

莲藕多糖-绿原酸复合体制备及特性评价

邹晓琴^{1,2}, 刘秋兰¹, 黄菲², 肖家喜², 易阳^{1*}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 农产品加工与转化湖北省重点实验室, 湖北武汉 430023)

(2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 为了增强莲藕多糖的功能特性和绿原酸的稳态化利用, 该研究考察了莲藕多糖与绿原酸的非共价相互作用, 探究了两者复合物的理化性质、稳定性和生物活性。通过单因素和响应面实验, 以绿原酸结合率为指标确定最佳制备工艺: 温度 0 °C, pH 值为 5.5, 多酚与多糖质量比 4:1。在此工艺条件下, 莲藕多糖与绿原酸的结合率为 2 174.01 mg/g, 其平均分子量由 146.3 ku 增加到 162.1 ku。红外光谱和紫外光谱特征证明了莲藕多糖和绿原酸非共价结合的存在。该复合物的解离率与温度呈正相关, 低温有利于维持复合物的稳定, 而经口腔、胃或小肠模拟消化后的解离率均低于 25%。该复合物对 DPPH 自由基清除率呈浓度依赖性, 具有一定的抗氧化能力。该复合物可显著诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 的同时, 也能明显抑制 LPS 诱导 RAW267.4 细胞产生 NO, 即同时具有免疫激活和免疫抑制的能力。该研究为莲藕多糖和绿原酸的加工利用提供一定的理论支持。

关键词: 莲藕多糖; 绿原酸; 非共价结合; 稳定性; 抗氧化活性; 免疫调节能力

文章编号: 1673-9078(2023)07-184-193

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0955

Preparation and Characterization of Lotus Root

Polysaccharide-chlorogenic Acid Complexes

ZOU Xiaoqin^{1,2}, LIU Qiulan¹, HUANG Fei², XIAO Jiaxi², YI Yang^{1*}

(1.College of Food Science and Engineering, Hubei Key Laboratory for Processing and Transformation of Agricultural Products, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China) (2.Sericultural and Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: To enhance the functionality of lotus root polysaccharides (LRPs) and stabilize chlorogenic acid (CHA) while also facilitating its use, the noncovalent LRP and CHA interactions were studied alongside the physicochemical properties, stability, and bioactivity of the LRP-CHA complex. Based on single-factor and response surface design experiments, the optimal parameters for the preparation of LRP-CHA complexes (measured by CHA binding to LRP) were a temperature of 0 °C, pH of 5.5, and polyphenol-to-polysaccharide mass ratio of 4:1. These parameters yielded a CHA-to-LRP binding rate of 2 174.01 mg/g and an increase in the average molecular weight from 146.3 ku to 162.1 ku. The IR and UV data indicate noncovalent binding between LRP and CHA. As the dissociation rate of the LRP-CHA complex was found to be positively correlated with temperature, low temperatures are assumed to maintain the stability of the complex. Nonetheless, the dissociation rate was generally less than 25% following simulated oral cavity, stomach, or intestine digestion. The LRP-CHA complex shows dose-dependent scavenging activity for DPPH free radicals, which is indicative of antioxidant activity. Furthermore, the LRP-CHA complex significantly induces NO production in RAW264.7 cells, while also suppressing LPS-stimulated NO production, indicating that it possesses both

引文格式:

邹晓琴,刘秋兰,黄菲,等.莲藕多糖-绿原酸复合体制备及特性评价[J].现代食品科技,2023,39(7):184-193.

ZOU Xiaoqin, LIU Qiulan, HUANG Fei, et al. Preparation and characterization of lotus root polysaccharide-chlorogenic acid complexes [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 184-193.

收稿日期: 2022-07-29

基金项目: 湖北省重点研发计划项目 (2021BED006); 湖北省青年拔尖人才培养计划项目; 武汉市知识创新专项基础研究项目 (2022020801010389)

作者简介: 邹晓琴 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养, E-mail: 921960634@qq.com

通讯作者: 易阳 (1986-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬加工与营养, E-mail: yiy86@whpu.edu.cn

immunoactivatory and immunosuppressive effects. The findings of this work are expected to serve as theoretical support for the processing and utilization of LRP and CHA.

Key words: lotus root polysaccharide; chlorogenic acid; noncovalent binding; stability; antioxidant activity; immunoregulatory capacity

多糖和多酚是植物的主要活性成分,两者可以通过共价和非共价形式结合共存。在加工过程中,多糖与多酚可以自发且快速的进行非共价结合。研究发现两者的非共价结合会影响食品的稳定性和感官品质及营养特性等,如 Bindon 等^[1]研究发现葡萄酒中酵母细胞壁多糖通过与单宁形成非共价结合物,从而抑制单宁与蛋白质的结合,减少沉淀的产生,提高酒的稳定性; Hayashi 等^[2]研究表明儿茶素通过与果胶的相互作用,从而降低其涩味,改善其口感。Wu 等^[3]发现燕麦 β -葡聚糖与茶多酚非共价结合后可增强其抗氧化活性。由此可见,探究多糖和多酚的非共价相互作用,对于调控食品品质和指导食品加工具有重要意义。

多糖被证实为莲藕中主要的功能性成分,具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节和抗肥胖等多种活性^[4]。目前关于莲藕多糖(Lotus Root Polysaccharide, LRP)的研究主要集中在多糖的提取、纯化、结构解析及活性评价等方面,关于其改性和组分相互作用的研究报道较少。绿原酸(Chlorogenic Acid, CHA)是多酚类物质中最重要的酚酸之一,具有抗氧化、抗菌、抗炎、保肝和降血脂等多种生理功能^[5],但由于其较差的水溶性和稳定性,使其在食品和化妆品等领域的应用受到限制。因此,能否通过物理混合的方式,使莲藕多糖与绿原酸进行非共价结合形成多糖-多酚复合物,从而实现莲藕多糖的功能特性增强和绿原酸的稳态化利用,有待研究。

研究发现多糖和多酚主要通过范德华力、氢键和疏水相互作用等形成非共价结合^[6]。氢键通常发生在多酚的羟基和糖苷键中的氧原子或者糖醛酸的羟基之间^[7],而疏水作用则多发生在多糖的疏水位点,如糖醛酸的甲氧基与多酚的芳香环之间^[8]。多糖与多酚之间的非共价相互作用受外在环境因素和内在自身理化性质的影响,其中环境因素包括混合体系的温度、pH、底物浓度和离子浓度等。Zhang 等^[9]的研究显示,不同的环境因素下,阿拉伯果胶与阿魏酸的相互作用有较大差异,当温度为 36.8℃、pH 值为 5.26 以及 PBS 浓度为 0.09 mol/L 时,两者的吸附能力最强。

