

β -胡萝卜素/酪蛋白纳米复合物的形成及 β -CE的生物利用率

张怡欣,何胜华*,唐海珊,马 莺

(哈尔滨工业大学食品科学与工程学院,黑龙江哈尔滨 150090)

摘要: β -胡萝卜素(β -CE)具有多种生物活性,但是不稳定,容易降解,利用酪蛋白(CN)对 β -胡萝卜素进行自组装能够对其起到保护作用,从而提高 β -胡萝卜素在食品工业中的利用价值。本文以 β -CE/CN形成纳米复合物为背景,研究了其形成的影响因素、粒径分布以及 β -CE的生物利用率。结果表明, β -CE/CN纳米复合物的形成受温度与 β -CE/CN质量比的影响较大, β -胡萝卜素经酪蛋白自组装后,其水溶性提高。经体外消化实验, β -CE/CN纳米复合物经胰蛋白酶和胃蛋白酶酶解后,酶解产物经SDS-PAGE分析,酪蛋白随着酶解时间的延长其水解程度增加,因此 β -CE从纳米复合物中更易释放出来,其生物利用率提高。

关键词: β -胡萝卜素,酪蛋白,纳米复合物,生物利用率

Formation of β -CE/CN nanoparticle complex and bioavailability of β -CE

ZHANG Yi-xin, HE Sheng-hua*, TANG Hai-shan, MA Ying

(College of Food Science & Engineering, Harbin Institute of Technology of China, Harbin 150090, China)

Abstract: β -carotene(β -CE) has various biological activities, but it is unstable and easily degradation. β -carotene self-assembles in casein (CN) and form nanoparticle complex, with plays an important role in protecting β -carotene. Thereby, β -carotene/CN nanoparticle complex can enhances the utilization value of β -carotene in the food industry. The paper was based on the formation of β -CE/CN nanoparticle complex, and the influence factors, such as formation, the particle size distribution and bioavailability of β -CE were investigated. The results showed that temperature and β -CE/CN mass ratio had great impact on its formation, β -CE re-assembled in CN can improve water solubility of β -CE. After digestion experiment *in vitro*, β -CE was hydrolyzed by trypsin and pepsin, the hydrolysis degree of casein was increased with the increase of hydrolysis time. Therefore, β -CE easily released from β -CE/CN nanoparticle complex and its bioavailability was enhanced.

Key words: β -carotene; casein; nanoparticle complex; bioavailability

中图分类号:TS255.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2016)05-0068-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.05.005

乳蛋白由于其价廉、无毒、高营养价值以及多种结构和功能特性使得其适合各种生物活性物质的载体^[1]。酪蛋白(CN)在整个蛋白中所占比例较高,在牛乳中以胶束的形式存在。酪蛋白的自组装作用是Semo等人首次提出,随着人们对酪蛋白自组装作用的认识,利用酪蛋白自组装作用作为生物活性物质的载体也越来越受到人们的重视^[2]。Zimet等人利用酪蛋白胶束和酪蛋白纳米粒子来作为多不饱和脂肪酸的载体,大大的提高了不饱和脂肪酸的稳定性^[3]。Bargarum等人利用 β -CN与疏水性维生素D混合,

利用 β -CN的自组装作用,形成了 β -CN/维生素D纳米粒子复合物,其胶束的粒径接近于天然酪蛋白胶束,提高了维生素D在水介质中的稳定性,对紫外光诱导降解起到了显著的保护作用^[4]。

β -胡萝卜素(β -CE)是维生素A的前体,具有多种生物活性功能^[5]。国内外大量研究表明: β -CE具有抗癌和作为天然抗氧化剂的作用,而且还可以作为天然色素应用于饮料加工中^[6]。然而, β -CE在食品工业中的应用有较大的局限性,主要是由于 β -CE对光、热、氧等条件十分敏感,极其不稳定,容易降

