

# 绿豆抗性淀粉消化前后益生作用与结构变化的比较

谢涛, 张儒

(湖南工程学院化学化工学院, 湖南湘潭 411104)

**摘要:** 制备与纯化得到了绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉, 研究了它们的益生作用及结构变化。结果表明: 绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉对双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖效果达到 100 倍以上, 对大肠杆菌和产气荚膜梭菌的抑制强度更是高达  $10^6$  倍以上, 对粪肠球菌的抑制强度也有 10 倍, 而对梭状杆菌无明显影响; 它们的发酵液总酸度增大 30% 以上, 说明它们能被肠道益生菌发酵利用; 绿豆抗性淀粉经消化处理后比表面积增加, 经发酵后比表面积更大。绿豆抗性淀粉的平均聚合度较之原淀粉降低了一半, 发酵后绿豆抗性淀粉或消化抗性淀粉的平均聚合度继续降低 30% 以上; 绿豆抗性淀粉经消化前后的晶型均为 B 型, 绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉经发酵后, 晶型都转变为 A 型, 微晶度、亚微晶度及总结晶度较之发酵前都明显降低。

**关键词:** 绿豆; 抗性淀粉; 益生作用; 结构变化

文章编号: 1673-9078(2013)12-2834-2838

## Probiotic Functions and Structural Changes of Mung Bean Resistant Starch Before and After Digestion

XIE Tao, ZHANG Ru

(College of Chemical Engineering, Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, China)

**Abstract:** Resistant starches from mung bean before and after *in vitro* digestion were prepared and purified, and their probiotic functions and structural changes were studied. The results demonstrated that these resistant starches before and after digestion had more than 100 times proliferative effect on *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, as high as more than  $10^6$  times inhibitory impact on *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*, 10 times inhibitory effect on *Enterococcus faecalis*, and no obvious influence on *Bacillus fusiformis*. The total fermentation liquid acidities increased by more than 30% which demonstrated that these resistant starches before and after digestion could be used by intestinal probiotics. Compared with resistant starch, digested resistant starches had larger specific surface areas, and enlarged after *in vitro* anaerobic fermentation. The average degree of polymerization of resistant starch was half of the native starch, and both resistant and digested resistant starches sequentially reduced more than 30% after fermentation. Crystal form of resistant starches before and after *in vitro* digestion was type B. After fermentation, they all transformed to type A, and the degree of microcrystal, submicrocrystal and total crystallinity obviously decreased.

**Key words:** mung bean; resistant starch; probiotic function; structural change

抗性淀粉作为新型益生元, 具有来源广泛、制备工艺简单、口感好等优点, 在国外已被广泛研究, 应用前景非常广泛<sup>[1]</sup>。Morais 等<sup>[2]</sup>研究了抗性淀粉对猪肠道吸收钙、铁、锌离子的影响, 结果表明, 抗性淀粉明显促进了猪肠道对钙离子和铁离子的吸收。Bird 等<sup>[3]</sup>证实抗性淀粉有助于短链脂肪酸的生成, 影响肠道细菌的生长。Cummings 等<sup>[4]</sup>研究抗性淀粉在人体大肠的消化和生理特性, 结果表明抗性淀粉增加了粪便湿重, 促进了短链脂肪酸的生成, 而且大部分抗性淀粉在大肠内被消化吸收。Yamada 等<sup>[5]</sup>研究富含抗

性淀粉的面包对人体餐后血糖的影响, 结果显示富含抗性淀粉的面包具有预防糖尿病, 可以作为一个有效的食疗方法。近 10 多年来, 国内外许多学者将研究的视角转向了非粮淀粉资源。赵力超等<sup>[6]</sup>采用酸解-微波法制备了慈姑抗性淀粉并测定了它的理化性质, 结果表明: 抗性淀粉的晶型转变为 C 型, 结晶度为 23.63%, 溶解度和透明度远远低于原淀粉。Lehmann 等<sup>[7]</sup>研究了香蕉抗性淀粉的聚合度、热特性、发酵特性及益生作用。关于绿豆抗性淀粉的研究也已有许多报道, 但大多针对其制备工艺的优化, 而关于绿豆抗性淀粉尤其是其消化抗性淀粉的生物活性的研究, 没有引起国内外学者足够的重视<sup>[8-10]</sup>。针对这些问题, 本文采用二次循环压热法制备并纯化得到了绿豆抗性淀粉, 再经人工胃液和人工胃肠液处理制得 2 个消化抗性淀粉

