

酶法纯化何首乌抗性淀粉及其对大肠杆菌增殖效力的影响

李佳璇¹, 谢丹¹, 王海燕¹, 阮婧华^{2*}, 唐东昕², 范东生², 辛加敏², 查鑫²

(1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 为优化何首乌抗性淀粉(resistant starch, RS)的纯化工艺, 并考察其对大肠杆菌增殖效力的影响。基于单因素试验, 采用 Box-Behnken 响应面法, 以淀粉乳浓度、酶添加量、酶解时间为考察因素, RS 含量为指标, 优化 RS 纯化工艺; 测定何首乌 RS 与纯化后 RS 的碘吸收曲线、平均聚合度; 以 RS 为培养基碳源, 采用体外发酵考察何首乌 RS 及纯化后 RS 对大肠杆菌增殖的影响。结果表明: 最佳纯化条件为淀粉乳浓度 16%、酶添加量 22 U/g、酶解时间 42 min 条件下纯化 RS, RS 含量为(43.23±0.26)%。纯化后 RS 的碘结合能力明显提高, 平均聚合度为 47.03; 纯化后 RS 表面呈现多孔结构。与葡萄糖培养基相比, 纯化 RS 可显著降低大肠杆菌的增殖。

关键词: 何首乌; 抗性淀粉; 纯化; 扫描电镜; 大肠杆菌

Enzymatic Purification of *Polygonum Multiflorum* Thunb. Resistant Starch and Its Effect on *Escherichia coli* Proliferation

LI Jia-xuan¹, XIE Dan¹, WANG Hai-yan¹, RUAN Jing-hua^{2*}, TANG Dong-xin², FAN Dong-sheng²,
XIN Jia-min², ZHA Xin²

(1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China;
2. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou, China)

Abstract: The study evaluated the resistant starch (RS) content from *Polygonum multiflorum* Thunb. and investigated the content of starch milk, enzyme dosage, and time of enzymatic hydrolysis to optimize its purification process and determine its effect on the proliferation of *Escherichia coli*. Based on single factor experiments, the Box-Behnken response surface method was used to optimize the RS purification process. The purified RS was determined with the iodine binding curve and average polymerization degree (DP). The effects of RS purification on the proliferation of *E. coli* were compared by in vitro fermentation. The optimal purification conditions were as follows: starch milk concentration of 16%, enzyme dosage of 22 U/g, and enzymatic hydrolysis time of 42 min. The content of purified RS was (43.23±0.26)%. The iodine binding ability and DP of the purified RS was significantly improved. Compared with glucose medium, the purified RS medium could significantly reduce the proliferation of *E. coli*.

Key words: *Polygonum multiflorum* Thunb.; resistant starch; purification; scanning electron microscopy; *Escherichia coli*

引文格式:

李佳璇, 谢丹, 王海燕, 等. 酶法纯化何首乌抗性淀粉及其对大肠杆菌增殖效力的影响[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(8): 9-16.

LI Jiaxuan, XIE Dan, WANG Haiyan, et al. Enzymatic Purification of *Polygonum Multiflorum* Thunb. Resistant Starch and Its Effect on *Escherichia coli* Proliferation[J]. Food Research and Development, 2023, 44(8): 9-16.

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(82060643); 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2021]5621)

作者简介: 李佳璇(1996—), 女(汉), 在读研究生, 研究方向: 生物大分子应用。

* 通信作者: 阮婧华(1976—), 女(回), 副研究员, 博士, 研究方向: 生物大分子及结构功能应用。

何首乌为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根,其性微温,味苦、甘、涩,归肝、心、肾经^[1],为贵州道地药材之一。目前对何首乌的研究主要集中在其肝损伤^[2]与小分子成分^[3]的研究,对其所含的大分子成分研究较少。抗性淀粉(resistant starch, RS),是指在健康人体小肠中不能被消化但却可在大肠中被微生物分解的淀粉^[4],因其具有更优越于膳食纤维的生理功能和特性,近年来受到广泛关注。经前期研究发现,由何首乌块根制备的何首乌抗性淀粉分子量大,聚合度高,能够自发形成内部体积较大的螺旋腔^[5],对胃肠道酶和pH值的耐受性较高^[6]。目前,RS多以高直链玉米淀粉制备,制备工艺复杂且含量较低^[7],在功能性淀粉加工领域,RS纯化工艺的改进以及RS制备的新来源的优选受到持续关注。

研究发现,RS在肠道中不仅为益生菌提供养分,还会抑制致病菌的生长^[8]。大肠杆菌又名大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),为主要的革兰氏阴性致病菌,属于常见的肠道微生物,可引起胃肠道感染、炎症反应等多种疾病,研究表明荞麦抗性淀粉^[9]、鹰嘴豆抗性淀粉^[10]均具有抑制大肠杆菌的生长,调节肠道微生物群的作用。目前,对RS纯化及其对微生物生长影响的相关研究报道较少。

本研究通过Box-Behnken响应面法优化何首乌RS纯化条件,并选取大肠杆菌为体外微生物试验代表菌株,考察纯化前后RS对致病菌增殖效力的影响,为抗性淀粉应用于调节肠道菌群提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

何首乌(批号:1991001):北京本草方源药业科技有限公司;何首乌淀粉(经检测淀粉含量>90%):贵州中医药大学第一附属医院制剂研发中心实验室自制;普鲁兰酶($\geq 1\ 000$ npun/g)、糖化酶(10万U/mL)、葡萄糖:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;耐高温 α -淀粉酶(40 000 U/g):北京索莱宝科技有限公司;LB培养基:青岛海博生物技术有限公司;大肠杆菌:北京百欧博伟生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

