

# 蓝莓花色苷聚电解质复合物制备及降脂活性比较

尹朝春<sup>1</sup>, 李环通<sup>2</sup>, 许泽文<sup>3</sup>, 陈丹妮<sup>1</sup>, 王赛男<sup>1</sup>, 肖苏尧<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)(2. 广东茂名农林科技职业学院食品工程系, 广东茂名 525024)(3. 华润怡宝饮料(中国)有限公司, 广东深圳 518055)

**摘要:** 为提高蓝莓花色苷的稳定性和活性, 该研究利用大豆分离蛋白和阿拉伯胶构建大豆分离蛋白/阿拉伯胶聚电解质负载蓝莓花色苷体系并进行表征, 并对复合物的细胞降脂活性进行了研究。在超声功率 180 W、壁材质量比为 10:4、壁芯质量比为 10:1、包埋时间为 1.0 h 的条件下, 得到包埋率为 66.05%,  $\zeta$ -电位为 1 比 9.00 mV, 平均粒径为 2.53  $\mu\text{m}$  的不规则球状物, 此条件下制备的复合物, 在模拟胃液和肠液中 2 h 的释放率为 71.05%、61.04%, 比游离花色苷降低了 19.16%、30.50%。通过 HepG2 细胞模型, 检测 TG、TC、SOD、MDA 含量, 结果发现, 复合物的降脂活性优于游离花色苷, 当花色苷质量浓度在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 复合物组的 TC、TG、MDA 含量为 0.19 mmol/g prot、0.21 mmol/g prot、10.58 nmol/mg prot, 比游离花色苷组下降 9.70%、14.21%、17.12%; SOD 酶活力为 25.25 U/mg prot, 比游离花色苷组提高 9.54%。表明大豆分离蛋白和阿拉伯胶可高效结合花色苷, 形成稳定的复合物, 并具有良好的体外缓释效果, 且复合物降脂活性高于游离花色苷。该研究可为后续开发降脂产品提供理论依据。

**关键词:** 蓝莓花色苷; 聚电解质; 大豆分离蛋白; 阿拉伯胶

文章编号: 1673-9078(2024)04-35-45

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.4.0321

## Preparation and Comparative Analysis of Lipid-lowering Activity of Blueberry Anthocyanin Polyelectrolyte Complexes

YIN Zhaochun<sup>1</sup>, LI Huantong<sup>2</sup>, XU Zewen<sup>3</sup>, CHEN Danni<sup>1</sup>, WANG Sainan<sup>1</sup>, XIAO Suyao<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Maoming Agriculture & Forestry Technical College, Department of Food Engineering, Maoming 525024, China)(3. China Resources C'estbon Beverage (China) Co. Ltd., Shenzhen 518055, China)

**Abstract:** To improve the stability and activity of blueberry anthocyanins, soy protein isolate, and acacia gum were used to construct and characterize soy protein isolate/acacia polyelectrolyte loaded with blueberry anthocyanins. The lipid-lowering activities of the complexes were compared. Under the conditions of ultrasonic power of 180 W, a wall material quality ratio of 10:4, wall core quality ratio of 10:1, and embedding time of 1.0 h, irregular spherical particles with an embedding rate of 66.05%, a  $\zeta$ -potential of 1 to 9.00 mV, and an average particle size of 2.53  $\mu\text{m}$  were obtained. The 2 h-release

引文格式:

尹朝春,李环通,许泽文,等. 蓝莓花色苷聚电解质复合物制备及降脂活性比较[J].现代食品科技,2024,40(4):35-45.

YIN Zhaochun, LI Huantong, XU Zewen, et al. Preparation and comparative analysis of lipid-lowering activity of blueberry anthocyanin polyelectrolyte complexes [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 35-45.

收稿日期: 2023-03-16

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金面上项目 (2022A1515010907)

作者简介: 尹朝春 (1998-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 天然产物活性功能, E-mail: yin\_zc0214@126.com

通讯作者: 肖苏尧 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物活性功能, E-mail: xiaosy@scau.edu.cn

rates of the complexes in simulated gastric and intestinal fluids were 71.05% and 61.04%, respectively, which were 19.16% and 30.50% lower, respectively, than that of free anthocyanins. A HepG2 cell model was used to determine the triglyceride (TG), total cholesterol (TC), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) content. The results showed that the lipid-lowering activity of the complex was better than that of free anthocyanins. When the mass concentration of anthocyanins was 50  $\mu\text{g/mL}$ , the TC, TG, and MDA content and the activity of SOD in the complex group were 0.19 mmol/g of protein, 0.21 mmol/g of protein, and 10.58 nmol/mg of protein, which were 9.70%, 14.21%, and 17.12% lower, respectively, than the values in the free anthocyanins group. SOD enzyme activity was 25.25 U/mg of protein, which was 9.54% higher than the activity in the free anthocyanin group. The results showed that soy protein isolate and acacia can efficiently bind anthocyanins to form stable complexes, demonstrating favorable *in vitro* sustained release effects, and that the lipid-lowering activity of the complexes was higher than that of free anthocyanins. This study provides a theoretical basis for the subsequent development of lipid-lowering products.

**Key words:** blueberry anthocyanins; polyelectrolytes; soy protein isolate; arabic gum

蓝莓花色苷 (Blueberry Anthocyanin, BBA) 具有包括抗氧化、降脂、降血糖、抗炎、促进益生菌增殖、抗肿瘤、保护视网膜等多种生物活性, 在保健食品开发、化妆品行业具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。然而, 花色苷是一类极不稳定的物质, 对 pH、温度、光照较为敏感<sup>[2]</sup>, 易受到氧化剂、酶、金属离子等因素的破坏, 而且, 花色苷的亲水性极强, 在胃肠道的吸收低, 从而导致其在机体的生物利用度降低。为了提高花色苷的稳定性, 目前的研究采用了多种方法, 例如分子改性、添加辅色物质、微胶囊化、生物大分子复合等<sup>[3]</sup>。

生物大分子复合是指花色苷与蛋白质、多糖等大分子发生相互络合, 形成复合物, 提高花色苷的稳定性。蛋白质、多糖、多肽等结构复杂的生物大分子, 利用带相反电荷的聚电解质之间的静电作用, 可以在溶液中缔合形成具有三维大分子结构的复合聚电解质 (Polyelectrolyte Complex, PEC), 聚电解质复合物因其无毒且具有良好的耐受性而受到广泛关注<sup>[4]</sup>, 大量研究表明聚电解质复合物能够达到提升花色苷的稳定性, 并且能够实现靶向缓释<sup>[5]</sup>。

大豆分离蛋白 (Soy Protein Isolation, SPI) 营养丰富、安全无毒, 已广泛用于食品工业中, 是潜在的聚阳离子材料。SPI 在等电点以下带正电, 能够与阴离子聚电解质相互作用。阿拉伯树胶 (Arabic Gum, AG) 是一种带负电的无毒的生物大分子, 主要作为聚电解质复合物壁材<sup>[8]</sup>。本文在上述参考文献的理论和技術基础上, 通过 SPI 和 AG 以静电自组装的方式负载蓝莓花色苷, 旨在通过聚电解质体系来提升蓝莓花色苷稳定性, 并且研究探讨复合物

