

大豆 11S 蛋白-刺槐豆胶冷致共混凝胶 控释核黄素性能的研究

朱建华¹, 杨晓泉²

(1. 韶关学院英东食品科学与工程学院, 广东韶关 512005)

(2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 通过葡萄糖酸内酯 (GDL) 冷致诱导热变性大豆11S蛋白-刺槐豆胶 (LBG) 共混溶液形成凝胶, 并对凝胶微结构、粘弹流变性、硬度性质、在模拟肠胃液中的溶胀性能及对核黄素的控释特性进行了分析研究。结果表明随多糖浓度的增加冷致凝胶微结构由蛋白连续相转变为多糖连续相形貌。添加多糖为0.05%~0.15% (*m/V*) 范围时, 伴随粘弹模量和硬度值呈增加趋势, 随多糖量增加至0.25% (*m/V*) 时凝胶硬度由峰值的46.7 g降低到38.2 g。凝胶弹性模量及硬度越大, 随润胀时间延长, 在模拟胃液中体积正向溶胀越大, 而在模拟肠液中体积负向溶胀(即消减)愈小。荷载核黄素的共混凝胶在模拟胃液和肠液中的缓释性能与共混凝胶弹性模量及硬度值、微结构均一性及孔隙尺度呈正相关关系。

关键词: 大豆11S蛋白; 刺槐豆胶; 冷致凝胶; 控释; 核黄素

文章编号: 1673-9078(2012)11-1429-1433

Study on Control Release Property of Riboflavin with Cold-set Soybean 11S Protein-Locust Bean Gum Blend Gel Matrix

ZHU Jian-hua¹, YANG Xiao-quan²

(1. Yingdong Food Science and Technology College, Shaoguan College, Shaoguan, 512005, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Cold-set gels were prepared through adding Gluconic acid-delta-lactone (GDL) to the heat denatured soy protein 11S - locust bean gum (LBG) blend solution, and microstructure, viscoelastic, hardness properties, the swelling properties and the controlled-release characteristics of riboflavin in simulated physiological fluids of the gels were analyzed. Results showed that cold-set gel microstructure morphologies were transferred from the protein continuous phase into poly saccharide continuous phase with increase of LBG concentration. The viscoelastic modulus and hardness increased with adding LBG concentration located 0.05%~0.15% (*m/V*), then hardness was decreased from the peak value 46.7 g to 38.2 g when LBG concentration was added beyond 0.25% (*m/V*). As gel elastic modulus and hardness increased, the volume by positive swelling became bigger in simulated gastric fluid with the swelling time longer, while the volume by negative swelling became smaller in simulated intestinal fluid. There were positively correlated relationships between control release capacity to riboflavin in simulated gastric and intestinal fluid with viscoelastic modulus, hardness, porosity of microstructure and integrity of cold-set gels.

Key words: soybean 11S protein, locust bean gum, cold-set gel, controlled release, riboflavin

如何降低食品营养素及功能因子成分在控释载体结构成型、胃肠环境中消化崩解直至靶器官吸收此一过程生物活性损耗是食品和医药工业及学术界等普遍关注的热点问题^[1]。从材料学视角而言, 食品产品是将

收稿日期: 2012-07-18

基金项目: 国家自然科学基金(31101215); 广东省自然科学基金(10451200501004341); 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目资助(LYM10120)

作者简介: 朱建华(1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为食品大分子及其混合体系结构-功能关系、食品材料学

控释、营养和感官等功能赋予到由各种食用成分经过相应工艺处理(压力、剪切及温度场等)而获得的具有一定微结构(如凝胶、乳液及泡沫等)的软物质(soft matter), 与其他软物质不同的是其能被摄食且可被感知到质构和风味^[2]。蛋白与多糖是最常见存在于食品体系中的生物大分子聚合物, 二者为构建食品微结构的两大重要基材, 食品材料的性能主要受制于由蛋白和多糖等大分子聚合物构成的多相体系的微结构尺度, 因此通过构建食品材料微结构可实现调控生物活性物质高效控释等功能特性的目的^[3]。绝大多数蛋白多糖共混

体系因热力学不相容而具相分离特征,大量研究已经表明利用胶凝固化控制蛋白多糖体系相分离程度、分散相形态及介观尺度可构建预期微结构,因而使其成为获得具高效控释等功能特性的结构化食品材料的理想途径^[4-5]。

