

不同电荷阴离子多糖对负载单宁酸的玉米醇溶蛋白纳米颗粒的稳定作用

梁晓¹, 胡勇², 徐金瑞², 胡坤^{2*}

(1. 广东药科大学公共卫生学院, 广东广州 510006) (2. 广东药科大学食品科学院, 广东中山 528458)

摘要: 以反溶剂法制备负载单宁酸的玉米醇溶蛋白纳米颗粒 (Tannic acid loaded zein nanoparticles, TZP), 将 TZP 分散液按 1:2 体积比分散至 pH 4.0 的多糖溶液, 研究带有不同表面电荷数的阴离子多糖海藻酸丙二醇酯 (Propylene glycol alginate, PGA)、阿拉伯胶 (gum Arabic, GA)、高酯果胶 (High methoxy pectin, HMP)、低酯果胶 (lowmethoxy pectin, LMP) 对纳米颗粒稳定性的影响。结果表明, 低浓度多糖使得颗粒表面电荷降低, 导致纳米颗粒沉淀, 其中 PGA、GA、HMP 稳定颗粒所需的最低浓度为 0.055% (*m/V*), 而 LMP 所需的最低浓度为 0.022% (*m/V*)。TZP/多糖复合纳米颗粒随 pH 和 NaCl 稳定性的变化是由阴离子多糖的 ζ -电位导致, 电位较低的 GA 在 pH 2.0、6.0、6.5 及低浓度 NaCl 浓度时均会导致纳米颗粒沉淀, 而电位最强的 LMP 在 pH 2.0~8.0 范围内均能够稳定纳米颗粒, 在氯化钠浓度为 30 mmol/L 时颗粒发生沉淀。经冷冻干燥, TZP/LMP 纳米颗粒得率可达 95.10%, 此时单宁酸负载率为 88.97%, 单宁酸含量为 5.39%。该研究表明玉米醇溶蛋白/低酯果胶纳米颗粒可用于亲水性生物活性物质的包埋与输送, 可望用于保健食品及医药行业。

关键词: 单宁酸; 玉米醇溶蛋白; 阴离子多糖; 纳米颗粒

文章编号: 1673-9078(2022)05-174-182

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0801

Stabilization of Tannic Acid-loaded Zein Nanoparticles by Anionic Polysaccharides with Different Charges

LIANG Xiao¹, HU Yong², XU Jinrui², HU Kun^{2*}

(1.School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

(2.School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

Abstract: Tannic acid-loaded zein nanoparticles (TZP) were fabricated by the anti-solvent method, and the TZP dispersion was dispersed into a polysaccharide solution with a pH of 4.0 at a volume ratio of 1:2. The effects of different anion-charged polysaccharides (propylene glycol alginate, PGA; gum Arabic, GA; high-methoxyl pectin, HMP; low-methoxyl pectin, LMP) on the stability of TZP were investigated. The results showed that the polysaccharide at a low concentration decreased the surface charge of particles, causing the precipitation of nanoparticles, with the minimum concentration required to stabilize the particles being 0.055% (*m/V*) for PGA, GA and HMP, and 0.022% (*m/V*) for LMP. The changes in the stability of TZP/polysaccharide composite nanoparticles with pH or NaCl were associated with the ζ -potential of anionic polysaccharides. GA with a lower potential led to the precipitation of nanoparticles at pH 2.0, 6.0 or 6.5 and a low NaCl concentration, whereas, LMP with the highest potential stabilized the nanoparticles in the pH range of 2.0~8.0, with the particles precipitating at a sodium chloride concentration of 30 mmol/L. After freeze-drying, the yield of TZP/LMP nanoparticles reached 95.10% with the tannic acid loading rate as 88.97% and tannic acid content as 5.39%. The research showed that zein/LMP nanoparticles could be used for encapsulating and delivering hydrophilic bioactive compounds, which are expected to be used in the functional food or pharmaceutical industries.

引文格式:

梁晓,胡勇,徐金瑞,等.不同电荷阴离子多糖对负载单宁酸的玉米醇溶蛋白纳米颗粒的稳定作用[J].现代食品科技,2022,38(5):174-182

LIANG Xiao, HU Yong, XU Jinrui, et al. Stabilization of tannic acid-loaded zein nanoparticles by anionic polysaccharides with different charges [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 174-182

收稿日期: 2021-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31771920)

作者简介: 梁晓 (1992-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 功能性食品, E-mail: lxlx18@126.com

通讯作者: 胡坤 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物活性物质输送体系、食品生物大分子与胶体科学, E-mail: huk88@126.com

Key words: tannic acid; zein; anionic polysaccharide; nanoparticles

单宁酸是一类天然多酚类物质,普遍存在于中草药植物的树皮或者果实中^[1]。单宁酸含有较多的酚羟基,具有一系列独特的化学特性和生理活性^[2],如可以与蛋白质、多糖、生物碱等发生相互作用,具有抗氧化^[3]、抗肿瘤^[4]、抗菌^[5]、抗诱变特性^[6]等活性。然而,单宁酸的生物活性和副作用与摄入量有关。膳食中摄入低剂量单宁酸可以对 C3H 雄性小鼠自发性肝肿瘤的形成产生强烈的剂量依赖性化学预防活性(高达 87%)^[7],或抑制肿瘤细胞蛋白酶体活性^[8];但高剂量单宁酸能抑制铁的吸收,也会抑制酶的活性^[9]。兔的口服单宁酸实验表明,单宁酸主要在胃肠道吸收,并且在 24 h 内被代谢和排泄^[10]。因此,将单宁酸包埋于输送载体中,在消化道中可控释放,是持续发挥单宁酸活性及避免高剂量副作用的有效方式。Neculai 等^[10]用壳聚糖微球、壳聚糖与海藻酸钠静电复合物、壳聚糖与羧甲基纤维素的静电复合物微球负载单宁酸,研究其不同 pH 环境下的释放单宁酸的动力学,三种微球对单宁酸的负载效率分别为 14%、28.9%、6.3%。这是由于单宁酸是水溶性小分子,当与水溶性高分子溶液混合后采用沉积的方法制备多糖颗粒时,大部分的单宁酸仍保留在水中,导致负载效率低下。

