

卵清蛋白包封山奈酚和单宁酸纳米颗粒的理化性质和抗氧化活性

蔡路昀^{1,2}, 王雨淅¹, 邹继华³, 贾江花³, 汪屹³, 史航⁴, 曹爱玲^{5*}

(1. 浙江大学宁波科创中心, 浙江宁波 315100) (2. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058)

(3. 美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315100) (4. 渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁锦州 121013)

(5. 杭州海关丝类检测中心, 浙江杭州 311208)

摘要: 为探究卵清蛋白 (Ovalbumin, OVA) 包封对多酚类物质的稳定性和抗氧化活性的影响, 该文以 OVA 作递送载体, 疏水性多酚山奈酚 (Kaempferol, KAE) 与亲水性多酚单宁酸 (Tannic acid, TA) 为活性包埋成分, 制备 OVA-TA、OVA-KAE 和 OVA-TA-KAE 复合纳米颗粒, 对其理化性质和抗氧化活性进行表征。结果表明, OVA 对 KAE 和 TA 具有较好的包封效果; KAE 提高了纳米颗粒的热稳定性; TA 提高了其结构稳定性和抗氧化活性, 使 OVA 更好地包埋两种多酚。粒径和 zeta 电位、内源性荧光分析、傅里叶变换红外光谱、X 射线衍射和扫描电镜结果表明, KAE/TA 被很好的包封于 OVA 中, 三种纳米颗粒结构稳定、均匀分散; OVA 与 TA 结合较好, 蛋白质结构稳定性最高, 且蛋白质保持了稳定的三维结构。差示扫描量热法分析表明, KAE 增强了纳米颗粒空间结构的热稳定性。总酚含量和抗氧化活性分析表明, OVA 包封抑制了多酚降解, 其中 OVA-TA-KAE 的总酚含量和 DPPH 清除能力分别为 141.33 mg/g 和 4 909.36 $\mu\text{mol Trolox/g}$ 。该研究为 OVA 纳米颗粒负载 KAE/TA 提供了新见解, 评估了 OVA 封装保护 KAE 和 TA 抗氧化活性的有效性和可行性。

关键词: 卵清蛋白; 纳米颗粒; 山奈酚; 单宁酸; 理化性质; 抗氧化活性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.2.1664

Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Ovalbumin-encapsulated Nanoparticles of Kaempferol and Tannic Acid

CAI Luyun^{1,2}, WANG Yuxi¹, ZOU Jihua³, JIA Jianghua³, WANG Yi³, Shi Hang⁴, Cao Ailing^{5*}

(1.Ningbo Innovation Center, Zhejiang University, Ningbo 315100, China)(2.College of Biosystems Engineering and

Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)(3.Meikang Medicalsystem Biotechnology Company,

Ningbo 315100, China)(4.College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

(5.Hangzhou Customs Silk Testing Center, Hangzhou 311208, China)

Abstract To investigate the effect of ovalbumin (OVA) encapsulation on the stability and antioxidant activity of polyphenolic compounds, OVA was used as a delivery carrier, with the hydrophobic polyphenol kaempferol (KAE) and the hydrophilic polyphenol tannic acid (TA) as the active compounds. OVA-TA, OVA-KAE, and OVA-TA-KAE composite nanoparticles were prepared, and their physicochemical properties and antioxidant activities were characterized. The results indicated that OVA exhibited good encapsulation efficiency for both KAE and TA. KAE enhanced the thermal stability of the nanoparticles, while TA improved their structural stability and antioxidant activity, leading to better encapsulation of the two polyphenols by OVA. Particle size, zeta potential, intrinsic fluorescence analysis, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM) results showed that KAE/TA were effectively encapsulated within OVA, and the three nanoparticles were structurally stable and uniformly dispersed. OVA formed a good bond with TA, resulting in the highest protein structural stability, with the protein maintaining a stable three-dimensional structure. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis indicated that KAE enhanced the thermal stability of the nanoparticle's spatial structure. The total phenol content, DPPH radical scavenging activity, ABTS⁺ radical scavenging activity, and FRAP antioxidant activity, measured by the Folin-Ciocalteu method,

收稿日期: 2024-11-07; 修回日期: 2025-01-14; 接受日期: 2025-01-16

项目基金: 宁波市海洋经济发展专项资金项目 (NBHY-2024-2); 宁波市重点研发计划 (2024Z282)

作者简介: 蔡路昀 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品功效因子高效利用, E-mail: cailuyun@zju.edu.cn

通讯作者: 曹爱玲 (1981-), 女, 硕士, 高级兽医师, 研究方向: 食品功效因子高效利用, E-mail: caoailing2002@163.com

revealed that OVA encapsulation inhibited the degradation of polyphenols. Among them, OVA-TA-KAE exhibited total phenol content and DPPH scavenging activity of 141.33 mg/g and 4 909.36 $\mu\text{mol Trolox/g}$, respectively. This study provides new insights into the loading of KAE/TA in OVA nanoparticles and evaluates the effectiveness and feasibility of OVA encapsulation in protecting the antioxidant activity of KAE and TA.

Keywords: ovalbumin; nanoparticles; kaempferol; tannic acid; physicochemical properties; antioxidant activity

纳米颗粒能够穿透生物膜屏障, 可作为药物以及健康和营养产品的潜在递送载体^[1]。纳米材料已被证明可以保护被包裹的成分免受酶攻击, 提高其水溶性和口服生物利用度, 进行可控释放和靶向递送^[2]。蛋白质是一种两性亲水性生物聚合物, 由于其低毒性和生物相容性, 被认为是制备纳米级递送载体的理想材料^[3]。目前已有玉米蛋白、大豆蛋白、小麦醇溶蛋白等多种蛋白质被用于制备蛋白质纳米颗粒作亲脂性药物载体, 但由于构建纳米颗粒的醇溶蛋白在没有表面活性剂的情况下水溶性低, 蛋白质类纳米颗粒在食品工业中的应用受到限制。