本研究从莲藕中水提醇沉得到多糖,采用平衡透析法制备莲藕多糖-绿原酸复合物。为了确定最佳制备工艺,以结合率作为评价指标,选取单因素和响应面进行优化。采用光谱法和色谱法分析复合物的理化特征,并探究其稳定性、抗氧化活性及免疫调节活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鄂莲 5 号新鲜莲藕,武汉市黄陂区四季美农贸城;绿原酸,纯度 $\geq 95\%$,阿拉丁试剂公司;Folin-Phenol 试剂,武汉飞扬生物科技有限公司;1,1-二苯-2-苦基肼(DPPH),北京瑞达恒辉科技发展有限公司;小鼠巨噬细胞 RAW264.7,武汉普诺赛生命科技有限公司;高糖培养基(DMEM)、磷酸盐缓冲液(PBS)和青/链霉素混合液抗生素,美国 Hyclone 公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;脂多糖(LPS),北京博奥拓达科技有限公司;CCK-8 试剂盒,南京恩晶生物科技有限公司;T25 培养瓶、24/48/96 细胞孔板,美国 Corning 公司;透析袋(500 u),上海源叶生物科技有限公司。

12N 冷冻干燥仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;AXTD5A 台式低速离心机,盐城市安信实验仪器有限公司;A360 型紫外可见分光光度计,翱艺仪器(上海)有限公司;恒温磁力搅拌器,上海湃澜仪器设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 莲藕粗多糖的制备

参考 Yi 等^[10]的方法并略做修改,将新鲜莲藕切片烘干,磨粉过 50 目筛。取 10.0 g 藕粉,以 10 mL/g 的物料比加入蒸馏水混合均匀,置于 90℃水浴锅中浸提 2 h。经 4 500 r/min 离心 10 min 后收集上清液,加入 $\phi=95\%$ 无水乙醇(终体积分数为 30%, V/V),在 4℃下静置 3 h 以沉淀淀粉,直至碘液检测上清液无变蓝现象。再以 4 500 r/min 转速离心 10 min,取上清液并加入 $\phi=95\%$ 无水乙醇(终体积分数为 75%, V/V),在 4℃条件下静置过夜。经 4 500 r/min 离心 10 min 后收集沉淀,向沉淀物中加入少量体积的蒸馏水复溶,于 45℃真空浓缩至合适浓度,浓缩液冷冻干燥得到莲藕粗多糖。

1.2.2 莲藕多糖-绿原酸复合物制备工艺

参考 Li 等^[11]的方法并略做修改,将绿原酸水溶液(1 mg/mL)和莲藕多糖水溶液(2 mg/mL)以一定体积比装入棕色玻璃瓶中进行混合,在不同的 pH、离子浓度和温度下水浴搅拌 30 min。将混合液转移至经预

处理的透析袋(500 u)后,放入含有大量蒸馏水的烧杯,在相同温度下进行透析并对透析外液进行磁力搅拌,每4 h更换一次透析外液直至达到透析平衡,即在280 nm处的吸光值为0。对透析内液真空冷冻干燥得到莲藕多糖-绿原酸复合物。

1.2.3 莲藕多糖与绿原酸结合率的测定

采用Folin-Ciocalteu法^[12]测定多酚含量,并制作相应的标准曲线为 $y=6.6229x+0.0536$ 。吸取1 mL透析外液于试管中,加入125 μ L的Folin-Ciocalteu试剂避光反应5 min,随后加入1.25 mL 7%的 Na_2CO_3 溶液后定容至5 mL,混匀置于室温避光反应90 min,在760 nm波长处测定溶液的吸光值,根据回归方程计算溶液中多酚含量。结合率C计算公式如下:

$$C = \frac{m_1 - m_2}{M} \quad (1)$$

式中:

C——CHA相对于LRP的结合率,mg/g;

m_1 ——LRP-CHA混合液中添加的CHA质量,mg;

m_2 ——LRP-CHA混合液经透析后透析外液所含CHA质量,mg;

M——LRP-CHA混合液中所添加的LRP质量,g。

1.2.4 单因素试验

1.2.4.1 温度对绿原酸结合率的影响

固定莲藕多糖和绿原酸质量比4:1,NaCl浓度0 mmol/L,不调节pH值,反应温度梯度设定为0、15、30、45、60 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.4.2 pH值对绿原酸结合率的影响

固定莲藕多糖和绿原酸质量比4:1,温度30 $^{\circ}\text{C}$,NaCl浓度0 mmol/L,反应pH值梯度设定为3、4、5、6、7。

1.2.4.3 质量比对绿原酸结合率的影响

固定温度30 $^{\circ}\text{C}$,NaCl浓度0 mmol/L,不调节pH值,莲藕多糖和绿原酸质量比梯度设定为4:1、2:1、1:1、1:2、1:4。

1.2.4.4 NaCl浓度对绿原酸结合率的影响

固定莲藕多糖和绿原酸质量比4:1,温度30 $^{\circ}\text{C}$,不调节pH值,NaCl浓度梯度设定为0、25、50、100、200 mmol/L。

表1 试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of the experiment

编码水平	因素		
	温度/ $^{\circ}\text{C}$	pH	质量比
-1	0	4	4:1
0	15	5	2:1
1	30	6	1:1

1.2.5 响应面试验

在单因素试验的基础上,采用Box-Behnken的中心组合试验设计方法,选定三因素(温度、pH值、质量比)三水平试验(如表1),确定莲藕多糖-绿原酸复合物制备的最佳工艺并进行验证试验,每个处理重复三次。

1.2.6 莲藕多糖-绿原酸复合物结构特征

1.2.6.1 分子量分布测定

参考黄晓芸^[12]的方法,采用SEC-RI-MALLS联用系统测定样品的分子量分布。样品处理:精确称取5.0 mg样品,溶于2 mL 0.2 mol/L醋酸铵溶液中,振荡后于13 000 r/min下离心5 min,然后用0.22 μm 微孔滤膜过滤,备用。色谱条件:色谱柱Agilent PL aquagel-OH凝胶色谱柱;流动相0.2 mol/L醋酸铵;流速0.7 mL/min;进样量20 μL ;柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.6.2 紫外-可见光谱分析

