

锐孔法制备水牛乳活性肽微胶囊工艺优化及体外释放研究

袁靖琳¹, 陈 燊¹, 韦翠兰², 苏海燕³, 梁晓琳¹, 蔡 达¹, 李全阳^{1*}

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004;

2. 华南理工大不食品科学与工程学院, 广西南宁 530004;

3. 广西东盟食品药品安全检验检测中心, 广东广州 510006)

摘要: 为了减少胃肠道对抗氧化活性肽的分解并使其具有肠道缓释效果, 以海藻酸钠、壳聚糖为壁材, 用锐孔法制备水牛乳活性肽微胶囊。通过响应面法优化了海藻酸钠溶液浓度、壳聚糖溶液浓度以及 Ca^{2+} 浓度的工艺条件, 并对制备的微胶囊进行扫描电镜观察以及体外释放检测。结果表明: 制备载水牛乳活性肽微胶囊的优化工艺为: 海藻酸钠、壳聚糖和 $CaCl_2$ 溶液的浓度分别为 1.28%、1.51% 和 2.20% (w/v)。在此工艺条件下, 活性肽的包埋率可达 95.20%。通过扫描电镜发现, 海藻酸钠-壳聚糖复合壁材载肽结构完整紧实。体外缓释实验表明, 样品在人工胃液 (pH = 2.0) 中释放量为 7.98%, 在人工肠液 (pH = 6.8) 中作用 12 h 后的相对累计释放量为 89.41%。样品表现出耐酸和良好的模拟肠道环境缓释效果, 制备的水牛乳活性肽微胶囊能够较好的保护目标肽、提高稳定性、耐酸和缓释效果。

关键词: 水牛乳活性肽, 锐孔法, 微胶囊, 体外释放

Optimization of preparation process of buffalo milk active peptides microspheres by piercing method and *in vitro* releasing behavior of the microcapsules

YUAN Jing-lin¹, CHEN Yu¹, WEI Cui-lan², SU Hai-yan³, LIANG Xiao-lin¹, CAI Da¹, LI Quan-yang^{1*}

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Guangxi ASEAN Food and Drug Safety Inspection and Testing Center, Nanning 530004, China;

3. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to reduce the decomposition of the antioxidant peptide in the gastrointestinal tract and to have a sustained release behavior, encapsulated buffalo milk antioxidant peptides were prepared by piercing method using sodium alginate and chitosan as the shell. Based on peptides loading efficacy, and determined by one-factor experimental results, operating parameters as sodium alginate concentration, chitosan concentration and calcium chloride concentration were optimized by response surface methodology. The prepared microspheres were subjected by scanning electron microscopy and researched on its *in vitro* releasing behavior. The results showed that the optimal operating parameters were 1.28%, 1.51% and 2.20% (w/v) for sodium alginate concentration, chitosan concentration and calcium chloride, respectively. Upon the optimal conditions, the experiment led to an encapsulated efficacy of 95.20%. Scanning electron microscopy showed that the alginate-chitosan microcapsules had compact structure. The *in vitro* release studies showed that the release rate was only 7.98% in the simulated gastric buffer (pH = 2.0), and 89.41% in simulated intestinal buffer (pH = 6.8). It showed that the sample had an acid-resistant and good slow-release behavior in simulated intestinal buffer. These results conclusively suggested that encapsulated buffalo milk antioxidant peptides by this process can protect the peptides, and improve its stability, acid resistance and sustained release behavior.

Key words: buffalo milk antioxidant peptides; piercing method; microcapsules; *in vitro* release

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2017)08-0227-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.036

黑白花奶牛的牛乳蛋白中包含许多具有生物学活性的肽段^[1]。本实验室前期研究的水牛乳蛋白水

解物中也含有很多的活性肽, 尤其是抗氧化活性肽。闭秋华用中性蛋白酶分别酶解水牛乳酪蛋白和乳清

收稿日期: 2016-10-11

作者简介: 袁靖琳 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性食品加工原理与工艺, E-mail: c535317194@163.com。

* 通讯作者: 李全阳 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与健康长寿, E-mail: liquanyang@gxu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目资助(31371762)。

