

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.12.037

不同均质次数 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子结构与性质研究

王喜波 陈爽 孙立娜 江连洲

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为了提高维生素 D₃ 的光稳定性, 采用高压均质技术制备大豆分离蛋白(SPI)-维生素 D₃ 纳米粒子, 研究了均质次数对 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子中 SPI 结构和维生素 D₃ 光稳定性的影响。结果表明: 与对照样品相比, 高压均质 2 次时, SPI-维生素 D₃ 纳米粒子负载率提高了 27.7%, 平均粒径由 145.20 nm 减小至 82.00 nm, 浊度逐渐减小, 粒径分布更均一; SPI-维生素 D₃ 纳米粒子中 SPI 的表面疏水性增大, 内源荧光光谱荧光强度增强; 傅里叶红外光谱结果显示, 高压均质后 SPI-维生素 D₃ 纳米复合物的二级结构发生改变, 当均质次数不超过 2 次时, α -螺旋和 β -折叠逐渐转变成 β -转角, 均质次数为 3、4 次时, 样品发生了不溶性聚集; 经过 2 次高压均质处理后, 样品中维生素 D₃ 的光稳定性显著提高, 与对照样品相比, 紫外线照射 4 h 后维生素 D₃ 的质量分数提高了 166.6%。本研究表明, 采用高压均质技术制备 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子是提高维生素 D₃ 光稳定性的有效方法。

关键词: 均质次数; 大豆分离蛋白; 维生素 D₃; 纳米粒子; 光稳定性

中图分类号: TS201 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)12-0341-07

OSID:



Structure and Properties of Soy Protein Isolate – Vitamin D₃ Nano-particles Complex under Different Homogenization Times

WANG Xibo CHEN Shuang SUN Li'na JIANG Lianzhou

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to improve the light stability of vitamin D₃ (VD₃), the soy protein isolate-vitamin (SPI – VD₃) nano-particles were prepared by high pressure homogenization. The influences of homogenization times on the SPI structure and VD₃ light stability in SPI – VD₃ nano-particles were investigated. The results showed that when the times of high pressure homogenization was 2, compared with the sample without high pressure homogenization, the loading efficiency of SPI – VD₃ nano-particles was increased to 27.7%; the average particle size was reduced from 145.20 nm to 82.00 nm, the turbidity was gradually decreased and the particle size distribution was more uniform. Two times high-pressure homogenization can increase the hydrophobicity of the surface of the SPI – VD₃ nano-particles and enhance the fluorescence intensity of the endogenous fluorescence spectrum. The results of Fourier transform infrared spectroscopy showed that the secondary structure of SPI – VD₃ nano-particles was changed after high pressure homogenization. When the number of homogenization times did not exceed 2, α -helix and β -fold were gradually changed into β -turn. When the number of times were 3 or 4, the sample may undergo insoluble aggregation. After twice high-pressure homogenization, the photostability of VD₃ in the sample was also improved. Compared with the VD₃ control alone, the remaining amount of VD₃ was increased to 166.6% after four hours of UV irradiation. Proper high-pressure homogenization was a useful method for making SPI – VD₃ nano-particles with improved VD₃ photostability.

Key words: homogenization times; soy protein isolate; vitamin D₃; nano-particles; photostability

0 引言

维生素 D 是人体必需的微量营养素, 具有促进

细胞生长、分化和对钙、磷的吸收等重要作用, 还与某些肿瘤、自身免疫性疾病等有关^[1-2]。维生素 D₃ 是维生素 D 的 7-位脱氢胆固醇 (7-dehydroch-

收稿日期: 2019-12-29 修回日期: 2020-02-23

基金项目: 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2019ZX08B01) 和国家大豆产业技术体系项目(CARS-04-PS28)

作者简介: 王喜波(1975—), 男, 教授, 博士, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: wangxibo@neau.edu.cn

olesterol, pro-vitamin D)的一种结构形态,在人体内经不同羟基化后,代谢为1,25-二羟胆钙化醇(维生素D₃的生物活性形式)。维生素D是人体最易缺乏的维生素之一,且这种现象在全球范围内普遍存在^[3-4]。维生素D₃水溶性差^[5],对光照敏感,氧、酸性条件,脂肪酸败等都影响其稳定性,因此,维生素D₃的利用受到限制。

