

桄榔抗性淀粉调控保加利亚乳杆菌和植物乳杆菌的增殖及耐受性

李梦赞, 任民红, 刘远森, 张露, 梅江洋, 符珍*

(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

摘要: 该研究以桄榔淀粉为原料制备桄榔抗性淀粉 (APRS), 采用体外发酵考察不同浓度 (0.1%、0.2%、0.5%、1%、1.5%) APRS 对保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*, LB) 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, LP) 增殖作用及在模拟人体胃肠道逆环境中的耐受能力影响。结果表明: 当 APRS 浓度逐渐增加到 0.2% 时, LB 的 OD 达到最大值为 0.91, 当 APRS 浓度逐渐增加到 0.5% 时, LP 的 OD 达到最大值 0.94, 但随着 APRS 含量的继续升高, 益生菌液浓度显著降低; 故低浓度下 (0.1%~0.5%) APRS 可促进 LB 和 LP 的生长, 但高浓度 (1%~1.5%) 不利于 LB 和 LP 的生长; 与葡萄糖 (GLU) 相比, APRS 可显著增强 LB 和 LP 耐酸性环境、高浓度胆汁酸盐及胃液逆环境的能力 ($p < 0.05$)。APRS 对益生菌的增殖作用展现出低浓度促进高浓度抑制现象, 使其在胃肠道环境中耐受性增强, APRS 潜在的益生作用可为其进一步开发提供理论参考。

关键词: 桄榔抗性淀粉; 益生菌; 体外发酵

文章编号: 1673-9078(2022)02-72-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0255

Proliferation and Tolerance Capability of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus plantarum* Regulated by the Resistant Starch from *Arenga pinnata*

LI Mengyun, REN Minhong, LIU Yuansen, ZHANG Lu, MEI Jiangyang, FU Zhen*

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: In this study, the starch from *Arenga pinnata* was used as the raw material to prepare *Arenga pinnata* resistant starch (APRS). *In vitro* fermentation was performed to investigate the effects of different concentrations of APRS (0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 1.5%) on the proliferation and tolerance capability in the adverse gastrointestinal environment of *Lactobacillus bulgaricus* (LB) and *Lactobacillus plantarum* (LP) were studied. The results showed that when the APRS concentration gradually increased to 0.2%, the OD_{600 nm} of LB reached the maximum (0.91); when the APRS concentration gradually increased to 0.5%, the OD_{600 nm} of LP reached the maximum (0.94). However, with the continuous increase of APRS content, the concentration of probiotics solution decreased significantly. Therefore, APRS at a low concentration (0.1%~0.5%) could promote on the growth of LB and LP; but APRS at a high concentration (1%~1.5%) was not conducive to on the growth of LB and LP. Compared with glucose (GLU), APRS could enhance the tolerance capability of LB and LP to an acidic environment, high concentration of bile acid salts and gastric fluid environment ($p < 0.05$). APRS promoted and inhibited the proliferation of probiotics at a low and high concentration, respectively, thereby enhancing their tolerance in the gastrointestinal environment. The potential prebiotic effect of APRS can provide a theoretical reference for further development of APRS.

引文格式:

李梦赞,任民红,刘远森,等.桄榔抗性淀粉调控保加利亚乳杆菌和植物乳杆菌的增殖及耐受性[J].现代食品科技,2022,38(2):72-78

LI Mengyun, REN Minhong, LIU Yuansen, et al. Proliferation and Tolerance Capability of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus plantarum* regulated by the resistant starch from *Arenga pinnata* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 72-78

收稿日期: 2021-03-10

基金项目: 广西自然科学基金面上项目 (2019GXNSFAA185014)

作者简介: 李梦赞 (1998-), 女, 硕士, 研究方向: 抗性淀粉与肠道菌群, E-mail: 424420789@qq.com

通讯作者: 符珍 (1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 碳水化合物, E-mail: fuzhen13@gxu.edu.cn

Key words: *Arenga pinnata* resistant starch; probiotics; *in vitro* fermentation

抗性淀粉(resistant starch, RS)作为一种新型的膳食纤维且属于淀粉的一部分,它有着多种类型且以“不被健康个体小肠所吸收的淀粉及其降解物”为定义,它对胃肠中消化酶等的抗性,从而对胃肠道微生物群落的组成和活性有一定的影响,进而影响人体健康^[1]。RS具有改善胰岛素敏感性,调节糖脂代谢、调节肠道菌群、促进矿物质的吸收和利用等多种潜在的生理功能^[2-5]。RS目前可分为五大类,比如存在于在谷物或种子的蛋白质基质和细胞壁中的物理性包埋淀粉(physically trapped starch, RS1)、像土豆中含有的不被消化酶消化的天然抗性淀粉颗粒(resistant starch granules, RS2)、因糊化老化而产生的回生淀粉(retrograded starch, RS3)、以及化学改性淀粉(chemically modified starch, RS4)和直链淀粉-脂肪复合淀粉(amylose-lipid complexed starch, RS5)5类^[6]。根据来源、处理方式和制备方法的不同,抗性淀粉呈现不同的颗粒形状、不同的晶体结构和不同的分子结构^[6,7]。

