

莲藕多糖和阿魏酸的非共价相互作用及其复合物特性

刘秋兰¹, 邹晓琴¹, 易阳^{1,2*}, 王宏勋³, 孙莹^{1,2}

¹ 武汉轻工大学食品科学与工程学院 武汉 430023

² 武汉轻工大学农产品加工与转化湖北省重点实验室 武汉 430023

³ 武汉轻工大学生命科学与技术学院 武汉 430023

摘要 研究莲藕多糖与阿魏酸的非共价相互作用,及其复合物的理化和功能特性。以阿魏酸的结合量为指标,结合单因素实验和响应面试验优化复合物的制备条件。结果表明,在温度 0℃、pH 7 及多糖-阿魏酸质量比 1:2 的条件下,低速搅拌 30 min,多糖的阿魏酸结合量达 110.22 mg/g,其平均分子质量由 191.8 ku 增至 297.4 ku。考虑各因素对阿魏酸结合量的影响,结合复合物的光谱分析发现,莲藕多糖与阿魏酸的非共价作用以氢键为主。低温有利于维持复合物的稳定,而复合物经口腔、胃或小肠模拟消化后的阿魏酸解离率均低于 25%。相比莲藕多糖,复合物具有更强的 DPPH 自由基清除活性($P < 0.05$),而二者的巨噬细胞 NO 生成刺激能力无显著差异($P > 0.05$)。研究结果为改善莲藕多糖的功能活性和阿魏酸的生物利用率提供思路。

关键词 莲藕多糖;阿魏酸;非共价复合物;稳定性;活性

文章编号 1009-7848(2023)07-0026-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.004

多糖和多酚是植物中广泛共存的活性成分,二者可以通过共价和非共价方式结合。当多糖和多酚进行物理混合时,氢键、疏水相互作用、静电作用等非共价力促成其自发形成可逆或不可逆的复合物;而共价相互作用诱导的复合物主要涉及酶氧化、碳二亚胺交联、自由基诱导等机制^[1-2]。植物性食品加工过程中,随着组织结构的破坏,多糖和多酚可能因混合发生自发的非共价结合,进而影响食品的感官品质、营养特性及功能活性^[3]。因此,探究二者的非共价相互作用以及复合物的理化与营养特性,对于调控食品品质和指导食品良性加工具有重要意义。

多糖和多酚是莲藕中的主要功能因子,具有降血糖、抗氧化、抗肿瘤、抑菌、免疫调节等多种活性^[4-6]。近年来,莲藕多糖(Lotus root polysaccharide, LRP)的研究主要集中在提取、分离、纯化、结构/组成分析以及活性评价等方面^[7-9],关于其改性

和组分相互作用的研究较少。阿魏酸(Ferulic acid, FA)是一种植物中含量较为丰富的酚酸类物质,因具有较好的抗氧化、降血糖、抗炎等活性而被广泛用于食品、医药、化妆品等领域^[10-11],然而其较差的水溶性和稳定性在一定程度上限制了应用^[12]。据文献报道,莲藕中 LRP 提取量可达 58.8 mg/g^[12],而 FA 提取量达 0.217 mg/g^[13]。在水溶液混合体系中,LRP 与 FA 能通过非共价力自发结合,而 FA 的结合量(29.28 mg/g LRP)较低^[14]。能否通过物理混合条件优化,提升 FA 的结合量,实现 LRP 的功能特性增强和 FA 的稳态化利用,有待于进一步探究。

多糖和多酚之间的非共价结合通常取决于外在环境因子和内在理化性质,而环境影响因素主要包括混合体系的 pH 值、温度、离子强度和底物浓度等^[15]。本研究采用热水浸提和二次醇沉分离 LRP,通过平衡透析法制备 LRP-FA 复合物。为提高复合物中 FA 的结合量,设计单因素实验和响应面试验优化其制备工艺参数。采用光谱法和色谱法等分析复合物的理化特性,以 FA 解离率评价复合物的热稳定性和消化稳定性,并考察其抗氧化能力和巨噬细胞刺激活性。基于 LRP-FA 复合物的制备和特性评价,旨在为莲藕功能因子的开发利用提供参考。

收稿日期: 2022-07-24

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2022BBA0023);武汉市知识创新专项基础研究项目(2022020801010389);湖北省青年拔尖人才培养计划项目

第一作者: 刘秋兰,女,硕士生

通信作者: 易阳 E-mail: yiy86@whpu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜莲藕(鄂莲 5 号),武汉市金水祺良农副产品有限公司。将新鲜莲藕洗净,去皮切片,于 65 °C 热风烘干至恒重,然后采用多功能粉碎机磨粉备用。

阿魏酸(FA,纯度≥95%),阿拉丁试剂公司;Folin-Phenol 试剂,北京瑞达恒辉科技发展有限公司;小鼠腹腔巨噬细胞 Raw264.7,武汉普诺赛生命科技有限公司;高糖完全培养基(Dulbecco's modified eagle medium,DMEM),美国 Hyclone 公司;磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered saline,PBS,pH 7.4),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(Lipopolysaccharide,LPS),北京博奥拓达科技有限公司;格里斯试剂,武汉基因美科技有限公司;48 孔和 96 孔的细胞培养板,美国 Corning 公司;唾液消化液、胃液消化液、肠液消化液,北京雷根生物技术有限公司;1,1-二苯-2-苦基肼(DPPH),北京瑞达恒辉科技发展有限公司;透析袋(截留分子量 500 u),上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

A360 型紫外可见分光光度计,翱艺仪器(上海)有限公司;SCIENTZ-12N/A 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;SUNRISE 酶标定量测定仪,西化仪(北京)科技有限公司;Thermo Scientific Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪,美国尼高力仪器有限公司;DAWN HELEOS-II 多角度激光光散射/凝胶色谱仪并配备 Optilab T-rEX 示差折光仪,美国 Wyatt 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 LRP 的提取及组成分析 参考 Yi 等^[16]的方法提取 LRP,方法稍有改动。称取一定量的藕粉与蒸馏水(固液比为 1:10)混合均匀后,超声处理 10 min。将混合液置于 90 °C 热水浴中浸提 2 h。浸提结束后以 4 500 r/min 转速离心 10 min,分离上清液。向上清液中加入无水乙醇至体积分数为 30%,于 4 °C 静置 3 h 以沉淀淀粉,并通过碘液检验确定淀粉完全除去。将上清液于 4 500 r/min 离心 10 min,弃沉淀。继续向上清液中加入无水乙醇至体积分数为 75%,继续静置过夜以沉淀多糖。于