PHS-3C pH计:上海仪电科学仪器股份有限公司;AL204电子天平:梅特勒-托利多公司;FD冷冻干燥机:上海拓纷机械设备有限公司;LMQ.C-50E高压灭菌器:山东新华医疗器械股份有限公司;BSC-1004 II A2超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司;MJ-250恒温培养箱:上海一恒科技有限公司;UV-6000PC紫外分光光度计:上海元析仪器有限公司;Quanta 250 FEG扫描电镜:美国FEI公司。

1.3 方法

1.3.1 何首乌RS的制备

采用热压-酶法制备何首乌RS^[5]。配制浓度为20%何首乌淀粉液,调节pH值为4.3,预糊化后121℃高压20 min,降至室温后加入普鲁兰酶(30 npun/g)60℃酶解12 h,酶解结束后100℃水浴30 min使酶失活,4℃老化24 h,冷冻干燥后用于后续试验。

1.3.2 RS的含量测定

采用耐高温型 α -淀粉酶法^[11]测定。取1 g样品用淀粉酶与糖化酶酶解后,离心弃上清,沉淀以2 mol/L KOH溶解后,HCl调pH值至中性,糖化酶酶解其中的还原糖,离心收集上清,用3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitro-salicylic acid, DNS)法测定其中还原糖的含量,抗性淀粉含量即还原糖含量乘以0.9。

1.3.3 纯化RS单因素考察

1.3.3.1 不同淀粉乳浓度对RS含量的影响

精密称取1.3.1制备的何首乌RS,配制淀粉乳浓度分别为5%、10%、15%、20%、25%的淀粉液,加入耐高温 α -淀粉酶20 U/g,100℃酶解40 min,离心弃上清液,洗涤沉淀2次,冷冻干燥并对其进行含量测定。

1.3.3.2 不同酶添加量对RS含量的影响

精密称取1.3.1制备的RS,配制淀粉乳浓度为15%的淀粉液,加入耐高温 α -淀粉酶(10、15、20、25、30 U/g),100℃酶解40 min,离心弃上清液,洗涤沉淀2次,冷冻干燥并对其进行含量测定。

1.3.3.3 不同酶解时间对RS含量的影响

精密称取1.3.1制备的RS,配制淀粉乳浓度为15%的淀粉液,加入耐高温 α -淀粉酶20 U/g,100℃分别酶解20、30、40、50、60 min,离心弃上清液,洗涤沉淀2次,冷冻干燥并对其进行含量测定。

1.3.4 RS纯化条件的响应面试验设计

为选择最佳试验条件,以A淀粉乳浓度、B酶添加量、C酶解时间为独立变量,RS含量为响应变量,采用Design Expert 8.0.6的Box-Behnken响应面法^[12]优化纯化过程。每组平行3次,响应面试验因素和水平见表1。

表1 响应面优化试验因素水平

Table 1 Factors and levels of response surface optimization

| 水平 | 因素 | | |
|----|-----------|--------------|------------|
| | A 淀粉乳浓度/% | B 酶添加量/(U/g) | C 酶解时间/min |
| -1 | 10 | 15 | 30 |
| 0 | 15 | 20 | 40 |
| 1 | 20 | 25 | 50 |

1.3.5 碘结合曲线及平均聚合度测定

参照文献[13]的方法测定,称取样品20 mg,用无水乙醇润湿,吸取1 mL 2 mol/L KOH溶解样品。调节溶液pH值至中性,用去离子水定容50 mL。取10 mL

定容液与 2 mL 碘试液混合,用去离子水定容 100 mL。用紫外分光光度计于波长 500 nm~800 nm 全波长扫描样液,测定最大吸收峰(λ_{\max})。根据 Banks 公式(1)计算平均聚合度(degree polymerization, DP)。

$$1/\lambda_{\max}=0.001\ 558+0.010\ 25/DP \quad (1)$$

1.3.6 颗粒形貌观察

取少量样品用导电双面胶固定在扫描电镜的样品台上,在真空条件下进行喷金处理,经过短暂干燥后,用扫描电子显微镜观察拍摄具有代表性的样品颗粒形貌。

1.3.7 RS 对大肠杆菌增殖的影响

1.3.7.1 培养基配制

试验培养基选用 LB 培养基^[14],以不同浓度 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0% 的 RS 为碳源配制,以葡萄糖作为阳性碳源,不加碳源的培养基作为对照。

1.3.7.2 不同 RS 浓度对大肠杆菌增殖效力的考察

取 50 mL 的锥形瓶,每瓶配制 25 mL 纯化后 RS 培养基,碳源浓度分别为 0%、0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、8.0%、121 °C 灭菌 15 min,冷却至室温,每瓶加入 0.2 mL 活化后的大肠杆菌悬液 (3.5×10^4 cfu/mL),37 °C 培养 24 h 后,吸取一定体积的培养液进行菌落计数,同时测定培养液 pH 值,试验重复 3 次。

1.3.7.3 不同碳源对大肠杆菌增殖过程的影响

取 50 mL 的锥形瓶,根据 1.3.7.2 大肠杆菌增殖结果,选择增殖效果最明显的碳源浓度配制试验培养基,每瓶 25 mL,121 °C 灭菌 15 min。取活化后的大肠杆菌悬液 0.2 mL 大肠杆菌悬液(1×10^3 cfu/mL)分别接种到不同碳源的培养基中,37 °C 培养 48 h。在不同的时间点(0、6、9、12、24、30、36、48 h)吸取一定体积的培养液进行菌落计数,同时测定培养液的 pH 值。以葡萄糖作为阳性碳源,不加碳源的培养基作为对照,试验重复 3 次。

