

玉米醇溶蛋白 Maillard 产物制备叶黄素纳米粒及表征

常影, 石磊, 焦岩*, 陈浩东, 赵丽红, 韩赫
(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要 叶黄素是一种具有抗氧化和护眼功能的类胡萝卜素,然而其溶解稳定性差,吸收利用率低,作为食品功能性成分的应用受限。采用壳寡糖通过美拉德反应修饰玉米醇溶蛋白(MDZ),提高修饰产物对叶黄素的包埋与传递性能,改善叶黄素的稳定性和生物利用率。探究糖基化修饰玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒(MDZ-LUT)的最佳制备工艺和性质表征。结果表明:当叶黄素质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,玉米醇溶蛋白(Zein)与壳寡糖(COS)的质量比为 1:3,加热温度为 91 $^{\circ}\text{C}$,加热时间为 92.30 min,MDZ-LUT 对叶黄素的包封率为 $(88.79\pm 0.37)\%$ 。Nano 粒径分析仪和透射电子显微镜(TEM)分析表明,MDZ-LUT 纳米粒显示出较小的平均粒径 $(310.73\pm 5.31)\text{nm}$ 和良好分散性(多分散指数 PDI 为 0.23 ± 0.02)。傅里叶红外光谱分析表明,壳寡糖修饰后的玉米醇溶蛋白与叶黄素能够形成纳米复合物包埋结构。抗氧化试验和模拟胃肠液消化试验结果表明,经 MDZ 包埋叶黄素的自由基清除活性和消化稳定性显著提高。以上结果说明美拉德反应修饰玉米醇溶蛋白可作为一种有效的叶黄素类生物活性物质的包埋和载运体系。

关键词 美拉德反应;糖基化玉米醇溶蛋白;叶黄素纳米粒;结构表征

文章编号 1009-7848(2025)01-0181-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.018

叶黄素(Lutein)是存在于胡萝卜、万寿菊等植物中的一种重要功能性色素,也是存在于人视网膜中的重要物质,可以预防白内障,降低因年龄增长而引起的黄斑病变性的风险,对于近视人群,补充叶黄素可以减缓度数增长^[1]。叶黄素除了能保护眼睛外,还能有效预防多种癌症,主要是通过抑制肿瘤血管增生和细胞增殖^[2]。叶黄素在结构上具有共轭双键,还具有淬灭单线态氧,抑制细胞膜脂质过氧化,使机体不受损害的特殊能力^[3]。人体本身无法有效合成叶黄素,而是通过固定的食物摄取,其被广泛用于食品、药品、保健品和饲料中。然而,由于叶黄素的化学性质不稳定,容易分解失活,且其较低的水溶性,导致生物利用率低,吸收利用率低,应用范围有限^[4-5]。

玉米醇溶蛋白(Zein)作为生物活性物质载体,具有生物相容性、可降解性、自组装性及抗降解等优点,在功能活性成分高效稳态化输送,微纳米化载运和缓控释体系的建立等方面有较多研究^[6]。然而,Zein 分子质量较大且含有较多的疏水性氨基酸,溶解性和吸收性较差,所形成的颗粒容易聚集,溶解性也较差,难以将疏水性强的叶黄素输送到有效部位而增强吸收和利用率^[7]。研究发现,利用玉米醇溶蛋白与蛋白质、多糖、多酚、表面活性剂等物质进行复合,可以得到更加稳定,对生物活性物质包封率、荷载量更高的玉米醇溶蛋白基纳米颗粒。开发具有良好的输送性能的 Zein 分子修饰纳米载体,是解决叶黄素吸收利用困难的有效途径^[8-10]。

蛋白质的美拉德修饰反应(Maillard)是氨基酸/蛋白质和还原糖之间发生的有助于改善蛋白质的溶解性、凝胶性、乳化性、起泡性、热稳定性、抗氧化性等功能特性的一种交联反应^[11-13]。糖基化蛋白的技术优势是提高了乳化能力和抗聚结、絮凝和乳糜化的稳定性,改善了溶解性,特别是在接近蛋白等电点的 pH 值条件下,在构建活性物质传递系统方面有较多应用,近年来广泛用于修饰蛋白质以改善其结构和功能^[14]。而壳寡糖(Chitosan oligosaccharide, COS)属于壳聚糖生物酶解制备的

收稿日期: 2024-01-16

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(LH2023C116);黑龙江省百千万工程科技重大专项(2021ZX12B09-2);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(145209144);黑龙江省植物性食品加工技术优势特色学科“科技攻关”专项(YST-SXK202204);齐齐哈尔市科技计划市校合作项目(SXSP-2021001)

第一作者: 常影,女,博士

通信作者: 焦岩 E-mail: jiaoyan_3000@126.com

衍生物,是一种阳离子寡聚糖,除了具有壳聚糖的抗菌、抗炎、降血脂等功能,以及高度生物官能性、生物相容性等特性外,还具有壳聚糖所没有的高溶解度,高生物融合性和靶向促吸收作用,在蛋白质的结构改性方面已取得明显的效果,尤其是壳寡糖对改善玉米醇溶蛋白的载运输送特性方面发挥重要作用^[15-16]。

本研究利用美拉德糖基化反应对玉米醇溶蛋白进行修饰,采用单因素和响应面试验确定修饰条件,通过引入最佳的糖配基改善玉米醇溶蛋白的疏水性结构,进而以修饰后的蛋白为载体实现对叶黄素的包封性能、溶解分散性和生物活性的提升。通过微观结构表征,探讨美拉德糖基化修饰的构效关系和相关机制,为玉米蛋白类纳米载体的开发和叶黄素作为功能食品的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料:叶黄素(纯度 $\geq 90\%$),上海源叶生物科技有限公司;壳寡糖、玉米醇溶蛋白、阿拉伯胶、葡萄糖、麦芽糖等试剂均为国产分析纯级。

试剂:无水乙醇、石油醚、DPPH试剂(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、ABTS试剂(2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)等试剂均为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

H-7650 透射电子显微镜,日本日立公司;Nano-Zs90 粒径分析仪,德国新帕泰克有限公司;Spectrum One 傅里叶变换红外光谱仪,美国PerkinElmer(珀金埃尔默)公司;UV-2450 型分光光度计,日本岛津公司;RE-52 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;PC/PLC LD-53 型冷冻干燥机,美国 Millrock 公司;WXH 微型旋涡混合器,上海跃进医疗器械厂。