大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)可以用作生物活性成分的输送载体,但由于SPI的疏水基团绝大部分深埋在内部,且结构较紧密,所以与生物活性成分小分子的结合能力有限。文献[6]研究发现,乳清蛋白的三级结构在适度加热的条件下发生改变,结构更加延展,增强了与小分子物质间的相互作用。文献[7]用超声制备了粒径分布窄小、具有缓释功能的酪蛋白-β-胡萝卜素纳米颗粒,有效提高了β-胡萝卜素的稳定性。高压均质技术在食品、医药和化妆品等领域已被广泛应用^[8],适当的高压均质处理能显著改善球蛋白的表面疏水性、溶解性、乳化性、柔性及抗氧化性等加工特性^[9-11]。在食品行业,高压均质主要应用于乳液制备方面,如文献[12]采用高压均质制备乳清蛋白乳液,发现高压处理可以改变蛋白界面层的结构,同时改变乳液粒径,增强蛋白质在界面上的吸附性和蛋白质在界面上的相互作用效果,从而有助于形成比较紧密的界面层和稳定性强的乳状液。但采用高压均质制备SPI-维生素D₃纳米粒子的研究却鲜有报道,本文研究高压均质次数对SPI-维生素D₃纳米粒子结构及性质的影响,以期开发高活性维生素D₃产品提供技术和理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料试剂与仪器设备

维生素D₃,纯度99%以上,购自Sigma-Aldrich官网。低温脱脂豆粕,购自山东禹王实业有限公司。甲醇,上海安谱试验科技股份有限公司;1-苯胺基-8-萘磺酸盐(ANS),天津北科化学品有限责任公司;试验中所用试剂均为分析纯。

AVP-2000型高压均质机,英国Stansted Fluid Power公司;79-1型磁力加热搅拌器,金坛市双捷试验仪器厂;FTIR-8400S型傅里叶变换红外光谱仪,日本岛津公司;Mastersizer 2000型激光粒径分析仪,英国Malvern公司;U3000型高效液相色谱仪,美国Thermo公司。

1.2 试验方法

1.2.1 SPI-维生素D₃纳米复合物制备

为避免维生素D₃降解,以下操作均在避光条件

下进行。称取一定维生素D₃粉末溶于无水乙醇,并磁力搅拌以保证其完全溶于乙醇,置于棕色瓶中备用。每次试验前需重新配制维生素D₃溶液。

将文献[13]描述的方法略做改动制备SPI,将SPI粉末溶于磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH值7.0)配制成4 mg/mL的SPI溶液,按照SPI与维生素D₃质量比10:1将维生素D₃溶液加入到SPI溶液中,室温(20℃)下避光磁力搅拌1 h以制备SPI-维生素D₃复合体系,在100 MPa下均质1~4次,得到不同均质次数的SPI-维生素D₃纳米复合物。

1.2.2 粒径和ζ-电位测定

用0.01 mol/L pH值7.0磷酸盐缓冲液将制备的不同均质次数的纳米复合物稀释至蛋白质量浓度为1 mg/mL,用Mastersizer 2000型纳米粒径仪检测纳米颗粒的粒径、多分散性指数和ζ-电位,测定温度为25℃,样品平衡时间为2 min。

1.2.3 维生素D₃标准曲线绘制

准确称取维生素D₃标准品50 mg溶于甲醇并定容至50 mL,配制成1 mg/mL的维生素D₃甲醇溶液,再用甲醇将其分别稀释至质量浓度为0.5、0.25、0.01、0.001 mg/mL的标液,将各质量浓度的标液过0.22 μm有机系滤膜,采用高效液相色谱进样分析,以各标液的质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。高效液相色谱分析参数参照文献[14]的方法,高效液相色谱检测器为紫外检测器,波长为265 nm,所用色谱柱为C18液相柱,检测时,柱温为25℃,流动相为甲醇(100%),流速为1 mL/min。

1.2.4 维生素D₃包封率和负载率测定

包封率和负载率的测定参照文献[15]的方法并略做改动。将10 mg冻干样品用5 mL甲醇进行淋洗,然后用Whatman No 1型滤纸过滤,重复2~4次,将滤液合并,然后将滤液过0.22 μm有机系滤膜后用高效液相色谱测定其中维生素D₃含量(未结合维生素D₃含量),将过滤后的粉末冻干并称量。样品包封率和负载率计算公式为

$$E = \left(1 - \frac{m_2}{m_1}\right) \times 100\% \quad (1)$$

$$L = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100\% \quad (2)$$

式中 E ——包封率, %

L ——负载率, %

m_1 ——加入维生素D₃的质量, mg

m_2 ——未与SPI结合的维生素D₃质量, mg

m_3 ——SPI质量, mg

1.2.5 浊度测定

参照文献[14]的方法并稍做修改,将各样品在紫外-可见分光光度计 600 nm 波长下测定其吸光度,所得 OD 值用来表示浊度,用去离子水作为空白。

1.2.6 表面疏水性测定

参照文献[16]的方法,并略做改动。用磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L, pH 值 7.0)将样品溶液稀释到 1、0.2、0.04、0.008 mg/mL,然后加入 20 μL 的 ANS (8 mmol/L,溶于 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液, pH 值 7.0)荧光探针,混合均匀后在室温下进行避光处理,15 min 后测定各样品的荧光强度,设定激发波长为 390 nm,发射波长为 470 nm,狭缝宽度 5 nm,以测得荧光强度为纵坐标,以蛋白溶液质量浓度为横坐标,选择线性关系良好的回归线的斜率作为蛋白质表面疏水性指数。

