

莲子抗性淀粉体外消化的结构变化对短双歧杆菌增殖的影响

黄雅萍^{1,2,3}, 刘霞^{1,2,3}, 杨书捷^{1,2,3}, 卢旭^{1,2,3}, 缪松^{2,4}, 邓凯波^{1,2,3*}, 郑宝东^{1,2,3}

¹福建农林大学食品科学学院 福州 350002

²中爱国际合作食品物质学与结构设计研究中心 福州 350002

³福建省特种淀粉品质科学与加工技术重点实验室 福州 350002

⁴爱尔兰农业与食品发展局 Teagasc 食品研究中心 爱尔兰科克 999014)

摘要 抗性淀粉是一类重要的结肠微生物碳源,研究其构效关系,有助于了解其在体内的转化过程。以用微波法和水浴法制备的莲子抗性淀粉(MP-LRS3 和 WB-LRS3)为原料,通过体外消化,测定其在消化过程中结构的变化,建立与内源性短双歧杆菌的营养互作关系。结果表明:体外消化后 MP-LRS3 和 WB-LRS3 的结构均发生改变,其中结晶度显著升高($P < 0.05$),形态由表面粗糙的叠层结构逐步解聚为粒径较小且棱角圆润的颗粒,晶体结构仍为 B 型,双螺旋结构更加紧密,淀粉分子的排列更加有序。MP-LRS3 和 WB-LRS3 因制备方式不同,故消化处理前、后的晶体特性均存在差异。相同消化阶段,MP-LRS3 较 WB-LRS3 的解聚程度高。此外,MP-LRS3 和 WB-LRS3 对短双歧杆菌的促增殖能力均随消化进程逐渐增强,在同一消化阶段前者的促增殖能力更强,这可能与消化环境对莲子抗性淀粉的解聚程度不同造成的结构差异有关。黏附结果与促增殖能力呈正相关,推测黏附水平也受莲子抗性淀粉结构变化的影响,并可能是影响莲子抗性淀粉与短双歧杆菌营养互作关系的重要因素之一。本研究结果可为完善抗性淀粉的体内代谢和益生作用提供理论依据。

关键词 莲子抗性淀粉; 体外消化; 结构特性; 短双歧杆菌; 增殖

文章编号 1009-7848(2022)08-0069-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.08.008

抗性淀粉(Resistant starch, RS)作为益生元,被誉为影响人体健康的“第七大营养因素”,具有可被以双歧杆菌为主的结肠细菌选择性利用而降解为短链脂肪酸等代谢产物的特性^[1]。在 Englyst 对淀粉的经典分类中,抗性淀粉被定义为“在 37 °C 消化酶体系培养 120 min 时仍存在非水解残余的淀粉部分”^[2],这也是目前大多数 III 型抗性淀粉(RS3)制备时酶解纯化步骤普遍参考的方法^[3-4]。然而,在多营养素及不同加工方式的食物体系中,淀粉的来源和分布,人体的咀嚼和胃肠道转运时间,以及体内消化酶分泌情况等均存在个体差异,表明这种受时间限定的“抗性”存在相对性^[5]。研究表明,在用人工胃液和肠液消化处理后,马铃薯抗性淀粉的结构越来越疏松,大块晶体多转变为小颗粒并进一步裂化成具有较大比表面积和堆积密度的结构^[4]。该过程发生在抗性淀粉经 120 min 初次酶解制备后的二次消化阶段,说明在

动物消化道中,初次酶解后的抗性淀粉仍可能因胃肠液作用而导致部分晶体结构发生变化,对其消化后构效关系的研究将更有助于抗性淀粉的开发和利用。

抗性淀粉是肠道细菌的碳源物质,其晶体结构与促进细菌增殖的能力相关。其中,RS3 比 RS2 更有利于细菌的发酵^[6],对双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌和乳链球菌 4 种益生菌最适添加量和最大促增殖水平的影响显著不同^[7]。与 A 型相比,B 型 RS3 还可将近段结肠中双歧杆菌的数量维持在更高的水平,并生成更多的丁酸盐产物^[8]。在细菌对植物多糖的降解过程中,菌体与作用底物之间的接触性黏附被认为是首要条件^[9]。淀粉结构对细菌增殖水平产生影响的原因,很可能与二者之间的黏附能力相关。RS3 表面的粗糙沟壑状表面和空腔凹陷可能具有黏附双歧杆菌的作用^[10]。这种黏附作用不仅可以提高菌体的胆盐耐受性,而且还通过碳源利用实现促进菌株增殖的目的^[3]。

莲子淀粉(Lotus seed starch)中直链淀粉含量高达 40%左右,是制备 RS3 的良好原料^[11]。与其

收稿日期: 2021-08-01

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2019J01391)

作者简介: 黄雅萍(1994—),女,博士

通信作者: 邓凯波 E-mail: dkbfst@163.com

它植物来源抗性淀粉的形成机制和结构特性类似,莲子淀粉糊化后,其直链淀粉聚合物发生回生反应,形成莲子抗性淀粉(LRS3),具有由氢键连接的稳定双螺旋结构、B型晶体特征和很高的热稳定性^[9]。压热、微波和超声波压热等不同制备方法导致LRS3产生结构差异^[12]。该阶段LRS3还具有比其它碳源(高直链玉米淀粉、葡萄糖等)更好的促双歧杆菌增殖效果,推测这可能与其结构特性有关。消化后LRS3的结构变化以及对双歧杆菌增殖和黏附的影响尚未见报道。

本研究通过物性结构测定技术比较微波法和水浴法制备的两种LRS3在体外模拟消化过程中的结构变化规律,阐明各消化阶段LRS3对短双歧杆菌的促增殖能力和黏附能力,探讨由体外消化环境介导的LRS3结构变化对短双歧杆菌增殖的影响,以了解抗性淀粉在体内的转化过程。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜莲,由绿田(福建)食品有限公司提供,产自福建建宁。

短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*, *B. breve*),德国DSMZ微生物菌种保藏中心。

葡萄糖(GLU)基础培养基、高直链玉米淀粉(HAMS)基础培养基、耐热 α -淀粉酶,美国ANKOM科技公司;糖化酶、胃蛋白酶、胰酶,美国Sigma公司;其它试剂均为国产分析纯级。