4 500 r/min 转速离心 10 min,保留沉淀。向沉淀物中加少量体积的水复溶,45 °C 真空浓缩以除去残留乙醇,对剩余物进行真空冷冻干燥,收集得到干燥粉末即为 LRP。分别采用苯酚-硫酸法^[17]和 DNS 法^[18]测定 LRP 的总糖含量和还原糖含量,得到其差值即为多糖含量(50.66%)。

1.3.2 LRP-FA 复合物制备的单因素实验 LRP-FA 复合物制备参考 Li 等^[19]的方法,稍有改动。将配制好的 FA 水溶液(1 mg/mL)和 LRP 水溶液(2 mg/mL)按一定比例混合,调节 pH 和离子浓度后恒温搅拌 30 min。搅拌结束后,取 10 mL 混合液转移至透析袋中,于 190 mL 蒸馏水(总体积为 200 mL)中透析 4 h。取透析袋外液,采用 Folin-Ciocalteu 法^[19]测定 FA 浓度,即可计算透析体系中的游离 FA 质量,并以此换算混合体系中总游离 FA 质量。相对于 LRP 的 FA 结合量 C (mg/g)按公式(1)计算:

$$C(\text{mg/g}) = \frac{m_1 - m_2}{M} \quad (1)$$

式中, m_1 ——混合体系中添加的 FA 质量(mg); m_2 ——混合体系中游离的 FA 质量(mg); M ——混合体系中添加的 LRP 质量(g)。

1) 反应温度 不添加 NaCl 且不调节 pH,以 LRP-FA 质量比为 4:1,考察温度(0,15,30,45,60 °C)对 FA 结合量的影响。

2) pH 值 不添加 NaCl,以 LRP-FA 质量比为 4:1,在 30 °C 下考察 pH 值(3,4,5,6,7)对 FA 结合量的影响。

3) LRP-FA 质量比 不添加 NaCl 且不调节 pH,在温度 30 °C 下考察 LRP-FA 质量比(8:1,4:1,2:1,1:1,1:2)对 FA 结合量的影响。

4) 离子浓度 不调节 pH,在温度 30 °C 和 LRP-FA 质量比 4:1 的条件下,考察 NaCl 浓度(0,25,50,100,200 mmol/L)对 FA 结合量的影响。

1.3.3 LRP-FA 复合物制备的响应面试验 在单因素实验结果的基础之上,采用 Box-Behnken 试验设计,选定温度(A)、pH(B)、LRP-FA 质量比($Y, X_1/X_2$)3 个因素进行响应面试验设计,因素和水平编码见表 1。

1.3.4 LRP-FA 复合物的制备及理化特征分析

1) LRP-FA 复合物的制备 根据响应面试

表1 响应面试验因素和水平
Table 1 Response surface experimental factors and levels

水平	因素		Y(LRP-FA 质量比)
	A(温度/℃)	B(pH)	
-1	0	5	1:1
0	15	6	2:1
1	30	7	4:1

验结果,在温度 0℃,pH 7 和 LRP-FA 质量比为 2:1 的条件下混合 30 min,随后将混合液转移至透析袋(500 u)内。透析袋置于含有大量蒸馏水的烧杯中搅拌透析,每隔 4 h 更换透析外液,持续约 48 h,直至透析外液在波长 280 nm 处的吸光度为 0 时终止。对透析袋内液进行真空冷冻干燥,收集干燥粉末即为 LRP-FA 复合物。根据 FA 结合量,将 LRP 和 FA 的粉末直接进行物理混合,得到 LRP&FA 混合物作为对照。

2) 紫外光谱扫描 配制 1 mg/mL 的 LRP、FA、LRP-FA 复合物以及 LRP&FA 混合物的水溶液,稀释 20 倍,以蒸馏水建立基线,在波长 190~400 nm 范围内扫描。

3) 傅里叶红外光谱 (Fourier transform infrared spectrometer, FTIR) 扫描 取 1 mg 样品与 200 mg KBr 粉末在研钵中混匀研磨,置于模具中,在油压机上压成透明薄片,将样品放入红外光谱仪中测试,波数范围 4 000~400 cm⁻¹,扫描次数 32,分辨率 4 cm⁻¹[20]。

4) 分子质量分布分析 采用体积排阻色谱-示差检测-多角度激光光散射联用系统 (High performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detection, HPSEC-MALLS-RI) 测定样品的分子质量分布[21]。精确称取 10 mg 样品,加入 1 mL 0.2 mol/L 醋酸钠溶液溶解后,于 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液检测。色谱条件为:色谱柱 Agilent PL aquagel-OH 凝胶色谱柱 (300 mm × 7.8 mm, 8 μm); 流动相 0.2 mol/L 醋酸钠;流速 0.7 mL/min;进样量 20 μL;柱温 30℃。

1.3.5 LRP-FA 复合物的稳定性评价

1) 热稳定性评价 取 10 mL 的 LRP-FA 复

合物水溶液 (2 mg/mL) 于透析袋 (500 u) 中,浸没于装有 190 mL 蒸馏水的烧杯中,将烧杯置于不同温度 (0, 25, 37, 100℃) 水浴中搅拌透析 4 h。测定透析袋外液中 FA 浓度,并按 200 mL 总体积计算游离 FA 质量。FA 解离率按游离 FA 质量占 20 mg 复合物中总 FA 质量的百分比计算。