卵清蛋白是一种典型的优质球蛋白, 由 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白、血清白蛋白、免疫球蛋白、溶菌酶和乳铁蛋白组成, 其中 β -乳球蛋白含量最高, 约占 60%^[4]。卵清蛋白水溶性高, 易消化, 具有自组装性和两性亲水性, 其带电氨基酸基团的疏水性让它可作为脂类活性物质的高效载体^[5]。OVA 与多酚的非共价相互作用会影响其结构和界面性质。因此, 有必要分析 OVA 与其分子之间的相互作用。研究表明, 将姜黄素封装在卵清蛋白纳米颗粒中可以保护其抗氧化活性^[6]。此外, 基于姜黄素-卵清蛋白纳米颗粒的双荧光反向靶向药物递送系统可用于过敏治疗, 这为卵清蛋白作为嵌入载体的应用提供了一定理论基础^[7]。山奈酚是一种天然疏水多酚类黄酮, 具有抗炎和抗氧化作用, 已被用于预防和治疗骨质疏松症、糖尿病和动脉粥样硬化, 保护肝脏、神经和心肌^[8]。但山奈酚水溶性较差且遇水易迅速降解, 因此, 通过纳米材料包封提供内部疏水的微环境可有效提高山奈酚的溶解性和稳定性。已有研究通过分子对接和分子动力学技术预测了 α -乳白蛋白和山奈酚的结合亲和力和稳定性, 且由于山奈酚溶解度的提高, 其复合物的抗氧化能力高于单独使用山奈酚^[9]。单宁酸是常见的亲水性多酚化合物, 单宁酸分子通过氢键和疏水基团与蛋白质相互作用, 表现出独特的理化性质和生物活性, 在药物递送、表面改性和制备其他材料中发挥着重要作用^[10]。已有研究表明, 卵清蛋白可与单宁酸结合提高其稳定性并降低其乳化能力^[5]。

该文通过将疏水性多酚山奈酚和亲水性多酚单宁酸封装在卵清蛋白中, 以探究卵清蛋白对不同类型多酚物质结构和稳定性的影响, 通过卵清蛋白作多酚载体制备了 OVA-TA、OVA-KAE 和 OVA-TA-KAE 复合纳米颗粒, 其中单宁酸加强了卵清蛋白与山奈酚的相互作用, 有效地控制了卵清蛋白的自装载行为, 以更好地嵌入两种类型的多酚, 制备稳定的 OVA-KAE-TA 复合纳米颗粒, 通过 OVA-KAE-TA 与 OVA-KAE 和 OVA-TA 对比, 探究其三者之间的相互影响, 提高对两种多酚的包埋和保护作用。研究的流程图如图 1 所示。该研究为 OVA 纳米颗粒负载不同理化性质的多酚类物质提供了新的见解, 并评估了 OVA 封装保护 KAE 和 TA 抗氧化活性的有效性和可行性, 为制药和食品行业中纳米颗粒负载活性物质的进一步应用提供理论参考。

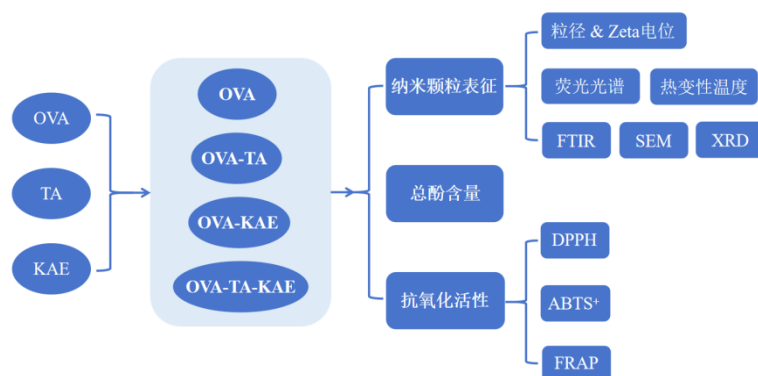


图 1 卵清蛋白包封山奈酚和单宁酸纳米颗粒的流程图

Fig.1 Flowchart of ovalbumin-encapsulated nanoparticles of kaempferol and tannic acid

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

卵清蛋白(鸡蛋蛋白的白蛋白, 氮含量 $\geq 12.5\%$, 干基总蛋白 $\geq 80\%$, 相对分子质量小于 1 000 $\geq 80\%$, 4.43~4.66 pI; 纯度 $\geq 80\%$)、DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、ABTS (2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸), 北京索莱宝科技有限公司; 山奈酚(提取自一种褐藻, $\geq 97\%$)、单宁酸($\geq 99.7\%$)、过硫酸钾($\geq 99.5\%$)、铁氰化钾($\geq 99.0\%$)、无水三氯化铁($\geq 97.0\%$), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Folin 酚试剂, 合肥博美生物科技有限公司; 其他分析纯试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

KQ-400KDE 超声处理器, 昆山超声仪器有限公司; Scimitar 2000 FTIR, 美国安捷伦科技有限公司; 90Plus 纳米粒度分析仪, 美国布鲁克海文仪器公司; Ultima IV X 射线衍射仪, 日本理学株式会社; 970 CRT 荧光分光光度计, 中国精密科学仪器有限公司; Q2000 差示扫描量热仪, 美国沃特世公司; S-4800 扫描电子显微镜、E-1045 离子溅射器, 日本株式会社日立制作所; UV-2550 紫外-可见分光光度计, 中国尤尼柯仪器有限公司。

1.3 OVA 纳米颗粒的制备

反溶剂法制备 OVA 纳米颗粒^[6]。将 10 g/L 的 OVA 溶解在去离子水中, 室温搅拌 2 h, 然后放置在冰箱(4 °C)过夜确保其充分水合。KAE 和 TA 分别溶解在 70%乙醇和去离子水中, 超声辅助溶解处理得到 KAE 和 TA 溶液, 避光保存直至使用。将 KAE 溶液和 TA 溶液混合后或分别加入到 OVA 溶液中(1:1, V/V), 使溶液中蛋白质与多酚的比例为 5:3 (m/m), 混合物在室温避光搅拌 24 h, 然后使用旋转蒸发器在 40 °C 下蒸发溶液以去除乙醇, 并用去离子水补充损失的体积。三种纳米颗粒粉末(OVA-TA、OVA-KAE 和 OVA-TA-KAE)使用前需冷冻干燥(上述比例通过预实验结果优化确定)。