1.3 方法

1.3.1 糖基化修饰 Zein 负载叶黄素纳米粒(MDZ-LUT)的制备与条件优化

1.3.1.1 Zein 和 COS 的比例对 Maillard 反应及 MDZ-LUT 包封率的影响 称取 0.5 g 玉米醇溶蛋白溶解在 10 mL 70%体积分数的乙醇溶液中,按玉米醇溶蛋白与壳寡糖质量比分别为 1:1,1:2,1:

3,1:4,1:5,加入相应比例的壳寡糖,充分搅拌溶解,调节溶液的 pH 值为 13,密封后在 90 °C 下加热反应 120 min。反应结束后迅速冷却到室温,调节 pH 值到 8,以转速 500 r/min 下磁力搅拌 1.0 h,真空冻干后得到美拉德产物(MDZ)。用 70%的乙醇将 MDZ 溶解,分别在波长 290 nm 和 420 nm 下比色,测定美拉德反应程度^[17]。

采用反溶剂法制备上述 MDZ 负载叶黄素纳米粒:将叶黄素晶体粉末溶于 70%无水乙醇中,配成质量浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的叶黄素溶液,取 5 mL 叶黄素溶液,5 mL MDZ 于 17 mL 去离子水中,在 45 °C 下搅拌水合 150 r/min,30 min,得到美拉德反应糖基化修饰玉米醇溶蛋白悬浮液,在 45 °C 条件下旋转蒸发除去乙醇,即得到了玉米醇溶蛋白糖基化修饰产物(MDZ)负载叶黄素纳米粒(MDZ-LUT),并测定叶黄素包封率,研究 Zein 和 COS 质量比对美拉德反应产物 MDZ 包封叶黄素效率的影响^[18]。

1.3.1.2 温度对 Maillard 反应及 MDZ-LUT 包封率的影响 称取 0.5 g 玉米醇溶蛋白溶解在 10 mL 70%体积分数的乙醇溶液中,加入质量比为 1:3 的壳寡糖并充分搅拌溶解,调节溶液的 pH 值为 13,密封后,分别在温度 75,80,85,90,95,100 °C 下加热反应 90 min。按照 1.3.1.1 节方法分别制备美拉德产物(MDZ)和 MDZ-LUT 纳米粒,研究温度对 Maillard 反应程度及 MDZ-LUT 包封率的影响。

1.3.1.3 加热时间对 Maillard 反应及 MDZ-LUT 包封率的影响 称取 0.5 g 玉米醇溶蛋白溶解在 10 mL 70%体积分数的乙醇溶液中,加入质量比为 1:3 的壳寡糖并充分搅拌溶解,调节溶液的 pH 值为 13,密封后,在温度 90 °C 下,分别加热反应 60,75,90,105,120 min。按照 1.3.1.1 节的方法分别制备美拉德产物(MDZ)和 MDZ-LUT 纳米粒,研究加热时间对 Maillard 反应程度及 MDZ-LUT 包封率的影响。

1.3.2 叶黄素包封率的测定 分别配制 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 叶黄素溶液,在波长 445 nm 下测定吸光度,建立标准曲线方程: $Y = 0.0023X + 0.0004$, $R^2 = 0.9991$ 。将叶黄素纳米粒溶液与等体积石油醚充分混匀,以 2 000 r/min 转速离心 5 min,重复石油

醚提取 2 次,合并上清液,在波长 445 nm 处测其吸光度,计算叶黄素浓度 C ,包封率(EE)的计算公式如下:

$$EE(\%) = (1 - \frac{C \times V}{M}) \times 100 \quad (1)$$

式中: M 为叶黄素的总量, μg ; V 为 MDZ-LUT 悬浮液的体积, mL。

1.3.3 响应面优化试验 选取对包封率影响较大的 Zein 和 COS 质量比、加热时间和温度 3 个主要因素,采用 Box-Behnken 试验设计优化 MDZ-LUT 制备的美拉德反应工艺参数^[19]。采用 Design Expert 8.0 软件进行响应面分析试验^[17],试验因素水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平编码表
Table 1 Coded levels of the Box-Behnken experimental design

水平	因素		
	X_1 (温度)/ ℃	X_2 (加热时间)/ min	X_3 (Zein 与 COS 质量比)
-1	85	75	1:2
0	90	90	1:3
+1	95	105	1:4

1.3.4 粒径和 Zeta 电位分析 将 1.0 mL Z-LUT 和 MDZ-LUT 纳米粒样品混匀后,采用 Nano-Zs90 粒径分析仪对不同纳米粒样品进行测定,分析比较不同样品的平均粒径、Zeta 电位和多分散系数(PDI)^[20]。

1.3.5 微观结构(TEM)分析 将 Z-LUT 和 MDZ-LUT 纳米粒溶液滴加到等离子体处理的碳膜载网上,红外灯烘干后,置于透射电子显微镜下观察 Z-LUT 和 MDZ-LUT 纳米粒的微观结构^[21]。

1.3.6 傅里叶红外光谱(FT-IR)分析 称取一定量的叶黄素、Zein、COS、Zein-LUT 纳米粒、MDZ 纳米粒、MDZ-LUT 纳米粒,称取一定比例的溴化钾晶体,混合磨粉压片,测定波数为 400~4 000 cm^{-1} ,扫描次数为 32 次,分辨率为 4 cm^{-1} ,得到 FT-IR 光谱图进行分析,每个样品重复 3 次^[22]。

1.3.7 模拟胃肠液中叶黄素及叶黄素纳米粒的稳定性研究 模拟人体胃液的配制方法:取 25 mL 去离子水,依次加入 0.2 g 氯化钠,0.32 g 胃蛋白酶

搅拌溶解,再加入 7 mL 浓盐酸,均匀,然后调 pH 值到 1.2,最后用去离子水定容至 100 mL。模拟人体肠液的配制方法:取 20 mL 去离子水,加入 0.68 g 磷酸二氢钾,搅拌均匀,完全溶解,调节 pH 值至 6.8,再加入胰蛋白酶 0.5 g,搅拌均匀,完全溶解,最后调节 pH 值至 7.5,定容到 100 mL^[23-25]。

参考 Jiao 等^[26]方法稍加改动,取适量的叶黄素、Z-LUT、MDZ-LUT 纳米悬浮液,以体积比 1:3 的比例依次加入模拟人体胃液和模拟人体肠液,条件设置为 37 $^{\circ}\text{C}$,120 r/min,模拟人体胃肠蠕动 6 h。每隔 1 h 取 3 mL 样品,加入无水乙醇漩涡振荡提取 2 min,然后在 5 000 r/min 下离心 6 min,将上清液旋转蒸发,并按照 1.3.2 节的方法计算溶液中叶黄素含量变化,计算叶黄素的降解率。