1.2 莲子抗性淀粉的制备和纯化

1) 微波法制备莲子抗性淀粉(Microwave-power LRS3, MP-LRS3) 将150 g鲜莲破碎后分散于1 L蒸馏水中,将淀粉悬浮液在微波功率640 W下加热3 min,冷却至室温后,4℃下保存24 h。随后,将糊化淀粉置于50℃烘箱中干燥6 h,80 μ m筛网过筛,根据Zhang等^[9]的方法纯化。

2) 水浴法制备莲子抗性淀粉(Water-bath LRS3, WB-LRS3) 将300 g鲜莲破碎后分散于1 L蒸馏水中,将淀粉悬浮液在80℃水浴锅中隔水放置20 min。冷却、干燥和纯化步骤同MP-LRS3制备方法。

1.3 体外消化过程

1) 唾液消化 将0.16 g NaCl,0.02 g KCl和

0.02 g α -淀粉酶加至100 mL PBS缓冲液(10 mmol/L,pH 7.0)中制成模拟唾液。将未经消化的两种LRS3(MP-LRS3-0与WB-LRS3-0)分别与唾液以质量比1:1混合后,37℃摇床振荡5 min(100 r/min),离心处理(4 000 \times g,10 min),热风干燥2 h后取LRS3样记为MP-LRS3-1与WB-LRS3-1,剩余混合液继续胃液消化试验。

2) 胃液消化^[13-15] 将0.32%胃蛋白酶和0.2% NaCl溶解于10 mmol/L PBS缓冲液(pH 2.5)中制成模拟胃液。将唾液完成样与胃液以质量比1:1混合后,37℃摇床振荡4 h(100 r/min),离心(4 000 \times g,10 min),热风干燥2 h后取LRS3样记为MP-LRS3-2与WB-LRS3-2,剩余混合液用于小肠液消化试验。

3) 小肠液消化^[13-15] 将1 g猪胰 α -淀粉酶(24 U/mg)溶于100 mL醋酸钠-盐酸缓冲液(0.1 mol/L,pH 5.2)中制成胰酶液。将2 g糖化酶(10⁵ U/g)溶于相同缓冲液后移入25 mL容量瓶中摇匀、定容,纱布过滤后滤液为糖化酶液。将0.4 g胆盐溶于10 mL醋酸钠-盐酸缓冲液(0.1 mol/L,pH 5.2)中制成胆盐溶液。然后,将胰酶液、糖化酶液和胆盐溶液以质量比16:2:1的比例混合制成模拟小肠液。取8 mL小肠液转入同体积含LRS3的胃液完成样中,混合物于37℃摇床振荡16 h(100 r/min)后离心处理(4 000 \times g,10 min),热风干燥2 h后取LRS3样记为MP-LRS3-3与WB-LRS3-3。

1.4 各消化阶段LRS3结构测定

以上各消化阶段LRS3的环境扫描电镜(Environmental scanning electron microscope, ES-EM)观察、固态¹³C-NMR核磁共振扫描和X-射线衍射测定参照Zhang等^[9]的方法。

1.5 各消化阶段LRS3源培养基厌氧发酵短双歧杆菌

分别配制碳源质量浓度为20 g/L的GLU基础培养基、HAMS基础培养基和各消化阶段LRS3试验培养基,均为以TPY培养基为基础,将其中碳源分别以GLU、HAMS和LRS3替代。将短双歧杆菌以体积分数2%接种后置37℃恒温培养箱中厌氧培养36 h,在培养过程中定时取样,测定其在波长600 nm处的吸光值。

1.6 各消化阶段 LRS3 与短双歧杆菌的黏附能力测定

将对数期短双歧杆菌菌体用 10 mL 0.1 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.0) 洗涤 2 次, 重悬于相同缓冲液中至细胞终浓度为 10^7 CFU/mL。取其中 2 mL 细胞重悬液与 LRS3 重悬液 (10 g/L, 所用 PBS 缓冲液条件同上) 在直径 1 cm 试管中同体积混匀, 室温静置 1 h, 至淀粉沉淀后, 在液面下 0.5 cm 处吸取两份 150 μ L 样液, 用酶标仪测定波长 540 nm 处的吸光值, 以 PBS 为空白对照。为计算黏附于淀粉上而后共沉淀于试管底部的细胞比例, 将上述吸光值结果与以下两个对照试管中的样品 OD_{540nm} 值作比较: 1) 不添加淀粉的细菌重悬液; 2) 不添加细菌的淀粉重悬液。黏附于抗性淀粉上细菌比例的计算公式^[6]:

$$\text{黏附率}(\%) = 100 - \left(\frac{a-b}{c} \times 100 \right)$$

式中: a ——既有抗性淀粉又有细菌的吸光值; b ——有抗性淀粉而无细菌的吸光值; c ——无抗性淀粉而有细菌的吸光值。

1.7 数据统计分析

所有样品检测试验重复 3 次, 取平均值。采用 MDI Jade 6.5 和 Peakfit 4.12 进行图谱分析, Origin 8.5 绘制图像, DPS 9.0 进行数据处理分析。

2 结果与分析

2.1 LRS3 在体外消化后的 ESEM 观察结果

由 ESEM 结果 (图 1 和图 2) 可知, MP-LRS3

和 WB-LRS3 经消化液作用后均发生明显的形态变化。消化前, MP-LRS3-0 颗粒呈薄片堆积的片层结构, 表面较粗糙 (图 1a)。这是因为受微波辐照后的淀粉分子在冷却过程中, 直链淀粉分子相互靠近形成新的双螺旋并沉降, 而且纯化作用加速了无定形部分的酶解, 剩下高度结晶的直链淀粉^[7]。WB-LRS3-0 片层特性虽不明显, 但也呈较大粒径的晶体形态 (图 2a)。

随着消化的进行, 各阶段 MP-LRS3 和 WB-LRS3 颗粒的尺寸均呈明显渐小趋势, 晶体层崩裂解体, 棱角逐渐圆润; 在模拟胃液和小肠液作用阶段均可看出, 晶体表面出现凹坑, 且蜂窝状孔洞的数量逐渐增加 (图 1c 和 d, 图 2c 和 d), 这些可能是由于消化酶或酸性消化液导致抗性淀粉结构解聚。此外, 从图 1 和图 2 中还可看出, MP-LRS3 与相同消化阶段的 WB-LRS3 相比, 颗粒粒径普遍偏小, 且晶体表面片层更多, 说明 MP-LRS3 在消化环境中更易发生结构性解聚^[8]。