RS的功能和营养价值,特别是其生理意义,取决于其结构。抗性淀粉作为新型益生菌制剂,制备工艺简单、口感好、来源也广,开发和充分利用抗性淀粉作为益生元来源成为当前研究热点。林珊^[8]以压热法制备的莲子淀粉饲喂小鼠发现莲子抗性淀粉能够促进肠道益生菌的增殖及产酸能力;包辰等^[9,10]则通过不同的加工工艺制备出多种抗性淀粉,他们的结晶区和螺旋结构等存在差异,且有着不同的益生菌增殖效果和产酸能力,不仅印证了薏苡仁抗性淀粉对两歧双歧杆菌耐受性的增强作用,且展现出不同加工处理方法获得的抗性淀粉之间益生元性质的差异;崔琳琳等^[11]通过苦荞抗性淀粉的体外发酵实验确定了它的益生元作用,且发现不同剂量的苦荞抗性淀粉对有害菌的抑制程度不同。杨玥熹等^[12]研究了以玉米、绿豆和葛根等植物来源制备的B型抗性淀粉(RS),并将这几种抗性淀粉作为碳源进行厌氧培养,发现大肠埃希氏菌、干酪乳杆菌、长双歧杆菌在不同的抗性淀粉为碳源的培养中出现了不同的增殖过程和pH变化。近年来的研究证明,以莲子、薏苡仁、苦荞等原料制备的抗性淀粉可以被大肠杆菌发酵,并产生多种短链脂肪酸如甲酸、乙酸和丁酸等和二氧化碳、氢气等气体,有利于降低肠道pH值,对致病菌的生长和繁殖有抑制作用,且促进益生菌的增殖^[2,3,5,13];并且众多实验研究发现植物来源、加工方式以及添加剂量的不同会对抗性淀粉的益生元潜力产生不同趋势的影响。因此对不

同植物来源的原材料进行研究不仅对资源开发有一定的意义,且一定程度上促进了对抗性淀粉的益生元作用和机理更加全面地了解。在众多原材料的研究中,很少有人对桄榔这一棕榈科的材料进行益生元潜力的探究,所以本实验主要讨论该材料的益生元作用。

桄榔粉是广西传统特产,作为广西四大名粉之一。它不仅富含多种微量元素,还有丰富的碳水化合物和膳食纤维。桄榔淀粉(*Arenga pinnata* starch, APS)是桄榔粉的主要成分并且直链淀粉含量较高^[14],是制备RS优质原料。前期研究表明桄榔抗性淀粉(APRS)具有很好的抗酶解性和高热稳定性^[15]。因此,本论文进一步采用体外发酵研究考察不同浓度(0.1%、0.2%、0.5%、1%、1.5%)APRS对保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*, LB)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, LP)增殖作用及在模拟人体胃肠道逆环境中的耐受能力影响,以观测APRS是否有益生元潜力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桄榔粉,广西龙州农业推广中心;酪蛋白胨,上海源叶生物科技有限公司;琼脂粉,上海源叶生物科技有限公司;牛肉粉、酵母粉、牛胆酸钠、胃蛋白酶、胰蛋白酶,索莱宝科技有限公司;柠檬酸氢二铵、吐温-80、磷酸氢二钾、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、碳酸钙,广西南宁楚杰生物科技有限公司;乙酸钠、葡萄糖,广西南宁沁田生物科技有限公司。普鲁兰酶(2000 u/mL),美国Sigma公司; α -淀粉酶(10 u/mg),Solarbio Bio-Technology Co. Ltd.;葡糖淀粉酶(100 u/mg),Doulai Bio Technology Co. Ltd.。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2F 洁净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;G180TW 高压灭菌锅,宁波甬安医疗器械制造有限公司;LRH-250-Z 振荡培养箱,广东省医疗器械厂;CR21N 超速离心机,天美(中国)科学仪器有限公司;JJ300Y 电子天平,上海仁沃实业发展有限公司;722 可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;TL-18M 台式高速冷冻离心机,上海市离心机械研究所有限公司。

1.3 供试菌种

保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*, LB), 北京川秀科技有限公司; 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, LP), 中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC, 1.2469)。

