

牛蒡根蛋白-降压肽纳米颗粒的制备及稳定性表征

李在群^{1,2}, 柴智², 冯进², 马恺扬², 李莹^{2*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212000)

(2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要: 该研究采用缓冲液浸提法提取牛蒡根蛋白 (Burdock Root Protein, BRP), 并制备载泥鳅降压肽丙氨酸-组氨酸-亮氨酸-亮氨酸 (Ala-His-Leu-Leu, AHLL) 的牛蒡根蛋白纳米颗粒 (Burdock Root Protein Nanoparticles Loaded with Loach Antihypertensive Peptide, BANPs)。BRP 与 AHLL 通过自组装形成 BANPs, 采用扫描电镜、荧光与紫外-可见光谱扫描、傅里叶红外光谱等对 BANPs 的结构和分子间相互作用进行表征, 考察了不同温度、pH 值对 BANPs 稳定性的影响。结果发现, pH 值 5.0 时, BANPs 粒径较小 (231.47 nm), 带负电荷 (-19.10 mV), BRP 分子通过静电相互作用和疏水相互作用与 AHLL 分子结合。随着 BRP 与 AHLL 质量浓度的增加, 当 BRP 为 8 mg/mL, AHLL 为 200 μg/mL 时, BRP 对 AHLL 的封装率提高到 77.28%, 载药量提高到 23.90%。在 60~100 °C 范围内, BANPs 的温度稳定性较高, 与游离 AHLL 相比降解率低至 46.90%; 在 pH 值 4.0~8.0 范围内 BANPs 的 pH 稳定性较高, 与游离 AHLL 相比降解率低至 33.16%。该研究表明, BRP 纳米载体可以有效地保护 AHLL 免受 pH 值和热降解的影响, 具有作为功能性食品中生物活性肽的纳米递送系统的潜力。

关键词: 牛蒡; 泥鳅降压肽; 纳米颗粒; 包埋; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2023)12-207-215

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.0032

Preparation and Stability Characterization of Burdock Root

Protein-antihypertensive Peptide Nanoparticles

LI Zaiqun^{1,2}, CHAI Zhi², FENG Jin², MA Kaiyang², LI Ying^{2*}

(1. School of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China)

(2. Institute of Agricultural Processing Research, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, burdock root protein (BRP) was obtained by buffer extraction, and burdock root protein nanoparticles (BANPs) loaded with loach antihypertensive peptide (Alanine-Histidine-Leucine-Leucine, AHLL) were then prepared. BANPs were formed by BRP and AHLL *via* self-assembly. The structure and intermolecular interactions of BANPs were studied by scanning electron microscopy, fluorescence and UV-Vis spectroscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy. The stability of BANPs under different temperatures and pHs was also investigated. The results showed that the BANPs had a smaller particle size (231.47 nm) and negative charge (-19.10 mV), and were formed through electrostatic and hydrophobic interactions between BRP and AHLL at pH 5. As the mass concentrations of BRP and AHLL increased, the AHLL encapsulation efficiency increased and drug loading content increased (to 77.28% and 23.90%, respectively when BRP=8 mg/mL and AHLL=200 μg/mL). The BANPs showed a high stability in the temperature range of 60~100 °C and pH range of 4.0~8.0. Compared to free AHLL, the degradation rate of encapsulated AHLL was as low as 33.16%. This study has shown that BRP nanocarriers can effectively protect AHLL against the impacts of pH and thermal degradation, thus have the potential as a nano-delivery system for bioactive peptides in functional foods.

Key words: burdock; loach antihypertensive peptide; nanoparticles; encapsulation; stability

引文格式:

李在群,柴智,冯进,等.牛蒡根蛋白-降压肽纳米颗粒的制备及稳定性表征[J].现代食品科技,2023,39(12):207-215

LI Zaiqun, CHAI Zhi, FENG Jin, et al. Preparation and stability characterization of burdock root protein-antihypertensive peptide nanoparticles [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 207-215

收稿日期: 2023-01-09

基金项目: 江苏省创新支撑计划乡村振兴项目 (FX202201); 江苏省农业自主创新基金项目 (CX(19)2006)

作者简介: 李在群 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物与医药, E-mail: 34753351@qq.com

通讯作者: 李莹 (1981-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: hijoly@163.com

牛蒡俗称东洋参,属菊科草本植物,是一种具有较高食用价值和药用价值的中药。牛蒡根具有抗菌、抗氧化、降血糖等药理活性^[1],新鲜牛蒡根由70%水、2.8%蛋白质、25%碳水化合物及0.6%灰分组成,其中蛋白质为牛蒡根重要组成成分^[2]。然而,牛蒡作为食品原料的研究已经非常广泛,但其研究重点多为牛蒡多糖与膳食纤维^[3],而不是牛蒡蛋白。随着消费者对食品安全的担忧和动物源蛋白价格的上涨,人们对天然植物源蛋白的兴趣不断增加^[4]。据报道,根茎中膳食蛋白质被认为是一种具有较高生物价值的蛋白质^[5]。例如,Tran等^[6]报道的山参蛋白介导的纳米颗粒表现出良好的抗炎效果。牛蒡根干片中蛋白质含量为12.3%,蛋白质在加工过程中作为副产品被丢弃,造成蛋白质资源的浪费。而牛蒡根中氨基酸含量比较丰富,其中药效氨基酸占氨基酸总量的77.65%,鲜味氨基酸为36.34%,同时也是一种成本较低天然植物蛋白来源^[7]。

从泥鳅中提取的降压肽具有较强的血管紧张素转化酶(Angiotensin Converting Enzyme, ACE)抑制活性^[8],然而,生物活性肽易被胃肠道中的酶降解,需要通过载体保护其能递送到有效作用靶位点^[9]。这可以通过纳米载体包埋来实现,以保护其结构和功能完整性,并提高其对胃肠道蛋白酶和肽酶的稳定性。因此,包封已成为促进生物活性肽作为功能性食品增强人类健康的相关重要技术,它保护生物活性肽免受物理化学影响,并增强其在体外和体内的功效^[10]。