1.4 数据处理

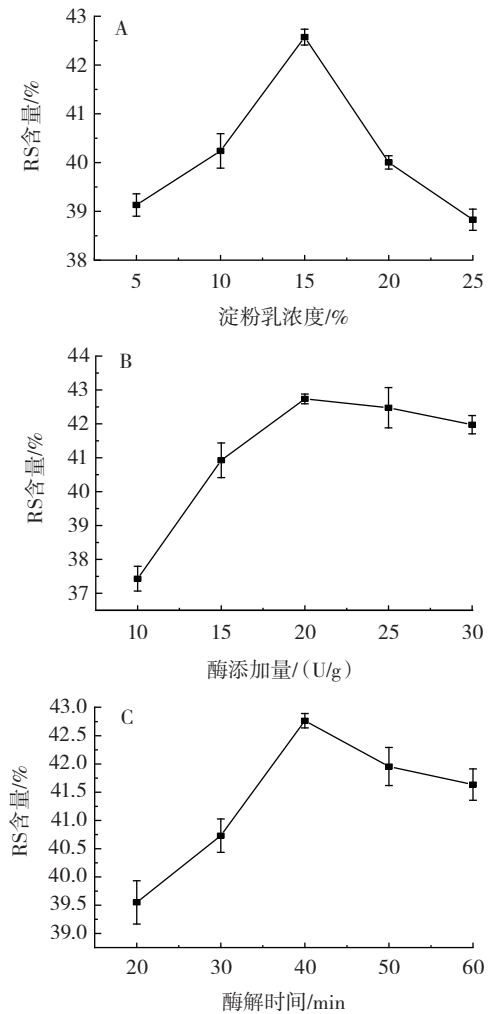
试验结果用平均值 \pm 标准差表示,使用 Design Expert 8.0.6 进行响应面试验数据优化;使用 origin 2018 绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

单因素试验结果如图 1 所示。

由图 1A 可知,随淀粉乳浓度的增大,RS 含量呈现先增后减的趋势,在淀粉乳浓度为 15% 时,纯化所得 RS 的含量最高。推测适宜的淀粉乳浓度有利于酶解反应的高效进行,在酶添加量一定的条件下,当淀粉乳浓度较低时,溶液中分子扩散接触作用迅速且酶量充足,酶解作用强,而当淀粉乳浓度过高时,可能由于酶量不足或产生底物抑制^[15],反而使得酶解作用逐渐减弱。因此不同淀粉乳浓度之间具有明显差异,综合考虑选取淀粉乳浓度 10%~20% 进行响应面法优化试验。



A. 淀粉乳浓度; B. 酶添加量; C. 酶解时间。

图 1 各单因素对 RS 含量的影响

Fig.1 Effects of single factors on RS content

由图 1B 可知,随着酶添加量的增多,RS 含量呈现先增大后略减小的趋势,在酶添加量为 20 U/g,纯化所得 RS 的含量最高。耐高温 α -淀粉酶纯化 RS 时,同时也可以除去其中的可溶性淀粉,这是 RS 含量提高的重要原因之一。纯化所用耐高温 α -淀粉酶可使淀粉分子链断裂,适宜链长的淀粉分子更有利于形成 RS^[16],当酶添加量过多时,分子运动比较强烈,并使得分子链过短,扩散速度也较大,因此较难聚集使得 RS 含量降低。因此不同酶添加量之间具有明显差异,综合考虑选取酶添加量 15 U/g~25 U/g 进行响应面法优化试验。

由图 1C 可知,随着酶解时间的延长,RS 含量呈现先增加后趋于平缓的趋势,在酶解时间为 40 min 时 RS 含量相对稳定。由此可得,当酶解时间在 40 min 之内时,RS 含量随着酶解时间的延长而增大;当酶解时间大于 40 min 时,由于底物量固定,酶解完全,使得其结果逐渐趋于恒定。因此不同酶解时间之间具有明显差异,综合考虑选取酶解时间 30 min~50 min 进行响应

面法优化试验。

2.2 响应面分析 RS 纯化工艺试验结果

2.2.1 响应面法优化试验设计及结果

每组样品平行测定 3 次,取平均值,进行统计分析。Design Expert 8.0.6 软件进行响应面设计及结果分析。结果如表 2 所示。

表 2 响应面试验方案与结果

Table 2 Response surface test scheme and results

| 试验号 | A 淀粉乳浓度 | B 酶添加量 | C 酶解时间 | RS 含量/% |
|-----|---------|--------|--------|---------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 17.93 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 26.17 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 29.65 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 33.86 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 17.57 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 21.73 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 21.96 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 31.66 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 22.15 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 22.71 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 23.80 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 33.86 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 43.10 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 41.66 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 43.89 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 41.21 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 40.80 |

由表 2 可知,得拟合方程: $Y=42.13+3.29A+3.75B+3.39C-1.01AB+1.39AC+2.37BC-8.81A^2-6.41B^2-10.09C^2$ 。

2.2.2 方差分析结果

响应面试验方差分析见表 3。

表 3 响应面试验方差分析

Table 3 Response surface test variance analysis

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|----------|-----|--------|--------|----------|-----|
| 模型 | 1 358.7 | 9 | 150.97 | 61.91 | <0.000 1 | ** |
| A 淀粉乳浓度 | 86.53 | 1 | 86.53 | 35.48 | 0.000 6 | ** |
| B 酶添加量 | 112.73 | 1 | 112.73 | 46.23 | 0.000 3 | ** |
| C 酶解时间 | 91.94 | 1 | 91.94 | 37.7 | 0.000 5 | ** |
| AB | 4.06 | 1 | 4.06 | 1.67 | 0.237 9 | |
| AC | 7.67 | 1 | 7.67 | 3.15 | 0.119 4 | |
| BC | 22.56 | 1 | 22.56 | 9.25 | 0.018 8 | ** |
| A ² | 327.16 | 1 | 327.16 | 134.16 | <0.000 1 | ** |
| B ² | 173.26 | 1 | 173.26 | 71.05 | <0.000 1 | ** |
| C ² | 428.43 | 1 | 428.43 | 175.69 | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 17.07 | 7 | 2.44 | | | |
| 失拟项 | 10.2 | 3 | 3.4 | 1.98 | 0.259 6 | |
| 纯误差 | 6.87 | 4 | 1.72 | | | |
| 总和 | 1 375.77 | 16 | | | | |