目前在医用生物活性因子的控释载体制备方面,多采用合成及天然的多羟基高聚物,其凝胶形成涉及有毒交联剂(如戊二醛)及热处理,不能应用于食品体系,也不利于热敏性功能因子的保护和输送^[6]。冷致蛋白-多糖共混凝胶由于其具有在常温或更低温度及低浓度条件下形成凝胶的能力,对热敏性功能因子的护尤为有利。本文以大豆11S蛋白-刺槐豆胶共混冷致凝胶和核黄素分别作为控释载体和生物活性因子构建模型控释体系,通过调制蛋白与多糖比例组成,探讨模拟胃肠条件下冷致复合凝胶流变性质、微结构与控释功能活性因子性能的关联性和规律,研究结果以期为构建功能因子高效控释食品材料提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

低温脱溶大豆胚片:山东禹王蛋白厂,蛋白(干基)质量分数为55%,水分质量分数为7.3%;刺槐豆胶(LBG):美国Sigma公司;葡萄糖酸内酯及其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器和设备

3202S型pH计:瑞士Mettler Toledo有限公司;冷冻干燥机(Alpha-4):MATRIN CHRIST公司,德国;RHS600 哈克流变仪:德国HAKKE公司;Leica TCS-SP2 激光共聚焦仪:德国莱卡公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆11S蛋白的分离制备

采用Nagano法来提取大豆豆粕中的蛋白质^[7],制备出的11S蛋白经冷冻干燥备用。

1.3.2 冷致大豆11S蛋白-刺槐豆胶共混凝胶的构建

冻干后的11S蛋白室温下搅拌2 h并用2 M的NaOH调节pH至7.6溶解,放置4℃冰箱中充分水化过夜配制为8% (mV)的蛋白溶液。然后取11 S上清液至一密闭容器中在95℃下加热30 min,并用去离子水稀释至所需浓度备用。刺槐豆胶溶液在85℃加热30 min使得多糖完全溶解备用。冷致凝胶构建采用加入相应浓度比例的刺槐豆胶至大豆蛋白聚集溶液至4% (mV)后搅拌5 min,加入0.6% (mV)的GDL,此样品将用于凝胶流变性质的测定。

1.3.3 冷致共混凝胶的微结构形态

利用激光共聚焦显微镜对加入蛋白质荧光标记试

剂罗丹明B (RITC) (0.02%, mV)好的凝胶样品观察,Ar/Kr 激光器的激光光源进行预扫描。参数如下:扫描模式像素:2048×2048;扫描速度:400Hz;FITC激发波长:488 nm,发射波长:490~540 nm。xy平面扫描面积大小为140 μm×140 μm,z轴方向扫描厚度为20 μm,每隔1.0 μm扫描一张图片,直至获取高质量的图像。

1.3.4 冷致共混凝胶流变性质及硬度的测定

采用平行板(直径为27.83 mm)哈克RS600流变仪测定粘弹性质。取1 mL样品分散液置于间隙设置为1 mm为平行板之间,在样品裸露部位添加一薄层硅化油防水分蒸发。采用控制应变(γ=0.5%)模式,频率ω=1 r/s。平衡后溶液恒温37℃测量6 h,记录此过程中的弹性模量(G')随时间的变化趋势,每个样品测试三次。采用质构仪的TPA模式对复合凝胶的硬度进行测定。待测凝胶的厚度为20 mm,压缩变形为样品高度的30%。探头直径10 mm,探头下降速度1.0 mm/s。检测温度为室温,5次测试的平均值为测定结果。

1.3.5 凝胶在模拟胃肠液中的溶胀性能研究

将制备好的一系列凝胶,分别置于模拟胃肠液中溶胀,测定溶胀度(SR)。

$$SR = \frac{W_t - W_0}{W_0}$$

式(1)式中:W_t是溶胀t时间后湿态凝胶的质量(g);W₀是溶胀前凝胶的质量(g)。

1.3.6 模拟胃液和模拟肠液的制备

模拟胃液体系(SGF):500 mL双蒸水中加入1.0 g NaCl及53 mL浓度为37%的盐酸,此模拟体系的最终pH值为1.20并于测定前1 h添加3.2 g/L的胃蛋白酶。模拟肠液体系(SIF):400 mL双蒸水中加入6.8 g磷酸二氢钾,然后加入190 mL 0.2 mol/L的NaOH溶液,此体系pH值经0.2 mol/L NaOH调至6.8,最后用双蒸水将其定容至1000 mL并于测定前1 h加入10.0 g/L胰蛋白酶。

