

黄嘌呤氧化酶抑制剂微胶囊的制备

崔方超¹, 李兰玲¹, 韩瑜娟¹, 王当丰¹, 檀茜倩¹, 吕欣然¹, 励建荣^{1*}, 李婷婷^{2*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013

²大连民族大学生命科学学院 辽宁大连 116600)

摘要 目的:为提高黄嘌呤氧化酶(XOD)抑制剂稳定性和生物可及性,采用喷雾干燥法制备 XOD 抑制剂的微胶囊。方法:以接枝度为指标,单因素实验优化糖基化反应产物的制备工艺,通过傅里叶红外光谱、紫外光谱、荧光光谱等对糖基化产物进行结构表征,探究不同反应时间对功能性质的影响。以大豆分离蛋白(SPI)和普鲁兰多糖的糖基化反应产物为壁材,包埋 XOD 抑制剂,利用 SEM、XRD 衍射、差示扫描量热分析等对微胶囊进行结构表征。研究微胶囊在模拟消化液中的释放率及贮藏稳定性。结果:糖基化产物最优制备工艺:蛋白含量 1.5%,蛋白和糖的质量比 1:2,反应时间 20 min,接枝度最高达 35%以上。表征结果表明 SPI 糖基化改性成功,而且溶解度提高 40%,乳化活性和乳化稳定性分别提高 2 倍和 4 倍,表面疏水性指数降低 225,有利于作为微胶囊壁材。包埋对羟基肉桂酸(HCA)和橙皮素(HES)后,通过 SEM 观察到微胶囊大小均匀、表面光滑。XRD 衍射光谱和差示扫描量热分析验证了 HCA 和 HES 被成功包埋。微胶囊使抑制剂的生物利用率提高了 50%,且微胶囊的贮藏稳定性较好。结论:本试验成功研发了基于乳酸菌代谢物的 XOD 抑制剂微胶囊制剂。高效包埋的 XOD 抑制剂微胶囊为 HCA 和 HES 作为生物活性物质用于功能性食品的开发和利用提供了依据。

关键词 黄嘌呤氧化酶;高尿酸血症;抑制剂;微胶囊

文章编号 1009-7848(2024)04-0223-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.04.021

随着国民生活水平提高,国民饮食结构出现显著变化,其主要特征是高热量、高嘌呤类食物摄入量的增加。在人体代谢过程中,嘌呤类物质在黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XOD)的催化作用下最终转化为尿酸^[1]。XOD 异常活跃导致体内尿酸大量累积,引发高尿酸血症(Hyperuricemia, HUA)和痛风^[2-3]。当前,在中国约有 1.77 亿 HUA 患者,HUA 在全球的发病率也不断上升,现已成为继“三高”之后的“第四高”^[4-7]。因此,对于 HUA 和痛风的预防和治疗刻不容缓,在临床治疗中,别嘌呤醇、非布司他等药物被广泛用于痛风、HUA 等的治疗中^[8-9],然而这些药物的副作用较大,严重时甚至会引发其它疾病,如系统性血管炎、皮疹,甚至肾衰竭等^[10]。开发安全性更高的 XOD 抑制剂来治疗 HUA 和痛风迫在眉睫。

随着社会进步,人们对功能性食品需求增大,功能性食品常含有多种生物活性物质^[11],能改善高血压、高血脂、高血糖等^[12]。例如,对羟基肉桂酸(p-Hydroxycinnamic acid, HCA)具有止血、抗氧化、抗心血管疾病等多种药理活性和药用价值^[13]。橙皮素(Hesperetin, HES)具有抗氧化、抗炎及神经保护等活性^[14]。前期研究已证实 HCA 和 HES 对 XOD 具有良好的抑制作用^[15-16]。而两者均不稳定, HES 水溶性低,胃肠道给药效率低,这些缺点限制了其与食品中的其它成分有效混合并发挥功效。将两者进行复合微胶囊化处理,可提高它们的稳定性和生物利用率。微胶囊化是一种将活性成分包装或包埋在单一或复杂的辅助材料基质中,形成亚微米至几微米的微球或胶囊,从而保护活性成分或掩盖苦味的微胶囊技术^[17-18]。该技术已在食品工业中广泛应用,如将 HCA 和 HES 包埋,可有效隔绝外界不利的环境,提高其在功能性食品中的可用性。大豆分离蛋白(Soybean protein isolate, SPI)价格低廉、来源丰富,可降低胆固醇、高血脂等心血管疾病^[19],是一种有应用价值的食品加工材料。普鲁兰多糖是一种微生物胞外聚合物^[20],通常用作形成微胶囊的主要材料。SPI 和普鲁兰多糖

收稿日期: 2023-04-10

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(U20A2067);辽宁省自然科学基金博士科研启动基金计划项目(2022-BS-301)

第一作者: 崔方超,男,博士,副教授

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

李婷婷 E-mail: tingting780612@163.com

可发生美拉德反应,生成糖基化反应产物(Maillard reaction products,MRPs),可作为微胶囊壁材的理想材料。目前关于HES脂质体已有研究,而微胶囊化HCA和HES国内还未见相关研究。对羟基肉桂酸和橙皮素的微胶囊化具有重要意义。

本文使用普鲁兰多糖和SPI通过微波法发生糖基化反应改性制备微胶囊壁材,通过喷雾干燥法制备对HCA、HES以及两者混合的XOD抑制剂微胶囊。以接枝度为指标,单因素试验优化糖基化反应条件,通过傅里叶变换红外光谱、紫外光谱、荧光光谱等对SPI及糖基化产物进行结构表征,探究不同反应时间对SPI溶解度、乳化特性及表面疏水性等功能性质的影响。以MRPs为壁材,利用扫描电镜、XRD衍射、差示扫描量热等对微胶囊进行结构表征。研究微胶囊在模拟消化液中的释放率及其贮藏稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

大豆分离蛋白(食品级),山东禹王生态食业有限公司;普鲁兰多糖(AR),上海麦克林生化科技有限公司;邻苯二甲醛(98%),萨恩化学技术(上海)有限公司; β -巯基乙醇(98%),北京伊诺凯科技有限公司;牛血清白蛋白(96%),上海麦克林生化科技有限公司;金龙鱼大豆油,益海嘉里食品营销有限公司;中链甘油三酯,上海金穗生物科技有限公司;胃蛋白酶(1:3 000,>3 000 U/mg),上海麦克林生化科技有限公司;胰酶(1:4 000),上海吉至生化科技有限公司。

1.2 设备

G80F23CN3XL-R6K(G2)微波炉,广东格兰仕微波生活电器制造有限公司;DF-101SZ集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市科瑞仪器有限公司;SCIENTZ-10N/A冷冻干燥机,美国宁波新芝生物科技股份有限公司;喷雾干燥器,瑞士Büchi-Labortechnik AG。

