

# 水溶性的抗菌小麦醇溶蛋白纳米粒子构建及性能研究

王丽娟<sup>1</sup>, 胡二坤<sup>2</sup>, 尹寿伟<sup>1</sup>, 杨晓泉<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院食物蛋白工程研究中心, 广东广州 510640)

(2. 河南职业技术学院烹饪食品系, 河南郑州 450046)

**摘要:** 本研究围绕小麦醇溶蛋白 (gliadin) 自组装展开, 以 NaCas 作为稳定剂利用水相反溶剂过程中 gliadin 与 thymol 共组装构建水溶性的抗菌 gliadin/NaCas 胶体粒子。利用纳米粒度仪、扫描电镜等技术手段表征纳米粒子的形貌、尺度, 并研究了 thymol 的释放动力学及纳米粒子的持续抗菌性能。Gliadin/NaCas 胶体粒子是纳米尺度的球形颗粒, 尺度均一 (PDI=0.31)。此类纳米粒子具有良好的水溶性及冻干复溶性, 荷载疏水类抗菌剂 (thymol) 不影响胶体粒子的复溶性能。Gliadin/NaCas 胶体粒子具有很强的荷载和控释能力, thymol 与 gliadin 比例介于 1:10~3:4 时胶体粒子的尺度仅略有增加 (从约 270 nm 增加至约 300 nm), thymol 的封装率高达 96%; 经过 7 d 释放, 仅释放约 30% 的 thymol。Gliadin/NaCas 纳米粒子在模拟食品体系中具有持续抗菌能力。本研究为功能性抗菌食品配料的研制提供全新的技术解决手段。

**关键词:** 小麦醇溶蛋白/酪蛋白酸钠纳米粒子; 百里香酚; 抗菌纳米粒子; 水溶性; 控释; 形貌学

文章编号: 1673-9078(2014)5-1-5

## Fabrication and Characterization of Water-soluble Antimicrobial Gliadin Nanoparticles

WANG Li-juan<sup>1</sup>, HU Er-kun<sup>2</sup>, YIN Shou-wei<sup>1</sup>, YANG Xiao-quan<sup>1</sup>

(1. Research and Development Center of Food Proteins, Department of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2. College of Cooking and Food, Henan Polytechnic, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract:** The objective of this work is to fabricate water-soluble and antimicrobial gliadin nanoparticles stabilized by sodium caseinate (NaCas) via the synchronous-assembly process of thymol and gliadin during the anti-solvent approach. Morphological attributes, particle size, antimicrobial properties as well as release profiles of thymol-loaded nanoparticles were investigated. The gliadin/NaCas nanoparticles were spherical in shape and uniform with PDI value of 0.31, possessing the water-solubility and re-dispersibility after freeze-drying. Thymol loading resulted in a slight increase in particle size from ~ 270 nm to ~300 nm at the thymol-to-gliadin ratios of 1:10~3:4, but did not affect the re-dispersibility of the nanoparticles. Moreover, these nanoparticles had strong encapsulation capacity, and the encapsulation efficiency (EE) of thymol was as high as 96%. The nanoparticles sustained the release of thymol, and the accumulative release after 7 day was about 30%. These nanoparticles were also effective in delaying the growth of *Staphylococcus aureus* in M-H broth at 37 °C. This work opens a promising pathway for the manufacture of water-soluble vehicle for antimicrobials to design novel antimicrobial food formulation.