在以蛋白质为输送载体的体系中,单宁酸常被用于交联强化蛋白质之间的聚集^[11-13],而鲜见以蛋白质为载体负载单宁酸的研究。利用水溶性蛋白质包埋单宁酸需要特殊处理(如热处理),也会存在包埋效率低下的问题。玉米醇溶蛋白(zein)是玉米的主要贮藏蛋白,其疏水氨基酸残基比例超过 50%,因此不溶于水而溶于高浓度的醇-水溶液^[14]。利用这一特性可将醇溶性活性成分与玉米醇溶蛋白溶解在高浓度乙醇-水溶液中利用反溶剂法分散到水中制备自组装纳米颗粒^[15,16]。与水溶性蛋白质的包埋作用相比,以玉米醇溶蛋白纳米颗粒负载单宁酸无需热处理,可望提高单宁酸的负载效率。然而 zein 纳米颗粒载体的缺陷是其表面疏水性强,在中性 pH 时颗粒的稳定性较差,且冻干后颗粒很难重新分散^[17],限制了在食品及制药领域的应用。Hu 等^[18]首先报道利用 zein 与海藻酸钠制备核/壳型纳米颗粒,在酸性至中性 pH 范围内都有较好的稳定性及重分散性。其他阴离子多糖如果胶^[19]、海藻酸丙二醇酯^[20]、阿拉伯胶^[21]等也被用于稳定 zein 纳米颗粒。目前关于不同电荷的多糖对 zein 纳米颗粒的稳定作用缺乏系统的研究,zein/阴离子多糖纳米颗粒对水溶性物质的负载也少见报道。本文将比

较不同电荷类型的多糖对负载单宁酸的 zein 纳米颗粒稳定性的影响,揭示不同电荷的阴离子多糖稳定 zein 纳米颗粒的机制,为开发负载水溶性生物活性物质的玉米醇溶蛋白/多糖纳米颗粒输送体系提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

玉米醇溶蛋白(>90%)、高脂果胶(酯化度 67%~71%)、阿拉伯胶(总灰分<4%)购自 Acros;单宁酸(99.9%)、低酯果胶(橘皮果胶,半乳糖醛酸>74%)购自 Sigma-Alorich;海藻酸丙二醇酯(纯度 98%)购自阿达玛斯(Adamas);其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

IKA 磁力搅拌器, R05, 德国; pH-3CpH 计, 上海雷磁; RE 2000A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化; Nano-ZS 90 激光粒度仪, Malvern, 英国; Beta 1-8 LSCbasic 冷冻干燥机, 德国 Chris; 1B48F 原子力显微镜, 美国 Bruker; Nova NanoSEM 430 场发射扫描电镜, 荷兰 FEI。

1.3 溶液的制备

1.3.1 单宁酸-玉米醇溶蛋白乙醇溶液的制备

将 1.0 g 玉米醇溶蛋白加入到 50 mL 85% (V/V) 的乙醇溶液中,在室温条件下以磁力搅拌器搅拌 30 min (500 r/min),然后加入 0.1 g 单宁酸继续搅拌 30 min,离心(3000 r/min, 10 min)除去不溶性杂质,得到澄清的溶液。

1.3.2 不同电荷特性多糖溶液的制备

分别称取 0、0.005、0.011、0.022、0.033、0.055、0.077、0.1、0.15 和 0.2 g 海藻酸丙二醇酯(PGA)、阿拉伯胶(GA)、高酯果胶(HMP)和低酯果胶(LMP)加入 100 mL 超纯水中,70 °C 水浴加热搅拌 30 min,快速冷却后搅拌 1 h,以 1.0 mol/L HCl 将溶液 pH 调至 4.0,并补充蒸发损失的水分,3000 r/min 离心除去不溶性杂质。

1.4 负载单宁酸的 zein/阴离子多糖纳米颗粒制备

在 800 r/min 的速度搅拌条件下,用注射器将 4 mL 玉米醇溶蛋白-单宁酸乙醇溶液快速注射到 16 mL pH

4.0 的超纯水中, 继续搅拌 3 min, 以旋转蒸发器除去乙醇, 并用相同体积的 pH 4.0 纯水补充至 20 mL, 制得负载单宁酸的 zein 纳米颗粒。然后按照 1:2 比例将制得的分散液分散 (900 r/min) 到不同电荷特性的多糖溶液中, 继续搅拌 10 min, 离心后 (3000 r/min, 10 min) 除去大颗粒。

1.5 纳米颗粒粒径与 ζ -电位的测定

将新鲜制备的 zein/阴离子多糖纳米颗粒分散液用 pH 4.0 的超纯水稀释至蛋白浓度为 0.05 mg/mL 后, 利用激光粒度仪测定其平均粒径、电位及颗粒多分散性 (PDI)。

1.6 微观形貌观察

1.6.1 原子力显微镜 (AFM)

取适量新鲜制备的样品 (多糖浓度 0.1%) 用 pH 4.0 的超纯水稀释至蛋白浓度为 0.05 mg/mL, 然后取 30 μ L 稀释后的样品滴至新的云母磁盘上自然晾干, 原子力显微镜采用轻敲模式, 采用图像分析软件对样品的微观形态进行分析。

1.6.2 场发射扫描电镜 (FE-SEM)

取适量冷冻干燥的 zein/阴离子多糖纳米颗粒样品经喷金后, 在 10.0 kV 的加速电压下观察冻干样品的形态。

1.7 环境条件对 zein/阴离子多糖纳米颗粒稳定性的影响

不同 pH 的颗粒稳定性用 1 mol/L NaOH 或者 HCl 溶液对新鲜配制的纳米颗粒进行调整, 使得颗粒悬浮液 pH 为 2.0~8.0。

盐浓度的影响: 向新制备的颗粒悬浮液中加入氯化钠, 最终盐浓度范围为 0~100 mmol/L NaCl。

热处理的影响: 新鲜制备的悬浮液在 80 $^{\circ}$ C 下加热不同 (0~120 min), 处理后的样品测定其平均粒径和多分散指数, 以数码相机记录颗粒分散液的状态, 评价环境压力对颗粒稳定性的影响。