2.2 LRS3 在体外消化后的 X-射线衍射结果

抗性淀粉的结构包括结晶区和无定形区, 其中结晶区又可分为微晶区和亚微晶区^[9]。结晶区主要由直链淀粉双螺旋叠加而成, 无定形区主要由无序淀粉组成^[20]。由于淀粉的结构解聚通常始于无定形区而非亚微晶区^[21], 因此 LRS3 的形态变化主要为消化液对其无定形区的作用。由图 3 可以看出, MP-LRS3-0 和 WB-LRS3-0 表现出相似的图谱趋势, 表明微波法和水浴法 LRS3 具有相似的晶体结构, 且分别在 2θ 为 17° , 22° , 19.77° 和

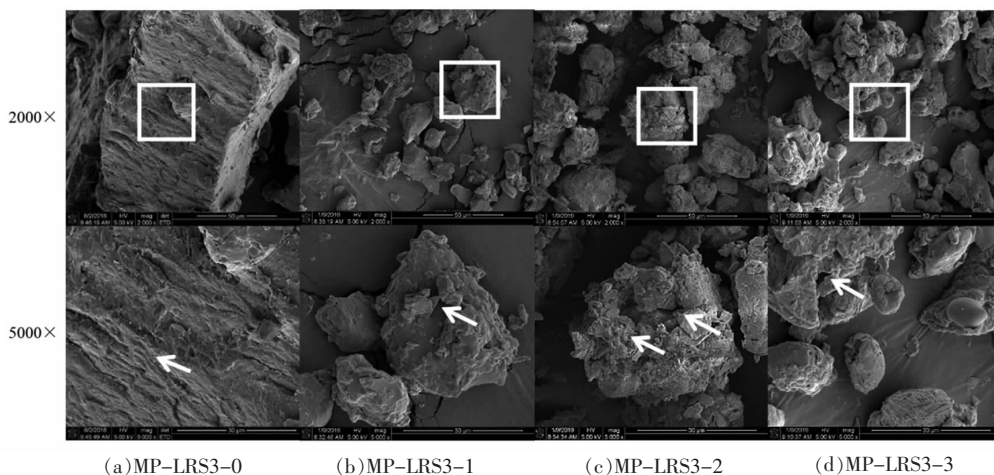


图 1 各消化阶段 MP-LRS3 环境扫描电镜照片

Fig.1 ESEM micrographs of MP-LRS3 at each digestive stage

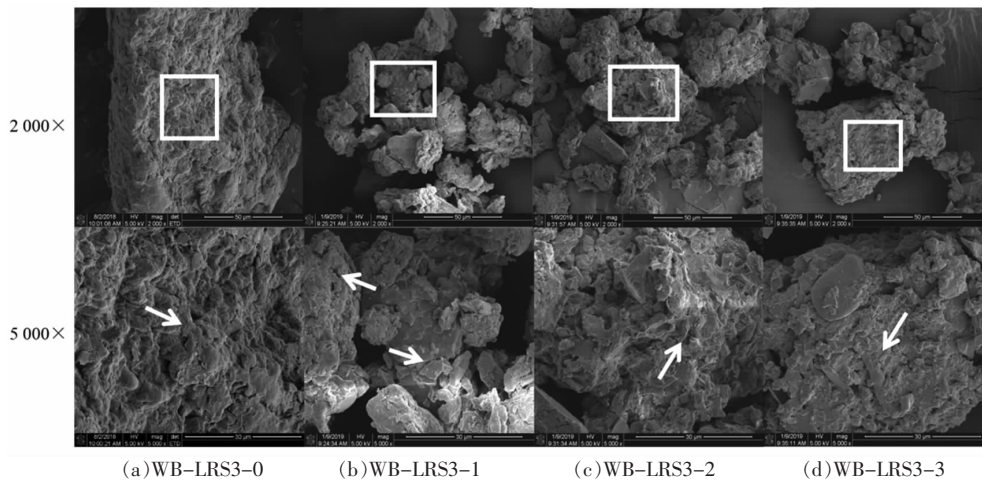


图2 各消化阶段 WB-LRS3 环境扫描电镜照片

Fig.2 ESEM micrographs of WB-LRS3 at each digestive stage

25.60°时出现馒头峰,均为B-型晶体^[22]。经消化后,MP-LRS3-1和WB-LRS3-1仍为B-型结晶;而MP-LRS3-2、MP-LRS3-3和WB-LRS3-2和WB-LRS3-3分别在 2θ 为11.62°、22°、23.26°、29°、31°和35°时出现尖锐的衍射峰,这可能是消化液中的有机物、盐等物质,也有可能为消化过程中游离的直链淀粉单螺旋在体系中发生分子间双螺旋重排,以结晶形式对消化具有高抗性,从而成为RS一部分^[23-24]。

随着消化的进行,MP-LRS3和WB-LRS3呈结晶度整体上升、无定形度整体下降趋势(表1和表2),其中MP-LRS3微晶度普遍高于WB-LRS3,说明MP-LRS3的结构比WB-LRS3更稳定^[18]。

抗性淀粉的抗酶解能力主要来自支链淀粉晶体,消化酶水解MP-LRS3的无定形区,使其直链淀粉溶出,体系中的直链淀粉含量增加^[25]。胃肠液消化后MP-LRS3微晶度与亚结晶度有较大提高,说明经胃液强酸环境的侵蚀与分散,肠液的作用被进一步增强,淀粉中无定形区的结构被完全破坏,体系中支链淀粉含量增大,从而增加了淀粉的结晶度。此外游离的直链淀粉单螺旋重排并聚集为更稳定的双螺旋结构^[18]。然而,WB-LRS3-3的无定形度高于WB-LRS3-2,小肠阶段的亚结晶度不升反降,说明小肠液作用阻碍了WB-LRS3完全结晶的生长^[18],这可能与二者制备方式不同导致的空间结构差异有关。