**Key words:** gliadin/NaCas nanoparticles; thymol; water-solubility; morphology; sustained release; antimicrobial nanoparticles

食品加工、运输和储藏环节中致病菌污染是造成食源性疾病的主要因素。在食品配方中添加抗菌剂等

收稿日期: 2014-01-16

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (S2013010012097); 华南理工大学中央高校基本科研业务费滚动项目 (2014ZG0021)

作者简介: 王丽娟 (1963-), 女, 博士, 副教授, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究

通讯作者: 尹寿伟 (1980-), 男, 博士, 主要从事新型食品包装材料研究

传统方法具有局限性, 如植物精油类抗菌剂影响食品的风味及蛋白 (肽) 类抗菌剂与食品组分反应而快速失效<sup>[1]</sup>。建纳 (微) 米尺度的抗菌剂输送载体为解决食品货架期内中有害微生物污染引起食品安全问题提供新技术途径。美国田纳西大学的钟启新教授的研究小组利用超临界反溶剂、喷雾干燥造粒技术合成了微米尺度的、以 zein 为壁材的微胶囊作为溶菌酶、nisin 和 thymol 等的输送载体<sup>[2-3]</sup>。但是所形成的微米尺度

微胶囊不溶于水, 在水相中易团聚和沉淀, 限制其在食品工业中的应用。水相反溶剂一项简单、方便的制备纳(微)米尺度胶体粒子的技术手段, 但是传统方法费时、效力低。最近, 我们小组建立了快速反溶剂和可连续化的对撞式反溶剂技术, 并利用酪蛋白酸钠(NaCas)稳定 zein 获得水溶性的 zein/NaCas 胶体粒子<sup>[4-5]</sup>。利用水溶性胶体粒子作为抗菌剂的输送载体为提升食品安全性提供了新思路。

小麦醇溶蛋白(gliadin)是大宗粮油加工副产物谷朊粉的主要成分之一。Gliadin 是一类疏水性醇溶蛋白, 具有两亲性, 溶剂极性改变会引发由两亲性驱动的 gliadin 分子自组装形成纳/微米尺度的胶体粒子。目前, 国内外在小麦醇溶蛋白粒子输送载体的研究方面主要为合成高分子聚合物表面活性剂(Synperonic® PE/F 68)稳定的(亚)微米尺度的胶体粒子<sup>[6-7]</sup>。此类胶体粒子适合作为药物载体, 不能用在食品体系中。

NaCas 是 FDA 批准的 GRAS 原料, 是一类优良的乳化剂/稳定剂<sup>[8]</sup>。我们以前的研究表明 NaCas 可以吸附在 zein 胶体粒子表面, 通过空间位阻及静电效应稳定胶体粒子而获得水溶的 zein/NaCas 胶体粒子<sup>[5]</sup>。本研究围绕小麦醇溶蛋白自组装展开, 以 NaCas 作为稳定剂利用水相反溶剂过程中 gliadin 与 thymol 共组装构建水溶性的抗菌的 gliadin/NaCas 胶体粒子, 并表征胶体粒子的形貌、尺度、表面性质、抗菌剂性能和控释能力。本研究为功能性抗菌食品配料的研制提供全新的技术解决手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与设备

#### 1.1.1 材料

小麦谷朊粉, 购自超市; 百里香酚(thymol 95%), 购自 sigma 公司; 酪蛋白酸钠, 购自澳洲 MG 公司; 其他化学试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 主要仪器

LEO 1530 VP 扫描电镜, 德国 LEO 公司; Q100-DSC 热分析仪, 美国 TA 公司; Nano-ZS 型 Zeta-电位及纳米粒度仪, 英国 Malvern 公司; DELTA 冷冻干燥机, Christ 公司; T25 高速均质机, 德国 IKA 公司; RV10 型旋转蒸发仪, 德国 IKA 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 小麦醇溶蛋白的提取

称取 100 g 谷朊粉, 加入 1000 mL 70%乙醇溶液, 磁力搅拌下提取 2 h, 离心(10000 r/min, 20 min),

弃沉淀。上清液先经去离子水透析 24 h, 0.5%乙酸透析 24 h, 再用去离子水透析 24 h, 之后冷冻干燥得到小麦醇溶蛋白。

#### 1.2.2 纳米粒子的制备

采用反溶剂方法制备 gliadin 纳米粒子。将一定量的 thymol 和 zein 溶于 20 mL 70%的乙醇溶液中, 按照 Thymol:gliadin 比分别为 0、1:10、1:5、3:10、3:8、3:4。在剪切条件下(10000 r/min), gliadin-thymol 溶液以细流状加到 50 mL 1% NaCas 水溶液, 用旋转蒸发器除去大多数的乙醇, 经 4000 r/min 离心 10 min 除少量不溶物, 冷冻干燥后即的纳米粒子粉末; 纳米粒子的得率为冷冻干燥后的样品质量占总固形物质量百分比。