1.8 颗粒得率及单宁酸负载效率的测定

1.8.1 颗粒得率测定

负载单宁酸的 zein/低酯果胶纳米颗粒分散液经冷冻干燥后回收称重, 颗粒得率和单宁酸的负载效率由下式计算:

$$\text{颗粒得率}/\% = \frac{w_1}{w_2} \times 100\%$$

式中:

w_1 ——冻干的纳米颗粒质量, mg;

w_0 ——单宁酸、玉米醇溶蛋白和低酯果胶的总质量, mg。

1.8.2 单宁酸负载效率的测定

参考 Arroyo-Maya 等^[22]的方法并做修改。将负载单宁酸的 Zein/低酯果胶纳米颗粒分散液离心 (4000 r/min, 20 min), 然后通过 10 ku 膜过滤器过滤, 收集滤液 (体积记为 v), 经适度稀释后在 278 nm 波长测定其吸光度, 根据标准曲线确定滤液中未包埋的游离单宁酸的浓度 c 。单宁酸负载效率由下式计算:

$$\text{单宁酸负载效率}/\% = \frac{m_0 - c \times f \times v}{m_0} \times 100\%$$

式中:

m_0 ——投入的单宁酸质量, μ g;

c ——滤液浓度;

f ——稀释倍数;

v ——滤液体积。

1.8.3 单宁酸标准曲线

称取 20 mg 单宁酸溶于 20 mL 超纯水中, 制备成浓度为 1 mg/mL 的单宁酸溶液, 然后用超纯水分别稀释成 0~20 μ g/mL 标准液, 在 278 nm 波长测定其吸光度, 建立单宁酸含量标准曲线 $y=0.0442x+0.0073$, $R^2=0.9997$ 。

1.9 数据处理

所有实验数据至少重复 3 次, 数据结果以平均值和标准差表示。采用 SAS (9.4) 统计软件对数据进行统计分析, $p<0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 多糖浓度与负载单宁酸的 zein 纳米颗粒稳定性

文献报道玉米醇溶蛋白等电点 pI 值为 pH 6.2^[23]。在 pH 4.0 的水中, 反溶剂法制备的纳米颗粒带净正电荷, 测得其 ζ -电位为 30.48 mV, 以 zein:单宁酸质量比 10:1 负载单宁酸后, 纳米颗粒的电位为 26.45 mV。因单宁酸带负电荷, 导致 zein 纳米颗粒表面电荷下降, 但下降幅度较小, 说明单宁酸大部分被包埋在 zein 纳米颗粒的内部, 从而对颗粒表面电荷的影响较小。

将负载单宁酸的 zein 纳米颗粒分散液按 1:2 体积比分散至 pH 4.0 的多糖溶液中, 结果如图 1。低浓度的多糖引起纳米颗粒的沉淀, 而随着多糖浓度的增加, 颗粒又重新稳定。不同多糖稳定颗粒所需的最低浓度

存在明显的差异：海藻酸丙二醇酯（Propylene glycol alginate, PGA）、阿拉伯胶（gum Arabic, GA）、高酯果胶（High methoxy pectin, HMP）稳定颗粒所需的最低多糖浓度为 0.055% (m/V)，而低酯果胶（lowmethoxy pectin, LMP）为 0.022% (m/V)。在 pH 4.0 时，测得 PGA、GA、HMP 以及 LMP 的 ζ -电位分别为 -17.25、-22.25、-28.48、-33.72 mV，多糖与带净正电荷的 zein 纳米颗粒发生静电吸引作用，吸附到 zein 颗粒的表面，使颗粒的电荷值急剧下降（图 2），多糖浓度较低时，吸附的多糖降低了颗粒的表面电位但不足以完全覆盖颗粒表面^[18]，导致颗粒之间聚集而沉淀；随着多糖浓度的增加，越来越多的多糖分子吸附到颗粒表面，颗粒重新变得稳定。当多糖浓度达到 0.10% 时，纳米颗粒的 ζ -电位均达到相对恒定的水平且接近多糖的 ζ -电位，说明纳米颗粒表面覆盖的多糖达到饱和（如图 2），形成 TZP/多糖核-壳型纳米颗粒。比较不同多糖覆盖的纳米颗粒粒径发现（图 3），TZP/PGA 颗粒粒径最大，当多糖浓度为 0.10% 时，其粒径为 506.70 nm。这是因为海藻酸丙二醇酯的 ζ -电位较低，与 zein 纳米颗粒之间的静电相互作用较弱，导致颗粒稳定性较差，粒径较大。Sun 等^[24]亦报道负载槲皮素的 zein/PGA 颗粒粒径达到 759 nm，说明 PGA 不能稳定 zein 纳米颗粒。其次是 TZP/HMP，粒径为 296.25 nm；而 TZP/GA 和 TZP/LMP 纳米颗粒的粒径分别为 131.63、160.18 nm。

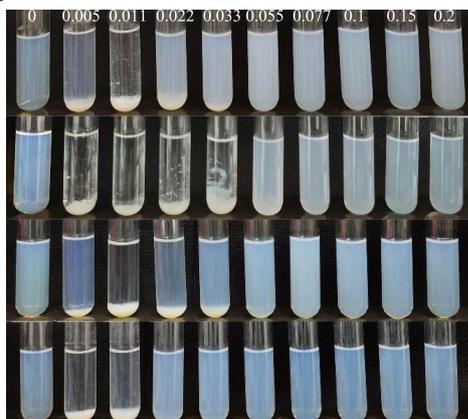


图 1 不同浓度多糖对纳米颗粒分散体系外观的影响
Fig.1 Effect of polysaccharide concentrations on the appearance of nanoparticle dispersion

注：图中从上到下分别为 PGA、GA、HMP、LMP。

采用原子力显微镜观察纳米颗粒的微观形貌，如图 4 所示，负载单宁的纳米颗粒近似球形且分布比较均一（图 4a），粒径 50 nm 左右，与粒度仪测定的结果接近（图 3）。