1.3.8 叶黄素及叶黄素纳米粒抗氧化活性的测定

1) DPPH 自由基清除活性 分别将 2.0 mL 不同浓度叶黄素、Z-LUT 以及 MDZ-LUT 纳米粒溶液,置于 2.0 mL 0.8 mg/mL DPPH 溶液中混匀后,避光反应 30 min,在分光光度计波长 517 nm 处测定吸光值 A_1 ;样品仅加入乙醇为空白组 A_2 ;乙醇代替样品为对照组 A_0 。DPPH 自由基清除率按公式(2)计算^[27-28]。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad (2)$$

2) ABTS 法测定叶黄素及其纳米粒的自由基清除活性 取 13.4 mg 过硫酸钾和 38.4 mg ABTS 粉末分别溶于 10 mL 蒸馏水中,将两种溶液等体积混合,在室温下黑暗处放置 12~16 h。将准备好的 ABTS 溶液稀释,使其在波长 734 nm 处的吸光度为 0.700 ± 0.02 。分别将 0.6 mL 叶黄素、Z-LUT 以及 MDZ-LUT 纳米粒溶液加入到 3.4 mL 配制好的 ABTS 溶液中,在室温下反应 5~7 min,设置检测波长为 734 nm,进行吸光度测定。式(3)中 A_1 为对照组的吸光度, A_2 为样品的吸光度^[29-30]。

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (3)$$

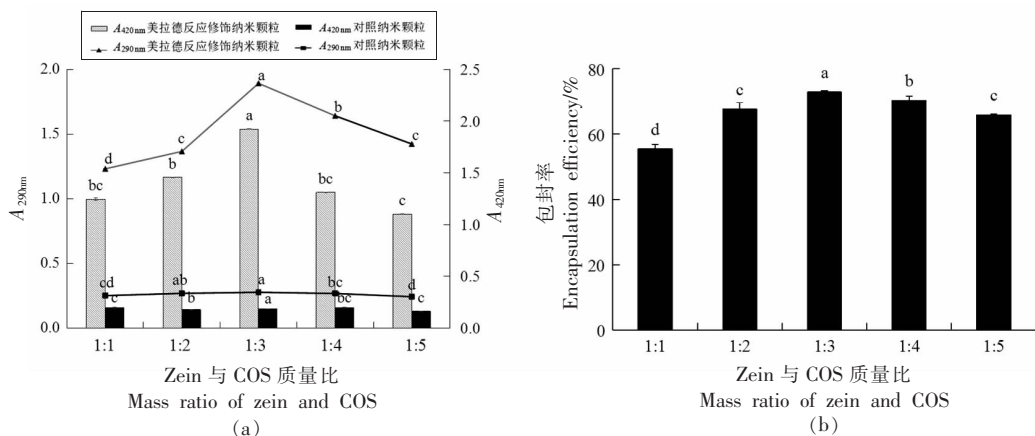
1.3.9 数据分析 试验数据均采用“平均值 \pm 标准偏差”表示。采用 Excel 2010 进行数据标准误差分析,SPSS 统计分析软件进行正交试验数据分析,结果通过 Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 糖基化修饰玉米醇溶蛋白负载叶黄素纳米粒(MDZ-LUT)制备条件优化

2.1.1 Zein 和 COS 质量比对 MDZ-LUT 纳米粒制备效果的影响 于波长 290 nm 和 420 nm 处测定吸光度的变化,能够反映玉米醇溶蛋白-壳寡糖之间的美拉德反应进程。如图 1 所示,Zein 和 COS 的质量比对美拉德反应程度影响较大,当两者的

质量比从 1:1 到 1:3 时,二者混合体系的 A_{290nm} 和 A_{420nm} 显著增加,随后开始降低。而随着二者比例的增大,MDZ-LUT 的包封率明显升高,当 Zein 和 COS 质量比为 1:3 时,叶黄素的包封率最高。说明 Zein 与 COS 的质量比会影响两者相互作用形成复合纳米颗粒包封效果。因此 Zein 与 COS 质量比为 1:3 时效果最佳。



注:不同小写字母表示各组之间存在显著差异($P<0.05$)。

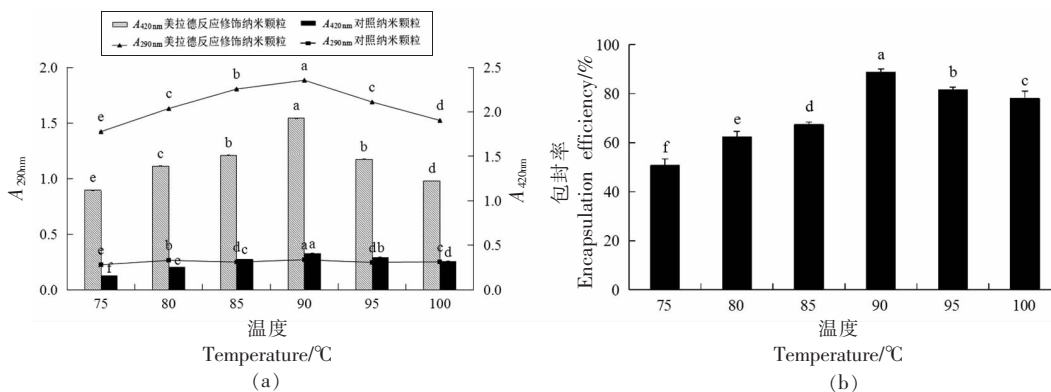
图 1 Zein 与 COS 质量比对美拉德反应程度(a)和 MDZ-LUT 纳米粒包封率(b)的影响

Fig.1 Effect of zein and COS mass ratio on degree of Maillard reaction (a) and encapsulation efficiency of MDZ-LUT nanoparticles (b)

2.1.2 温度对 MDZ-LUT 纳米粒制备效果的影响

如图 2 所示,随着温度的升高,对照组玉米醇溶蛋白与壳寡糖混合体系的 A_{290nm} 和 A_{420nm} 随之显著增加,包封率也随之提高,在 90 °C 时达到顶峰,这

也进一步证实了在高温条件下玉米醇溶蛋白与壳寡糖之间发生了褐变反应。在此温度条件下,对叶黄素的包封率最高,随后开始降低。综合美拉德反应程度来看,选择 90 °C 为最佳温度。