收稿日期: 2013-08-11

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (教高司函[2013]8 号)

作者简介: 谢涛 (1970.05-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事再生资源与食品、生物化工研究

样品,然后研究了这3个样品的益生作用及其结构变化,以期探讨消化前后的抗性淀粉在益生作用过程中可能的结构变化,为进一步阐明抗性淀粉益生作用的机理及构效关系打下理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选择性培养基:麦康凯琼脂培养基(大肠杆菌)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(双歧杆菌)、LAMVAB琼脂培养基(乳酸杆菌)、麦芽糖琼脂培养基(粪肠球菌)、亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基(梭状杆菌)、甘露醇琼脂培养基(产气荚膜梭菌)、需氧-厌氧菌琼脂培养基购自美国Life Tech公司;耐热 $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、胃蛋白酶、胰酶-5.0购自美国Sigma公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 抗性淀粉的制备

制备:用蒸馏水配制30%的淀粉乳液,调节pH为6.0,沸水浴30 min后,121 °C高温高压处理40 min。冷却,4 °C放置24 h。重复高温高压和冷却步骤,80 °C烘干,粉碎过100目筛得粗抗性淀粉。

纯化:取一定量的粗抗性淀粉,用耐热 $\alpha$ -淀粉酶在70 °C水解1 h,加入过量糖化酶,55 °C水解2 h,离心(3000 r/min, 30 min),水洗离心多次,最后用95%乙醇清洗,干燥,粉碎,过200目筛,得纯抗性淀粉(RS)。

### 1.3 胃液、胃肠液消化抗性淀粉的制备

按参考文献<sup>[11]</sup>的方法制备人工胃液和人工胃肠液消化抗性淀粉,分别简称为DRS<sub>AGJ</sub>、DRS<sub>AGIJ</sub>。

### 1.4 体外厌氧发酵

#### 1.4.1 培养基

改良MRS培养基:以2%的抗性淀粉或消化抗性淀粉取代MRS培养基中的葡萄糖作为碳源。

选择性培养基:见1.1。

#### 1.4.2 厌氧发酵

取年龄23~31岁健康男子(此前至少3个月以上未注射抗生素,没有预先服用已知的益生元或益生菌,没有胃肠病史)的粪便,将粪使用磷酸盐缓冲溶液(PBS)制成均匀的悬浮液。取4×3个50 mL的锥形瓶,设三个平行,每个装入20 mL改良MRS培养基,于121 °C,1×10<sup>5</sup> Pa灭菌20 min后,每个锥形瓶接入等量已多次用MRS培养基活化的粪便培养物,密封,

37 °C厌氧培养至10、20、30 h分别取样,用于肠道微生物菌群组成和总酸度的测定分析。

### 1.4.3 肠道菌群分析

取样品液1 mL,用生理盐水稀释一定倍数后涂布于选择性平板上,于37 °C需/厌氧培养48~72 h后,使用全自动菌落分析仪计数。

### 1.4.4 发酵液总酸度测定

参照GB/T 12456-1990法测定每份发酵液的总酸度,并以乳酸含量表示。

### 1.4.5 发酵残余物制备

取10 mL发酵液,离心(15 min, 3000 g),沉淀用10 mL蒸馏水清洗三次后烘干,粉碎过100目筛,这些发酵残余物分别称为发酵抗性淀粉(FRS)、发酵胃液消化抗性淀粉(FDRS<sub>AGJ</sub>)和发酵胃肠液消化抗性淀粉(FDRS<sub>AGIJ</sub>)。