将1 mg/mL样品水溶液于190~500 nm范围内进行紫外全扫。

1.2.6.3 傅里叶红外光谱分析

参考Yi^[13]的方法。取1.0 mg样品与100~200 mg KBr粉末在研钵中混匀研磨,置于模具内压成透明薄片,在4 000~400 cm^{-1} 波数范围内进行红外扫描。

1.2.7 莲藕多糖-绿原酸复合物稳定性评价

1.2.7.1 热稳定性

取10 mL复合物溶液(4 mg/mL)于透析袋(500 u)中,浸没于装有19倍体积去离子水的烧杯后,置于不同温度(0、25、37、100 $^{\circ}\text{C}$)下磁力搅拌4 h,根据方法1.2.5对透析袋外液中多酚含量进行测定,实验重复三次,结果用平均值 $\pm$ 标准差表示。复合物解离率D计算公式(2)如下:

$$D = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D——复合物解离率,%;

m_1 ——复合物经透析后外液中可检测到的游离酚质量,mg;

m_2 ——复合物中结合多酚质量,mg。

1.2.7.2 消化稳定性

(1)消化液配制:参考Yi^[10]的方法并略做修改。

唾液电解质液:0.766 4 g NaCl、1.491 g KCl、0.133 2 g CaCl_2 溶于1 L的蒸馏水中,用0.4 mol/L的HCl和0.4 mol/L NaHCO_3 将pH值调至6.9。

唾液模拟消化液(酶含量130 U/mL):准确称取260.0 mg α -淀粉酶(酶活力 ≥ 50 U/mg)溶于100 mL唾液电解质中,搅拌20 min混匀,用0.4 mol/L HCl调节pH值至6.9。

胃电解质液: 3.19 g NaCl、1.10 g KCl、0.15 g CaCl₂、0.60 g NaHCO₃ 溶于 1 L 的去离子水中, 用 0.4 mol/L 的 HCl 将 pH 值调至 1.5。

胃模拟消化液(酶含量 4 000 U/mL): 准确称取 133.3 mg 胃蛋白酶(酶活力≥3 000 U/mg)溶于 100 mL 胃电解质溶液中, 搅拌 20 min 混匀, 用 0.4 mol/L HCl 调节 pH 值至 2.5。

肠电解质液: 2.70 g NaCl、0.33 g KCl、0.16 g CaCl₂ 溶于 1 L 的蒸馏水中, 用 0.4 mol/L NaHCO₃ 将 pH 值调至 7。

肠模拟消化液(酶含量 50 U/mL): 准确称取 7.00 g 胰酶(酶活力≥30 000 U/g)溶于 100 mL 肠电解质溶液中, 4 800 r/min 离心 10 min 后取上清液。将 25 mL 胰酶溶液与 75 mL 肠电解质溶液混匀, 并用 0.4 mol/L NaHCO₃ 将 pH 值调节至 7。

(2) 消化模拟: 取 10 mL 唾液消化液(或胃液消化液或肠液消化液)与 20 mg 复合物于 15 mL 离心管中混合均匀, 150 r/min 摇床 37 °C 恒温孵育 2 h 后, 将混合液装入透析袋中, 在 0 °C 下透析 4 h。测定透析外液中游离酚含量。实验重复三次, 复合物解离率按照公式(2)计算。

1.2.8 莲藕多糖-绿原酸复合物 DPPH 自由基清除能力测定

参考 Xiong 等^[14]的方法并略作修改, 在 1.0 mL 不同浓度的复合物溶液(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL)中加入 4.0 mL 溶于 95%无水乙醇的 DPPH 溶液(0.2 mmol/L), 并充分混匀。在室温下避光 30 min 后于 517 nm 处测定吸光值 A₁, 同时测定 1.0 mL 样品溶液与 4.0 mL 95%乙醇溶液反应的吸光值 A₂ 以及 1.0 mL 蒸馏水与 4.0 mL DPPH 溶液反应的吸光值 A₀。采用以下公式计算 DPPH 自由基清除率:

$$S = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

S——DPPH 自由基清除率, %;

A₀——空白组吸光值;

A₁——实验组吸光值;

A₂——干扰组吸光值。

1.2.9 莲藕多糖-绿原酸复合物刺激巨噬细胞分泌 NO 的测定

1.2.9.1 复合物诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 测定

参考 Han 等^[15]的方法并略做修改。莲藕多糖-绿原酸复合物在 400 μg/mL 浓度内对巨噬细胞 RAW264.7 无毒性。向 48 孔板中加入每毫升 5×10⁵ 个的 RAW264.7 细胞悬液每孔 500 μL, 在恒温培养箱

(37 °C, 5% CO₂) 中培养, 待细胞贴壁后弃去培养液。然后每孔加入 500 μL 含有不同浓度复合物(25、50、100、200、400 μg/mL)的无胎牛血清培养基, 以不加细胞的孔为空白, 以仅含有细胞悬液的孔为对照组, 以 500 ng/mL LPS 培养基为阳性对照组, 重复 3 组, 培养 24 h 后吸取上清液 50 μL 加入新的 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 格里斯试剂, 充分混匀后静置 5 min, 采用酶标仪于 540 nm 处进行检测吸光值, NO 浓度以亚硝酸钠当量表示(μmol/L)。

1.2.9.2 复合物抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 测定

向 48 孔板中加入每毫升 5×10⁵ 个的 RAW264.7 细胞悬液每孔 500 μL, 在恒温培养箱(37 °C, 5% CO₂)中培养, 待细胞贴壁后弃去培养液。然后每孔加入 500 μL 含 LPS(终质量浓度为 500 ng/mL)和不同浓度复合物(终质量浓度为 25、50、100、200、400 μg/mL)的无胎牛血清培养基, 以不加细胞的孔为空白, 以仅含有细胞悬液的孔为对照组, 以 500 ng/mL LPS 培养基为阳性对照组, 重复 3 组, 培养 24 h 后吸取上清液 100 μL 加入新的 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 格里斯试剂, 充分混匀后静置 5 min, 采用酶标仪于 540 nm 处进行检测吸光值, NO 浓度以亚硝酸钠当量表示(μmol/L)。