#### 1.2.3 纳米粒子粒度和电位的测定

用 nano-ZS 纳米粒度仪测定纳米粒子的粒度和 Zeta 电位, 纳米粒子浓度为 0.5 mg/mL。采用 V4.20 Dispersion Technology 软件(DTS)分析结果。

#### 1.2.4 纳米粒子的得率及 thymol 包封率的测定

称取 10 mg 纳米粒子粉末, 用 1 mL 乙酸乙酯萃取游离的 thymol(500 r/min, 1 min), 离心(10000 r/min, 5 min), 取出上清, 萃取 3 次。采用比色法测定含量上清液中的 thymol 浓度, 在其特征吸收峰 276 nm 波长下测定吸光值, 计算得到游离百里香酚质量<sup>[5]</sup>。Thymol 包封率计算方法如下:

百里香酚的包埋率(%)=1-(游离 thymol 质量)/(加入 thymol 质量)

#### 1.2.5 纳米粒子微结构的观察

喷金后用 LEO 1530 VP 场发射扫描电镜观察纳米粒子的微观结构。

#### 1.2.6 示差扫描量热分析(DSC)

采用 TA Q100-DSC 表征百里香酚包埋前后的特征吸热峰, 测试时加入氮气为保护气体。分别精确称量 2 mg 纳米粒子粉末放入铝盘中, 设定升温速率为 20 °C/min, 扫描温度范围是 25~100 °C。采用软件 Universal Analysis 2000 分析吸热峰( $T_m$ )。

#### 1.2.7 Thymol 释放动力学研究

准确称取 50 mg 纳米粒子粉末, 并将其溶于 5 mL 去离子水, 将得到的纳米粒子溶液转移到透析袋中(截留分子量 7~8 kDa), 并将其放入盛有 45 mL 超纯水的烧杯中, 在常温下不断搅拌透析。每隔 24 h 取出 2.5 mL 溶液, 同时补充 2.5 mL 的去离子水。取出的透过液在 276 nm 下测定吸光值, 通过制标准曲线计算百里香酚浓度, 取三次平均值<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.8 纳米粒子的持续抑菌研究

通过测定溶液中存活的目标菌的菌落总数 (CFU) 来测定纳米粒子的持续抗菌能力。以金黄色葡萄球菌 (ATCC-6538) 作为待测微生物。在 37 °C 下的 M-H 营养肉汤培养基中培养 24 h。将纳米粒子悬浮液加入 10 mL 的 pH 7.4 的 M-H 营养肉汤中, 并加入 100 μL 事先稀释到 6.0 log(cfu/mL) 的金黄色葡萄球菌液。在培养基中的 thymol 浓度为 0.5 mg/mL, 未加纳米粒子的培养液作为对照。在 37 °C 下, 采集经过 0、1、3、5、7 和 9 d 培养的样品, 通过琼脂-MH 营养肉汤平板计数法测定其中的菌落总数 (CFU)。

### 1.3 统计性分析

采用 SPSS 17.0 系统进行数据的显著性分析, 显著性差异采用 95% 的置信区间进行一维方差分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Gliadin/NaCas 纳米粒子的形成、尺度及表面电位

#### 表面电位

在反溶剂过程中, gliadin 以细流状加入到 NaCas 水溶液中, 机械剪切力将 gliadin 溶液撕裂破碎形成小液滴, 伴随乙醇向水相的扩散迁移, 造成 gliadin 微环境的极性增加, 而引发由分子两亲性驱动的自组装形成 gliadin 纳米粒子, 同时 NaCas 向 gliadin 纳米粒子表面迁移, 并通过静电和空间位阻效应稳定 gliadin 胶体粒子, 进而形成稳定胶体粒子。图 1 为经冷冻干燥纳米粒子的复溶液外观。Gliadin/NaCas 纳米粒子溶液