1.3 MRPs的制备工艺优化

1.3.1 MRPs的制备 称取SPI和普鲁兰多糖,加蒸馏水搅拌至样品完全溶解,将混合物以700 W的功率微波加热,反应结束后将样品置于冰水浴缓慢冷却,以终止反应。将反应产物于-80℃预冻

24 h,冷冻干燥为样品粉末,备用。

1.3.2 单因素实验优化反应条件 以接枝度(DG)为指标,探究不同反应条件对SPI糖基化反应程度的影响,以得到MRPs的最佳制备工艺。采用邻苯二醛(OPA)法测定游离氨基酸,向200 μ L反应溶液中加入4 mL OPA试剂,将混合溶液35℃水浴加热10 min,在波长340 nm处测定吸光度,并采用式(1)计算接枝度。

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

式中, A_0 ——糖基化反应前溶液的吸光度; A_1 ——糖基化反应后溶液的吸光度。

1.3.2.1 蛋白含量对SPI糖基化反应程度的影响

探究不同蛋白含量(0.5%,1.0%,1.5%,2.0%,2.5%)对SPI糖基化的影响。

1.3.2.2 SPI和普鲁兰多糖质量比对SPI糖基化反应程度的影响 探究SPI和普鲁兰多糖不同质量比(3:1,2:1,1:1,1:2,1:3)对SPI糖基化的影响。

1.3.2.3 反应时间对SPI糖基化反应程度的影响

探究不同反应时间(5,10,15,20,25 min)对SPI糖基化的影响。

1.4 MRPs的结构表征

1.4.1 傅里叶红外光谱分析(FT-IR) 采用压片法进行FT-IR分析,扫描范围为4 000~400 cm^{-1} 。

1.4.2 荧光光谱分析 激发波长280 nm,在300~500 nm波长范围内进行扫描。

1.4.3 紫外光谱分析(UV光谱) 在200~600 nm波长范围内进行UV光谱扫描。

1.5 不同反应时间对MRPs功能性质的影响

1.5.1 反应中间产物和褐变程度 MRPs特征波长为420 nm,在波长294 nm处测定吸光值,反映MRPs随反应时间延长褐变程度的变化。

1.5.2 溶解度的变化 采用考马斯亮蓝法测定随反应时间延长蛋白质溶解度的变化。蛋白标准曲线测定:配制1 mg/mL标准牛血清蛋白母液,备用。将母液稀释至10,20,40,60,80,100 μ g/mL。将30 μ L标准液与1 mL染色剂混匀,在波长595 nm下测定吸光值。4 500 r/min离心10 min,取上清液测定。

根据牛血清蛋白标准曲线,按式(2)计算蛋白

溶解度。

$$\text{溶解度}(\%) = \frac{\text{上清液中蛋白浓度}}{\text{总蛋白浓度}} \times 100 \quad (2)$$

1.5.3 乳化性能的变化 取 30 mL 样液与 10 mL 大豆油混合,10 000 r/min 均质 3 min, 静置。在 0 min 和 10 min 吸取 100 μL 乳液,以 5 mL 0.1% 十二烷基磺酸钠(SDS)稀释,在波长 500 nm 测吸光值。乳化稳定性(ES)用乳化稳定指数(ESI)表示,如式(3)。

$$\text{ES} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times \Delta t \quad (3)$$

式中, A_0 ——0 min 时吸光值; A_{10} ——10 min 时吸光值; Δt ——时间差(10 min)。

1.5.4 表面疏水性的变化 将 1 mg/mL 样品与 15 mmol/L 8-苯胺-1-萘磺酸溶液混合,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min,在激发波长 380 nm 和发射波长 410~570 nm 测荧光强度。

1.6 XOD 抑制剂微胶囊的制备及性能研究

1.6.1 水包油乳液的制备 称取 5 mg XOD 抑制剂溶于 5 mL 中链甘油三酯(MCT)中,以转速 400 r/min 搅拌 30 min,得到 1 mg/mL 抑制剂油相。另取 1.0,1.5,2.0 g MRPs 溶于蒸馏水,加上述抑制

剂油相,得到不同壁材含量混合物,15 000 r/min 均质 10 min,以压力 40 MPa 微射流循环均质 5 次,得到水包油乳液。

1.6.2 乳液稳定性 使用激光粒度仪测定乳液粒径,介质折射率 1.333,测试温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.6.3 XOD 抑制剂微胶囊的制备 选择最佳壁材含量,分别包埋 HCA、HES 及两者的混合物,将乳液喷雾干燥形成微胶囊。

1.6.4 SEM 观察微胶囊的形态结构 加速电压 10.0 kV 时,采用扫描电镜(SEM)观察微胶囊微观形貌。

1.6.5 XRD 衍射 将样品放置在玻璃板的粗糙平面上进行 X 射线衍射分析(XRD)。

1.6.6 差示扫描量热(DSC) 精确称量 5~10 mg 样品置于 40 μL 铝坩埚中,用压机密封后进行 DSC 分析。

1.7 XOD 抑制剂微胶囊体外释放试验

1.7.1 微胶囊中抑制剂含量的测定 利用紫外-可见分光光度法对 HCA 和 HES 进行全波长扫描,扫描范围为 200~600 nm,确定最大吸收峰位置,绘制标准曲线。代入方程计算抑制剂含量。

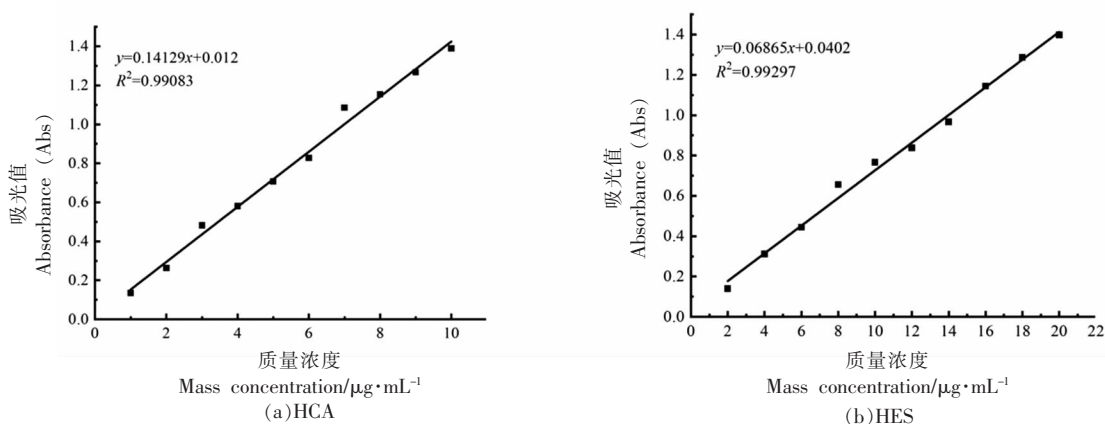


图 1 HCA 和 HES 的标准曲线

Fig.1 Standard curves of HCA and HES

1.7.2 模拟胃液、肠液的配制 模拟胃液(SGF)的制备:取 0.2 g NaCl 和 0.7 mL HCl(37%)加至 100 mL 蒸馏水中,用 1 mol/L HCl 调节 pH 值至 2.0,加 320 mg 胃蛋白酶,即得模拟胃液。