2) 消化稳定性评价 取 10 mL 唾液消化液、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,置于 37℃ 恒温摇床 (转速 150 r/min) 中分别消解 10 min, 2 h 和 1.5 h 后,将混合液转入透析袋 (500 u) 中,浸没于 190 mL 蒸馏水,在冰水浴中透析,4 h 后测定透析外液中 FA 浓度,并按 200 mL 总体积计算游离 FA 质量。FA 解离率按游离 FA 质量占 20 mg 复合物中总 FA 质量的百分比计算。

1.3.6 LRP-FA 复合物的 DPPH 自由基清除能力测定 分别取不同浓度的样品溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中,并加入 4.0 mL DPPH 溶液 (0.2 mmol/L),混匀后于室温避光反应 30 min,以乙醇为空白,于波长 517 nm 处测定吸光值,试验重复 3 次,结果取“平均值±标准差”。DPPH 自由基清除率 $S(\%)$ 按公式 (2) 计算:

$$S(\%) = \frac{A_0 - (A_s - A_c)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中, A_0 ——1.0 mL 蒸馏水与 4.0 mL DPPH 溶液混合后,于波长 517 nm 处的吸光值; A_s ——1.0 mL 样液与 4.0 mL DPPH 溶液混合后,于波长 517 nm 处的吸光值; A_c ——1.0 mL 样液与 4.0 mL 乙醇混合后,于波长 517 nm 处的吸光值。

1.3.7 LRP-FA 复合物的巨噬细胞刺激活性评价 参考 Yi 等[22]的方法,通过 NO 生成量评价 LRP-FA 复合物的巨噬细胞刺激活性,方法略有改动。

1) NO 标准曲线测定 用去离子水配制 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 mmol/L 的亚硝酸钠溶液,各取 100 μL 置于 96 孔板中,每孔再加入 100 μL 格里斯试剂。以不加亚硝酸钠的孔为空白,每组包括 3 个平行孔,混匀后静置 10 min。采用酶标仪于波长 540 nm 处进行检测,以吸光值 (Y) 和亚硝酸钠浓度 (X, mmol/L) 建立标准曲线方程 $y = 20.528x + 0.0503 (R^2 = 0.999)$ 。

2) 正常 RAW264.7 细胞的 NO 分泌测定 将 RAW264.7 细胞稀释至浓度为 2×10^5 cells/mL, 向 48 孔板中每孔加入 500 μ L 细胞悬液, 于 37 $^{\circ}$ C 的 5%CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 弃去培养液, 并用 PBS 润洗。然后将每孔加入含 200 μ g/mL LRP-FA、200 μ g/mL LRP 或 500 ng/mL LPS 的无胎牛血清培养基 500 μ L, 以不加细胞的孔为空白, 以仅含有细胞悬液的孔为对照组, 每组包括 5 个平行孔。48 孔板培养 24 h 后取 100 μ L 上清液测定 NO 生成量 (mmol/L), 继续培养 24 h 后再次测定。

3) LPS 诱导 RAW264.7 细胞的 NO 分泌测定

RAW264.7 细胞按上述方法培养贴壁后, 每孔加入含 500 ng/mL LPS 和 200 μ g/mL LRP-FA (或 LRP) 的无胎牛血清培养基 500 μ L, 并设计无刺激物的空白对照组和 LPS 对照组 (500 ng/mL), 每组包括 5 个平行孔。48 孔板培养 24 h 和 48 h 后, 分别取 100 μ L 上清液测定 NO 生成量 (mmol/L)。

1.4 数据处理

试验数据均以“平均值 \pm 标准偏差”表示 ($n=3$ 或 $n=5$)。组间数据在 0.05 水平的显著性差异通过 SPSS 19.0 软件采用 Duncan (D) 进行分析。采用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面分析。

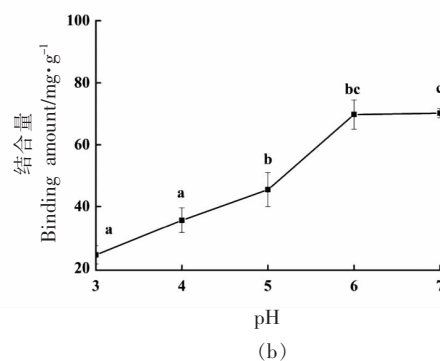
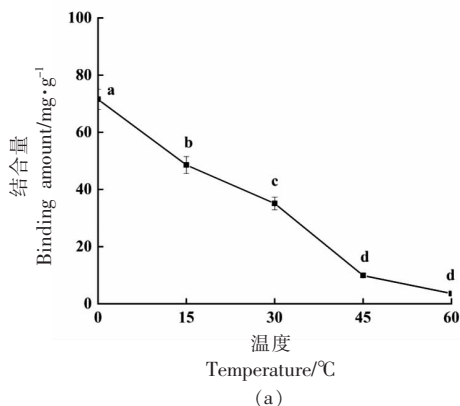
2 结果与分析

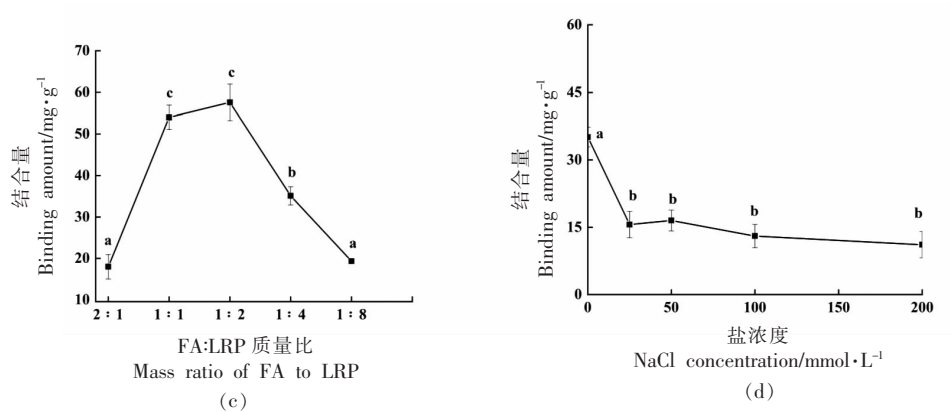
2.1 LRP-FA 复合物制备的单因素分析

研究温度、pH、质量比以及盐浓度对 LRP 和 FA 结合量的影响, 结果如图 1 所示。由于氢键的形成是一个放热过程, 温度升高导致结合率降低可能是因为高温会削弱氢键作用^[23-24]。在 0~60 $^{\circ}$ C