1.3.7 冷致共混凝胶在模拟胃肠液中的释放性能测定

称取一定量的共混凝胶装入透析袋,置于模拟胃液、模拟肠液中于以200 r/min恒温37℃搅拌进行核黄素释放,每隔一定时间吸取一定量的释放液,过膜测定释放液在446 nm处的吸光值。加相同体积的溶剂以保持模拟消化液体积恒定,根据释放体系中核黄素浓度的变化,以空白模拟胃、肠液作为对照,计算不同时间核黄素从共混凝胶中的累积释放质量及累积释放率。

1.3.8 数据处理

应用Origin 7.0软件对试验结果数据进行统计处

理, 样品组和对对照组之间的差异显著性采用 one way Anova 方法分析, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 大豆11S蛋白-LBG共混冷致凝胶微结构分析

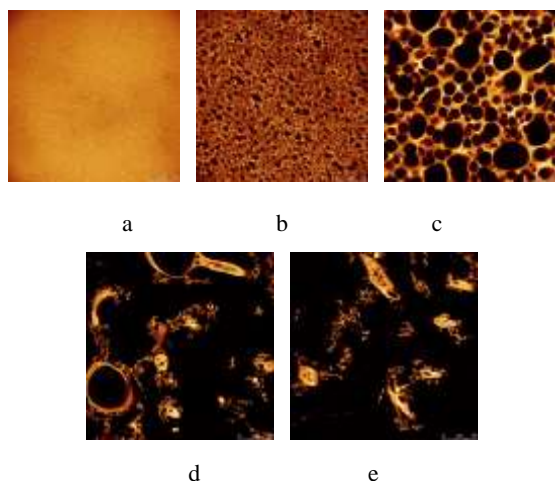


图1 冷致大豆11S蛋白-LBG共混凝胶的CLSM图

Fig.1 CLSM microstructures of cold-set soybean 11S protein-LBG blend gels

注: a-without LBG; b-0.05% LBG; c-0.15% LBG; d-0.25% LBG; e-0.35% LBG。

图1为添加不同浓度(0%~0.35%, m/V) LBG的冷致大豆11S蛋白凝胶微结构测定结果。对于未添加多糖的冷致11S凝胶, 激光共聚焦测定结果显示荧光色泽非常均一, 表明其微结构为均相结构(图1a)。与对照相比, LBG浓度由0.5% (m/V)增加至0.15% (m/V)时, 共混凝胶的微结构变化显著, 形成典型的“海-岛”结构, 此浓度条件下“岛”型区域为多糖相, 混合体系蛋白相(亮色区域)连续显著下降而多糖相(暗色区域)增加, 且此趋势随多糖浓度增加加剧。进一步增加多糖浓度至0.25% (m/V), 共混体系中“岛”型区域由多糖相过渡到蛋白相, 相逆转现象发生。S.de Jong^[8]研究多糖浓度对乳清蛋白/多糖混合体系的微结构影响时发现了类似的相逆转现象。当多糖浓度增加至0.35% (m/V)时, 微结构测定结果表明相逆转后共混体系中的多糖连续相进一步扩大, 而蛋白非连续相被疏化。共混体系冷致凝胶微结构随多糖浓度的增加显著变化, 主因蛋白多糖热力学不相容进而引起相分离所致, 混合体系中的最终凝胶结构和形态学取决于凝胶和相分离的竞争结果。

2.2 大豆11S蛋白-LBG共混冷致凝胶流变学性质分析

图2分别为LBG浓度对4.0% 11S凝胶动态流变监控的粘弹模量及TPA质构分析的硬度测定结果。与对照样相比, 添加多糖浓度为0.05%~0.15% (m/V)时, 11S的凝

胶强度随着LBG浓度的升高而升高, 同时其凝胶起始点被提前, 主因共混体系中相分离现象引起^[9]。含0.15% (m/V) LBG的混合体系凝胶强度最高。

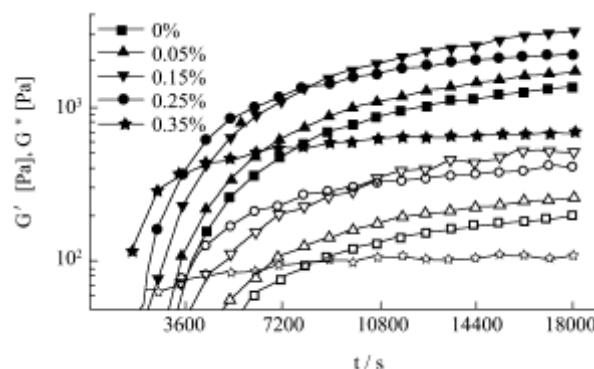


图2 多糖浓度对共混凝胶流变粘弹性质的影响

Fig.2 Effect of polysaccharide concentration on viscoelastic properties of blend gels