1.4 纳米颗粒的表征

1.4.1 粒径和 Zeta 电势

分析前, 纳米颗粒用去离子水分散, 以避免多重散射效应^[11]。使用 Zeta 电位及粒度分析仪在 25 °C 和固定角度 90°下测量 0.1 g/L 纳米颗粒溶液的粒径和 Zeta 电位。

1.4.2 内源性荧光测量

制备含有 0.2 g/L 蛋白质的样品溶液, 用荧光分光光度计进行分析。以卵清蛋白分子中的荧光基团作探针, 激发光狭缝宽度 10 nm, 发射光狭缝宽度 5 nm, 激发波长 295 nm, 发射波长 295~500 nm^[12]。

1.4.3 傅里叶变换红外光谱

参考 Foegeding^[13]的方法, 分析纳米颗粒的二级结构。将 1 mg 冻干样品和 100 mg 干燥的 KBr 在玛瑙研钵中研磨成均匀粉末后压片, 然后在样品室中扫描并分析收集数据, 波长范围 4 000~500 cm⁻¹, 分辨率 2 cm⁻¹。

1.4.4 差示扫描量热法

参考 Cao 等^[14]的方法, 使用差示扫描量热仪确定样品的热收缩温度和热焓。将 5 mg 冷冻干燥样品称重后放入 DSC 铝盘, 并用盖子密封, 空铝盘作对照。初始温度 20 °C, 结束温度 200 °C, 加热温度 15 °C/min。

1.4.5 X 射线衍射

通过 CuK α 辐射扫描样品的晶体结构, 扫描范围为 5~50°(2 θ), 扫描速度为 10 °/min^[15], X 射线发生器的管电流和工作电压分别为 40 mA 和 40 kV。

1.4.6 扫描电镜

使用扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM)观察样品的微观结构。利用离子溅射将样品镀金处理, 使样品颗粒具有导电性。在 3.0 kV 电压下, 以合适的放大倍数观察样品的形态特征。

1.5 福林酚法测定总酚含量

制备 0.2 g/L KAE/TA 标准溶液, 稀释至不同的浓度, 每种稀释液各取 1 mL 与 1 mL 0.25 mol/L Folin-酚试剂充分混合, 室温放置 3 min 后向上述混合液中加入 2 mL 15% Na₂CO₃ 溶液, 充分摇匀后室温静置 30 min, 在 760 nm 处测量吸光度并绘制酚标准曲线(以 15% Na₂CO₃ 溶液作空白对照)^[16]。同理, 测定 1 g/L OVA 纳米粒子溶液的吸光度, 并根据酚标准曲线计算样品的总酚含量。

1.6 抗氧化活性分析

1.6.1 DPPH 自由基清除活性

制备 0.05 g/L DPPH 乙醇溶液和 1 g/L Trolox 溶液。用无水乙醇稀释 Trolox 溶液,使其浓度分别为 40、35、30、25、20、10 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 。分别将 2 mL DPPH 溶液和 2 mL 样品混合,记作实验组;2 mL 无水乙醇和 2 mL 测试样品混合,记作对照组;2 mL DPPH 溶液和 2 mL 无水乙醇混合,记作空白组。将上述 3 组混合液室温避光放置 30 min 后,在 517 nm 处测吸光度,结果以 $\mu\text{mol Trolox/g}$ 表示^[17]。

1.6.2 ABTS⁺自由基清除活性

将 7 mmol ABTS 无水乙醇溶液和 2.5 mmol $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液等体积混合,室温避光放置 16 h 后形成 ABTS⁺自由基储备液,用无水乙醇稀释,得到 734 nm 处吸光度为 0.70 ± 0.02 的 ABTS⁺自由基工作液。分别将 1 mL ABTS⁺和 3 mL 样品混合,记作实验组;1 mL 无水乙醇和 3 mL 样品混合,记作对照组;1 mL ABTS⁺ 3 mL 无水乙醇混合,记作空白组。将上述 3 组混合液于室温避光条件下放置 30 min,在 734 nm 处测量吸光度,结果以 $\mu\text{mol Trolox/g}$ 表示^[2]。

1.6.3 铁离子还原能力

取 1 mL 0.1 g/L 无水乙醇样品溶液、2.5 mL 0.2 mol/L PBS (pH 值 6.6) 和 2.5 mL 1% 高铁氰化钾混合,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 20 min,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷却,向混合物中加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸后充分摇匀,将上述 2.5 mL 混合物与 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL 0.1% 氯化铁混合,室温下反应 15 min,在 700 nm 处测量吸光度,结果以 $\mu\text{mol Trolox/g}$ 表示^[18]。

1.7 数据处理与分析

所有实验均重复三次。采用 OMNIC 8.2 分析 FTIR 结果。TA Universal Analysis 评估变性温度和转换焓。SPSS 22.0 进行数据分析和方差分析 (ANOVA),Duncan 多重范围检验比较均值, $P < 0.05$ 表示存在显著差异。所有图表用 OriginPro 9.0 绘制。