1.2.7 内源荧光光谱测定

内源荧光光谱测定参照文献[17]的方法,并略做改动,将各样品分别稀释至蛋白质量浓度 0.5 mg/mL,设定激发波长为 290 nm,发射波长范围为 300~400 nm,狭缝宽度为 2.5 nm,电压 700 mV,进行内源荧光光谱扫描。

1.2.8 傅里叶红外光谱分析

将 1 mg 冷冻干燥后的样品与 150 mg KBr 粉末混合研磨,然后将混合粉末压制成固体薄片^[18],使用 FTIR-8400S 型红外光谱仪进行全波段(4 000~400 cm⁻¹)扫描,设置分辨率为 4 cm⁻¹,扫描次数为 32 次。采用 PeakFit 4.12 软件进行拟合分析,通过酰胺 I 区的反卷积算法计算不同蛋白样品中 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲成分的含量。

1.2.9 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子的光稳定性

称取 4 mg 维生素 D₃ 溶于 10 mL 去离子水中,取 10 mL 不同均质次数的样品,分别置于直径 90 mm 的培养皿中,按以上方法每个样品制备 9 个,将其水平放置,用 15 W 的紫外灯近距离(20 cm)照射,每隔 30 min 取样一次,每个样品取出一个培养皿,每个培养皿取出 0.5 mL 样品,测定其中维生素 D₃ 含量。

1.3 数据分析

所有试验重复 3 次取平均值,采用 SPSS 19.0 进行数据处理和方差分析(ANOVA),使用 Origin 8.6 软件制图,PeakFit 4.12 软件计算蛋白二级结构。所有结果均以平均值 ± 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 纳米粒子粒径、多分散性指数和 ζ-电位

如图 1 所示,经过高压均质处理后,SPI 的平均

粒径显著下降($P < 0.05$),均在 100 nm 以下,平均粒径由 384.33 nm 减小至 84.77 nm(表 1),同时随着均质次数的增加粒径分布逐渐由双峰分布转变为单峰分布,粒径分布更加均匀。样品在经历高压均质的过程中,在一定的压力下,流体被迫通过一些微米孔,流体在通过非常短的距离期间加速到非常高的速度,在经受空化、剪切和湍流等作用下,蛋白结构被破坏,其产生随机破裂,解离或解聚,导致粒径减小^[19-21]。在高压均质处理次数为 1~4 次的过程中,随着均质次数的增加,样品的平均粒径逐渐减小,在均质次数为 2 次时,平均粒径最小,为 84.77 nm,当均质次数继续增加时,平均粒径和多分散性指数(PDI)均略有增大,但不显著($P > 0.05$)。该结果可能由于样品被高压均质次数过多,反复经受物理作用,导致蛋白质重新聚合,粒径增大^[22]。

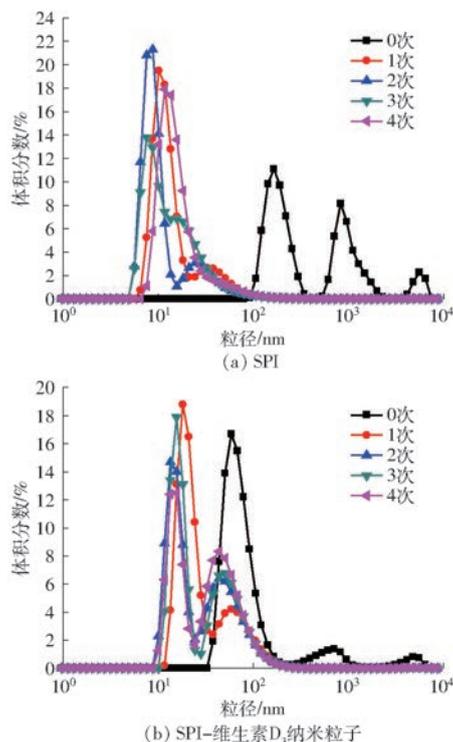


图 1 均质次数对 SPI 及 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子粒径分布的影响

Fig.1 Effect of high pressures homogenization times on particle size distribution of SPI and SPI-VD₃ nano-particles

SPI-维生素 D₃ 纳米粒子在经历 0~4 次高压均质处理后,粒径变化趋势与 SPI 经受高压均质后粒径变化相同,平均粒径由 145.20 nm 减小至 82.00 nm。在经受相同次数的高压均质条件下,SPI-维生素 D₃ 纳米粒子与 SPI 相比有更小的粒径,这也说明维生素 D₃ 与 SPI 相互作用后使复合物结合更加紧密。