是澄清透明的, 并带有明显的乳光 (图 1A)。在 thymol 与 gliadin 比为 1:10~3:4 范围内, 纳米粒子溶液依然是澄清透明的, 表明荷载 thymol 的胶体粒子具有良好的复溶性 (图 1BC)。

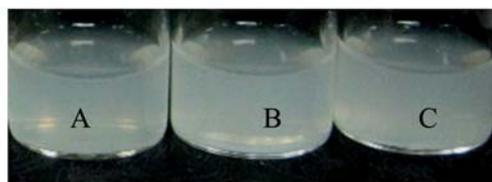


图 1 纳米粒子复溶解后的照片 (0.1%wt)

Fig. 1 Representative photograph of the re-dispersed gliadin/NaCas nanoparticles powder

注: A 不含百里香酚; B thymol: gliadin 比为 1:10; C thymol:gliadin 比为 3:4。

Gliadin/NaCas 胶体粒子的纳米尺度的球形颗粒状 (表 1; 图 2)。胶体粒子的粒径介于 264.13~301.87 nm, PDI 小于 0.4。荷载 thymol 对胶体粒子粒径的影响依赖于荷载比, 荷载少量 thymol 胶体粒子的粒径略有下降, 这是由于酚类通过疏水相互作用改变 gliadin 的自组装行为, Patel 等研究 zein-curcumin 胶体粒子报道相似结果<sup>[9]</sup>。提高 thymol 与 gliadin 比, 所得胶体粒子的粒径变大, 可能是由于高浓度的 thymol 起到桥联作用引发 gliadin 纳米粒子的聚集。Gliadin/NaCas 胶体粒子的电位介于 -24 和 -30 mV 之间, 支持 NaCas 通过静电排斥力稳定 gliadin 胶体粒子。

### 2.2 胶体粒子的得率及对 thymol 的包封率

表 1 纳米粒子粒度与表面 zeta 电位实验结果

Table 1 Effect of ion strength on Gliadin/SC-Thy nanoparticles zeta potential

Thy:gliadin	粒度/nm	PDI	电位/mV	得率/%	包封率/%
0	272.46±1.01 <sup>c</sup>	0.31±0.01 <sup>cb</sup>	-29.12±0.71 <sup>c</sup>	73.16±1.39 <sup>a</sup>	-
1:10	264.13±3.82 <sup>d</sup>	0.27±0.03 <sup>c</sup>	-24.38±0.35 <sup>a</sup>	70.92±2.46 <sup>a</sup>	97.07±0.13 <sup>c</sup>
1:5	276.85±2.36 <sup>cb</sup>	0.33±0.02 <sup>ba</sup>	-28.21±1.57 <sup>b</sup>	71.33±2.92 <sup>a</sup>	99.51±0.11 <sup>a</sup>
3:10	282.44±2.24 <sup>b</sup>	0.31±0.04 <sup>cb</sup>	-29.75±1.11 <sup>c</sup>	68.17±5.21 <sup>a</sup>	99.79±0.19 <sup>a</sup>
3:8	301.41±6.27 <sup>a</sup>	0.38±0.01 <sup>a</sup>	-29.33±4.04 <sup>b</sup>	67.32±3.9 <sup>a</sup>	98.09±0.14 <sup>b</sup>
3:4	301.87±1.63 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>d</sup>	-24.62±0.43 <sup>a</sup>	65.22±3.38 <sup>a</sup>	96.55±0.16 <sup>d</sup>