作用于经油酸诱导的 HepG2 脂质模型的降脂作用, 为聚电解质复合物提高天然活性物功能活性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蓝莓花色苷由本实验室提取<sup>[9]</sup>。

人肝癌细胞株 HepG2 购买于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

大豆分离蛋白 (SPI)、阿拉伯树胶粉 (AG)、噻唑蓝 (MTT)、油红 O 试剂盒、油酸, 上海源叶生物科技有限公司; PBS、DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰酶、链霉素青霉素, 美国 Gibco 公司; BCA、TG、TC、SOD、MDA 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Enspire2300 多功能酶标仪, 美国 PE 公司; Sentinel Gold 生物安全柜、CCL-170B-8 二氧化碳培养箱, 新加坡艺思高科技有限公司; BDS 200 倒置显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; JY 92-IID 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Centrifuge 5415 R 通用台式冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; EVO MA 15 扫描式电子显微镜, ZEISS 公司; Vertex 70 傅立叶变换红外光谱仪, 布鲁克公司; Mastersizer 3000 激光粒度分析仪、Zetasizer Nano ZS 90 纳米粒度及 ZETA 电位分析仪, 英国 Malvern 公司; LS-50HG 立式压力蒸汽灭菌器, 江阴滨江医疗设备有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 SPI/AG-BBA 复合物的制备

本文通过研究超声功率、壁芯质量比 (SPI:BBA)、壁材质量比 (SPI:AG)、包埋时间等 4 个因素来筛选出最适聚电解质制备工艺。配制一定质量浓度的预处理 SPI 溶液和 AG 溶液, 将体系调到 pH 值 3.0。将 10 mL 质量浓度为 10 mg/mL 的预处理后 SPI 溶液置于烧杯中, 调整变幅杆高度直至深入液面以下, 加入 BBA, 不同功率下进行 20 min 的超声波处理, 总处理时长为 20 min (超声设置为工作时间 3 s, 间歇时间 3 s, 超声破碎仪总功率为 900 W)。取出烧杯, 在 700 r/min 条件下磁力搅拌, 逐滴加入不同体积的质量浓度为 10 mg/mL 的 AG 溶液, 继续搅拌一定时间制备得到 SPI/AG-BBA 复合物 (下文简称复合物)。

#### 1.3.2 包埋率测定

吸取适量制备好的复合物装入超滤离心管中, 相对离心力  $15\ 000\times g$ ,  $4\ ^\circ\text{C}$  条件下离心 20 min, 取下清液采用 pH 示差法测花色苷含量。

$$X = \frac{w_1 - w_2}{w_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$X$ —包埋率, %;

$w_1$ —总投入花色苷质量, mg;

$w_2$ —离心后下清液中花色苷质量, mg。

#### 1.3.3 SPI/AG-BBA 复合物的表征

##### 1.3.3.1 平均粒径、 $\zeta$ -电位测定

利用纳米粒径及 Zeta 电位分析仪, 将样品液稀释到合适倍数后, 取适量加入样品池中, 用动态光散射法测定复合物的平均粒径和分散系数。通过电位池测定样品通电后的电泳迁移率, 计算聚电解质复合物的表面  $\zeta$ -电位。室温  $25\ ^\circ\text{C}$ , 各样品平行测定 3 次。

##### 1.3.3.2 BBA 的荧光淬灭特性

称取 1.00 g 大豆分离蛋白粉末于烧杯中, 加入 100 mL 蒸馏水, 水浴磁力搅拌  $80\ ^\circ\text{C}$ 、30 min 至完全溶解, 得到质量浓度为 10 mg/mL 的预处理的大豆分离蛋白溶液, 使用盐酸溶液、氢氧化钠溶液将体系调到 pH 值 3.0。用 pH 值 3.0 的蒸馏水将大豆分离蛋白溶液稀释成 0.5 mg/mL 的工作液, 用蒸馏水配制质量浓度梯度为 0、0.25、0.5、1、2 和

4  $\mu\text{g/mL}$  的花色苷工作液。将 SPI 工作液与各质量浓度的花色苷工作液按体积比 1:1 的比例混合, 震荡混合后置于室温孵育 30 min, 以蒸馏水为空白, 记录并扣除响应化合物的荧光值。使用激发光谱, 荧光激发波长设置为 280 nm, 发射波长范围设置为 300~450 nm, 激发及发射狭缝均设置为 5 nm。

##### 1.3.3.3 扫描电镜

使用钨光扫描电子显微镜微胶囊的微观结构观察, 表面镀金后用扫描电镜观察微胶囊的外观形态。

##### 1.3.3.4 傅里叶红外

采用傅立叶变换红外光谱仪对 SPI/AG/BBA 聚电解质复合物冷冻干燥样品进行分析。取样品与 KBr 经过研钵研细后用压片机制得透明样品薄片, 以空白 KBr 薄片来调整基线水平并对差异化光谱进行归一化处理, 以空气为参比, 测定波段为  $4\ 000\sim 500\ \text{cm}^{-1}$ , 扫描次数设置为 16 次。

#### 1.3.4 体外模拟缓释

在体外模拟胃液和模拟肠液中观察花色苷的释放, 分别将相同质量浓度花色苷的游离花色苷和 SPI/AG-BBA 复合物装入已活化好的 3.5 ku 纤维素透析袋中置于烧杯, 向烧杯中加入足量的 pH 值 1.2 的 0.2% NaCl 模拟胃液和 pH 值 6.8 的 50 mmol/L 的 PBS, 于  $37\ ^\circ\text{C}$  下恒温磁力搅拌。在 0、0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 时取样测定花色苷含量, 每次取样后向烧杯中补充同等体积的模拟胃液和模拟肠液<sup>[10]</sup>。

$$C = \frac{w_t}{w_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$C$ —花色苷释放率, %;

$w_t$ — $t$ 时刻花色苷累计释放量, mg;

$w_0$ —花色苷初始质量, mg。

#### 1.3.5 SPI/AG-BBA 复合物体外降脂活性

##### 1.3.5.1 HepG2 细胞培养

细胞培养参考刘畅等<sup>[11]</sup>的方法, HepG2 细胞用含  $\varphi=10\%$  胎牛血清、 $\varphi=1\%$  青霉素-链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基培养, 培养在  $37\ ^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱。

##### 1.3.5.2 复合物的细胞毒性测定

将密度为每毫升  $5\times 10^4$  个的细胞悬液接种到 96 孔板中, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 常规培养 24 h。取出 96 孔板, 吸去旧的培养基, PBS 清洗。试验组每孔加入

200  $\mu\text{L}$  含有不同质量浓度花色苷样品和油酸造模剂的完全培养基, 设置空白组, 每组 6 个复孔。培养 24 h 后, 吸去旧的培养基, PBS 清洗, 每孔加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 200  $\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 吸出旧培养基, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 室温振荡孵育 10 min, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值。按照公式 3 计算存活率。

$$B = \frac{A_{\text{试验}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

$B$ ——为细胞存活率, %;

$A_{\text{试验}}$ ——为试验组的吸光度;

$A_{\text{对照}}$ ——为对照组的吸光度。

### 1.3.5.3 油酸诱导的 HepG2 细胞脂质积累模型的建立及鉴定

将密度为每毫升  $5 \times 10^4$  个的细胞悬液接种到 12 孔板中, 每孔 1 mL, 常规培养 24 h。油酸造模剂的制备参照刘畅等<sup>[1]</sup>的方法, 配油酸浓度为 10 mmol/L 的造模剂溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌, 冷冻备用, 用完全培养基将造模剂稀释成 0、200、400、600  $\mu\text{mol/L}$ 。取出 12 孔板吸取旧的培养基, PBS 清洗。加入 1 mL 不同浓度的油酸造模剂, 继续培养 24 h。

