

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250313005

引用格式: 程熠娜, 李雯, 李吉莹, 等. 羧甲基茯苓多糖对酪蛋白 pH 稳定性与生物活性的调控与机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(12): 88-96.

CHENG YN, LI W, LI JY, *et al.* Study on the regulation and mechanism of carboxymethyl pachymaran on pH stability and bioactivity of casein [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(12): 88-96. (in Chinese with English abstract).

羧甲基茯苓多糖对酪蛋白 pH 稳定性与生物活性的 调控与机制研究

程熠娜¹, 李雯¹, 李吉莹¹, 王静祎², 冯利^{1*}

(1. 长江职业学院医药护理学院, 鄂州 436032;

2. 湖北工业大学生命科学与健康工程学院, 武汉 430068)

摘要: **目的** 探究羧甲基茯苓多糖以不同比例与酪蛋白复配时对酪蛋白稳定性、结构与理化性质以及生物活性的影响。**方法** 通过羧甲基衍生化, 提升茯苓多糖的溶解性并表征其结构; 以不同比例将羧甲基茯苓多糖与酪蛋白进行物理共混, 测定复合物在不同 pH 下的浊度、zeta 电位、蛋白质溶解性、相图; 通过激光共聚焦显微镜和旋转流变仪比较不同酪蛋白样品在酸性条件下的聚集特性与理化特性; 通过自由基清除能力与非酶糖基化产物的抑制能力比较不同酪蛋白样品的生物活性。**结果** 本研究所得羧甲基茯苓多糖的分子量为 2.43×10^5 g/mol, 通过取代度(0.84)和红外光谱中的羧甲基特征吸收峰可以确定羧甲基多糖的成功制备。当羧甲基茯苓多糖与酪蛋白共混后, 能够有效提高酪蛋白的 pH 稳定性, 显著影响了酪蛋白在酸性条件下的浊度、提高蛋白质溶解性, 这可能是由于多糖-蛋白质间静电相互作用力影响了复合物分子的表面电荷分布。其中, 当二者以 5:1 (w/w)复合时, 羧甲基茯苓多糖表现出最好的稳定效果。随后的结构与理化性质研究表明, 引入多糖, 特别当二者以 5:1 (w/w)复合时, 复合物具有较低的聚集程度、表观黏度与模量, 表明此时复合物的凝胶网络结构具有更好的结构稳定性。生物活性结果表明, 复合物, 特别以 5:1 (w/w)复合时, 表现出最强的抗氧化活性和非酶糖基化产物的抑制能力。**结论** 本研究所得羧甲基茯苓多糖-酪蛋白复合物在酸性环境下具有更好的结构稳定性与生物活性, 为稳定的酸性乳制品的开发与加工提供理论基础和技术支持。

关键词: 茯苓多糖; 酪蛋白; 聚集程度; 抗糖化活性

Study on the regulation and mechanism of carboxymethyl pachymaran on pH stability and bioactivity of casein

CHENG Yi-Na¹, LI Wen¹, LI Ji-Ying¹, WANG Jing-Yi², FENG Li^{1*}

(1. Department of Medical Nursing, Changjiang Polytechnic, Ezhou 436032, China;

2. School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

收稿日期: 2025-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(32301996)

第一作者: 程熠娜(1992—), 女, 硕士, 主要研究方向为中药加工与安全。E-mail: 437576889@qq.com

*通信作者: 冯利(1981—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为医药职业教育。E-mail: 15640564@qq.com

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of carboxymethyl pachymaran on the stability, structure, physicochemical properties and biological activity of casein at different ratios. **Methods** Pachymaran was derivatized with carboxymethyl groups to enhance its solubility, and its structural features were studied; carboxymethyl pachymaran was mixed with casein in different ratios, and the turbidity, zeta potential, protein solubility, and phase diagram of the complex were evaluated at different pH values; the aggregation degree and physicochemical properties of different casein-based samples were studied under acidic conditions using confocal laser microscopy and rotational rheometer; free radical scavenging ability and non-enzymatic glycation product inhibition ability of different casein-based samples were compared. **Results** The molecular weight of carboxymethyl pachymaran obtained in this study was 2.43×10^5 g/mol. The successful preparation of carboxymethyl pachymaran was determined by the degree of substitution (0.84) and the characteristic absorption peak of carboxymethyl group. When carboxymethyl pachymaran was mixed with casein, it could effectively affect the pH stability and reduce the turbidity of casein under acidic conditions, and its solubility was also enhanced. This might be due to the electrostatic interactions between polysaccharides and proteins affecting the surface charge distribution of the molecules. Among them, the best stabilizing effect was observed when carboxymethyl pachymaran was mixed with casein at 5:1 (w/w). Subsequent studies on the structure and physicochemical properties of the complex showed that with the introduction of polysaccharides, especially when they were mixed at a ratio of 5:1 (w/w), the aggregation degree, apparent viscosity and modulus of the complex were lower, indicating that its gel network structure had better stability. The biological activity results showed that the complex, especially when they were mixed at a ratio of 5:1 (w/w), exhibited the strongest antioxidant activity and non-enzymatic glycation product inhibition ability. **Conclusion** The carboxymethyl pachymaran-casein complex obtained in this study has better structural stability and biological activity in acidic environments, providing a theoretical basis and technical support for the development and processing of stable acidic dairy products.

KEY WORDS: pachymaran; casein; aggregation degree; anti-glycation

0 引言

酸化乳饮料通常指一大类 pH 范围约为 3.4~4.6 的酸性含乳饮料, 具有口感清爽、营养丰富、风味独特等优点。近年来, 由于蛋白质基饮料的健康益处, 其需求激增的同时也使得酸化乳饮料逐渐受到重视^[1]。然而, 降低 pH 会导致乳饮料的稳定性显著下降并影响产品的感官质量, 其主要原因是酪蛋白(casein, CS)在酸性条件下的聚集^[2]。CS 是牛乳中的主要蛋白质, 占牛乳蛋白总量的 80%左右, 通常以胶束结构稳定存在于牛乳中。在牛乳的正常 pH (~6.7)时, CS 胶束之间具备充分的空间位阻与静电斥力, 使 CS 胶束稳定分散。当体系 pH 接近 CS 的等电点(~4.6)时, 其分子表面呈电中性, CS 亚组构象崩溃, CS 分子间空间位阻和静电斥力降低, 导致 CS 胶束的聚集和沉淀^[3]。因此, 提高 CS 的 pH 稳定性对于开发符合消费者需求的酸化乳饮料十分重要。