2 结果与分析

2.1 纳米颗粒的表征

2.1.1 粒径和 Zeta 电位分析

样品颗粒的粒径和 Zeta 电位如图 2A 所示,0.1 g/L OVA、OVA-TA、OVA-KAE 和 OVA-TA-KAE 纳米颗粒溶液的有效粒径和 zeta 电位分别为 150.68、286.56、345.7 和 337.44 nm,以及 -40.84、-31.48、-23.93 和 -26.46 mV,这个结果高于喷雾干燥封装橄榄叶提取物中酚类化合物 (0.25~20 μm)^[19]。研究表明,蛋白质溶液的 Zeta 电位受蛋白质表面正负电荷氨基酸的暴露情况影响,更大的 $|\zeta|$ 值表示蛋白质分子表面有更多的电荷,溶液中分子间的斥力更强,有助于形成稳定的系统^[20]。OVA 是一种大型蛋白质,其表面的许多极性基团如氨基、羟基和羧基等,使其具有高度的电荷性^[21]和较低的有效粒径,这表明蛋白质聚集被抑制,系统具有更高的稳定性。图 2A 中 OVA 的 $|\zeta|$ 值最大,有效粒径最小,表明该溶液系统非常稳定,OVA 在水溶液中具有稳定的稳定性。相比之下,OVA-KAE 的 $|\zeta|$ 值最小,粒径最大,表明 OVA-KAE 的系统稳定性较弱。OVA-TA 由于 TA 呈酸性改变了 OVA-TA 溶液的 pH 值,并影响了 $|\zeta|$ 值,与其他两种纳米粒子溶液相比,OVA-TA 的粒径更小,表明 OVA-TA 具有更稳定的系统^[22]。OVA-TA-KAE 的粒径变化和稳定性介于上述两种纳米粒子之间。结果表明,添加 TA 增强了 OVA 和 KAE 之间的相互作用,从而提高了嵌入效果。

2.1.2 内部荧光光谱分析

卵清蛋白-多酚纳米颗粒的内部荧光光谱变化如图 2B 所示。色氨酸是荧光检测的基础,当它被埋藏在 OVA 内部时,由多种非极性氨基酸残基包围的局部微环境的极性较外部水溶液的极性弱^[2];荧光峰位置 (λ_{max}) 会向较短波长偏移 (蓝移)。由图 2B 可知,样品的荧光强度 OVA-KAE > OVA-TA > OVA-TA-KAE > OVA (分别为 657.2 ± 11.44 、 464.4 ± 0.03 、 259.9 ± 0.35 和 190.5 ± 0.67)。这可能是由于蛋白质与多酚结合后,蛋白质分子的伸展和形变增大,暴露了更多色氨酸残基,从而增强了内部荧光^[23]。而蛋白质变性过程中,OVA 的荧光峰位置出现红移,芳香族氨基

酸的侧链逐渐暴露在水溶液中, 芳香族氨基酸的环境极性逐渐增加, OVA 荧光发射峰的 $\lambda_{\max}$ 也随之增加^[24], $\lambda_{\max}$ 的红移增加 (OVA-KAE、OVA-TA、OVA-TA-KAE 和 OVA 的 $\lambda_{\max}$ 分别为 392.6 ± 0.87 、 377.7 ± 0.75 、 376.6 ± 0.61 和 356.1 ± 3.07 nm), 表明蛋白质在变性过程中的构象变化更大^[25], 在玉米醇溶蛋白/酪蛋白/海藻酸钠纳米颗粒中封装姜黄素也有相似变化^[1]。三种纳米颗粒的荧光峰位置显示出不同程度的红移, 说明 OVA-KAE 纳米颗粒的结构变化最大, 其次是 OVA-TA-KAE 和 OVA-TA 纳米颗粒。结果表明, TA 的添加减少了 OVA 芳香族氨基酸侧链的暴露, 并减弱了 OVA 在 OVA-KAE 纳米颗粒中的结构变化。

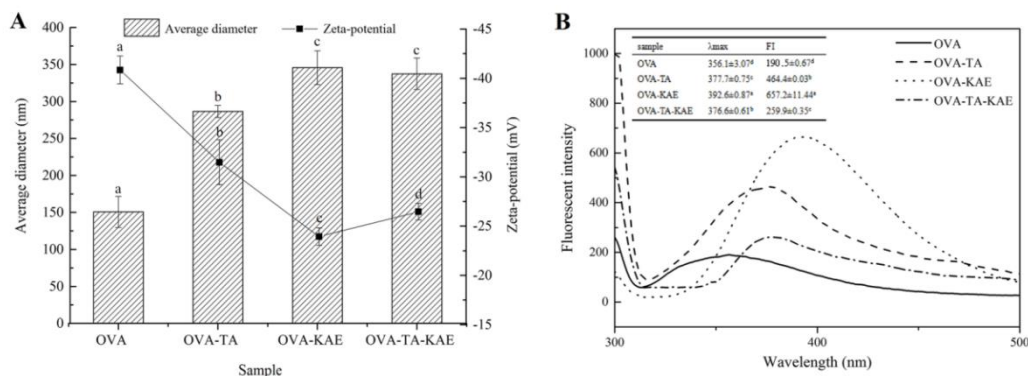


图2 纳米颗粒的 Zeta 电位、粒径和内在荧光光谱的变化

Fig.2 Changes in zeta potential effective diameter and intrinsic fluorescence spectra of nanoparticles

注: 图中不同字母表示在 $P < 0.05$ 时存在显著差异。

2.1.3 傅里叶变换红外光谱分析

不同 OVA-多酚纳米颗粒的傅里叶变换红外光谱 (Fourier Transform Infrared Spectrometer, FTIR) 如图 3A 所示。峰值位置和光谱的详细信息见表 1。图 3A 的 FTIR 显示 OVA-多酚纳米颗粒具有特征性的红外吸收峰, 包括酰胺 A 和 B 带、I、II 和 III 带^[26]。OVA-TA、OVA-KAE 和 OVA-TA-KAE 的酰胺 A 带相对于 OVA 出现红移, 这是由于蛋白质亚氨基和酚羟基间存在伸缩振动组合, 这表明酚羟基参与了 OVA 与多酚的反应。酰胺 B 带是由于 -CH 引起的不对称伸缩振动^[27]。