1.3 数据处理

实验数据均以“平均值±标准偏差”表示。采用 SPSS 19.0 软件 Duncan 检验组间数据显著性差异(P<0.05 水平)。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 温度对结合率的影响

温度对莲藕多糖与绿原酸结合率的影响如图 1a 所示。在 0~15 °C 的范围内, 多糖与多酚的结合率缓慢上升(P>0.05), 在 15 °C 时结合率最大为 150.02 mg/g; 但当温度超过 15 °C 后, 二者的结合率明显下降, 差异显著(P<0.05)。这可能是因为莲藕多糖与绿原酸之间存在着氢键作用, 由于氢键的形成往往需要释放能量, 温度的升高会减弱两者之间的氢键作用, 从而抑制多糖与多酚的非共价结合^[16]。

2.1.2 pH 对结合率的影响

pH 对莲藕多糖与绿原酸结合率有显著的影响(图 1b)。结果显示, 多糖与多酚的结合率随着 pH 值的升高呈现先上升后下降的趋势(P<0.05), 当 pH

值为 5 时,两者之间的结合率最大。并且当反应体系呈弱酸性时,莲藕多糖与绿原酸的结合率较高,说明在此条件下两者之间可能存在着静电相互作用,多糖与多酚分子表面电位会随着 pH 值的变化而变化,从而使两者之间的静电相互作用大小发生改变^[17]。

2.1.3 质量比对结合率的影响

不同质量比对莲藕多糖与绿原酸结合率的影响如图 1c 所示。当混合体系中绿原酸与莲藕多糖的质量比高于 4:1 时,莲藕多糖与绿原酸的结合趋于饱和,混合体系中的底物浓度过高会抑制两者发生相互作用^[18],且未结合绿原酸透析平衡时间大幅度增加,因此结合前期预实验和实际应用,莲藕多糖与绿原酸质量比梯度选定为 4:1~1:4。结果显示,随着多酚含量的减少,多糖与多酚的结合率呈现显著下降的趋势 ($P<0.05$)。当多酚与多糖的比例为 4:1 时,结合率可达到 1 757.50 mg/g。

2.1.4 NaCl 浓度对结合率的影响

不同 NaCl 浓度对莲藕多糖与绿原酸结合率的影响如图 1d 所示。通过改变反应体系中 NaCl 的浓度来考察离子浓度对多糖与多酚结合的影响。结果表明,随着离子浓度的增大,两者结合率先增大后趋于稳定;当 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时,结合率达到最高。可能是由于离子强度的增大使多糖与多酚之间的疏水作用发挥作用,提高了两者的结合率,但高浓度的盐会降低多糖与多酚的溶解度,抑制了两者的结合率^[19]。

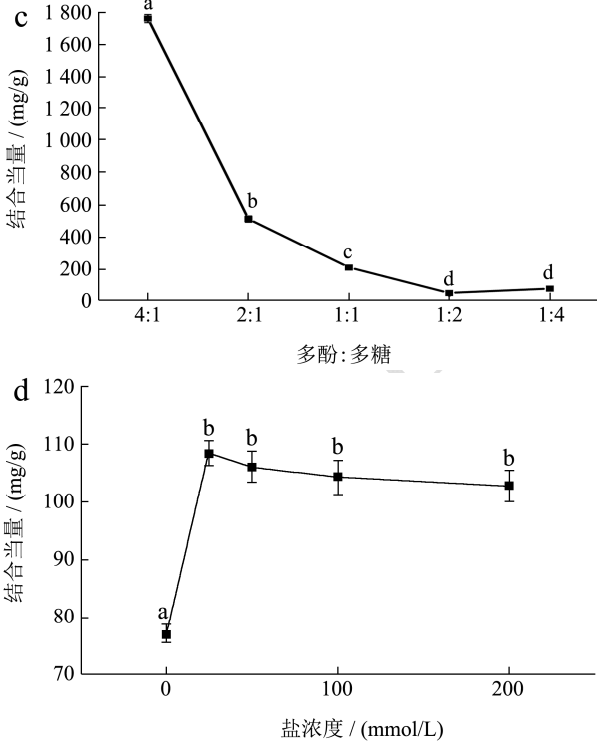
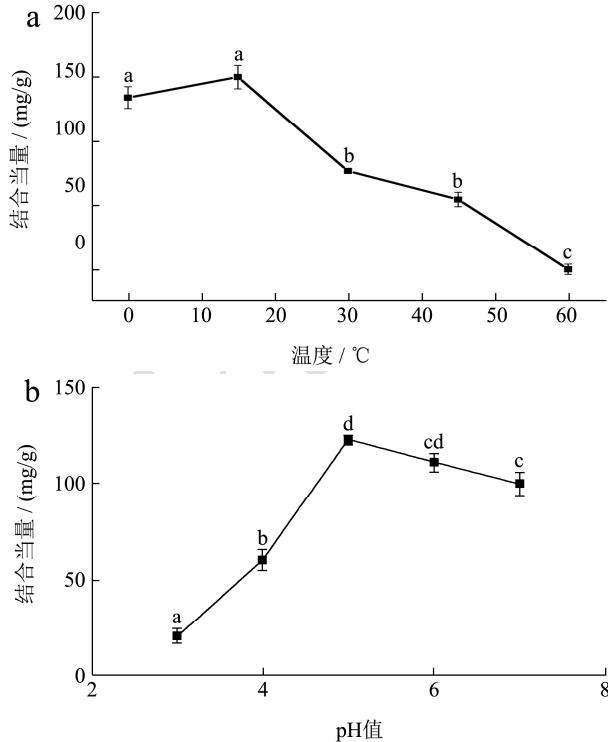


图 1 不同因素对莲藕多糖与绿原酸结合率的影响
Fig.1 Effect of different factors on the binding rate of LRP and CHA in lotus root

注: a 温度; b pH 值; c 质量比; d 盐浓度; 不同的小写字母表示在 0.05 水平上的显著性差异 ($P<0.05$)。

表 2 莲藕多糖与绿原酸复合物制备工艺条件的优化试验结果
Table 2 Optimization test results of the preparation process of the complex of LRP and CHA