纳米颗粒作为载体具有多种优势,纳米技术已成为制药科学领域的重要组成部分。在纳米颗粒中,蛋白质基纳米颗粒是最重要的。研究表明,蛋白质基纳米颗粒与其他类型的纳米颗粒相比具有无毒和可生物降解等优势^[11]。Yang等^[12]测试了乳清蛋白水解物在麦芽糖糊精和 β -环糊精胶囊中的包封效果。另一方面,Alvarado等^[13]使用海藻酸盐阿拉伯胶包封抗高血压肽。这些研究中最重要的是证实了包埋可以提高活性物质的稳定性。尽管如此,关于活性分子包封优点的证据是不够的,需要更多的研究来证明,以便提供有关活性分子包埋技术的相关数据。

本研究通过自组装制备负载泥鳅降压肽的牛蒡根蛋白纳米颗粒,探讨不同因素对AHLL的包埋效果及其稳定性情况,同时对牛蒡根蛋白纳米颗粒的粒径、微观形态和结构进行表征,不仅提高牛蒡根蛋白的利用率,而且为泥鳅源降压肽的口服利用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

牛蒡粉,实验室前期制备;血管紧张素转化酶抑制肽,上海强耀公司;Tris-HCl缓冲液,上海源叶生物有限公司;透析袋(8 000~14 000 u),上海源叶生物有限公司;BCA蛋白定量试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;PAGE预制胶,上海碧云天生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

BX-2F磁力搅拌器,常州普天仪器制造有限公司;TGL-50 WS型大容量高速离心机,巩义市宏华仪器设备工贸有限公司;LB 941 TriStar微孔板多功能分析仪,德国Berthold Technologies公司;1260 Infinity高效液相色谱仪,美国Agilent公司;Alpha-1900Plus紫外分光光度计,上海普元仪器有限公司;F-7000荧光分光光度计,日本Hitachi公司;500型精密电子天平,意大利BEL公司;DK-8D电子恒温水浴槽,上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 牛蒡蛋白提取

采用Tris-HCl缓冲液浸提法提取牛蒡根蛋白^[14],取4g牛蒡粉按照1:10料液比加入pH值8和pH值9的NaOH溶液与不同浓度Tris-HCl缓冲液(pH值7.4)40 mL,充分摇匀混合后4℃冰箱浸提过夜(约10 h),充分浸提后7 000 r/min离心10 min取上清液,向上清液中加入硫酸铵至饱和度为85%(m/V),4℃冰箱过夜后6 000 r/min离心10 min,除去上清液得到蛋白质浸膏,加入少量Tris-HCl缓冲液使蛋白质溶解,使用超纯水透析(截留量为8 000~14 000 u)3 d,冻干后得到牛蒡根蛋白粉末。

1.2.2 蛋白含量测定

将得到的0.5 mg牛蒡粗蛋白加入1 mL超纯水中复溶,充分混匀后6 000 r/min,离心10 min,取上清液。采用BCA法对提取的牛蒡粗蛋白进行测定^[15],按照试剂A与试剂B 50:1的比列配制工作液,将0.5 mg/mL的标准品按1、2、4、8、12、16、20 μ L加到96孔板中,并用PBS补足至20 μ L,分别加入200 μ L BCA工作液混匀,37℃静置30 min,波长562 nm酶标仪测定不同浓度标准品的吸光度,以蛋白质量浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为: $y=0.904x+0.0913$ ($R^2=0.9993$)。牛蒡粗蛋白中的蛋白质含量根据以上方程及蛋白测定的浓度求得。

1.2.3 Native-PAGE分析

将制备的蛋白上清液置于离心管中,加入上样缓冲液2 mL,混匀,10 000 r/min离心3 min取上清,上样量为20 μ L,配制12%(V/V)分离胶,5%(V/V)浓缩胶,以恒流模式进行凝胶电泳。利用0.25%(m/m)

考马斯亮蓝(R-25)染液对凝胶染色1 h,使用脱色液(乙酸:乙醇:水=50:75:875)4℃冰箱脱色6 h。

1.2.4 BANPs 制备

用 HBSS 配制 0.01 mol/L 平衡盐溶液,将 20 mg AHLL 溶于 1 mL HBSS 中制成 20 mg/mL 的 AHLL 母液,将 15 mg 牛蒡根蛋白溶于 10 mL 纯水中磁力搅拌 30 min,使蛋白充分溶解,将溶液 pH 值调节至 5,向溶液中缓慢滴加 20 mg/mL AHLL 母液使其最终质量浓度为 200 μg/mL,随后置于 4℃层析柜磁力搅拌 2 h 使其充分结合。通过超高压微射流(12 000 PSI)后,用纯水进行透析,透析期间每 4 h 更换一次透析液,透析 3 d 后将溶液取出避光保存。

1.2.5 BRP 质量浓度对包封率及载药量的影响

控制 AHLL 质量浓度为 400 μg/mL,其他因素条件不变,利用一系列质量浓度梯度的 AHLL 溶液制备 BANPs 溶液。探讨不同质量浓度的 AHLL 对纳米颗粒溶液的包埋效果。包埋率与载药量由下式计算:

$$E = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$L = \frac{A_1 - A_0}{A_2 + A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

E —包埋率, %;

L —载药量, %;

A_0 —投入 AHLL 的质量浓度, μg/mL;

A_1 —游离 AHLL 的质量浓度, μg/mL;

A_2 —投入 BRP 的质量浓度, μg/mL。

1.2.6 AHLL 质量浓度对包封率及载药量的影响

控制 BRP 为 8 mg/mL,其他因素条件不变,利用一系列浓度梯度的 AHLL 溶液制备 BANPs 复合纳米颗粒溶液。探讨不同浓度的 AHLL 对复合纳米颗粒溶液的包埋效果。

1.2.7 BANPs 结构测定

1.2.7.1 扫描电子显微镜(SEM)实验

吸取 10 μL 按上述 1.2.4 的方法制备的复合纳米颗粒载体溶液滴加在洁净的盖玻片上室温下烘干液滴后,再将盖玻片粘结在具有导电装置的样品台上,在真空环境下做喷金处理操作,在扫描电镜下观测样品形态特征。