目前, 已有研究表明向酸性乳中添加阴离子多糖, 例如卡拉胶、果胶、羧甲基纤维素等, 能够显著提高酸性乳的整体稳定性, 并且这一手段在科学研究和工业生产中已经较常见^[4]。阴离子多糖吸附在 CS 表面, 提供一定的空间稳定作用; 此外, 阴离子多糖能够通过非共价相互作用与

CS 形成凝胶网络结构, 使其在低 pH 下恢复空间位阻和静电排斥力^[5]。然而, 上述阴离子多糖主要因较好的稳定效果被应用于酸性乳中, 尚未考虑到所选多糖的生物活性。即筛选出既能够有效稳定酸性乳, 同时也可以赋予酸性乳显著生物活性的酸性多糖, 这对于以目前大健康饮食为趋势的消费与政策导向十分关键, 但综合二者的相关研究极少。茯苓是一种药食同源的中药材, 其主要活性成分茯苓多糖已被证实具有抗氧化、抗炎等生物活性, 在许多药方、饮食中均得到应用。然而, 茯苓多糖主要由 β -(1,3)-葡聚糖组成, 水溶性极差, 故常通过羧甲基衍生化提高其溶解性与生物利用率, 羧甲基的引入无疑为茯苓多糖在酸性乳中的应用提供了可能性^[6]。然而, 目前尚未有关于羧甲基茯苓多糖(carboxymethyl pachymaran, CMP)在调控 CSpH 稳定性中的应用效果与机制研究。

同时, 许多因素被认为会影响多糖-CS 相互作用和体系的物理稳定性, 例如多糖类型、结构特征、环境条件等。其中, 多糖的浓度(多糖-蛋白复合比例)以及环境 pH 受到最多的研究^[7]。因此, 本研究利用浊度、zeta 电位、激光共聚焦显微镜、流变等手段探究 CMP 对 CS 溶液稳定性的调控作用, 着重关注多糖-蛋白复合比例在不同 pH 下的影响。

此外,通过抗氧化活性与非酶糖基化产物的生成抑制作用共同探究 CMP 在酸性条件下对 CS 生物活性的促进效果,为新型、高品质酸性乳饮料的开发提供理论依据与指导。

1 材料与试剂

1.1 材料与试剂

白茯苓粉(湖北罗田九资河);CS、牛血清蛋白(美国 Sigma-Aldrich 公司);盐酸、冰醋酸、氢氧化钠、乙酸、乙醇、氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)、8-苯胺基-1-萘磺酸铵(分析纯,源叶生物有限公司);鼠李糖、木糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖和葡萄糖标准品(纯度 $\geq 99\%$,上海阿拉丁生物有限公司)。

1.2 仪器与设备

HH-W600 恒温水浴锅(东鹏仪器有限公司);UV-2600i 紫外分光光度计(上海美析仪器有限公司);DAWN HELEOS 凝胶渗透色谱-多角激光散射仪(美国沃特世科技公司);CY-3000 磁力搅拌器(常州聚辉仪器制造有限公司);CR21N 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 有限公司);Labconco FreeZon 真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Thermo Scientific Nicolet iS10 傅里叶红外光谱仪(中科瑞捷科技有限公司);Nano ZS 纳米粒度及电位分析仪(荷兰弗尔德仪器设备有限公司);LEICA SP8 激光扫描共聚焦显微镜(德国徕卡显微系统贸易公司);Mars60 旋转流变仪(奥地利安东帕有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CMP 的制备与表征

(1) CMP 的制备与纯化

参考 WANG^[8]的方法,将茯苓粉末以料液比 1:50 (w/V)加至 0.6 mol/L 氢氧化钠溶液中,4 °C 下静置提取 8 h,经离心(8000 r/min, 15 min)得到上清液。利用冰醋酸溶液中和上清液至 pH=6,沉淀经流水透析(3000 D) 3 d、冷冻干燥后即可得碱溶性茯苓多糖。

随后,向碱溶性茯苓多糖中加入 20% (V/V)氢氧化钠溶液,冰浴搅拌 3 h 使其完全溶解;然后加入氯乙酸(24 g 氯乙酸溶解于 100 mL 异丙醇溶液中)和 20% (V/V)氢氧化钠混合溶液,常温搅拌 3 h;再次加入等量该混合溶液,在 60 °C 环境下反应 1 h,用冰醋酸溶液中和反应溶液至 pH=7,旋蒸法回收异丙醇,剩余溶液用透析袋(3000 D)流水透析 3 d,透析液经浓缩后用 95%乙醇沉淀过夜,离心收集沉淀,冷冻干燥即得到 CMP。

(2) CMP 的化学组成与结构表征

参考 LI 等^[9]的方法,以葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法测定 CMP 的总糖含量;以牛血清白蛋白为标准品,

按照考马斯亮蓝法测定蛋白质含量;使用 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖含量;以半乳糖醛酸为标准品,采用咔唑-硫酸法测定半乳糖醛酸含量;通过铜盐沉淀法测定了 CMP 的取代度值,10 mL CMP (10 mg/mL)与 4 mL NH_4Cl 缓冲溶液(0.1 mol/L)混合后调节 pH 至 6.5 并加入 10 mL CuSO_4 标准溶液(0.05 mol/L),摇匀后过滤并将上清液 pH 调至 8.0,加入 0.05 g 紫脲酸铵指示剂,以乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)标准溶液(0.05 mol/L)滴定该溶液至呈紫蓝色。记录 EDTA 消耗量并计算取代度。

将 CMP 使用超纯水溶解,配置成质量浓度 1 mg/mL 的溶液,用紫外可见分光光度计扫描得到图谱,设置 200~800 nm 的波长扫描范围;采用 Nexus 470 红外光谱仪测定 CMP 的红外光谱(400~4000 cm^{-1}),并采用 Ominic 7.3 软件进行分析;采用配备 HP-5 硅胶毛细管柱(30 m \times 0.32 mm, 0.25 μm)的 GC-6890N 气相色谱分析 CMP 的单糖组成,CMP 以 3 mol/L 三氟乙酸溶解后密封并于 110 °C 度下水解 6 h,除酸后向水解物分别加入 10 mg 盐酸羟胺、1.5 mg 肌醇和 1.0 mL 吡啶并混合均匀,密封后于 90 °C 下水浴 30 min,冷却后加入乙酸酐 0.5 mL 并再次于 90 °C 下反应 30 min 后将样液过膜进样,以鼠李糖、木糖、甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖和葡萄糖为单糖标准品;通过配备 He-Ne 激光器($\lambda=658$ nm)和 Styragel HMW 6E 色谱柱(7.8 mm \times 300 mm)的凝胶渗透色谱-多角激光散射仪测定 CMP 的重均分子量(M_w)和均方根旋转半径(R_g),其中 1.0 mg/mL CMP 溶于 0.1% NaCl 水溶液^[10]。