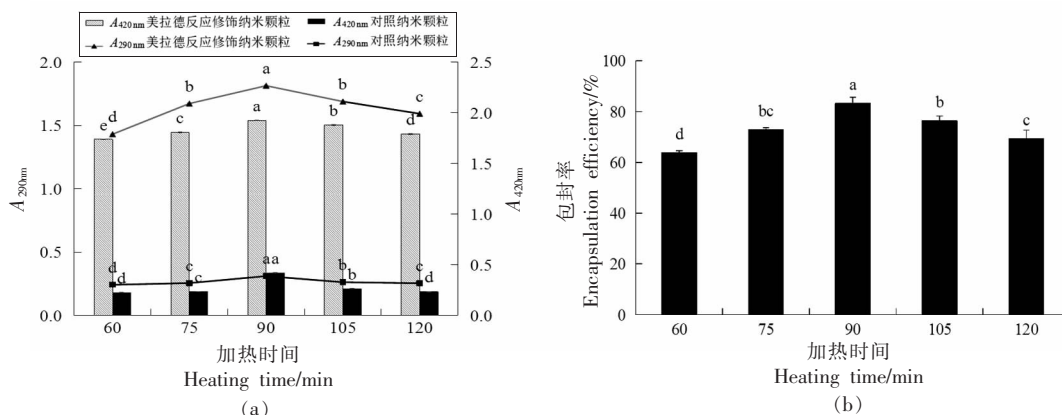
注:不同小写字母表示各组之间存在显著差异($P<0.05$)。

图 2 温度对美拉德反应程度(a)和 MDZ-LUT 纳米粒包封率(b)的影响

Fig.2 Effect of temperature on degree of Maillard reaction (a) and encapsulation efficiency of MDZ-LUT nanoparticles (b)

2.1.3 加热时间对 MDZ-LUT 纳米粒制备效果的影响 加热时间对美拉德反应程度和产物包封率的影响如图 3 所示,随着加热时间的延长,美拉德修饰的 Zein 纳米体系 A_{290nm} 和 A_{420nm} 都呈现出先上升后下降的趋势,并且都在 90~105 min 时美拉

德最终反应程度最高。叶黄素包封率在 90 min 时达到最大,随后下降。可能是加热时间过长,美拉德最终产物聚集,不利于与玉米醇溶蛋白的结合,导致包封率下降^[31]。因此选择 90 min 作为最佳加热时间。



注:不同小写字母表示各组之间存在显著差异($P<0.05$)。

图 3 加热时间对 Maillard 反应程度(a)和 MDZ-LUT 纳米粒包封率(b)的影响

Fig.3 Effect of heating time on degree of Maillard reaction (a) and encapsulation efficiency of MDZ-LUT nanoparticles (b)

2.2 响应面试验结果与分析

1) 回归模型的建立与分析 以温度(X_1)、加热时间(X_2)、Zein 和 COS 质量比(X_3)三因素为自

变量,叶黄素包封率(Y)为响应值进行 MDZ-LUT 制备的响应面试验,叶黄素包封率结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken test design and results

序号	X_1 (温度)/ °C	X_2 (加热时间)/ min	X_3 (Zein 与 COS 质量比)	包封率 (Y)/%	序号	X_1 (温度) /°C	X_2 (加热时 间)/min	X_3 (Zein 与 COS 质量比)	包封率 (Y)/%
1	90	105	1:4	55.47	10	95	90	1:4	52.59
2	85	90	1:4	48.52	11	90	90	1:3	83.30
3	85	75	1:3	53.16	12	95	75	1:3	61.85
4	95	105	1:3	67.65	13	85	105	1:3	66.65
5	90	90	1:3	84.30	14	85	90	1:2	59.42
6	90	105	1:2	66.18	15	90	75	1:2	58.95
7	95	90	1:2	71.69	16	90	75	1:4	58.38
8	90	90	1:3	86.04	17	90	90	1:3	87.90
9	90	90	1:3	82.30					

2) 模型的建立及分析 利用 SAS 9.0 对表 2 的试验数据进行方差及显著性分析,具体结果分析见表 3,并得到如下标准形式的三元二次回归方程:

$$Y=84.77+3.25X_1+2.95X_2-5.16X_3-1.92X_1X_2-$$

$$2.06X_1X_3-2.54X_2X_3-12.07X_1^2-10.38X_2^2-14.65X_3^2$$

由表 3 响应面试验分析结果可知,回归方程模型显著($P<0.05$),失拟项不显著($P>0.10$),说明试验结果与回归方程模型比较契合,响应面回归模型达到显著水平;模型常量 X_1 的 P 值在 0.01~

0.05 之间,具有显著性,而 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 的 $P < 0.01$,具有极显著差异;3 个因素中的 Zein 和 COS 质量比、温度对包封率响应值影响显著。回归分析结果显示: X_1 、 X_2 、 X_3 的 P 值大小顺序为 $X_2 > X_1 > X_3$,因此对响应值影响的强烈程度顺序为:Zein 和

COS 质量比>温度>加热时间。残差项各项数据分析表明,该模型失拟 $P=0.9642 > 0.05$ 不具有显著性;因此该二次方程能够较好地拟合真实的响应面。

表 3 响应面模型方差分析

Table 3 Variance analysis of response surface model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	2 619.42	9	291.05	20.95	0.0003	**
X_1	84.70	1	84.70	6.10	0.0429	*
X_2	69.68	1	69.68	5.02	0.0601	
X_3	213.00	1	213.00	15.33	0.0058	**
X_1X_2	14.78	1	14.78	1.06	0.3366	
X_1X_3	16.81	1	16.81	1.21	0.3077	
X_2X_3	25.70	1	25.70	1.85	0.2159	
X_1^2	612.93	1	612.93	44.12	0.0003	**
X_2^2	453.25	1	453.25	32.63	0.0007	**
X_3^2	903.40	1	903.40	65.03	0.0001	**
残差	97.24	7	13.89			
失拟	77.35	3	25.78	5.18	0.0729	
误差	19.89	4	4.97			
总和	2 716.66	16			$R^2=0.9642$	