通常情况下, FTIR 可用于表征蛋白质分子间的非共价相互作用, 反映了蛋白质二级结构的变化, 酰胺 I 和 II 带主要反映了肽链的弯曲振动和伸缩振动^[28], 酰胺 III 带是甘氨酸和脯氨酸残基的 -CH 特征振动峰, 表明 OVA 在 OVA-多酚复合物中保持了完整的三螺旋结构, 而酰胺 I 带对蛋白质二级结构的定量和变化更灵敏^[29]。不同纳米颗粒的蛋白质二级结构含量基于酰胺 I 区不同二级结构对应峰面积的比较计算得出, 如图 2B 所示, OVA 的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲含量分别为 52.66%、21.42%、15.60%和 10.006%和 1.31%。 α -螺旋和无规卷曲分别代表有序和无序松散的 OVA 结构。其中, OVA-TA-KAE 中的 α -螺旋含量最高, 无规卷曲含量最低, 这表明添加 TA 抑制了 OVA-KAE 有序结构的破坏, 有助于 OVA-TA-KAE 形成最稳定的蛋白质结构^[30]。

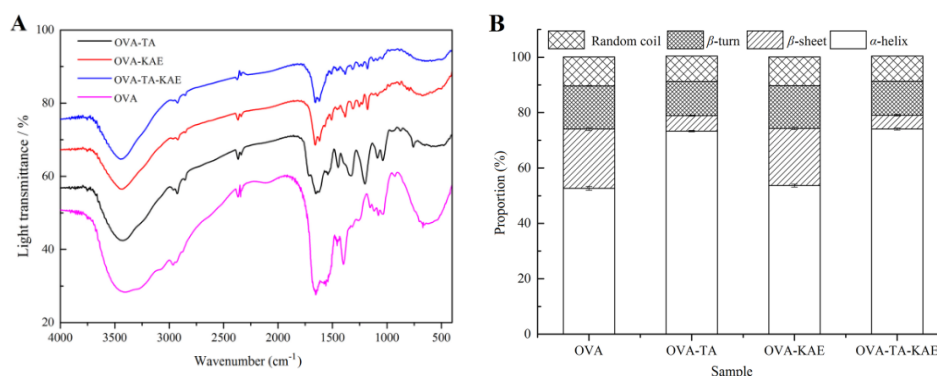


图3 纳米颗粒的红外光谱和酰胺 I 区的 OVA 二级结构含量

Fig.3 Infrared spectra and secondary structure content of OVA from amide I region of nanoparticles

表 1 纳米颗粒在 FTIR 光谱中识别的峰的位置分布

Table 1 Location and assignment of the peaks identified in FTIR spectra for the nanoparticles					
Region	Peak wavenumber (cm ⁻¹)				Assignment and remarks
	OVA	OVA-TA	OVA-KAE	OVA-TA-KAE	
Amide A	3 422	3 429	3 439	3 446	N-H stretch coupled with hydrogen bond
Amide B	2 966	2 924	2 920	2 924	CH antisymmetric and symmetric stretching
	2 870	2 850	2 852	2 845	CH antisymmetric and symmetric stretching
Amide I	1 653	1 653	1 659	1 659	C=O stretch/hydrogen bond coupled COO ⁻
Amide II	1 558	1 550	1 508	1 519	NH bend coupled with CN stretch
	1 406	1 460	1 456	1 458	CH ₂ bending (scissors) vibration
	1 330	1 336	1 386	1 384	CH ₂ wag of proline and glycine
Amide III	1 259	—	1 255	1 255	NH bend stretch coupled C-N stretch
Fingerprint	1 033	1 031	—	—	C-O skeletal stretch
	929	954	—	—	C-H deformation vibration (carbohydrate)
	—	877	889	—	C-H deformation vibration (carbohydrate)
	671	667	651	677	C-C Skeletal stretch

2.1.4 差示扫描量热法分析

差示扫描量热法（Differential scanning calorimetry, DSC）是一种常用的热力学分析方法。热变性温度（ T_m ）可直接反映蛋白质的热稳定性，通过计算与 T_m 对应的峰面积可得到焓变（ ΔH ）^[31]。 T_m 值增加代表了更好的热稳定性， ΔH 值更高意味着需要更多的能量来破坏纳米颗粒的空间结构^[32]。OVA-多酚纳米颗粒的 T_m 和 ΔH 见表 2，其中 OVA、OVA-TA、OVA-KAE 和 OVA-TA-KAE 有两个吸收峰。第一个吸收峰表示 OVA 嵌入壁材的部分变性温度。与 OVA 相比，OVA-KAE、OVA-TA 和 OVA-TA-KAE 的第二个 T_m 显著增大， ΔH 增加了约 5~14 倍。在这些纳米颗粒中，OVA-KAE 的 T_m 和 ΔH 最高，说明 OVA 负载多酚后，蛋白质分子中有序结构增加，无规卷曲结构减少，从而显著增强了蛋白质空间结构的热稳定性。结果表明，TA 的加入有利于 OVA-KAE 的结合；KAE 的加入显著提高了 OVA 和 OVA-TA 的热稳定性。

表 2 纳米颗粒的热变性中点温度（ T_m ）和焓变（ ΔH ）

Table 2 Thermal denaturation midpoint temperature (T_m) and enthalpy (ΔH) of nanoparticles						
Sample	Peak 1		Peak 2		Peak 3	
	$T_m/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$	$T_m/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$	$T_m/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$
OVA-TA-KAE	54.59±0.30 ^c	5.81±0.20 ^b	—	—	167.60±0.81 ^b	80.43±0.24 ^b
OVA-KAE	53.24±0.64 ^d	3.46±0.22 ^c	—	—	171.31±2.19 ^{ab}	108.03±0.67 ^a
OVA-TA	56.86±0.47 ^b	1.28±0.19 ^d	—	—	157.19±1.91 ^c	35.05±2.83 ^e
OVA	57.55±1.32 ^b	3.48±0.23 ^c	—	—	146.17±4.70 ^d	7.58±0.80 ^f
KAE	41.85±0.32 ^e	0.51±0.04 ^e	53.80±0.40	3.06±0.32	174.70±4.25 ^a	61.08±3.89 ^c
TA	76.46±0.57 ^a	8.75±0.37 ^a	108.18±0.65	0.06±0.02	146.62±0.64 ^d	52.94±1.25 ^d