试验编码	温度 A/°C	pH B	质量比 C	结合率 D/(mg/g)
1	1	-1	0	623.37
2	-1	0	-1	716.99
3	0	-1	-1	405.33
4	0	0	0	1 451.40
5	0	0	0	1 499.68
6	1	0	-1	257.01
7	0	1	-1	505.73
8	0	0	0	1 509.68
9	1	1	0	602.44
10	-1	1	0	1 405.14
11	-1	0	1	2 179.09
12	-1	-1	0	1 009.93
13	0	0	0	1 522.66
14	0	-1	1	1 431.80
15	1	0	1	1 108.06
16	0	0	0	1 577.58
17	0	1	1	1 988.51

表 3 莲藕多糖与绿原酸结合率回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model for binding rate of LRP and CHA in lotus root

方差来源	平方和	自由度	均方根	F 值	P 值	
模型	5.083E+006	9	5.647E+005	105.00	<0.000 1	significant
A-温度	9.250E+005	1	9.250E+005	171.98	<0.000 1	
B-pH	1.330E+005	1	1.330E+005	24.72	0.001 6	
C-质量比	2.907E+006	1	2.907E+006	540.48	<0.000 1	
AB	43 293.12	1	43 293.12	8.05	0.025 1	
AC	93 345.53	1	93 345.53	17.36	0.004 2	
BC	52 054.70	1	52 054.70	9.68	0.017 1	
A ²	4.040E+005	1	4.040E+005	75.12	<0.000 1	
B ²	3.595E+005	1	3.595E+005	66.85	<0.000 1	
C ²	79 194.74	1	79 194.74	14.72	0.006 4	
残差	37 648.83	7	5 378.40			
失拟项	29 405.14	3	9 801.71	4.76	0.083 0	not significant
纯误差	8 243.70	4	2 060.92			
总和	5.120E+006	16				

2.2 响应面模型建立及结果

2.2.1 二次回归拟合及响应面模型建立

莲藕多糖-绿原酸复合物制备工艺的响应面结果和方差分析见表 2。对表 2 的试验数据进行二次多项回归分析，得到回归方程为：

$$Y=1\,512.20-340.03A+128.92B+602.80C-104.04AB-152.76AC+114.08BC-309.77A^2-292.21B^2-137.14C^2$$

2.2.2 响应面模型显著性分析

对回归模型进行显著性分析（表 3）可见，该模型方差分析达到极显著水平($F=105.00$ 及 $P<0.000\,1$)，失拟项 $P>0.05$ ，表明该模型的拟合效果较好；该模型决定系数 $R^2=0.992\,6$ ，修正相关系数 R^2_{Adj} 及预测相关系数 $Pred\,R^2$ 分别为 $0.983\,2$ 和 $0.905\,6$ ，结果相近，表明预测值和试验值具有很好的相关性；根据 F 值判断出，影响莲藕多糖与绿原酸结合的因素次序为：质量比>温度>pH。

2.2.3 双因素交互作用

用三维和二维图表示各因素之间的交互作用对结合率的影响。由图 2 可以看出，随着温度、pH 和多酚与多糖比例升高，莲藕多糖与绿原酸的结合率逐渐增大，达到峰值后缓慢下降。且坡面越陡峭，二者的交互作用对响应值的影响越大。通过对二阶多项式方程的分析，得到莲藕多糖与绿原酸复合物制备的最佳条件为：温度 $0\,^{\circ}\text{C}$ ，pH 值 5.5 ，多酚与多糖质量比 $4:1$ ，在此条件下预测结合率最大为 $2\,267.43\,\text{mg/g}$ ，三次验证实验测得的实际值为 $2\,174.01\,\text{mg/g}$ ，与预测值之间的偏差为 4.12% ，表明建立的回归模型具有较好的拟

合性。

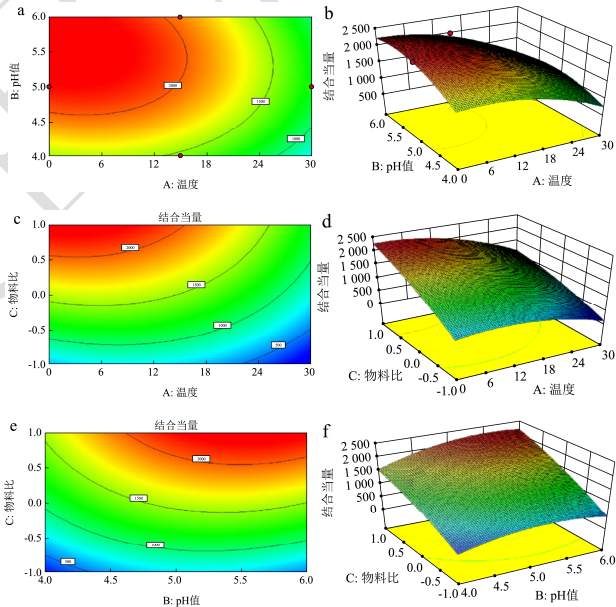


图 2 交互作用对结合率影响的响应面图
Fig.2 Response surface diagram of interaction effect on binding rate

2.3 莲藕多糖-绿原酸复合物结构特征

2.3.1 分子量分布

通过 HPSEC-MALLS-RI 法检测莲藕多糖及复合物的分子量分布如表 4 所示。莲藕多糖及复合物均含有 7 个组分，但各组分的相对含量存在着差异，其中与多糖相比，复合物中 10^5 和 10^4 数量级相对含量分别增加了 14.1% 和 34.0% 。此外，莲藕多糖的平均分子量为 $146.3\,\text{ku}$ ，而复合物的平均分子量增大为