模拟肠液(SIF)的制备:将 0.375 g 胆盐和 0.220 g CaCl_2 加至 10 mL 磷酸缓冲液(pH=7.0,10 mmol/L)中;将 0.3 g 胰酶加至 10 mL 磷酸缓冲液

中,待用;试验时,取 4 mL 胰酶悬浮液加入上述含胆盐、 CaCl_2 磷酸缓冲液中,即得模拟肠液。

1.7.3 XOD 抑制剂微胶囊的体外释放 取 10 mL 新鲜微胶囊悬浮液与 10 mL SGF 充分混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$,100 r/min 反应 2 h;微胶囊在 SGF 中消化 0,30,60,90,120 min 后取样,取样后立即补加模拟胃液。2 h 后加入 SIF 并搅拌均匀,调节 pH 值至

7.0;监测4 h内消化体系的pH值,维持pH恒定。微胶囊在SIF中消化180,240,300,360 min后立即取样,取样后立即补加模拟肠液。

测定6 h内所取样品抑制剂含量,并计算抑制剂释放率,以游离HCA和HES作为对照。每次收集1 mL消化样品,并立即用液氮冷冻,冷冻样品被冻干,粉末与1 mL乙醇混合,短暂漩涡离心(10 000×g,10 min),按式(4)计算释放率。

释放率(%)=

$$\frac{\text{模拟胃肠液中抑制剂的含量}}{\text{加入的微胶囊质量} \times \text{抑制剂百分含量}} \times 100 \quad (4)$$

1.8 微胶囊的贮藏稳定性

1.8.1 贮藏过程中微胶囊包埋率的变化 将微胶囊分装并保存于室温(25±5)℃下1个月,每隔5 d取样,测定其包埋率变化。

将10 mg微胶囊与5 mL甲醇混合,涡旋30 s,并在10 000×g下离心10 min。收集上清液,以定量游离抑制剂。取另10 mg样品溶解于0.5 mL水,加入4.5 mL甲醇,以获得样品中抑制剂总含量。甲醇水溶液离心(10 000×g,10 min)以沉淀蛋白质和多糖。使用紫外分光光度计测定总抑制剂含量,见式(5)。

$$\text{包埋率(%)} = \frac{\text{总抑制剂含量} - \text{游离抑制剂含量}}{\text{总抑制剂含量}}$$

×100 (5)

1.8.2 贮藏过程中微胶囊XOD抑制活性的变化

XOD抑制率的试验方法同1.8.1节。

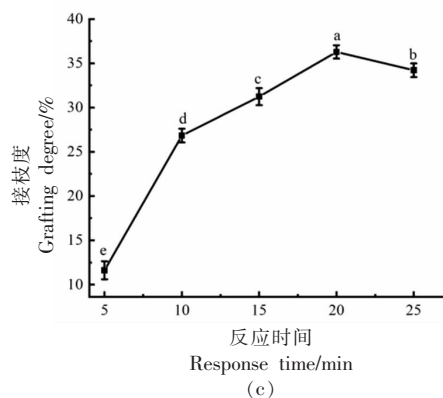
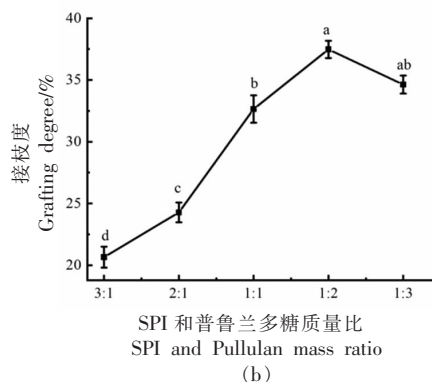
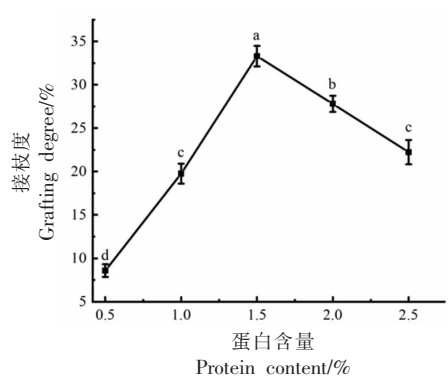
1.9 数据分析

采用SPSS 19.0软件对数据进行显著性差异分析,并使用Origin8.5作图。

2 结果与分析

2.1 单因素优化糖基化反应条件

2.1.1 蛋白含量对SPI糖基化程度的影响 如图2a所示,随着SPI添加量增加,接枝度值呈先升后降的趋势($P<0.05$),当蛋白含量增至1.5%时,接枝度达到峰值34.5%。这可能是由于蛋白含量的增加利于糖基化反应进行和蛋白质大分子快速交联^[21]。然而过高的蛋白含量会增加空间位阻,糖基化逐渐失去优势,接枝度急剧下降^[22]。结果表明,SPI的最佳添加量约为1.5%。



注:不同小写字母表示具有显著性差异($P<0.05$)。

图2 不同反应条件对接枝度的影响

Fig.2 Effect of different reaction conditions on the degree of glycosylation

2.1.2 蛋白与糖的质量比对SPI糖基化程度的影响 SPI与普鲁兰多糖的质量比对糖基化程度的影响见图2b。随着普鲁兰多糖相对含量增加,接枝度增加至38.2%($P<0.05$)。而普鲁兰多糖相对含量进一步增加会导致接枝度降低。普鲁兰多糖所占比例越高,糖基化和其它副反应产物的空间位阻效应越明显,SPI和普鲁兰多糖间的静电斥力也

增加^[23]。因此,选择 SPI/普鲁兰多糖=1:2(*m/m*)为最佳质量比。

2.1.3 反应时间对 SPI 糖基化程度的影响 如图 2c 所示,当反应时间从 5 min 延长至 20 min 时,接枝度从 10.6%增加到 35.5%($P<0.05$)。20 min 后,接枝度略降低。这可能是由于反应进程加快了 SPI 向糖基化活性中心扩散的速度,而过长的反应时间会消耗底物,导致蛋白质变性,不利于糖基化^[24]。因此,最佳反应时间为 20 min。

2.2 MRP 的结构表征

2.2.1 FT-IR FT-IR 光谱是一种快速、高效的方法来识别蛋白质与碳水化合物之间的相互作用,还可用于观察蛋白质二级结构和氢键变化。在蛋白质 FT-IR 光谱中,通常 3 个吸收带反映蛋白质特征吸收峰,包括酰胺 I($1\ 600\sim 1\ 690\text{ cm}^{-1}$),酰胺 II($1\ 480\sim 1\ 575\text{ cm}^{-1}$)和酰胺 III($1\ 300\sim 1\ 200\text{ cm}^{-1}$)^[25]。