注: 各列中不同上标字母 (a~c) 表示差异显著。

荷载 thymol 的 gliadin/NaCas 纳米粒子的得率和包封率如表 1 所示。Gliadin/NaCas 纳米粒子的得率为 65%~74%, 随 thymol 荷载量增加, 略有下降, 与胶体粒子的粒径增加是一致的 (表 1)。Gliadin/NaCas 纳米粒子对 thymol 具有极强的荷载能力, thymol 荷载比例从 1:10 增加到 3:4, 其包封率依然维持在 96.0% 以上 (表 1)。以前的研究表明 zein 纳米粒子对 thymol

的包封率随荷载比从 0.1 增加到 0.4 (thymol:gliadin), 由 96.0% 降低到 77.5%<sup>[5]</sup>。Patel 研究表明 zein/NaCas 胶体粒子对姜黄色素的包封率为 71%~86.9%<sup>[9]</sup>。因此, Gliadin/NaCas 纳米粒子具有更强的包封能力, 这可能与 gliadin 与疏水类活性物的相互作用有关, 两者间更具亲和力。Gliadin/NaCas 纳米粒子体系为新型营养物质、药物和抗菌剂的包埋输送提供了新的途径。

### 2.3 胶体粒子的形貌特征

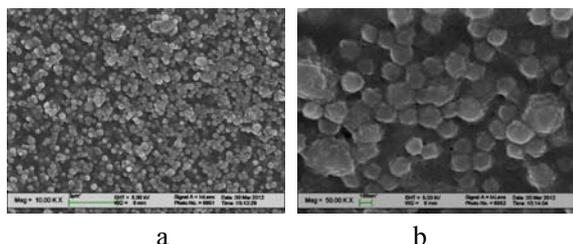


图2 典型的 gliadin/NaCas 纳米粒子场发射扫描电子显微镜观察结果

Fig.2 SEM images of gliadin/NaCas nanoparticles at Thymol-to-gliadin ratio of 3:8

注: a-放大 10000 倍; b-放大 50000 倍 SEM。

SEM 图片显示: 荷载 thymol 的 gliadin/NaCas 纳米粒子是球形粒子, 粒径平均为 200~300 nm, 与动态光散射测量粒径的结果相比, 粒径稍小, 这是由于在粒子干燥后会有一定收缩的结果。SEM 图片中的个别粒子较大, 可能是由于在反溶剂形成粒子的过程中 gliadin 的乙醇溶液被分散成较大的液滴, 形成了大一些的粒子, 或者是由于小粒子聚集成为大的粒子。

### 2.4 DSC 分析

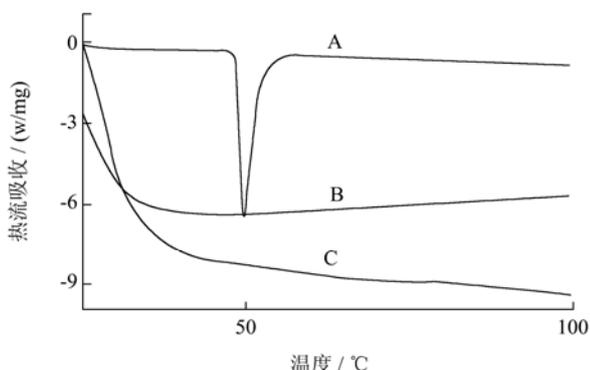


图3 百里香酚粉末; (A) 及荷载百里香酚; (B) 未荷载百里香酚; (C) 纳米粒子的 DSC 曲线

Fig.3 Typical DSC profiles of thymol (A), gliadin/NaCas nanoparticles with (B) or without (C) thymol