1.2.7.2 粒径及 Zeta 电位测定

使用动态光散射测定纳米颗粒的粒径分布和电位。将上述按 1.2.4 制备的 BRP、BANPs 溶液放入纳米粒度仪的检测槽中,设置温度为(25±1)℃、光散射角度 90°,功率 30 W。在此条件下测定复合纳米颗粒的粒径和 Zeta 电位数值。

1.2.7.3 傅里叶变换红外光谱

采用傅立叶变换红外光谱仪评估了 BRP 与 AHLL 之间的相互作用。将 BANPs 冻干粉末用杵手工研磨成粉末。将研磨好的粉末在 4×10⁸ Pa 的压力下压制成薄片。以空气为背景,在 500~4 000 cm⁻¹ 和 4 cm⁻¹ 分辨率范围内分析红外吸收扫描。

1.2.7.4 荧光光谱分析

使用荧光分光光度计对 BRP 与 BANPs 进行内源荧光测定。将上述制备的复合纳米颗粒溶液加入微量比色皿中,荧光激发波长 280 nm,荧光发射波长 285~500 nm,激发缝宽 3 nm,发射狭缝宽度 10 nm,扫描速度为 300 nm/min,于此条件下对样品进行检测。

1.2.7.5 紫外-可见光分析

使用紫外分光光度计对 BRP、BANPs 及 AHLL 进行紫外-可见光光谱扫描,将上述制备的复合纳米颗粒溶液加入石英比色皿中,紫外光谱扫描起始波长 190 nm,终止波长 600 nm 对样品进行紫外检测。

1.2.7.6 不同解离溶剂对纳米颗粒的影响

利用尿素、NaCl 和 SDS 对 BANPs 原液进行稀释,得到尿素稀释液(6 mol/L)、NaCl 稀释液(0.5 mol/L)和 SDS 稀释液(0.5%)样品。对每个样品的浊度、粒径和 Zeta 电位进行测定。

1.2.8 BANPs 稳定性测定

1.2.8.1 温度对纳米颗粒稳定性的影响

将制备好的将制备好的 AHLL、BRP、BANPs 溶液分别置于不同温度(60、70、80、90、100℃)的水浴锅中保温 1 h 后取样,对照为 AHLL 溶液标品,取样后过 0.45 μm 滤膜,用高效液相法测定多肽 AHLL 的保留量,并利用动态光散射对其粒径和电位进行测定。AHLL 的降解率由下式计算:

$$R = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

R —降解率, %;

A_0 —初始 AHLL 的质量浓度, μg/mL;

A_1 —处理后 AHLL 的质量浓度, μg/mL。

1.2.8.2 pH 值对纳米颗粒稳定性的影响

调节 AHLL、BRP、BANPs 复合纳米颗粒溶液 pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0),磁力搅拌 60 min 后,用高效液相法测定多肽 AHLL 的保留量,并利用动态光散射对其粒径和电位进行测定。

1.2.9 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 SASS 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 结果与讨论

2.1 浸提溶剂对 BRP 提取率及蛋白含量的影响

碱溶酸沉法是蛋白质提取的传统方法。本研究采用 NaOH 溶液 (pH 值 8.0、9.0) 和 0.05、0.1、0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液作为浸提溶剂分别对 BRP 进行提取, 并考察了 BRP 的提取率及蛋白含量。由图 1 可知, 浸提溶剂的种类和浓度对 BRP 的提取率和蛋白含量具有显著的影响。传统碱液提取时, BRP 提取率较低, 且长时间的碱液浸提也易造成蛋白质的变性和有害物质生成, 对蛋白质的后续利用产生不良影响。Tris-HCl 缓冲液显著提升了 BRP 的提取率 ($P < 0.05$), 且提取率和蛋白含量随着缓冲液体系浓度的增加而表现出增大的趋势。0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液作为浸提溶剂时, BRP 的得率和蛋白含量最高, 分别为 6.62% 和 68.62%。

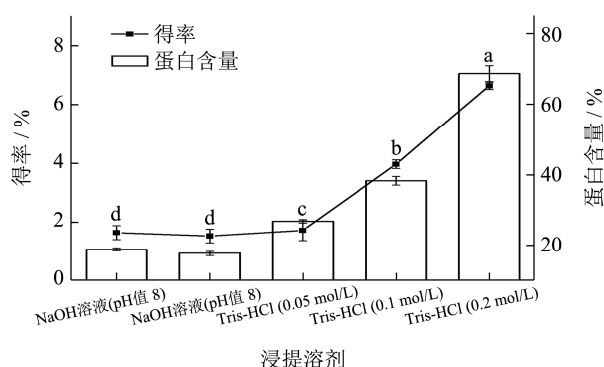


图 1 不同浸提溶剂对牛蒡根蛋白提取率及蛋白含量的影响
 Fig.1 Effects of different extraction solvents on the extraction yield and protein content of burdock root protein
 注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.2 BRP 的 Native-PAGE 分析

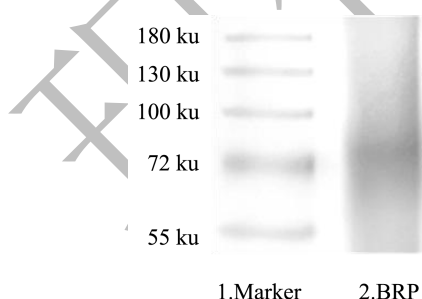


图 2 BRP 的 Native-PAGE 电泳图谱

Fig.2 Native-PAGE electrophoretic pattern of BRP

通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了 BRP 的均一性, 这是一种在非变性条件下分离蛋白复合物的分辨率方法^[16]。结果如图 2 所示, 天然的 BRP 仅在 75~100 ku 之间有一条明显的条带, 表明大部分 BRP 都