如图 3a 所示,与未处理的 SPI 相比,MRPs 在 $3\ 200\sim 3\ 700\text{ cm}^{-1}$ 范围的吸收峰变宽,表明 SPI 与普鲁兰多糖成功接枝并产生相应的美拉德反应产物,MRPs 共轭物表面的氢键和羟基大幅增加,对提高溶解度有积极意义^[26]。除此之外,MRPs 在 $1\ 000\sim 1\ 200\text{ cm}^{-1}$ 范围内吸收峰通常是由 C-O 拉伸和 -OH 变形振动产生^[27]。 $1\ 600\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰增强表明 C=O 键伸缩振动增加,证明糖基化产物的成功生成。

2.2.2 内源荧光光谱分析 在糖基化反应中产生的荧光物质是有色物质的前体物。因此,色氨酸的固有荧光光谱通常用于观察蛋白质的构象变化,其最大吸收峰反映了水相中暴露的色氨酸残基数量^[28]。荧光光谱扫描图如图 3b 所示,MRPs 最大发射波长约为 350 nm,而 SPI 最大发射波长约为 353 nm,表现出红移,这是由于结合物结构发生变化,意味着极性增加导致更多显色基团暴露于水溶液中。而 MRP 荧光强度明显高于 SPI,这可能是因为微环境构象变化所引起,美拉德反应可以促进 SPI 与普鲁兰多糖的共价结合,导致荧光强度降低^[22]。

2.2.3 UV 光谱 为了进一步验证糖基化产物中的共价键合,通过在波长 200~400 nm 范围内扫描获得 UV 光谱。在波长 260~280 nm 范围内蛋白质紫外光谱主要由芳香族氨基酸决定,尤其是色氨

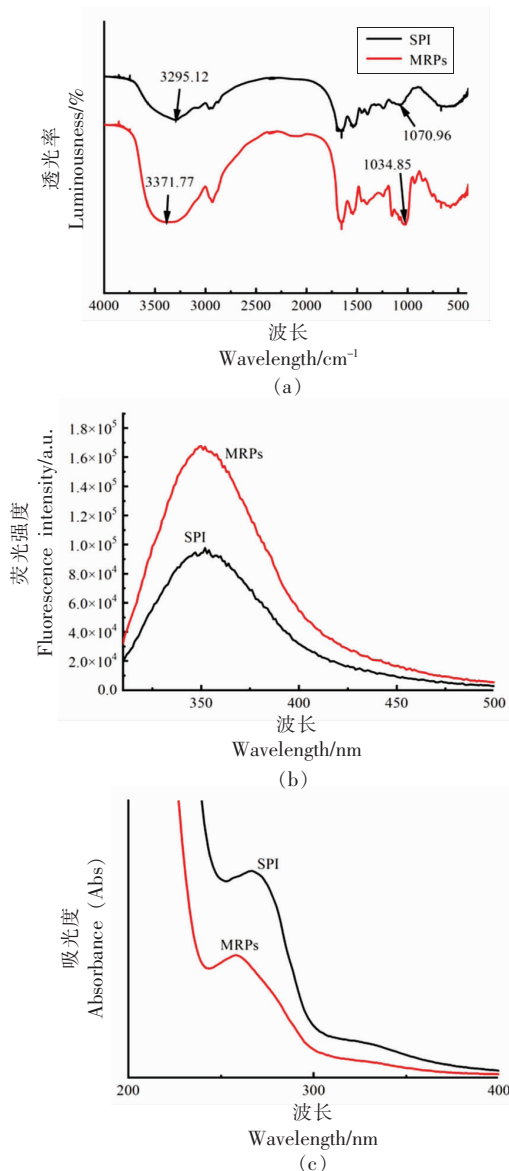


图 3 SPI 和 MRPs 的结构表征图

Fig.3 Structural characterization images of SPI and MRPs

酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)残基。UV 光谱分析图(图 3c)显示,SPI 与普鲁兰多糖发生美拉德反应后,UV 光谱吸收强度发生明显变化,MRPs 吸收强度明显弱于 SPI,这证明了新物质的生成,蛋白质分子的空间结构拓宽,导致 Trp 和 Tyr 吸收变弱,特征吸收峰强度降低^[29]。除此之外,糖基化反应引起最大吸收峰波长发生从 267 nm 到 258 nm 的蓝移,这说明糖基化反应导致 SPI 结构展开,有利于色氨酸、酪氨酸等芳香族氨基酸暴露。这进一步证明了 SPI 与普鲁兰多糖发生了共价键合,改变了

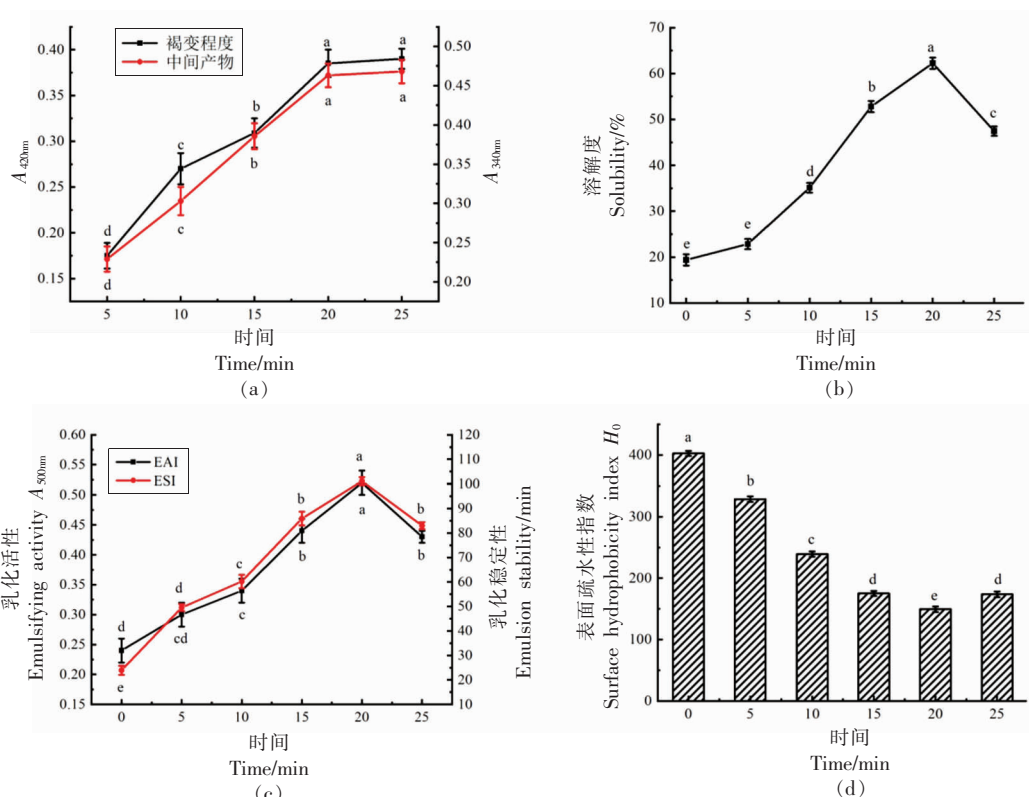
SPI的高级结构。

2.3 不同反应时间对MRPs功能性质的影响

2.3.1 褐变程度和反应中间产物含量的变化 $A_{294\text{nm}}$ 和 $A_{420\text{nm}}$ 能够分别反映美拉德反应中无色中间化合物生成量和糖基化产物褐变程度^[1]。吸光值越小,褐变程度越小,说明糖基化反应程度越小,反之越大。