注:*. 显著($0.01 < P \leq 0.05$);**. 极显著($P \leq 0.01$)。

3) 响应曲面分析与优化 为了考察影响 MDZ-LUT 制备的各个因素间的交互作用情况,采用 Design Exper 软件对回归模型进行降维分析,

得到交互因素响应曲面图和等高线图,如图 4 所示。

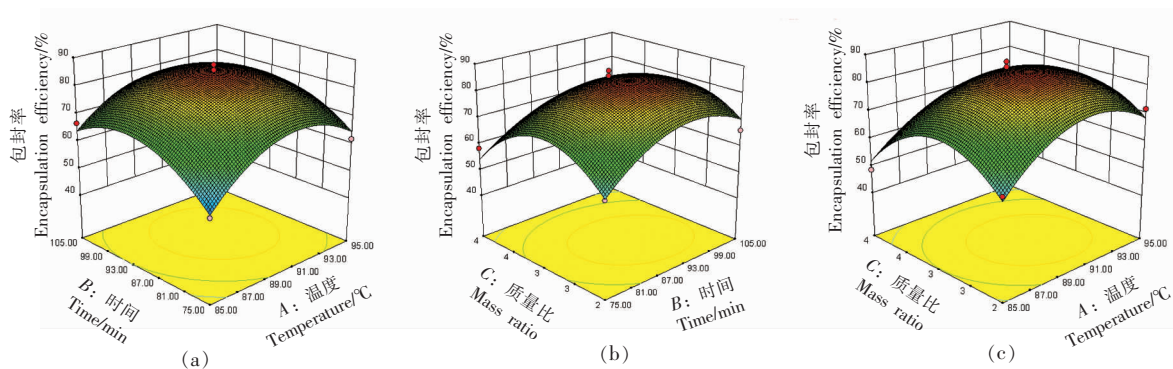


图 4 各因素对叶黄素包封率的交互作用

Fig.4 The interaction of various factors on the encapsulation efficiency of lutein

4) 最佳工艺参数的确定和验证 为确定美拉德修饰 Zein 负载叶黄素纳米粒的最佳制备工艺,利用 Design Expert 8.0 软件分析优化数据得到一个最大响应值(点),即 Zein 与 COS 质量比为 1:3,温度为 90.69 °C,加热时间为 92.30 min,此时

MDZ-LUT 对叶黄素的包封率为 88.65%。为了验证模型分析结果,在 Zein 与 COS 质量比为 1:3,温度为 91 °C,加热时间为 92.30 min 条件下进行 MDZ-LUT 纳米粒制备试验验证,结果显示叶黄素包封率为 $(88.79 \pm 0.37)\%$ ($n=3$),接近于响应面模

型的预测值。因此,可将 Zein 与 COS 质量比为 1:3,温度为 91 ℃,加热时间 92.30 min 作为 MDZ-LUT 制备的最佳工艺参数。

2.3 MDZ-LUT 纳米粒的粒径和电位分析

采用 Nano-Zs90 粒径分析仪测得 MDZ-LUT 的粒径分布图。MDZ-LUT 的粒径分布结果如图 5a 所示,MDZ 负载叶黄素纳米粒的平均粒径较小,随着 COS 修饰量增大,MDZ-LUT 粒径显著增加,MDZ-LUT 为 1:5,粒径达到最大值(382.60±9.00)nm。修饰后叶黄素纳米粒的多分散指数(PDI)呈先减小后增大的趋势,MDZ-LUT 为 1:3

达到最小值,PDI 为(0.145±0.02)<0.5,说明 MDZ-LUT 1:3 纳米粒分布区域比较窄且均匀,并且 MDZ 能够与叶黄素通过自组装作用而结合形成均一、稳定的纳米粒子结构。由图 5b 电位变化可知,随着壳寡糖的加入,MDZ-LUT 纳米粒的电位逐渐增加,这可能是因为 COS 属于带正电荷的阳离子多糖,经 COS 修饰 Zein 后,所制备的 MDZ-LUT 纳米粒体系的电位升高,证实了 COS 经过静电吸附作用与 Zein 结合形成纳米复合物,使得 Zein 纳米粒的载运与包埋性能显著提升^[32]。

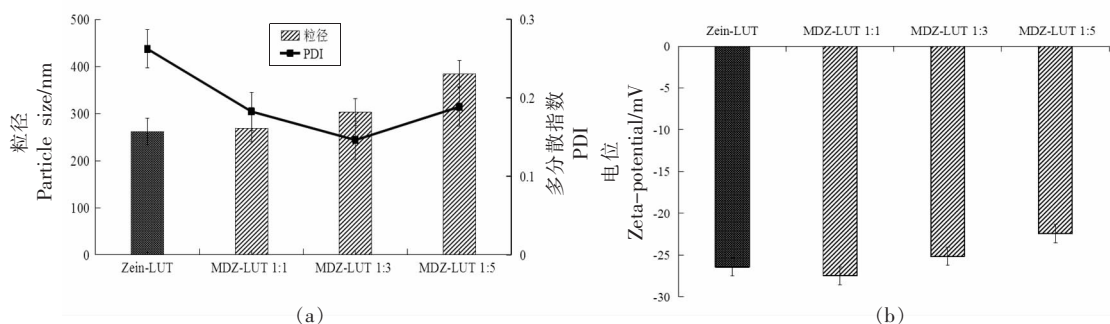


图 5 不同 Zein 与 COS 质量比的 MDZ-LUT 的粒径、PDI、电位分布

Fig.5 The particle size and PDI, zeta-potential of the MDZ-LUT nanoparticles at different mass ratios of zein and COS

2.4 透射电子显微镜(TEM)结果与分析

如图 6a 所示,Z-LUT 纳米颗粒呈球形,粒径小于 500 nm。在溶液体系中,Z-LUT 纳米颗粒大小不均一,对叶黄素包埋效果较差^[33]。而修饰后的 MDZ-LUT 纳米颗粒(图 6b)呈不规则球形,被糖基化壳寡糖包围,由于壳寡糖的交联,MDZ-LUT 的颗粒尺寸变大,这与粒径测定结果一致。通过壳寡糖对 MDZ-LUT 载体表面进行修饰,减少了玉米醇溶蛋白颗粒的聚集,增加了玉米蛋白与叶黄素的包埋运载能力。因此,糖基化玉米醇溶蛋白显示出较高的包封率和分散稳定性。

2.5 傅里叶红外光谱 FTIR 结果分析

采用红外光谱对叶黄素及其纳米粒的结构组成进行分析,结果如图 7 所示。叶黄素的红外光谱特征吸收主要有:在波数 2 957 cm^{-1} 处有 O-H 伸缩振动峰,在波数 2 918 cm^{-1} 和 2 848 cm^{-1} 处有 C-H 伸缩振动峰,在波数 1 719 cm^{-1} 处有 C=C 伸缩振动峰。壳寡糖的主要吸收峰有:在波数 3 416