注: 实心图例为弹性模量值, 空心图例为对应粘性模量值。

含0.25% (m/V) LBG的混合体系凝胶强度低于峰值, 进一步增加LBG浓度至0.35% (m/V), 凝胶强度骤降。这是由于多糖连续相的持续增加使得蛋白连续相被破坏且不能维持三维网络结构, 添加低浓度的LBG, 大豆11S蛋白有效凝胶浓度增加且加强了共混凝胶结构, 当浓度高于某一临界值会弱化蛋白网络并导致凝胶强度下降。图3表明共混凝胶的硬度随多糖浓度的变化趋势与粘弹模量变化趋势类似。共混凝胶材料微结构的多样性和流变及力学性质呈现规律性的变化, 为控释载体的构建提供了可行性依据。

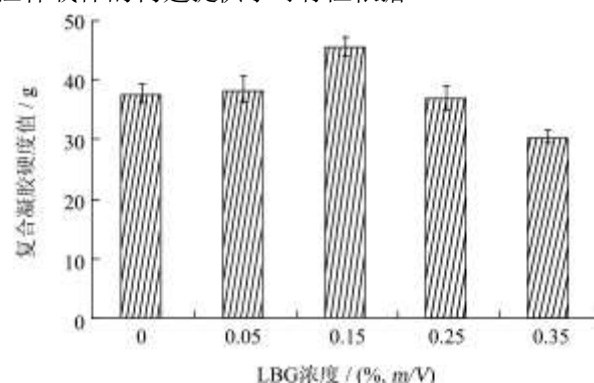


图3 多糖浓度对共混凝胶硬度性质的影响

Fig.3 Effect of LBG concentration on TPA hardness properties of blend gels

2.3 大豆11S蛋白-LBG共混冷致凝胶的溶胀动力学分析

实验结果表明, 不同蛋白多糖比例冷致共混凝胶在模拟胃液中的溶胀度经历两个阶段(图4), 首先在浸泡0~100 min阶段溶胀度随浸泡时间延长呈急剧增加阶段, 此阶段为跃变期。约100 min后进入缓慢增长阶段, 此阶段为缓增期。跃变期内因冷致共混凝胶预先

固化相分离所得不同孔隙度微结构的凝胶基质，水分子进入凝胶孔隙微结构的速度取决于三维孔隙度和凝胶基质强度，随LBG浓度的增加，0~0.15%阶段，网络孔隙相比对照显著增加且网络强度足够强以维系溶胀过程的网络结构。0.25%和0.35%阶段由微观结构及流变性质表明网络强度和峰值0.15%相比大为降低甚至崩解，此过程溶胀速率低于峰值甚至对对照。此过程胃蛋白酶降解大豆11S蛋白非常有限，对凝胶网络结构的弱化还不足以破坏凝胶的三维网络结构，因而随浸润时间延长共混凝胶的体积有不同程度的增加。此过程凝胶的溶胀能力与共混凝胶的粘弹模量及硬度呈增相关关系。