范围内, FA 结合量随温度的升高而逐渐降低 ($P < 0.05$), 当温度达到 60 $^{\circ}$ C 后, FA 结合量低至 3.60 mg/g, 由此说明氢键可能参与 LRP 和 FA 之间的相互作用。另外, 当温度升高, 苯环之间的疏水相互作用有利于 FA 聚合体的形成^[25], 可能阻碍 FA 与 LRP 之间的非共价结合。pH 的变化会导致 LRP 与 FA 分子表面的电位改变, 从而影响二者之间的静电相互作用^[26]。FA 结合量随 pH 值 (3~7) 的升高而逐渐增加 ($P < 0.05$), 其原因可能是随着 pH 值的增大, 静电斥力减少, 静电相互作用增强, 有利于 LRP 与 FA 结合。pH 值为 6 和 7 时的 FA 结合量无显著差异 ($P > 0.05$), 在中性条件下的结合量达到 70.184 mg/g。由此猜测, 静电相互作用可能参与到 LRP 与 FA 的结合, 过酸不利于氢键的形成。

此外, 多糖与多酚的混合比例也是影响两者相互作用的重要因素^[27]。在 FA 与 LRP 质量比为 1:2~1:8 范围内, 随着 FA 含量降低, 单位质量 LRP 结合的 FA 质量少 ($P < 0.05$); 当 FA 与 LRP 质量比为 2:1~1:2 时, 可能因 FA 聚合体的生成^[25], 导致 FA 与 LRP 的结合量升高。在添加少量 NaCl (25 mmol/L) 后, FA 结合量发生显著下降 ($P < 0.05$), 且随着 NaCl 浓度的升高始终维持较低结合量 (~15 mg/g)。盐溶液中 FA 结合量的减少, 可能归因于 LRP 与 FA 之间氢键作用减弱^[25], 以及溶解度的降低^[28]。为了获得相对高的 FA 结合量, 混合体系中不添加 NaCl, 在温度 0~30 $^{\circ}$ C (0 $^{\circ}$ C 以下无法进行透析)、pH 5~7 以及 LRP-FA 质量比 1:1~1:4 的水平范围内进行响应面试验, 优化复合物制备条件。





注:不同小写英文字母表示具有显著性差异, $P<0.05$ 。

图1 温度、pH、质量比和盐浓度对LRP的FA结合量的影响

Fig.1 Effect of temperature, pH, mass ratio and salt concentration on the binding rate of ferulic acid to lotus root polysaccharide

2.2 响应面试验结果与回归分析

在单因素实验基础上,选择温度、pH和LRP-FA质量比为变量,以FA结合量为响应值,设计三

因素三水平的响应面试验,设计与结果如表2所示。

表2 响应面试验设计与结果

Table 2 Response surface experimental design and results

试验编码	温度(A/°C)	pH值(B)	LRP-FA质量比(C/X ₁ :X ₂)	结合量(D/mg·g ⁻¹)	试验编码	温度(A/°C)	pH值(B)	LRP-FA质量比(C/X ₁ :X ₂)	结合量(D/mg·g ⁻¹)
1	0	5	2:1	100.72 ± 4.45	10	15	5	1:1	48.98 ± 1.45
2	30	6	4:1	33.38 ± 1.45	11	15	6	2:1	88.52 ± 1.14
3	15	6	2:1	88.59 ± 3.82	12	15	5	4:1	51.92 ± 1.85
4	15	7	1:1	92.97 ± 1.18	13	15	6	2:1	83.59 ± 1.45
5	30	7	2:1	64.73 ± 1.59	14	0	7	2:1	106.07 ± 3.18
6	15	6	2:1	80.69 ± 3.43	15	0	6	4:1	95.01 ± 1.34
7	30	5	2:1	29.84 ± 1.91	16	0	6	1:1	100.86 ± 6.54
8	30	6	1:1	52.13 ± 0.64	17	15	7	4:1	55.73 ± 3.88
9	15	6	2:1	80.77 ± 2.19					

通过回归数据处理得到拟合函数模型:

$$D = 84.43 - 27.83A + 11.00B - 7.36C + 7.38AB - 3.22AC - 10.05BC - 0.57A^2 - 8.52B^2 - 13.51C^2$$

通过方差分析(表3)发现,该模型极显著($P<0.0001$),且失拟项不显著,表明该模型能够拟合响应值的变化,可以用来对LRP-FA复合物制备工艺进行分析和预测。温度、pH和质量比对FA结合量有显著影响($P<0.001$),且温度与pH之间以及pH与质量比之间存在相互影响。同时,由F值推断,影响LRP的FA结合量的次序为:温度>

pH>质量比。

通过回归模型预测最大FA结合量的复合物制备条件为:温度0℃,pH7,LRP-FA质量比1:2,在此条件下的FA结合量理论值为106.79 mg/g,3次验证试验的实测值为110.22 mg/g,模型预测偏差为3.11%。

2.3 LRP-FA复合物的理化特征

2.3.1 紫外光谱特性 多酚的紫外吸收峰主要存在于波长240~380 nm范围内,而大多数多糖在此范围内没有吸收峰。据研究报道,多酚通过非共价

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	9 402.16	9	1 044.68	89.85	< 0.0001
A(温度)	6 193.87	1	6 193.87	532.69	< 0.0001
B(pH 值)	968.81	1	968.81	83.32	< 0.0001
C(质量比)	433.68	1	433.68	37.30	0.0005
AB	217.97	1	217.97	18.75	0.0034
AC	41.60	1	41.60	3.58	0.1005
BC	403.75	1	403.75	34.72	0.0006
A ²	1.39	1	1.39	0.12	0.7396
B ²	305.66	1	305.66	26.29	0.0014
C ²	768.97	1	768.97	66.13	< 0.0001
残差	81.39	7	11.63		
失拟项	19.30	3	6.43	0.41	0.7525
纯误差	62.10	4	15.52		
总和	9 483.55	16			