多糖覆盖的纳米颗粒在制样干燥时发生不同程度的颗粒聚集，且海藻酸丙二醇酯（图 4b）、阿拉伯胶

（图 4c）、高酯果胶（图 4d）包覆的颗粒聚集程度较高，而低酯果胶包覆的纳米颗粒聚集程度较低，说明颗粒稳定性较高（图 4e）。

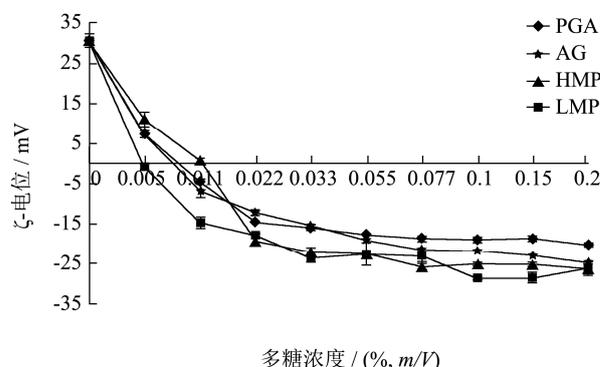


图 2 不同浓度多糖对纳米颗粒 ζ -电位的影响

Fig.2 Effect of polysaccharide concentrations on the ζ -potential

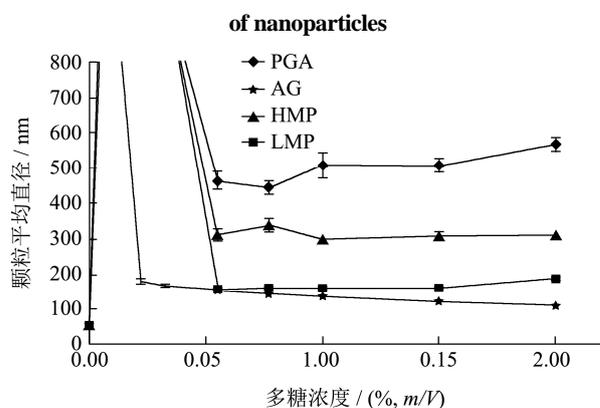
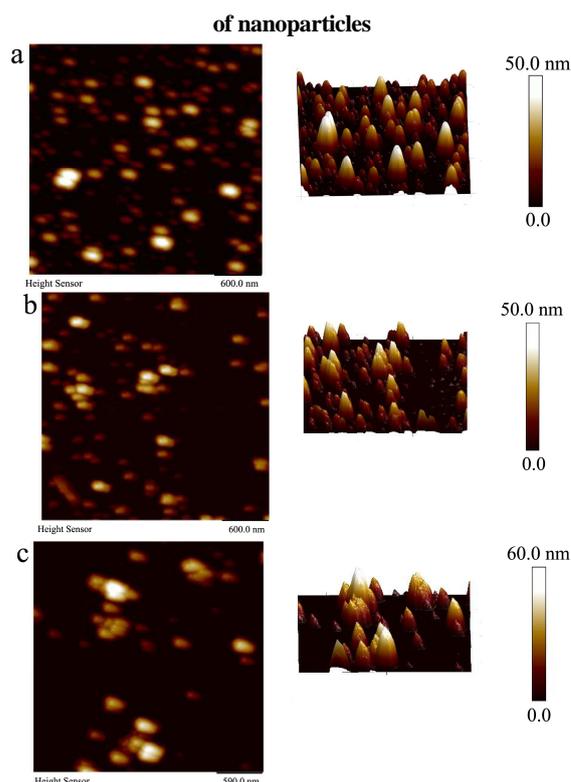


图 3 不同浓度多糖对纳米颗粒粒径的影响

Fig.3 Effect polysaccharide concentrations on the particle size



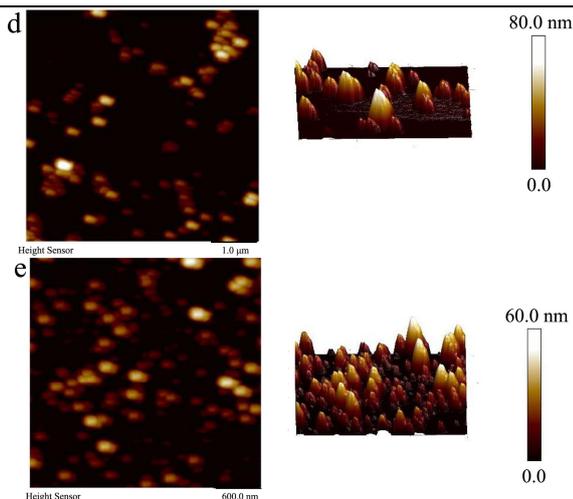


图4 原子力显微镜下纳米颗粒的形貌

Fig.4 Morphology of nanoparticles under atomic force microscope

注: a: TZP; b: TZP/PGA; c: TZP/GA; d: TZP/HMP; e: TZP/LMP; 多糖浓度 0.10%(m/V), 照片观测范围 3 μm×3 μm。

2.2 不同 pH 条件下 TZP/多糖纳米颗粒的稳定性

玉米醇溶蛋白为两亲性高分子, 其纳米颗粒表面电荷受水相 pH 的影响, 从而与其与阴离子多糖的相互作用, 进而影响纳米颗粒的稳定性。基于海藻酸丙二醇酯包覆的纳米颗粒粒径较大, 稳定性较差, 故后续研究主要针对 TZP/GA、TZP/HMP、TZP/LMP 纳

米颗粒。不同 pH 条件下纳米颗粒分散液的稳定性如图 5: TZP/GA 在 pH 2.0 及 zein 等电点附近 (pH 6.0~6.5) 不稳定, 颗粒沉淀析出, 在 pH 3.0 时分散液变浑浊; Gali 等^[21]报道以 zein/GA 颗粒负载流苏芸香 (*Ruta chalepensis*) 的芦丁提取物在 pH 2~3、pH 7~8 时粒径较大; 而负载松香的 zein/GA 颗粒在 pH 3.0 时聚集沉淀^[25], 说明负载的客体极性对 zein/GA 颗粒在不同 pH 时的稳定性影响较大, 疏水性客体更有利于 zein/GA 在高酸性及 zein 等电点 pH 时颗粒的稳定。TZP/HMP 在 pH 2.0~3.0 澄清度下降; 而 TZP/LMP 仅在 pH 6.0 时澄清度稍有下降, 说明 LMP 比 HMP 对 TZP 的稳定作用更强。



图5 Zein/多糖纳米颗粒分散液在不同 pH 条件下的稳定性

Fig.5 Effect of various pH on the appearance of dispersions of TZP/polysaccharide nanoparticles

