

抗性淀粉的体外产酸发酵研究

林 杨,赵新淮

(东北农业大学食品学院,黑龙江 哈尔滨, 150030)

摘 要 分别采用健康成人和健康婴儿的新鲜粪便提取液,在模拟大肠环境下(厌氧,37℃),作用于不同含量的抗性淀粉,发酵不同时间,采用气相色谱法测定不同发酵时间的发酵产物中短链脂肪酸的含量。分析结果表明,对于2种不同的粪便提取液,随着发酵时间的延长和抗性淀粉含量的增加,发酵产物中短链脂肪酸的总含量均逐渐增加,特别是丁酸含量增加显著;但在婴儿粪便提取液的发酵产物中,短链脂肪酸的含量,尤其是丁酸的含量,显著高于成人粪便提取液的发酵产物。

关键词 抗性淀粉,体外发酵,短链脂肪酸

抗性淀粉(resistant starch,RS)是指不被健康人体小肠吸收的淀粉及其分解物的总体,它具有多种功能,包括:抑制餐后血糖升高^[1],减少血清中胆固醇和甘油三酸酯^[2],促进肠道有益菌丛的生长、繁殖,是一种双歧杆菌增殖因子^[3]。最重要的是,抗性淀粉在大肠中发酵或部分发酵,产生挥发性短链脂肪酸(SCFA),特别是丁酸,降低大肠中的pH,抑制致病菌的生长、繁殖,减少结肠癌发病率^[4]。

国外已经对抗性淀粉的发酵特性进行过很多研究,包括体内验证和体外模拟^[5,6]。但国内很少有人研究。体内验证主要是以动物为对象,喂以抗性淀粉一段时间,然后宰杀,测定肠道粪便中的短链脂肪酸含量。若以人为试验对象,则测定其新鲜粪便中的短链脂肪酸含量。体外模拟主要是利用提取出的大肠内微生物菌群,在模拟肠道内环境下,作用于抗性淀粉,最终测定发酵产物中的短链脂肪酸含量。本研究以高直链玉米淀粉为原料,采用压热-冷却循环处理法制备出抗性淀粉,然后利用健康成人和健康婴儿的新鲜粪便提取液模拟大肠的微生物环境,对抗性淀粉进行发酵;通过分析发酵产物中短链脂肪酸含量,确认抗性淀粉在不同模拟环境下的发酵行为变化,为其在保健食品中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

Hylon VII 高直链玉米淀粉,National Starch and Chemical Company; α -淀粉酶,北京奥博星生物技术

有限责任公司;糖化酶,北京奥博星生物技术有限责任公司;正己烷,天津市东丽区天大化学试剂厂;甲醇,色谱级,美国Dima公司;甲酸标准品、乙酸标准品、丙酸标准品、丁酸标准品,天津试剂三厂。所用分析试剂均为分析纯试剂。

1.2 仪 器

手提式压力灭菌器,镇海金鑫医疗器械有限公司;数显电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;GL-21M型低速离心机,上海市离心机械研究所;YQ-3型电动匀浆机,江苏江阴科研器械厂;万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;厌氧培养箱,美国Beckman Coulter公司;气相色谱仪,Agilent 6890N,美国安捷伦。

1.3 方 法

1.3.1 抗性淀粉的制备

称取10 g高直链玉米淀粉样品,加入40 mL蒸馏水后,置于高压灭菌锅中,121℃处理20 min。取出后冷却至室温,于4℃冰箱保存24 h。如此重复处理1次后,所得样品烘干,粉碎,过100目筛,得抗性淀粉产品。测定样品中抗性淀粉含量。平行样数为4个,重复试验3次,以平均值作为测定结果。