如图4a所示,SPI与普鲁兰多糖发生糖基化

反应导致的褐变程度随着反应时间的延长而增加,在20 min后褐变程度趋于稳定。这可能是由于在美拉德反应的形成途径中,游离氨基酸基团暴露有助于褐变及中间产物形成。继续延长反应时间,美拉德反应趋于稳定,褐变反应接近终点^[30]。这些结果表明,糖基化产物的 $A_{294\text{nm}}$ 和 $A_{420\text{nm}}$ 值是反映美拉德反应进程的直接指标。



注:不同小写字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)。

图4 不同反应时间对MRPs功能性质的影响

Fig.4 Effects of different reaction times on the functional properties of MRPs

2.3.2 蛋白溶解度的变化 溶解度是评价蛋白质变性和聚集的理想指标。SPI与普鲁兰多糖经过美拉德反应后会形成共价键,有效提高蛋白质溶解度和功能性。图4b反映了美拉德反应后不同反应时间与蛋白质溶解度之间的关系。随着反应时间延长,蛋白质溶解度呈先升后降的趋势,与未经过处理的SPI相比,当反应时间达25 min时,蛋白质溶解度达到峰值为62.5%。这主要是由于添加了普鲁兰多糖中的亲水性羟基,从而增强了蛋白质和水间的共价键作用,防止在不利条件下的聚集

过程,使得蛋白质溶解度增加^[31]。当反应时间继续增加,蛋白质溶解度降低,是由于疏水基团暴露,蛋白质通过非共价相互作用重排成更大的大分子复合物,降低了蛋白质和水之间的相互作用。

2.3.3 蛋白乳化性和乳化稳定性的变化 蛋白质乳化性能包含乳化剂形成和稳定乳液的能力,由构象和物理化学性质决定。MRPs乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性指数(ESI)如图4c所示,EAI和ESI显著增加($P < 0.05$),最高值出现在20 min。这可能是由于MRPs的多糖部分表现出足够高的

抵抗力,以抵抗有利于向上运动和奶油化的浮力,同时糖以共价键接入 SPI 肽链中,增加空间阻力,阻止蛋白聚合。在反应 20~30 min 时,美拉德反应可能导致产物的尺寸分布不同,干扰油/水界面处连续蛋白质膜的形成,同时蛋白分子重新聚集^[32]。因此,较长的反应时间可能会降低糖基化产物的 EAI 和 ESI。

2.3.4 蛋白表面疏水性的变化 表面疏水性(H_0)是决定蛋白质结构的重要因素,与蛋白质的凝胶化、起泡、乳化等功能性质相关,在蛋白质应用中发挥着重要作用。采用 ANS 荧光强度表征蛋白质表面暴露疏水基团数量。如图 4d 所示,随着反应时间的延长,糖基化产物的 H_0 显著降低,在 20 min 时疏水性最低,之后呈上升的趋势。反应开始时,SPI 与碳水化合物发生静电相互作用或共价结合,亲水基团羟基的引入,覆盖了蛋白质表面的疏水基团,使产物表面亲水性增强,疏水性降低。反应时间过长时,在美拉德反应过程中,聚集体形成以及疏水性氨基酸残基暴露,导致产物 H_0 略有增加^[33]。

2.4 乳液稳定性的变化

乳液稳定性被认为是乳化剂形成和稳定小液滴的能力,通常与液滴粒径和液滴的分散程度有关。不同壁材含量(1%,1.5%,2%)的乳液粒度分布如图 5 所示,乳液粒径分布图呈正态分布,这是由于单峰分布且峰窄,表示乳液粒径分布均匀且稳定。由图 5 还可看出乳液分布均匀且集中,在放置 24 h 后,壁材含量为 1.5%的乳液展示出稳定的粒径,说明 1.5%的乳液稳定性最佳,这是由于蛋白质之间的静电排斥足以克服吸引相互作用,导致颗粒分散乳液的液滴尺寸减小,有利于在人体中的消化吸收^[34]。因此,选择 1.5%的壁材含量以制备稳定的乳液。

2.5 XOD 抑制剂微胶囊的性能研究

2.5.1 SEM 观察 SEM 图像如图 6 所示,未包埋的前体物质 HCA 和 HES 表面形状不规则且较为粗糙,表面有明显的裂痕。相比之下,通过喷雾干燥包埋形成的微胶囊干燥粉末呈现球形且表面光滑,具有完整的微胶囊结构,这些粉末单独分布,没有发生任何聚集。由 SEM 图像还可看出微胶囊的囊壁具有相当高的致密性,说明芯材已经被壁

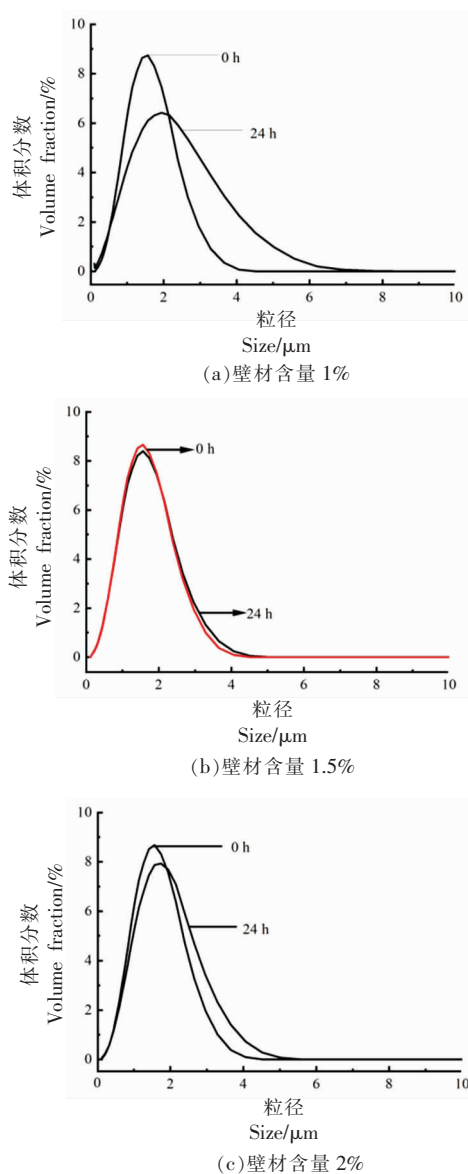


图 5 乳液粒径变化

Fig.5 Emulsion particle size change

材成功包埋。

2.5.2 XRD 衍射分析 图 7a 显示了微胶囊包埋前、后的 XRD 图像,图像表明,包埋前的 HCA 和 HES 显示出对应于无定形状态的宽峰,属于非晶体状态^[35]。SPI 糖基化产物包埋抑制剂形成微胶囊后的衍射峰也为馒头峰,有效表明了 HCA 和 HES 被成功包埋进微胶囊结构中,该结果与上述 SEM 结果一致。