作用与多糖结合后,其特征峰在复合物紫外光谱中消失或减弱^[19]。如图 2 所示,LRP 仅在波长 190~220 nm 范围内具有较强的吸收,与其不饱和羰基和羧基有关^[25];FA 的特征吸收峰出现在波长 312 nm ($\pi-\pi^*$ 双键的跃迁)、288 nm ($\pi-\pi^*$ 酚基的跃迁)和 218 nm ($\pi-\pi^*$ 苯环的跃迁)^[26],且 3 个特征峰也出现在 LRP&FA 混合物的光谱图中。相比于混合物,LRP-FA 复合物中 FA 的特征峰消失,证实了 LRP 与 FA 的相互作用。

2.3.2 FTIR 特征 如图 3 显示,LRP 具有多糖的典型特征峰^[29],包括 3 394 cm^{-1} 处的-OH 伸缩振

动吸收峰,2 933 cm^{-1} 处的 C-H 伸缩振动吸收峰和 1 411 cm^{-1} 处的-CH₂ 变形吸收峰。LRP&FA 混合物的 FTIR 图中,1 517 cm^{-1} 处出现的强吸收峰归属为 C=C 的伸缩振动,1 276 cm^{-1} 和 1 029 cm^{-1} 处出现的峰为 C-O-C 振动吸收,1 122 cm^{-1} 附近的峰属于酚羟基的弯曲-伸缩振动^[30],617 cm^{-1} 处的峰归属于芳香族化合物平面弯曲的 C-H 键^[20]。LRP-FA 复合物与 LRP&FA 混合物的差异表现在以上峰消失或偏移,推测 LRP 与 FA 的相互作用导致了官能团的改变。

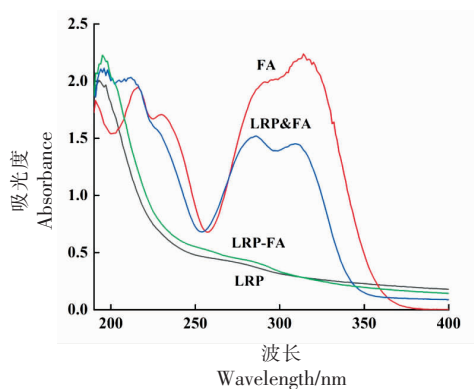


图 2 LRP、FA 及其复合物和混合物的紫外光谱图
Fig.2 UV spectra of lotus root polysaccharide, ferulic acid and their complexes and mixtures

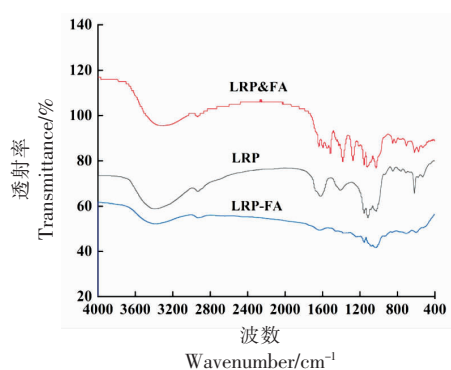


图 3 LRP 以及 LRP-FA 复合物和混合物的 FTIR 光谱图
Fig.3 FTIR spectra of lotus root polysaccharide, LRP-FA complexes and mixtures

2.3.3 分子质量分布分析 采用 HPSEC-MALLS-RI 测定 LRP 和 LRP-FA 复合物的分子质量分布, 各组分的保留时间范围和分子质量如表 4 所示。LRP 由 6 个级分组成, 其中最高分子质量达 1 704 ku(占 7.3%), 而分子质量数量级为 10^5 , 10^4 , 10^3 的级分相对含量相近。相比之下, LRP-FA 复合物中分子质量高于 100 ku 级分的相对含量增加

19.5%, 而低于 10 ku 级分消失。FA 的结合将 LRP 的平均分子质量由 191.8 ku 增加至 297.4 ku, 这一现象与 Li 等^[19]研究结果一致, 证实了 LRP 与 FA 之间的相互作用。LRP-FA 复合物未检出分子质量低于 10 ku 级分, 说明无游离 FA 存在, 因此复合物在冷冻干燥过程和色谱流动相 (0.2 mol/L 醋酸钠溶液) 中均具有较好的稳定性。

表 4 LRP 及 LRP-FA 复合物的分子质量分布

Table 4 The molecular weight distribution of lotus root polysaccharide, and ferulic acid complexes

样品名称	保留时间/min	分子质量/ku	相对含量/%
LRP	7.146~8.956	$1.704 \times 10^6 (\pm 0.791\%)$	7.3
	8.956~11.430	$1.896 \times 10^5 (\pm 0.843\%)$	31.4
	11.430~12.214	$3.066 \times 10^4 (\pm 2.883\%)$	8.6
	12.214~13.994	$1.291 \times 10^4 (\pm 3.988\%)$	22.7
	13.994~14.748	$6.419 \times 10^3 (\pm 3.176\%)$	11.8
	14.778~17.131	$8.550 \times 10^3 (\pm 2.953\%)$	18.3
LRP-FA	7.358~8.926	$1.632 \times 10^6 (\pm 0.829\%)$	11.8
	8.926~11.430	$1.954 \times 10^5 (\pm 0.803\%)$	46.4
	11.430~12.365	$3.070 \times 10^4 (\pm 2.398\%)$	15.3
	12.365~13.994	$3.322 \times 10^4 (\pm 3.320\%)$	12.8
	13.994~16.377	$3.173 \times 10^4 (\pm 2.271\%)$	10.5
	17.131~21.264	$5.829 \times 10^4 (\pm 3.441\%)$	3.3