注: 图中从上到下分别为 Zein/GA、Zein/HMP、Zein/LMP。

表1 不同 pH 条件下 TZP/多糖纳米颗粒的粒径及 PDI

Table 1 The particle size and PDI of TZP/polysaccharide nanoparticles at different pH

pH	GA		HMP		LMP	
	粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI
2.0	-	-	266.32±6.03	0.23±0.01	197.80±2.86	0.20±0.01
3.0	145.53±2.32	0.21±0.01	279.62±5.86	0.25±0.01	178.48±1.96	0.19±0.01
4.0	121.53±4.74	0.19±0.00	294.35±4.08	0.27±0.01	166.55±1.44	0.24±0.00
5.0	133.20±3.85	0.20±0.00	321.65±10.67	0.26±0.03	164.90±2.49	0.25±0.01
6.0	-	-	270.33±8.25	0.34±0.04	178.73±2.15	0.23±0.00
6.5	-	-	238.50±10.71	0.35±0.03	130.88±1.51	0.24±0.01
7.0	159.93±2.35	0.21±0.01	197.13±7.70	0.38±0.02	131.40±1.51	0.27±0.01
8.0	129.42±2.95	0.20±0.01	178.05±4.21	0.34±0.04	105.98±0.26	0.25±0.01

注: “-”表示颗粒聚集沉淀。

纳米颗粒粒径及颗粒多分散性指数 (PDI) 随 pH 的变化如表 1 所示, TZP/GA 颗粒在 pH 3.0~5.0、pH 7.0~8.0 时, 颗粒粒径在 120~160 nm 之间, PDI 约为 0.20, 说明纳米颗粒均一性较好, 颗粒较为稳定。TZP/HMP 颗粒的粒径在酸性 pH 时较大, 最大粒径达到 321.65 nm, 但在 zein 等电点 pH 附近 (pH 6.0~6.5)

时粒径反而较低, 在 pH 7.0~8.0 时, 粒径最小。这是因为在中性到碱性 pH 时 zein 带净负电荷, 与同为负电荷的高酯果胶之间主要发生静电排斥, 多糖与 zein 颗粒之间相互作用较弱, 部分多糖脱离颗粒表面, 从而降低颗粒的粒径。随着 pH 值的增加, 颗粒的 PDI 逐渐增大, 当 pH>5.0 时, PDI 大于 0.34, 表明 TZP/HMP

纳米颗粒粒径分布不均一，颗粒粒径差异明显，也说明在此条件下，高酯果胶与 zein 颗粒之间相互作用较弱，使得颗粒粒径分布发生较大的变化。TZP/LMP 的粒径在 pH 2.0~8.0 范围内随 pH 值的增加而减小（从 197.80 nm 减小至 105.98 nm）。但在 pH 6.0 时（接近 zein 等电点 pH 值）粒径稍有增加（由 pH 5.0 时的 164.90 nm 增加到 pH 6.0 时的 178.73 nm），表明在等电点 pH 附近，低酯果胶与 zein 的静电相互作用相对较弱，导致颗粒粒径增加，但所有 pH 范围内纳米颗粒的 PDI 值都低于 0.27。一般认为 PDI 低于 0.30，纳米颗粒比较稳定，粒径分布比较均一，因此低酯果胶在 pH 2.0~8.0 均能较好的稳定纳米颗粒。

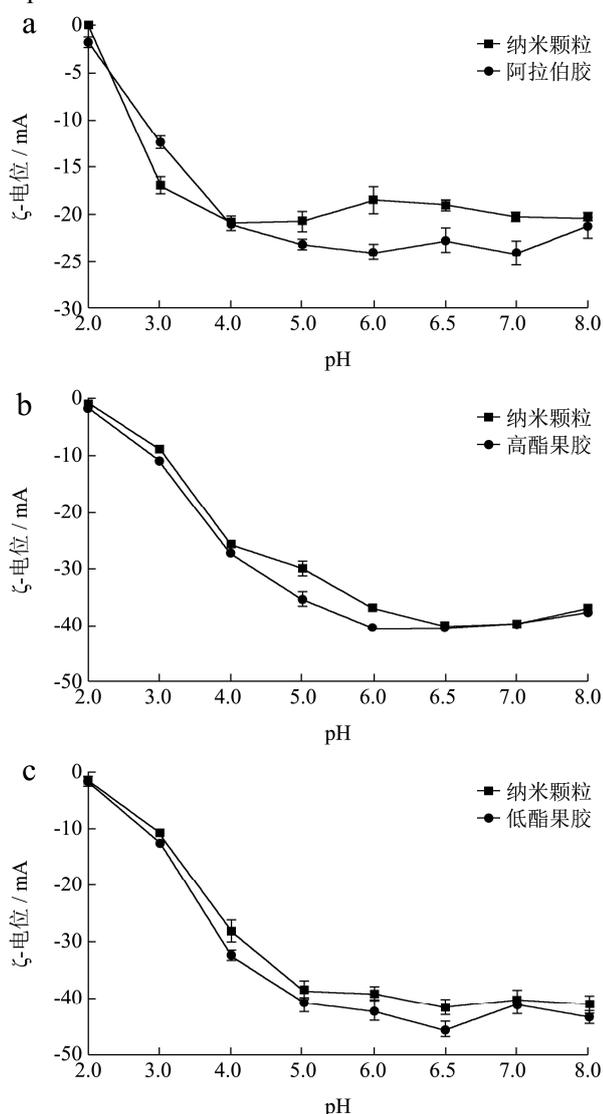


图 6 不同 pH 时纳米颗粒与多糖的 ζ-电位

Fig.6 The ζ-potential of nanoparticles and polysaccharides at different pH

TZP/多糖纳米颗粒 ζ-电位随 pH 的变化趋势见图 6，纳米颗粒的 ζ-电位随 pH 值的变化受到多糖分子的显著影响，表现出与多糖溶液相同的变化趋势，说

明 TZP 纳米颗粒被多糖包覆。在 pH 2.0 时，TZP/GA 的 ζ-电位为 0.02 mV (图 6a)，TZP/HMP 的为 -0.69 mV (图 6b)，而 TZP/LMP 则为 -2.23 mV (图 6c)。阿拉伯胶为含有蛋白质的羧基多糖，果胶为部分甲酯化的羧基多糖，羧基的 pKa 约为 pH 3.5^[26]，在 pH 2.0 时，多糖分子中未与 zein 的 -NH₃⁺ 发生静电相互作用的游离 -COO⁻ 质子化生成 -COOH，导致纳米颗粒 ζ-电位接近 0，此时 TZP/GA 沉淀析出，TZP-HMP 粒径稍微增加 (266.32 nm)；而 TZP-LMP 因存在一定的电荷排斥作用，颗粒得以稳定。在 pH 6.0 时，zein 表面净电荷接近电中性，此时与阴离子多糖的静电相互作用最弱，电荷较弱的阿拉伯胶对 TZP 的稳定作用减弱，测得 TZP/GA 的 ζ-电位 (-18.48 mV) 远低于 TZP-HMP (-37.20 mV) 及 TZP-LMP (-39.31 mV)，导致 TZP/GA 颗粒之间的静电排斥力较弱，从而失去稳定而沉淀。