集中在这个分子量范围内, 提取得到的 BRP 较为均一。此外, 本研究采用的溶剂提取法对 BRP 的影响较小, 没有破坏牛蒡中固有蛋白组成, 也没有杂蛋白干扰。

2.3 BRP、AHLL 质量浓度对 BANPs 包封率和载药量的影响

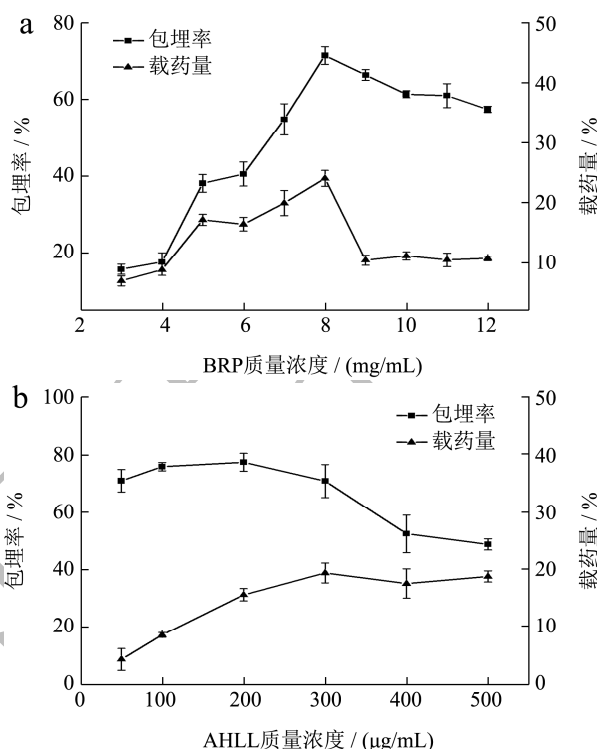


图 3 BRP、AHLL 浓度对复合纳米颗粒包封率和载药量的影响
 Fig.3 Effect of BRP and AHLL concentrations on the encapsulation efficiency and drug loading of composite nanoparticles

活性肽的包封效率是影响其稳定性和功能发挥的重要因素之一^[17]。为此, 本研究测定了 BRP 和 AHLL 的质量浓度变化对降压肽包封效率及载药量的影响。固定降压肽 AHLL 的添加量为 200 $\mu\text{g/mL}$, 保持其它条件不变的情况下制备 BANPs, 探讨载体蛋白 BRP 浓度对 AHLL 包封率的影响。由图 3a 可见, 随着 BRP 浓度的增加, 纳米颗粒中 AHLL 包封率快速且显著地上升, 当 BRP 为 8 mg/mL 时, AHLL 的包封率最高, 达到 71.43%, 随后继续增大 BRP 质量浓度, 包封率变化不大, 甚至表现出一定的下降趋势。BANPs 的载药量也具有类似的变化: 载药量起初随着 BRP 质量浓度的增大而上升, 接着快速下降并基本保持稳定。这说明, BANPs 的包封率和载药量与载体蛋白 BRP 质量浓度之间并不呈现简单的线性正相关关系。当 BRP 质量浓度较低时, 溶液中的载体数量较少, 没有足够多的蛋白分子包裹 AHLL 导致对 AHLL 的包封不充

分,因此包封率较低。增加载体 BRP 的质量浓度将导致体系中形成更多稳定的纳米颗粒,AHLL 的包封率和载药量随之升高,并逐渐达到饱和。此时继续增大 BRP 质量浓度,体系中过剩的载体分子并不有助于包封率的进一步提升,过高的 BRP 质量浓度下载体蛋白反而会发生聚集,影响包埋效果,造成 AHLL 包封率和载药量呈现出下降的趋势。Yuan 等^[18]采用不同比例的玉米醇溶蛋白包埋叶黄素,其包埋率与载药量同样呈现先升高后降低的趋势。

类似地,固定载体蛋白 BRP 为 8 mg/mL,保持其它条件不变的情况下,考察 AHLL 添加量对 BANPs 包封率和载药量的影响(图 3b)。随着 AHLL 添加量的增加,纳米颗粒的包封率首先略有增大并基本保持稳定,当 AHLL 质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,包封率最高,达到 77.28%,此后包封率呈现出下降趋势。纳米颗粒的载药量随着 AHLL 质量浓度的增加不断提高,之后保持平稳。这表明,当载体数量过剩时,增加 AHLL 质量浓度可以提高纳米颗粒的载药量。当 BRP 与 AHLL 充分结合形成稳定的纳米颗粒后,由于蛋白载体逐渐饱和,过多的 AHLL 分子也不会被包埋,反而会造成体系包封率的下降。

2.4 BANPs 的结构表征

2.4.1 粒径与电位分析

zeta 电位决定了悬浮在液体中的纳米颗粒的团聚状况,一般可反映粒子之间由于静电排斥所产生的稳定性。zeta 电位值越大,表明纳米颗粒表面同种电荷产生的静电斥力越大,体系稳定性也相对越好^[19]。图 4 展示了不同 pH 值条件下(pH 值 2.0~7.0) BRP 和 BANPs 的粒径和电位值变化。pH 值 2.0 时, BRP 带正电荷;pH 值 3.0 左右, BRP 大量凝集形成沉淀,聚集体粒径较大,且电位值趋于零,推测此时达到 BRP 的等电点。pH 值 4.0~7.0 时 BRP 带较多负电荷,当 pH 值 6 时 BANPs 电位值为 -21.33 mV,由于负电荷的增加,粒子间的排斥力使 BRP 粒径较小,集中在 138.53~185.47 nm, BRP 体系整体较为稳定,殷婷等^[20]报道的负载白藜芦醇的大麦醇溶蛋白纳米颗粒 Zeta 电位均在 20 mV 左右,Zeta 电位(正或负)越高,体系越稳定,即溶解或分散可以抵抗聚集。当 BRP 与 AHLL 结合形成纳米颗粒后,由于 AHLL 的引入使得 BANPs 的粒径略高于 BRP,为 166.80~280.30 nm,粒径分布均匀,且在 pH 值 4.0~7.0 的范围内,pH 值的改变对 BANPs 粒径影响较小。加入 AHLL 后,BANPs 的电位值略有下降,推测 BRP 与 AHLL 间存在一定的静电相互作用^[21]。