注:**表示具有极显著差异, $P<0.01$ 。

如表 3 所示,模型 $F=61.91$, $P<0.01$,说明此回归模型是极显著的。方程失拟项 $F=1.98$, $P>0.05$,失拟项相对于纯误差影响不显著,说明回归模型与实测值拟合度较好,适用性高,可以使用该回归方程代替试验真

实点分析试验结果。各因素的影响大小:淀粉乳浓度<酶解时间<酶添加量。通过 F 检验来判定,概率 $P(F>F\alpha)$ 的值越小,则相应变量的显著程度越高,对试验指标的影响越大, A 、 B 、 C 的 P 值均小于 0.01,说明淀粉乳浓度、酶解时间、酶添加量对 RS 含量的影响极显著。 $R^2=0.987 6$, $R^2_{Adj}=0.971 6$,表示所建立的模型能够很好地反映独立变量和响应变量之间的关系。

2.2.3 因素交互作用

利用 Design Expert 8.0.6,根据回归方程,生成等高线和响应面图,并考察拟合响应曲面的形状,分析淀粉乳浓度、酶解时间、酶添加量对 RS 含量的影响,结果见图 2~图 4。

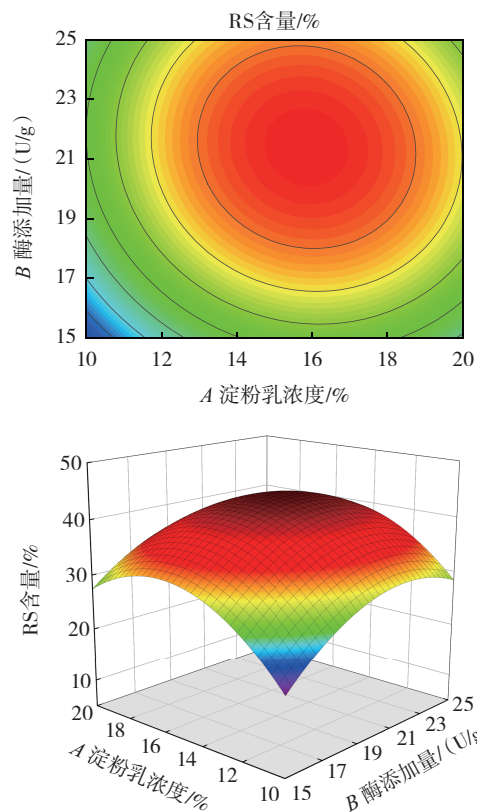
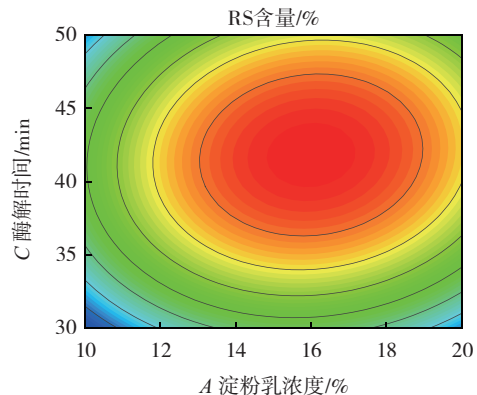


图 2 淀粉乳浓度与酶添加量相互作用的等高线图与响应面图
Fig.2 Contour diagram and response surface diagram of interaction between starch milk concentration and enzyme dosage level



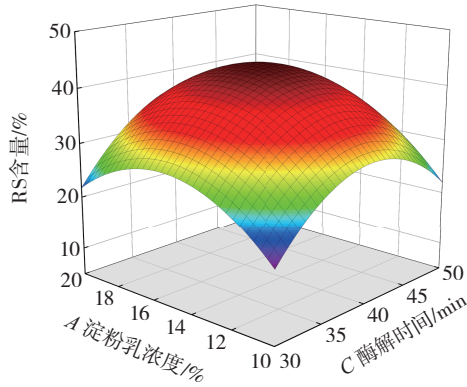


图3 淀粉乳浓度与酶解时间相互作用的等高线图与响应面图
Fig.3 Contour diagram and response surface diagram of interaction between starch milk concentration and enzymatic hydrolysis time

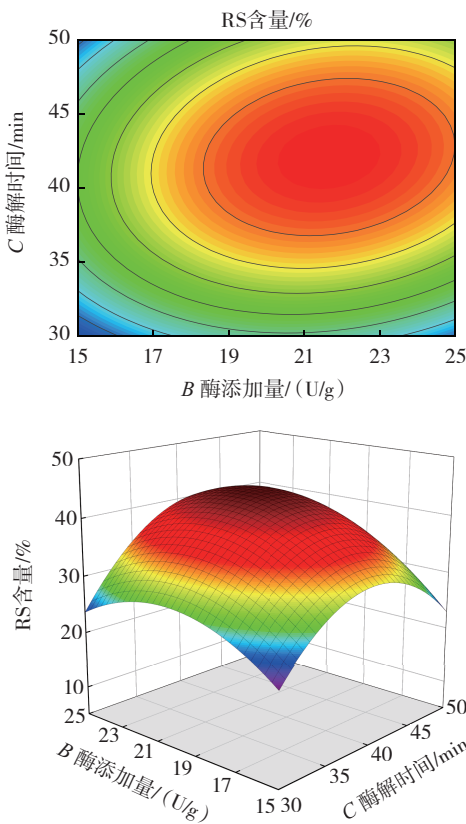


图4 酶解时间与酶添加量相互作用的等高线图与响应面图
Fig.4 Contour diagram and response surface diagram of interaction between enzymatic hydrolysis time and enzyme dosage level