162.1 ku。同时，复合物中未检出小于 500 u 的组分，表明复合物中不存在游离绿原酸，这说明莲藕多糖与

绿原酸之间存在着相互作用使两者紧密结合，且复合物的分子量会明显增大，这一结论与 Li 等^[11]一致。

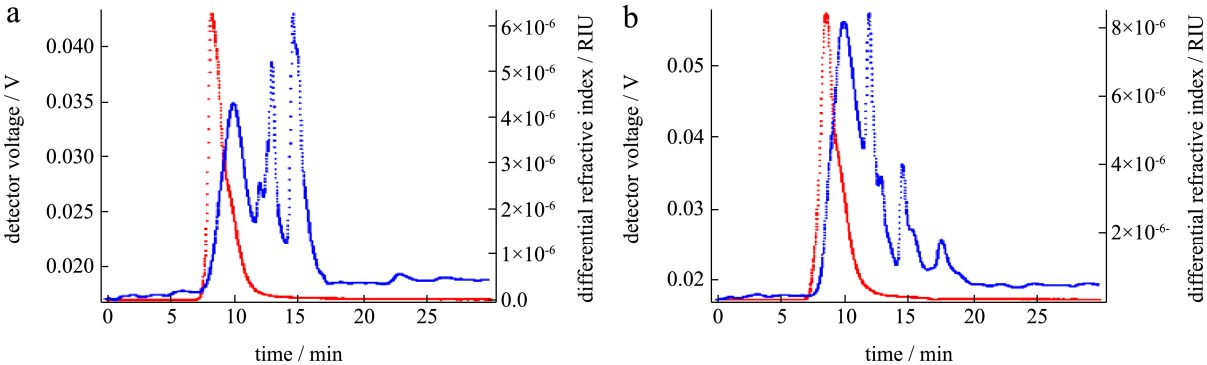


图 3 分子量图谱

Fig.3 Chromatogram of molecular weight

注：a 莲藕多糖；b 莲藕多糖-绿原酸复合物。

表 4 莲藕多糖及莲藕多糖-绿原酸复合物的分子量分布

Table 4 Molecular weight distribution of LRP and its compound with CHA				
样品名称	保留时间/min	分子量/u	相对含量/%	平均分子量/u
LRP	7.297~9.107	1.144×10 ⁶ (±0.791%)	8.4	1.463×10 ⁵
	9.077~11.490	1.359×10 ⁵ (±1.050%)	33.1	
	11.490~12.184	2.628×10 ⁴ (±4.650%)	6.3	
	12.184~13.934	9.036×10 ³ (±3.661%)	20.6	
	13.934~14.718	3.695×10 ³ (±5.083%)	12.7	
	14.748~18.398	6.798×10 ³ (±4.744%)	18.3	
	21.868~24.402	2.494×10 ³ (±51.551%)	0.9	
LRP-CHA	7.207~8.956	1.157×10 ⁶ (±0.660%)	7.8	1.621×10 ⁵
	8.956~11.370	1.365×10 ⁵ (±0.960%)	47.2	
	11.400~12.576	1.840×10 ⁴ (±5.402%)	19.8	
	12.576~13.934	2.211×10 ⁴ (±5.505%)	8.2	
	13.934~15.020	1.253×10 ⁴ (±5.063%)	7.5	
	15.020~16.317	1.676×10 ⁴ (±4.756%)	4.8	
	17.011~18.700	4.540×10 ³ (±23.036%)	4.7	

2.3.2 紫外光谱特征

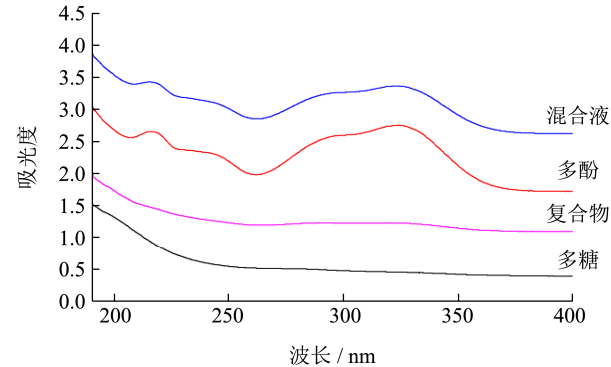


图 4 莲藕多糖与绿原酸及其复合物、混合物的紫外图谱

Fig.4 UV spectra of LRP, CHA and their compounds and mixtures

莲藕多糖、绿原酸及其复合物和混合物的紫外-

可见光谱扫描结果如图 4 所示。多糖含有不饱和羰基和羧基使其在 190~220 nm 处产生强烈吸收峰^[9]，而多酚的紫外吸收峰主要存在于 240~400 nm 范围内，绿原酸的特征吸收峰表现在 215 nm 处的苯环跃迁峰，297 nm 处的酚羟基跃迁峰以及 324 nm 处的 π - π^* 双键跃迁峰。结果表明，绿原酸单体及相对应的混合物中均存在多酚的特征吸收峰，而复合物中的特征吸收峰消失，并且与多糖单体的紫外-可见光谱结果基本一致。因此，可以判断莲藕多糖与绿原酸之间发生了相互作用，多酚与多糖间非共价结合会使紫外光谱中的酚峰消失，该结果与 Zhu 等^[9]和 Li 等^[11]一致。

2.3.3 红外光谱特征

莲藕多糖及其与绿原酸混合物和复合物的红外图谱如图 5 所示。多糖中典型特征峰^[20]表现在 3 382 cm^{-1}

处的-OH 伸缩振动峰, 2 931 cm^{-1} 和 1 410 cm^{-1} 处的-CH 吸收峰, 1 618 cm^{-1} 处的 C=O 吸收峰和 852 cm^{-1} 处 β 型糖苷键的特征吸收。相较于莲藕多糖-绿原酸混合物, 复合物中的酚峰在光谱图中发生偏移或者消失, 如 1 520 cm^{-1} 处的 C=C 伸缩振动, 1 275 cm^{-1} 处的 C-O-C 吸收峰以及 1 120 cm^{-1} 附近的酚羟基弯曲振动。由此表明, 莲藕多糖与绿原酸之间存在着相互作用关系, 并且多糖与多酚的特征吸收峰会发生变化。

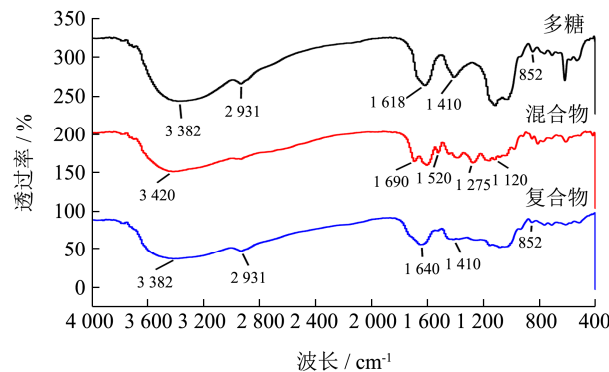


图5 莲藕多糖及其与绿原酸复合物和混合物的红外图谱

Fig.5 FT-IR spectra of LRP, its compound and mixture with CHA

2.4 莲藕多糖-绿原酸复合物稳定性评价

2.4.1 热稳定性

考虑到莲藕多糖-绿原酸复合物的应用, 分别选取 0、25、37 和 100 $^{\circ}\text{C}$ 四个条件来表征在贮藏、加工和消化过程中的冷藏温度、室温、人体消化温度及烹煮温度, 探究复合物在不同温度下的稳定性。结果如表 5 显示。随着温度的不断升高, 复合物的解离率会显著增加。复合物在冷藏温度条件下 (0 $^{\circ}\text{C}$) 几乎不会解离, 在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 和人体消化温度条件下 (37 $^{\circ}\text{C}$) 发生一定程度的解离, 而在高温条件下 (100 $^{\circ}\text{C}$), 复合物的解离率超过 50%。由此说明, 复合物的解离率与温度呈正相关。此结论为莲藕多糖-绿原酸复合物应用于乳剂、果酒、果汁等食品加工具有一定的指导意义。