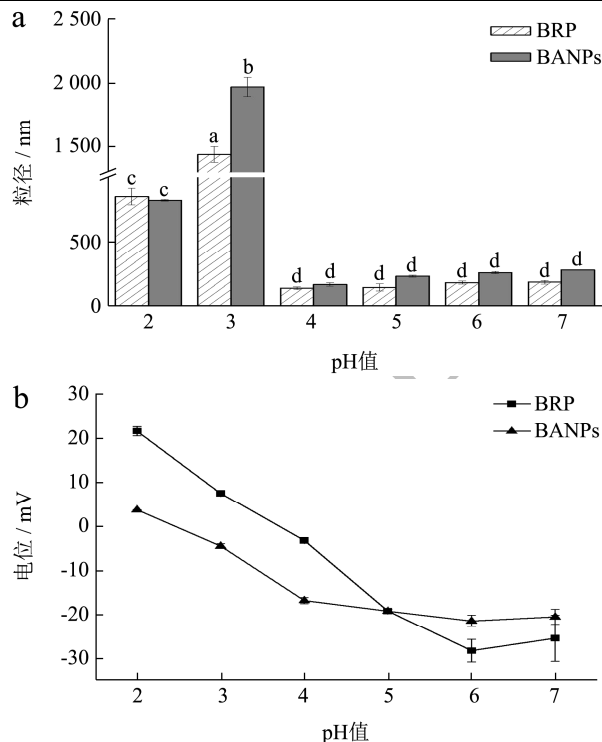


图 4 不同 pH 值条件下 BRP、BANPs 的粒径及电位变化

Fig.4 Particle size and potential changes of BRP and BANPs under different pH conditions

注:不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.4.2 荧光与紫外-可见光谱分析

BRP 及 BANPs 的荧光发射光谱如图 5a 所示。色氨酸和酪氨酸是蛋白质的主要内源荧光基团^[22]。激发波长为 285 nm 时, BRP 的最大荧光发射峰出现在 416 nm 处。加入 AHLL 后, BANPs 的荧光强度显著下降,并随着 AHLL 浓度增加,荧光强度逐渐降低,发生了荧光淬灭现象。推测在 BANPs 的形成过程中, AHLL 的引入可能导致 BRP 疏水核中色氨酸残基原本的疏水微环境发生变化,疏水性降低,极性增强, BRP 的固有荧光被淬灭导致体系荧光强度下降,表明疏水相互作用参与了 AHLL 与 BRP 纳米颗粒的形成, BRP 的空间结构变得更加伸展。Wang 等^[23]也报道了在制备鳕鱼蛋白纳米颗粒时,随着姜黄素浓度的增加其荧光强度出现有规律的降低,表明疏水相互作用在分子间起重要作用。同时, AHLL 与 BRP 结合过程中的静电相互作用可能也影响了 BRP 的分子结构。

检测了 BRP、BANPs 的紫外-可见光谱。如图 5b 所示, BRP 的最大吸收峰出现在 276 nm 处,是蛋白质中芳香族氨基酸的特征吸收峰^[24]。添加 AHLL 后,形成的纳米颗粒的吸收峰强度增加,最大吸收波长从 276 nm 增加到 293 nm,出现红移,表明 BRP 与 AHLL 的结合影响了蛋白质的构象,生成了新的复合物,导致蛋白质的吸收光谱发生变化。吸光度的增加和吸收

波长的红移,可能是 AHLL 与 BRP 间的相互作用使得蛋白质中芳香族氨基酸色氨酸等残基的位置发生变化,产生了新的共轭体系,这与荧光光谱的结果是一致的。

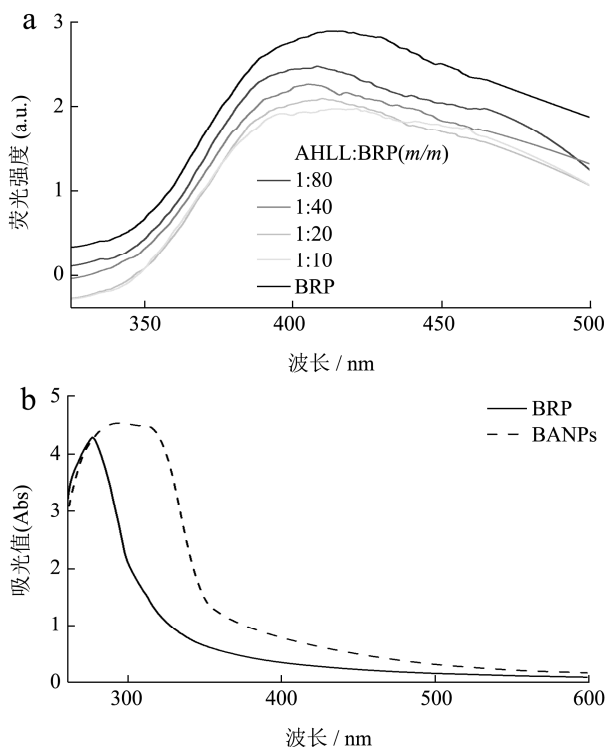


图5 BRP、BANPs 荧光光谱和紫外-可见光谱图

Fig.5 Fluorescence and UV spectra of BRP and BANPs

2.4.3 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 分析

为了确定 BRP 与 AHLL 相互作用前后二级结构的变化,本研究对 BRP 和 BANPs 的红外光谱进行了扫描(图6)。BRP 和 BANPs 在 $3\ 283\ \text{cm}^{-1}$ 处存在一个宽频带,而 $3\ 100\sim 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 范围的特征吸收峰是由 O-H 键的强拉伸振动产生的^[25],因此 BRP 和 BANPs 均存在 O-H 键的拉伸振动。

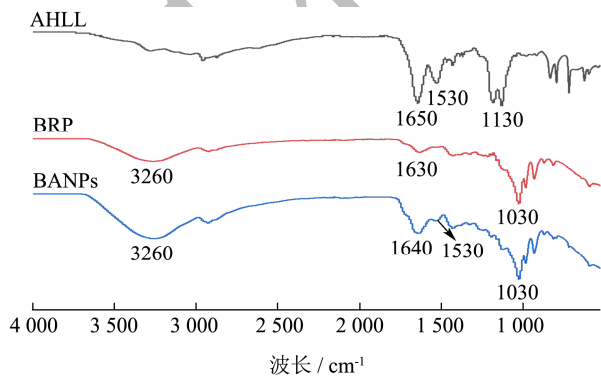


图6 BRP、BANPs 红外光谱图

Fig.6 FT-IR spectra of BRP and BANPs

蛋白质的主要特征吸收带包括酰胺 I 带 ($1\ 600\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$) 和酰胺 II 带 ($1\ 500\sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$)^[26], 分别由 C=O 的伸缩振动和 C-N 的伸缩振动以及 N-H 的