## 1.5 结构测定方法

平均聚合度(DP值)测定采用碘吸收法<sup>[12]</sup>;扫描电子显微(SEM)分析按参考文献<sup>[13]</sup>的方法测定;X-射线衍射(XRD)分析采用参考文献<sup>[14]</sup>的方法。

所有数据为三个平行实验的平均值,且采用SPSS 20.0 for windows进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉对肠道菌群生长的影响

以不添加绿豆抗性淀粉或胃肠液消化抗性淀粉为对照,在10、20、30 h取样,测定绿豆抗性淀粉及胃肠液消化抗性淀粉对肠道菌群生长的影响结果见表1。从表1可知,发酵至第30 h时各种肠道微生物菌浓均比发酵至第20 h时的低,这是由于30 h时细菌生长已达衰老期,导致活细胞数目减少。当发酵20 h后,绿豆抗性淀粉及其胃肠液消化抗性淀粉对双歧杆菌和乳酸杆菌都有显著的增殖作用( $P<0.001$ ),其中抗性淀粉的增殖效果达到10<sup>2</sup>倍、消化抗性淀粉的增殖效果更是高达10<sup>3</sup>倍左右;对大肠杆菌和产气荚膜梭菌的抑制作用很强( $P<0.001$ ),大肠杆菌减值倍数达到10<sup>6</sup>倍,而产气荚膜梭菌减值倍数则更高达约10<sup>8</sup>倍;对粪肠球菌的抑制作用也比较显著( $P<0.01$ ),减值倍数也达到了10倍;对梭状杆菌影响不明显( $P>0.05$ )。绿豆胃肠液消化抗性淀粉比其抗性淀粉对双歧杆菌、乳酸杆菌增殖效果更加明显,对产气荚膜菌的抑制作用也更强些,说明抗性淀粉经消化道酶及其环境条件的作用是其发

挥益生作用所必需的,也就是说消化抗性淀粉具有更好的益生作用,这与文献<sup>[8,10]</sup>报道的结果非常一致。

表1 绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉对肠道菌群生长的影响 [lg(CFU/mL)]

**Table 1 Effects of resistant starches before and after digestion from mung bean on intestinal bacteria [lg(CFU/mL)]**

样品	发酵时间/h	双歧杆菌	乳酸杆菌	粪肠球菌	大肠杆菌	梭状杆菌	产气荚膜梭菌
对照	10	8.37±0.14	8.55±0.15	8.57±0.22	7.63±0.26	9.19±0.39	5.32±0.16
	20	10.30±0.25	10.08±0.38	11.09±0.45	8.08±0.33	11.69±0.47	11.34±0.38
	30	5.32±0.17	6.43±0.24	8.62±0.37	6.65±0.24	8.37±0.18	9.04±0.27
RS	10	8.43±0.35	8.71±0.18	8.44±0.15	4.15±0.18	8.56±0.26	4.83±0.25
	20	12.98±0.72	12.06±0.26	12.11±0.55	2.06±0.05	11.51±0.43	3.58±0.10
	30	8.65±0.43	8.36±0.17	8.82±0.07	0.00±0.00	7.68±0.31	2.51±0.13
DRS <sub>AGIJ</sub>	10	8.44±0.19	8.72±0.29	8.45±0.10	4.02±0.14	8.54±0.16	4.66±0.24
	20	13.60±0.22	12.94±0.65	12.05±0.21	1.86±0.09	11.52±0.57	3.06±0.11
	30	8.46±0.14	8.39±0.36	8.84±0.16	0.00±0.00	7.71±0.18	1.53±0.02