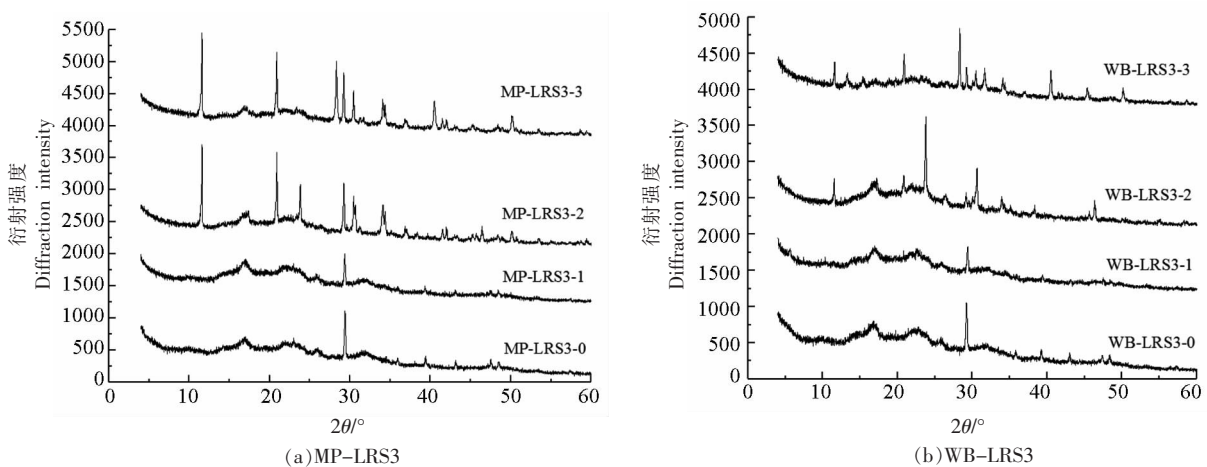


图3 各消化阶段 MP-LRS3(a)和 WB-LRS3(b)的X-射线衍射图谱

Fig.3 X-ray diffractogram characteristics of MP-LRS3 (a) and WB-LRS3 (b) at each digestive stage

表 1 各消化阶段 MP-LRS3 结晶特性

Table 1 Crystallinity characteristics of MP-LRS3 at each digestive stage

样品	晶型	微晶度/%	亚结晶度/%	无定形度/%
MP-LRS3-0	B	24.00 ± 0.05 ^d	20.88 ± 0.03 ^c	55.12 ± 0.10 ^a
MP-LRS3-1	B	29.02 ± 0.03 ^c	26.16 ± 0.07 ^b	44.82 ± 0.11 ^b
MP-LRS3-2	B	44.24 ± 0.07 ^a	25.13 ± 0.13 ^{bc}	30.63 ± 0.18 ^c
MP-LRS3-3	B	39.01 ± 0.08 ^b	32.80 ± 0.09 ^a	28.19 ± 0.15 ^d

表 2 各消化阶段 WB-LRS3 结晶特性

Table 2 Crystallinity characteristics of WB-LRS3 at each digestive stage

样品	晶型	微晶度/%	亚结晶度/%	无定形度/%
WB-LRS3-0	B	2.21 ± 0.04 ^c	48.75 ± 0.13 ^{bc}	49.04 ± 0.09 ^a
WB-LRS3-1	B	1.83 ± 0.03 ^c	49.40 ± 0.07 ^b	48.78 ± 0.03 ^{ab}
WB-LRS3-2	B	4.41 ± 0.05 ^b	62.18 ± 0.04 ^a	33.41 ± 0.08 ^c
WB-LRS3-3	B	14.57 ± 0.08 ^a	38.93 ± 0.05 ^c	46.50 ± 0.07 ^b

2.3 LRS3 在体外消化后的核磁共振检测结果

由 X-射线衍射结果可知,MP-LRS3-0 与 WB-LRS3-0 具有相似的波谱特征,然而,经消化处理后二者的结晶度和无定形度却呈现不同的变化趋势。本研究通过核磁共振扫描技术研究此过程中 MP-LRS3 和 WB-LRS3 的内部结构变化(图 4)。淀粉晶体结构的改变主要是由 CH 和 CH₂ 基团分子间移动,以及直链和支链淀粉不同的葡萄

糖残基分布引起的^[26-27]。碳化学位移在 106~96 处晶体峰与葡萄糖单元 C1 有关,位移的多样性反映淀粉结晶度和双螺旋对称性,B-型晶体在 101 和 100 处有两个 C1 共振峰;72~76 范围的峰与 C2、C3、C5 的无序结构有关,主要表示直链淀粉残基形成的 B-型双螺旋结构;79~85 范围的峰与 C4 有关,若 82 处出现宽共振,表明无定形区增加;59~62 范围的峰与 C6 有关^[26,28]。

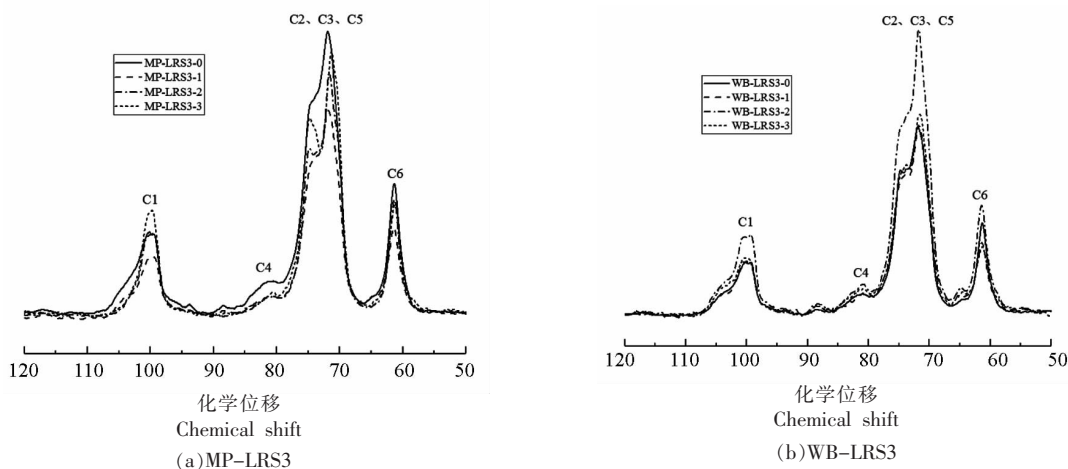


图 4 各消化阶段 MP-LRS3(a)和 WB-LRS3(b)的 CP/MPS 核磁共振扫描波谱

Fig.4 CP/MPS NMR spectra of MP-LRS3 (a) and WB-LRS3 (b) at each digestive stage

由表 3 和表 4 可知,MP-LRS3 和 WB-LRS3 的 C1 位均显示多重共振峰(除 MP-LRS3-3 和 WB-LRS3-3),为典型的 B-型晶体特征;且两者的相对结晶度随消化过程的进行而增大,变化趋