面内弯曲振动产生,酰胺 I 带和酰胺 II 带均与蛋白质的二级结构密切相关,是由 α -螺旋、 β -折叠、转角和无规卷曲叠加共同作用所产生的吸收带^[27]。如图6所示,BRP 的 FT-IR 光谱在 $1\ 630\ \text{cm}^{-1}$ 处显示出一个典型的酰胺 I 带吸收峰,在引入 AHLL 形成 BANPs 后,此特征吸收峰产生明显移动,且在 $1\ 530\ \text{cm}^{-1}$ 处观察到出现了一个新的峰,这表明复合纳米颗粒形成时,BRP 和 AHLL 的组装力中存在静电相互作用^[28]。Fan 等^[29]报道的大豆分离蛋白与岩藻多糖纳米颗粒由于静电相互作用在酰胺 I 带和酰胺 II 带均出现移动。这也验证了电位测定的结果。

2.4.4 BANPs 分子间相互作用分析

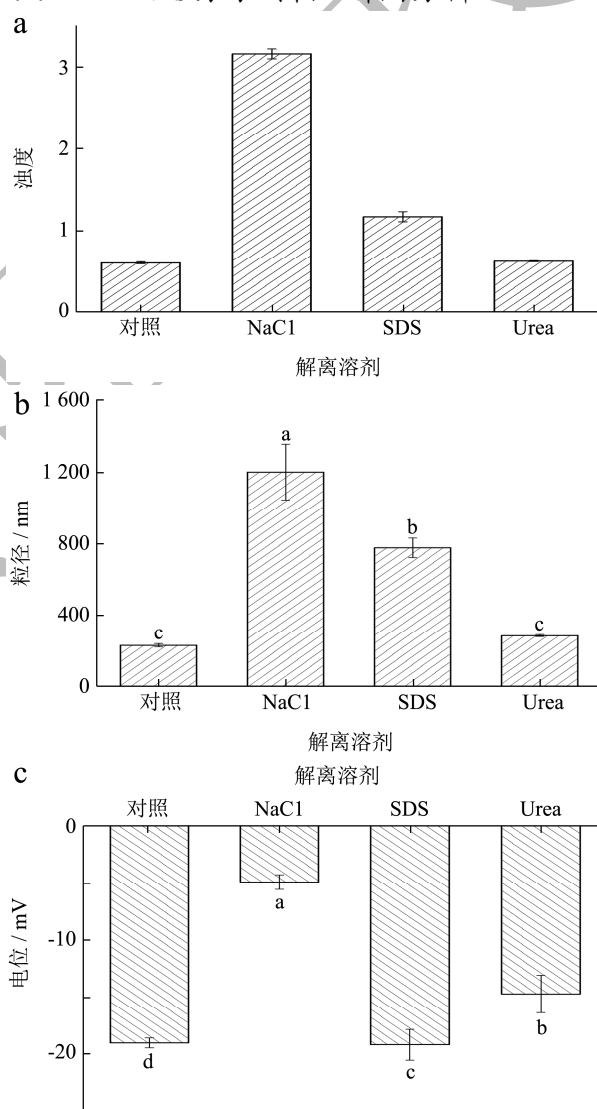


图7 不同解离溶剂对 BANPs 溶液浊度、粒径及电位的影响

Fig.7 Effect of different dissociation solvents on turbidity, particle size and potential of BANPs solution

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$)。

纳米颗粒之间存在不同类型的作用力,可以通过分析浊度、粒径、电位等参数的相对变化来评估不同

解离溶剂条件下纳米颗粒间作用力的变化规律^[30]。图7为BANPs在NaCl、SDS和尿素3种不同解离溶剂条件下(24 h)的物化参数变化结果。加入NaCl后, BANPs溶液的浊度值、粒径显著增大, 电位显著降低并趋于零, 表明静电相互作用是BANPs分子间的主要作用力, 同样的, 许雪儿等^[31]研究的玉米醇溶蛋白纳米颗粒在NaCl的干扰下发生了电荷屏蔽作用, 颗粒絮凝, 粒径电位增大; 类似地, SDS的加入也导致了BANPs溶液的浊度值、粒径增大, 电位值降低, 即疏水相互作用在BANPs的形成和稳定过程中也发挥了重要作用。以浊度值的变化(ΔT)为例, 3种条件下 ΔT 依次为NaCl>SDS>尿素(静电相互作用>疏水相互作用>氢键), 此外, 粒径和电位的变化趋势也支持上述结果。因此, 实验表明, BANPs的形成和维持主要受静电相互作用和疏水相互作用的影响这与荧光和FT-IR的结果一致。

2.5 BANPs的微观形貌观察

通过扫描电镜观察到BRP和BANPs的微观结构特征, 纳米颗粒的结构影响到复合体系的稳定, 结果如图8所示。BRP呈现外形较光滑且规则的球状颗粒, 分布均匀, 其粒径主要集中在150~200 nm之间, 这与动态光散射测定的粒径结果是一致的。BANPs经冷冻干燥后颗粒表面发生皱缩, 呈不规则形态, 但分布较均匀。相关研究表明, 纳米颗粒的形态参数对其生物学反应及相互作用有一定的影响^[32]。

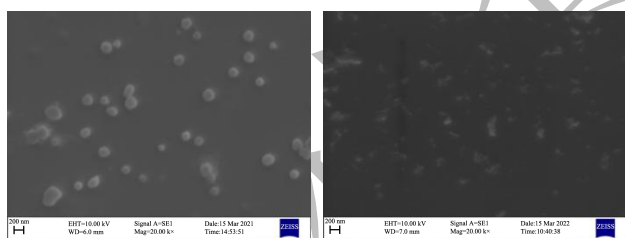


图8 BRP(左)、BANPs(右)的微观形貌观察

Fig.8 Microscopic morphology observation of BRP and BANPs

2.6 BANPs的稳定性分析

2.6.1 BANPs的热稳定性

AHLL等天然活性物质在食品加工过程中或极端的条件下(如高温等)通常是不稳定的^[33]。因此, 在60、70、80、90、100℃下处理60 min, 考察了游离AHLL和BANPs中AHLL的稳定性。如图9a所示, 游离AHLL的降解速率较快, 温度升高到70℃时, AHLL降解率急剧上升到57.39%; 当温度达到100℃, 60 min后AHLL仅剩不到25%, 75.61%的AHLL发生了降解, 而此时BANPs中包埋AHLL的降解率为