1.4 试验方法

1.4.1 桃椰抗性淀粉的制备

根据实验室前期报道的方法^[15]制备 APRS:

淀粉乳→水浴糊化→普鲁兰酶酶解→灭酶→超声波处理→冷藏→洗涤, 离心→干燥→粉碎, 过筛→抗性淀粉

对桃椰淀粉进行称重, 并与醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 混合, 配制 8% 的淀粉乳液。沸水浴中糊化并持续搅拌 30 min, 然后冷却至适宜温度; 加入普鲁兰酶 (普鲁兰酶添加量 3.74×10^3 U/g) 酶解 14.3 h, 沸水浴 10 min 灭酶, 灭酶后 40 °C 水浴超声处理 36 h (功率定为 120 W), 加入乙醇 (醇:水=9:1 V/V) 于 4 °C 回生 24 h, 取出后离心, 于 70 °C 干燥 24 h, 用粉碎机粉碎后过筛, 制得最高含量的抗性淀粉, 置于干燥器中保藏。

1.4.2 培养基配置

MRS 基础培养基配方: 蛋白胨, 10 g; 牛肉粉, 10 g; 酵母粉, 5.0 g; 葡萄糖, 5.0 g; 乙酸钠, 5.0 g; 柠檬酸氢二铵, 2.0 g; 吐温-80 1.0 mL; 磷酸氢二钾, 2.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.05 g; 碳酸钙, 0.5 g; 琼脂, 13 g; 蒸馏水, 1000 mL; pH 6.8。PBS 缓冲液 (1 L): 氯化钠, 8 g; 氯化钾, 0.2 g; 磷酸氢二钠, 1.44 g; 磷酸二氢钾, 0.24 g; pH 7.4, 定容至 1 L。试验培养基及配方: 以不同浓度 (0.1%、0.2%、0.5%、1%、1.5%) 的 APRS 粉替代葡萄糖作为碳源配制而成, 其他成分与基础培养基相同。

1.4.3 菌种活化

在无菌室内, 将接种环灭菌后, 在 MRS 固体培养基上蘸取冻存管中的菌液进行划线, 37 °C 厌氧培养 48 h, 挑取菌落在 10 mL MRS 液体培养基中 37 °C 厌氧培养 24 h, 菌液 1 mL 接种到 25 mL 已灭菌的 MRS 培养基中, 37 °C 厌氧培养 48 h, 活化 2 次后得到第 3 代菌种, 用 30% 甘油以 1:1 比例放在冻存管中, 之后将冻存管放入 -80 °C 冰箱冻存菌种备用。保加利亚乳杆菌的活化方法同植物乳杆菌。保加利亚乳杆菌的活化方法与植物乳杆菌相同。

1.4.4 菌悬液制备方法

吸取等体积培养后的液体培养基以 3000 r/min 离心 15 min, 去除上清液。用去离子水洗涤沉淀菌体 2 次后移至无菌试管, 去离子水定容至 15 mL, 螺旋振荡器充分振荡试管 20 s, 制成菌体悬液。

1.4.5 不同浓度的 APRS 对 LP 和 LB 增殖作用

的影响

取 60 个 25 mL 的厌氧管, 分别配制 25 mL 葡萄糖基础培养基和 APRS 的试验培养基, 碳源浓度分别为: 0.1%、0.2%、0.5%、1.0%、1.5%, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却至室温, 用移液枪给每根厌氧管移入 1 mL 经 3 次活化后的植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌菌悬液, 37 °C 厌氧培养 48 h 后, 在 600 nm 处测定各培养基的吸光值, 每组 3 个重复。

1.4.6 APRS 对 LP 和 LB 生长过程的影响

根据不同浓度的 APRS 对乳酸菌增殖结果, 选择基础培养基和试验培养基中增殖效果最明显的碳源浓度, 分别配制最适浓度的基础培养基和试验培养基, 121 °C 灭菌 20 min。取活化后的植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌菌悬液 1 mL 分别接种到 25 mL 基础培养基和试验培养基中, 37 °C 厌氧培养 48 h。分别以不添加菌液的基础培养基和试验培养基为空白, 于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、20、24、28、32 h 取少量菌液测定 600 nm 处的吸光度值, 每组设 3 次重复。以培养时间为横坐标, OD 值为纵坐标, 分别绘制 LP 和 LB 的生长曲线。

1.4.7 APRS 对乳酸菌在模拟胃肠道逆环境中耐受性的影响

1.4.7.1 耐胆汁酸盐试验

配制基础培养基活化冻存的菌种, 48 h 后取出分装在无菌的离心管中, 8000 r/min 离心 10 min 去除上清液待用。用磷酸盐缓冲溶液调试验培养基 pH 至 7.0, 分别加入 0.3%、1%、2% 的牛胆酸钠, 121 °C 灭菌 20 min, 分别添加到待用的菌体离心管中。37 °C 厌氧培养, 分别培养 0、12 h 后取样稀释涂布在无菌平皿中, 测定活菌数。