2.3 离子强度对 TZP/多糖纳米颗粒稳定性的影响

影响

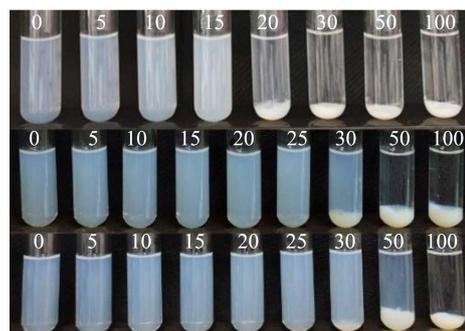


图 7 不同浓度的 NaCl (mmol/L) 对纳米颗粒分散液外观的影响

Fig.7 Effect of NaCl concentrations (mmol/L) on the appearance of nanoparticle dispersions

注：图中从上到下分别为 TZP/GA、TZP/HMP、TZP/LMP。

蛋白质与多糖之间的静电相互作用受离子强度的影响，从而影响纳米颗粒的稳定性。TZP/GA 颗粒对离子强度最敏感 (图 7)，10 mmol/L 的 NaCl 即引起颗粒分散液混浊，当 NaCl 浓度增加到 15 mmol/L 时颗粒沉淀。当 zein/GA 颗粒负载姜黄素时，大于 8 mmol/L 的 NaCl 浓度即导致颗粒聚集^[27]。以上结果说明阿拉伯胶与 zein 之间的静电相互作用较弱，较低浓度的中性盐即可达到电荷中和作用而使颗粒沉淀。与阿拉伯胶相比，TZP/HMP、TZP/LMP 纳米颗粒对盐的耐受性较强，颗粒分散液在 0~25 mmol/L NaCl 浓度范围内仍然保持半透明状，但其粒径分别增加至 370.70 nm (图 8a) 和 279.88 nm (图 8a)，30 mmol/L 的 NaCl 浓度时纳米颗粒发生聚集沉淀，而负载白藜芦醇的 zein/LMP 纳米颗粒则在 70 mmol/L 的盐浓度时

发生沉淀^[28]。此结果进一步表明, 负载的客体的极性影响 zein/阴离子多糖纳米颗粒的稳定性, 疏水性客体有利于纳米颗粒与多糖的相互作用, 使颗粒更为稳定。

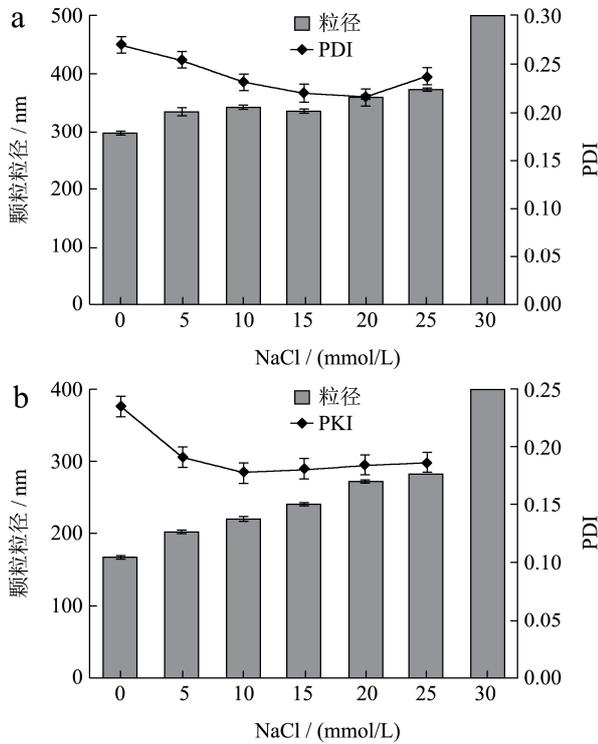


图8 不同浓度的 NaCl 对纳米颗粒溶液粒径及 PDI 的影响

Fig.8 Effect of NaCl concentrations on the particle size and PDI

注: a 为 TZIP/HMP, b 为 TZIP/LMP, pH 4.0。

2.4 颗粒的热稳定性

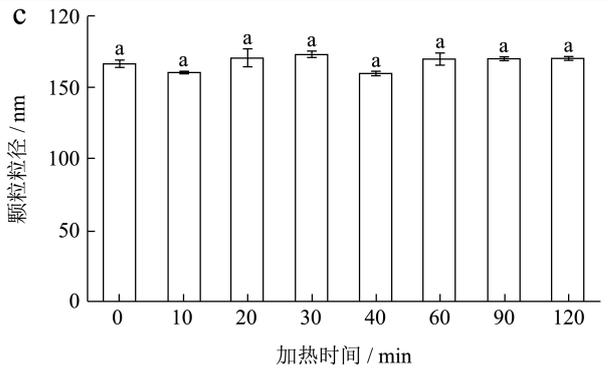
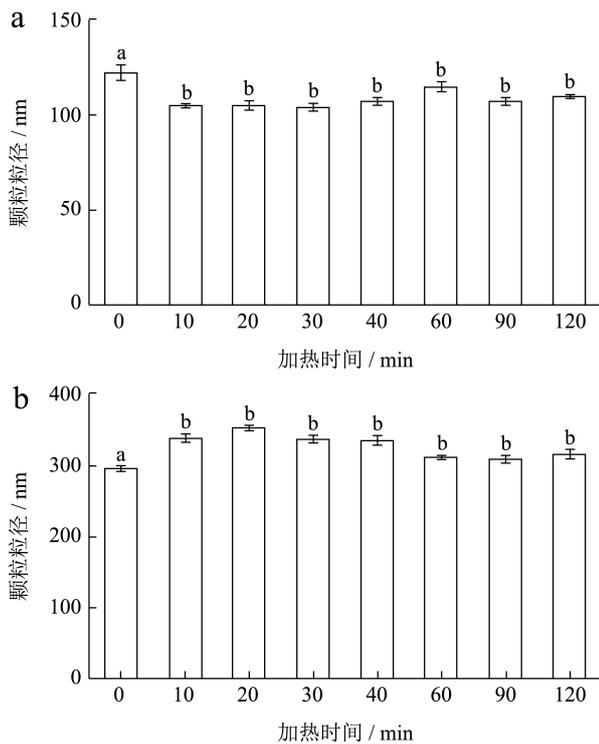