### 1.3.5.4 复合物对脂质 HepG2 细胞模型的降脂效果检测

将密度为每毫升  $2 \times 10^5$  个的细胞悬液接种到 6 孔板中, 每孔 2 mL, 当细胞生长至密度为 80%~90% 时, 使用 200  $\mu\text{mol/L}$  的油酸诱导, 设置对照组。24 h 后吸弃旧的培养液, PBS 清洗, 对照组和模型组加入完全培养基, 阳性对照组加入 15  $\mu\text{g/mL}$  多烯磷脂酰胆碱 (Polyene Phosphatidyl Choline, PPC), 实验组分别加入花色苷质量浓度为 10、30、50  $\mu\text{g/mL}$  的 BBA 溶液和 SPI/AG-BBA 溶液, 每孔培养基为 2 mL, 继续培养 12、24、36、48 和 60 h。待细胞给药处理结束后, 吸弃 6 孔板中的培养基, PBS 洗涤后收集细胞, 制成细胞悬液, 冰浴状态下进行超声破碎处理。根据试剂盒方法测定细胞样液中的总蛋白、TG、TC、SOD、MDA 的含量。

### 1.3.6 数据分析

所有样品均设置 3 个平行, 处理后的数据以平均值  $\pm$  标准差表示。采用 Origin 2022 软件作图, 采用 SPSS 22.0 统计分析软件进行单因素方差分析和独立  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示存在显著性差异,  $P < 0.01$  表示有极显著差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SPI/AG-BBA 复合物的制备和优化

#### 2.1.1 超声功率对复合物形成的影响

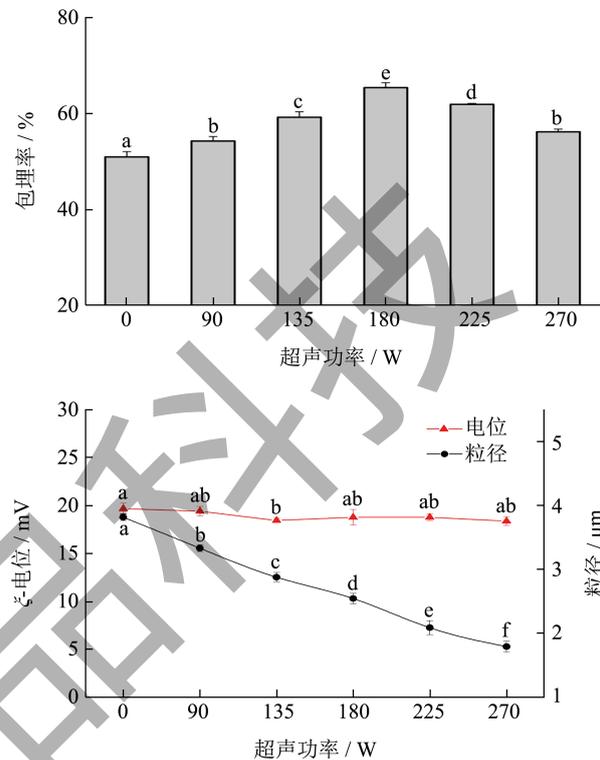


图 1 超声功率对复合物包埋率、平均粒径、 $\zeta$ -电位的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic power on embedding rate, mean particle size and Zeta-potential of complex

注: 值表示为平均值  $\pm$  SD ( $n=3$ )。不同小写字母代表组间有显著性差异  $P < 0.05$ 。下同。

超声功率对复合物形成的影响结果如图 1 所示, 在 0~180 W 的范围内增加, SPI/AG-BBA 的包埋率随着功率的提高而提高, 180 W 时达到最高包埋率为 65.36%, 但是随着超声功率进一步提高, 复合物的包埋率逐渐降低, 从功率 225 W 时的 61.90% 降低到了 270 W 时的 56.20%。分析可能的原因, 在于超声处理后的大豆分离蛋白球状结构的构象发生变化, 使亲水区域更多地暴露<sup>[12]</sup>, 有利于蛋白质与花色苷的结合。但是, 当超声功率过高时, 空化效应迫使 SPI/BBA 进入高温状态, 破坏了单个组分的分子结构或复合物的结构, 使花色苷泄漏, 包埋率降低。超声处理还能够显著减小蛋白的粒径, 随着功率增大, 复合物的粒径逐渐减小, 180 W 功率条件下, 平均粒径从 3.81  $\mu\text{m}$  降低至 2.54  $\mu\text{m}$ , 270 W 时降为 1.79  $\mu\text{m}$ 。 $\zeta$ -电位则不受超声功率的影响,

基本稳定在 19 mV 左右。综合考虑，后续实验制备复合物选择超声功率为 180 W。

### 2.1.2 壁芯质量比对复合物形成的影响

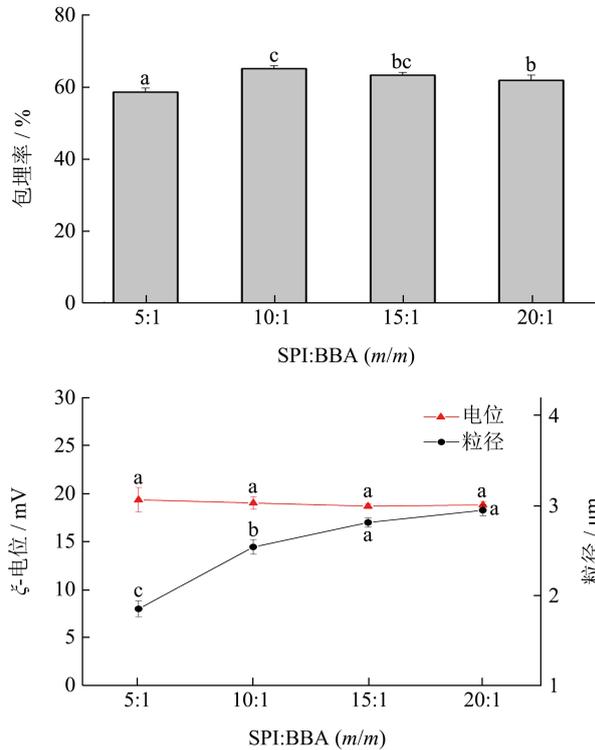


图 2 不同壁芯比对复合物包埋率、平均粒径、ζ-电位的影响

Fig.2 Effects of different wall-core ratio on embedding rate, average particle size and Zeta-potential of complex