1.4.7.2 耐酸性试验

配制基础培养基活化冻存的菌种, 48 h 后取出分装在无菌的离心管中, 8000 r/min 离心 10 min 去除上清液待用。分别用 37% 盐酸溶液调试验培养基 pH 至 1.5、2.5、3.0, 121 °C 灭菌 20 min, 分别添加到待用的菌体离心管中。37 °C 厌氧培养, 分别培养 0、3 h 后取样稀释涂布在无菌平皿中, 测定活菌数。

1.4.7.3 模拟胃肠道试验

配制基础培养基活化冻存的菌种, 48 h 后取出分装在无菌的离心管中, 8000 r/min 离心 10 min 去除上清液待用。用 37% 盐酸溶液调试验培养基 pH 至 3.0, 121 °C 灭菌 20 min 后加入 0.5% 经紫外线灭菌处理 60 min 的胃蛋白酶作为模拟胃液, 充分混匀后分别添加到待用的菌体离心管中。37 °C 厌氧培养, 分别培养 0、3 h 后取样稀释涂布在无菌平皿中, 测定活菌数。

配制基础培养基活化冻存的菌种, 48 h 后取出分装于无菌的离心管中, 8000 r/min 离心 10 min 去除上清液待用。用磷酸盐缓冲液调试验培养基 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min 后加入 1.0% 经紫外线灭菌处理 60 min 的胰蛋白酶作为模拟肠液, 充分混匀后分别添加到待用的菌体离心管中。37 °C 厌氧培养, 分别培养 0、3 h 后取样稀释涂布于无菌平皿中, 测定活菌数。

1.4.7.4 LP 和 LB 存活率

梯度稀释后, 用移液枪取 100 μ L 菌液涂布在培养皿中, 37 °C 条件下厌氧培养 48 h, 选择菌落数在 30~300 的平板进行计数。菌落总数的计算方法是: 计算两个平板上菌落总数的平均值, 再乘以相应的稀释倍数, 即每 g (mL) 样品中菌落总数。菌种存活率计算公式:

$$\text{存活率}/\% = \frac{\lg N1}{\lg N0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$N1$ ——处理后的活菌数, cfu/mL;

$N0$ ——初始活菌数, cfu/mL。

1.5 统计方法

试验数据采用 SPSS 进行显著性分析, 采用 Origin pro 9.1 对数据作图。

2 结果与讨论

2.1 APRS 对 LP 和 LB 增殖作用的影响

碳源浓度对菌体生长状况起着决定性的作用, 菌液的吸光度值可作为检测细菌增殖的指标^[16]。从图 1a 可以看出, APRS 浓度为 0.5% 时, LP 的 OD 达到最大值为 0.94; 葡萄糖 (Glucose, GLU) 浓度为 1% 时, OD 最大值为 1.29。从图 1b 可以看出, APRS 浓度为 0.2% 时, LB 的 OD 达到最大值为 0.91; 葡萄糖浓度为 1% 时, OD 最大值为 1.39。

在碳源浓度为 0.5% 时, 与 GLU 相比, APRS 为碳源的培养基中的 LP 的 OD 值达到了该培养基下的最高值在 0.2% 时, APRS 为碳源的培养基中的 LB 的 OD 值最高, 且均大于同等浓度 GLU 碳源下的 LP 和 LB 的 OD 值。表明 APRS 对 LP 和 LB 生长的影响在低浓度下的增殖效果更佳。当各碳源浓度大于 5% 时, GLU 碳源的 OD 值大于 APRS 的 OD 值, 且随着 APRS 浓度的增加, 目标菌液的 OD 值逐渐下降。表明高浓度的 APRS 对 LP 和 LB 的生长有抑制作用。刘树兴等^[17]发现当回生型抗性淀粉 (RS3) 的浓度达到 1% 时, 以 RS3 为碳源的培养基中 LB 的 OD 值最大为 1.77,

RS3 浓度为 2% 时, 嗜酸乳杆菌 OD 达到最大值 1.99, 与 GLU 为碳源的培养基对比可知, RS3 的增殖作用最为突出, 但随着 RS3 浓度的增大, 菌体数量呈先增大后减小的趋势。与本实验的对比结果及趋势相一致, 不同点在于两个实验的碳源浓度即抗性淀粉的浓度不同。推测原因可能是 LB 和 LP 利用 APRS 产生了乙酸等短链脂肪酸, 对菌体的生长产生了一定程度的抑制作用; 而不同的抗性淀粉制备方式使两个实验的原料必然存在一定的结构等差异, 有可能是造成二者在不同的抗性淀粉浓度下出现相似趋势的原因。