由表 1 可知,SPI 与 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子均带负电荷,有效的表面电荷主要决定悬浮颗粒

的分散和聚集,更多的表面负电荷使颗粒之间的静电排斥增强,可以使胶体聚集体破坏并防止进一步聚集^[23-24]。样品经受高压均质处理后,电位

的绝对值略有减小,当高压均质3次和4次后,电位的绝对值显著减小,该结果可归因于蛋白变性和聚集的形成。

表1 均质次数对 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子粒径、PDI、 ζ -电位的影响

Tab.1 Effect of high pressure homogenization times on particle size, PDI, ζ -potential of SPI-VD₃ nano-particles

均质次数	SPI			SPI-维生素 D ₃ 纳米粒子		
	平均粒径/nm	多分散性指数	ζ -电位/mV	平均粒径/nm	多分散性指数	ζ -电位/mV
0	(384.33 ± 31.07) ^a	(0.800 ± 0.128) ^a	(-19.60 ± 1.21) ^a	(145.20 ± 2.70) ^a	(0.585 ± 0.018) ^a	(-20.37 ± 0.87) ^a
1	(90.88 ± 2.62) ^b	(0.390 ± 0.042) ^c	(-18.77 ± 1.37) ^b	(85.53 ± 1.40) ^b	(0.214 ± 0.016) ^b	(-18.93 ± 0.60) ^b
2	(84.77 ± 1.91) ^c	(0.423 ± 0.016) ^b	(-15.57 ± 0.15) ^c	(82.00 ± 0.84) ^c	(0.235 ± 0.008) ^b	(-18.30 ± 0.58) ^b
3	(85.31 ± 2.69) ^c	(0.471 ± 0.008) ^b	(-14.50 ± 0.36) ^{cd}	(82.30 ± 0.96) ^{bc}	(0.237 ± 0.014) ^b	(-16.83 ± 0.80) ^c
4	(85.25 ± 0.24) ^c	(0.454 ± 0.015) ^b	(-13.36 ± 0.67) ^d	(82.47 ± 0.53) ^{bc}	(0.250 ± 0.013) ^b	(-15.63 ± 1.10) ^d

注:同一列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 纳米粒子负载率和包封率

在 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子制备过程中,许多参数都会影响 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子的性质和负载率和包封率,表2中体现了均质次数对负载率和包封率的影响。未经高压均质处理的 SPI-维生素 D₃ 样品的负载率为 62.00%,包封率为 6.20%,即维生素 D₃ 负载量可达到 62.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$,均质压力为 100 MPa、均质次数为 2 次时,负载率和包封率显著提高,负载率达到 79.21%,包封率达到 7.92%,与未均质样品相比提高了 27.7%,这归因于微通道中剪切、撞击和空化等作用使 SPI 表面疏水性变化从而使更多的维生素 D₃ 可以和 SPI 疏水基团发生作用^[25]。文献[26]指出氢键和

弱分子间作用力可以在均质作用下断裂从而导致蛋白质分子结构的变化,暴露出更多疏水基团,与本试验结果一致。当均质次数达到 3 次后包封率和负载率均有所下降。本团队在之前的研究中发现 SPI 与维生素 D₃ 结合为非共价结合,主要作用力为疏水相互作用和静电相互作用^[27],均质次数较多时,强的剪切、湍流等作用对已经结合的 SPI-维生素 D₃ 的非共价键产生了破坏。在高压均质过程中,一方面改变 SPI 的结构,提高其与维生素 D₃ 的相互作用,另一方面,过强的高压均质破坏 SPI 与维生素 D₃ 之间的非共价键而不利二者结合。文献[28]在研究高压均质压力对 SPI-维生素 D₃ 纳米复合物影响时得到了同样的结论。

表2 均质次数对 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子负载率和包封率的影响

Tab.2 Effect of high pressure homogenization times on EE and LE of SPI-VD₃ nano-particles

参数	均质次数				
	0	1	2	3	4
负载率	(62.00 ± 0.45) ^a	(77.81 ± 0.39) ^d	(79.21 ± 0.59) ^e	(72.09 ± 0.67) ^c	(69.49 ± 0.27) ^b
包封率	(6.20 ± 0.05) ^a	(7.78 ± 0.04) ^d	(7.92 ± 0.06) ^e	(7.21 ± 0.07) ^c	(6.95 ± 0.03) ^b

注:同一行数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 纳米粒子浊度

由图2(图中相同参数不同字母表示差异显著,下同)可见,由于未均质的 SPI 样品和 SPI-维生素 D₃ 体系中存在大量沉积在底部的高分子聚合物,导致体系浊度较大;经过高压均质的强剪切力和空化的作用力后,大的蛋白聚集体分散成小的亚基,使溶液中小聚集体数量增多,进而使浊度减小,该结果也可能与蛋白的溶解度有关,高压均质改变蛋白结构,增大其在水中的溶解性,从而使浊度减小。文献[14]研究发现未被处理的 SPI 溶液呈现低溶解度、高浊度,经过超声空化作用处理后蛋白溶解性显著提高,浊度降低。当均质 3、4 次时,浊度不再减小,反而略有提高,这可能是由于解离的小分子重新