从图2~图4可见,3个因素在所选范围内存在极值,即等高线中最小椭圆的中心点。结果表明,BC交互作用显著,与F值结果一致。

2.2.4 验证试验

经软件分析,该模型得到的最优条件:淀粉乳浓度 15.93%、酶添加量 21.59 U/g、酶解时间 42.19 min,预测 RS 含量理论值为 43.404 6%。考虑到实际操作的

可能性,将试验条件修正为淀粉乳浓度 16%、酶添加量 22 U/g、酶解时间 42 min。在该修正条件下进行 3 次重复试验,RS 含量平均为 (43.23±0.26)%, 接近理论值。表明该数学模型可用于 RS 纯化过程。

2.3 RS 碘结合曲线

碘吸收曲线见图 5。

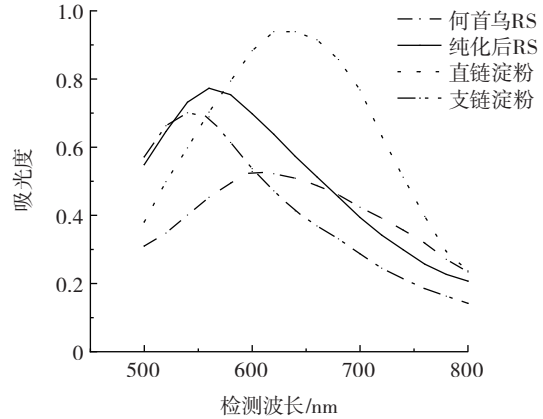


图5 碘吸收曲线

Fig.5 Iodine absorption curve

淀粉和碘相互作用可引起特有的颜色反应^[17],是影响淀粉结构和功能的重要因素。直链淀粉与碘结合,在范德华力的作用下碘分子进入直链淀粉的螺旋结构中,形成稳定的蓝色复合物^[18],并且最大吸收峰在 600 nm~640 nm;支链淀粉由于其分支状况的不同,与碘结合生成紫红色复合物,最大吸收峰在 520 nm~560 nm^[19]。淀粉-碘复合物的颜色越深,碘结合能力越强,最大吸收波长、吸收峰的范围和吸光值变化可作为分析淀粉中直/支链比例以及分子量的大小的重要依据之一。如图 5 所示,何首乌 RS 及纯化后 RS 的最大吸收峰分别是在 598,561 nm,由直链淀粉处向支链淀粉处偏移,充分说明何首乌 RS 是由直链淀粉和支链淀粉构成的混合物。纯化后 RS 的吸光度远远大于何首乌 RS,表明纯化后 RS 且具有更强的碘结合能力;纯化后 RS-碘络合物的吸收峰比何首乌 RS 的窄,表明纯化后 RS 的分子量分布比较集中,该纯化工艺对 RS 纯化效果较好。

2.4 平均聚合度(DP)分析

不同样品的平均聚合度见表 4。

表 4 不同样品的平均聚合度

Table 4 Average degree of polymerization of different samples

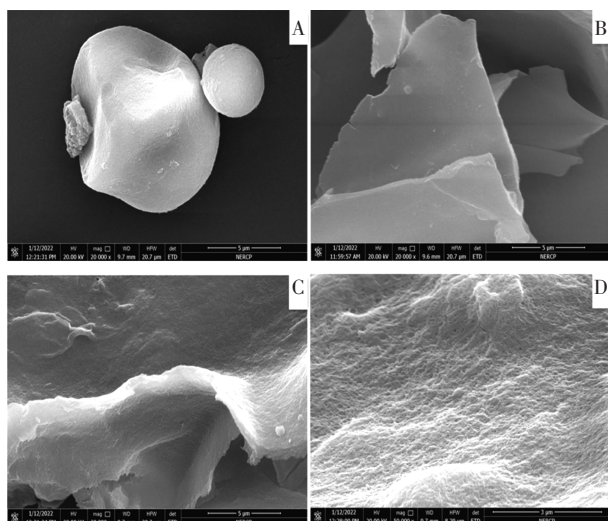
| 淀粉类型 | 何首乌 | | 不同 RS 含量 | | | | |
|-------|--------|-------|----------|--------|--------|--------|--------|
| | 淀粉 | RS | 17.93% | 21.73% | 26.17% | 33.86% | 43.89% |
| 平均聚合度 | 125.58 | 91.72 | 87.35 | 80.06 | 69.42 | 62.38 | 47.03 |

RS 的形成是由靠近分子链的末端区域相互缠绕

发生双螺旋结构,并使原来杂乱无章的淀粉分子链进一步延伸,延伸的分子链再发生折叠卷曲,更有利于分子上的羟基相互作用形成螺旋之间的氢键,从而形成紧密的螺旋与螺旋的聚集体,形成抗酶解的结晶区。RS的DP关系到抗性淀粉的形成及含量,DP过低淀粉链过短无法形成螺旋结构^[20],研究表明DP>20更利于双螺旋与结晶区的形成^[21]。热压-酶法制备的何首乌RS与纯化后的RS分子的平均聚合度分别为91.72和47.03,纯化后RS的DP明显减小,也证实了何首乌RS在酶解纯化过程中发生降解,纯化过程中形成了聚合度较小的分子链,提供了许多容易形成双螺旋结构的链端,分子自由移动能力增加,进而更易组成的稳定双螺旋结构,提高RS含量并使得使整个淀粉分子处于有序状态。