由图 2 可知，SPI:BBA 比例从 5:1~20:1 范围内，包埋率呈现先上升后下降的趋势，由开始时的 58.62% 上升至 10:1 时的 65.10%，之后包埋率开始出现略微下降。随着 SPI 比例增加，包埋率逐渐上升，壁材的结合位点增加，拥有更多的结合机会让包埋率得到提升<sup>[13]</sup>。继续增大 SPI 的量，复合物的包埋率开始下降，这可能是因为壁材乳化稳定性减弱导致的<sup>[14]</sup>，复合物的外壳形成不均匀。可能的原因在于，较大量花色苷的存在会与 SPI 发生充分结合，此时花色苷是过量的，蛋白的结构发现较大变化，这可能不利于接下来与 AG 的结合，因为这种结合不仅仅是电荷在起作用，还有蛋白和多糖基团上的结合，花色苷占据较多位置使得 AG 与 SPI 的结合过程受到挤压<sup>[15]</sup>。由于体系中阴阳离子聚电解质比较稳定，在加入不同质量花色苷后复合物的 ζ-电位变化有略微下降，在 5:1 时电位为 19.31 mV，到 20:1 时电位为 18.80 mV，但是整体不明显，说明在此范围内的花色苷添加量对体系 ζ-电位没有

影响。随着花色苷添加量的减小，粒径逐渐增大。综合考虑，后续实验制备复合物选择壁芯质量比 (SPI:BBA) 为 10:1。

### 2.1.3 壁材比对复合物形成的影响

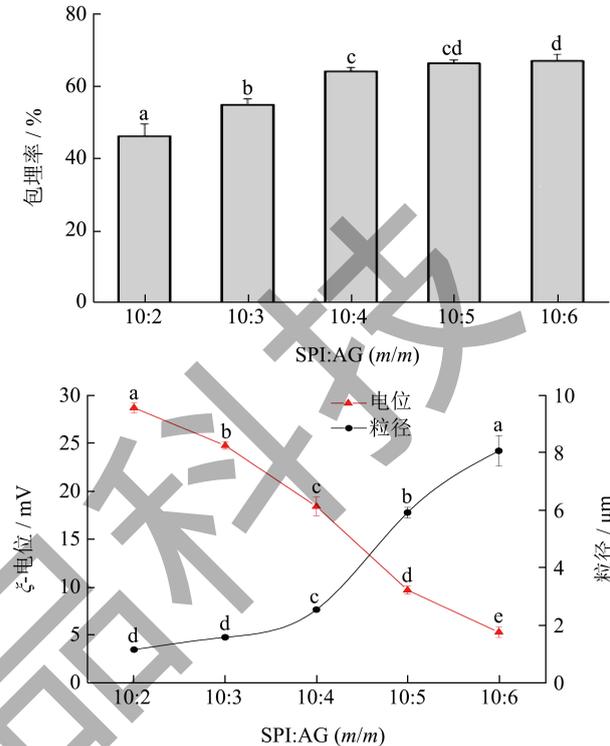


图 3 不同壁材比对复合物包埋率、平均粒径、ζ-电位的影响

Fig.3 Effects of different wall ratio on embedding rate, average particle size and Zeta-potential of complex

由图 3 可知，在壁材比 (SPI:AG) 10:2~10:6 范围内，包埋率随着壁材比的增加呈现逐渐上升的趋势。壁材比为 10:2 时包埋率最低为 46.20%，当壁芯比为 10:4 时包埋率达到 64.10%，随着壁材比继续增加，包埋率增速放缓，10:6 时为 67.00%。随着 AG 质量增加，与 SPI 有效结合，形成较多较密集的复合物。SPI:AG 为 10:2 时 ζ-电位处于最高水平，达到了 28.70 mV，此时的复合物体系中正电荷占据主导，整体比较稳定，不容易发生沉降现象。在 Lan 等<sup>[16]</sup>的研究中提到两种相反电荷聚电解质的比例影响着复合物在水体系中的形态结构和性质，在阳离子聚电解质占据主导时体系呈溶液状态，随着阴离子聚电解质的增加，体系会经过聚电解质小球、颗粒状沉淀和絮凝沉淀等过程，后两者都不是理想状态。随着 AG 质量的逐渐增加，体系的粒径开始逐渐变大，粒径在 10:4 时 2.53 μm，10:6 时粒径增加到 8.06 μm，大颗粒的复合物形状不规则

并且分布不集中, 由于重力作用会快速沉淀在烧杯底部。综合考虑, 后续实验制备复合物选择壁材比(SPI:AG)为10:4。

#### 2.1.4 包埋时间对复合物形成的影响

从图4中可以看出, 在包埋时间0.5~2.0 h范围内随着时间增加出现包埋率先增加后减小的现象, 0.5 h此时的包埋率为57.60%, 包埋时间延长到1.0 h时包埋率为66.05%, 有明显的上升, 随着包埋时间继续延长, 包埋率出现明显下降。时间增加而出现的包埋率下降的原因可能是复合物中的花色苷在经过机械作用的情况下开始发生泄漏, 这种现象与复合物本身的缓释作用相关<sup>[17]</sup>。不同包埋时间下, 复合物的 $\zeta$ -电位变化趋势不明显, 并且稳定。随着包埋时间的延长, 粒径逐渐减小。综合考虑, 后续实验制备复合物选择包埋时间为1 h。

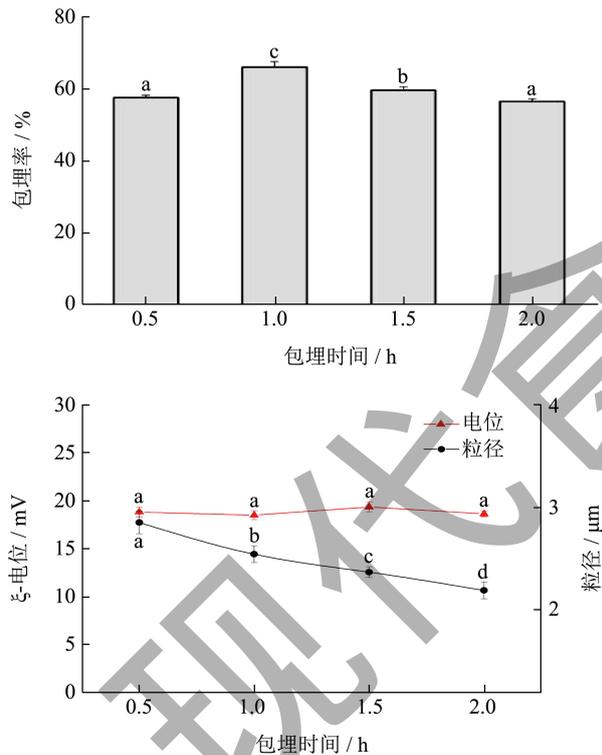


图4 不同包埋时间对复合物包埋率、平均粒径、 $\zeta$ -电位的影响

Fig.4 Effect of different embedding time on embedding rate, average particle size and Zeta-potential of complex

## 2.2 SPI/AG-BBA 复合物的表征

### 2.2.1 BBA 对大豆分离蛋白的荧光淬灭特性

大豆分离蛋白的内源荧光主要来自于结构中的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸基团, 激发波长为

280 nm 时, 蛋白质的荧光光谱取决于色氨酸残基<sup>[21]</sup>。图5为大豆分离蛋白的荧光淬灭图谱, 由图可知, 花色苷质量浓度增加, 大豆分离蛋白的荧光强度逐渐降低, 最大激发峰逐渐变小。BBA 质量浓度为 2.0  $\mu\text{g/mL}$  和 4.0  $\mu\text{g/mL}$  时, 最大荧光强度分别下降了 63.67% 和 83.44%, 荧光强度下降可能是由于发生了静态淬灭<sup>[21]</sup>, 说明大豆分离蛋白与花色苷之间产生了一定的相互作用; 当 BBA 质量浓度为 4.0  $\mu\text{g/mL}$  时, 最大激发波长由 327 nm 变成 314 nm, 发生蓝移, 这说明大豆分离蛋白的三级结构发生变化, 花色苷的加入改变了蛋白分子内部氨基酸残基微环境的极性, 蛋白质结构松散舒展, 使得更多疏水基团和色氨酸暴露, 非极性增强<sup>[21]</sup>。综上所述, BBA 与 SPI 紧密结合, 形成了 SPI-BBA 复合物。