采用热分析 (DSC) 研究在包埋后 thymol 的形态变化规律。在游离 thymol 的 DSC 曲线上, 吸热峰位于 50 °C, 为 thymol 晶体融化时的特征峰<sup>[10]</sup>。而荷载 thymol 的 gliadin/NaCas 纳米粒子的 DSC 曲线上未出现吸热峰, 表明在纳米粒子中 thymol 不是以无定型结构形态存在。Gliadin 是一类疏水性醇溶蛋白, 反溶剂过程 gliadin 与 thymol 共组装, thymol 主要为位于纳米粒子的疏水性腔体中。DSC 数据进一步印证了

gliadin/NaCas 纳米粒子对 thymol 具有极高的包封率。

### 2.5 Thymol 的释放动力学

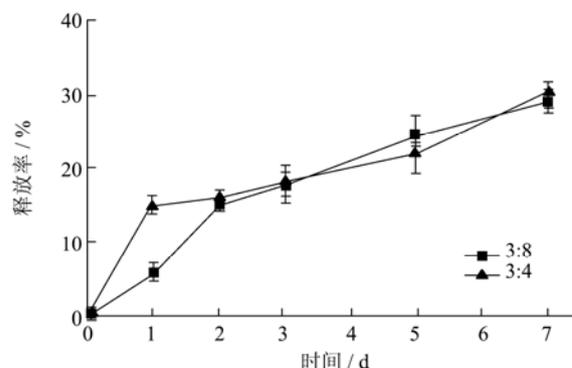


图4 gliadin/NaCas 纳米粒子对百里香酚控释性;

Fig. 4 Kinetic release profiles of thymol for gliadin/NaCas nanoparticles in de-ionized water

注: Thymol/gliadin 比为 3:8 和 3:4。

图4为 gliadin/NaCas 纳米粒子中 thymol 的释放动力学曲线。Thymol 释放曲线可分为两个阶段: 快速释放阶段和缓慢释放阶段。快速释放阶段, thymol 的释放速率与 thymol 荷载量有关。释放 24 h 后, thymo:gliadin 比为 3:4 的纳米粒子的释放量迅速增加到 15%, 而 thymo:gliadin 比为 3:8 的纳米粒子中仅 6% thymol 释放。之后, 前者进入缓释阶段, 后者再经过 1 天释放, 释放率达到 15%, 之后进入缓释阶段。在缓慢释放阶段, 两者的释放曲线是相似的, 经过 7 d 释放约有 30% 的 thymol 从纳米粒子中释放出来 (图4)。

Thymol 扩散迁移规律决定其在胶体粒子中的分布, 进而控释 thymol 的释放规律。经过反溶剂后纳米粒子悬浮液中的乙醇浓度约为 20%<sup>[5]</sup>。在反溶剂过程中, 部分 thymol 与 gliadin 共组装包埋在胶体粒子的疏水腔体, 余下部分 thymol 位于胶体粒子表面 (通过疏水相互作用) 或粒子间 (存在乙醇)。在溶剂蒸发的过程中, 溶液极性提高使 thymol 向 gliadin 疏水腔体扩散和迁移。在 zein/NaCas 胶体粒子制备过程报道相似的现象<sup>[5]</sup>。快速释放阶段归属为吸附在胶体粒子表面或近表面区域的 thymol 的迁移和释放; 而缓慢释放阶段为位于内部疏水腔体的 thymol 向外的快速迁移。

大豆蛋白微球 (亲水) 控释体系, 1 h 后核黄素释放比例达到 50%<sup>[11]</sup>。酪蛋白酸钠微球 (亲水) 控释体系, 模型药物在 15 min 后释放比即达 90%<sup>[12]</sup>。疏水性胶体粒子 (zein/NaCas) 输送体系, 6.5 h 后 thymol 的释放率为 30~40%<sup>[5]</sup>。因此, gliadin/NaCas 胶体粒子具有很强的控释能力, 这与 gliadin 分子组成、结构和自

组装规律有关。

## 2.6 抗菌能力

为了研究荷载 thymol 的纳米粒子在液体食品中的抑菌效果,研究了液体培养基中的活菌数量随时间的变化规律。液体培养基中活菌技术选取金黄色葡萄球菌作为待测微生物。对照样品(control)中的活菌总数从 4.0 log(cfu/mL)迅速增加到 9.6 log(cfu/mL)以上,9 d 内缓慢下降到 8.6 log(cfu/mL)(图 4~6)。加入荷载 Thymol:gliadin 比为 3:4 的 gliadin/NaCas 纳米粒子(图 G120)后的培养基中活菌数比对照样品小约 1 个数量级,抑制了金黄色葡萄球菌的生长,显示出一定的持续抗菌效果。