势分别呈先降后升和先降后升再降,这与 X-射线衍射结果一致。而 MP-LRS3-3 和 WB-LRS3-3 在 C1 位仅出单峰(100.03),说明形成更稳定的晶体结构^[18,29],这与 X-衍射结果一致。

淀粉结构中的双螺旋结构含量与无定形区密切相关,无定形区含量越低,双螺旋结构含量越高;而PPA为C4位峰值拟合面积与波谱总面积的比值^[30]。在模拟消化液作用下,MP-LRS3的PPA值逐渐降低,说明其双螺旋结构占比增大,解聚作用主要作用于无定形区;而WB-LRS3未表现出如MP-LRS3一致的PPA变化趋势,呈先缓慢升

高后降低的趋势,说明二者在消化液中解聚区域的暴露情况不同。WB-LRS3的PPA在各阶段均高于MP-LRS3,说明其双螺旋结构占比低于MP-LRS3,这与ESEM和X-射线衍射结果一致,推测这可能与二者制备方式不同导致的晶体三维结构差异有关。

表3 各消化阶段MP-LRS3的化学位移和相对结晶度

Table 3 Chemical shifts and relative crystallinity of MP-LRS3 at each digestive stage

样品	化学位移				相对结晶度/%	PPA/%
	C1	C4	C-2,3,5	C6		
MP-LRS3-0	100.22	81.28	71.96	61.42	84.71 ± 0.07 ^c	4.78 ± 0.02 ^a
	99.59	80.60				
MP-LRS3-1	100.15	80.86	73.88	61.45	81.23 ± 0.06 ^d	2.55 ± 0.03 ^b
	99.43		71.79			
MP-LRS3-2	100.36	80.92	71.82	61.47	88.54 ± 0.09 ^b	2.55 ± 0.02 ^b
	99.38					
MP-LRS3-3	100.03	81.57	73.86	61.34	94.98 ± 0.12 ^a	1.15 ± 0.03 ^c
		80.84	71.64			
		79.58				

注:PPA表示淀粉中无定形区含量。

表4 各消化阶段WB-LRS3的化学位移和相对结晶度

Table 4 Chemical shifts and relative crystallinity of WB-LRS3 at each digestive stage

样品	化学位移				相对结晶度/%	PPA/%
	C1	C4	C-2,3,5	C6		
WB-LRS3-0	100.21	81.00	74.78	61.37	82.98 ± 0.11 ^c	3.49 ± 0.06 ^c
	99.37	79.58	71.94			
WB-LRS3-1	100.19	80.79	71.91	61.48	74.41 ± 0.06 ^d	3.47 ± 0.03 ^c
	99.61					
WB-LRS3-2	100.10	81.42	74.82	61.41	95.24 ± 0.09 ^a	5.46 ± 0.04 ^a
		99.60	80.76	71.72		
			80.30			
			80.00			
WB-LRS3-3	100.03	80.71	74.79	61.27	88.81 ± 0.05 ^b	4.66 ± 0.08 ^b
			71.34			

2.4 MP-LRS3和WB-LRS3对短双歧杆菌的增殖作用

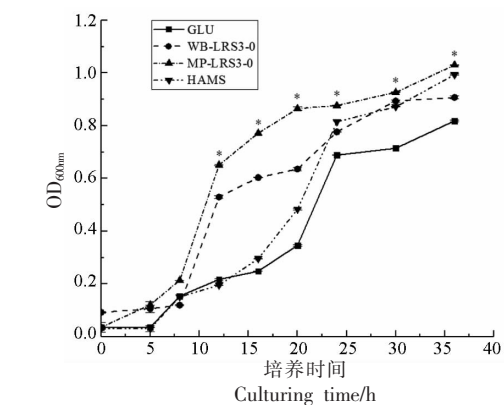
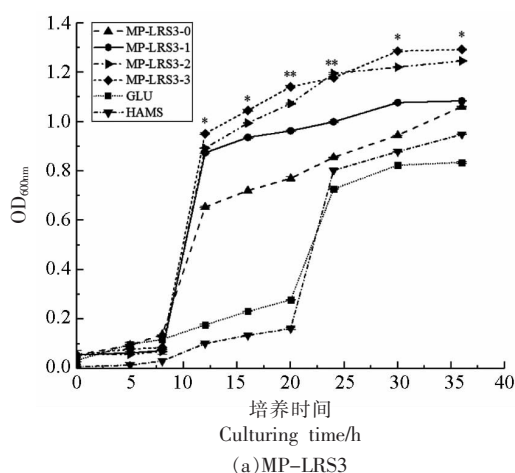
为证实消化后LRS3的结构特性对短双歧杆菌增殖的影响,以各消化阶段MP-LRS3和WB-LRS3为培养基碳源,研究其促短双歧杆菌增殖作用。

如图5所示,4组不同碳源培养的菌株均在8h左右进入对数期,24h左右进入稳定期;MP-LRS3-0和WB-LRS3-0试验组菌株最大增殖速率和最大生长量均显著高于GLU和HAMS对照组($P < 0.05$),说明两种LRS3均具有比另两种碳源更好的促短双歧杆菌增殖效果,这与Zhang等^[3]结

论一致。在对数生长期, LRS3 表现出与 GLU 和 HAMS 完全不同的促增殖现象。在菌株生长的 8~16 h, LRS3 组菌株的增殖速率明显高于对照组, 这表明 LRS3 可被短双歧杆菌更快速、有效的利用; 而在 16~24 h 则相反, 增殖速率更趋于平缓, 这可能是由于可被利用的 LRS3 营养水平逐渐降低, 成为菌体增殖速率的关键限制因子所致。此外, 在底物浓度一致的前提下, MP-LRS3-0 组菌株的最大增殖速率和最大生长量也显著高于 WB-LRS3-0 组 ($P < 0.05$), 说明前者更易被短双歧杆菌快速、彻底地利用, 这可能与其制备方式导致的结构差异有关。结合结构特性, 发现 MP-LRS3-0 较 WB-LRS3-0 结构松散, 无定形程度高, 推测短双歧杆菌快速增殖的原因是利用了抗性淀粉的无定形区。

此外, 经消化液处理的 LRS3, 极有可能对短双歧杆菌的增殖产生不同的影响。如图 6 所示, 在 0~8 h 时, 短双歧杆菌在所有培养基中的增殖速率相似, 仅 GLU 组稍高。所有 LRS3 试验组菌株在 8 h 时进入对数生长期, 而 GLU 和 HAMS 对照组在 8 h 时仍生长缓慢, 20 h 后才开始快速增殖。试验组菌株的最终生长量也显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 高于对照组。这表明无论是否经消化液处理, LRS3 均较 GLU 和 HAMS 更易被短双歧杆菌利用。