收稿日期:2015-05-19

作者简介:张怡欣(1991-),女,硕士研究生,研究方向:乳品化学与乳品加工技术,E-mail:zyxkysmile@163.com。

*通讯作者:何胜华(1974-),男,博士,讲师,研究方向:乳品化学与乳品加工技术,E-mail:heshenghua@hit.edu.cn。

基金项目:中国博士后特别资助(2014T70360)。

解,另外, β -CE 的水溶性差^[7]。 β -CE 与 CN 在体外通过自组装作用形成 β -CE/CN 纳米复合物,对 β -CE 起到了保护的作用,而且 CN 在胃肠中易于消化吸收,因此为 β -CE 的释放和提高生物利用率创造了条件^[8]。

本研究以酪蛋白酸钠为原料,通过 β -CE 与 CN 混合,形成 β -CE/CN 纳米复合物,并测定影响 β -CE/CN 纳米复合物形成的因素, β -CE/CN 纳米复合物的粒径分布以及 β -CE/CN 纳米复合物的生物利用率。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

β -胡萝卜素 SIGMA 公司,酪蛋白酸钠 蒙牛乳业,丙酮 天津科密欧化学试剂厂,氯化钙 天津博迪化工有限公司,磷酸氢二钾 天津博迪化工有限公司,柠檬酸三钠 天津致远化学有限公司,胰蛋白酶 SIGMA 公司,胃蛋白酶 SIGMA 公司,十二烷基硫酸钠 天津博迪化工有限公司,过硫酸铵 天津博迪化工有限公司,甲醇 天津科密欧化学试剂厂,冰乙酸 天津科密欧化学试剂厂,考马斯亮蓝 南京奥多福尼生物公司。

pH 计 sartorius,电子天平 上海越平科学仪器有限公司,HWS24 型恒温水浴锅 上海一恒科技有限公司,F-2700 型荧光分光光度计 HITACHI,激光粒度分析仪 Malvern 公司,DYY-8C 型凝胶电泳仪 北京六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 β -CE/CN 纳米复合物的制备 18 mL 0.3 mmol/L 的 β -胡萝卜素丙酮溶液经过 0.45 μ m 滤膜过滤,并与 4 mL 1 mol/L 柠檬酸三钠共同加入到 200 mL 5% 的酪蛋白酸钠溶液中,然后将 24 mL 0.2 mol/L 的 K_2HPO_4 和 20 mL 0.2 mol/L 的 $CaCl_2$ 分 8 次加入上述溶液中,每次间隔 15 min,在加入过程中,溶液在 37 $^{\circ}C$ 水浴锅中边搅拌边加入,加完后将溶液 pH 调至 6.7,最后用蒸馏水将上述溶液定容到 400 mL,将 pH 重新调至 6.7,轻轻搅拌 1h,通过 CN 的自组装得到 β -CE/CN 纳米复合物^[9]。

1.2.2 β -CE/CN 纳米复合物荧光强度测定

1.2.2.1 温度对 β -CE/CN 纳米复合物的影响 在温度分别为 28、32、36、40、44、48 $^{\circ}C$, β -CE 与 CN 质量比为 1:300,pH6.7 的情况下,按 1.2.1 的方法分别对 β -CE 进行自组装,使用荧光分光光度计测定相对荧光强度来表示自组装分子在不同温度环境中的最佳组装条件,其中激发波长为 301 nm,发射波长为 409 nm。

1.2.2.2 β -CE 与 CN 质量比对 β -CE/CN 纳米复合物的影响 在 β -CE 与 CN 质量比分别为 1:200、1:250、1:300、1:350、1:400、1:450,在温度 40 $^{\circ}C$,pH6.7 的情况下,按 1.2.1 的方法分别对 β -CE 进行自组装,使用荧光分光光度计测定相对荧光强度来表示自组装分子在不同温度环境中的最佳组装条件。

1.2.2.3 pH 对 β -CE/CN 纳米复合物的影响 在 pH 分别为 6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4, β -CE 与 CN 质量比

