-1	0	26.28
10	0	0	0	41.08
11	0	0	0	38.37
12	0	+1	+1	75.31
13	0	-1	-1	49.93
14	+1	0	+1	65.44
15	+1	0	-1	24.36
16	0	0	0	39.19
17	-1	0	-1	51.49

将所得的试验数据采用Design Expert 软件进行多元回归拟合, 得到以抗性淀粉残留率为目标函数的二次回归方程:  $Y=687.7013+28.2807X_1-142.5000X_2-11.0494X_3-0.7850X_1X_2+0.6519X_1X_3-2.8000X_2X_3-1.2059X_1^2+7.5388X_2^2+5.1153X_3^2$ 。

为了检验方程的有效性, 对抗性淀粉降解工艺的数学模型进行方差分析, 方差分析结果见表2。方差分析中模型 $F=18.33$ 说明回归方程是极显著的( $P<0.01$ ), 相关系数 $R^2=0.9593$ 说明响应值(抗性淀粉残留率)的变化有95.93%来源于所选变量, 即发酵时间、菌液浓度、底物质量浓度。因此, 回归方程对试验拟合情况好, 试验误差小, 可以较好的描述各因素与响应值之间的真实关系, 可以利用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。

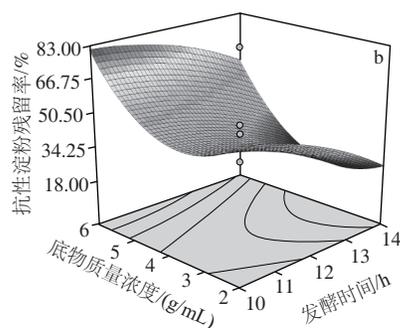
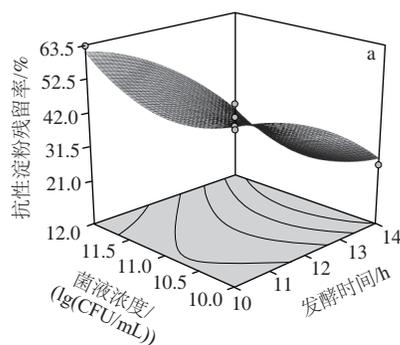
表2 回归模型方差分析

Table 2 Analysis of variance for the fitted regression equation

变异来源	总和	自由度	均方	F 值	Prob>F
模型	5297.19	9	588.58	18.33	0.0005
X <sub>1</sub>	1431.93	1	1431.93	44.60	0.0003
X <sub>2</sub>	59.73	1	59.73	1.86	0.2148
X <sub>3</sub>	1521.59	1	1521.59	47.39	0.0002
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	9.86	1	9.86	0.31	0.5967
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	27.20	1	27.20	0.85	0.3880
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	125.44	1	125.44	3.91	0.0886
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	97.97	1	97.97	3.05	0.1242
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	239.30	1	239.30	7.45	0.0293
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1762.79	1	1762.79	54.90	0.0001
残差	224.76	7	32.11		
失拟项	184.86	3	61.62	6.18	0.0555
纯误差	39.91	4	9.98		
总和	5521.95	16			

对发酵时间(X<sub>1</sub>)、菌液浓度(X<sub>2</sub>)、底物质量浓度(X<sub>3</sub>)进行方差分析, 结果均 $P<0.01$ , 表明3个因素是影响抗性淀粉含量的重要因素。对回归方程系数绝对值大小进行排序可知, 考察的3个因素对抗性淀粉影响作用的大小顺序为菌液浓度>发酵时间>底物质量浓度。

根据回归方程, 采用Design-Expert软件作出各因素对抗性淀粉残留率影响的响应面图, 结果见图4, 其直观反映了发酵时间、菌液浓度与底物质量浓度的交互作用对抗性淀粉残留率的影响。在选取的各因素范围内, 设定抗性淀粉的残留率为5%时的条件为抗性淀粉完全降解的临界条件, 根据回归模型通过Design-Expert软件分析得到多组完全降解的临界条件的理论最佳组合, 对所得数据进行对比分析, 并结合实际情况, 选择抗性淀粉完全降解的临界条件。确定抗性淀粉完全降解的临界条件为: 发酵时间14h、菌液浓度 $10^{11}$ CFU/mL、底物质量浓度4g/mL。



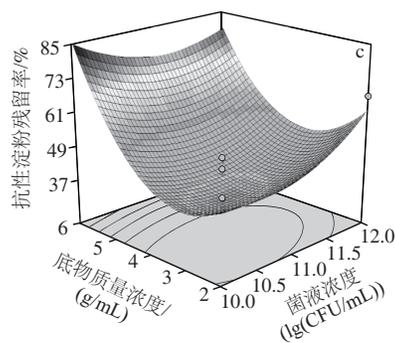


图4 各因素的交互作用对抗性淀粉残留率的影响

Fig.4 Response surface plots showing the interaction effects of substrate concentration and bacterial concentration on residual rates of RS