表5 复合物热稳定性解离率测定结果

Table 5 Determination results of thermal stability dissociation

rate of the complex	
温度/ $^{\circ}\text{C}$	解离率/%
0	低于检测范围
25	12.96 $\pm$ 0.75
37	18.24 $\pm$ 1.06
100	65.79 $\pm$ 1.42

2.4.2 消化稳定性

本试验采用体外模拟消化系统, 将复合物置于口腔、胃及肠道电解质液和消化液中反应 2 h, 分析复合

物在电解质液和消化液中的解离情况, 结果如表 6 所示。在口腔、胃和肠道三种电解质溶液中, 复合物的解离率均低于 10%, 且无明显差异; 但在三种消化液中, 复合物均出现了不同程度的解离, 其中在肠道中的稳定性最差, 解离率达到 23.97%, 分别是口腔和胃中解离率的 1.25 倍和 1.78 倍, 这可能是由于复合物能够与肠道中的胰酶发生反应, 导致其结合不再稳定。

表6 复合物消化稳定性解离率测定结果

Table 6 Determination results of digestion stability dissociation

rate of the complex		
消化部位	种类	解离率/%
口腔	电解质溶液	8.86 $\pm$ 1.62
	消化模拟液	13.45 $\pm$ 3.01
胃	电解质溶液	9.27 $\pm$ 1.21
	消化模拟液	19.15 $\pm$ 2.86
肠道	电解质溶液	9.95 $\pm$ 1.16
	消化模拟液	23.97 $\pm$ 2.57

2.5 莲藕多糖-绿原酸复合物 DPPH 自由基清除能力

除能力

莲藕多糖-绿原酸复合物对 DPPH 自由基清除能力的测定结果如图 6。结果显示, 在 0.1~0.8 mg/mL 浓度范围内, 莲藕多糖-绿原酸复合物对 DPPH 自由基清除率表现出浓度依赖性; 前期研究显示, 莲藕多糖对 DPPH 自由基清除活性较弱, IC_{50} 值为 1.65 mg/mL ^[10], 而此复合物的 IC_{50} 值为 0.96 mg/mL 。这一结论表明, 与多酚结合后的莲藕多糖抗氧化活性增强, 对 DPPH 自由基表现出一定的清除能力, 这可能与活性羟基的增加有关。Alejandra 等^[21]的研究证实了此结论, 多酚化合物与可溶性膳食纤维结合后, 可以保留部分抗氧化活性。

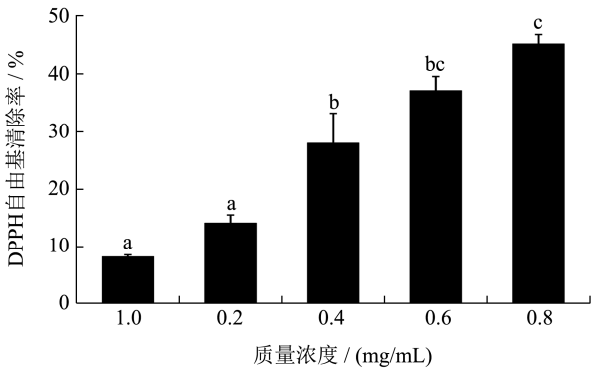


图6 复合物 DPPH 自由基清除率测定结果

Fig.6 Determination results of DPPH free radical scavenging

rate of the complex

2.6 莲藕多糖-绿原酸复合物的巨噬细胞刺激性

莲藕多糖能刺激体外培养的 RAW264.7 巨噬细胞分泌 NO, 广泛参与包括免疫应答在内的机体多系统的生理和病理过程^[4,22]。莲藕多糖-绿原酸复合物诱导 RAW264.7 产生 NO 的结果如图 7 所示, 与空白组 (3.88 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 复合物具有显著刺激 RAW264.7 巨噬细胞产生 NO 的能力, 且在一定的范围内呈现浓度依赖趋势, 随着复合物浓度增大, 细胞产生的 NO 含量也逐渐升高, 当浓度达到 400 mg/mL 时, NO 含量最高为 15.83 $\mu\text{mol/L}$ 。

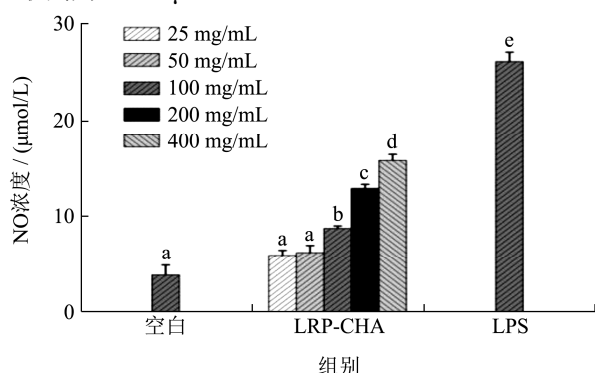


图7 莲藕多糖-绿原酸复合物诱导 RAW264.7 产生 NO 测定结果

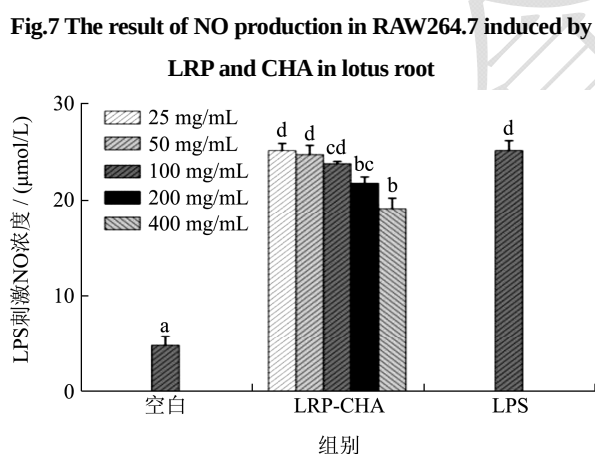


图8 莲藕多糖-绿原酸复合物抑制 LPS 诱导 RAW264.7 产生 NO 测定结果

Fig.8 The result of NO production in RAW264.7 induced by LPS was inhibited by LRP and CHA in lotus root