为 1:300,pH6.7 的情况下,分别进行自组装,使用荧光分光光度计测定相对荧光强度来表示自组装分子在不同温度环境中的最佳组装条件。

1.2.3 β -CE/CN 纳米复合物粒径的测定 将 β -CE/CN 纳米复合物与对照组用激光粒度分析仪分析其粒径,对照组为将 200 mL 5% 的酪蛋白酸钠溶液定容至 400 mL。 β -CE/CN 纳米复合物粒径测定参照 Thiebaut 等人的方法^[10]。 β -CE/CN 纳米复合物按 1:10(v:v) 稀释,然后在室温下静置 1 h,接着用去离子水按 1:1000(v:v) 稀释,稀释液于 20 $^{\circ}C$ 用磁力搅拌器以 1000 r/min 的转速搅拌 30 min,取 100 mL 处理好的样品用激光粒度分析仪进行粒径分析。样品和水的折射率分别为 1.545 和 1.333。 β -CE/CN 纳米复合物粒径分布用直径 d_{43} 的值表示。 d_{43} 定义为 $\sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$ (其中 n_i 是脂肪球直径在 d_i 这一级别的脂肪球数量)。

1.2.4 β -CE/CN 纳米复合物的生物利用率

1.2.4.1 胰蛋白酶酶解产物的 SDS-PAGE 分析 将 β -CE/CN 纳米复合物中加入 2 g 胰蛋白酶,调 pH 至胰蛋白酶活性位点,37 $^{\circ}C$ 水浴条件下搅拌,分别在酶解 0、30、60、90、120 min 时取样并分别用 HCl 终止反应,将 5 个时间段所取样品进行 SDS-PAGE。

胰蛋白酶酶解产物采用 SDS-PAGE 进行分析,分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 5%,酶解产物用上样缓冲液稀释后取 10 μ L 点样于进样孔,电泳槽运行电压稳定在 120 V,分离的蛋白用考马斯亮兰进行染色 1h,然后用脱色液(冰乙酸:甲醇:水 = 7.5:7.5:85,v:v:v)进行脱色,最后经凝胶成像处理,水解产物分子量的确定通过与标准蛋白的分子量进行比较。

1.2.4.2 胃蛋白酶酶解产物的 SDS-PAGE 分析 将 β -CE/CN 纳米复合物中加入 0.5 g 胃蛋白酶,调 pH 至胃蛋白酶活性位点,37 $^{\circ}C$ 水浴条件下搅拌,分别在酶解 0、30、60、90、120 min 时取样并分别用 NaOH 终止反应,将 5 个时间段所取样品进行 SDS-PAGE,其条件同胰蛋白酶酶解产物的 SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 β -CE/CN 纳米复合物荧光强度测定结果分析

研究表明,酪蛋白与脂溶性分子 β -CE 相结合会使 β -CE 荧光基团发生淬灭,因此利用荧光分光光度计测得的 β -CE/CN 纳米复合物自组装分子的相对荧光强度会低于正常浓度的 β -CE 的相对荧光强度。根据相对荧光强度的大小能够表现出酪蛋白与 β -CE 的结合强度^[7]。

图 1~图 3 分别为温度、 β -CE 与 CN 质量比与 pH 对 β -CE/CN 纳米复合物影响的荧光强度结果图。图 1 中,当自组装温度在 28~40 $^{\circ}C$ 范围内,其荧光强度变化不大,因此温度在此范围内对 β -CE/CN 纳米复合物的结合强度影响较小,而当温度为 44、48 $^{\circ}C$ 时,其荧光强度显著增大。由此可知,温度超过 40 $^{\circ}C$ 时, β -CE/CN 纳米复合物的结合强度显著降低;从图 2 中可以看出,当 β -CE 与 CN 质量比为 1:300 时,其荧光强度最小, β -CE/CN 纳米复合物结合强度最大,当 β -CE 与 CN 质量比为 1:200 与 1:250 时,