1.3.2 CMP 对 CS 溶液 pH 响应特性的调控作用

(1) 浊度的测定

将 CS 粉末分散于 0.01 mol/L 磷酸盐溶液中过夜搅拌,得到 CS 溶液。随后,CS 溶液质量浓度固定为 0.1 mg/mL,分别向其中添加等体积的 0.50、0.10 与 0.02 mg/mL 的 CMP 溶液(CMP:CS=5:1, 1:1, 1:5, m/m ,通过预实验确定这些比例下复合物稳定性具有显著性差异)。最后,将这些混合物用 0.1~1.0 mol/L 盐酸溶液从 pH=7 酸化逐渐至 pH=1.00 \pm 0.02,并在 25 °C 下测定不同 pH 时 CMP, CS, CMP-CS 复合溶液的 OD_{600} 值,重复 3 次^[11]。

(2) zeta 电位的测定

在 25 °C 下,使用 Nano-ZS-90 仪器测量上述 CMP-CS 复合物的 zeta 电位,重复 3 次。

(3) 溶解度的测定

将 CS 溶液以及 CMP-CS 混合物溶液调至不同 pH 后,在 3000 r/min 下离心 10 min。上清液采用考马斯亮蓝 G250 试剂混匀并在室温下避光反应 5 min,随后测定 595 nm 处的吸光度以绘制标准曲线。样品按照上述方法测

定并计算蛋白质含量。

(4)相图与外观变化

在将 CS 溶液(2 mg/mL)与 CMP 溶液(2 mg/mL)等体积混合,并用 0.1~1.0 mol/L 盐酸酸化至不同 pH。随后将样品于 4 °C 下静置 24 h,记录溶液相分离状态,包括浑浊悬浮液沉淀(□)、无沉淀澄清溶液(O)、浑浊悬浮液(□)、有沉淀澄清溶液(■)^[12]。

1.3.3 激光共聚焦显微镜观察

在 pH 4.0 下使用激光扫描共聚焦显微镜在室温下记录 CS-CMP 混合物的激光共聚焦显微图像。将 2 mL 不同样品溶液和 20 μL 罗丹明 B (0.05 g/100 mL 乙醇)共混并漩涡 2 min。随后将 200 μL 染色液在 555 nm 的激发波长和 630 nm 的发射波长下观察并记录图像^[13]。

1.3.4 流变特性测定

在 pH 4.0 下采用旋转流变仪测量 CS 以及 CS-CMP 混合溶液的表观黏度与模量。取 1 mL 样品溶液于流变仪平板上。在稳态剪切测量中,在 0.1~500.0 1/s 的剪切速率范围内测定 CS 溶液的黏度。在动力振荡实验中,首先通过动态应变扫描试验确定试样的线性黏弹性区,随后在 1% 的固定振幅下对样品溶液进行频扫测量,记录存储模量 (G'/G'')随角频率(0.1~100 rad/s)的函数关系^[14]。

1.3.5 体外抗氧化活性测定

参考 LIU 等^[15]的方法,室温下取 2 mL 不同样品与 2 mL 2×10^{-4} mol/L DPPH 共混并避光反应 30 min 后于 517 nm 测定其吸光度 A_0 。同时,测定 2 mL 2×10^{-4} mol/L DPPH 溶液与 2 mL 无水乙醇混合液的吸光度 A_1 ,以及 2 mL 样品溶液与 2 mL 无水乙醇混合液的吸光度 A_2 ,重复 3 次。计算见公式(1):

$$\text{DPPH 抑制率}/\% = (1 - \frac{A_0 - A_2}{A_1}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 为样品溶液加 DPPH 溶液的吸光度; A_2 为样品溶液加无水乙醇的吸光度; A_1 为 DPPH 溶液加无水乙醇的吸光度。

此外,将 7 mmol/L 的 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)水溶液与 2.45 mmol/mL 的 $K_2S_2O_8$ 水溶液等体积混合并用无水乙醇将其稀释至 734 nm 处的吸光值为 0.7,即得 ABTS 工作液。随后,将 0.1 mL 多糖溶液与 1.9 mL ABTS 工作液混匀、避光反应 6 min 后测定 734 nm 处吸光值,以无水乙醇代替样品溶液作为空白。根据下式计算消化液对 ABTS 阳离子自由基的清除率,重复 3 次。计算见公式(2):

$$\text{ABTS 阳离子抑制率}/\% = (1 - \frac{A_0 - A_2}{A_1}) \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_1 为样品溶液加 DPPH 溶液的吸光度; A_0 为 ABTS 工作液加无水乙醇的吸光度。

1.3.6 体外对非酶糖基化的抑制作用

参照 FENG 等^[16]的实验方法并稍做改动,建立甲基

乙二醛-牛血清白蛋白非酶糖基化模型。牛血清白蛋白(终浓度为 5 mg/mL)与甲基乙二醛(终浓度为 10 mmol/L)溶液等体积均匀混合后,添加 5 mg/mL 样品(2 mL)并用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)定容至 10 mL,并在 37 °C 下避光反应 10 d,分别于 0、5、10 d 取样进行测定。其中,取 0.4 mL 样品溶液,分别加入吉腊德-T 储备溶液(500 mmol/L, 0.2 mL)和甲酸钠(500 mmol/L, pH 2.9, 3.4 mL),均匀混合并于 37 °C 孵育 1 h,测定 294 nm 处吸光值以计算二羰基化合物的生成抑制率。而对于荧光晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)抑制率,样品通过荧光酶标仪在激发波长 370 nm,发射波长 440 nm 条件下检测荧光值并计算抑制率,重复 3 次,以磷酸盐缓冲液作为空白对照。

1.4 数据处理

所有实验均为 3 次重复,结果以平均值±标准偏差表示。采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行单因素方差分析和多重比较(Duncan), $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 CMP 的化学组成与结构特征