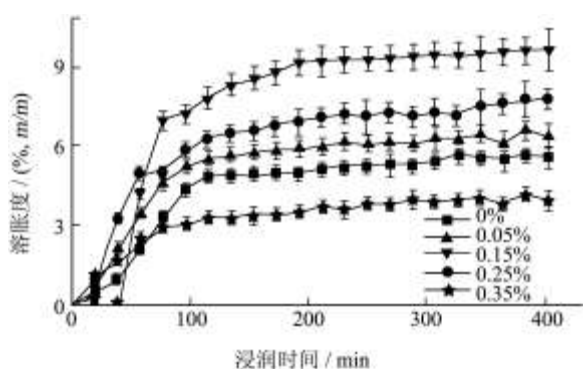


图4 冷致大豆11S蛋白-LBG共混凝胶在模拟胃液中的溶胀性曲线

Fig.4 Effect of LBG concentration on swelling properties of blend gels in SGF

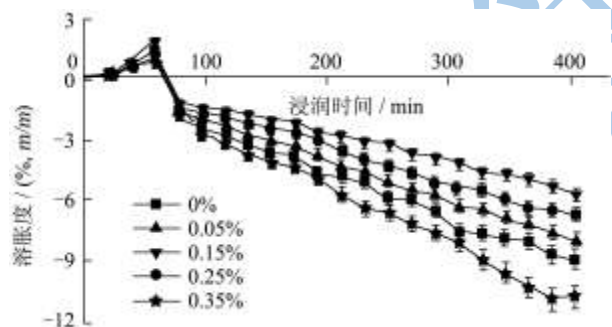


图5 共混凝胶在模拟肠液中的溶胀性曲线

Fig.5 Effect of LBG concentration on swelling properties of blend gels in SIF

由图5可知共混凝胶在浸泡约1 h此过程因凝胶持水能力增加导致体积呈微弱增加趋势，体积溶胀主要因溶剂中的自由水分由凝胶网络表面孔隙进入而充盈蛋白多糖网络相畴空间引起，此阶段溶剂中的胰蛋白酶对网络基质中的蛋白构架存在弱化作用，但弱化能力还未能达到开始崩解凝胶三维体系的强度。随后随浸泡时间延长共混凝胶体积均呈逐渐消减趋势，且随多糖浓度的加大共混凝胶体积消减更为显著，此现象主要因为胰蛋白酶对大豆11S蛋白基质的降解显著，进而崩解网络中的蛋白支撑基质，随时间延长，胰蛋白

酶进一步将大豆11S蛋白降解为小分子肽类，而后者未能维系凝胶三维结构的完整，因此随时间延长体积逐渐减小，部分聚合物结构出现重排而使水挤出基质^[10]。

2.4 大豆11S蛋白-LBG共混冷致凝胶的体外释放实验

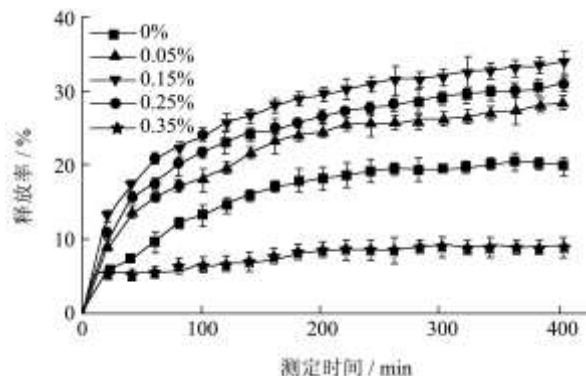


图6 共混凝胶在模拟胃液中对核黄素的释放性能曲线

Fig.6 Riboflavin release curves with different LBG concentration for cold-set blend gels in SGF

功能因子在凝胶基质中的释放动力学受控于功能因子自身特性、凝胶微结构及凝胶大分子成分之间及与功能因子的相容性等因素^[11]。共混凝胶荷载模型功能因子核黄素后在模拟胃液中的释放性能见图 6，结果表明核黄素在不同蛋白多糖比例共混凝胶中的释放性能在实验时间段内均相对较缓，浸润 7 h 后累计释放率未及 40%。随 LBG 的由对照增加到 0.15%，相同浸润时间测定的释放速率呈增加趋势，进一步增加 LBG 浓度至 0.25%，释放速率由峰值降低，但仍比对照高，当 LBG 浓度增加到 0.35% 后，释放速率降低显著。此现象可能主要由以下两方面原因引起：其一 0~0.15% LBG 浓度条件下，共混凝胶网络结构由平整光滑过渡到蛋白连续多糖非连续的“海-岛”结构，此过程凝胶的三维网络结构比对照有更强的弹性和硬度，同时孔隙度增加，溶胀后更利于提供核黄素释放的通道，其二增加 LBG 浓度到 0.25% 后，共混凝胶形成蛋白多糖“海-海”双连续结构，此过程凝胶结构弱化，且与添加 0.35% LBG 样均存在析水现象，表明凝胶结构弱化甚至未能形成蛋白多糖三维相畴的凝胶结构，析水现象致使等量添加核黄素后，蛋白多糖冷致凝胶形成过程未能全部将核黄素包埋。