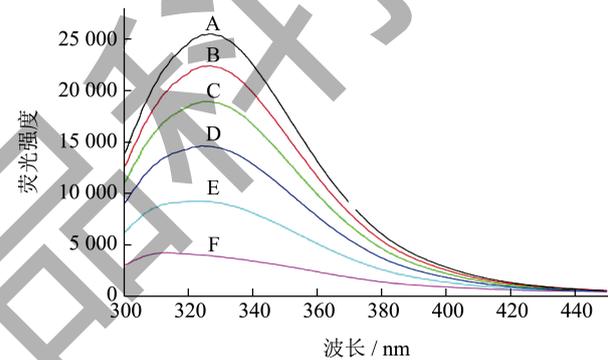


图5 不同质量浓度BBA对大豆分离蛋白荧光强度的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of BBA on the fluorescence intensity of soybean protein isolates

注: 由A→F 分别代表 BBA 质量浓度为 0、0.25、0.5、1.0、2.0 和 4.0  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.2.2 傅立叶变换红外光谱

对制备的 SPI/AG-BBA 复合物进行红外光谱检测, 结果如图6所示。在经过花色苷复合之后, 大豆分离蛋白的氨基和羧基带分别从 3 407.33、2 972.86 和 2 932.98  $\text{cm}^{-1}$  迁移到 3 405.22、2 961.86 和 2 931.14  $\text{cm}^{-1}$ 。蛋白质的主要特征谱带由酰胺 I 带 (1 700~1 600  $\text{cm}^{-1}$ )、酰胺 II 带 (1 560~1 520  $\text{cm}^{-1}$ )、酰胺 III 带 (1 240~1 430  $\text{cm}^{-1}$ ) 三个强谱峰带组成<sup>[21]</sup>, 随着花色苷的加入, 酰胺 I 带从 1 641.05  $\text{cm}^{-1}$  迁移到了 1 645.26  $\text{cm}^{-1}$  出现了略微蓝移; 酰胺 II 带发生较大红移, 从 1 544.76  $\text{cm}^{-1}$  迁移到 1 539.78  $\text{cm}^{-1}$ 。这可能是由于 O-H 键和分子间氢键伸缩震动引起的, 表明 SPI/AG 与 BBA 之间存在氢键作用<sup>[21]</sup>。红外光谱的变化说明了花色苷引起了大豆分离蛋白二

级结构的改变, 花色苷与 SPI/AG 主要通过氢键结合, 形成 SPI/AG-BBA 复合物。

达到了 87.80%, 随后释放率缓慢升至 92.51%, 4 h 时达到最高点。

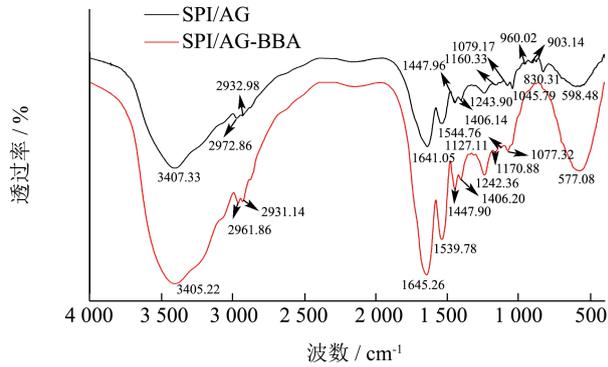


图 6 SPI/AG及SPI/AG-BBA傅立叶变换红外光谱图

Fig.6 SPI/AG and SPI/AG-BBA Fourier transform infrared spectra

### 2.2.3 复合物扫描电镜检测

对 SPI/AG-BBA 复合物进行了扫描电镜检测, 由图 7 可以看出, SPI/AG-BBA 是粒径为 2 μm 左右的不规则球形, 形成由数个或数十个团聚在一起的球团。

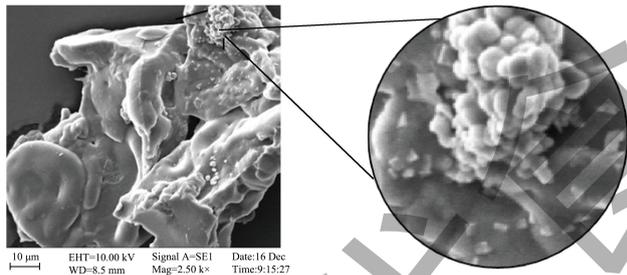


图 7 SPI/AG-BBA扫描电镜图

Fig.7 SPI/AG-BBA scanning electron microscope image

### 2.3 SPI/AG-BBA 复合物体外模拟释放

为了检测复合物的缓释效果, 对 SPI/AG-BBA 复合物在体外模拟胃液 (pH 值 1.2) 和肠液 (pH 值 6.8) 中的释放过程进行了检测。结果如图 8 所示, 在 pH 值 1.2 的模拟胃液环境中, 复合物在 2 h 时 71.05%, 随后释放速度放慢, 4 h 时释放率为 79.20%, 而游离花色苷在 2 h 和 4 h 的释放率分别为 87.80% 和 97.51%, 几乎完全释放, 比较而言, 复合物具备一定的缓释效果。在 pH 值 6.8 的模拟肠液环境中, 在监测区间内释放率开始逐渐下降。在 pH 值 6.8 条件下复合物的释放率峰值发生在 6 h 时, 为 66.40%, 与 pH 值 1.2 环境下峰值相比有明显降低。而游离 BBA 同样具有快速释放的特点, 在前两个小时检测到花色苷释放率的明显跃升, 在 2 h 时

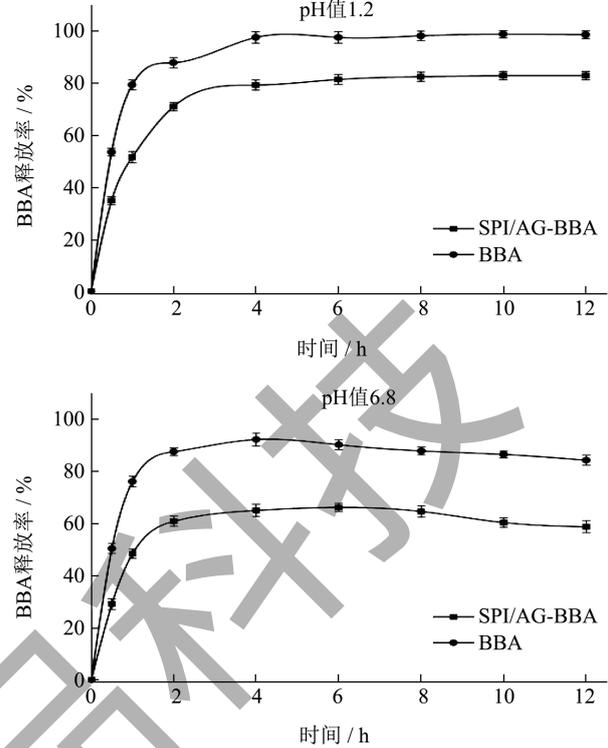


图 8 SPI/AG-BBA复合物在体外模拟条件下的释放情况

Fig.8 Release of SPI/AG-BBA complex under simulated conditions *in vitro*

由上述结果来看, 在 pH 值 6.8 的模拟肠液环境中复合物具有更佳的缓释效果, 可能的原因是在 pH 值 6.8 的环境下复合物的电荷下降, 溶胀度降低, 结构变得致密<sup>[23]</sup>, 花色苷的释放进一步受阻; 另一方面, 花色苷的释放程度不及降解程度, 所以在释放率上表现为缓慢下降, 这与现有报道结果相近<sup>[24]</sup>。总体来看, 经过复合物负载后的花色苷在模拟胃肠液状态中表现出了优良的缓释效果。