β -CE/CN 纳米复合物结合强度略低于质量比为 1:300 时的结合强度,但差异并不显著,而当 β -CE 与 CN 质量比大于 1:300 时, β -CE/CN 纳米复合物结合强度显著降低($p < 0.05$),质量比超过 1:400 时结合强度的变化趋于稳定;由图 3 可知,pH 在 6.4~7.4 的范围内, β -CE/CN 纳米复合物的荧光强度值基本趋于稳定,在 pH 为 7 时其荧光强度稍有降低,但差异并不显著,因此可知,pH 对 β -CE/CN 纳米复合物的结合强度的影响不大。

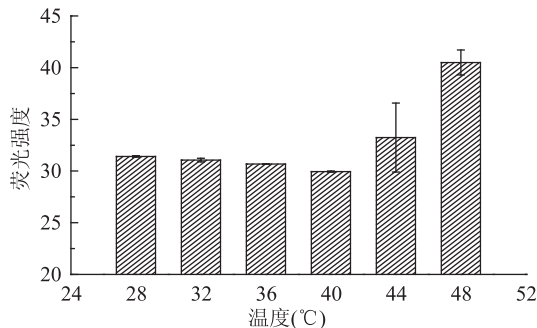


图1 温度对 β -CE/CN 纳米复合物影响的荧光强度

Fig.1 Effect of temperature on fluorescence intensity from β -CE/CN nanoparticle complex

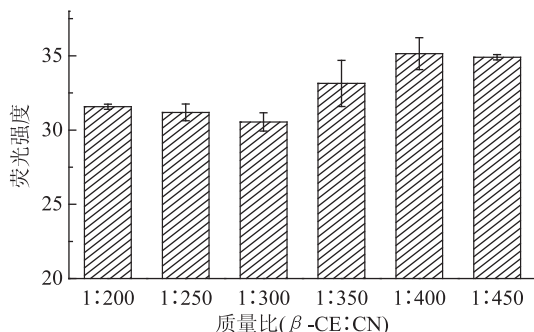


图2 β -CE 与 CN 质量比
对 β -CE/CN 纳米复合物影响的荧光强度

Fig.2 Effect of ratio of β -CE to CN

on fluorescence intensity from β -CE/CN nanoparticle complex

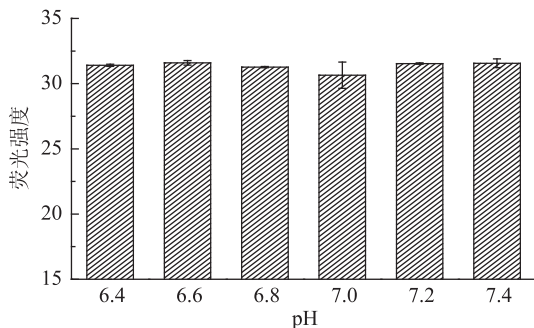


图3 pH 对 β -CE/CN 纳米复合物影响的荧光强度

Fig.3 Effect of pH on fluorescence intensity from β -CE/CN nanoparticle complex

2.2 β -CE/CN 纳米复合物粒径测定结果分析

图 4 是 β -CE/CN 纳米复合物及对照组的粒径分布情况,由图 4 可以看出, β -CE/CN 纳米复合物的平均粒径为 18.53 nm,酪蛋白酸钠的平均直径为 47.63 nm,经自组装的 β -CE/CN 纳米复合物的平均

粒径与对照组酪蛋白的平均粒径相比显著减小。该结果说明 β -CE 经酪蛋白自组装以后,酪蛋白与 β -CE 结合以后,其 β -CE 能更好的分散于水溶液中,提高了其水溶解度。