2.4 LRP-FA 复合物的稳定性

考虑到 LRP-FA 复合物的应用, 贮藏、加工及消化过程中的稳定性都是重要的考量因素, 故而分析其在冷藏低温 (0 °C)、贮藏室温 (25 °C)、消化体温 (37 °C) 和加工高温 (100 °C) 下的 FA 解离率, 结果如图 4 所示。0 °C 低温有利于维持复合物的稳定, FA 解离率仅 1.03%。随着温度的逐渐升高, FA

解离率显著提高 ($P < 0.05$), 且在 100 °C 高温条件下的解离率达 89.33%。绿茶饮料中的单宁类化合物在经胃和十二指肠模拟消化后, 大幅度降低, 且经过胃肠道消化后其抑菌活性消失^[31]; 而胃肠道消化过程会大大降低葡萄皮提取物中酚类化合物的种类和含量, 并降低其抗氧化和抑菌活性^[32]。由此可见, 酚类物质的消化稳定性对于其生物利用具

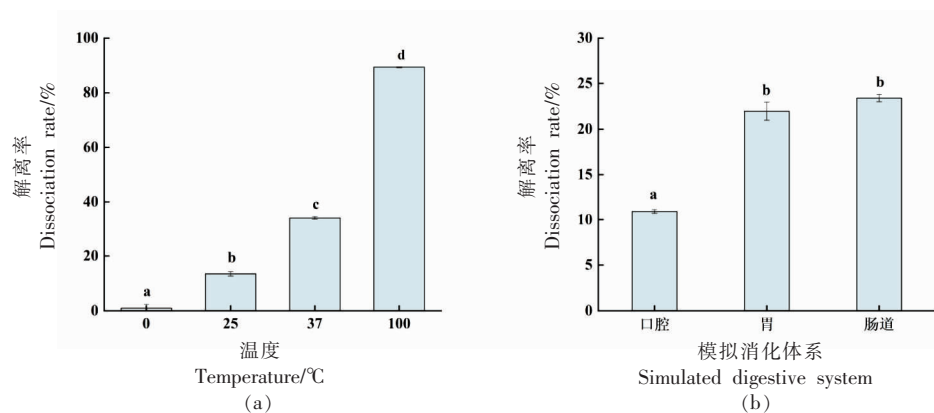


图 4 LRP-FA 复合物的稳定性评价

Fig.4 Stability evaluation of LRP-FA complex

有重要意义。进一步考察 LRP-FA 复合物在消化体系中的稳定性发现,经口腔(10 min)、胃(2 h)和肠道(1.5 h)模拟消化后,FA 发生不同程度的解离。其中,口腔消解程度(10.94%)显著低于胃消解(21.98%)和肠道消解(23.43%)($P < 0.05$)。结果表明,与 LRP 的非共价结合有利于 FA 在上消化道的缓慢释放。

2.5 LRP-FA 复合物的 DPPH 自由基清除活性

此前研究表明,LRP 虽具有一定的 DPPH 自由基清除活性,但其活性较低^[16]。与可溶性膳食纤维结合后,酚类化合物仍保留其抗氧化活性^[33],且复合物的抗氧化活性可能与多酚结合量成正比^[34]。如图 5 所示,在 0.1~0.8 mg/mL 质量浓度范围内,LRP-FA 复合物的 DPPH 自由基清除活性均强于 LRP,这可能与活性羟基增多有关;然而与 LRP&FA 物理混合物相比,LRP-FA 复合物的活性较弱,可能由于活性羟基氢键的形成而减少。

2.6 LRP-FA 复合物的巨噬细胞刺激活性

巨噬细胞是抵御内源性病原体和外源性病原体的第一道防线,也是研究细胞免疫的重要对象^[35]。当巨噬细胞被激活时,会释放大量的 NO,杀死微生物、寄生虫及肿瘤细胞,同时诱发炎症反应以达到保护身体的目的^[36]。在 200 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,LRP-FA 复合物刺激巨噬细胞 NO 分泌量在 24 h 和 48 h 分别为 15.27 $\mu\text{mol/L}$ 和 18.16 $\mu\text{mol/L}$

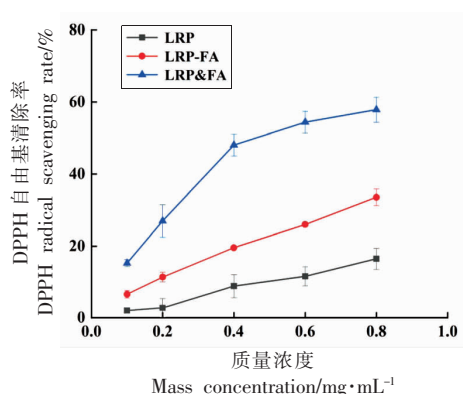
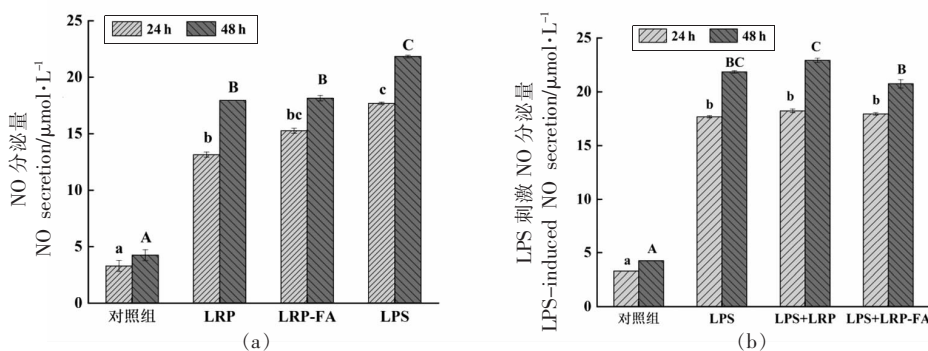


图 5 LRP 以及 LRP-FA 复合物和混合物的 DPPH 自由基清除能力

Fig.5 DPPH radical scavenging activity of lotus root polysaccharide, and LRP-FA complexes and mixtures