2.5.3 DSC 分析 为了进一步证明 XOD 抑制剂微胶囊成功包埋活性物质 HCA 和 HES,进行差示

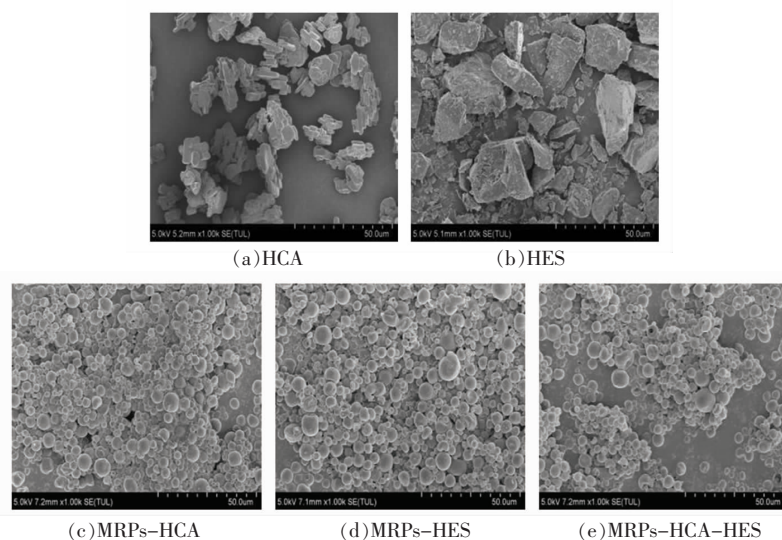


图6 HCA, HES, MRP-HCA, MRP-HES 和 MRP-HCA-HES 的扫描电镜图

Fig.6 SEM images of HCA, HES, MRP-HCA, MRP-HES and MRP-HCA-HES

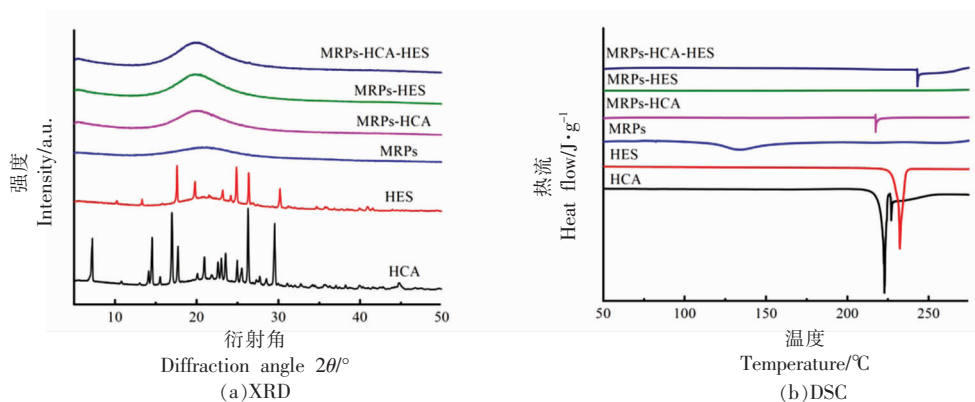


图7 HCA, HES, MRP-HCA, MRP-HES 和 MRP-HCA-HES 的表征图

Fig.7 Images of HCA, HES, MRP-HCA, MRP-HES and MRP-HCA-HES

扫描量热分析(DSC)。如图7b所示,微胶囊形成后的峰面积比抑制剂单体HCA和HES明显减小,甚至消失,这是由于在粉末的状态下,热直接传递到微胶囊^[36],DSC结果表明HCA和HES成功被XOD抑制剂包埋在微胶囊内部,这也证实了上述SEM和XRD的分析结果。

2.6 XOD抑制剂微胶囊体外模拟释放率

最佳的微胶囊结构能够在胃液环境下保持原有结构不被破坏,在肠液的生理环境下,被包埋的活性成分能够达到最大程度释放,以使被包埋物质在相应部位发挥正常生理功能。然而,微胶囊在胃液或肠液消化阶段遭到破坏或活性物质无法释

放均影响释放特性,目标活性成分无法释放,导致生物利用率较低。因此,为进一步研究XOD抑制剂微胶囊的特性,分析了HCA和HES在胃肠液中的释放曲线,以确定在体外条件下微胶囊的释放动力学。

将微胶囊放置在胃液消化2h,再转移至肠液消化4h,在模拟胃肠消化6h的消化样品溶液中释放曲线如图8所示。XOD抑制剂在胃液模拟环境下,释放量较低,仅为35%,而在肠液模拟环境下释放率较高,释放率达到80%以上。在低pH下,XOD抑制剂在胃液的释放量低是由于SPI与普鲁兰多糖形成的结构稳定,防止被胃液消化。当

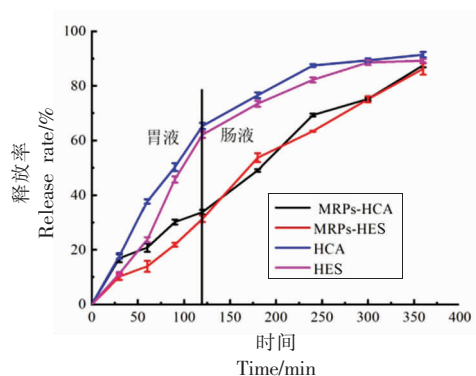
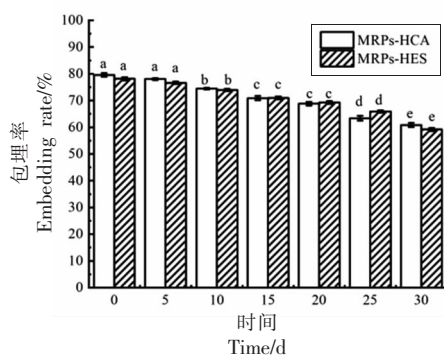


图 8 XOD 抑制剂微胶囊体外模拟释放率

Fig.8 Simulated release rate of XOD inhibitor microcapsules *in vitro*

转移至中性 pH 的肠液时, 由于壁材具有较高的水溶性, 因此与水的接触可能会破坏微胶囊的结构, 同时蛋白质被胰蛋白酶水解, 微胶囊壁材被破坏, 对 HCA 和 HES 快速释放^[37]。



注: 不同小写字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.7 XOD 抑制剂微胶囊贮藏稳定性研究

在贮藏过程中, 微胶囊中的包埋物质会由于其通过壁材的扩散而影响释放, 从而影响微胶囊内活性成分含量的变化。因此, 以贮藏 30 d 为研究周期, 对微胶囊 HCA 和 HES 的包埋率和 XOD 抑制剂抑制率在室温下进行研究。如图 9 所示, 在贮藏 30 d 后, XOD 抑制剂微胶囊的包埋率低于原始包埋率, 降低了约 20%, 表现出良好的贮藏性能, 这可能是由于微胶囊的较高吸水率可能导致此期间 HCA 和 HES 的破坏率较高, 较高的湿度含量会导致更多的分子流动性, 从而促进降解反应; 同时, 溶液中的 HCA 和 HES 容易氧化, 尤其是在暴露于光、热和氧气等因素时, 会出现快速的降解^[38]。除此之外, 在 30 d 后, XOD 抑制剂微胶囊仍具有良好的 XOD 抑制率, 说明微胶囊的贮藏稳定性良好。