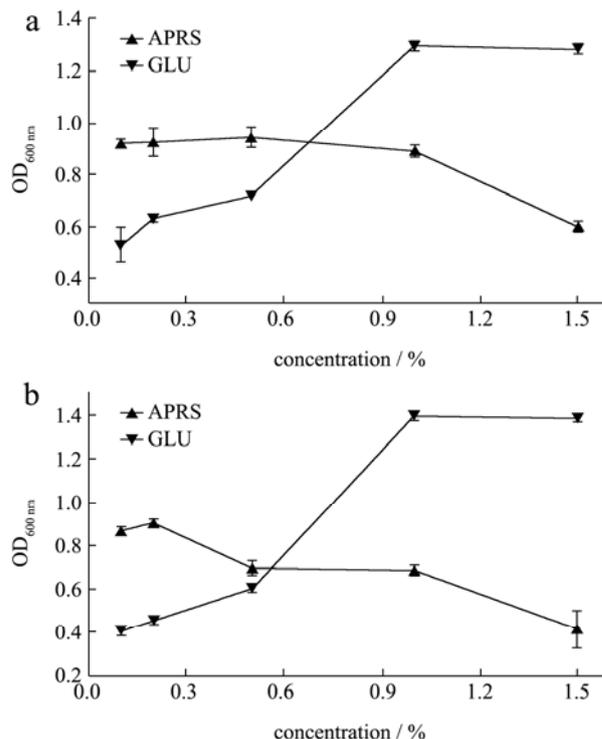


图 1 APRS 对 LP (a) 和 LB (b) 生长的影响

Fig.1 Effects of APRS with different concentrations on the proliferation of LP (a) and LB (b)

2.2 APRS 对 LP 和 LB 生长过程的影响

从图 2 可看出, LP 和 LB 在两种碳源的培养基中有 4 h 的生长迟滞期, 这段时间内菌体数量没有发生显著变化。4 h 后乳杆菌进入对数生长期, 12 h 后进入稳定生长期, 菌体数量不再发生明显变化, 该实验结果与邢海楠^[18]报道的结论相似。LP 和 LB 在 APRS 的培养基中的 OD 值整体高于 GLU 培养基, LP 和 LB 在 APRS 培养基中的生长速率较快, 菌体数量比较高, 即 APRS 促 LP 和 LB 能力强于葡萄糖培养基, 且对乳酸菌的生长具有显著的促进作用。其他研究表明莲子、绿豆、马铃薯、锥栗和板栗抗性淀粉对乳酸杆菌也具有促进作用^[8,17,19]。LP 和 LB 都属于乳酸杆菌, 在 APRS 培养基发酵 12 h 左右后乳酸杆菌数量已经趋于稳定,

而在谢涛等^[19]研究发现乳酸杆菌的最大增值在 20 h 左右出现。稳定生长期的不同可能与菌种的不同而产生差异，而最大增值的差异可能与不同原料来源的抗性淀粉的表面沟壑结构有关。

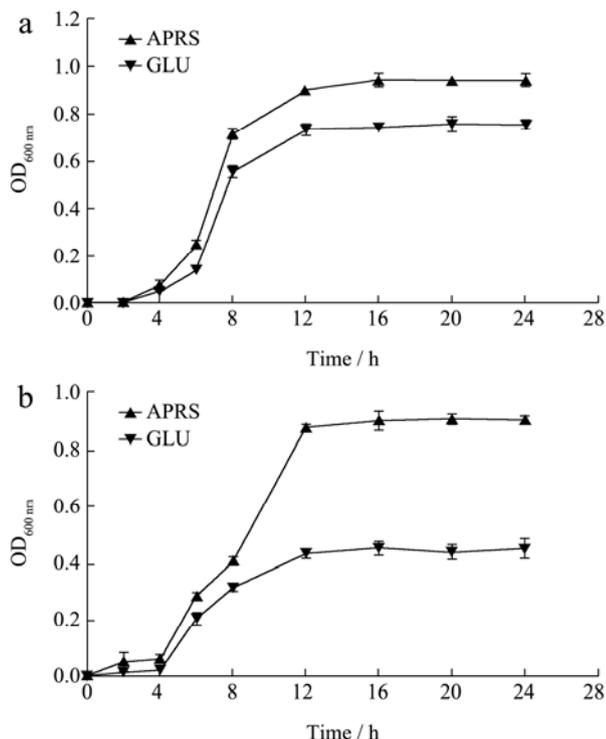


图2 APRS对LP和LB生长过程的影响植物乳杆菌(a)和保加利亚乳杆菌(b)