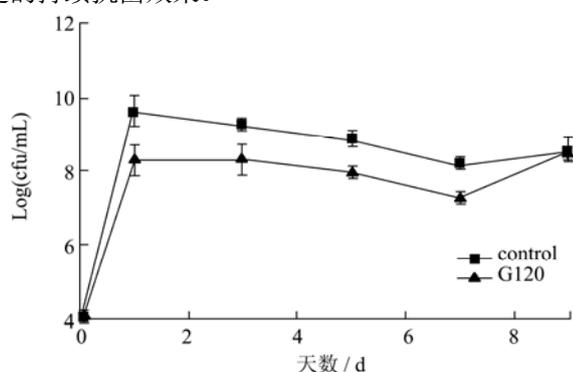


图 5 培养基中金黄色葡萄球菌 (cfu 曲线)

Fig.5 Antibacterial activity of thymol-loaded gliadin/NaCas nanoparticles by bacteria colony forming units (CFU) analysis

## 3 结论

3.1 以 NaCas 为稳定剂构建了水溶性的 Gliadin/NaCas 纳米粒子,并利用反溶剂过程中的 gliadin 与 thymol 共组装的制备了抗菌的纳米粒子,此类纳米粒子具有很强的荷载能力,thymol 的包封率超过 96%。

3.2 Gliadin/NaCas 纳米粒子对 thymol 具有很强的控释能力和适度的持续抗菌能力,此类抗菌粒子在液态食品中很好的应用前景。

## 参考文献

[1] Kerry JP, O'Grady MN, Hogani SA. Past, current and potential utilization of active and passive packaging systems for meat and muscle-based products: A review [J]. Meat Science, 2006, 74, 113-130

[2] Zhong Q X, Jin M F. Nanoscalar structures of spray-dried zein microcapsules and in vitro release kinetics of the encapsulated lysozyme as affected by formulations [J]. J. Agri. Food Chem., 2009, 57: 3886-3894

[3] Zhong Q, Jin M, Davidson, et al. Sustained release of lysozyme from zein microcapsules produced by a supercritical antisolvent process [J]. Food Chem., 2009, 115: 697-700

[4] Li KK, Zhang X, Huang Q, et al. Continuous preparation of zein colloidal particles by Flash NanoPrecipitation (FNP) [J]. J. Food Eng., 2014, 127: 103-110

[5] Li KK, Yin SW, Yin YC, et al. Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization [J]. J. Food Eng., 2013, 119: 343-352

[6] Ezpelleta I, Irache J M, Stainmesse S, et al. Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid [J]. Int. J. Pharm., 1996, 131: 191-200

[7] Duclairoir C, Irache J M, Nakache E, et al. Gliadin nanoparticles: formation, all-trans-retinoic acid entrapment and release, size optimization [J]. Polym. Int., 1999, 79: 327-333

[8] Dickinson E. Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments [J]. J. Dairy Sci., 1997, 80: 2607-2619

[9] Patel A, Hu Y C, Tiwari J K, et al. Synthesis and characterisation of zein-curcumin colloidal particles [J]. Soft Matter, 2010, 6: 6192-6199

[10] Ponce Cevallos P A, Buera M P, Elizalde B E. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in cyclodextrin: effect of interactions with water on complex stability [J]. J. Food Eng., 2010, 99: 70-75

[11] Chen L, Subirade M. Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery [J]. Biomacromolecules, 2009, 10(12): 3327-3334

[12] Fieclan B A, Corrigan O I. In vitro analysis of the release of incorporated agents from sodium caseinate microspheres [J]. Journal of Microencapsulation, 1997, 14(1): 63-78