注：表中不同字母表示在 $P<0.05$ 时存在显著差异。

2.2 X 射线衍射分析

OVA-多酚纳米颗粒的 X 射线衍射（X-ray diffraction, XRD）图谱如图 4A 所示。每个样品的 XRD 图谱包含两个衍射峰。第一个衍射峰位于 $2\theta=5.76$ ，表明纳米颗粒具有有序结构^[33]，第二个衍射峰在 $2\theta=21.34$ 处偏移到更大的散射角，这是由于 OVA 和多酚之间形成了氢键。与其他 OVA-多酚纳米颗粒相比，OVA-TA-KAE 的结晶度略有提高。根据布拉格定律， $d(\text{\AA})=\lambda/2\sin\theta(\lambda=1.54\text{ \AA})$ ，相应的晶面间距 d 值分别为 15.33 $\text{\AA}$ 和 4.16 $\text{\AA}$ 。XRD 的空间分布也称为衍射几何，可以反映晶体单元的大小、形状和取向^[21]。衍射图样的强度取决于原子类型及其在纳米颗粒中的位置。XRD 强度为 OVA>OVA-TA>OVA-KAE>OVA-TA-KAE。这个结果可能是由于 KAE、TA 和 OVA 之间的分子间晶体束缚，极大地限制了分子运动，导致峰强度降低^[34]。

2.3 扫描电子显微镜分析

卵清蛋白-多酚纳米颗粒的扫描电子显微镜结果如图 4B 所示。冻干后, OVA-KAE 呈现为规则的短棒状, 这是因为 OVA-KAE 纳米颗粒的 pH 值接近 OVA 的 pI 值, 分子间静电斥力降低, 导致纳米颗粒聚集^[35]。OVA 在包封 TA 和 KAE 时具有不同的成键效应会导致固态纳米晶体呈不同形状^[36], OVA-TA-KAE 纳米颗粒呈现为松散的花状纤维。在 20.0 千倍放大下观察, OVA-TA 的粒径约为 2~4 μm , OVA-KAE 的纤维宽度约为 2 μm , OVA-TA-KAE 的直径约为 1~2 μm , 这与粒径测试结果中的粒径大小不同, 原因在于两种测试形态不同, 分子间的相互作用不同。结果表明, 上述三种纳米颗粒均匀分散, 尺寸一致, 没有观察到大的聚集物^[37]。