46.90%, 其稳定性提高了28.71个百分点。Zhang等^[34]测定铁蛋白包埋ACE抑制肽的稳定性, 当温度为80℃时, 活性肽降解率为51.34%, 相同温度下, 本研究中AHLL的降解率仅为36.08%, 显著低于Zhang等^[34]报道的降解率。在整个温度测试范围内, BRP包埋处理后的纳米颗粒中AHLL的降解率均显著低于游离AHLL, 这表明基于BRP的纳米载体明显增强了AHLL的热稳定性。如图10a所示, 随着温度的升高, BANPs的粒径逐渐降低并保持稳定, 而电位的变化较小。这主要是BRP由于自组装通过静电等相互作用结合形成了致密的纳米颗粒结构和更有效的疏水囊, 致密的纳米颗粒结构可以通过隔绝温度与其它水溶性促氧化剂(包括自由基、氧和金属离子)等作用来保护AHLL免受降解, 稳定性提高。

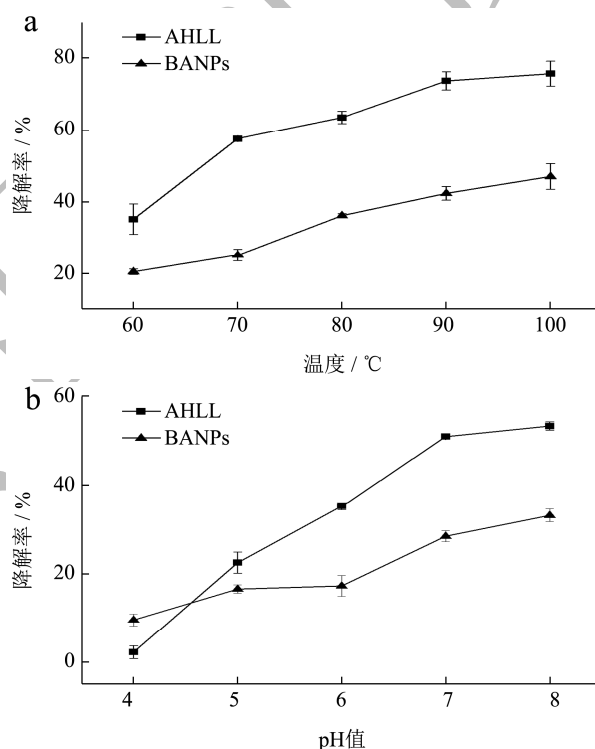


图9 不同温度、pH值对AHLL降解率的影响

Fig.9 Effect of different temperature and pH on the degradation rate of AHLL

2.6.2 BANPs的pH稳定性

负载降压肽的牛蒡蛋白纳米颗粒在不同pH值下的稳定性对其在食品中的应用有很大的影响。以降解率作为不同pH值下稳定性的评价指标, 结果如图9b所示, 随着pH值的逐渐增大, 游离AHLL的降解率急剧增加, pH值7.0~8.0时, AHLL降解率均超过50%; 而BANPs中AHLL降解率的增加速率较为平稳, 在pH值5.0~8.0的范围内, BANPs中包埋的AHLL的降解率均显著低于游离AHLL。结合图10b的结果, 推测这可能是因为该pH值范围内时BRP分子携带较

多的负电荷,可通过静电相互作用等与 AHLL 较紧密地结合,从而保证了较宽 pH 值范围内的纳米颗粒中活性肽的稳定性。

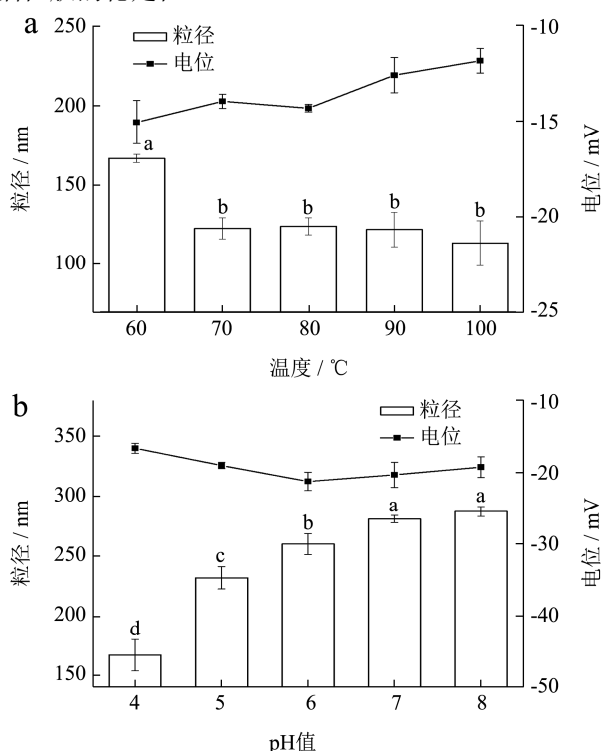


图 10 不同温度、pH 值对 BANPs 粒径及电位的影响

Fig.10 Effects of different temperatures and pH on the particle size and zeta potential of BANPs

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

3 结论

本研究表明,利用 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液提取牛蒡根蛋白,并利用 BRP 构建了负载 AHLL 的复合纳米颗粒递送体系,发现提取的牛蒡根蛋白成分固定无杂蛋白质干扰,与 AHLL 通过静电相互作用和疏水相互作用形成稳定的复合纳米颗粒。在 BRP 为 8 mg/mL, AHLL 为 200 μ g/mL 时,载体蛋白 BRP 对 AHLL 的包封率高达 77.28%,载药量提高到 23.97%,BANPs 颗粒分布比较均匀且粒径较小。随着温度升高和 pH 值增大, BANPs 中 AHLL 降解率均显著低于游离 AHLL,粒径电位变化较小并趋于稳定,稳定性显著提高。因此,本文报道的牛蒡根蛋白可用于小分子生物活性肽的包封与保护,有望用于活性肽的靶向递送与可控释放,为未来我们利用蛋白纳米载体封装小分子疏水活性肽提供理论基础。

参考文献

[1] Chen Y S, Cheng L N, Wu J H, et al. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock) [J].