Fig.2 Effect of APRS on the growth of LP (a) and LB (b)

2.3 APRS对LP和LB在模拟胃肠道环境中耐性的影响

LP和LB生长曲线结果表明APRS在非逆环境培养基中对乳酸菌的增殖具有显著影响，但益生菌在肠道内的生长状况还受胃肠道环境各因素的影响，故通过体外模拟胃肠道逆环境，以葡萄糖为对照，分别研究APRS对乳酸菌抗胆汁酸盐以及模拟胃液液中耐受性的影响。

2.3.1 APRS对LP和LB抗胆汁酸盐耐受性的影响

益生菌在小肠中需要耐得住高渗透环境而存活，人体的小肠高渗透环境主要是由胆汁酸盐造成的，成人正常小肠的胆汁浓度为0.03%~0.30%^[20]。由表1可得，对比两种不同碳源的培养基中两种乳酸菌的存活率，碳源为APRS的培养基显著高于以葡萄糖为碳源的培养基。当胆汁酸盐浓度为0.3%时，菌体存活率保持在80%以上，且乳酸菌在APRS的培养基中存活率高于葡萄糖且差异显著($p < 0.05$)。随着胆汁酸盐浓度

增加，LP和LB在1%胆汁酸盐环境中菌落总数有所减少，但仍然能维持在50%以上，LB的存活率略高，抗逆性较强^[21]。可以看出APRS对LB和LP的耐胆汁酸盐、低pH的耐受性效果良好。当胆汁酸盐浓度为2%时，菌体存活率急剧下降，LB在葡萄糖培养基中已经无法检出。刘树兴等^[8,17]发现嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌在0.5%胆汁酸盐环境下生长茂盛；2%胆汁酸盐环境条件下无LB检出也与林珊的结果相符。这可能是因为极端的酸环境并且作用时间较长，导致乳酸菌的黏附作用被破坏，使得乳酸菌无法受到APRS的保护，改变了菌体外膜的通透性，对菌体生长存活产生一系列的抑制作用，导致乳酸菌存活率下降^[22,23]。

表1 LP和LB在含胆汁酸盐的不同碳源培养基中的存活率/%
Table 1 Survival rate of LP and LB in different carbon source mediums containing bile salts

碳源	0.3%	1%	2%
GLU+LB	88.75±0.32 ^b	ND	ND
APRS+LB	98.62±0.34 ^a	64.73±0.05 ^a	47.06±0.32 ^a
GLU+LP	91.13±0.18 ^b	76.95±1.17 ^b	26.19±1.17 ^b
APRS+LP	97.68±0.34 ^a	85.75±1.63 ^a	36.44±0.55 ^a

注：ND表示无法在平板计数培养基上检测出乳酸菌菌落数，同列中不同字母表示相互之间差异显著($p < 0.05$)，下同。

2.3.2 APRS对LP和LB耐酸性的影响

表2 LP和LB在低pH值不同碳源培养基中的存活率/%

Table 2 Survival rate of LP and LB in different carbon source medium at low pH

碳源	pH 3.0	pH 2.5	pH 1.5
GLU+LB	83.98±0.31 ^b	ND	ND
APRS+LB	89.77±0.26 ^a	ND	ND
GLU+LP	71.32±0.66 ^b	ND	ND
APRS+LP	79.83±0.51 ^a	ND	ND

胃酸的pH会根据人进食时间和所食食物的种类等因素变化，一般波动幅度在1.5~4.5之间。由表2可知，当培养基pH为3.0时，两种菌生长良好，在APRS培养基中的活菌数均高于葡萄糖培养基且差异性均显著($p < 0.05$)，并且保加利亚乳杆菌和植物乳杆菌在各组培养基中存活率均在70%以上，表明APRS可增强两种益生菌在低pH环境中的耐受性。当培养基pH为2.5和1.5时，培养3h后在APRS和葡萄糖为碳源的培养基中无法检验出存活的乳酸菌，且差异性均显著($p < 0.05$)，说明过低的pH对于LP和LB的生长有严重的抑制作用。这与全千秋^[24]的在pH为2.0条件下无LB存活的实验结果相符。对比玉米抗性淀粉的体外发酵结果可知，在同等pH值下，抗性淀粉培养基中的菌

种数目和生长速率均高于 GLU 培养基, pH 3.0 时的生长速度高于 pH 2.0 时的生长速度, 且嗜酸乳杆菌的生长优势最为突出^[17]。综上所述, APRS 对 LP 和 LB 低 pH 耐受性较葡萄糖好, 原因可能与 APRS 表面沟壑状结构为乳酸菌提供保护有关^[8,17]。