聚集。

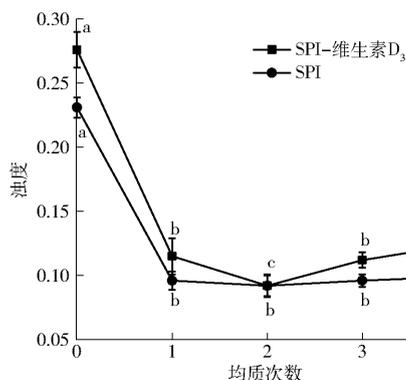


图2 均质次数对 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子浊度的影响

Fig.2 Effect of high pressure homogenization times on turbidity of SPI-VD₃ nano-particles

2.4 纳米粒子表面疏水性

图 3 显示了 SPI 与 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子经过不同次数高压均质处理后的表面疏水性的变化。均质 0~3 次时, SPI 的表面疏水性指数显著提高 ($P < 0.05$), 由 1 134.8 增大到 1 537.2。该现象主要是由于高压均质可以对蛋白的大聚集体进行破坏, 使蛋白结构更加伸展, 深埋在内部的疏水基团暴露于外部^[29]。SPI-维生素 D₃ 的表面疏水性指数也随高压均质次数增大呈现出增大的趋势, 但其表面疏水性指数均低于单纯的 SPI, 该结果可能因为维生素 D₃ 与蛋白疏水基团相互作用使表面疏水性降低, 文献[30]研究维生素 D₃ 与 β -乳球蛋白相互作用时指出维生素 D₃ 可能通过蛋白表面的疏水基团与其结合。适当的均质次数可以有效地增大样品的表面疏水性, 而次数过多可能会使已经打开的蛋白结构重新聚合, 由图 3 可知, 当均质次数为 3 次和 4 次时, 高压均质已经不再显著改善表面疏水性, 反而可能对蛋白产生了不利的影响。蛋白质-生物活性成分纳米复合物是基于蛋白质与(难溶)生物活性物质之间的疏水相互作用而构建的纳米输送载体, 疏水作用是一种熵驱动的自发过程, 活性物质与蛋白的疏水位点接触的可能性是两者相互作用发生的关键, 本试验采用高压均质法改变蛋白表面疏水性进而提高负载量。

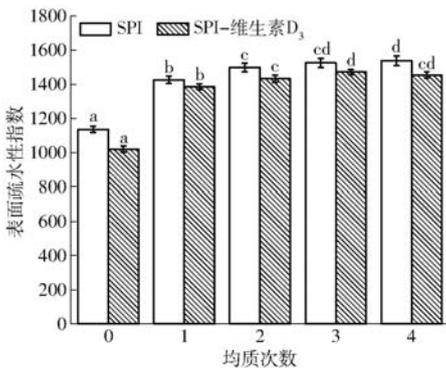


图 3 均质次数对 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子表面疏水性指数的影响

Fig. 3 Effect of high pressure homogenization times on surface hydrophobicity of SPI-VD₃ nano-particles

2.5 纳米粒子内源荧光光谱

固定激发波长 290 nm, 扫描不同均质次数处理后样品的内源荧光光谱。从图 4 可以看出, 与未经高压均质处理的样品相比, 样品经高压处理后, 荧光强度明显增强, 更多的色氨酸残基被暴露。荧光强度与均质次数不完全呈正相关关系, 高压均质使荧光强度增强, 而维生素 D₃ 的存在可能使蛋白结构改变, 发色基团色氨酸的微环境发生变化, 进而改变其对荧光的敏感程度, 使荧光强度降低。当内部色氨

酸被其他构象遮蔽时也会使蛋白荧光发生猝灭^[31]。

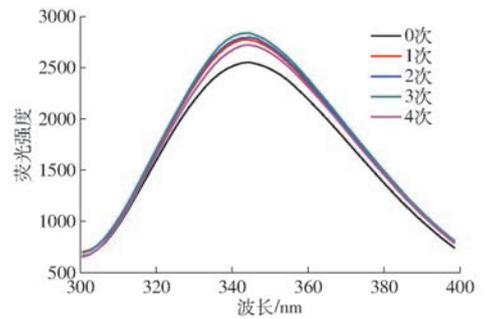


图 4 均质次数对 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子内源荧光光谱的影响

Fig. 4 Effect of high pressure homogenization times on surface fluorescence spectroscopy of SPI-VD₃ nano-particles