1.3.2 抗性淀粉含量的测定

根据改进的Goñi等方法^[7],分析处理后淀粉样品中的抗性淀粉含量。向待测样品中加入1 mL 1% α -淀粉酶(2 700 U/mL),持续搅拌下,60℃水解24 h。水解后,样品沸水浴5 min。加入95%乙醇(体积为沉淀体积的4倍),12 h后转至离心管中,4 000 r/min离心20 min,弃去上清液,再加入10 mL 95%乙醇反复洗涤沉淀2次。沉淀105℃烘干,粉碎,过100目筛。

第一作者:硕士研究生(赵新淮教授为通讯作者)。

收稿日期:2008-04-01,改回日期:2008-09-01

称取 1 g 粉碎样品于离心管中,加入 6 mL 蒸馏水和 6 mL 4 mol/L KOH,室温持续搅拌 30 min。加入 11.5 mL 2 mol/L HCl 和 6 mL 0.4 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 4.75),调节至 pH 4.5。加入 1 mL 1%糖化酶(1 500 U/mL),60℃水解 45 min。然后样品沸水浴 5 min,4 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。再加入 10 mL 蒸馏水反复洗涤沉淀 2 次。上清液合并,定容至 100 mL,直接滴定法测定上清液中还原糖的含量(GB/T5009.7-2003),数据乘以 0.9 即为抗性淀粉的含量。

1.3.3 抗性淀粉的体外模拟发酵

1.3.3.1 粪便的采集与处理

分别采集 5 个健康成人和 5 个健康婴儿的新鲜粪便,所选对象在近 1 个月内未服用抗生素、未得腹泻和肠炎,采集和处理在 1 h 内完成。分别取 40 g 粪便样品溶于磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.5),匀浆 2 min,制成 160 g/L 的悬浮液 250 mL。悬浮液用棉或尼龙筛粗滤,以去除颗粒物质。

1.3.3.2 体外模拟发酵

利用健康成人以及健康婴儿的粪便提取物,模拟相应的肠道微生物环境,对抗性淀粉进行体内模拟发酵。将 5 mL 粪便悬浮液转移至分别含有 20 g/L、40 g/L 和 80 g/L 抗性淀粉产品的 5 mL 磷酸盐缓冲液的试管中,空白对照组中不含有抗性淀粉产品。混匀,加塞,不断振动(50 r/min),37℃分别厌氧培养 6、12 和 24 h。取出,试管用力混合,待进一步分析。

1.3.3.3 短链脂肪酸的气相色谱分析

根据改进的 Drzikova 等^[8]方法,取发酵液 3 mL,离心(4℃,10 000 r/min,10 min)。吸取 100 μ L 上清液,加入 280 μ L 0.36 mol/L HClO₄ 和 270 μ L 1 mol/L NaOH,剧烈振荡。加入 50 μ L 5 mol/L 磷酸,剧烈振荡。加入 300 μ L 1%浓 H₂SO₄ 的甲醇溶液,70℃回流 30 min。然后加入 300 μ L 冷的正己烷提取。吸取 2 μ L 有机层,上柱分析。

气相色谱的操作条件为:色谱柱型号为 HP-5(30 m×0.32 mm×0.25 μ m);柱温:150℃;进口温度:250℃;FID 检测温度:250℃;载气:氮气;流量:0.6 mL/min;分流比:50:1;升温程序:初始温度 100℃,以 2℃/min 升温至 200℃,保持 20 min。