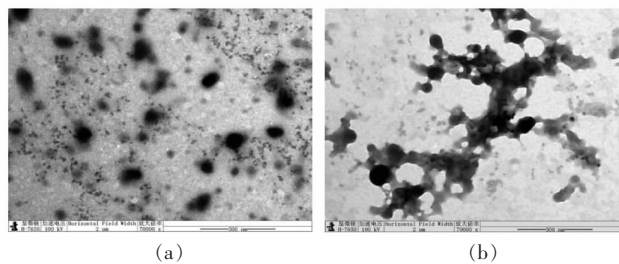


图 6 Z-LUT(a)和 MDZ-LUT(b)纳米粒的透射电镜图

Fig.6 TEM of Z-LUT (a) and MDZ-LUT (b) nanoparticles

cm^{-1} 处有 O-H 伸缩振动峰和 $-\text{NH}_2$ 伸缩振动的叠加吸收峰,在波数 1 025 cm^{-1} 处有 $-\text{CO}$ 伸缩振动的红外特征峰^[34-35]。叶黄素经过 MDZ 包埋后形成纳米粒子,Z-LUT 和 MDZ-LUT 中都有叶黄素官能团的红外特征光谱,证明所制备的 MDZ-LUT 纳米粒中有叶黄素的存在;而 MDZ-LUT 中含有 COS 吸收峰,进一步说明 COS 修饰后的 Zein 对叶黄素进行了有效包埋和负载,构成稳定的纳米复

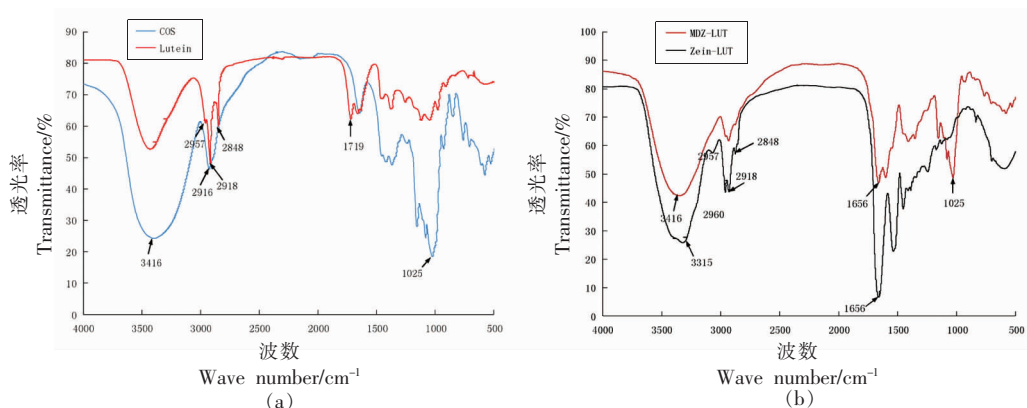


图 7 叶黄素、壳寡糖 (a)、Z-LUT 和 MDZ-LUT (b) 纳米粒的傅里叶红外光谱图
Fig.7 FTIR of lutein, COS (a), Z-LUT and MDZ-LUT nanoparticles (b)

合物体系。

2.6 叶黄素及叶黄素纳米粒的胃肠稳定性分析结果

如图 8 所示，游离叶黄素在模拟胃肠液中快速降解，在 1~6 h 随着时间的延长降解率增大，6 h 降解率达到了 58.91% 和 41.98%。而 Z-LUT 和 MDZ-LUT 纳米粒中叶黄素的降解率显著降低，在胃液中 MDZ-LUT 纳米粒中叶黄素的降解率最低，这说明美拉德法糖基化玉米醇溶蛋白负载叶

黄素纳米体系在模拟胃液中可对消化液中叶黄素起到保护作用，防止在酸性条件和各种酶的作用下快速降解和损失。在肠液中消化 2 h 后，Z-LUT 和 MDZ-LUT 降解率升高，可能是由于在肠液中释放出更多的叶黄素，MDZ-LUT 有更好的水溶性和易分散性，导致其叶黄素降解率略高于 Z-LUT，而二者纳米体系中的叶黄素降解率显著低于未封装的叶黄素。

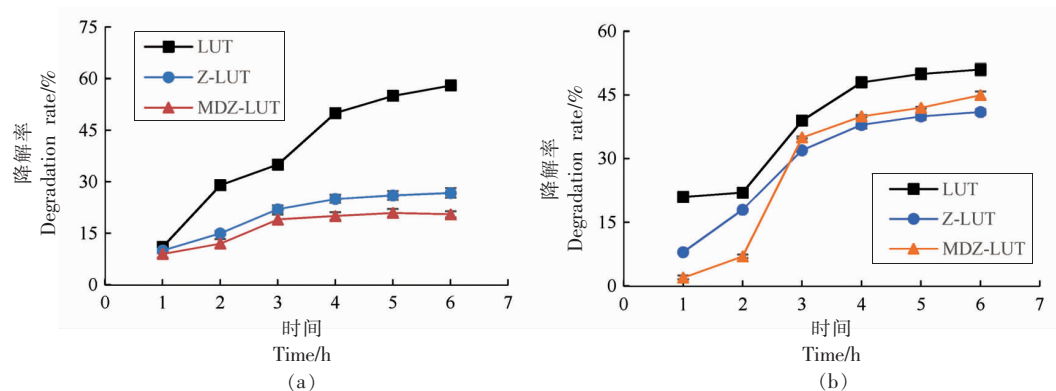
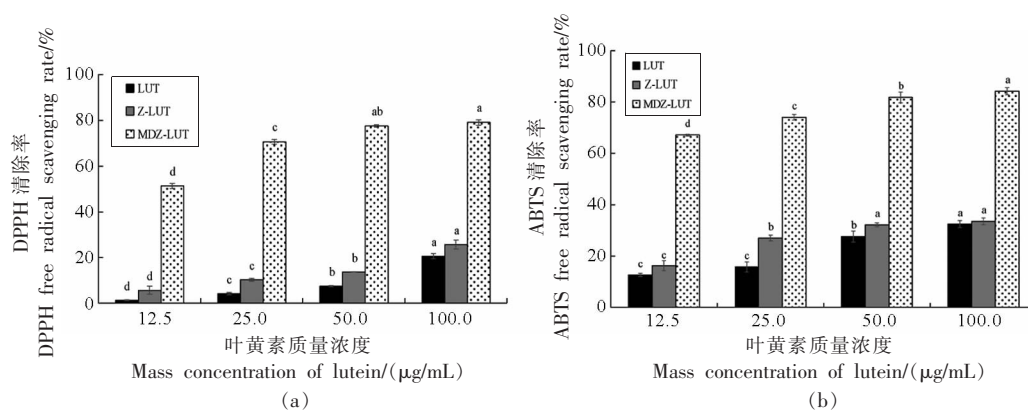