2.6 纳米粒子傅里叶红外光谱

图 5 显示了经历不同次数高压均质处理的 SPI-维生素 D₃ 样品的傅里叶红外光谱图, 蛋白质的红外光谱图有 3 组特征吸收谱区: 酰胺 I 区、酰胺 II 区和酰胺 III 区, 波长范围分别为 1 600~1 700 cm⁻¹、1 530~1 550 cm⁻¹ 和 1 260~1 300 cm⁻¹。酰胺 I 区主要是由 C=O 伸缩振动引起的, 该峰对蛋白的二级结构相当敏感^[32]。随着均质次数增加, 在酰胺 I 区、酰胺 II 区的峰均明显增高, 表明 SPI 的结构发生了改变。如表 3 所示, 经过高压均质处理 4 次后的 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子表现出与均质 1 次相比 α -螺旋、 β -折叠含量降低和 β -转角含量增加的现象, α -螺旋和 β -折叠逐渐转变成 β -转角。文献[33]提出热加工和高压处理会诱导蛋白质部分结构的展开, 并且对结构改变起主导作用的是高压, 该结果与表面疏水性变化结果相一致。 β -转角是维持蛋白质高度有序结构的产物, 在聚集的蛋白质分子形成过程中可以形成反向平行的折叠结构, 这也是蛋白质热稳定性提高的原因^[34]。综上可知, SPI 在经受高压均质产生的机械作用下, 稳定的 α -螺旋、 β -折叠

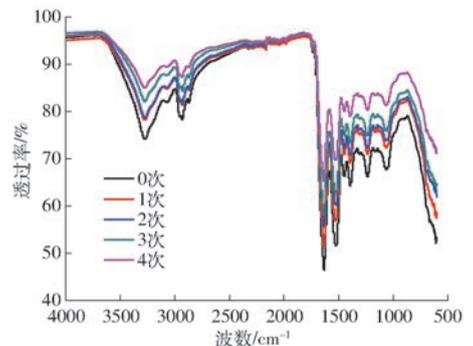


图 5 均质次数对 SPI-维生素 D₃ 纳米粒子傅里叶红外光谱的影响

Fig. 5 Effect of high pressure homogenization times on surface Fourier infrared spectroscopy of SPI-VD₃ nano-particles

构象被破坏,其通过展开与重组转变成高度有序的超分子结构,分子内部也形成更强的氢键,由此改变了SPI-维生素D₃的性质^[35]。当均质次数在2次以上时,随着均质次数的增加, α -螺旋、 β -折叠构象含量略有增加,说明蛋白质发生了不溶性聚集。SPI的功能性质与其结构有很大关系,当均质次数为2次时,SPI对维生素D₃的负载率最高,这可能与SPI结构的展开程度有关。SPI结构展开,深埋于内部的疏水基团得以暴露,更多的疏水基团与维生素D₃接近,其二者产生相互作用的概率变大,因此更多的维生素D₃被SPI负载。

表3 不同均质次数下SPI-维生素D₃纳米粒子中蛋白二级结构相对含量

Tab.3 Effect of high pressure homogenization times on protein secondary structure in SPI-VD₃ nano-particles

均质次数	α -螺旋	β -转角	β -折叠	无规则卷曲
0	(19.80 ± 0.03) ^a	(42.51 ± 0.04) ^a	(12.03 ± 0.01) ^a	(25.83 ± 0.01) ^a
	(18.96 ± 0.04) ^b	(41.38 ± 0.03) ^c	(13.73 ± 0.03) ^c	(25.91 ± 0.01) ^b
1	(18.23 ± 0.02) ^c	(40.97 ± 0.01) ^d	(13.91 ± 0.03) ^d	(26.68 ± 0.02) ^d
	(18.26 ± 0.03) ^c	(41.05 ± 0.02) ^d	(13.92 ± 0.02) ^d	(26.75 ± 0.02) ^d
2	(18.81 ± 0.02) ^b	(41.96 ± 0.02) ^b	(13.04 ± 0.04) ^b	(26.18 ± 0.03) ^c
	(18.81 ± 0.02) ^b	(41.96 ± 0.02) ^b	(13.04 ± 0.04) ^b	(26.18 ± 0.03) ^c

注:同一列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.7 纳米粒子光稳定性

文献[36]提出维生素D₃的光稳定性较差,维生素D₃及不同高压均质压力下制备的各SPI-维生素D₃纳米粒子被放置于15W的紫外灯下照射,各样品中维生素D₃的降解情况如图6所示。维生素D₃在水中降解较快,在紫外灯下照射4h后,仅剩余18%,而与SPI发生相互作用后,维生素D₃的光稳定性明显提高,这可能因为大豆蛋白中的芳香族羟基和双键可吸收紫外线,从而降低紫外线强度,达到保护维生素D₃的作用^[37]。均质压力为0MPa时样