此外, 与消化前相比, 消化后各 MP-LRS3 和

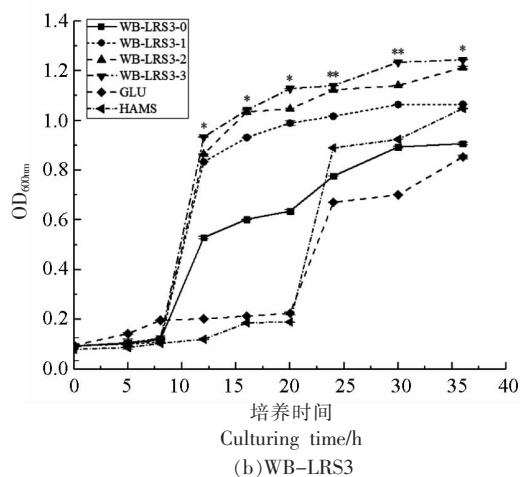


注: * 表示 MP-LRS3-0 与 WB-LRS3-0 在 12~36 h 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 5 MP-LRS3-0 和 WB-LRS3-0 对短双歧杆菌的促增殖作用比较

Fig.5 Comparison of the effects of MP-LRS3-0 and WB-LRS3-0 on the proliferation of *B. breve*

WB-LRS3 组菌株的最大增殖速率和最大生长量均呈显著升高趋势 ($P < 0.05$), 且随着口腔、胃和小肠消化过程的进行, 各组最大生长量也升高, 即 MP-LRS3-3 > MP-LRS3-2 > MP-LRS3-1 > MP-LRS3-0, WB-LRS3-3 > WB-LRS3-2 > WB-LRS3-1 > WB-LRS3-0。经体外消化的 LRS3 更有利于短双歧杆菌的增殖, 且由消化液导致的 LRS3 结构性解聚程度影响其促菌株增殖效果, 即消化后的抗性淀粉具有更好的益生作用, 意味着抗性淀粉结晶度的提高对促菌株增殖有利, 这与文献[31-32]报道一致。



注: * 与 ** 分别表示 MP-LRS3 与 WB-LRS3 在 12~36 h 具有显著性差异 ($P < 0.05$) 和极显著差异 ($P < 0.01$)。

图 6 各消化阶段 MP-LRS3(a) 和 WB-LRS3(b) 对短双歧杆菌的促增殖作用

Fig.6 Effects of MP-LRS3 (a) and WB-LRS3 (b) at each digestive stage on the proliferation of *B. breve*

2.5 短双歧杆菌与 MP-LRS3 和 WB-LRS3 的黏附作用

研究表明,高直链玉米抗性淀粉可提高小鼠肠道双歧杆菌在低 pH 值、胆盐环境和肠道通路中的生存能力^[1],菌体对淀粉的黏附作用可能是提

高细菌活力的可能机制之一^[33-34];Crittenden 等^[16]指出,黏附极有可能对菌株与淀粉的营养相互作用具有重要作用。本研究采用经体外消化处理的各阶段 MP-LRS3 和 WB-LRS3 与短双歧杆菌进行黏附试验,以黏附率为指标,结果如表 5 所示。

表 5 短双歧杆菌对各消化阶段 MP-LRS3 和 WB-LRS3 的黏附能力

Table 5 Adhesion capacity of *B. breve* to MP-LRS3 and WB-LRS3 after each digestive stage

组别	黏附率/%	组别	黏附率/%
MP-LRS3-0	66.53 ± 0.75 ^d	WB-LRS3-0	56.12 ± 0.38 ^b
MP-LRS3-1	67.26 ± 0.01 ^c	WB-LRS3-1	64.84 ± 0.01 ^c
MP-LRS3-2	71.74 ± 0.05 ^b	WB-LRS3-2	60.47 ± 0.01 ^d
MP-LRS3-3	78.71 ± 0.02 ^a	WB-LRS3-3	78.31 ± 0.02 ^a

注:表中不同的小写字母角标表示同一列数据间具有显著性差异($P < 0.05$)。

根据 Crittenden 等^[16]的研究结果,与淀粉颗粒黏附的细菌占比超过 70%被认为是高黏附,40%~70%之间为中等黏附,而低于 40%为低黏附。由表 5 可知,消化处理前、后 MP-LRS3 组和 WB-LRS3 组黏附率均高于 50%,属于中等黏附。MP-LRS3 对短双歧杆菌的黏附率普遍高于 WB-LRS3,说明微波法较水浴法更有利于 LRS3 对菌株的黏附。其中,短双歧杆菌与各阶段 MP-LRS3 的黏附率均在 65%以上,总体呈上升趋势($P < 0.05$),且在胃肠消化处理组呈现出超过 70%的高黏附率。短双歧杆菌与各阶段 WB-LRS3 的黏附率整体较 MP-LRS3 组稍低,均在 50%以上,同样总体呈上升趋势($P < 0.05$),仅胃液消化处理组略下降。上述结果说明,口腔和胃肠消化液对 LRS3 的结构性解聚具有促进短双歧杆菌黏附的作用。这可能与大分子淀粉聚合物与细菌之间的空间位阻有关^[16]。由结构测定结果可知,MP-LRS3 和 WB-LRS3 经消化液处理后发生颗粒松散,产生凹坑孔洞,以及无定形区解聚等空间结构的变化,均可能使晶体上黏附受体的暴露程度或表面电荷等发生改变,从而导致黏附效果的差异。MP-LRS3 较 WB-LRS3 更易解聚成高结晶度的结构特性,也与该组黏附率较高的结果一致,验证了由消化介导的 LRS3 结构解聚利于菌株黏附这一观点。结合抗性淀粉体外消化的结构特性,可推测黏附体系中直链淀粉含量的增加,使得菌与淀粉的黏附率增大。

Flint 等^[9]认为,不溶性颗粒淀粉与细菌的黏附

作用是其降解过程的首要步骤,也是其有效降解的先决条件。结合之前结果,消化进程与促增殖作用存在相关性的原因,可能与 LRS3 晶体结构变化使其黏附菌株能力不同有关,这为抗性淀粉与菌株的营养互作提供结构基础,即:一方面 LRS3 表面的沟壑状结构为双歧杆菌提供了附着点,是二者黏附的可能机制之一;另一方面这种聚集态结构和黏附作用也保护并促进了双歧杆菌的增殖^[3]。这也可能是短双歧杆菌菌株对 LRS3 底物的利用率高于其它来源抗性淀粉的原因。