2.5 颗粒形貌观察

扫描电镜图见图6。



A. 何首乌淀粉(20 000×); B. 何首乌 RS (20 000×);
C. 纯化后 RS(20 000×); D. 纯化后 RS(50 000×)。

图6 样品扫描电镜图

Fig.6 Scanning electron microscopy of samples

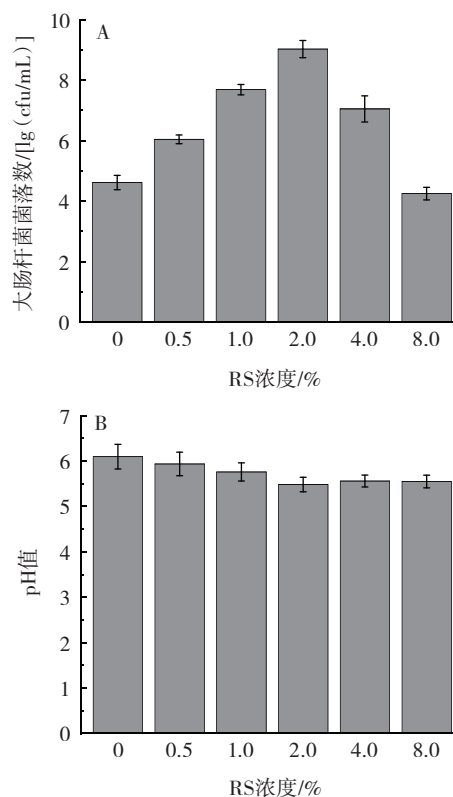
由图6可以看出何首乌RS与纯化后RS样品均为冷冻干燥制备,样品呈层片状,形态保存较好^[22]。何首乌淀粉颗粒呈不规则圆球形,大小不一,表面比较光滑平整,由于何首乌RS是热压-酶法处理法制备而成的,从扫描电镜图可见其颗粒形状已经被破坏,大部分已经呈现层片的形状,淀粉在糊化过程中吸水膨胀破裂,破坏了原有结构,并在回生阶段直链淀粉分子依靠氢键和范德华力重新聚集形成了结构较为紧密稳定的新晶体^[23]。经纯化后的RS粉颗粒均呈现多孔结构,纯化所用耐高温 α -淀粉酶能使淀粉分子片段减小,从而增大了其可酶解成分与淀粉酶的接触面积,可能是纯化效果较好的原因之一,纯化过程使小分子糖与可

消化淀粉被去除^[24],使得抗性淀粉结晶区暴露出来。由于淀粉酶的作用,纯化后RS表面出现凹陷^[24],淀粉酶仅在非结晶区水解支链淀粉,充分显示了抗性淀粉的紧密结构^[25],这些观察结果与有关莲子淀粉的报道一致。

2.6 RS对大肠杆菌增殖的影响

2.6.1 不同RS浓度对大肠杆菌增殖效力的考察

培养液中不同RS浓度对大肠杆菌菌落数及培养液pH值的影响如图7所示。



A. 大肠杆菌菌落数变化; B. 培养液pH值变化。

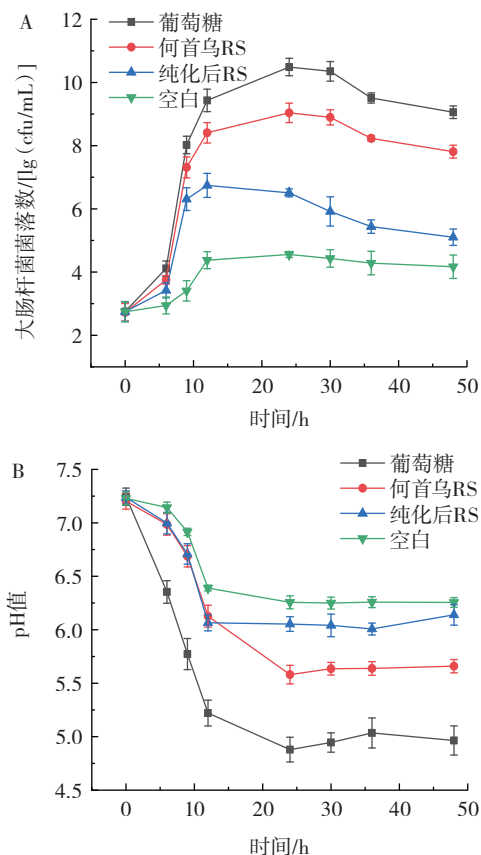
图7 培养液中不同RS浓度对大肠杆菌增殖的影响

Fig.7 Effect of RS concentration on the proliferation of *Escherichia coli* in culture medium

纯化后RS对大肠杆菌的增殖存在最大增殖量浓度,由图7A可看出,当RS浓度为2.0%时,为菌落数最高值,碳源浓度继续增加,菌落数出现下降趋势,这可能是由于过高浓度的碳源影响了培养基渗透压^[26],渗透压过高不利于使大肠杆菌增殖,或是大肠杆菌在大量增殖过程中产生的代谢产物影响了自身的生长。培养液pH值变化也是反应细菌生长情况的指标之一,大肠杆菌生长产酸^[27],使得培养液pH值降低,由图7B可看出,当RS浓度为2.0%时,培养液pH值最低,即培养液中菌落数最多,培养液pH值结果与菌落数变化趋势一致,由此得出不同碳源浓度对大肠杆菌的增殖作用有一定影响,且过高浓度的碳源并不利于大肠杆菌的生长。