由表 1 可知,CMP 总糖含量达到 87.37%,同时蛋白质含量极低,仅为 0.19%,表明其是一种纯度较高的多糖。单糖组成结果表明,CMP 主要由葡萄糖和甘露糖组成,其中葡萄糖为主要的结构单糖,表明 CMP 是以葡聚糖为主要成分的多糖。同时,CMP 的取代度经测试高达 0.84,不仅表明羧甲基衍生化的成功,同时意味着茯苓多糖的水溶性以及其他生物活性可能得到显著提升。

表 1 CMP 的化学组成与基本结构表征
Table 1 Chemical composition and basic structure characterization of CMP

| 化学组成 | CMP |
|-------------|-----------------------------|
| 总糖含量/% | 87.37±1.35 |
| 蛋白质含量/% | 0.19±0.07 |
| 糖醛酸含量/% | 7.43±0.36 |
| 还原糖含量/% | 5.21±0.63 |
| 取代度 | 0.84±0.02 |
| 分子量/(g/mol) | 2.43×10^5 (±2.16%) |
| 葡萄糖含量/mol | 9.43 |
| 甘露糖含量/mol | 1.24 |

通过 CMP 的紫外光谱图(图 1A)可以发现,CMP 在 200~500 nm 范围内无明显吸收峰,表明其纯度较高。此外,通过红外光谱图(图 1B)对其特征吸收峰进行判定,其中 3277 cm^{-1} 处归属于 CMP 的 O-H 键拉伸振动,而 1600 cm^{-1} 处吸收峰归属于 CMP 的 C=O 键,是羧甲基的特征吸收峰^[17],而未衍生化的茯苓多糖在此处没有观察到明显的吸收峰。因此,CMP 是一种具有丰富羧甲基的多糖。

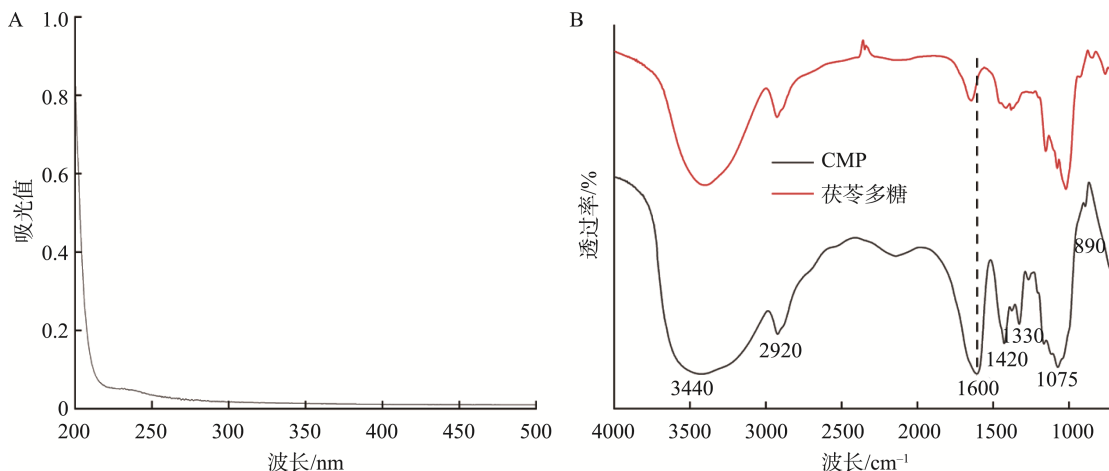


图 1 CMP 的紫外和红外谱图

Fig.1 UV visible absorption spectrum and Fourier transform infrared spectrum of CMP

2.2 CMP 对 CS 溶液 pH 响应特性的调控作用理化性质的影响

浊度是分散体中分散颗粒大小和数量的敏感指标,在复杂的初始阶段很容易发现细微的变化。由浊度变化(图 2 A)可知, pH 从 7.0 降至 6.0 时,不同复配比例的 CMP-CS 复合物溶液的浊度变化并不明显,说明 CMP 与 CS 之间不存在强相互作用。当 pH 由 6.0 接近 4.0 时,CS 样品的浊度显著上升,并在 pH 4.8 处达到最大,这是由于 pH 逐渐降至 CS 等电点所导致的蛋白分子聚集^[18]。由于 CMP 的加入, CMP-CS 复合物的浊度在该阶段同样显著增加,但二者以 5:1 比例复配的复合物的最大浊度均显著高于 CS,但 1:1 和 1:5 的比例下较 CS 低。在之前的报道中,壳聚糖越高,其对 CS 的 pH 稳定性提升越显著^[19]。通过它们的 zeta 电位(图 2B)与 CS 溶解性(图 2C)可以看出,此时带负电荷的 CMP 通过静电作用力与带正电荷的 CS 结合,表明当 CMP 含量高于 CS 时,二者间在该 pH 范围内通过相互作用形成了复杂聚集体,浊度较 CS 或其它复合比例复合物显著增加。最后,当 pH 从 4.0 降低到 3.0 时,由于 CMP 和 CS 携带足够的相反净电荷,导致电荷中和并且相分离,稳定效果受到限制;此外,在非常低的 pH (<3.0)下,即 pH 接近或低于羧基的解离常数(4~5)值时,羧基的质子化使 CMP 具有净零表面电荷^[20],削弱了它与 CS 的静电相互作用,从而降低了复合物的浊度与蛋白溶解度,但其浊度稳定性仍旧高于 CS。根据 HOU 等^[21]的研究,卵黄蛋白在不同 pH 下的稳定性能够受到羧甲基纤维素的浓度影响,且与多糖的添加浓度紧密相关。因此,在一定 pH 范围内,适量 CMP 的引入能够提高 CS 的 pH 稳定性,且随着 CMP 含量的增加而更加显著。

图 2D 记录了 CMP-CS 混合物溶液的相行为随 pH、混合比的变化规律。从图 2D 中可以看出,在偏中性环境(pH 5 和 6)时,观察到 CMP 与 CS 的共溶性,可能是由于羧

基(-COO)增强了与水相的离子偶极矩^[22-23]。当 pH 调整到酸性时,在 pH 4~5 以及 5:1 比例下的复合物具有更好的稳定性,能观察到无沉淀的混浊溶液。然而,在 1:1 和 1:5 比例下观察到与 CS 溶液类似的大量沉淀,这表明在该 pH 范围内 CMP 与 CS 之间的静电相互作用较强。而 pH 的进一步降低触发了具有不同相行为的不溶性复合物的逐步形成, CMP-CS 复合物在 pH 为 2~4 范围内形成浑浊悬浮液沉淀。此外,随着 pH 降低到 2 时,5:1 比例下的复合物开始聚集,出现明显的沉淀。因此,高浓度 CMP 能在更宽的 pH 范围内维持 CS 悬浮液的稳定,具有明显的稳定促进效果。