2.3.3 APRS 对 LP 和 LB 抗模拟胃肠液耐受性的影响

APRS 对 LP 和 LB 模拟胃肠液耐受性的影响结果见表 3 所示。由表 3 可知, 在胃蛋白酶环境下, 以 APRS 为碳源的培养基中培养 3 h 后, LP 和 LB 的存活率与葡萄糖相比差异显著且具有统计学意义 ($p < 0.05$), 表明桃榔 APRS 可以增强乳酸菌模拟胃液耐受性的能力。而经研究发现, 莲子抗性淀粉对嗜酸乳杆菌、德氏乳杆菌胃肠液耐受性无显著影响, 这可能与菌种的不同有关^[8]。在模拟胰液环境下培养, 以 APRS 为碳源的培养基中培养 3 h 后 LP 和 LB 的存活率与葡萄糖相比无明显差异 ($p > 0.05$), 这与刘树兴等人^[17]的实验结果相一致, 可能是因为胰蛋白酶降低了 LP 和 LB 对桃榔 APRS 的黏附作用, 使益生菌暴露在肠液环境中, 无法受到 APRS 特殊结构的保护^[16,25,26]。

表 3 LP 和 LB 在含模拟胃肠液的不同碳源培养基中的存活率/%

Table 3 Survival rate of LP and LB in different carbon source

mediums containing simulated gastrointestinal fluid		
碳源	胃蛋白酶	胰蛋白酶
GLU+LB	37.54±1.20 ^b	83.58±0.31 ^a
APRS+LB	67.55±1.17 ^a	84.42±0.06 ^a
GLU+LP	84.29±1.29 ^b	87.78±1.04 ^a
APRS+LP	97.82±0.54 ^a	89.57±0.31 ^a

3 结论

随着 APRS 浓度增加, LP 和 LB 液浓度先稍微增大然后显著降低; 低浓度下 APRS 可促进 LB 和 LP 的生长且增殖效果优于葡萄糖, 但高浓度 (1%~1.5%) 不利于 LB 和 LP 的生长; APRS 可显著增强 LB 和 LP 耐酸性环境、高浓度胆汁酸盐以及胃液逆环境 ($p < 0.05$)。APRS 提高乳酸菌模拟肠液耐受性的能力与葡萄糖对比无差异, 表明桃榔 APRS 可能具有较好的耐消化特性。因此, APRS 具有潜在的益生元作用可为其进一步开发提供理论参考。

参考文献

[1] Englyst H N, Cummings J H. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1985, 42(5): 778-787

[2] Fuentes-Zaragoza E, Sanchez-Zapata E, Sendra E, et al. Resistant starch as prebiotic: a review [J]. Starch-Starch, 2011, 63(7SI): 406-415

[3] Ma Z, Boye J I. Research advances on structural characterization of resistant starch and its structure-physiological function relationship: a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(7): 1059-1083

[4] Demartino P, Cockburn D W. Resistant starch: impact on the gut microbiome and health [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 61: 66-71

[5] 闫国森,郑环宇,孙美馨,等.抗性淀粉生理功能及作用机制的研究进展[J].食品科学,2020,41(21):330-337

YAN Guosen, ZHENG Huanyu, SUN Meixin, et al. Recent progress in physiological functions and mechanism of action of resistant starch [J]. Food Science, 2020, 41(21): 330-337

[6] Fuentes-Zaragoza E, Riquelme-Navarrete M J, Sanchez-Zapata E, et al. Resistant starch as functional ingredient: a review [J]. Food Research International, 2010, 43(4): 931-942

[7] 刘霞,黄雅萍,卢旭,等.抗性淀粉的结构性质与功能关系研究进展[J].食品与发酵工业,2020,46(18):279-286

LIU Xia, HUANG Yaping, LU Xu, et al. Advances in structural properties and its correlation with physiological functions of resistant starch [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(18): 279-286

[8] 林珊.莲子抗性淀粉分级分离及其益生元作用的研究[D].福州:福建农林大学,2016

LIN Shan. Grading alcohol precipitation of resistant starch derived from lotus seed, and its probiotics effects [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016

[9] 包辰,张怡,黄灿灿,等.薏苡仁抗性淀粉对两歧双歧杆菌的增殖作用的研究[J].食品科技,2016,41(10):15-20

BAO Chen, ZHANG Yi, HUANG Cancan, et al. Effect of semen coicis resistant starch on the proliferation of *Bifidobacterium bifidum* [J]. Food Science and Technology, 2016, 41(10): 15-20

[10] Bao C, Zeng H L, Zhang Y, et al. Structural characteristics of semen coicis resistant starch and its effect on the proliferation of *Bifidobacterium bifidum* [J]. Chinese Journal of Structural Chemistry, 2017, 36(3): 511-521