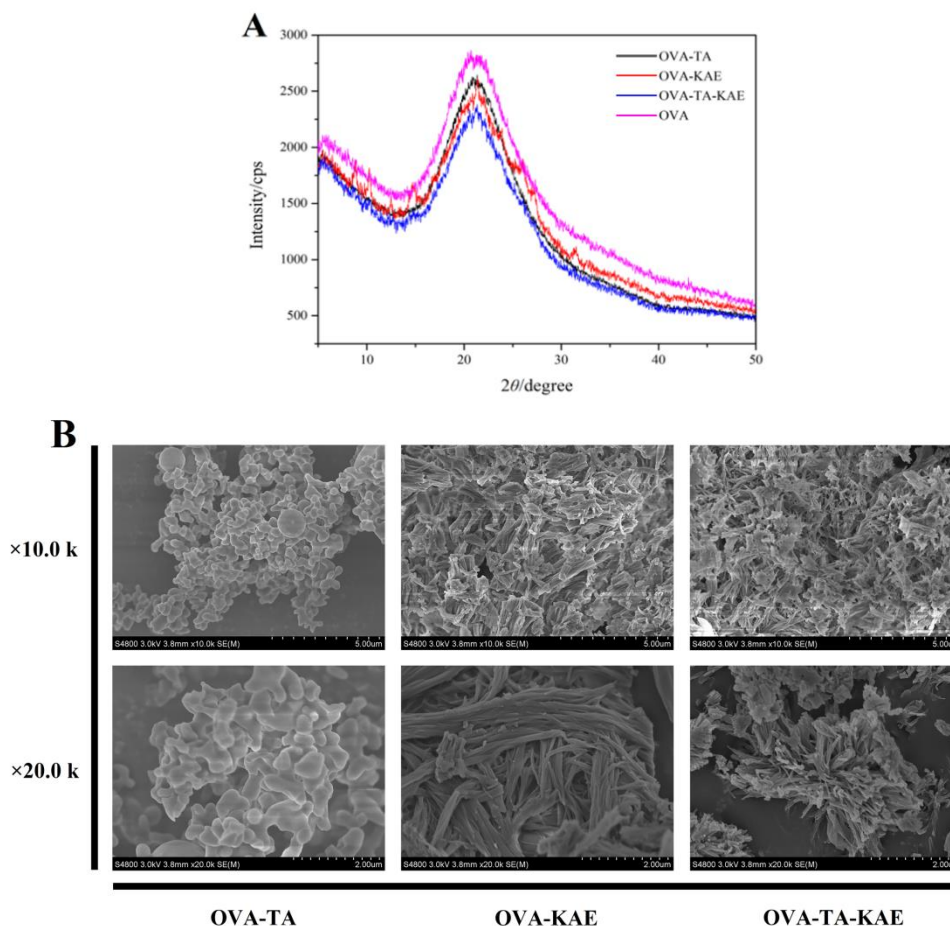


图 4 纳米颗粒的 X 射线衍射和扫描电子显微镜

Fig.4 XRD and SEM of nanoparticles

2.4 总酚含量和抗氧化活性

KAE 和 TA 的抗氧化性在医疗和食品应用中起重要作用, 而 KAE 和 TA 分子中的芳香环可吸收紫外线, 使其在阳光下降解和变性^[38]。为评估 OVA 的包封效果, 该文通过 DPPH 自由基清除活性、ABTS⁺自由基清除活性和铁离子还原能力 (Ferric ion reducing antioxidant power, FRAP) 三种方法探究 OVA-多酚纳米颗粒的抗氧化活性。如图 5 所示, OVA-TA、OVA-KAE 和 OVA-TA-KAE 的 DPPH 清除能力分别为 4 775.5、3 106.1 和 4 909.36 $\mu\text{mol Trolox/g}$; ABTS⁺清除能力分别为 4 066.2、1 740.36 和 2 530.06 $\mu\text{mol Trolox/g}$; FRAP 分别为 6 090.46、2 090.46 和 4 090.46 $\mu\text{mol Trolox/g}$ 。OVA-TA 纳米颗粒具有最高的 ABTS⁺清除能力和铁离子还原能力, 表明其抗氧化活性最强。其中 OVA-KAE 和 OVA-TA-KAE 抗氧化活性较弱, 这可能是因为 KAE 嵌入纤维状纳米颗粒中形成的疏水微结构域具有弱极性和强疏水性^[39], Li 等^[40]和 Tai 等^[41]制备壳聚糖盐酸盐-羧甲基淀粉复合纳米凝胶和 β -谷甾醇脂质体包封姜黄素也证明了这点。OVA-TA-KAE 具有最高的 DPPH 自由基清除能力, 说明 TA 的加入提高了 OVA-KAE 的抗氧化活性, 包埋两种多酚效果较好。通过 Folin 酚法测定的 OVA-TA、OVA-KAE 和 OVA-TA-KAE

纳米颗粒的总酚含量分别为 152、130.67 和 141.33 mg/g, 这是因为当 TA 和 KAE 嵌入时, OVA 暴露了更多的羟基基团, 纤维状纳米颗粒的保护效率得到增强, 从而显著提高了纳米颗粒的抗氧化能力, 表明 TA 有利于 KAE 与 OVA 的非共价结合, 同时也表明 OVA 包封降低了 TA 和 KAE 降解^[42]。结果表明, 添加 TA 提高了 KAE 和 OVA 的非共价结合能力, 从而增强了纳米颗粒的抗氧化活性和包封能力; 同时, OVA 的包封减少了多酚的降解并保护了其生物活性。

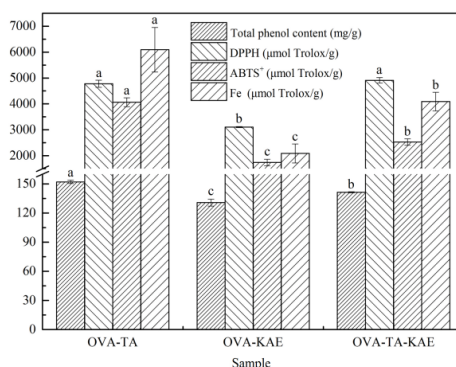


图 5 OVA-多酚的总酚含量、DPPH、ABTS⁺和铁离子还原能力

Fig.5 Total phenol content, DPPH, ABTS⁺, and Fe reducing ability of OVA-polyphenols

注: 图中不同字母表示在 $P < 0.05$ 时存在显著差异。

3 结论

该文以 OVA 为包封蛋白, 疏水性 KAE 与亲水性 TA 为多酚载体, 通过 TA 有效地操控 OVA 的自主装行为包埋两种多酚, 最后制备出稳定的 OVA-TA-KAE 复合纳米颗粒, 与单一负载 TA 和 KAE 的纳米颗粒对比, 通过粒径、内部荧光光谱、FTIR、SEM、XRD、总酚含量和抗氧化分析, 对三种复合粒子的理化性质和抗氧化活性进行表征, 探究 OVA、KAE 和 TA 三者之间的相互影响。结果表明, OVA 对 KAE 和 TA 具有较好的包封效果, 三种纳米颗粒均匀分散, 尺寸一致, 同时负载两种多酚的复合粒子的系统稳定性与抗氧化活性最强; OVA 与 TA 结合较好, 蛋白质结构稳定性最高, 且蛋白质保持了稳定的三维结构; KAE 的负载增强了 OVA 与 TA 结合的热稳定性; TA 增强了 OVA 与 KAE 的相互作用, 减小了其颗粒的构象变化。Folin 酚法测定结果表明, OVA 的包封减少了多酚的降解并保护了其生物活性。DPPH 自由基清除活性、ABTS⁺自由基清除活性和 FRAP 的结果分析表明, TA 的加入提高了 OVA 与 KAE 的非共价结合能力, 提高了其抗氧化活性, OVA-TA-KAE 具有最高的 DPPH 自由基清除能力 ($4\,909.36\ \mu\text{mol Trolox/g}$)。该研究证实了卵清蛋白包裹多酚类成分的可行性和有效性, 为开发一种有效的 KAE 和 TA 的蛋白质嵌入载体提供了理论依据。

参考文献

- [1] LIU Q, JING Y, HAN C, et al. Encapsulation of curcumin in zein/ caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 93(AUG.): 432-442.
- [2] CHENG H, FANG Z, LIU T, et al. A study on β -lactoglobulin-trilignand-pectin complex particle: formation, characterization and protection [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84(NOV.): 93-103.
- [3] YAN H, CHIRCOV C, ZHONG X, et al. Reversible condensation of mucins into nanoparticles [J]. Langmuir, 2018, 34(45): 13615-13625.
- [4] DOPIERALA K, KRAJEWSKA M, PROCHASKA K. Study on pH-dependent interactions of linoleic acid with α -lactalbumin [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106217.
- [5] CHEN Y, HU J, YI X, et al. Interactions and emulsifying properties of ovalbumin with tannic acid [J]. LWT, 2018, 95: 282-288.
- [6] CHANG C, MEIKLE T G, SU Y, et al. Encapsulation in egg white protein nanoparticles protects anti-oxidant activity of curcumin [J]. Food Chemistry, 2018, 280: 65-72.
- [7] LI H, XU Y, SUN X, et al. Stability, bioactivity, and bioaccessibility of fucoxanthin in zein-caseinate composite nanoparticles fabricated