2.6.2 不同碳源对大肠杆菌增殖过程的影响

不同碳源对大肠杆菌菌落数及培养液 pH 值的影响如图 8 所示。



A.不同碳源对大肠杆菌菌落数变化;B.不同碳源对培养液 pH 值变化。

图 8 不同碳源对大肠杆菌增殖的影响

Fig.8 Effects of different carbon sources on the proliferation of *Escherichia coli*

由图 8 可看出,6 h 内处于细菌的生长延迟期,细菌总数变化不大,但可以看出葡萄糖组的生长延迟期较 RS 组明显减短。6 h 后细菌进入对数生长期,葡萄糖组对大肠杆菌的增殖能力最强,纯化后 RS 组在对数生长期的菌落数比何首乌 RS 组明显减少,说明纯化后 RS 能显著降低细菌增殖能力。30 h 后细菌进入生长稳定期,细菌生长速率下降,死亡率上升,且纯化后 RS 组较其他组提前进入细菌衰亡期,菌落数明显下降,培养液 pH 值与菌体数变化趋势一致,由此得出何首乌 RS 可明显降低大肠杆菌的增殖速率,且纯化后 RS 的作用更为明显。发酵底物在被消化分解后,才可以被细菌利用,底物的分解速度越快,发酵速度就会越快^[28]。RS 包含大量的直链淀粉和少量的支链淀粉,微生物降解后部分低聚物不能被细菌利用需进一步需要分解为更小的碎片。研究结果表明 RS 发酵速度较慢,是因为其复杂的序列结构和双螺旋特性^[29],RS 特有的结晶区不利于细菌分解^[30],纯化后 RS 结晶

区明显增加,影响细菌与底物的结合能力,导致发酵动力学减慢。功能性淀粉对细菌降解具有更强的抵抗力^[31-32],不利于细菌的增殖生长,进而 RS 组在对数生长期菌落数明显低于葡萄糖组。大肠杆菌能够发酵碳水化合物产生乙酸、甲酸和乳酸,并且在氢解酶系统裂解二氧化碳和氢^[33],因此造成了发酵液在后期 pH 值有所下降,而当培养基中酸性物质到一定含量时会对大肠杆菌增殖产生抑制作用,这也是大肠杆菌在生长后期菌落数下降的原因之一。

3 结论

抗性淀粉作为一种新型食品添加剂,具有高膳食纤维含量、低热量的功能。本研究采用单因素结合响应面法优化 RS 纯化工艺结果表明,在淀粉乳浓度 16%、酶添加量 22 U/g、酶解时间 42 min 条件下纯化 RS,含量为(43.23±0.26)%,高温酶解法可以用于 RS 纯化。同时对其理化特性进行了研究,碘结合曲线表明,何首乌 RS 是由直链淀粉和部分支链淀粉组成,且纯化后 RS 碘结合能力明显提高。何首乌 RS 的 DP 值为 91.72,纯化后 RS 的 DP 值为 47.03,DP 值的降低表明直链淀粉分子链减小而集中,RS 含量提高。扫描电镜显示纯化后 RS 呈现多孔状。体外微生物试验结果显示,RS 对抑制大肠杆菌增殖具有良好的效果,何首乌 RS 及纯化后 RS 对大肠杆菌的增殖效力均低于葡萄糖,且纯化后 RS 对大肠杆菌增殖的影响更为显著。相比于原抗性淀粉,酶法纯化工艺在降低酶使用量及确保安全健康的基础上大大提高了其纯度,为制备高纯度抗性淀粉提供了基础方法,有利于抗性淀粉制备研究的继续进行,也为何首乌 RS 作为功能性淀粉的开发潜力奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China—Volume I[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [2] XUE X Y, QUAN Y Y, GONG L H, et al. A review of the processed *Polygonum multiflorum* (Thunb.) for hepatoprotection: Clinical use, pharmacology and toxicology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 261: 113121.
- [3] YANG J B, YE F, TIAN J Y, et al. Multiflorumisides HK, stilbene glucosides isolated from *Polygonum multiflorum* and their *in vitro* PTP1B inhibitory activities[J]. Fitoterapia, 2020, 146: 104703.
- [4] 费洪立, 李志江, 阮长青, 等. 抗性淀粉的生理功能及其在食品中的应用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(18): 425-432.
FEI Hongli, LI Zhijiang, RUAN Changqing, et al. Physiological function of resistant starch and its application in food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(18): 425-432.
- [5] 万科, 杨莹, 谷津, 等. 何首乌抗性淀粉制备工艺优化及性质研