## 2.2 发酵液的酸度分析

发酵液的总酸度在一定程度上代表了益生菌尤其是双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖情况,双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖会促进丙酸、丁酸、乳酸等合成<sup>[15]</sup>。表2为添加不同绿豆抗性淀粉和胃肠液消化抗性淀粉发酵10 h、20 h、30 h所测得的总酸度(以乳酸含量表示)。从发酵至第10 h后,绿豆抗性淀粉及其胃肠液消化抗性淀粉的发酵液总酸度逐渐增大,且绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉的发酵液总酸度均比对照值要高出至少30% (0.01<P<0.05),说明抗性淀粉及消化抗性淀粉被肠道益生菌发酵过程中产生的短链脂肪酸数量增多,而且后者产生的脂肪酸数量要略多些。

表2 绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉发酵液的总酸度

**Table 2 Total fermentation liquid acidities s from resistant starches before and after digestion**

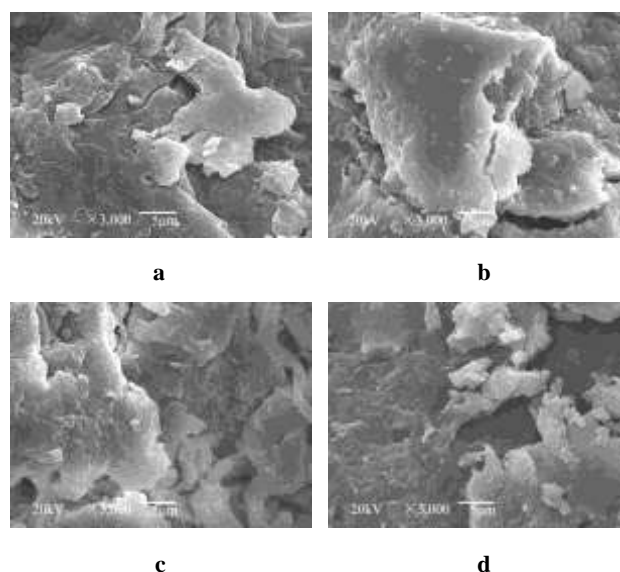
样品	发酵时间/h		
	10	20	30
对照	10.80±0.19	11.16±0.26	11.52±0.08
RS	13.15±0.37	14.24±0.35	15.98±0.18
DRS <sub>AGIJ</sub>	14.26±0.25	15.40±0.19	16.20±0.33

注:以乳酸表示,单位g/L。

## 2.3 发酵前后绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉的超微结构变化

图1为发酵前后绿豆抗性淀粉及其消化抗性淀粉的扫描电子显微照片。从图1a可看出,经压热制备的绿豆抗性淀粉颗粒是由大小不一的块状物紧密堆积而成的叠层结构,且表面有坑洼。造成这种变化的原因是:在糊化过程中,直链淀粉先从原淀粉颗粒中溶出,

进入水中,冷却时,直链淀粉分子相互靠近依靠氢键及范德华力形成双螺旋并沉降,形成非常稳定的晶体;在后续纯化过程中,粗抗性淀粉中的无定形部分被酶解,剩下高度结晶的直链淀粉。绿豆抗性淀粉经人工胃液消化后,经强酸环境的侵蚀作用,叠层结构上出现大小、长短不一的裂缝,开始崩裂解体(图1b)。绿豆抗性淀粉经人工胃肠液联合作用后,随着叠层结构的崩解,剥落出大小不一的片层,并散乱堆积(图1c)。发酵后绿豆抗性淀粉单一的叠层结构表面出现较多的蚀孔,使其变得更加粗糙不平,并剥落出碎片堆积在上(图1d)。人工胃液消化的抗性淀粉经发酵后,伴随着叠层结构的崩解,在叠层表面出现许多大小不一的蚀孔,层与层之间开始松动(图1e)。经人工胃肠液消化的抗性淀粉发酵后,剥落的片层继续细化,最后变成由大小均匀的小片层堆积成具有更大比表面积和堆积密度的结构(图1f),可能与抗性淀粉在肠道中发挥的其他生理功能有关。