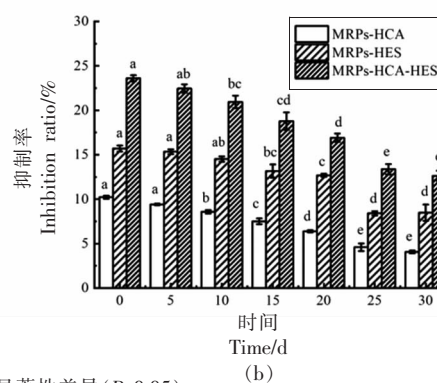


图 9 XOD 抑制剂微胶囊贮藏稳定性

Fig.9 Storage stability of XOD inhibitor microcapsules

3 结论

本试验利用普鲁兰多糖和 SPI 发生糖基化反应制备 XOD 抑制剂微胶囊壁材, 使用喷雾干燥技术包埋对羟基肉桂酸和橙皮素以制成微胶囊。结果表明, 以接枝度为指标, 微胶囊壁材的最佳工艺条件为蛋白含量 1.5%, 蛋白和糖的质量比 1:2, 反应时间 20 min, 此时接枝度最高达 35% 以上。MRPs 结构表征结果表明 SPI 糖基化改性成功, 确定了糖基化产物的生成。通过研究不同反应时间对 MRPs 功能性质的影响, 结果显示反应时间为 20 min 时, 与未处理 SPI 相比, 美拉德反应后的蛋

白溶解度提高 40%, 乳化活性和乳化稳定性分别提高 2 倍和 4 倍, 表面疏水性指数降低了 225, 说明糖基化反应后功能特性明显提高。同时对制备的 XOD 抑制剂微胶囊进行表征, 扫描电镜观察到微胶囊大小均匀, 表面光滑, XRD 衍射光谱和差示扫描量热分析验证了对羟基肉桂酸和橙皮素被成功包埋。在体外模拟消化液中, XOD 抑制剂大部分在肠道中释放, 微胶囊在贮藏 30 d 后, XOD 抑制剂的包埋率由 80% 降低到 60%。本研究对 XOD 抑制剂的应用具有一定的指导意义。

参 考 文 献

- [1] ZHANG X L, GAO H, WANG C Y, et al. Characterization and comparison of the structure and antioxidant activity of glycosylated whey peptides from two pathways[J]. Food Chemistry, 2018, 257(8): 279–288.
- [2] 魏韶尉. 植物精油对蓝靛果主要腐败菌的抑制作用及其微胶囊的制备[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2022.
- WEI S W. Inhibition of plant essential oil on main spoilage bacteria of indigo fruit and preparation of microcapsules[D]. Harbin: Heilongjiang University, 2022.
- [3] ABDULHAFIZ F, MOHAMMED A, KAYAT F, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity, chemical composition, antioxidant properties and GC-MS Analysis of Keladi Candik (*Alocasia longiloba* Miq)[J]. Molecules, 2020, 25(11): 2658.
- [4] 杨立娜, 黄靖航, 李燕红, 等. 不同分子质量菊芋菊糖益生元特性及其益生菌微胶囊稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 106–113.
- YANG L N, HUANG J H, LI Y H, et al. Study on prebiotic properties of helianthin with different molecular weight and stability of probiotic microcapsules[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 106–113.
- [5] BURMAOGLU S, OZCAN S, BALCIOGLU S, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of bis-chalcone derivatives as xanthine oxidase inhibitors and anticancer agents[J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 91: 103149.
- [6] PELIN M, FUSCO L, MARTÍN C, et al. Graphene and graphene oxide induce ROS production in human HaCaT skin keratinocytes: The role of xanthine oxidase and NADH dehydrogenase[J]. Nanoscale, 2018, 10(25): 11820–11830.
- [7] MARUHASHI T, HISATOME I, KIHARA Y, et al. Hyperuricemia and endothelial function: From molecular background to clinical perspectives[J]. Atherosclerosis, 2018, 278: 226–231.
- [8] ZHANG B H, XU H L, CHEN J, et al. Highly specific and label-free histological identification of microcrystals in fresh human gout tissues with stimulated Raman scattering[J]. Therapeutic, 2021, 11(7): 3074.
- [9] CAO L, ZHAO T Y, XIE C M, et al. Performance of ultrasound in the clinical evaluation of gout and hyperuricemia[J/OL]. Journal of Immunology Research, 2020, <https://www.researchgate.net/publication/340202445>.
- [10] CUI L, LIU J, YAN X M, et al. Identification of metabolite biomarkers for gout using capillary ion chromatography with mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(21): 11737–11743.
- [11] ZAYED A, BADAWEY M T, FARAG M. Valorization and extraction optimization of Citrus seeds for food and functional food applications[J]. Food Chemistry, 2021, 355(9): 129609.
- [12] XIONG K, ZHOU L Y, WANG J Y, et al. Construction of food-grade pH-sensitive nanoparticles for delivering functional food ingredients[J]. Trends in Food Science and Technology, 2020, 96(2): 102–113.
- [13] BICHOT A, RAOUCHE S, FAULDS C B, et al. Effects of successive microwave and enzymatic treatments on the release of p-hydroxycinnamic acids from two types of grass biomass[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 182(4): 108434.
- [14] DE OLIVEIRA J, SANTOS C, FERNANDES E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models[J]. Phytomedicine, 2020, 73: 152887.
- [15] 刘雪梅. 具有 XO1 活性的食源性植物多酚提取物的筛选、降尿酸活性评价及功效因子靶向鉴定[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- LIU X M. Screening of foodborne plant polyphenol extracts with XO1 activity, evaluation of uric acid lowering activity and targeted identification of efficacy factors[D]. Guanzhou: South China University of Technology, 2019.
- [16] 田宇晨. 双功能荷叶提取物的制备、关键活性成分筛选及降尿酸功效初探[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- TIAN Y C. Preparation, screening of key active components and efficacy of lowering uric acid of bifocal lotus leaf extract[D]. Guanzhou: South China University of Technology, 2021.
- [17] MONTERO P, CALVO M, GÓMEZ-GUILLÉN M, et al. Microcapsules containing astaxanthin from shrimp waste as potential food coloring and func-