总的来说,由图 2 可知, CMP 对 CS 对 pH 稳定性具有显著的积极作用,特别是在等电点附近。因此,后续实验研究选取 pH=4 来探究 CMP 对 CS 溶液 pH 响应特性的调控作用以及理化性质的影响。

2.3 激光共聚焦分析

为了更好地了解 pH=4 下 CMP-CS 的微观结构特性,本研究通过激光共聚焦显微镜对它们的微观结构与聚集情况进行直接观察。如图 3 所示,在 pH=4 条件下,能够观察 CS 溶液均匀且成片状的大面积聚集体(图 3A),类似的微观结构在大豆乳清蛋白-阿拉伯胶的可溶性配合物中也有报道^[24]。这再次证实了 CS 分子在 pH=4 时具有较强的聚集性。然而,在图 3B~D 中,能观察到不均匀分布的聚集体,即对于不同比例下的 CMP-CS 复合物(CS 浓度始终保持一致),它们的聚集程度较 CS 发生了显著降低,这可归因于两种带相反电荷的生物聚合物之间较弱的相互作用^[25],表明 CMP 通过静电相互作用能够显著提升 CS 的 pH 稳定性。对于不同 CMP-CS 复合比例而言,结果与图 2 类似,5:1 时复合物具有最低的聚集程度,代表着较高的稳定性,而 1:1 和 1:5 下的复合物则相对较差。这表明,在 pH 4 的情况下, CMP-CS 的静电相互作用及其引发的复合物稳定性可能会随着 CMP 含量的增加而逐渐变强。

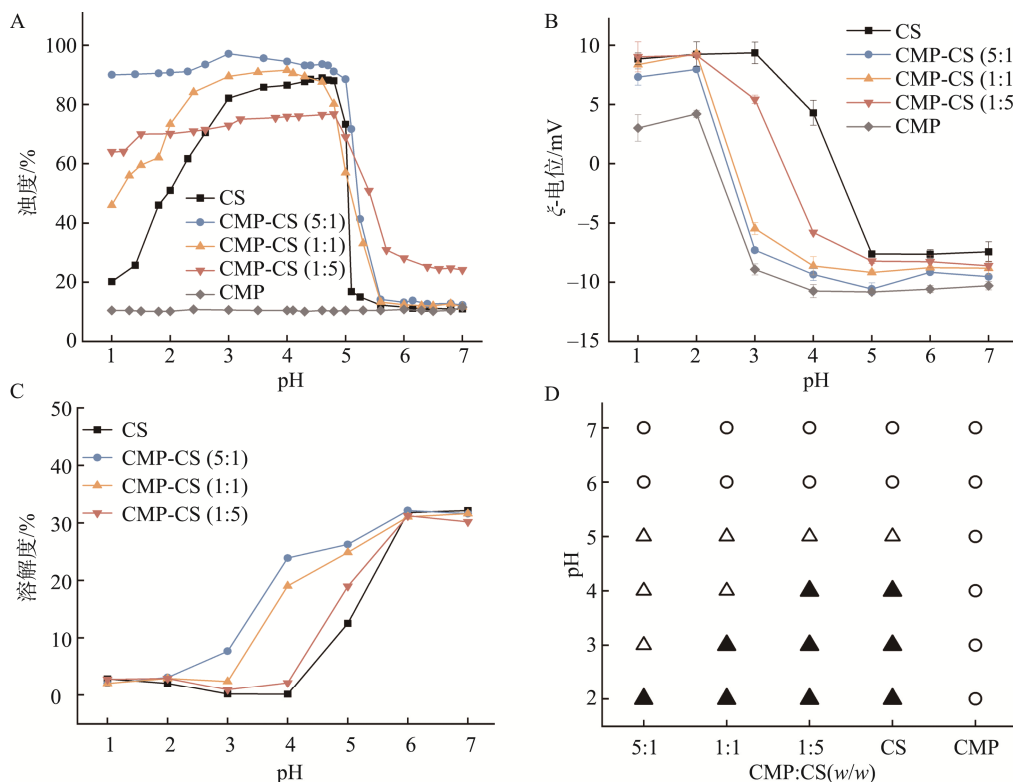
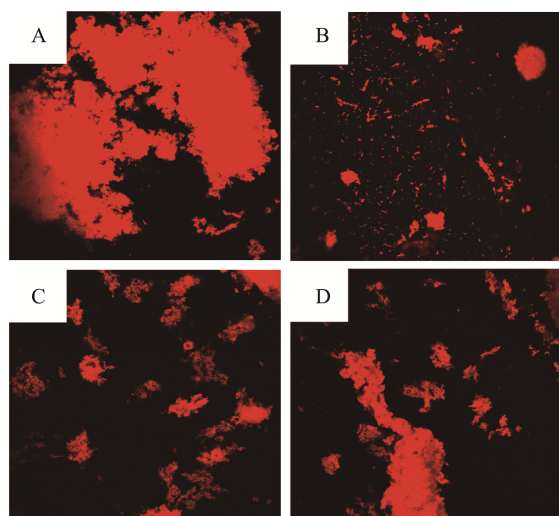


图 2 不同 CMP:CS 复合比例下混合溶液的理化性质随 pH 变化(n=3)

Fig.2 Variation of physicochemical properties of complex solutions with pH value under different CMP:CS composite ratios (n=3)



注: A. CS; B. CMP-CS (5:1); C. CMP-CS (1:1); D. CMP-CS (1:5); 所有样品均在 pH=4 的溶液中制备, 并在 500 倍下进行观察。