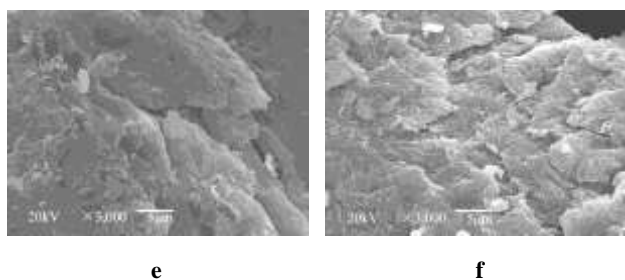


图1 发酵前后绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉的超微结构

Fig.1 Ultrastructures of resistant starch and digested resistant starch before and after fermentation

注: a-RS, b-DRSAGJ, c-DRSAGIJ, d-FRS, e-FDRSAGJ, f-FDRSAGIJ; 放大3000倍。

### 2.4 发酵前后抗性淀粉、消化抗性淀粉的平均聚合度变化

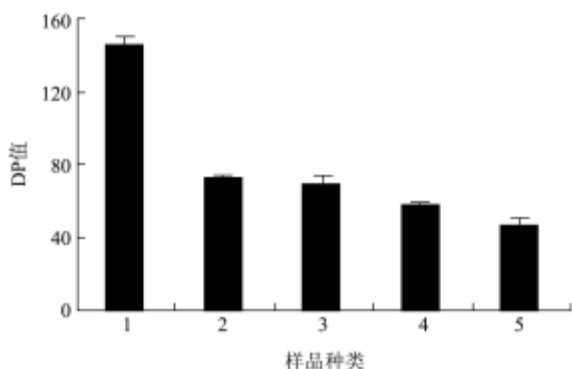


图2 绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉发酵前后的平均聚合度

Fig.2 Average degree polymerizations of resistant starch and digested resistant starch before and after fermentation

注: 1-原淀粉, 2-RS, 3-DRSAGIJ, 4-FRS, 5-FDRSAGIJ。

图2为绿豆抗性淀粉、消化抗性淀粉发酵前后的最大吸收波长 $\lambda_{max}$ 和平均聚合度(DP)。绿豆抗性淀粉的 $\lambda_{max}$ 和DP值都比其原淀粉的小,特别是DP值减少了一半以上( $P<0.001$ )。这是由于在制备过程中,高温、高压使部分直链淀粉分子断裂,支链淀粉的部分支链断裂转化为直链淀粉,故而抗性淀粉的DP值要比其原淀粉的小;同时直链淀粉分子越大,越容易断裂。消化后绿豆抗性淀粉的DP值比消化前略有降低( $P>0.05$ ),说明消化作用对抗性淀粉分子的DP值影响很小,而主要是其结构受到影响。发酵后绿豆抗性淀粉或消化抗性淀粉较之发酵前的DP值出现了较显著的下降( $0.01<P<0.05$ ),但与抗性淀粉较之原淀粉DP值的降低幅度都要小得多。从图2还可看出,胃肠液消化过的绿豆抗性淀粉经发酵后的DP值比绿豆抗性淀粉经发酵后的DP值至少降低30%( $0.01<P<0.05$ ),由此进一步说明胃肠液的消化作用对抗性淀粉在肠道