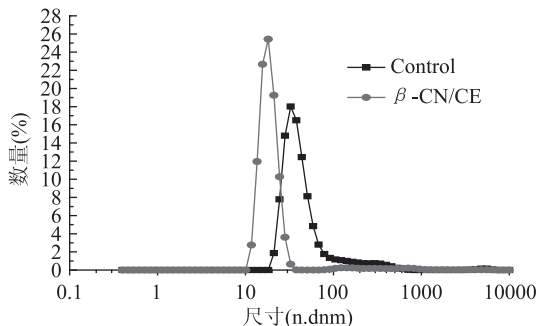


图4 β -CE/CN 纳米复合物与对照组酪蛋白粒径分布

Fig.4 Particle size distribution of β -CE/CN nanoparticle complex and casein

2.3 β -CE/CN 纳米复合物中 β -CE 的生物利用率

为了分析 β -CE/CN 纳米复合物中 β -CE 的生物利用率,本实验通过体外模拟肠道中胰蛋白酶和胃蛋白酶酶解 β -CE/CN 纳米复合物,以酪蛋白的降解来分析 β -CE 的释放。

图 5A 为胰蛋白酶酶解 β -CE/CN 纳米复合物产物的 SDS-PAGE 图,从该图可以看出,随着酶解时间的延长,分子量范围为 25.0~35.0 ku 的酪蛋白在 SDS-PAGE 中条带的密度逐渐降低,说明了酪蛋白的降解增大,说明了 β -CE 从 β -CE/CN 纳米复合物中释放率增加。

图 5B 为胃蛋白酶酶解 β -CE/CN 纳米复合物产物的 SDS-PAGE 图,从该图可以看出,胃蛋白酶解以

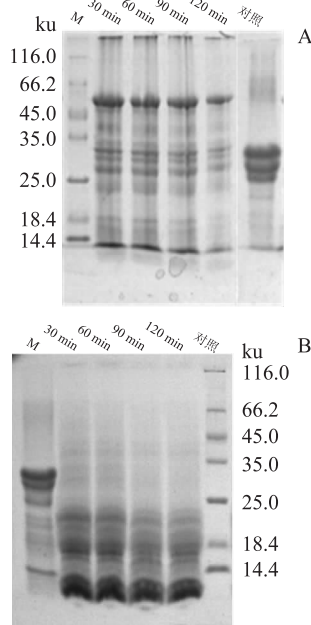


图5 胰蛋白酶和胃蛋白酶酶解 β -CE/CN 纳米复合物产物的 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE of enzymatic hydrolysis product from β -CE/CN nanoparticle complex by trypsin and pepsin

后,其酪蛋白条带几乎消失,而在酪蛋白条带的下面,出现了很多条带,说明了酪蛋白经胃蛋白酶解以后,产物中出现了更多的小分子量蛋白和肽。随着胃蛋白酶酶解时间的延长,小分子量蛋白的密度降低,说明产物中有更多的小分子量蛋白和肽,随着蛋白的不断酶解, β -CE 也会逐渐释放出来。

3 结论

在特定的条件下, β -胡萝卜素与酪蛋白能够形成 β -CE/CN 纳米复合物,实验中分别测定了不同温度 β -CE 与 CN 质量比、pH 对 β -CE/CN 纳米复合物形成的影响,温度高于 40℃ 与 β -CE 与 CN 质量比大于 1:300 时不利于 β -CE/CN 纳米复合物的形成,而 pH 对 β -CE/CN 纳米复合物的形成没有显著的影响。 β -CE/CN 纳米复合物的平均粒径小于酪蛋白,说明 β -CE 经酪蛋白自组装后,提高了 β -CE 的水溶性。体外模拟胰蛋白酶和胃蛋白酶酶解作用的结果显示,随着酶解时间的延长,酪蛋白被酶解的量增加,表明 β -CE 从 β -CE/CN 纳米复合物中会更多的释放出来,提高了 β -CE 的生物利用率。

参考文献

- [1] Yoav D. Milk protein as vehicles for bioactives [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010, 15: 73-83.
- [2] Semo E, Kesselman E, Danino D, et al. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals [J]. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21: 936-942.
- [3] Zimet P, Rosenberg D, Livney Y D. Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for u-3

(上接第 67 页)