(图 6),与 LRP 的刺激作用无显著差异($P > 0.05$),而均显著高于对照组($P < 0.05$)。LRP 和 LRP-FA 复合物能够刺激 Raw264.7 巨噬细胞分泌 NO,而 48 h 后的 NO 浓度均显著低于 LPS 对照组($P < 0.05$)。LPS 刺激巨噬细胞 NO 分泌量在 24 h 和 48 h 分别为 17.69 $\mu\text{mol/L}$ 和 21.84 $\mu\text{mol/L}$ 。LRP 和 LRP-FA 复合物对 LPS 诱导的 NO 分泌均无抑制效果($P > 0.05$),而后者在 48 h 后的 NO 分泌量较低($P < 0.05$)。由此可见,LRP 及 LRP-FA 均可不同程度刺激 RAW264.7 细胞分泌 NO,且不会加剧炎症反应。



注:不同小写字母表示在 24 h 条件下具有显著性差异, $P < 0.05$;不同大写字母表示在 48 h 条件下具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

图 6 LRP-FA 复合物对巨噬细胞 NO 分泌的影响

Fig.6 The effect of LRP-FA complex on the NO secretion of macrophages

3 结论

LRP 能与 FA 通过非共价相互作用形成复合物,而物理混合的温度、pH、LRP-FA 质量比和离

子浓度对 FA 结合量都有显著影响。以 FA 结合量为指标,采用单因素实验和响应面试验优化复合物制备工艺:在温度 0°C , pH 7, LRP-FA 质量比

1:2且离子浓度为0的条件下,FA结合量可达110.22 mg/g。结合LRP-FA复合物的光谱特征和分子质量分布分析,证实了二者的相互作用,且通过温度、pH和离子浓度对FA结合量的影响判断,该作用以氢键为主。

考察不同温度和消化条件对LRP-FA复合物稳定性的影响,结果发现:复合物中FA的解离率与温度呈正相关,适宜于低温下作用;复合物在3种消化液中的FA解离率均低于25%,表现出一定的消化稳定性,可实现消化过程中的FA缓释。相比LRP,LRP-FA复合物具有更强的DPPH自由基清除活性,同时保留良好的巨噬细胞免疫刺激活性。通过多糖和多酚的非共价作用调控,预期能改善莲藕食品的营养特性。然而,影响多糖-多酚复合物生物活性和生物利用度的内源性和外源性因素,以及构效关系,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 张曼,王岸娜,吴立根,等.蛋白质、多糖和多酚间相互作用及研究方法[J].粮食与油脂,2015,28(4):42-46.
ZHANG M, WANG A N, WU L G, et al. The interaction and research methods between protein, polysaccharide and polyphenol[J]. Cereals & Oils, 2015, 28(4): 42-46.
- [2] 魏子溟.乳蛋白-EGCG和壳聚糖-绿原酸复合物的制备、结构表征及功能评价[D].北京:中国农业大学,2015.
WEI Z H. Preparation, structural characterization and functional evaluation of milk protein-EGCG and chitosan-chlorogenic acid complexes [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [3] RENARD C M G C, WATRELOT A A, LE BOURVELLEC C. Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion[J]. Trends in Food Science and Technology, 2017, 60: 43-51.
- [4] YI Y, SUN J, XIE J, et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of lotus root varieties[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2016, 21(7): 863.
- [5] 罗登宏,周桃英,袁仲,等.莲藕多糖的降血糖活性及对体内抗氧化能力的影响[J].安徽农业科学, 2011, 39(6): 3334-3335.
- [6] LUO D H, ZHOU T Y, YUAN Z, et al. Hypoglycemic activity of (*Rhizoma Nelumbinis Nuciferae*) polysaccharide and its effect on *in vivo* antioxidant activity[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(6): 3334-3335.
- [6] 何纤,李俊年,杨冬梅,等.马蹄皮多酚的抗氧化活性及其对HepG-2细胞增殖的抑制[J].华西药学期刊,2021,36(6):628-632.
HE Q, LI J N, YANG D M, et al. Antioxidant activity and inhibitive effect on HepG-2 cells proliferation of polyphenol from water chestnut peel[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 36(6): 628-632.
- [7] YI Y, LAMILANRA O, SUN J, et al. Activity diversity structure-activity relationship of polysaccharides from lotus root varieties[J]. Carbohydrate polymers, 2018, 190: 67-76.
- [8] 刘恩超,黄晓芸,孙杰,等.莲藕多糖的单糖组成分析方法优化[J].食品科技,2018,43(6):292-296.
LIU E C, HUANG X Y, SUN J, et al. Optimization of monosaccharide composition analysis methods of lotus root polysaccharides [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(6): 292-296.
- [9] 孙杰,易阳,王宏勋,等.莲藕多糖的提取工艺优化及理化特性研究[J].食品工业科技,2016,37(12):256-260.
SUN J, YI Y, WANG H X, et al. Optimization of extraction and physicochemical property of polysaccharides from lotus root[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(12): 256-260.
- [10] 李英,吴庆华,杨华林,等.阿魏酸对抗生素应激小鼠血清抗氧化性及其肠道微生物的影响[J].广东农业科学,2021,48(6):116-125.
LI Y, WU Q H, YANG H L, et al. Effects of ferulic acid on serum antioxidant capacity and intestinal microflora in antibiotic stressed mice[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2021, 48(6): 116-125.
- [11] 赵文红,陈晖,谢岩黎.麦麸中阿魏酸糖酯对高糖诱导HepG2细胞氧化应激的影响[J].粮食与油脂,2017,30(8):38-41.
ZHAO W H, CHEN H, XIE Y L. Effects of feruloylated glycosides from wheat bran on the HepG2 cellular oxidative stress induced by high glucose[J]. Cereals & Oils, 2017, 30(8): 38-41.