为了证实预测结果的准确性,用试验中得到的最佳降解工艺条件重复实验3次,平均抗性淀粉残留率为22.04%,与预测值21.97%基本一致(相对误差0.85%),说明该方程与实际情况拟合很好,充分验证了所建模型的正确性。

### 3 结论

抗性淀粉在双歧杆菌单独作用下的体外降解规律为:  $Y=687.7013+28.2807X_1-142.5000X_2-11.0494X_3-0.7850X_1X_2+0.6519X_1X_3-2.8000X_2X_3-1.2059X_1^2+7.5388X_2^2+5.1153X_3^2$ , 方程所确定的香蕉天然抗性淀粉完全降解的临界点为: 发酵时间14h、菌液浓度 $10^{11}$ CFU/mL、底物质量浓度4g/mL。在此最佳条件下抗性淀粉的残留率为22.04%,与预测值21.97%基本一致(相对误差0.85%)。

本实验中的抗性淀粉的残留率最低只能达到20%左右,这可能由于体外模拟实验所使用的菌的种类和数量有限,另外与体外培养时有限的营养、发酵液的pH值降低及细菌自身的生长阶段有关。

### 参考文献:

[1] 刘重阳, 陈东风. 肠道菌群在炎症性肠病发病中的作用[J]. 重庆医学, 2009, 38(10): 1251-1253.  
 [2] 张玲. 双歧杆菌作用的研究进展[J]. 医学综述, 2009(17): 封2-封3.  
 [3] 何梅, 洪洁, 杨月欣, 等. 抗性淀粉对大鼠肠道菌群的影响[J]. 卫生研究, 2005, 34(1): 85-87.

[4] 翁幸璧, 糜祖煌. 人体肠道细菌群落与疾病[J]. 中国微生态学杂志, 2011(7): 662-666.  
 [5] VERBERKMOES N C, RUSSELL A L, SHAH M, et al. Shot gun meta proteomics of the human distal gut microbiota[J]. ISME J, 2009, 3(2): 179-189.  
 [6] WANG Y. Prebiotics: present and future in food science and technology[J]. Food Research International, 2009, 42(1): 8-12.  
 [7] 林杨. 抗性淀粉的制备工艺及其发酵特性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.  
 [8] 别同玉, 许加生, 别同德. 抗性淀粉卫生保健功能及膳食应用研究进展[J]. 现代预防医学, 2011, 38(23): 4845-4847.  
 [9] 张嫚. RS<sub>3</sub>抗性淀粉对酸乳品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2010(5): 417-419.  
 [10] 徐忠, 王卓, 赵丹, 等. 淀粉及变性淀粉在酸乳中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2011(12): 512-514.  
 [11] 杭苏琴. 甘露寡糖对断奶仔猪肠道微生物的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.  
 [12] ASP N G. Preface: resistant starch[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46(Suppl 2): 1-148.  
 [13] ENGLYST H N, KINGMAN S M, CUMMINGS J H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions[J]. European J Clinical Nutr, 1992, 46(2): 33-50.  
 [14] 邱芳萍, 赵伟. 抗性淀粉: 特种膳食纤维的制备工艺[J]. 食品工业科技, 2005(1): 102-103.  
 [15] HYLLE S, GOSTNER A, DUSEL G, et al. Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: possible implications for cancer prevention[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1998, 67: 136-142.  
 [16] GOEL R K, GUPTA S, SHANKAR R, et al. Anti-ulcerogenic effect of banana powder (*Musa sapientum* var. *paradisica*) and its effect on mucosal resistance[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1986, 18(1): 33-44.  
 [17] MUKHOPADHYAYA K, BHATTACHARYA D, CHAKRABORTY A, et al. Effect of banana powder (*Musa sapientum* var. *paradisica*) on gastric mucosal shedding[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1987, 21(1): 11-19.  
 [18] BEST R, LEWIS D A, NASSER N. The anti-ulcerogenic activity of the unripe plantain banana (*Musa* species)[J]. British Journal of Pharmacology, 1984, 82(1): 107-116.  
 [19] LEWIS D A, FIELDS W N, SHAW G P. A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisica*) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosions[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 65(3): 283-288.  
 [20] 曾艳华, 张宁, 吴希阳, 等. 通过体外发酵研究不同聚合度的大蒜多糖对人体肠道菌群的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(10): 10-13.  
 [21] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.34—2008 食品卫生微生物学检验双歧杆菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.  
 [22] 范媛媛. 香蕉抗性淀粉降解规律及机理研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2012.  
 [23] 熊德鑫. 临床厌氧菌检验手册[M]. 北京: 中国科技出版社, 1994.