[11] 崔琳琳,姜玥,周一鸣,等.苦荞抗性淀粉体外益生元的作用[J].食品工业,2019,40(8):205-210

CUI Linlin, JIANG Yue, ZHOU Yiming, et al. The probiotics effects of Tartary buckwheat resistant starch *in vitro* [J]. Food

- Industry, 2019, 40(8): 205-210
- [12] 杨玥熹,陈晴,曹一丹,等.不同种 B 型抗性淀粉对肠道菌群发酵产短链脂肪酸的影响[A].中国食品科学技术学会.第十四届益生菌与健康国际研讨会摘要集[C].中国食品科学技术学会:中国食品科学技术学会, 2019: 2
- YANG Yuexi, CHEN Qing, CAO Yidan, et al. Effects of different B-type resistant starches on the production of short-chain fatty acids by intestinal microflora fermentation [A]. Chinese Association of Food Science and Technology. Summary of the 14th International Symposium on Probiotics and Health [C]. Chinese Society of Food Science and Technology: Chinese Association of Food Science and Technology, 2019: 2
- [13] Bindels L B, Segura M R R, Gomes-Neto J C, et al. Resistant starch can improve insulin sensitivity independently of the gut microbiota [J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 10.1186
- [14] Mei J Y, Zhang L, Lin Y, et al. Pasting, rheological, and thermal properties and structural characteristics of large and small *Arenga pinnata* starch granules [J]. *Starch - Stärke*, 2020, 72(11-12): 1900293
- [15] Zhang L, Mei J, Ren M, et al. Optimization of enzyme-assisted preparation and characterization of *Arenga pinnata* resistant starch [J]. *Food Structure*, 2020, 25: 100149
- [16] 朱辉,张德纯,王春耀,等.椰汁体外促双歧杆菌生长作用的研究[J].第三军医大学学报,2012,34(18):1849-1852
- ZHU Hui, ZHANG Dechun, WANG Chunyao, et al. Coconut juice improves *Bifidobacterium* proliferation *in vitro* [J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2012, 34(18): 1849-1852
- [17] 刘树兴,候敏,徐晨,等.抗性淀粉对益生菌增殖作用的研究[J].食品科技,2019,44(1):14-20
- LIU Shuxing, HOU Min, XU Chen, et al. Effect of resistant starch on the proliferation of probiotics [J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(1): 14-20
- [18] 邢海楠.不同低聚糖对嗜酸乳杆菌生长状况的效果观察[D].延吉:延边大学,2014
- XING Hainan. Different oligosaccharide on *Lactobacillus acidophilus* growth effect observation [D]. Yanji: Yanbian University, 2014
- [19] 谢涛,曾红华,汪婕,等.4 种抗性淀粉的益生作用及结构变化[J].中国粮油学报,2014,29(10):23-27
- XIE Tao, ZENG Honghua, WANG Jie, et al. Probiotic function and structural changes of 4 resistant starches [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2014, 29(10): 23-27
- [20] Lo P R, Yu R C, Chou C C, et al. Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic *Bifidobacteria* under acidic and bile conditions against benzo[a]pyrene by a modified Ames test [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 93(2): 249-257
- [21] 路四海.嗜酸乳杆菌降低胆固醇作用及其机理研究[D].新乡:河南科技学院,2012
- LU Sihai. Study on cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and its mechanism [D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2012
- [22] Eng-Seng C, Peh-Phong L, Pogaku R, et al. A standard quantitative method to measure acid tolerance of probiotic cells [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(1)
- [23] 刘芸,曹宜,刘波,等.植物蛋白发酵乳酸菌对模拟胃肠道环境的耐受性研究[J].福建农业学报,2013,28(7):709-713
- LIU Yun, CAO Yi, LIU Bo, et al. Tolerance of lactic acid bacteria strains for phytoprotein yoghurt fermentation to simulated gastrointestinal environments [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28(7): 709-713
- [24] 全千秋.保加利亚乳杆菌生物学特性及原生质体制备的研究[D].郑州:河南农业大学,2006
- TONG Qianqiu. Study on biological characteristics and protoplasts formation of *Lactobacillus bulgaricus* [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2006
- [25] 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 Xiaoting. Properties and prebiotics effects *in vitro* of lotus seed resistant starch prepared by different methods [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015
- [26] 汪颖.莲子抗性淀粉制备、性质及其对双歧杆菌增殖效应的研究[D].福州:福建农林大学,2013
- WANG Ying. Preparation and properties of lotus seeds resistant starch and its proliferation effects on *Bifidobacterium adolescentis* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013