- 究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(1): 88-91.
- WAN KE, YANG YING, GU JIN, et al. Optimization of preparation technology and Properties of Resistant Starch from *Polygonum multiflorum*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2018, 29(1): 88-91.
- [6] 李闻涛, 万科, 杨莹, 等. 何首乌抗性淀粉促进靶向结肠微丸体外药物释放研究[J]. 中国药业, 2017, 26(17): 6-9.
- LI Wentao, WAN Ke, YANG Ying, et al. Study on resistant starch of *Polygonum multiflorum* for promoting drug release in vitro of targeted colon pellets[J]. China Pharmaceuticals, 2017, 26(17): 6-9.
- [7] SUN H R, FAN J Y, TIAN Z G, et al. Effects of treatment methods on the formation of resistant starch in purple sweet potato[J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130580.
- [8] JAITURONG P, LAOSIRISATHIAN N, SIRITHUNYALUG B, et al. Physicochemical and prebiotic properties of resistant starch from *Musa sapientum* Linn., ABB group, cv. Kluai Namwa Luang[J]. Heliyon, 2020, 6(12): e05789.
- [9] WANG M W, CHEN X Y, ZHOU L Y, et al. Prebiotic effects of resistant starch nanoparticles on growth and proliferation of the probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112572.
- [10] 孙永康. 鹰嘴豆抗性淀粉的制备、理化性质和肠道益生特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- SUN Yongkang. Study on preparation, physicochemical properties and prebiotic properties of chickpea resistant starch[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.
- [11] 杨光, 丁霄霖. 抗性淀粉定量测定方法的研究[J]. 中国粮油学报, 2002, 17(3): 59-62.
- YANG Guang, DING Xiaolin. Study on determination of resistant starch[J]. Chinese Cereals and Oils Association, 2002, 17(3): 59-62.
- [12] 谢丹, 鲁延杰, 李佳璇, 等. 响应面法优化川芎蛋白提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 213-220.
- XIE Dan, LU Yanjie, LI Jiakuan, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of *Ligusticum* Chuanxiong protein by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(21): 213-220.
- [13] 刘淑婷, 王颖, 王志辉, 等. 超声-微波协同酶法制备芸豆抗性淀粉工艺优化及结构分析[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 187-195.
- LIU Shuting, WANG Ying, WANG Zhihui, et al. Process optimization and structure analysis of kidney bean resistant starch by ultrasound-microwave synergistic enzymatic method[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 187-195.
- [14] CORREA-ARAGUNDE N, NEJAMKIN A, DEL CASTELLO F, et al. Nitric oxide synthases from photosynthetic organisms improve growth and confer nitrosative stress tolerance in *E. coli*. Insights on the pterin cofactor[J]. Nitric Oxide, 2022, 119: 41-49.
- [15] 杨铭乾, 黄继红, 许茜, 等. 酶法纯化玉米抗性淀粉工艺的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2015, 36(1): 22-26.
- YANG Mingqian, HUANG Jihong, XU Qian, et al. Study on enzymatic purification process of corn resistant starch[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2015, 36(1): 22-26.
- [16] LI E P, YANG X Y, LI C. Combined effects of starch fine molecular structures and storage temperatures on long-term rice amylopectin retrogradation property[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 201: 458-467.
- [17] LI X X, YUE X R, HUANG Q L, et al. Effects of wet-media milling on multi-scale structures and *in vitro* digestion of tapioca starch and the structure-digestion relationship[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 284: 119176.
- [18] AMOAKO D B, AWIKA J M. Resistant starch formation through intrahelical V-complexes between polymeric proanthocyanidins and amylose[J]. Food Chemistry, 2019, 285: 326-333.
- [19] YANG Y X, CHEN Q, YU A Z, et al. Study on structural characterization, physicochemical properties and digestive properties of *Euryale ferox* resistant starch[J]. Food Chemistry, 2021, 359: 129924.
- [20] PAN L X, CHEN F, YANG Y, et al. The underlying starch structures of rice grains with different digestibilities but similarly high amylose contents[J]. Food Chemistry, 2022, 379: 132071.
- [21] DUYEN T T M, VAN HUNG P. Morphology, crystalline structure and digestibility of debranched starch nanoparticles varying in average degree of polymerization and fabrication methods[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 256: 117424.
- [22] B J, D D, S I, et al. Influence of freeze-drying and fresh cooking on starch morphology and physicochemical and thermal properties of various tropical tubers[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 1794-1806.
- [23] GAO L C, XIA M J, LI Z H, et al. Common buckwheat-resistant starch as a suitable raw material for food production: A structural and physicochemical investigation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 145-153.
- [24] BISWAS P, DAS M, BORAL S, et al. Enzyme mediated resistant starch production from Indian Fox Nut (*Euryale ferox*) and studies on digestibility and functional properties[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 237: 116158.
- [25] ZHANG L, MEI J Y, REN M H, et al. Optimization of enzyme-assisted preparation and characterization of *Arenga pinnata* resistant starch[J]. Food Structure, 2020, 25: 100149.
- [26] TEMPELHAGEN L, AYER A, CULHAM D E, et al. Cultivation at high osmotic pressure confers ubiquinone 8-independent protection of respiration on *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(4): 981-993.
- [27] ZOU S P, ZHAO K, TANG H, et al. Improved production of D-panthothenic acid in *Escherichia coli* by integrated strain engineering and fermentation strategies[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 339: 65-72.
- [28] TIWARI U P, SINGH A K, JHA R. Fermentation characteristics of resistant starch, Arabinoxytan, and β -glucan and their effects on the gut microbial ecology of pigs: A review[J]. Animal Nutrition, 2019, 5(3): 217-226.
- [29] ZHOU D T, MA Z, HU X Z. Isolated pea resistant starch substrates with different structural features modulate the production of short-chain fatty acids and metabolism of microbiota in anaerobic fermentation *in vitro*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(18): 5392-5404.
- [30] WANG R, WANG J, LIU M, et al. Association of starch crystalline pattern with acetylation property and its influence on gut microbiota fermentation characteristics[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 128: 107556.
- [31] LI M, WANG F F, WANG J, et al. Manipulation of the internal structure of starch by propionyl treatment and its diverse influence on digestion and *in vitro* fermentation characteristics[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 270: 118390.
- [32] SONG R, MURPHY M, LI C S, et al. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2018, 12: 3117-3145.
- [33] 俞东宁. 不同抗性淀粉理化特性及其体外发酵的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018.
- YU Dongning. Physicochemical properties and *in vitro* fermentation characteristics of different resistant starches[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2018.