图9 热处理对纳米颗粒粒径的影响

Fig.9 Effect of heating on the particle size

注: a、b、c 分别为 TZIP/GA、TZIP/HMP、TZIP/LMP; 不同字母表示两组间有差异, $p < 0.05$ 。

将颗粒分散液在 80 °C 水浴加热处理 120 min, TZIP/GA、TZIP/LMP 分散液外观仍为澄清透明的状态, 然而 TZIP/HMP 分散液外观透明度下降。TZIP/GA 的粒径经热处理后明显下降, 从未处理时的 121.53 nm 降至 107.39 nm (图 9a, $p < 0.05$); 而 TZIP/HMP 的粒径从未处理时的 294.35 nm 增大至 326.09 nm (图 9b, $p < 0.05$)。热处理对 TZIP/LMP 的粒径无明显影响 (图 9c, $p > 0.05$), 表明 TZIP/LMP 具有良好的热稳定性。

2.5 纳米颗粒得率及单宁酸负载效率

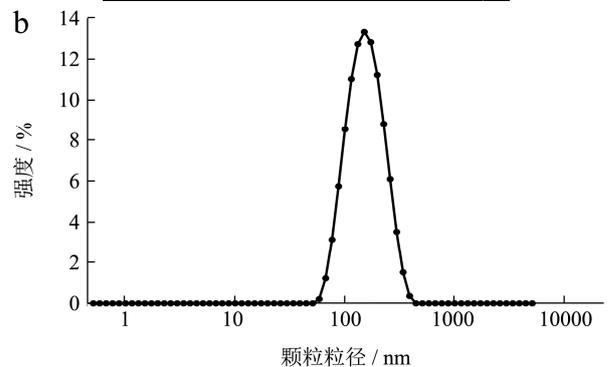
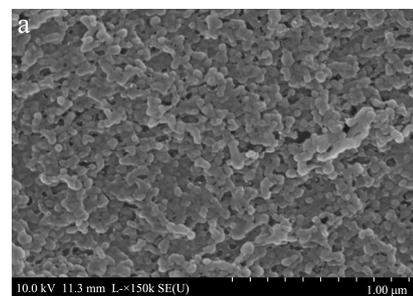


图10 负载单宁酸的 TZIP/LMP 纳米颗粒的微观形貌 (a) 和颗粒粒径分布 (b)

Fig.10 The SEM image (a) and particle diameter distribution (b) of TZIP/LMP

注: 低酯果胶浓度为 0.11% (m/V)。

将 TZP 纳米颗粒分散液以 1:2 的体积比分散至浓度为 0.11% 低酯果胶溶液中, 经冷冻干燥后收集干燥的 TZP/LMP 纳米颗粒, 计算颗粒得率为 95.10%, 测得单宁酸的负载效率为 88.97%, 颗粒中单宁酸的含量为 5.39%。亲水性小分子物质易溶于水, 将其高效负载到蛋白质纳米颗粒中具有一定的挑战性^[29]。Arroyo-Maya 等^[22]采用热处理和静电络合的方法, 以乳清分离蛋白-甜菜果胶纳米颗粒负载花青素, 负载效率为 35%~55%。本文中的玉米醇溶蛋白/低酯果胶纳米颗粒对单宁酸的负载效率显著高于 Arroyo-Maya 等人^[22]报道的花青素的负载效率, 甚至接近疏水性的姜黄素^[19]和白藜芦醇的负载效率^[30]。利用 SEM 观察冷冻干燥的纳米颗粒为球形, 直径范围为 100~200 nm (图 10a)。纳米颗粒的粒径分布为单峰 (图 10b), 粒径和 PDI 分别为 165.55 nm 和 0.23。

3 结论

玉米醇溶蛋白在 pH 4.0 时, 以反溶剂法制备的纳米颗粒带净正电荷, 可与阴离子多糖发生静电相互作用而形成核-壳型纳米颗粒。比较表面负电荷依次增加的海藻酸丙二醇酯、阿拉伯胶、高酯果胶、低酯果胶对负载单宁酸的 zein 纳米颗粒稳定性的影响, 结果发现当多糖在颗粒表面达到饱和和吸附时, 可以稳定颗粒。这种稳定作用受阴离子多糖的 ζ -电位影响, ζ -电位最弱的海藻酸丙二醇酯不能有效地稳定 TZP, ζ -电位较弱的 GA 在强酸性 pH 值和 zein 等电点 pH 值附近无法稳定纳米颗粒, 而 ζ -电位最强的 LMP 在 pH 2.0~8.0 范围内均能稳定纳米颗粒。由于阴离子多糖与 TZP 以静电相互作用形成核-壳型纳米颗粒, 其作用强度受离子强度的影响。表面电荷较低的阿拉伯胶, 其与 TZP 形成的纳米颗粒对盐的稳定性最低, 而表面电荷最强的 LMP 与 TZP 形成的纳米颗粒对盐的稳定性较高。以 LMP 作为稳定剂制备的 TZP/LMP 纳米颗粒对水溶性多酚单宁酸的负载率达到 88.97%, 单宁酸在颗粒中的含量为 5.39%, 明显优于水溶性蛋白 (如乳清蛋白) 纳米颗粒对亲水性活性成分的负载率。因此, 本文报道的玉米醇溶蛋白/低酯果胶复合纳米颗粒可用于亲水性多酚的包埋与保护, 可望用于亲水性活性成分的靶向输送和可控释放, 今后的研究将集中于该体系在胃肠道环境中释放单宁酸的过程及生物利用度。