品在4h紫外照射后维生素D₃剩余24%,随着均质次数的增多,样品的光稳定性进一步提高,当均质次数为2次时,维生素D₃质量分数提高到48%,与未均质样品相比提高了166.6%,SPI-维生素D₃纳米粒子的光稳定性得到改善。该结果表明适当的高压均质能促进SPI与维生素D₃的结合,达到更好保护维生素D₃的作用。

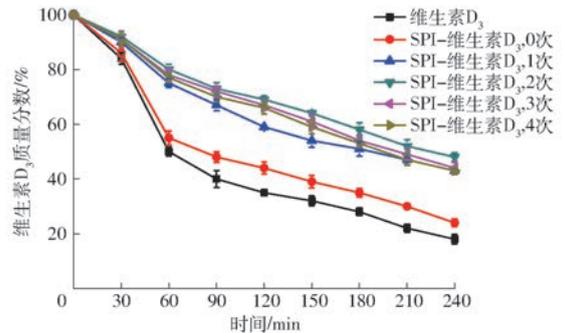


图6 均质次数对SPI-维生素D₃纳米粒子光稳定性的影响

Fig.6 Effect of high pressure homogenization times on light stability of SPI-VD₃ nano-particles

3 结束语

适当的高压处理能够提高SPI-维生素D₃纳米粒子的性质。当高压均质压力为100MPa、高压均质次数为2次时,制备的SPI-维生素D₃纳米粒子的平均粒径由145.20nm减小至82.00nm,浊度减小,体系更均一;包封率和负载率较高,分别为79.21%和7.92%,负载率提高了27.7%;SPI及SPI-维生素D₃纳米粒子的表面疏水性均增大,有利于SPI与维生素D₃的结合;内源荧光光谱和傅里叶红外光谱表明,高压均质使复合物的结构发生变化, α -螺旋和 β -折叠逐渐转变成 β -转角;高压均质处理使SPI-维生素D₃纳米粒子的光稳定性显著提高,与纯维生素D₃相比,紫外灯下照射4h后维生素D₃的质量分数由18%提高至48%,提高了166.6%。本文认为,SPI-维生素D₃纳米粒子负载率的提高及光稳定性的改善与SPI结构展开、疏水基团暴露有一定关联。

参 考 文 献

- [1] ROSEN C J. Vitamin D insufficiency[J]. N. Engl. J. Med., 2011, 364(1): 248-254.
- [2] ADAMS J S, HEWISON M. Update in vitamin D[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2010, 95(2): 471-478.
- [3] GUELI N, VERRUSIO W, LINGUANTI A, et al. Vitamin D: drug of the future. A new therapeutic approach[J]. Archives of Gerontology and Geriatrics, 2012, 54(1): 222-227.
- [4] GINTER E, SIMKO V. Vitamin D deficiency, atherosclerosis and cancer[J]. Bratisl Lek Listy, 2009, 110(12): 751-756.
- [5] ABBASI A, EMAM-DJOMEH Z, MOUSAVI M A E, et al. Stability of vitamin D₃ encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate[J]. Food Chemistry, 2014, 143: 379-383.
- [6] JONES O G, MCCLEMENTS D J. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2010, 167(1-2): 49-62.
- [7] 于钰. 酪蛋白自组装纳米粒的超声制备及其应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [8] ZHANG H, LI L, TATSUMI E, et al. High-pressure treatment effects on proteins in soy milk[J]. LWT—Food Science and Technology, 2005, 38(1): 7-14.
- [9] WANG X S, TANG C H, LI B S, et al. Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of