给药时,应与注射液复水后立即使用。

参考文献

- [1] Bai C Q, Luo G W, Liu Y Z, et al. A comparison investigation of coix seed oil liposomes prepared by five different methods [J]. *Journal of Dispersion Science and technology*, 2015, 36: 136-145.
- [2] Fan M, Xu S Y, Xia S Q, et al. Effect of different preparation methods on physicochemical properties of salidroside liposomes [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2007, 55: 3089-3095.
- [3] Mozafari M R, Johson C, Hatziantoniou C, et al. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology [J]. *Journal of Liposome Research*, 2008, 18: 309-327.
- [4] 郑杭生,黄绳武,李范珠,等.盐酸青藤碱脂质体的制备工艺研究[J]. *中药学*, 2013, 44: 408-413.
- [5] 吴广通,张夏华,李凤前.改善中药挥发油稳定性的制剂学研究进展[J]. *药学服务与研究*, 2008, 8: 197-200.
- [6] Laye C, McClements D J, Weiss J. Formation of Biopolymer-Coated Liposomes by Electrostatic Deposition of Chitosan [J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73: 7-15.
- [7] Bai C Q, Peng H L, Xiong H, et al. Carboxymethylchitosan-coated proliposomes containing coix seed oil: characterization, stability and *in vitro* release evaluation [J]. *Food Chemistry*, 2011,

- polyunsaturated fatty acids [J]. *Food Hydrocolloid*, 2011, 25: 1270-1276.
- [4] Bargarum J, Danino D, Livney Y D. Nanoencapsulation of vitamin D in beta casein micelles. Poster presentation at the IFT 2009 Annual Meeting Anaheim, CA, USA, June 2009.
- [5] Maria J, Saiz A, Carolina G F, et al. Thermal protein of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologie applied in food industry. 2013: 138, 1581-1587.
- [6] Yi J, Li Y, Zhong F, et al. The physicochemical stability and *in vitro* bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 35: 19-27.
- [7] Martin A, Mattea F, Gutierrez L, et al. Co-precipitation of carotenoids and bio-polymers with the supercritical anti-solvent process [J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2007, 41: 138-147.
- [8] Avi S, Yifat C, Yoav D. Thermally-induced β -lactoglobulin-EGCG nanovehicles: Loading, stability, sensory and digestive-release study [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 29: 57-67.
- [9] Maria S, Carolina G F, Ana M R, et al. Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138: 1581-1587.
- [10] Thiebaud M, Dumay E, Picart L, et al, Cheftel J C. High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation [J]. *International Dairy Journal*, 2003 (13): 427-439.
- [11] 孔小宇,刘宁. β -乳球蛋白-番茄红素自组装分子抗消化性的研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(3): 60-67.
- 129: 1695-1702.
- [8] Karadag K, Özçelik B, Sramek M, et al. Presence of Electrostatically Adsorbed Polysaccharides Improves Spray Drying of Liposomes [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78: 206-221.
- [9] Zhao L P, Xiong H, Peng H L, et al. PEG-coated lyophilized proliposomes: preparation, characterizations and *in vitro* release evaluation of vitamin E [J]. *European Food Research and Technology*, 2011, 232: 693-702.
- [10] 仲跻云,陈梁,杨肖斌.口服前体脂质体的研究进展[J]. *药学与临床研究*, 2012, 20: 56-59.
- [11] 白春清,熊华,罗国伟,等.羧甲基壳聚糖包覆薏苡仁油脂质体的制备及质量评价[J]. *中国油脂*, 2013, 38: 35-40.
- [12] 杨瑞.紫杉醇长循环热敏脂质体的研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2006.
- [13] Xia S Q, Xu S Y, Zhang X M. Optimization in the preparation of coenzyme Q10 nanoliposomes [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006, 54: 6358-6366.
- [14] Chen X G, Wang Z, Liu W S, et al. The effect of carboxymethyl chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts [J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 4609-4614.
- [15] 白春清.羧甲基壳聚糖包覆薏苡仁油前体脂质体的制备稳定性及体外释放研究[D].南昌:南昌大学,2011.