图 8 叶黄素及叶黄素纳米粒在模拟胃液 (a) 和肠液 (b) 中的降解率
Fig.8 Degradation rate of lutein and lutein nanoparticles in SGF (a) and SIF (b)

2.7 叶黄素及其纳米粒的抗氧化能力分析

叶黄素、Z-LUT 和 MDZ-LUT 的抗氧化效果如图 9 所示。结果显示，随着叶黄素质量浓度的增加，3 种形态叶黄素清除 DPPH 和 ABTS 自由基效果逐渐增强。当叶黄素质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，DPPH 和 ABTS 的清除能力分别达到 80% 以上，远高于游离叶黄素和 Z-LUT。原因可能是 MDZ-LUT

纳米颗粒中的叶黄素得到了很好的保护，防止了在制备和储存过程中游离叶黄素的损失。同时，玉米醇溶蛋白和 COS 的抗氧化性能提高了 MDZ-LUT 纳米颗粒的抗氧化活性。此外，糖基化纳米颗粒具有更好的释放性能，增强了纳米颗粒与自由基的接触和反应，从而显著增强了 MDZ-LUT 封装叶黄素的抗氧化活性。



注:不同小写字母表示各组之间存在显著差异($P<0.05$)。

图9 叶黄素及其纳米粒的DPPH(a)和ABTS(b)自由基清除率

Fig.9 DPPH (a) and ABTS (b) free radical scavenging rates of different lutein and nanoparticles

3 结论

本文研究了基于美拉德反应原理制备COS糖基化修饰的Zein对叶黄素的载运包埋作用,确定了Zein与COS的质量比为1:3,温度为91℃,加热时间为92.30 min条件下COS糖基化修饰的Zein对叶黄素最大包封率为(88.79±0.37)%。COS糖基化修饰显著改善了Zein负载叶黄素纳米粒的粒径分布和微观结构,增强了叶黄素的胃肠消化稳定性,减少了叶黄素在消化过程中的损失。此外,抗氧化结果也表明COS糖基化修饰的Zein能够显著提高其纳米粒的抗氧化性能,较好地保护叶黄素的生物活性,提高了叶黄素的生物利用率,拓展了以Zein为载体的叶黄素纳米粒的应用领域。因此,本研究证明了MDZ纳米颗粒可作为一种新型运载体对叶黄素进行传递与输送,为Zein的分子修饰和疏水性、功能性载体壁材的研究与开发提供参考。

参 考 文 献

- [1] 郭静, 胡坦, 潘思轶. 食品运载体包埋叶黄素的研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(1): 313-320.
GUO J, HU T, PAN S Y. Research progress of lutein embedding in food delivery systems[J]. Food Science, 2022, 43(1): 313-320.
- [2] PADMANABHA S, VALLIKANNAN B. Fatty acids modulate the efficacy of lutein in cataract prevention: Assessment of oxidative and inflammatory pa-

rameters in rats[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 500(20): 435-442.

- [3] BECERRA M O, CONTRERAS L M, LO M H, et al. Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 66: 1-12.
- [4] ARUNKUMAR R, PRASHANTH K V H, BASKARAN V. Promising interaction between nanoencapsulated lutein with low molecular weight chitosan: Characterization and bioavailability of lutein *in vitro*, and *in vivo*[J]. Food Chemistry, 2016, 141(1): 327-337.
- [5] LI H, YUAN Y K, ZHU J X, et al. Zein/soluble soybean polysaccharide composite nanoparticles for encapsulation and oral delivery of lutein[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103: 1-10.
- [6] MAHALAKSHMI L, LEENA M M, MOSES J A, et al. Micro- and nano-encapsulation of β -carotene in zein protein: Size-dependent release and absorption behavior[J]. Food & Function, 2020, 11(2): 1647-1660.
- [7] MA M J, YUAN Y K, YANG S, et al. Fabrication and characterization of zein/tea saponin composite nanoparticles as delivery vehicles of lutein[J]. LWT, 2020, 125: 1-7.
- [8] CHANG D, MA Y, CAO G, et al. Improved oral bioavailability for lutein by nanocrystal technology: Formulation development, *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2018, 46(5): 1018-1024.