3 结论

研究体外消化后微波法和水浴法制备莲子抗性淀粉的晶体特性,结果发现,消化后 MP-LRS3 和 WB-LRS3 颗粒变小,从大块片层结构变为表面粗糙有凹坑且棱角圆润的小颗粒,晶体结构仍为 B-型,结晶区域和双螺旋结构占比增大,无定形区含量整体降低,推测随着消化的进行,LRS3 发生结构性解聚,并形成更稳定的双螺旋结构。因制备方式不同,故消化前、后的晶体特性均存在差异,在相同消化阶段,MP-LRS3 较 WB-LRS3 的解聚程度更高。

各消化阶段 MP-LRS3 和 WB-LRS3 均具有比 GLU 和 HAMS 更好的促短双歧杆菌增殖能力,并可与短双歧杆菌发生中等以上黏附反应。黏附率随 LRS3 消化时间的延长而显著升高($P < 0.05$),且各消化阶段的促增殖作用与其黏附能力呈正相

关。这表明由消化液导致的 LRS3 结构性解聚影响二者的黏附作用，而其聚集态结构和黏附作用又促进短双歧杆菌的增殖，推测这种 LRS3 和双歧杆菌之间的营养互作关系均以抗性淀粉聚集态结构特性为基础。此外，MP-LRS3 较 WB-LRS3 有更好的黏附能力和促增殖能力，可被短双歧杆菌更有效利用，这可能与其制备方式导致的空间结构差异有关。LRS3 在消化环境中存在不同程度的晶体结构解聚现象，直接影响其对短双歧杆菌的促增殖效果和黏附能力。这一构效关系的建立对于深入了解抗性淀粉在体内的转化过程提供重要的理论支持，而消化后 LRS3 的其它益生作用及内在构效机制还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] WANG X, BROWN I L, EVANS A J, et al. The protective effect of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium* spp. in the mouse intestinal tract[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(5): 631-639.
- [2] MOREIRA R, CHENLO F, TORRES M D. Effect of sodium chloride, sucrose and chestnut starch on rheological properties of chestnut flour doughs [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 1041-1050.
- [3] ZHANG Y, WANG Y, ZHENG B D, et al. The *in vitro* effects of retrograded starch (resistant starch type 3) from lotus seed starch on the proliferation of *Bifidobacterium adolescentis*[J]. *Food & Function*, 2013, 4(11): 1609-1616.
- [4] 谢涛, 张淑远, 王美桂. 马铃薯抗性淀粉消化前后的益生作用与结构变化[J]. *食品科学*, 2014, 35(15): 105-108.
XIE T, ZHANG S Y, WANG M G. Probiotic functions and structural changes of potato resistant starch before and after digestion[J]. *Food Science*, 2014, 35(15): 105-108.
- [5] DHITAL S, WARREN F J, BUTTERWORTH P J, et al. Mechanisms of starch digestion by α -amylase—structural basis for kinetic properties[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(5): 875-892.
- [6] LEHMANN U, JACOBASCH G, SCHMIEDL D. Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*)[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, 50(18): 5236-5240.
- [7] 曾红华. 抗性淀粉的理化性质及其益生效应[D]. 长沙: 长沙理工学院, 2013.
ZENG H H. Physico-chemical properties and probiotic effect of resistant starches[D]. Changsha: Changsha University of Science & Technology, 2013.
- [8] LESMES U, BEARDS E J, GIBSON G R, et al. Effects of resistant starch type III Polymorphs on human colon microbiota and short chain fatty acids in human gut models[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008, 56(13): 5415-5421.
- [9] FLINT H J, BAYER E A, RINCON M T, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: Potential for new insights from genomic analysis [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(2): 121-131.
- [10] ZHANG Y, ZENG H L, WANG Y, et al. Structural characteristics and crystalline properties of lotus seed resistant starch and its prebiotic effects[J]. *Food Chemistry*, 2014, 155: 311-318.
- [11] 郑宝东, 王琦, 郑亚凤, 等. 抗性淀粉的生物学功效及在食品加工中的应用[J]. *食品科学技术学报*, 2015, 32(5): 1-7.
ZHENG B D, WANG Q, ZHENG Y F, et al. Biological functions of resistant starch and its application in food processing[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 32(5): 1-7.
- [12] 吴小婷. 不同方法制备的莲子抗性淀粉性质及其体外益生元作用的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
WU X T. Properties and prebiotics effects *in vitro* of lotus seed resistant starch prepared by different methods[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015.
- [13] 曾红华, 谢涛, 杨莉, 等. 几种薯类与豆类抗性淀粉的抗消化性及其益生效应[J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(11): 31-33.
ZENG H H, XIE T, YANG L, et al. Anti-digestibility of several tubers and legumes resistant starches and their proliferation of probiotics[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2012, 27(11): 31-33.
- [14] 陈梦霏, 周娟娟, 吴书建, 等. 模拟胃肠消化提高蛹虫草蛋白的体外抗氧化活性[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(2): 70-77.
CHEN M F, ZHOU J J, WU S J, et al. Simulated