内的益生作用相当重要,表2和图2也证明了这一点。

### 2.5 发酵前后抗性淀粉、消化抗性淀粉的结晶度变化

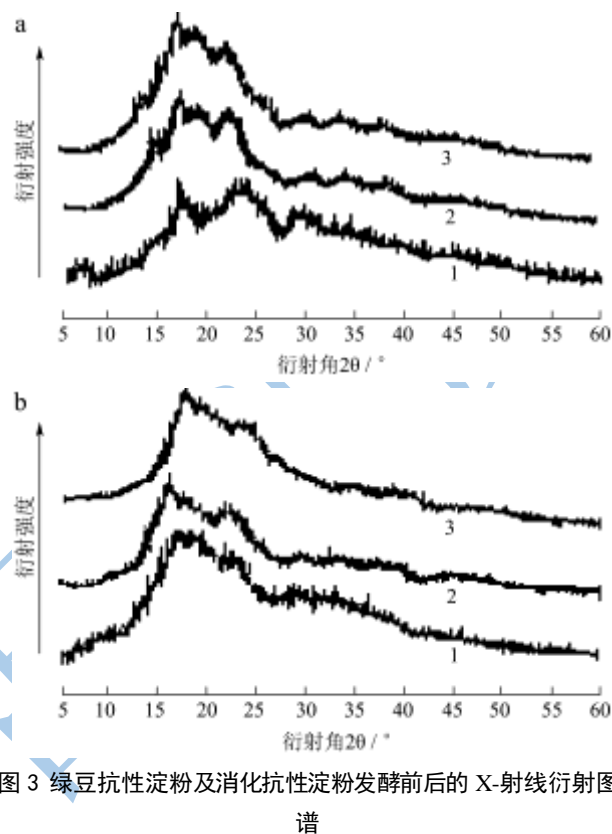


图3 绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉发酵前后的X-射线衍射图谱

Fig.3 X-ray diffraction patterns of resistant starch and digested resistant starches before and after fermentation

注: a: 发酵前, b: 发酵后; 1-RS, 2-DRSAGJ, 3-DRSAGIJ。

表3 绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉发酵前后的结晶参数

Table 3 Crystallization parameters of resistant starch and digested resistant starches before and after fermentation

样品	微晶度/%	亚微晶度/%	结晶度/%
RS	13.75±0.62	23.83±1.15	37.57±1.68
DRSAGJ	12.32±0.33	23.92±0.87	36.25±1.20
DRSAGIJ	12.06±0.19	19.45±0.28	31.46±0.48
FRS	7.48±0.27	17.29±0.39	24.67±0.87
FDRSAGJ	6.72±0.30	16.04±0.48	22.75±1.09
FDRSAGIJ	5.31±0.11	15.48±0.65	20.86±0.57

淀粉是主要由A型和B型晶体及少量V型晶体组成的混合物。图3是绿豆抗性淀粉及其消化抗性淀粉在体外厌氧发酵前后的X-射线衍射图谱,由其计算得到的结晶参数如表3所示。绿豆抗性淀粉的晶型为B型,说明在制备抗性淀粉的过程中,其分子链通过断裂、重组,形成了更为稳定的晶体结构<sup>[2]</sup>。绿豆抗性淀粉经胃液或胃肠液消化后的晶型仍为B型,与抗性淀

粉相比,胃液消化抗性淀粉的微晶度、亚微晶度及总结晶度基本没有变化 ( $P>0.05$ ),但胃肠液消化抗性淀粉亚微晶度与总结晶度有所降低 ( $0.01<P<0.05$ ),说明经过人工胃液的强酸侵蚀与分散作用,增强了人工肠液的消化作用。绿豆抗性淀粉及其消化抗性淀粉经发酵后,晶型都转变为 A 型,微晶度、亚微晶度及总结晶度较之发酵前都明显降低 ( $P<0.01$ ),说明发酵作用对绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉的结晶结构有较大影响。

### 3 结论

- 3.1 绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉对双歧杆菌和乳酸杆菌都有显著的增殖作用,对大肠杆菌和产气荚膜梭菌有强抑制作用,对粪肠球菌、梭状杆菌、兼性细菌无明显影响。它们的发酵液总酸度增大,说明它们被肠道益生菌发酵利用产生了更多的短链脂肪酸。
- 3.2 绿豆抗性淀粉经人工胃液、胃肠液消化处理后结构越来越疏松,且比表面积增加;绿豆抗性淀粉及其消化抗性淀粉经发酵后,它们进一步碎化为以细小片层为主体的具有更大比表面积和堆积密度的结构。
- 3.3 绿豆抗性淀粉的 DP 值较之原淀粉显著变小。消化后绿豆抗性淀粉的 DP 值比消化前几无降低,说明胃肠液主要作用于抗性淀粉的结构。胃肠液消化过的绿豆抗性淀粉经发酵后的 DP 值比绿豆抗性淀粉经发酵后的 DP 值要小。
- 3.4 绿豆抗性淀粉经胃液或胃肠液消化前的晶型均为 B 型,胃肠液消化抗性淀粉亚微晶度与总结晶度有所降低。绿豆抗性淀粉及消化抗性淀粉经发酵后,晶型都转变为 A 型,微晶度、亚微晶度及总结晶度较之发酵前都明显降低。