同样的步骤处理短链脂肪酸标准化合物,标准化合物浓度:甲酸和乙酸,20 mmol/L;丙酸和丁酸,10 mmol/L。

2 结果与分析

2.1 发酵底物中抗性淀粉的含量分析

经分析,高直链玉米淀粉原料经过方法 1.3.1 的处理后,其抗性淀粉含量为 29.7%。

2.2 发酵液中短链脂肪酸的分析

在所选择的毛细管气相色谱条件下,对抗性淀粉发酵液中的短链脂肪酸进行分析,相应的标准化合物色谱图和分析样品的色谱图如图 1。

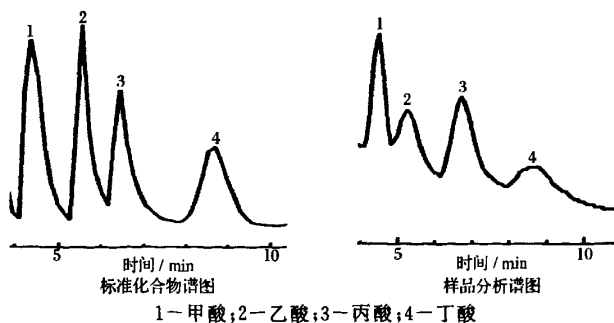


图 1 气相色谱分析短链脂肪酸时的标准谱图和样品谱图

2.3 抗性淀粉在模拟成人肠道中的发酵情况

抗性淀粉在模拟成人肠道中的发酵作用情况见表 1。随着发酵时间的延长,发酵产物中短链脂肪酸的总量逐渐增加;同时,随着发酵液中抗性淀粉含量的增加,发酵产物中短链脂肪酸的总量也逐渐增加。整体上看,发酵 12 h 后,短链脂肪酸生成量的增加幅度变小,大部分的短链脂肪酸是在发酵时间为 12 h

时产生的。

发酵产物中的各种短链脂肪酸均随着发酵时间的增加、抗性淀粉含量的增加而增加,但增加幅度各不相同。发酵产物中甲酸、乙酸和丙酸含量的增加幅度较小,均不及丁酸。Mette 等人^[9]研究了抗性淀粉对仔猪肠道短链脂肪酸浓度的影响,结果表明,喂以含有抗性淀粉饲料的仔猪肠道中,短链脂肪酸总量明

显提高,特别是其中丁酸的含量;并且随着饲料中抗性淀粉含量的增加,仔猪肠道中短链脂肪酸总量和丁酸含量也随之增加。

表 1 健康成人粪便对抗性淀粉的发酵作用

抗性淀粉浓度	有机酸 /mmol·L ⁻¹	发酵时间/h		
		6	12	24
3 g/L	甲酸	13.67±0.83	17.15±2.23	17.26±0.54
	乙酸	4.613±0.145	6.451±1.062	6.305±0.313
	丙酸	2.299±0.631	3.016±0.945	4.307±0.233
	丁酸	1.641±0.159	3.906±0.177	4.002±0.536
	总酸	22.22±1.765	30.52±4.41	31.87±1.62
6 g/L	甲酸	13.78±0.26	17.01±0.21	16.51±0.15
	乙酸	4.843±0.933	5.273±0.316	4.766±0.262
	丙酸	3.164±0.496	4.978±0.473	5.113±0.681
	丁酸	2.120±0.661	5.693±0.351	5.857±1.53
	总酸	23.91±2.35	32.95±1.35	32.25±2.62
12 g/L	甲酸	12.65±1.90	14.62±0.70	14.33±0.41
	乙酸	4.618±0.283	5.639±0.237	5.083±0.312
	丙酸	4.043±0.735	6.925±1.256	6.647±0.257
	丁酸	3.211±0.326	7.951±0.980	9.031±0.109
	总酸	24.52±3.24	35.13±3.17	35.09±1.09

由于丁酸盐可诱发肠道上皮细胞生长,细胞分化,增强免疫效应;还可诱发结肠癌细胞裂化,从而阻止癌细胞扩散,通过后修饰作用诱发基因表达和正常细胞衰亡,因此丁酸与防止直肠癌紧密相关,将其作为本研究的重点考察指标^[10]。随着发酵时间的延长,发酵产物中丁酸的含量明显增加,对于不同含量的抗性淀粉,丁酸增加的幅度也不相同,丁酸增加幅度最大为2倍。发酵6 h时,随着抗性淀粉浓度的增加,发酵液中丁酸含量从1 mmol/L增加到3 mmol/L;发酵12 h时,发酵液中丁酸含量从3 mmol/L增加到7 mmol/L;而发酵24 h时,发酵液中丁酸含量从4 mmol/L增加到9 mmol/L。这也显示了大部分丁酸是在发酵时间为12 h时产生的。