- at neutral pH by antisolvent precipitation [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84(NOV.): 379-388.
- [8] PEI J, CHEN A, DONG P, et al. Modulating heterologous pathways and optimizing fermentation conditions for biosynthesis of kaempferol and astragalin from naringenin in *Escherichia coli* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(2): 171-186.
- [9] MENGXUE D, YUAN L, JINGQI Z, et al. Enhanced cytotoxicity and antioxidant capacity of kaempferol complexed with α -lactalbumin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 153: 112265.
- [10] BROUWER P, NIEROP K G J, HUIJGEN W J J, et al. Aquatic weeds as novel protein sources: Alkaline extraction of tannin-rich *Azolla* [J]. Biotechnology Reports, 2019, 24: e00368.
- [11] SILVA D H, POEJO J, PINHEIRO C A, et al. Evaluating the behaviour of curcumin nanoemulsions and multilayer nanoemulsions during dynamic in vitro digestion [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 48: 605-613.
- [12] MONIKA K, LIU C, WU W. Protein moiety in oligochitosan modified vector regulates internalization mechanism and gene delivery: Polyplex characterization, intracellular trafficking and transfection [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 202(15): 143-156.
- [13] FOEGEDING E A, PLUNDRICH N, SCHNEIDER M, et al. Protein-polyphenol particles for delivering structural and health functionality [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 72(nov.): 163-173.
- [14] CAO M, CAO A, WANG J, et al. Effect of magnetic nanoparticles plus microwave or far-infrared thawing on protein conformation changes and moisture migration of red seabream (*Pagrus Major*) fillets [J]. Food Chemistry, 2018, 266: 498-507.
- [15] DENG L, KANG X, LIU Y, et al. Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 74(jan.): 324-332.
- [16] CHEN L Y, CHENG C W, LIANG J Y. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols [J]. Food Chemistry, 2015, 170: 10-15.
- [17] GONG Y, HOU Z, GAO Y, et al. Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology [J]. Food and Bioproducts Processing, 2012, 90(1): 9-16.
- [18] YAN M, LI B, ZHAO X, et al. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 907-914.
- [19] GONZALEZ E, MARIA G A, GIMENEZ B, et al. Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion [J]. Food Chemistry, 2019, 279(MAY 1): 40-48.
- [20] BELICIU C M, MORARU C I. The effect of protein concentration and heat treatment temperature on micellar casein-soy protein mixtures [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(6): 1448-1460.
- [21] LUANA C D Q J, Oliveira D A C R, Rodrigues M L L, et al. Chitosan-whey protein nanoparticles improve encapsulation efficiency and stability of a trypsin inhibitor isolated from *Tamarindus indica* L. [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84(NOV.): 247-256.
- [22] HAN J R, GU L P, ZHANG R J, et al. Bioaccessibility and cellular uptake of β -carotene in emulsion-based delivery systems using scallop (*Patinopecten yessoensis*) gonad protein isolates: effects of carrier oil [J]. Food & Function, 2019, 10(1): 49-60.
- [23] POPESCU I, PELIN I M, LILIANA A G, et al. Amphiphilic polysaccharide based on curdlan: Synthesis and behaviour in aqueous solution [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 224: 115157.
- [24] LEON M A, AGUILERA M J, PARK J D. Mechanical, rheological and structural properties of fiber-containing microgels based on whey protein and alginate [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 207: 571-579.
- [25] SARIKA P, JAMES R N, KUMAR A P, et al. Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 134: 167-174.
- [26] DEY S, SREENIVASAN K. Conjugation of curcumin onto alginate enhances aqueous solubility and stability of curcumin [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99: 499-507.
- [27] ZHOU H, PANDYA J K, TAN Y, et al. Role of mucin in behavior of food-grade TiO₂ nanoparticles under simulated oral conditions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 20: 67.
- [28] CHENG J C, FERRUZZI M, JONES G O. Fate of lutein-containing zein nanoparticles following simulated gastric and intestinal digestion [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 229-236.
- [29] YANG H, ZHANG W, LI T, et al. Effect of protein structure on water and fat distribution during meat gelling [J]. Food Chemistry, 2016,

- 204(aug.1): 239-245.
- [30] ZHU Q, QIU S, ZHANG H, et al. Physical stability, microstructure and micro-rheological properties of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions stabilized by porcine gelatin [J]. Food Chemistry, 2018, 253(JUL.1): 63.
- [31] PARADA J, AGUILERA J M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients [J]. Journal of Food Science, 2010, 72(2): R21-R32.
- [32] CAI L, NIAN L, ZHAO G, et al. Effect of herring antifreeze protein combined with chitosan magnetic nanoparticles on quality attributes in red sea bream (*pagrosomus major*) [J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(3): 409-421.
- [33] LUNDQUIST P, ARTURSSON P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016, 106(PB): 256-276.
- [34] HUA S, MARKS E, SCHNEIDER J J, et al. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue [J]. Nanomedicine, 2015, 11(5): 1117-1132.
- [35] LING K, WU H, NEISH S A, et al. Alginate/chitosan microparticles for gastric passage and intestinal release of therapeutic protein nanoparticles [J]. Journal of Controlled Release, 2019, 295: 174-186.
- [36] WANG Z, ZHANG R X, ZHANG C, et al. Fabrication of stable and self-assembling rapeseed protein nanogel for hydrophobic curcumin delivery [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(3): 887-894.
- [37] FAN X, WANG Y, ZHONG W H, et al. Hierarchically structured all-biomass air filters with high filtration efficiency and low air pressure drop based on Pickering emulsion [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(15): 14266-14274.
- [38] LUCA S V, MACOVEI I, BUJOR A, et al. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 60(4): 1-34.
- [39] LUO S Z, FU X F, PAN L H, et al. Preparation of camellia oil-based W/O emulsions stabilized by tea polyphenol palmitate: Structuring camellia oil as a potential solid fat replacer [J]. Food Chemistry, 2019, 276(MAR.15): 209-217.
- [40] LI X, WU Z, ZHANG B, et al. Fabrication of chitosan hydrochloride and carboxymethyl starch complex nanogels as potential delivery vehicles for curcumin [J]. Food Chemistry, 2019, 293: 197-203.
- [41] TAI K, RAPPOLT M, HE X, et al. Effect of β -sitosterol on the curcumin-loaded liposomes: Vesicle characteristics, physicochemical stability, in vitro release and bioavailability [J]. Food Chemistry, 2019, 293(SEP.30): 92-102.
- [42] YEN F, WU T, TZENG C, et al. Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(12): 7376-7382.