蛋白超滤分离得到了多组具有抗氧化性的多肽^[2];此外,Shanmugam^[3]等人用胃蛋白酶酶解水牛乳酪蛋白,分离得到了11段具有抗氧化活性的小肽;李玲^[4]等人用碱性蛋白酶酶解酪蛋白得到一种肽粉,并用这种肽粉灌胃D-半乳糖致衰老小鼠,一定程度上提高了衰老小鼠的抗氧化能力。这些研究表明水牛乳源抗氧化肽具有良好的开发应用价值,然而抗氧化肽不稳定,易受环境影响而变质,口服时则易受消化道逆环境影响失去原有的功能性,这些因素在很大程度上阻碍了乳源抗氧化肽的市场推广的进程。因此,通过一定的工艺手段提高食源活性肽的稳定性及其生物利用率则成了一个亟待解决的问题。

张路^[5]用锐孔法以海藻酸钠、氯化钙以及其他辅料制备了包埋率为61.35%的载玉米多肽微胶囊;张生生等^[6]用锐孔凝固浴法制备以海藻酸钠、氯化钙制备了包埋率为87.6%的载抗菌脂肽微胶囊,该微胶囊具有较好的肠液缓释效果。在这些研究的基础上,本研究选择了以天然、无毒、生物相容性较好并具有抗菌性的大分子材料壳聚糖,与海藻酸钠共为复合壁材,氯化钙为凝固剂,采用无需有机溶剂、无需高速搅拌、设备简单易操作且对芯材影响较小的锐孔法^[7-8]制备水牛乳抗氧化肽微胶囊。以这两种材料为复合壁材包埋目标物的相关研究主要集中于药物控释缓释等领域,从而达到缓释和提高生物利用率的的目的,如制备具有缓释作用的载胰岛素微球^[9-11]、载疫苗微球^[12]以及抗癌药物微球^[13]等,但在食品工业领域相关研究较少,且鲜见以这种复合壁材包埋水牛乳多肽的相关报道。本研究旨在探索一种新的载水牛乳多肽微胶囊制备工艺条件,以期制备具有缓释作用的活性肽食品提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

壳聚糖、海藻酸钠 上海源叶生物科技有限公司;氯化钙 天津科密欧试剂有限公司;冰醋酸、乙醇、85%磷酸 成都科龙试剂有限公司;胃蛋白酶(Potency = 1:3000)、胰蛋白酶(Potency > 1:250)、中性蛋白酶(酶活不低于60000活力单位/g) 南京都莱生物技术有限公司。

UV5200型紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;HL-2D定时数显恒流泵 上海沪西分析仪器厂有限公司;VORTEX-5漩涡震荡仪 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;SHZ-82气浴恒温振荡器 上海皓庄仪器有限公司;Phenom台式扫描电镜 Phenom-World公司;SBC-12离子溅射仪 中科科仪。

1.2 实验方法

1.2.1 水牛乳活性肽制备 参照参考文献方法^[2,14],使用中性蛋白酶酶解水牛乳全蛋白进行制备,样品经冷冻干燥、真空封装,于-20℃环境中存放。

1.2.2 水牛乳活性肽微胶囊制备

1.2.2.1 微胶囊制备工艺 配制海藻酸钠溶液(壁材A)、1%醋酸-壳聚糖溶液(壁材B),过夜溶胀,静

置。凝固液为相应浓度的CaCl₂溶液(C液)。精确1.00g冻干多肽粉均匀分散于50mL壁材A中,同时将50mL壁材B与50mL凝固液C混合均匀作为凝固液。多肽-壁材A混合物通过恒流泵匀速泵入凝固浴中,出口段有锐孔(Φ=0.45mm)固化造粒,期间不断搅拌,直至颗粒完成固化,过滤获得胶粒微球并保留滤液。蒸馏水清洗微球表面除去表面残留的多肽,用滤纸吸干表面水分,即得载肽湿微球。-80℃预冻,经真空冷冻干燥,获得载肽干微球,用于电镜扫描观察。将壁材A直接滴入凝固浴中制备空白微球,其余步骤同上。