莲藕多糖-绿原酸复合物抑制 LPS 诱导 RAW264.7 产生 NO 的结果如图 8 所示, 与 LPS 阳性对照组 (25.13 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 复合物明显抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO, 减弱了由脂多糖引起的炎症的发展, 且在一定范围内, 呈现出浓度依赖性, 随着复合物浓度增大, 抑制能力越强, 当浓度为 400 mg/mL 时, NO 含量降低到 19.09 $\mu\text{mol/L}$, 抑制效果最好。结

果表明, 莲藕多糖-绿原酸复合物可双向调节 NO 的产生, 即同时具有免疫激活和免疫抑制的能力。这一结论与 Sun 等^[23]一致, 研究阐明了玉屏风多糖发酵前后在巨噬细胞增殖和细胞因子表达方面的双重免疫调节作用。

3 结论

莲藕多糖-绿原酸复合物制备的最佳工艺条件为: 温度 0 $^{\circ}\text{C}$, pH 值 5.5, 多酚与多糖质量比 4:1, 在此工艺条件下, 莲藕多糖与绿原酸的结合率为 2174.01 mg/g, 该复合物的平均分子量为 162.1 ku。复合物的紫外和红外光谱特征证实了莲藕多糖和绿原酸间存在非共价相互作用。探究莲藕多糖-绿原酸复合物的稳定性, 发现低温有利于维持复合物的稳定, 且消化稳定性较好, 经过口胃肠体外模拟消化后的解离率均低于 25%。该复合物具有一定的 DPPH 自由基清除能力, 在一定的浓度范围内呈现浓度依赖趋势。该复合物可双向调节 RAW264.7 细胞产生 NO, 即同时具有免疫激活和免疫抑制的能力。本研究可以为莲藕多糖的功能特性增强和绿原酸的稳态化利用提供一定的理论支持, 但影响多糖-多酚复合物生物活性和生物利用度的内在和外在因素, 以及其构效关系有待进一步研究。

参考文献

- [1] Bindon K A, Kassara S, Solomon M, et al. Commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains significantly impact shiraz tannin and polysaccharide composition with implications for wine colour and astringency [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(9): 466.
- [2] Hayashi N, Ujihara T, Kohata K. Reduction of catechin astringency by the complexation of gallate-type catechins with pectin [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(7): 1306-1310.
- [3] Wu Z, Ming J, Gao R, et al. Characterization and antioxidant activity of the complex of tea polyphenols and oat beta-glucan [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(19): 10737-10746.
- [4] Yi Y, Lamikanra O, Sun J, et al. Activity diversity structure-activity relationship of polysaccharides from lotus root varieties [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 190: 67-76.
- [5] Naveed M, Hejazi V, Abbas M, et al. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research [J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2018, 97: 67-74.
- [6] Liu X, Le Bourvellec C, Renard C. Interactions between cell wall polysaccharides and polyphenols: effect of molecular

- internal structure [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(6): 3574-617.
- [7] Brahem M, Renard C, Bureau S, et al. Pear ripeness and tissue type impact procyanidin-cell wall interactions [J]. Food Chemistry, 2019, 275: 754-762.
- [8] Mamet T, Ge Z Z, Zhang Y, et al. Interactions between highly galloylated persimmon tannins and pectins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 410-417.
- [9] Zhang D, Zhu J, Ye F, et al. Non-covalent interaction between ferulic acid and arabinan-rich pectic polysaccharide from rapeseed meal [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103: 307-315.
- [10] Yi Y, Huang X Y, Zhong Z T, et al. Structural and biological properties of polysaccharides from lotus root [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 454-461.
- [11] Li S, Li J, Zhu Z, et al. Soluble dietary fiber and polyphenol complex in lotus root: Preparation, interaction and identification [J]. Food Chemistry, 2020, 314: 126219.
- [12] 黄晓芸.干制方式对龙眼果肉多糖理化及功能特性的影响 [D].武汉:武汉轻工大学,2019.
- [13] Yi Y, Han M M, Huang F, et al. Effects of a lysine-involved Maillard reaction on the structure and *in vitro* activities of polysaccharides from longan pulp [J]. Molecules, 2019, 24(5): 972.
- [14] Xiong S L, Li A, Huang N, et al. Antioxidant and immunoregulatory activity of different polysaccharide fractions from tuber of *Ophiopogon japonicus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(3): 1273-1280.
- [15] Han M M, Yi Y, Wang H X, et al. Investigation of the Maillard reaction between polysaccharides and proteins from longan pulp and the improvement in activities [J]. Molecules, 2017, 22(6): 938.
- [16] Le Bourvellec C, Guyot S, Renard C M. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1672(3): 192-202.
- [17] Jakobek L, Matic P. Non-covalent dietary fiber-polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 83: 235-247.
- [18] 金花,江连洲,冯海莹,等.绿原酸共价和非共价作用对黑豆蛋白纳米乳稳定性和抗氧化性的影响[J].食品科学,2022, 43(4):17-24.
- [19] Le Bourvellec C, Guyot S, Renard C M G C. Interactions between apple (*Malus x domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(2): 251-261.
- [20] Huang F, Liu H, Zhang R, et al. Physicochemical properties and prebiotic activities of polysaccharides from longan pulp based on different extraction techniques [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 206: 344-351.
- [21] Bermudez-oria A, Rodriguez-gutierrez G, Fernandez-prior A, et al. Strawberry dietary fiber functionalized with phenolic antioxidants from olives. Interactions between polysaccharides and phenolic compounds [J]. Food Chemistry, 2019, 280: 310-320.
- [22] Hu W, Jiang Y, Xue Q, et al. Structural characterisation and immunomodulatory activity of a polysaccharide isolated from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) root residues [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 60: 103457.
- [23] Sun H, Ni X, Zeng D, et al. Bidirectional immunomodulating activity of fermented polysaccharides from Yupingfeng [J]. Research in Veterinary Science, 2017, 110: 22-28.