- [12] PIBER M, KOEHLER P. Identification of dehydroferulic acid-tyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(13): 5276-5284.
- [13] 谢玮, 严守雷, 李春丽, 等. 响应面法优化莲藕中结合态阿魏酸的提取工艺[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 18-22.
- XIE W, YAN S L, LI C L, et al. Optimization of alkaline hydrolysis of lotus root for non-extractable ferulic acid by response surface methodology[J]. Food Science, 2014, 35(10): 18-22.
- [14] YI Y, TANG H, SUN Y, et al. Comprehensive characterization of lotus root polysaccharide-phenol complexes[J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130693.
- [15] BOURVELLEC C L, GUYOT S, RENARD C M G C. 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.
- [16] YI Y, HUANG X, ZHONG Z, et al. Structural and biological properties of polysaccharides from lotus root [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 454-461.
- [17] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 苯酚-硫酸法测定野木瓜中多糖含量的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 276-279.
- WANG W P, GUO S Y, LI L, et al. Assay study on content of polysaccharides in *Stanuntonia chinensis* by phenol-sulfuric acid method[J]. Food Science, 2007, 28(4): 276-279.
- [18] 赵凯, 许鹏举, 谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.
- ZHAO K, XUE P J, GU G Y. Study on determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method [J]. Food Science, 2008, 29(8): 534-536.
- [19] 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.
- [20] BERMÚDEZ-ORIA A, RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ G, FERNÁNDEZ-PRIOR Á, et al. Confirmation by solid-state NMR spectroscopy of a strong complex phenol-dietary fiber with retention of antioxidant activity *in vitro*[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 102: 105584.
- [21] 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.
- HUANG X Y. Effect of drying methods on the physicochemical and functional properties of longan pulp polysaccharides[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2019.
- [22] YI Y, LAMIKANRA O, SUN J, et al. Activity diversity structure-activity relationship of polysaccharides from lotus root varieties[J]. Carbohydr Polym, 2018, 190: 67-76.
- [23] JAKOBEK L, MATIĆ P. Non-covalent dietary fiber - Polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 83: 235-247.
- [24] WU Z, LI H, MING J, et al. Optimization of adsorption of tea polyphenols into oat β -glucan using response surface methodology[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(1): 378-385.
- [25] 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.
- [26] LE BOURVELLEC C, RENARD C M. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1725(1): 1-9.
- [27] 王丽颖, 李福香, 杨雅轩, 等. 多糖与多酚相互作用机制及其对多酚特性的影响研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(11): 276-282.
- WANG L Y, LI F X, YANG Y X, et al. Interaction mechanism between polyphenols and polysaccharides and effect on polyphenolic properties: A review[J]. Food Science, 2017, 38(11): 276-282.
- [28] 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.
- [29] 夏朝红, 戴奇, 房韦, 等. 几种多糖的红外光谱研究[J]. 武汉理工大学学报, 2007(1): 45-47.

- XIA C H, DAI Q, FANG W, et al. Research on the IR spectroscopy of kinds of polysaccharide [J]. Journal of Wuhan University of Technology, 2007 (1): 45–47.
- [30] ZHOU P, FENG R, LUO Z, et al. Synthesis, identification and bioavailability of *Juglans regia* L. polyphenols–*Hohenbuehelia serotina* polysaccharides nanoparticles[J]. Food Chem, 2020, 329: 127158.
- [31] BERMÚDEZ-ORIA A, RODRÍGUEZ-GUTIEÉRREZ G, FERNÁNDEZ-PRIOR Á, et al. Confirmation by solid–state NMR spectroscopy of a strong complex phenol–dietary fiber with retention of antioxidant activity *in vitro* [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 102: 105584.
- [32] MARCHESE A, COPPO E, SOBOLEV A P, et al. Influence of *in vitro* simulated gastroduodenal digestion on the antibacterial activity, metabolic profiling and polyphenols content of green tea (*Camellia sinensis*) [J]. Food Research International, 2014, 63: 182–191.
- [33] CORREÍA R C G, HAMINIUK C W I, BARROS L, et al. Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 36: 410–417.
- [34] YI Y, TANG H, SUN Y, et al. Comprehensive characterization of lotus root polysaccharide–phenol complexes [J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130693.
- [35] LEE H, FESSLER M B, QU P, et al. Macrophage polarization in innate immune responses contributing to pathogenesis of chronic kidney disease [J]. BMC Nephrol, 2020, 21(1): 270.
- [36] GONG W, HAN R, LI H, et al. Agronomic traits and molecular marker identification of wheat – *Aegilops caudata* addition lines [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1743.

Non-covalent Interactions between Lotus Root Polysaccharides and Ferulic Acid and Their Complex Properties

Liu Qiulan¹, Zou Xiaoqin¹, Yi Yang^{1,2*}, Wang Hongxun³, Sun Ying^{1,2}

¹School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023

²Hubei Key Laboratory for Processing and Transformation of Agricultural Products, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023

³School of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023)

Abstract This work aimed to investigate the non-covalent interaction between lotus root polysaccharide (LRP) and ferulic acid (FA), as well as the physicochemical and functional properties of LRP–FA complex. Based on single factor experiment and response surface experiment using the FA binding amount as evaluation index, the preparation conditions of LRP–FA complex were optimized. The results showed that, after 30 min low-speed mixing at temperature 0 °C and pH 7 with the FA–LRP mass ratio of 1:2, the binding amount of FA to LRP was 110.22 mg/g. The interaction increased the average molecular weight of LRP from 191.8 ku to 297.4 ku. According to the effect of experimental factors on the FA binding amount and the spectral analysis of LRP–FA complex, it was found that the non-covalent interaction between LRP and FA mainly depended on hydrogen bonding. Low temperature was beneficial to maintain the stability of LRP–FA complex, and its FA dissociation rate was lower than 25% by the simulated digestion of mouth, stomach and small intestine. The complex had a better DPPH free radical scavenging activity compared with LRP ($P < 0.05$), however, their stimulating abilities on the NO production of macrophages showed no significant difference ($P > 0.05$). The results provide ideas for improving the functional activity of LRP and the bioavailability of FA.

Keywords lotus root polysaccharide; ferulic acid; non-covalent complex; stability; activity