图 3 不同 CS 样品的激光共聚焦显微镜图片

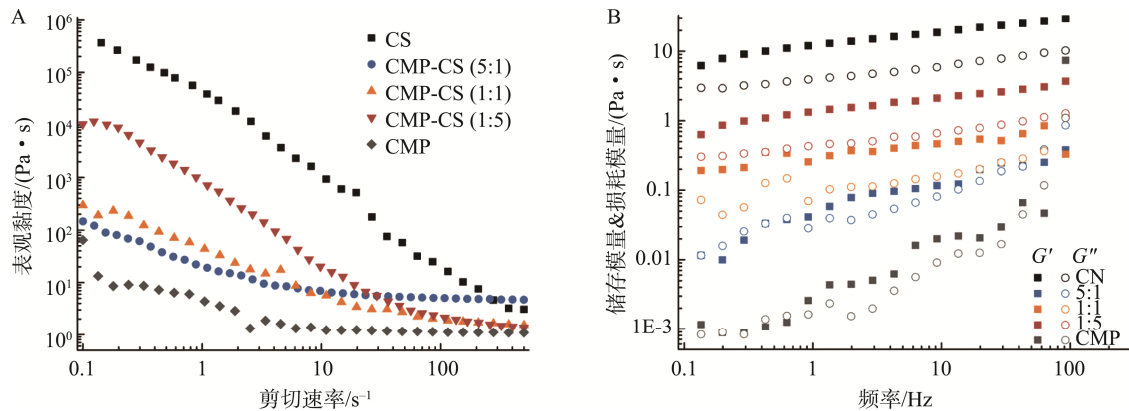
Fig.3 Laser confocal microscopy images of different CS samples

2.4 流变特性

在 pH=4 情况下, CMP-CS 混合比例对复合物流变性能的影响如图 4A 和 B 所示。表观黏度代表着流体对样品溶液流动的阻力, 这取决于蛋白质分子之间的聚集状态和相互作用。由图 4A 可以看出, 所有测试样品的表观黏度均随着

剪切速率的增加而持续下降, 表现出显著的剪切稀释行为, 这归因于样品分子结构破坏和重排或相邻聚合物链之间相互作用的减少^[26]。特别的, 与单独 CS 相比, 不同比例 CMP-CS 复合物表观黏度相对较低, 这是由于小颗粒聚集体的形成, 导致分子间的流动阻力降低, 相似的结果也在乳蛋白-壳聚糖相互作用中被观察到^[27]。此外, 这种黏度变化随多糖含量的增加而减小, 这有可能是因为黏度较高的 CS 的相对含量在降低, 也有可能是由于 5:1 时 CMP-CS 复合物的粒径与聚合度最小, 使得分子间的摩擦力较低, 黏度下降。

为了进一步研究复合物结构特性的变化, 图 4B 显示了不同混合比例的复合物的 G' (储能模量)和 G'' (损耗模量)随频率的变化。结果表明, 在 0.1~100.0 rad/s 频率范围内, 各个样品的 G' 和 G'' 随频率的变化而增大。此外, 由于 G' 始终高于 G'' , 表明基于 CS 形成的络合物呈凝胶状网络结构, 且主要依靠非共价相互作用维持^[28]。对于不同复合比例, 复合物的模量随着 CMP 含量的增大而减少。这表明, CMP 的加入会导致复合物絮凝状态或 CS 之间的已经形成的网络结构被破坏。这与 CLSM、浊度、相图等实验结果相一致。即 CMP, 特别是高浓度 CMP, 通过静电相互作用与 CS 发生非共价相互作用, 破坏了酸性条件下 CS 已经形成的聚集体, 导致 CMP-CS 复合物的聚集程度大大下降, 表现为该复合物溶液更加清澈、均匀。此外, 高浓度 CMP 具有的高黏度同样会阻止 CS 在酸性环境下的聚集, 提高其稳定性。



注: A. 表观黏度图; B. 模量图; 所有样品均在 pH=4 的溶液中制备。

图 4 不同 CS 样品流变学特性的表征

Fig.4 Characterization of rheological properties of different CS samples

2.5 体外抗氧化能力

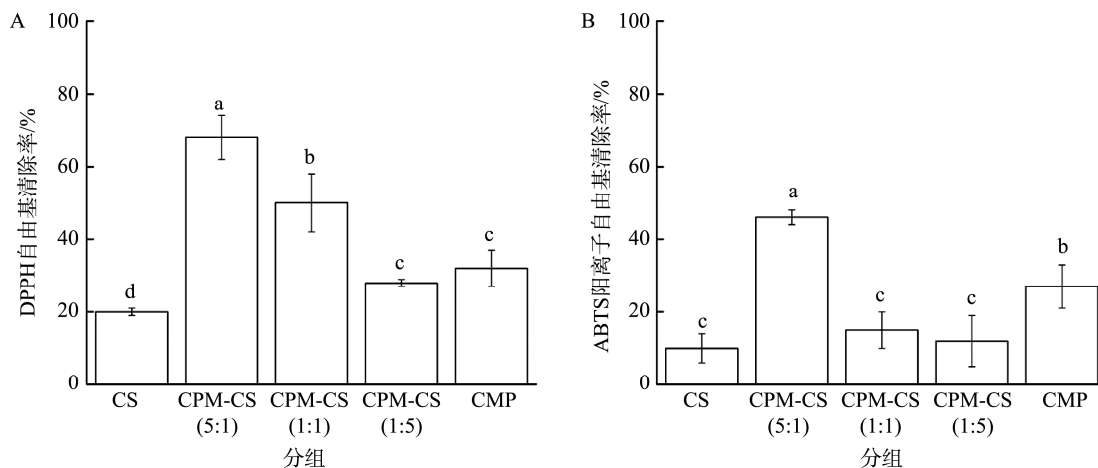
由图 5 可以看出, 不同 CS 样品均具有一定的抗氧化活性。其中, CS 表现出极为有限的效果, 其对 DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的清除率仅为 19.5% 和 6.5%, 这表明 CS 本身可能不具备显著的生物活性。当引入 CMP 后, 复合物(pH=4 下制备)的抗氧化活性较 CS 具有显著的提高, 其原因可能是由于 CMP 具有较 CS 更为明显的抗氧化活性, 因为多糖是一种多羟基化合物, 能够在一定程度上发挥猝灭自由基的作用, 这与其它研究是一致的^[29]。而对于 3 种比例下的复合物, 可以发现复合物中 CMP 含量越高, 其抗氧化活性越强, 特别是 5:1 复合比例时的化合物。原因可能有以下两点: 首先, 此时复合物中具有抗氧化活性的 CMP 含量较高, 导致整体抗氧化能力较强; 其次, 通过结构表征结果可知, 5:1 复合比例下的复合物具有较为分散的结构, 聚集程度较低, 这有利于大分子化合物捕获自由基, 而其它比例下复合物分子间聚集程度较高, 难以发挥抗氧化活性^[30]。而与 CMP 相比, 复合物(5:1)具有较高的抗氧化

能力, 原因可能为复合物的结构较 CMP 更加舒展或 CMP 与 CS 的非共价相互作用影响了 CS 的构象并导致 CS 的抗氧化能力增强。因此, 合适的复配比例对于 CMP-CS 复合物的生物活性具有重要意义。