2.4 抗性淀粉在模拟婴儿肠道中的发酵

抗性淀粉在模拟婴儿肠道中的发酵作用见表2。由表2可知,随着发酵时间的延长,发酵产物中短链脂肪酸的总量逐渐增加,趋势与表1相似;随着抗性淀粉含量的增加,发酵产物中短链脂肪酸的总量也逐渐增加。并且,发酵24 h所得短链脂肪酸的总量,较发酵12 h略有增加。

发酵产物中的各种短链脂肪酸均随着发酵时间的增加、抗性淀粉含量的增加而增加,但增加幅度各不相同。甲酸、乙酸和丙酸的含量均有小幅度的增加,并且甲酸和乙酸含量的增加幅度高于丙酸。最为重要的是,此时抗性淀粉发酵产生的丁酸,较健康成

人粪便发酵所产丁酸有大幅度提高。发酵6 h时,随着抗性淀粉浓度的增加,发酵液中丁酸含量从6 mmol/L增加到10 mmol/L;发酵12 h时,发酵液中丁酸含量从9 mmol/L增加到12 mmol/L;而发酵24 h时,发酵液中丁酸含量从12 mmol/L增加到15 mmol/L。这也显示了大部分丁酸是在发酵时间为12 h时产生的。

表 2 健康婴儿粪便对抗性淀粉的发酵作用

抗性淀粉浓度	有机酸 /mmol·L ⁻¹	发酵时间/h		
		6	12	24
3 g/L	甲酸	17.23±0.49	21.64±0.29	23.12±0.43
	乙酸	13.16±0.75	14.89±0.72	15.65±0.36
	丙酸	13.87±0.26	15.46±0.67	17.47±0.93
	丁酸	6.317±0.371	9.802±0.496	11.41±0.62
	总酸	50.58±1.87	61.79±2.18	67.65±2.34
6 g/L	甲酸	18.73±0.52	23.15±1.15	23.43±0.18
	乙酸	12.86±0.73	15.23±0.46	14.68±0.27
	丙酸	17.32±0.40	18.91±0.32	18.47±0.38
	丁酸	8.587±0.625	12.74±0.57	14.83±0.81
	总酸	57.50±2.27	70.03±2.50	71.41±1.64
12 g/L	甲酸	22.84±0.85	26.01±0.56	26.24±0.21
	乙酸	15.21±0.69	17.22±0.39	17.86±2.17
	丙酸	17.08±0.42	17.51±1.03	17.75±0.59
	丁酸	10.45±0.77	12.39±1.44	15.87±0.68
	总酸	65.58±2.73	73.13±3.42	77.69±3.65

比较表1、表2,从整体上看,健康成人粪便发酵12 h后丁酸的最低浓度水平为3 mmol/L,而健康婴儿粪便发酵12 h后丁酸的最低浓度水平为9 mmol/L,为前者的3倍;健康成人粪便发酵12 h后丁酸的最高浓度水平为7 mmol/L,而健康婴儿粪便发酵12 h后丁酸的最高浓度水平为12 mmol/L,比前者提高了近1倍。这表明健康婴儿粪便中的微生物菌群,更能有效的利用抗性淀粉发酵产生丁酸。

3 结 论

通过抗性淀粉的体外模拟发酵研究,可在一定程度上评价其在健康人体内的发酵行为。结果表明,随发酵时间的延长和抗性淀粉含量的增加,发酵产物中短链脂肪酸总量逐渐增加,特别是丁酸含量增加显著;并且,以健康婴儿新鲜粪便提取物发酵抗性淀粉时,短链脂肪酸总量以及丁酸的量,均明显高于相同条件下健康成人新鲜粪便提取物的发酵产物。这表明抗性淀粉发酵的产酸模式,受到发酵提取物来源的影响,即受到所存在的微生物菌群影响。这种影响作用有待于今后更完善的发酵模式研究而确认。