- tional ingredient: Characterization, stability, and bioaccessibility[J]. LWT, 2016, 70(7): 229–236.
- [18] WEGMÜLLER R, ZIMMERMANN M B, BÜHR V G, et al. Development, stability, and sensory testing of microcapsules containing iron, iodine, and vitamin A for use in food fortification[J]. Trends in Food Science and Technology, 2006, 71(2): S181–S187.
- [19] MORADI M, DANESHZAD E, AZADBAKHT L, et al. The effects of isolated soy protein, isolated soy isoflavones and soy protein containing isoflavones on serum lipids in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(20): 3414–3428.
- [20] NIU B, SHAO P, CHEN H J, et al. Structural and physicochemical characterization of novel hydrophobic packaging films based on pullulan derivatives for fruits preservation[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 208(4): 276–284.
- [21] CHANG C H, SU Y J, GU L P, et al. Microwave induced glycosylation of egg white protein: Study on physicochemical properties and baking performance [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118(9): 106569.
- [22] 钱文文. 鼠李糖乳杆菌微胶囊的制备及其胞外多糖对小鼠肠道菌群的调节作用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2021.
- QIAN W W. Preparation of *Lactobacillus rhamnosus* microcapsules and the regulation of exopolysaccharides on intestinal flora in mice[D]. Hangzhou: Zhejiang Gong University, 2021.
- [23] CHANG H T, LIN C Y, HSU L S, et al. Thermal degradation of linalool-chemotype *Cinnamomum osmophloeum* leaf essential oil and its stabilization by microencapsulation with β -cyclodextrin[J]. Molecules, 2021, 26(2): 409.
- [24] XU Y J, ZHAO X, BIAN G L, et al. Structural and solubility properties of pale, soft and exudative (PSE)-like chicken breast myofibrillar protein: Effect of glycosylation[J]. LWT, 2018, 95(9): 209–215.
- [25] CARBAUGH D L, LAZEAR H. Flavivirus envelope protein glycosylation: Impacts on viral infection and pathogenesis[J]. Journal of Virology, 2020, 94(11): e00104–e00120.
- [26] KIGHTLINGER W, DUNCKER K E, RAMESH A, et al. A cell-free biosynthesis platform for modular construction of protein glycosylation pathways[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1–13.
- [27] XIAO H, SUN F, SUTTAPITUGSAKUL S, et al. Global and site-specific analysis of protein glycosylation in complex biological systems with mass spectrometry[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2019, 38(4/5): 356–379.
- [28] YUAN F, AHMED I, LV L, et al. Impacts of glycation and transglutaminase-catalyzed glycosylation with glucosamine on the conformational structure and allergenicity of bovine β -lactoglobulin[J]. Food and Function, 2018, 9(7): 3944–3955.
- [29] LI J, YANG J G, MU S C, et al. Efficient O-glycosylation of triterpenes enabled by protein engineering of plant glycosyltransferase UGT74AC1 [J]. ACS Catalysis, 2020, 10(6): 3629–3639.
- [30] 郭帅, 卢家君, 孟和毕力格. 壁材对真空低温喷雾干燥制备乳双歧杆菌 Probio-M8 微胶囊的影响[J]. 中国食品学报, 2022, 22(5): 219–227.
- GUO S, LU J J, MENG H B L G. Effect of wall material on preparation of *Bifidobacterium lactis* Probio-M8 microcapsules by vacuum low temperature spray drying[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(5): 219–227.
- [31] HE W Y, TIAN L, FANG F, et al. Limited hydrolysis and conjugation of zein with chitosan oligosaccharide by enzymatic reaction to improve functional properties[J]. Food Chemistry, 2021, 348(7): 129035.
- [32] LI Z Q, XI J, CHEN H M, et al. Effect of glycosylation with apple pectin, citrus pectin, mango pectin and sugar beet pectin on the physicochemical, interfacial and emulsifying properties of coconut protein isolate[J]. Food Research International, 2022, 156(7): 111363.
- [33] LIU P, LI Y L, GAO L, et al. Effect of different carbohydrates on the functional properties of black rice glutelin (BRG) modified by the maillard reaction[J]. Journal of Cereal Science, 2020, 93(5): 102979.
- [34] JU M, ZHU G, HUANG G N, et al. A novel pickering emulsion produced using soy protein-anthocyanin complex nanoparticles[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 99(2): 105329.
- [35] SUN S F, GAO Y, HAN N, et al. Reversible pho-

- tochromic energy storage polyurea microcapsules via in-situ polymerization[J]. *Energy*, 2021, 219(4): 119630.
- [36] 徐鹏飞, 王昊乾, 郑新飞, 等. 喷雾冷冻干燥技术制备乳双歧杆菌 Probio-M8 微胶囊制剂[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(7): 197-207.
- XU P F, WANG H Q, ZHENG X F, et al. Preparation of *Bifidobacterium lactis* Probio-M8 microcapsules by spray freeze-drying technique[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(7): 197-207.
- [37] CHEN X D, LIANG R, ZHONG F, et al. Effect of beta-carotene status in microcapsules on its *in vivo* bioefficacy and *in vitro* bioaccessibility[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 106(9): 105848.
- [38] ZHOU Y, YIN X Q, CHEN J, et al. Encapsulation efficiency and release of citral using methylcellulose as emulsifier and interior wall material in composite polysaccharide microcapsules[J]. *Advances in Polymer Technology*, 2018, 37(8): 3199-3209.

Preparation of Microcapsule Preparation of Xanthine Oxidase Inhibitor

Cui Fangchao¹, Li Lanling¹, Han Yujuan¹, Wang Dangfeng¹, Tan Xiqian¹,
Lü Xinran¹, Li Jianrong^{1*}, Li Tingting^{2*}

(¹College of Food Science and Engineering, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, Liaoning)

(²College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning)

Abstract Objective: To improve the stability and bioavailability of xanthine oxidase (XOD) inhibitors, microcapsules based on XOD inhibitors were prepared by spray drying method. Methods: Using the grafting degree as an index, the preparation process of the glycosylation reaction product was optimized by single factor, and the structure was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, fluorescence spectroscopy, etc., to explore the effect of different reaction times on the functional properties. The microcapsules were characterized by SEM, XRD and differential scanning calorimetry, using the glycosylation reaction product of soybean protein isolate (SPI) and pullulan as the wall material. The release rate and storage stability of microcapsules in simulated digestive juice were studied. Results: The optimal preparation process of glycosylation products was that the protein content was 1.5%, the mass ratio of protein and sugar was 1:2, the reaction time was 20 min, and the grafting degree was up to more than 35%. The characterization results showed that the glycosylation modification of SPI was successful, and the solubility was increased by 40%, the emulsifying activity and emulsifying stability were increased by 2 times and 4 times, respectively, and the surface hydrophobicity index was reduced by 225, which was beneficial to be used as a microcapsule wall material. After embedding p-hydroxycinnamic acid (HCA) and hesperetin (HES), SEM, observed microcapsules with uniform size and smooth surface, XRD diffraction spectrum and differential scanning calorimetry verified the successful embedding of HCA and HES. Microcapsules increased the bioavailability of inhibitors by 50%, and the storage stability of microcapsules was good. Conclusion: This experiment successfully developed the XOD inhibitor microcapsule formulation based on lactic acid bacteria metabolites. The high-efficiency embedded XOD inhibitor microcapsules provide the basis for the development and utilization of HCA and HES as biologically active substances in functional foods.

Keywords xanthine oxidase; hyperuricemia; inhibitor; microcapsule