荷载核黄素的冷致大豆11S蛋白-LBG共混凝胶在模拟肠液中的释放性能测定结果见图7，与在模拟胃液中的释放性能相比，其在模拟肠液中的释放速率显著增加。添加0.15% LBG样共混凝胶浸润7 h后释放速率最高约达90%，而在胃液中释放率约为34%，增幅约近56%。0~0.15% LBG浓度条件下，同浸润时间下测定的释放率随多糖浓度增加而增加，此现象主要因网络基质中11S蛋白被胰蛋白酶降解和微观结构孔隙度渐增

协同增加了核黄素的扩散系数所致。随共混凝胶中的LBG浓度的增加,核黄素释放速率渐增,主因胰蛋白酶逐渐降解蛋白网络基质后,中性多糖LBG本身不具备凝胶作用,三维网络基质崩解后更进一步加快了核黄素的释放速率。另核黄素在模拟肠液中带负电,与大豆11S蛋白所携带电荷类型相同,因此静电排斥作用也可能加快了核黄素在模拟肠液中的释放。

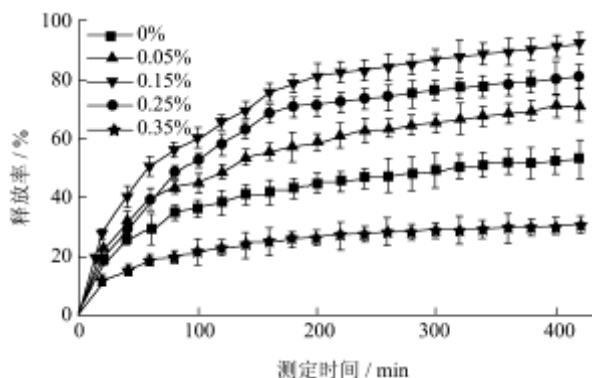


图7 共混凝胶在模拟肠液中对于核黄素的释放性能曲线

Fig.7 Riboflavin release curves with different LBG concentration for cold-set blend gels in SIF

3 结论

添加不同浓度刺槐豆胶形成了不同微结构的凝胶载体,随多糖浓度的增加,冷致凝胶微结构逐渐由蛋白连续多糖非连续转变为多糖连续蛋白非连续形貌,伴随粘弹模量和硬度值呈先增加后降低趋势。冷致共混凝胶的微结构和粘弹、硬度性质直接影响到核黄素在载体中的控释速度,与在模拟胃液中冷致共混凝胶对核黄素的释放速度相比,在模拟肠液中崩解更快,致使核黄素释放加快,7 h后释放率可达90%。改变冷致共混凝胶基质中大分子聚合物的浓度,使凝胶载体微结构、力学性能呈多样性变化,可直接调节凝胶溶胀性及控释性能,进而为利用冷致大豆11S蛋白-刺槐豆胶共混凝胶载体控释功能性因子提供了依据。

参考文献

- [1] van der Sman R G M, van der Goot A J. The science of food structuring[J]. *Soft Matter*, 2009, 5: 501-510
- [2] Donald A. Food for thought [J]. *Nature Mater*, 2004, 3: 579-581
- [3] Mezzenga R, Schurtenberger P, Burbidge A. et al. Understanding foods as soft materials [J]. *Nature Mater.*, 2005, 4: 729-740
- [4] 王晓园,杨晓泉,朱建华.大豆蛋白组分与κ-卡拉胶混合凝胶的流变学研究[J].*现代食品科技*,2008,24(6):501-505
- [5] 周蕊,曾庆孝,朱志伟,等.淀粉对罗非鱼鱼糜凝胶品质的影响[J].*现代食品科技*,2008,24(6):759-772
- [6] Ankareddi I, Brazel C S. Synthesis and characterization of grafted thermosensitive hydrogels for heating activated controlled release [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 336(2): 241-247
- [7] Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40: 941-944
- [8] Saskia de Jong, Fred van de Velde. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels [J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 21: 1172-1187
- [9] Gilsenan P M, Richardson R K, Morris E R. Associative and segregative interactions between gelatin and low-methoxy pectin: Part 3-Quantitative analysis of co-gel moduli [J]. *Food Hydrocolloids*, 2000, 17: 751-761
- [10] Maltais A, Remondetto G E, Subirade M. Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: a molecular and supramolecular investigation. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22: 550-559
- [11] Shen E, Kipper M J, Dziadul B, et al. Mechanistic relationships between polymer microstructure and drug release kinetics in bioerodible polyanhydrides. *Journal of Controlled Release*, 2002, 82: 115-125

欢迎订阅中文核心期刊
《现代食品科技》

邮发代号：46-349 刊号：ISSN 1673-9078/CN 44-1620