Inflammopharmacology, 2011, 19(5): 245-254.

- [2] 乔贝贝.牛蒡根化学成分及其生物活性研究[D].南京:南京农业大学,2019.
- [3] Nabeshima E H, Moro T M A, Campelo P H, et al. Tubers and roots as a source of prebiotic fibers [J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2020, 94: 267-293.
- [4] Du M, Xie J, Gong B, et al. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of mung bean protein [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 76: 131-140.
- [5] Phillips R D. Starchy legumes in human nutrition, health and culture [J]. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 1993, 44(3): 195-211.
- [6] Tran T H M, Puja A M, Kim H, et al. Nanoemulsions prepared from mountain ginseng-mediated goldnanoparticles and silydianin increase the anti-inflammatory effects by regulating NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Biomaterials Advances*, 2022, 137: 212814.
- [7] 谢小花,安晓婷,陈静,等.牛蒡根中的功能成分及多酚类化合物提取方法研究进展[J].*湖南文理学院学报(自然科学版)*,2019,31(3):25-31.
- [8] Li Y, Zhou J, Huang K, et al. Purification of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide with an antihypertensive effect from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(5): 1320-1325.
- [9] Nongonierma A B, Fitzgerald R J. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(15): 3407-3423.
- [10] Cao S J, Xu S, Wang H M, et al. Nanoparticles: Oral delivery for protein and peptide drugs [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2019, 20(5): 190.
- [11] Tarhini M, Greige-Gerges H, Elaissari A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 522(1-2): 172-197.
- [12] Yang S, Mao X Y, Li F F, et al. The improving effect of spray-drying encapsulation process on the bitter taste and stability of whey protein hydrolysate [J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 235(1): 91-97.
- [13] Alvarado Y, Muro C, Illescas J, et al. Encapsulation of antihypertensive peptides from whey proteins and their releasing in gastrointestinal conditions [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(5): 164.
- [14] 王钰莹,闫福源,闫凯丽,等.人參蛋白的提取和体外免疫调

- 节活性研究[J].长春中医药大学学报,2018,34(3):443-445.
- [15] 晋海军,蒋廷红,王海霞,等.川续断根蛋白提取工艺的优化及分析[J].生物学杂志,2020,37(3):102-105.
- [16] Alu'datt M H, Rababah T, Kubow S, et al. Molecular changes of phenolic-protein interactions in isolated proteins from flaxseed and soybean using Native-PAGE, SDS-PAGE, RP-HPLC, and ESI-MS analysis [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(5): e12849.
- [17] 郝晓丽,吉日木图,何静.利用纳米载体口服递送生物活性肽的研究进展[J].食品科学,2021,42(11):341-348.
- [18] Yuan Y, Li H, Liu C, et al. Fabrication and characterization of lutein-loaded nanoparticles based on zein and sophorolipid: Enhancement of water solubility, stability, and bioaccessibility [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(43): 11977-11985.
- [19] Senapathi J, Bommakanti A, Mallepalli S, et al. Sulfonate modified lactoferrin nanoparticles as drug carriers with dual activity against HIV-1 [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 191: 110979.
- [20] 殷婷,管晓.大麦醇溶蛋白负载白藜芦醇自组装纳米颗粒及其性质研究[J].分析测试学报,2015,34(1):67-72.
- [21] Zhou S, Han L, Lu K, et al. Whey protein isolate-phytosterols nanoparticles: Preparation, characterization, and stabilized food-grade pickering emulsions [J]. *Food Chemistry*, 2022, 384: 132486.
- [22] Wei Y, Wang C, Liu X, et al. Effects of microfluidization and thermal treatment on the characterization and digestion of curcumin loaded protein-polysaccharide-tea saponin complex nanoparticles [J]. *Food & Function*, 2021, 12(3): 1192-1206.
- [23] Wang Y, Sun R, Xu X, et al. Mechanism of enhancing the water-solubility and stability of curcumin by using self-assembled cod protein nanoparticles at an alkaline pH [J]. *Food & Function*, 2021, 12(24): 12696-12705.
- [24] Do Prado Silva J T, Geiss J M T, Oliveira S M, et al. Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory [J]. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2017, 76: 1005-1011.
- [25] Klijn M E, Hubbich J. Application of ultraviolet, visible, and infrared light imaging in protein-based biopharmaceutical formulation characterization and development studies [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft fuer Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 2021, 165: 319-336.
- [26] Stani C, Vaccari L, Mitri E, et al. FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: New insight into the amide III band [J]. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 229: 118006.
- [27] Wang L, Gulati P, Santra D, et al. Nanoparticles prepared by proso millet protein as novel curcumin delivery system [J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 1039-1046.
- [28] Ji N, Hong Y, Gu Z, et al. Preparation and characterization of insulin-loaded zein/carboxymethylated short-chain amylose complex nanoparticles [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(35): 9335-9343.
- [29] Fan L, Lu Y, Ouyang X K, et al. Development and characterization of soybean protein isolate and fucoidan nanoparticles for curcumin encapsulation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 169: 194-205.
- [30] Liu E, Su Z, Yang C, et al. Fabrication, characterization and properties of DHA-loaded nanoparticles based on zein and PLGA [J]. *Food Chemistry*, 2021, 360: 129957.
- [31] 许雪儿,李娟,陈正行.负载生育酚的玉米醇溶蛋白纳米颗粒的构建及性质表征[J].中国食品学报,2020,20(12):24-30.
- [32] Thi Oanh H, Hac Thi N, Nhan Nguyen T, et al. Co-encapsulation of lycopene and resveratrol in polymeric nanoparticles: Morphology and lycopene stability [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2021, 21(5): 3156-3164.
- [33] Balcão V M, Vila M M. Structural and functional stabilization of protein entities: State-of-the-art [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 93: 25-41.
- [34] 张韵晨,方旭波,李莹,等.铁蛋白-AHLL 纳米颗粒的稳定性及肠吸收研究[J].江苏农业科学,2021,49(20):194-200.