抗性淀粉体外模拟发酵产生短链脂肪酸的情况

不同,也意味着它与益生菌的协同作用优势,以及在保健食品开发方面存在的潜力。

参 考 文 献

- 1 Raben A, Tagliabue A, Christensen N J, et al. Resistant starch: the effect on postprandial glycemia, hormonal response and satiety [J]. American Journal of Clinic Nutrition, 1994, 60(4): 544~551
- 2 De Deckere E A M, Kloots W J, Amelsvoort J M M. Resistant starch decreases serums total cholesterol and triacylglycerol concentration in rats [J]. American Institute of Nutrition, 1993, 123(12): 2 142~2 151
- 3 杨月欣,王 竹,洪 洁. 抗性淀粉结肠内酵解对大鼠肠道健康的影响 [J]. 营养学报, 2004, 12(11): 2618~2622
- 4 Haralampu S G. Resistant starcha review of the physical properties and biological impact of RS3 [J]. Carbohydrate Polymers, 2000, 41(3): 285~292
- 5 Mahadevamma S, Shamala TR, Tharanathan R N. Resistant starch derived from processed legumes; *in vitro* and *in vivo* fermentation characteristics [J]. International

Journal of Food Science and Nutrition, 2004, 55(5): 399~405

- 6 Vincent Lebet, Eva Arrigoni, Renato Amadò. Measurement of fermentation products and substrate disappearance during incubation of dietary fibre sources with human faecal flora [J]. Academic Press, 1998, 31(5): 473~479
- 7 Goñi I, García-Diz L, Mañás E. Analysis of resistant starch: a method for foods and food product [J]. Food Chemistry, 1996, 56(4): 445~449
- 8 Drzikova B, Dongowski G, Gebhardt E, et al. The composition of dietary fibre-rich extrudates from oat affects bile acids binding and fermentation *in vitro* [J]. Food Chemistry, 2005, 90(1-2): 181~192
- 9 Mette Skou Hedemann, Knud Eric Bach Knudsen. Resistant starch for weaning pigs-effect on concentration of short chain fatty acids in digesta and intestinal morphology [J]. Livestock Science, 2007, 108(13): 175~177
- 10 Brouns F, Kettlitz B, Arrigoni E. Resistant starch and "the butyrate revolution" [J]. Trends Food Science & Technology, 2002, 13(8): 251~261

Study of Acid Production of Resistant Starch During Fermentation *in vitro*

Lin Yang, Zhao Xinhui

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT Fresh fecal extraction from healthy human and infant were used. At the stimulated condition of the large intestines (anaerobic and 37℃), it was mixed with several content of resistant starch, and then fermented for certain period of time. The concentration of short chain fatty acids in the fermented production was determined by GC. The results showed that as the fermented time and content of resistant starch increase, the concentration of short chain fatty acids in the fermented production increased gradually, especially for the concentration of butyric acid. However, the concentration of short chain fatty acids in the fermented production with healthy infant fecal extraction, especially for the concentration of butyric acid, was much higher than that with healthy human fecal extraction.

Key words resistant starch, fermentation *in vitro*, short chain fatty acids

行业动态

江苏省塑料饮料机械出口基地落户张家港

2008年11月8日,江苏省塑料(饮料)机械出口基地在张家港市建立。张家港市塑料(饮料)机械产业起源于1970年代,是张家港市起步较早、发展较快的行业之一,目前全市已有塑料(饮料)生产企业300多家,年总产量1万多台套,约占全国市场的1/10,年销售额有70多亿元,是全国最主要的生产基地。

据不完全统计,2007年,全市塑料(饮料)机械出口总额达1.5亿美元(含外贸供货),预计2008年张家港市塑料(饮料)机械可完成销售总额80亿元。

塑料(饮料)机械出口基地的建立,对促进张家港市乃至全省的塑料(饮料)机械产业转型升级、进一步开拓国际市场、降低贸易风险、巩固和加快企业的发展、拉动经济增长等具有重要的意义。