2.6 体外非酶糖基化产物生成的抑制效果

AGEs 是美拉德反应的产物之一, 是还原糖中的羰基与蛋白质中的氨基之间经过非酶催化的缩合、重排、裂解即氧化修饰等一系列反应所形成的复合物^[31]。研究表明, AGEs 在体内长期过度积累会诱导炎症、氧化应激, 从而导致糖尿病、肠炎等病症, 寻求天然、安全的 AGEs 抑制剂具有重要意义^[32-33]。

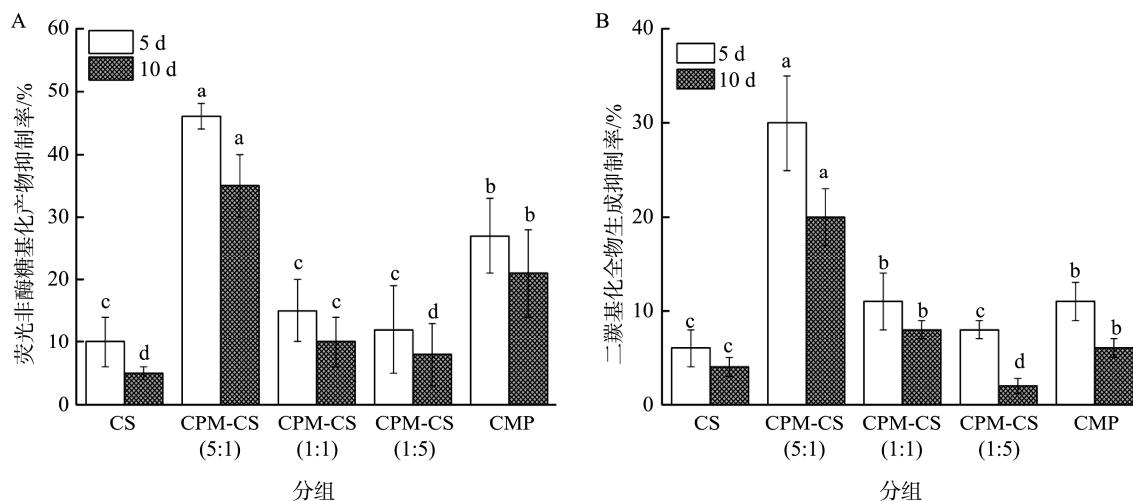
如图 6 所示, 不同 CS 样品对于荧光 AGEs 和二羰基化合物的形成具有不同程度的抑制作用, 并且具有明显规律。首先, 在反应体系储藏 10 d 期间, 样品的抑制率随着储藏时间的增加而下降, 表明 CS 样品的抑制能力被逐渐消耗。其次, 与 CMP 相比, CS 具有较低的抑制作用。研究表明, 活性样品的抗氧化能力直接影响美拉德反应中的氧化反应,



注: 不同字母表示组间具有显著性差异, $P < 0.05$, 下同。

图 5 不同 CS 样品的抗氧化活性比较($n=3$)

Fig.5 Comparison of antioxidant activity of different CS samples ($n=3$)

图 6 不同 CS 样品的非酶糖基化产物生成的抑制效果比较($n=3$)Fig.6 Comparison of inhibitory effects on non-enzymatic glycation product generation of different CS samples ($n=3$)

并能决定反应的中间产物与最终产物的生成效率^[34]。在本研究的实验结果中, 不难发现不同样品的 AGEs 抑制率与它们的抗氧化活性成正比。其中, 复合物(5:1)具有最强的抑制活性, 这不仅是由于它在所有样品中具有最为显著的抗氧化活性, 同时可能由于它能够干预美拉德反应原料分子间的结合。其中, 复合物(5:1)较 CMP 具有更好的抑制能力, 可能与复合物具有最佳的抗氧化活性以及与干预美拉德反应中间产物生成紧密相关。因此, 本研究可以推测, 当向酸性乳中添加合适剂量的 CMP, 能够使复合物具有极好的 AGEs 抑制能力。

3 结论

本研究探究了 CMP 对 CS 溶液 pH 响应特性的调控以及生物活性的影响。根据浊度、zeta 电位、蛋白质溶解性、相图结果的综合分析, CMP:CS=5:1 时, CMP 对 CS 在酸性条件下的聚集具有显著的改善作用, 增加了 CS 的稳定性与溶解性, 但 CMP 含量下降时这种效果得到削弱。激光共聚焦显微镜结果也显示出, pH=4 下 CS 聚集程度会随着高浓度 CMP 的引入而降低, CS 主要以碎片化形态均一分布。而流变结果表明, CMP 能够降低酸性环境下 CS 的黏度与模量, 且随着多糖含量的增加而愈加显著, 表明 CS 的粒径减小、网络结构被破坏, 意味着在酸性环境下 CMP 在一定程度上阻止了 CS 的聚集。最后, 通过抗氧化活性与非酶糖基化产物抑制能力, 发现高浓度 CMP 能够使多糖-CS 复合物在酸性环境下表现出显著的生物活性。综上所述, 通过控制 CMP 的添加量与体系 pH 可以实现显著提高 CS 体系稳定性的目的, 为 CMP 作为新的功能性生物活性多糖在酸性乳饮料中的应用提供理论基础。

参考文献

- [1] GUO S, SUN Y, WU T, *et al.* Co-fermented milk beverage has better stability and contains more health-promoting amino acid metabolites than single-strain-fermented milk beverage over one-month storage [J]. *Food Chemistry*, 2023, 430: 136840.
- [2] DU XJ, JING HJ, WANG L, *et al.* pH-shifting formation of goat milk casein nanoparticles from insoluble peptide aggregates and encapsulation of curcumin for enhanced dispersibility and bioactivity [J]. *LWT*, 2021, 154: 112753.
- [3] ZHAO ZG, CORREDIG M. Effects of pH-modification on the rennet coagulation of concentrated casein micelles suspensions [J]. *Food Chemistry*, 2020, 316: 126199.
- [4] GUO YL, WEI Y, CAI ZX, *et al.* Stability of acidified milk drinks induced by various polysaccharide stabilizers: A review [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118: 106814.
- [5] TAVASOLI S, MAGHSOUDLOU Y, JAFARI SM, *et al.* Improving the emulsifying properties of sodium caseinate through conjugation with soybean soluble polysaccharides [J]. *Food Chemistry*, 2021, 377: 131987.
- [6] CHEN ZX, ZHAO YL, FENG X, *et al.* Effects of degradation on the physicochemical and antioxidant properties of carboxymethyl pachyman [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 245: 125560.
- [7] GENTILE L. Protein-polysaccharide interactions and aggregates in food formulations [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2020, 48: 18-27.
- [8] WANG JY, BIE M, ZHOU WJ, *et al.* Interaction between carboxymethyl pachyman and lotus seedpod oligomeric procyanidins with superior synergistic antibacterial activity [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 212: 11-20.
- [9] LI PY, JING YS, QIU XY, *et al.* Structural characterization and immunomodulatory activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 265: 130734.