### 2.4 SPI/AG-BBA 复合物的降脂活性测定

#### 2.4.1 SPI/AG-BBA 复合物的细胞安全浓度检测

为了确定 SPI/AG-BBA 复合物对 HepG2 肝癌细胞的安全作用浓度, 试验选取质量浓度为 0~100 μg/L 的 BBA 及复合物作用于细胞 24 h, 用 MTT 法定测定细胞的存活率, 结果如图 9 所示, 在 SPI/AG-BBA 复合物中花色苷折合质量浓度为 10~50 μg/L 时, 细胞存活率无明显影响, 表明在 50 μg/mL 质量浓度以内对细胞无毒副作用; 质量浓度为 75 μg/L 时, 细胞存活率下降至 90.05%, 而对应的游离花色苷组细胞

存活率降低至 75.51%，由此，选择 0~50 μg/L 的花色苷作为 HepG2 细胞的实验质量浓度范围。

从图中还可发现，复合物在低质量浓度时（10~20 μg/L）表现出了显著的细胞促生长作用，这可能是由于复合物中的大豆分离蛋白有一定的促生长作用。在 75 μg/mL 时 SPI/AG-BBA 复合物的细胞存活率为 89.32%，相对游离 BBA 组的高出了 16.35%，表明 SPI/AG-BBA 复合物细胞毒性更低。

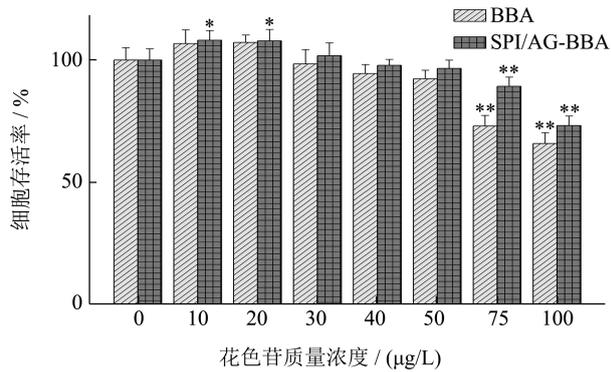


图 9 BBA及SPI/AG-BBA复合物对HepG2细胞存活率的影响

Fig.9 Effects of BBA and SPI/AG-BBA complex on survival rate of HepG2 cells

注：图中的值表示为平均值 ± SD (n=6)。\*表示其他处理组与 0 μg/L 组相比有显著差异 (P<0.05)，\*\*表示其他处理组与 0 μmol/L 组相比有极显著差异 (P<0.01)。图 10 同。

### 2.4.2 HepG2 细胞脂质堆积模型的建立

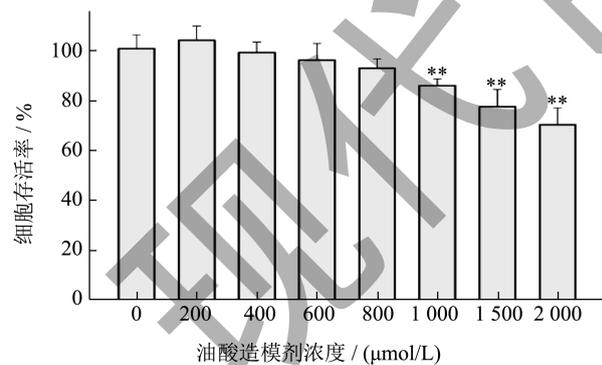


图 10 油酸造模剂对HepG2细胞存活率的影响

Fig.10 Effect of oleic acid moulding agent on survival rate of HepG2 cells

为了确定油酸造模剂对 HepG2 肝癌细胞的安全作用浓度，试验选取不同浓度的油酸造模，用 MTT 法测定细胞的存活率，结果如图 10 所示，当浓度在 200~800 μmol/L 范围内，与空白组相比细胞存活率无显著性差异，属于安全浓度范围，后续实验选用 200 μmol/L 油酸浓度为造模浓度。

### 2.4.3 SPI/AG-BBA 对细胞模型中 TG、TC 含量的影响

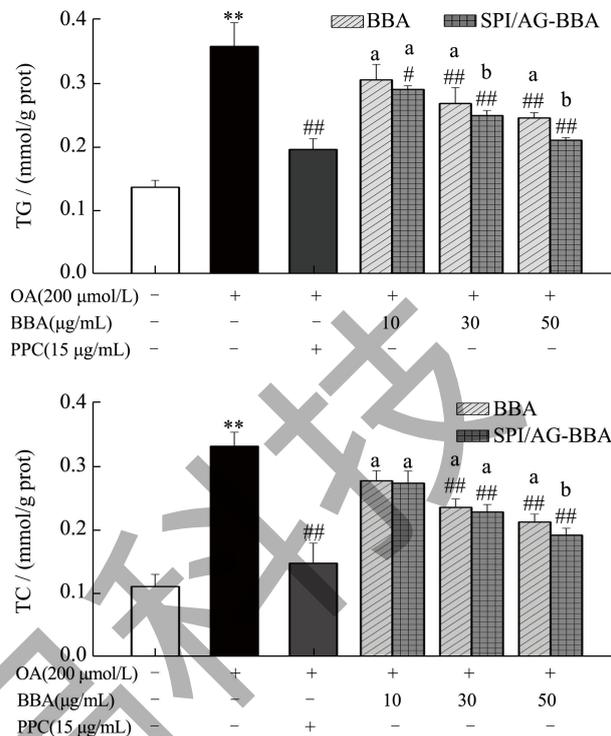


图 11 BBA及SPI/AG-BBA复合物对细胞中TG、TC含量的影响

Fig.11 Effects of BBA and SPI/AG-BBA complex on TG and TC content in cells

注：图中的值表示为平均值 ± SD (n=3)。\*\*表示 OA 处理组与空白组相比有极显著差异 (P<0.01)，#表示实验组与 OA 处理组有显著性差异 (P<0.05)，##表示有极显著性差异 (P<0.01)，不同字母表示同一浓度下，游离 BBA 组和复合物组有显著性差异 (P<0.05)，同一字母则表示无显著性差异 (P>0.05)。下同。