- gastrointestinal digestion increase the *in vitro* antioxidant activity of *Cordyceps militaris* proteins[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(2): 70–77.
- [15] 李贻, 贺君, 张鹏敏. 体外模拟胃肠道消化下刺梨抗氧化成分的释放[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(2): 102–107.
- LI Y, HE J, ZHANG P M. Antioxidant components release of *Rosa roxburghii* Tratt by *in vitro* simulated gastrointestinal digestion[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(2): 102–107.
- [16] CRITTENDEN R, LAITILA A, FORSSELL P, et al. Adhesion of *Bifidobacteria* to granular starch and its implications in probiotic technologies[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2001, 67(8): 3469–3475.
- [17] NAGULESWARAN S, VASANTHAN T, HOOVER R, et al. Amylolysis of amylopectin and amylose isolated from wheat, triticale, corn and barley starches[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 35(3): 686–693.
- [18] ZHENG Y X, ZHANG C, TIAN Y T, et al. Effects of freeze–thaw pretreatment on the structural properties and digestibility of lotus seed starch–glycerin monostearin complexes [J]. *Food Chemistry*, 2021, 350: 129231.
- [19] 张本山, 张友全, 杨连生, 等. 淀粉多晶体系结晶度测定方法研究[J]. *华南理工大学学报 (自然科学版)*, 2001, 29(5): 55–58.
- ZHANG B S, ZHANG Y Q, YANG L S, et al. A method of determining crystallinity of starch in multicrystal system[J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2001, 29(5): 55–58.
- [20] MUTUNGI C, PASSAUER L, ONYANGO C, et al. Debranched cassava starch crystallinity determination by Raman spectroscopy: Correlation of features in raman spectra with X–ray diffraction and CP/MAS NMR spectroscopy[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 598–606.
- [21] ZHANG B J, LI X X, LIU J, et al. Supramolecular structure of A– and B–type granules of wheat starch[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 31(1): 68–73.
- [22] CHEETHAM N W, TAO L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: An X–ray powder diffraction study[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1998, 36(4): 277–284.
- [23] 方晨璐, 黄峻榕, 任瑞珍, 等. 酶解薯类淀粉适用于电镜观察其颗粒表面及内部结构[J]. *农业工程学报*, 2018, 34(22): 306–312.
- FANG C L, HUANG J R, REN R Z, et al. Amylases enzymolysis of tuber starch granules for surface and internal structure observation under scanning electron microscopy[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, 34(22): 306–312.
- [24] 赵凯, 陈威, 宫玉晶, 等. 酶脱支处理对颗粒态缓慢消化淀粉形成的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2019, 37(2): 42–47.
- ZHAO K, CHEN W, GONG Y J, et al. Effect of enzyme debranching treatment on formation of granular slowly digestible starch[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 37(2): 42–47.
- [25] 吴晓娟, 林亲录, 符琼, 等. 酶法制备不同品种大米淀粉的性质研究[J]. *粮食与油脂*, 2016, 29(11): 46–48.
- WU X J, LIN Q L, FU Q, et al. Study on the properties of different varieties of rice starch by pronase hydrolysis [J]. *Cereals & Oils*, 2016, 29(11): 46–48.
- [26] FLORES –MORALES A, JIMÉNEZ –ESTRADA M, MORA –ESCOBEDO R. Determination of the structural changes by FT–IR, Raman, and CP/MAS 13C NMR spectroscopy on retrograded starch of maize tortillas [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 61–68.
- [27] FAN D M, MA W R, WANG L Y, et al. Determining the effects of microwave heating on the ordered structures of rice starch by NMR[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2): 1395–1401.
- [28] LIN J H, WANG S W, CHANG Y H. Effect of molecular size on gelatinization thermal properties before and after annealing of rice starch with different amylose contents[J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22(1): 156–163.
- [29] ZHENG Y X, OU Y J, ZHANG Y, et al. Effects of pullulanase pretreatment on the structural properties and digestibility of lotus seed starch–glycerin monostearin complexes [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 240: 116324.
- [30] ATICHOKUDOMCHAI N, VARAVINIT S, CHINACHOTI P. A study of ordered structure in acid–

- modified tapioca starch by 13C CP/MAS solid-state NMR [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2004, 58 (4): 383-389.
- [31] LOPEZ-RUBIO A, FLANAGAN B M, GILBERT E P. Molecular rearrangement of starch during *in vitro* digestion: Toward a better understanding of enzyme resistant starch formation in processed starches [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(7): 1951-1958.
- [32] MUTUNGI C, OUYANGO C, DOERT T, et al. Long- and short-range structural changes of recrystallised cassava starch subjected to *in vitro* digestion [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(2): 477-485.
- [33] AMBALAM P, KONDEPUDI K K, BALUSUPATI P, et al. Prebiotic preferences of human *Lactobacilli* strains in co-culture with *Bifidobacteria* and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(6): 1672-1682.
- [34] LEE S K, KIM Y B, JI G E. Note: Purification of amylase secreted from *Bifidobacterium adolescentis*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, 83 (3): 267-272.

Effect of Structural Changes of Lotus Seed Resistant Starch through Digestion *in Vitro* on *Bifidobacterium breve* Proliferation

Huang Yaping^{1,2,3}, Liu Xia^{1,2,3}, Yang Shujie^{1,2,3}, Lu Xu^{1,2,3}, Miao Song^{2,4}, Deng Kaibo^{1,2,3*}, Zheng Baodong^{1,2,3}

(¹College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002

²China-Ireland International Cooperation Centre for Food Material Science and Structure Design, Fuzhou 350002

³Fujian Provincial Key Laboratory of Quality Science and Processing Technology in Special Starch, Fuzhou 350002

⁴Teagasc Food Research Centre, Agriculture and Food Development Authority of Ireland, Cork 999014, Ireland)

Abstract Resistant starch is a kind of important carbon source for colonic microorganisms. The study of its structure-function relationship is helpful to understand the mechanism of dietary nutrition in the body. In this paper, lotus seed resistant starch prepared by microwave-power method (MP-LRS3) and water-bath method (WB-LRS3) were used as raw materials. With digestion *in vitro*, MP-LRS3 and WB-LRS3 were used to determine the structural changes and established their nutritional interactions of *Bifidobacterium breve*. The results showed that after digestion *in vitro*, the crystallinity of MP-LRS3 and WB-LRS3 changed significantly ($P < 0.05$), the layered structure with rough surface gradually depolymerized into smaller particles with rounded corners, and both of their crystal structure still were B type. After recrystallization, the double helix structure was compacter and the arrangement of starch molecules was more orderly. However, due to the different preparation methods, the crystal properties were different after digestion. At the same digestion stage, the depolymerization degree of MP-LRS3 was higher than that of WB-LRS3. In addition, MP-LRS3 and WB-LRS3 showed a better adhesion reaction to *Bifidobacterium breve* with the process of digestion, but the level of the former was higher at the same digestion stage, which might be related to the different depolymerization degree in the digestion environment of lotus seed resistant starch caused by the structural differences. There was a positive correlation between the adhesion reaction and the ability to promote proliferation. It was speculated that the structural difference caused by the different degree of depolymerization made that MP-LRS3 was stronger than WB-LRS3 on adhesion ability and proliferative effect. The results of this study could provide a theoretical basis for improving the metabolism and probiotic action of resistant starch *in vivo*.

Keywords lotus seed resistant starch; digestion *in vitro*; structural characteristics; *Bifidobacterium breve*; proliferation