- [10] TAHTAOUI K, TRAIKIA M, RIHOUEY C, *et al.* Chemical characterization of polysaccharides from *Gracilaria gracilis* from Bizerte (Tunisia) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 266: 131127.
- [11] JIN WP, WANG ZF, PENG DF, *et al.* Effect of linear charge density of polysaccharides on interactions with α -amylase: Self-assembling behavior and application in enzyme immobilization [J]. *Food Chemistry*, 2020, 331: 127320.
- [12] LAN Y, OHM JB, CHEN BC, *et al.* Phase behavior, thermodynamic and microstructure of concentrated pea protein isolate-pectin mixture: Effect of pH, biopolymer ratio and pectin charge density [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105556.
- [13] WANG PP, DU YT, CHAI XH, *et al.* Effect of bioactive *Rosa roxburghii* Tratt fruit polysaccharide on the structure and emulsifying property of lactoferrin protein [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 298: 140016.
- [14] GUO RX, SUN WH, HE MJ, *et al.* Interactions between *Dendrobium officinale* polysaccharide and κ -carrageenan: Rheological and functional properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2025, 159: 110618.
- [15] LIU XC, TIAN J, ZHOU ZR, *et al.* Antioxidant activity and interactions between whey protein and polysaccharides from different parts of *Houttuynia cordata* [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1020328.
- [16] FENG NJ, FENG YN, ZHANG F, *et al.* Inhibition mechanism of mango vinegar on protein-AGEs digestion in vitro gastrointestinal environment [J]. *LWT*, 2023, 186: 115246.
- [17] ZHAO YL, FENG X, ZHANG LJ, *et al.* Antitumor activity of carboxymethyl pachyman with different molecular weights based on immunomodulatory and gut microbiota [J]. *Nutrients*, 2023, 15(21).
- [18] WANG YR, YANG Q, DU HQ. Chitosan can improve the storage stability of ovalbumin fibrils at pH higher than isoelectric point [J]. *Food hydrocolloids*, 2023, 136: 1–9.
- [19] DING L, HUANG Y, CAI XX, *et al.* Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 208: 133–141.
- [20] WANG Y, LIN C, LI YN, *et al.* Tuning the electrostatic interaction between rice protein and carboxymethyl cellulose toward hydrophilic composites with enhanced functional properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions*, 2023, 235: 123918.
- [21] HOU JJ, CHANG HY, LIU YF, *et al.* Exploring the phase behavior of natural egg yolk-carboxymethyl cellulose concentrate: Impact on emulsification and gelling properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2024, 157: 110385.
- [22] LI S, LIN SY, JIANG PF, *et al.* The interaction mechanism of different ionic polysaccharides with myofibrillar protein and its contribution to the heat-induced gels [J]. *Food Frontiers*, 2024, 5: 1613–1628.
- [23] KOVAEVI J, WURM F, PHAM T, *et al.* Influence of chickpea protein on the pH and temperature dependent viscosity of carboxymethylated starch [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 280: 136170.
- [24] CAO J, TONG XH, CHENG JJ, *et al.* Impact of pH on the interaction between soy whey protein and gum Arabic at oil-water interface: Structural, emulsifying, and rheological properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 139: 108584.
- [25] ZHENG LY, CHANG QS, CHEN X, *et al.* Phase behavior and interaction of strong polyelectrolyte dextran sulfate and whey protein isolation: Effects of pH, protein/polysaccharide ratio, and salt addition [J]. *Food Chemistry*, 2025, 464: 141815.
- [26] ZHANG XY, REN XX, HAN XM, *et al.* Effects of polysaccharides on the structure, functionality, emulsion stability and rheological properties of soybean meal hydrolysate-proanthocyanidin complexes [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 293: 139204.
- [27] HASSANVAND E, RAZAVI SMA. Effect of chitosan molecular weight and protein to polysaccharide ratio on the rheological and physicochemical properties of milk proteins–chitosan complex coacervate [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 282: 137247.
- [28] WANG SN, YANG JJ, SHAO GQ, *et al.* Soy protein isolated-soy hull polysaccharides stabilized O/W emulsion: Effect of polysaccharides concentration on the storage stability and interfacial rheological properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105490.
- [29] LIU HC, YANG JG, TANG YQ, *et al.* Carboxymethyl polysaccharides from *Poria cocos* (Schw.) wolf: Structure, immunomodulatory, anti-inflammatory, tumor cell proliferation inhibition and antioxidant activity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 299: 140104.
- [30] CAPEK P, KOSTALOVA Z. Isolation, chemical characterization and antioxidant activity of *Prunus spinosa* L. fruit phenolic polysaccharide-proteins [J]. *Carbohydrate Research*, 2022, 515: 108547.
- [31] WANG M, WANG JR, LI WH, *et al.* Protective effects of polyphenol-rich sugarcane molasses extract against AGEs-induced glycosylation damage in L929 cells [J]. *Food Bioscience*, 2025, 63: 105775.
- [32] YADAV N, PALKHEDE JD, KIM SY. Anti-glucotoxicity effect of phytoconstituents via inhibiting MGO-AGEs formation and breaking MGO-AGEs [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(8): 7672.
- [33] 李骏函, 邓鹏, 马斯迪, 等. 不同热加工条件下植物汉堡肉中杂环胺和晚期糖基化末端产物的同步生成规律[J]. *食品安全质量检测学报*, 2025, 16(7): 45–54.
- LI JH, DENG P, MA SD, *et al.* Synchronous generation pattern of heterocyclic amines and advanced glycation end products in plant hamburger meat under different thermal processing conditions [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2025, 16(7): 45–54.
- [34] LIU D, MEI XY, MAO YT, *et al.* *Lentinus edodes* mycelium polysaccharide inhibits AGEs-induced HUVECs pyroptosis by regulating lncRNA MALAT1/miR-199b/mTOR axis and NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 267: 131387.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)