将复合物作用于模型细胞中，通过检测细胞中 TG、TC 含量来评价其降脂效果。实验结果如图 11，经过油酸诱导 24 h 后，细胞内的 TG、TC 含量显著高于空白组，建模成功；给药培养 48 h 后，当 BBA 质量浓度 10 μg/mL 时，与模型组相比，BBA 及 SPI/AG-BBA 组的 TC 含量无显著性差异，在 BBA 质量浓度 30~50 μg/mL 下，BBA 组及 SPI/AG-BBA 组的 TG、TC 含量显著低于模型组，且存在剂量依赖。当 BBA 质量浓度为 50 μg/mL 时，复合物组的 TG、TC 含量分别为 0.21 mmol/g prot、0.19 mmol/g prot，与模型组相比，复合物组的 TG、TC 分别下降了 41.18%、42.12%，与游离 BBA 组相比，复合物组的 TG、TC 分别下降了 14.21%、9.70%。刘畅等<sup>[1]</sup>的研究也发现 200 μg/mL 的红树莓花色苷提取

物能使肝癌细胞内 TG 含量降低 37.23%，具有清除细胞脂肪堆积的能力。我们还检测了游离 BBA 及其复合物不同作用时间对细胞 TG 和 TC 含量的影响，结果如图 12 所示，在作用时间 12~60 h 范围内，24 h 前，游离 BBA 组和复合物组 TG 和 TC 含量无显著性差异，36~60 h，复合物组的 TG、TC 含量呈下降趋势，且显著低于游离 BBA 组，这可能是复合物组中 BBA 缓慢释放出来，BBA 没有过早被破坏，持续作用细胞，而游离 BBA 组则发生较快降解，与前人的发现一致<sup>[25]</sup>。综上所述，经过复合物负载的花色苷在降脂活性上有一定提高，且作用效果随作用时间的增加而提高。

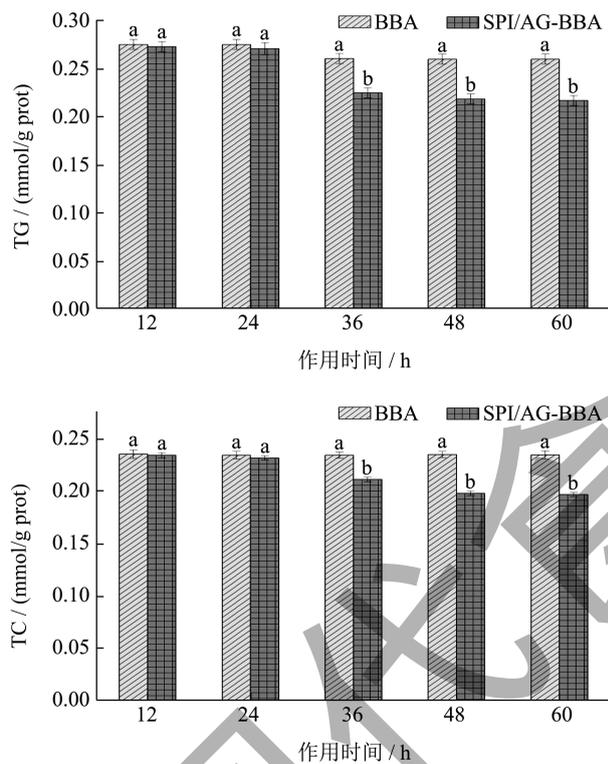


图 12 不同药物作用时间对细胞中TG、TC含量的影响

Fig.12 Effects of different drug duration on the content of TG and TC in cells

#### 2.4.4 SPI/AG-BBA 对细胞模型中 SOD、MDA 含量的影响

检测了细胞中 SOD 酶活力和 MDA 的含量，结果如图 13 所示，空白组细胞酶活力最强，而油酸诱导之后的细胞，由于胞内产生氧化应激反应导致酶活力下降。酶活力的提升与 BBA 浓度呈正相关，BBA 质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，BBA 组及复合物组的 SOD 酶活分别提升了 26.92%、38.23%，MDA 含量下降了 14.13%、14.31%。当 BBA 质量浓度增加达到 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，复合物组的 MDA 含

量为 10.58 nmol/mg prot，比模型组下降了 34.15%，比游离 BBA 组下降了 17.12%；SOD 酶活力为 25.25 U/mg prot，比模型组提高了 63.99%，比游离 BBA 组提高了 9.54%。我们还检测游离 BBA 及其复合物不同作用时间对细胞 SOD 酶活力及 MDA 含量的影响，结果如图 14 所示，复合物组在作用时间 12~60 h 范围内，SOD 含量出现上升趋势、MDA 含量出现明显下降趋势，而游离 BBA 组在这两项指标的表现上比较平稳，没有明显变化。随着作用时间的延长，复合物组与游离 BBA 组差距逐渐增大，作用时间为 24 h 时，复合物组的 SOD、MDA 指标与游离 BBA 组相比无显著性差异，当作用时间增加到 60 h 时，复合物组的 MDA 比游离 BBA 组降低了 12.68%，SOD 酶活力比游离 BBA 组提高了 6.75%，具有显著性差异。Zhang 等<sup>[25]</sup>发现花色苷能够通过激活 SOD 抗氧化酶系统有效保护肝脏，摄入花色苷可以间接或者直接地清除体内的活性氧和自由基，从而改善机体的血脂异常，这与本实验的研究结果一致。总体来说，游离 BBA 和复合物均可通过提高 SOD 酶活性，提升抗氧化酶系统，从而改善血脂水平，且复合物的效果强于游离 BBA。

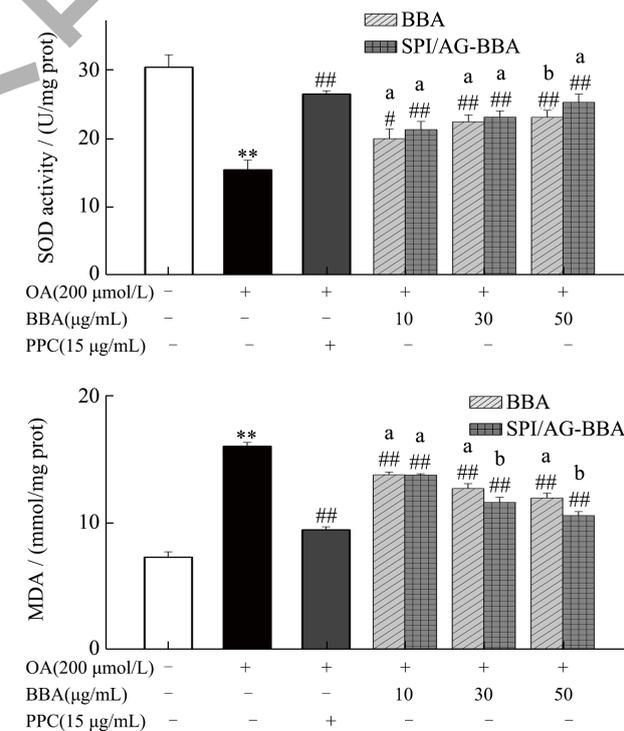


图 13 BBA及SPI/AG-BBA复合物对细胞中SOD酶活力和 MDA含量的影响

Fig.13 Effects of BBA and SPI/AG-BBA complex on SOD activity and MDA content in cells