### 参考文献

- [1] Fuentes Aragozae E, Riquelme Navarrete M J, Sanchez Zapata E, et al. Resistant Starch as Functional Ingredient: A Review [J]. Food Research International, 2010, 43: 931-942
- [2] Morais M B, Feste A, Miller R G, et al. Effect of Resistant and Digestible Starch on Intestinal Absorption of Calcium, Iron, and Zinc in Infant Pigs [J]. Pediatric Research, 1996, 39(5): 872-876
- [3] Bird A R, Brown I L, Topping D L. Starches, Resistant Starches, The Gut Microflora and Human Health [J]. Current Issues in Intestinal Microbiology, 2000, 1(1): 25-37
- [4] Cummings J H, Beatty E R, Kingman S M, et al. Digestion and Physiological Properties of Resistant Starch in The Human Large Bowel [J]. British Journal of Nutrition, 1996, 75(05): 733-747
- [5] Yamada Y, Hosova S, Nishimur S, et al. Effect of Bread Containing Resistant Starch on Postprandial Blood Glucose Levels in Humans [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(3): 559-566
- [6] 赵力超,杜征,刘欣,等.慈姑抗性淀粉的理化特性研究[J].食品科学,2010,31(7):55-59  
ZHAO Li-chao, DU Zhen, LIU Xing, et al. Study on Physicochemical Properties of Arrowhead Resistant Starch [J]. Food Chemistry, 2010, 31(7): 55-59
- [7] Lehmann U, Jacobasch G, Schmiedl D. Characterization of resistant starch type III from banana [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(18): 5236-5240
- [8] 李素玲.绿豆抗性淀粉的制备及其性质研究[D].广州:华南理工大学,2011  
LI Su-ling. Preparation and Properties of Resistant Starch from Mung Bean Starch [D]. Guang Zhou: South China University of Technology, 2011
- [9] Mutungi C, Onyango C, Rost F, et al. Structural and Physicochemical Properties and In Vitro Digestibility of Recrystallized Linear  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) Glucans Derived from Mild-acid Modified Cassava Starch [J]. Food Research International, 2010, 43(4): 1144-1154
- [10] Mutungi C, Onyango 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
- [11] 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 Hong-hua, XIE Tao, YANG Li, 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
- [12] Takeda C, Takeda Y, Hizukuri S. Physicochemical Properties of Lily Starch [J]. Cereal Chemistry, 1983, 60(1): 212-216
- [13] Sushil D, Ashok K S, Michael J G. Effect of Cryo-milling on Starches: Functionality and Digestibility [J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24 (1): 152-163
- [14] 谢涛,张淑远,王美桂,等.重结晶红薯淀粉体外消化前后益生作用与结构变化[J].农业机械学报,2013,44(8):203-208  
XIE Tao, ZHANG Shu-yuan, WANG Mei-gui, et al. Probiotic Functions and Structure Changes of Recrystallised Sweet Potato Starches Before and After in Vitro Digestion [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural

- Machinery, 2013, 44(8): 203-208
- [15] Mazorati M, Verhilt A, Luta G, et al. In Vitro Modulation of The Human Gastrointestinal Microbial Community by Plant-derived Polysaccharide-rich Dietary Supplements [J]. International journal of food microbiology, 2010, 139(3): 168-176

现代食品科技