- soy protein isolates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22(4): 560–567.
- [10] 丁俭, 马文君, 毕爽, 等. 超高压改性大豆蛋白与可溶性多糖复合物对乳液形成及稳定性的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(7): 96–101.
- DING Jian, MA Wenjun, BI Shuang, et al. Effect of ultrahigh pressure modified soy protein and soluble polysaccharide complexes on formation and stability of emulsion[J]. *Food Science*, 2017, 38(7): 96–101. (in Chinese)
- [11] 王喜波, 徐晔晔, 于洁, 等. 高压均质对大豆蛋白柔性和乳化性的影响及相关性分析[J/OL]. *农业机械学报*, 2018, 49(6): 362–367.
- WANG Xiubo, XU Yeye, YU Jie, et al. Effect of high pressure homogenization of flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate and correlation analysis[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(6): 362–367. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20180643&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.06.043. (in Chinese)
- [12] LEE S H, SUBIRADE M, PAQUIN P. Effects of ultra-high pressure homogenization on the emulsifying properties of whey protein isolates under various pH [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2008, 17(2): 324–329.
- [13] SORAGENTINI D A, WAGNER J R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 1999, 23(5): 489–507.
- [14] LEE H, YILDIZ G, SANTOS L C D, et al. Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 55: 200–209.
- [15] TENG Z, LUO Y, WANG Q. Carboxymethyl chitosan-soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D₃[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(1): 524–532.
- [16] SCHMAI H, NIEMEYER P, ZWINGMANN J, et al. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins[J]. *Journal of Food Science*, 1985, 50(2): 486–491.
- [17] LIU Y, ZHAO G, ZHAO M, et al. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction[J]. *Food Chemistry*, 2012, 131(3): 901–906.
- [18] HERRERO A M, CARMONA P, PINTADO T, et al. Infrared spectroscopic analysis of structural features and interactions in olive oil-in-water emulsions stabilized with soy protein[J]. *Food Research International*, 2011, 44(1): 360–366.
- [19] DIELS A M, CALLEWAERT L, WUYTACK E Y, et al. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 101(3): 281–291.
- [20] FLOURY J, BELLETTRE J, LEGRAND J, et al. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern[J]. *Chemical Engineering Science*, 2004, 59(4): 843–853.
- [21] WANG T, SUN X, RADDATZ J, et al. Effects of microfluidization on microstructure and physicochemical properties of corn bran[J]. *Journal of Cereal Science*, 2013, 58(2): 355–361.
- [22] 李雨枫, 薛思雯, 陈星, 等. 高压均质处理次数对肌原纤维蛋白水溶液结构及理化特性的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(15): 127–134.
- LI Yufeng, XUE Siwen, CHEN Xing, et al. Changes in structure and physicochemical properties of myofibrillar proteins subjected to different cycles of high pressure homogenization treatment[J]. *Food Science*, 2019, 40(15): 127–134. (in Chinese)
- [23] SONG X, ZHOU C, FU F, et al. Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate[J]. *Industrial Crops & Products*, 2013, 43(1): 538–544.
- [24] MALHOTRA A, COUPLAND J N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18(1): 101–108.
- [25] RAMÓN B R, MANUEL S. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 213(1–2): 175–186.
- [26] TEDFORD L A, SMITH D, SCHASCHKE C J. High pressure processing effects on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme and β -lactoglobulin[J]. *Food Research International*, 1999, 32(2): 101–106.
- [27] 陈爽, 王小丹, 李瑞, 等. VD₃与大豆分离蛋白相互作用的多重光谱分析与计算[J]. *食品科学*, 2019, 40(23): 8–13.
- CHEN Shuang, WANG Xiaodan, LI Rui, et al. Multiplex spectroscopy analysis and calculation of the interaction between VD₃ and soy protein isolate[J]. *Food Science*, 2019, 40(23): 8–13. (in Chinese)
- [28] ZHANG A, CHEN S, WANG Y, et al. Effect of different homogenization pressure on soy protein isolate-vitamin D₃ complex [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 87: 145–150.
- [29] BOUAOUINA H, DESRUMAUX A, LOISEL C, et al. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(4): 275–284.
- [30] BERINO R P, BAEZ G D, BALLERINI G A, et al. Interaction of vitamin D₃ with beta-lactoglobulin at high vitamin/protein ratios: characterization of size and surface charge of nanoparticles[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90(5): 182–188.
- [31] 刘俊. 超声波辅助糖基化修饰对蛋白质功能性质的影响及机制初探[D]. 南昌: 江西师范大学, 2018.
- [32] 朱颖, 王中江, 李杨, 等. 花青素对大豆蛋白质二级结构影响的多重光谱分析[J/OL]. *农业机械学报*, 2018, 49(6): 368–374, 426.
- ZHU Ying, WANG Zhongjiang, LI Yang, et al. Effects of anthocyanins on the secondary structure of soybean protein isolate by multiplex spectroscopy[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(6): 368–374, 426. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20180644&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.06.044. (in Chinese)
- [33] 邢贝贝, 张亭亭, 赵强, 等. 高压微射流处理对米谷蛋白热聚集集体性质的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(3): 109–115.
- XING Beibei, ZHANG Tingting, ZHAO Qiang, et al. Effect of high pressure microfluidization treatment on the properties of thermal glutelin aggregates[J]. *Food Science*, 2019, 40(3): 109–115. (in Chinese)
- [34] ELLEPOLA S W, CHOI S M, MA C Y. Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 37(1–2): 12–20.
- [35] 雷颖, 赵强, 范婷, 等. 高压微射流处理对白木通籽分离蛋白结构及流变性质的影响[J]. *现代食品科技*, 2015(2): 145–150.
- LEI Li, ZHAO Qiang, FAN Ting, et al. Effect of high pressure microfluidization on the structure and rheological properties of akebia trifoliata var australis seed protein isolate[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015(2): 145–150. (in Chinese)
- [36] KUTSKY R J. *Handbook of vitamins, minerals and hormones*[M]. New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1981.
- [37] LUO Y, TENG Z, WANG Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D₃[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(3): 836–843.