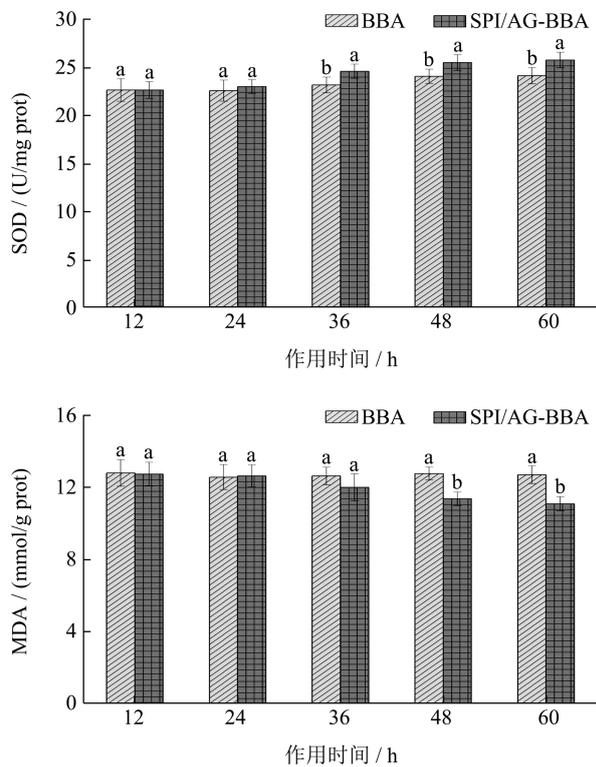


图 14 不同药物作用时间对细胞中SOD酶活力和MDA含量的影响

Fig.14 Effects of different drug duration on SOD activity and MDA content in cells

### 3 结论

本文构建了大豆分离蛋白/阿拉伯胶-花色苷体系的聚电解质复合物, 确定超声功率 180 W、壁材质量比为 10:4、壁芯质量比为 10:1、包埋时间为 1.0 h, 得到包埋率为 66.02%,  $\zeta$ -电位为 19.03 mV, 平均粒径为 2.53  $\mu\text{m}$  的不规则球状物, 提高了花色苷稳定性, 并且具有良好的体外缓释效果。最后, 对比了游离 BBA 和 SPI/AG-BBA 复合物的体外降脂活性, 发现 SPI/AG-BBA 复合物的降脂活性优于游离 BBA, 作用 48 h 后, SPI/AG-BBA 复合物组的 TG、TC 含量为 0.21 mmol/g prot、0.19 mmol/g prot, 比游离 BBA 组下降了 9.70%、14.21%, 具有显著性差异。本实验初步对比了游离 BBA 和 SPI/AG-BBA 复合物对 HepG2 细胞脂质积累模型的降脂作用, 为后续提高活性物稳定性和降脂方面的研究提供理论依据。

### 参考文献

[1] WANG M, ZHANG Z, SUN H, et al. Research progress of anthocyanin prebiotic activity: A review [J].

Phytomedicine, 2022, 102(20): 154145.

- [2] LIU Y, LIU Y, TAO C, et al. Effect of temperature and pH on stability of anthocyanin obtained from blueberry [J]. Journal of Food Measurement & Characterization, 2018, 12(3): 1744-1753.
- [3] CAI D, LI X, CHEN J, et al. A comprehensive review on innovative and advanced stabilization approaches of anthocyanin by modifying structure and controlling environmental factors [J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130611.
- [4] LUO Y, WANG Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 64: 353-367.
- [5] GE J, YUE X, WANG S, et al. Nanocomplexes composed of chitosan derivatives and  $\beta$ -Lactoglobulin as a carrier for anthocyanins: Preparation, stability and bioavailability *in vitro* [J]. Food Research International, 2019, 116: 336-345.
- [6] SONG J, YU Y, CHEN M, et al. Advancement of protein- and polysaccharide-based biopolymers for anthocyanin encapsulation [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 938829.
- [7] WANG S, YE X, SUN Y, et al. Nanocomplexes derived from chitosan and whey protein isolate enhance the thermal stability and slow the release of anthocyanins in simulated digestion and prepared instant coffee [J]. Food Chemistry, 2021, 336: 127707.
- [8] HOSSEINI A, JAFARI S M, MIRZAEI H, et al. Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 126: 1-8.
- [9] 彭丽莎. 蓝莓花色苷的提取纯化及抗氧化活性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [10] WANG W, JUNG J, ZHAO Y. Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 1246-1253.
- [11] 刘畅, 张海华, 柴洋洋, 等. 红树莓提取物降低油酸诱导 HepG2 细胞脂肪的积累[J]. 现代食品科技, 2019, 35(2): 24-31.
- [12] HIGUERA-BARRAZA O A, DEL TORO-SANCHEZ C L, RUIZ-CRUZ S, et al. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 31: 558-562.
- [13] SHARIF H R, WILLIAMS P A, SHARIF M K, et al. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants-A review [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 76: 2-16.
- [14] ESTUPIÑAN D C, SCHWARTZ S J, GARZÓN G A. Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin,

- and color stability of isotonic model beverages colored with andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin powder [J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(1): S26-S34.
- [15] NAGAE M, YAMAGUCHI Y. Three-dimensional structural aspects of protein-polysaccharide Interactions [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(3): 3768-3783.
- [16] LAN Y, WANG L, CAO S, et al. Rational design of food-grade polyelectrolyte complex coacervate for encapsulation and enhanced oral delivery of oenothien B [J]. *Food & Function*, 2017, 8(11): 47-48.
- [17] 徐群娜,白忠薛,马建中,等.缓香型玉米醇溶蛋白微胶囊乳液的制备及应用[J].*精细化工*,2021,38(7):1436-1443.
- [18] ZHU Z, ZHU W, YI J, et al. Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate [J]. *Food Research International*, 2018, 106: 853-861.
- [19] 何文佳.基于乳蛋白与矢车菊素相互作用提高色素稳定性的研究[D].无锡:江南大学,2018.
- [20] CHUNG C, ROJANASASITHARA T, MUTILANGI W, et al. Enhanced stability of anthocyanin-based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation [J]. *Food Research International*, 2015, 76: 761-768.
- [21] 赵飞.物理预处理对大豆分离蛋白结构和理化性质的影响机制[D].泰安:山东农业大学,2019.
- [22] CARRA J B, DE MATOS R L N, NOVELLI A P, et al. Spray-drying of casein/pectin bioconjugate microcapsules containing grape (*Vitis labrusca*) by-product extract [J]. *Food Chemistry*, 2022, 368: 130817.
- [23] MAHAMMAD S S, CHETTY C M, MURTHY K V R. Studies on preparation and characterization of polyelectrolyte complex of gum kondagogu and chitosan: pH-induced changes in swelling, stability and bound water content [J]. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 2013, 52(1): 30-37.
- [24] SARKAR R, DUTTA A, PATRA A, et al. Bio-inspired biopolymeric coacervation for entrapment and targeted release of anthocyanin [J]. *Cellulose*, 2021, 28(1): 377-388.
- [25] 冉林武,米佳,禄璐,等.黑果枸杞花色苷纳米颗粒的制备及其对氧化低密度脂蛋白诱导的人脐静脉融合细胞氧化损伤的保护作用[J].*食品科学*,2019,40(17):162-168.
- [26] ZHANG H, XU Z, ZHAO H, et al. Anthocyanin supplementation improves anti-oxidative and anti-inflammatory capacity in a dose-response manner in subjects with dyslipidemia [J]. *Redox Biology*, 2020, 32: 101474.