- [9] ZHANG Y Q, KONG L Y, TAN L B. Effectiveness of nanoscale delivery systems on improving the bioavailability of lutein in rodent models: A systematic review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 62(9): 1–16.
- [10] TORAGALL V, JAYAPALA N, VALLIKANNAN B. Chitosan-oleic acid-sodium alginate a hybrid nanocarrier as an efficient delivery system for enhancement of lutein stability and bioavailability[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 578–594.
- [11] DAVIDOV-PARDO G, PEREZ-CIORDIA S, MARIN-ARROYO M R, et al. Improving resveratrol bioaccessibility using biopolymer nanoparticles and complexes: Impact of protein-carbohydrate Maillard conjugation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(15): 3915–3923.
- [12] YI J, FAN Y T, ZHANG Y Z, et al. Glycosylated α -lactalbumin-based nanocomplex for curcumin: Physicochemical stability and DPPH-scavenging activity[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61: 369–377.
- [13] FAN Y T, YI J, ZHANG Y Z, et al. Fabrication of curcumin-loaded bovine serum albumin (BSA)-dextran nanoparticles and the cellular antioxidant activity[J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 1210–1218.
- [14] 王梓郡, 刘慧慧, 麻志刚, 等. 糖基化 β -伴大豆球蛋白负载提高姜黄素抗氧化及缓释特性[J]. *食品科学*, 2023, 44(8): 23–29.
- WANG Z J, LIU H H, MA Z G, et al. Glycosylated β -combined with daidzein enhanced the antioxidant and slow-release properties of curcumin[J]. *Food Science*, 2023, 44(8): 23–29.
- [15] ZHU B Y, HOU T, HE H. Calcium-binding casein phosphopeptides-loaded chitosan oligosaccharides core-shell microparticles for controlled calcium delivery: Fabrication, characterization, and *in vivo* release studies[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 1347–1355.
- [16] 吕凤娇, 蔡菊虹, 宋婧雯, 等. 黄芩苷壳寡糖纳米粒的制备及其对 MCF-7 乳腺癌细胞的抑制作用研究[J]. *中国药学杂志*, 2023, 58(8): 708–716.
- LÜ F J, CAI J H, SONG J W, et al. Preparation of baicalin-chitosan oligosaccharide-nanoparticles and its inhibitory effect on MCF-7 breast cancer cells[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2023, 58(8): 708–716.
- [17] GU F L, ABBAS S, ZHANG X M. Optimization of Maillard reaction products from casein-glucose using response surface methodology[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2009, 42(8): 1374–1379.
- [18] JIAO Y, ZHENG X Q, CHANG Y, et al. Zein derived peptides as nanocarriers to increase the water solubility and stability of lutein[J]. *Food & Function*, 2018, 9(1): 117–123.
- [19] 郑炆凡, 陈艺焯, 陈娟, 等. 壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物的制备及对斑马鱼胚胎生长发育的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(10): 210–220.
- ZHENG Y F, CHEN Y X, CHEN J, et al. Preparation of conjugates of chitosan and krill oil nano-liposomes and their effects on embryonic growth and development of zebrafish[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(10): 210–220.
- [20] HAN H, JIAO Y, CHANG Y, et al. Glycosylation of zein hydrolysate as a nanocarrier for lutein delivery: Preparation and stability[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 905059.
- [21] CHUACHAREN T, SABLIOV C M. Zein nanoparticles as delivery systems for covalently linked and physically entrapped folic acid[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2017, 19(81): 1–12.
- [22] 冯欣. 基于玉米醇溶蛋白-EGCG 复合物的纳米颗粒水相制备及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- FENG X. Preparation and application of nanoparticles in aqueous phase based on zein albumin-EGCG complex[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [23] 田少君, 张贝贝, 王蕾, 等. 亚麻籽油前体脂质体稳定性及释放性能研究[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34(4): 92–99.
- TIAN S J, ZHANG B B, WANG L, et al. Study on stability and release property of liposome of linseed oil precursor[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oil Association*, 2019, 34(4): 92–99.
- [24] SUN G Z, YANG Q C, ZHANG A C, et al. Synergistic effect of the combined bio-fungicides ϵ -poly-L-lysine and chitooligosaccharide in controlling grey mould (*Botrytis cinerea*) in tomatoes[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 276: 46–53.
- [25] CHANG C, WANG T R, HU Q B, et al. Pectin coating improves physicochemical properties of caseinate/zein nanoparticles as oral delivery vehicles

- for curcumin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 70: 143–151.
- [26] JIAO Y, HAN H, CHANG Y, et al. Improvement in entrapment efficiency and *in vitro* digestion stability of lutein by zein nanocarriers with pepsin hydrolysis[J]. *Journal of Food Quality*, 2020, 2020: 1–9.
- [27] GUAN Y, WU J, ZHONG Q. Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene[J]. *Food Chemistry*, 2016, 194(1): 787–796.
- [28] MENG R, WU Z, XIE Q T, et al. Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: Physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties[J]. *Food Chemistry*, 2021, 340: 1–8.
- [29] 郭建峰, 郗浩然, 胡培毅, 等. 沙棘籽粕低聚原花青素的制备及结构与抗氧化活性分析[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(6): 232–245.
- GUO J F, QIE H R, HU P Y, et al. Preparation of oligomeric proanthocyanidins from seabuckthorn seed meal and analysis of structure and antioxidant activity[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(6): 232–245.
- [30] DEGHIMA A, RIGHI N, ROSALES-CONRADO N, et al. Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots: Quantification, identification and antioxidant activity [J]. *South African Journal of Botany*, 2020, 132: 204–214.
- [31] DAVIDOV-PARDO G, JOYE I J, ESPINAL-RUIZ M, et al. Effect of Maillard conjugates on the physical stability of zein nanoparticles prepared by liquid antisolvent coprecipitation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(38): 8510–8518.
- [32] 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.
- XU X E, LI J, CHEN Z X. Construction and characterization of zein nanoparticles loaded with tocopherol[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(12): 24–30.
- [33] CHUACHAROEN T, SABLIOV C M. Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticles with and without lecithin and pluronic F127 surfactants [J]. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016, 503: 11–18.
- [34] PALUSZKIEWICZ C, STODOLAK E, HASIK M, et al. FT-IR study of montmorillonite-chitosan nanocomposite materials[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, 79(4): 784–788.
- [35] JIAO Y, SHI L, LI D J, et al. Lutein-loaded glycosylated zein nanoparticles—preparation, characterization, and stability in functional drink[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2023, 187: 1–10.

Preparation of Lutein Nanoparticles with Zein Maillard Products and Their Characterization

CHANG Ying, SHI Lei, JIAO Yan*, CHEN Haodong, ZHAO Lihong, HAN He
(College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang)

Abstract Lutein is a carotenoid which has high antioxidant activity and remarkable protection function on the eye. Unfortunately, it is difficult to play the role as an effective functional component because of its instability, poor solubility in water, and low intestinal absorption rate. In this work, zein was glycosylated with chitosan oligosaccharide by the Maillard reaction to prepare zein/chitosan oligosaccharide (COS) conjugates (MDZ) to improve the encapsulation and delivery properties to lutein. Optimum preparation process conditions and characterization of lutein-loaded MDZ nanoparticles (MDZ-LUT) were investigated. The results revealed that the optimal preparation conditions were: the mass concentration of lutein was 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the mass ratio of zein to COS was 1:3, temperature was 91 $^{\circ}\text{C}$, and the time was 92.30 min, the encapsulation rate of MDZ-LUT reached (88.79 \pm 0.37)%. The MDZ-LUT had a smaller particle size (310.73 \pm 5.31) nm, and better polydispersity (polydispersion index PDI 0.23 \pm 0.02). The results of FTIR suggested that lutein could be

combined and encapsulated better by Maillard-modified zein. Furthermore, the simulated gastrointestinal digestion and antioxidant results showed that the digestive stability and free radical scavenging activity capacity of lutein in MDZ-LUT increased significantly. These findings indicated that the zein/COS nanoparticles obtained by the Maillard reaction might be an efficient and promising delivery system to encapsulate and protect bioactive lutein compounds.

Keywords Maillard reaction; glycosylated zein; lutein nanoparticles; structure and characterization