参考文献

[1] Lopes G K B, Schulman H M, Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton

reaction by complexing ferrous ions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1472(1-2): 142-152

[2] Mueller-Harvey. Analysis of hydrolysable tannins [J]. *Animal Feed Science Technology*, 2001, 91(1-2): 3-20

[3] Dai X, Zhou Y L, Xu T T, et al. Reproductive responses of the male Brandt's vole, *Lasiopodomys brandtii* (Rodentia: Cricetidae) to tannic acid [J]. *Zoologia*, 2020, 37(4): 1-11

[4] Ngaesh P K B, Chowdhury P, Hatami E, et al. Tannic acid inhibits lipid metabolism and induce ROS in prostate cancer cells [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 980

[5] Weng B, Gilkerson R, Materon L A, et al. Development of tannic acid/chitosan/pullulan composite nanofibers from aqueous solution for potential applications as wound dressing [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 115(22): 16-24

[6] Chen S C, Chung K T. Mutagenicity and antimutagenicity of tannic acid and its related compounds [J]. *Food Chemical Toxicology*, 2000, 38(1): 1-5

[7] Nepka C, Sivridis E, Antonoglou O, et al. Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice [J]. *Cancer Letters*, 1999, 141(1-2): 57-62

[8] Nam S, Smith M, Dou P Q. Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis [J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2001, 10(10): 1083-1088

[9] Chung K T, Wong T Y, Wei C, et al. Tannins and human health: a review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1998, 38(6): 421-464

[10] Aelenei N, Marcel L P, Novac O, et al. Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and *in vitro* controlled release [J]. *Journal of Materials Science*, 2009, 20: 1095-1102

[11] Hu S, Wang T, Fernandez M L, et al. Development of tannic acid cross-linked hollow zein nanoparticles as potential oral delivery vehicles for curcumin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61:821-831

[12] Wang Y H, Wan Z L, Yang X Q, et al. Colloidal complexation of zein hydrolysate with tannic acid: constructing peptides-based nanoemulsions for alga oil delivery [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 54: 40-48

[13] Chengsheng J, Dandan C, Suping J. Tannic acid-assisted cross-linked nanoparticles as a delivery system of eugenol: the characterization, thermal degradation and antioxidant properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 104(1): 105717

- [14] Patel A R, Velikov K P. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures [J]. *Current Opinion in Colloid*, 2014, 19(5): 450-458
- [15] Dai L, Zhou H, Wei Y, et al. Curcumin encapsulation in zein-rhamnolipid composite nanoparticles using a pH-driven method [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 93: 342-350
- [16] Wei Y, Yu Z, Lin K, et al. Fabrication and characterization of resveratrol loaded zein-propylene glycol alginate-rhamnolipid composite nanoparticles: physicochemical stability, formation mechanism and in vitro digestion [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 95: 336-348
- [17] Yao K F, Chen W J, Song F L, et al. Tailoring zein nanoparticle functionality using biopolymer coatings: Impact on curcumin bioaccessibility and antioxidant capacity under simulated gastrointestinal conditions - sciencedirect [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 79: 262-272
- [18] Hu K, McClements D J. Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: zein-alginate core/shell nanoparticles [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 44: 101-108
- [19] Hu K, Huang X X, Gao Y Q, et al. Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles [J]. *Food Chemistry*, 2015, 182: 275-281
- [20] Sun C X, Dai L, Gao Y X. The binary complex based on zein and propylene glycol alginate for delivery of quercetin [J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(12): 01362
- [21] Lynda G, Fatiha B, Giovanna F, et al. Formulation and characterization of zein/gum arabic nanoparticles for the encapsulation of a rutin-rich extract from *ruta chalepensis* [J]. *Food Chemistry*, 2022, 367: 129982
- [22] Arroyo-Maya I J, McClements D J. Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: fabrication and properties [J]. *Food Research International*, 2015, 69: 1-8
- [23] Shukla R, Cheryan M. Zein: the industrial protein from corn [J]. *Industrial Crops*, 2001, 13(3): 171-192
- [24] Sun C X, Wei Y, Li R, et al. Quercetin-loaded zein-propylene glycol alginate ternary composite particles induced by calcium ions: structure characterization and formation mechanism [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(19): 3934-3945
- [25] Spasojevi, Buko, Kovaevi, et al. Interactions of zein and zein/rosin nanoparticles with natural polyanion gum arabic [J]. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 196: 111289
- [26] Hurtado-López P, Murdan S. Zein microspheres as drug/antigen carriers: a study of their degradation and erosion, in the presence and absence of enzymes [J]. *Journal of Microencapsulation*, 2006, 23(3): 303-314
- [27] Chen G W, Fu Y Y, Niu F G, et al. Evaluation of the colloidal/chemical performance of core-shell nanoparticle formed by zein and gum arabic [J]. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*, 2018, 560: 130-135
- [28] Huang X L, Liu Y, Zou Y, et al. Encapsulation of resveratrol in zein/pectin core-shell nanoparticles: stability, bioaccessibility, and antioxidant capacity after simulated gastrointestinal digestion [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 93: 261-269
- [29] Khan M A, Yue C, Fang Z, et al. Alginate/chitosan-coated zein nanoparticles for the delivery of resveratrol [J]. *Journal of Food Engineering*, 2019, 258: 45-53
- [30] Huang X L, Dai Y Q, Cai, J X, et al. Resveratrol encapsulation in core-shell biopolymer nanoparticles: impact on antioxidant and anticancer activities [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 64: 157-165

(上接第 260 页)

- [31] Nishimura Osamu. Identification of the characteristic odorants in fresh rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) using aroma extract dilution analysis and modified multidimensional gas chromatography-mass spectroscopy [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(11): 2941-2945
- [32] 陈臣,刘政,黄轲,等.基于 GC-MS/GC-O 及电子鼻评价不同加工方式对乳扇风味的影响[J].*食品科学*,2021,42(16):108-117
- CHEN Chen, LIU Zheng, HUANG Ke, et al. Effect of different processing methods on the flavor of milk fans based on the GC-MS/GC-O and electronic nose analysis [J]. *Food Science*, 2021, 42(16): 108-117
- [33] QB/T 5323-2018,植物酵素[S]
QB/T 5323-2018, Plant Enzyme [S]