1.2.2.2 包埋率及载肽量计算 用考马斯亮蓝法。取1.2.2.1中制载肽湿微球滤液1mL与5mL考马斯亮蓝溶液混合均匀,在5min内于595nm处测定吸光值得A_i。同样取制空白湿微球滤液1mL进行检测得A₀。1.000g多肽与100mL凝固浴充分混匀,取1mL混合液用考马斯亮蓝法测吸光值得A_j;同时测定空白凝固浴的吸光值得A_c。用相对载肽率表示包埋率,计算公式如下:

$$\text{包埋率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_0}{A_j - A_c}\right) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中:A_i-载肽微球制备残液吸光值;A₀-空白微球制备残液吸光值;A_j-1g多肽-凝固浴吸光值;A_c-凝固浴吸光值。

$$\text{载肽量}(g/g) = \frac{\text{包埋总肽量} \times \text{包埋率}}{\text{总微球重量}} \quad \text{式(2)}$$

1.2.2.3 单因素实验 经预实验后确定海藻酸钠、壳聚糖以及CaCl₂溶液的浓度(w/v)为需优化因素。造粒方法同上。分别考察:

当壳聚糖溶液浓度为1.50%,CaCl₂溶液的浓度为2.00%时,海藻酸钠添加量(0.50%、0.75%、1.0%、1.25%、1.50%)对包埋率的影响;

当海藻酸钠溶液浓度为1.25%,CaCl₂溶液的浓度为2.00%时,壳聚糖添加量(0、0.50%、1.00%、1.50%、2.00%)对包埋率的影响;

当海藻酸钠溶液浓度为1.25%,壳聚糖溶液的浓度为1.50%时,CaCl₂溶液的浓度(1.00%、1.50%、2.00%、2.50%、3.00%)对包埋率的影响。

1.2.2.4 Box-Behnken 响应面优化实验 经单因素实验后确定因素优化水平范围,设计三因素三水平响应面优化实验(见表1),并对实验结果进行验证。

表1 实验设计因素及水平表

Table 1 Factors and levels table of the experimental

水平	因素		
	A 海藻酸钠 (% w/v)	B 壳聚糖 (% w/v)	C CaCl ₂ (% w/v)
-1	1.00	1.00	1.50
0	1.25	1.50	2.00
1	1.50	2.00	2.50

1.2.3 水牛乳活性肽微胶囊特性表征

1.2.3.1 微胶囊扫描电镜(SEM)分析 按优化后的最佳工艺分别制备复合壁材载肽微球(Alg-CS-肽)和相应空白微球。并按最佳工艺海藻酸钠浓度制备

海藻酸钠单一壁材载肽微球(Alg-肽)和相应空白微球。微球经冷冻干燥,用导电胶固定在样品台上,喷金后,用扫描电镜进行观察。同时进行光学显微镜观察,放大倍数为40倍。

1.2.3.2 微胶囊于人工胃肠液中缓释情况分析 参照《中国药典》(2010版)配制人工胃液及人工肠液^[15]。

参照1.2.3.1的方法按最佳工艺制备空白微球(B-Alg-CS-MC)及载肽微球(B-Alg-CS-PP-MC),并按最佳工艺海藻酸钠浓度制备单一壁材空白微球(B-Alg-MC)及相应载肽微球(B-Alg-PP-MC)。

模拟消化累计释放曲线,参照张杰^[16]的方法稍作修改:分别取1.00g载肽微球(PP-MC)和相应空白微球(MC),并按载肽量换算出相应肽量(PP)。将PP-MC、MC及PP均置于100mL人工胃液中消化。消化条件为:37℃,100r/min。分别在0、0.5、1、2h各取2mL液体,4000r/min,离心5min,取1mL上清液,按1.2.2.2方法测吸光值。每次取液后用空白人工胃液补足至100mL。按式(3)计算相对释放量。将经过2h模拟胃液消化的微球过滤,用蒸馏水洗净附着的胃酶和肽并吸干水分,放入100mL模拟肠液中。消化释放量测定和计算同上。分别计算0、1、2、4、6、8、10、12h的相对释放量。

$$\text{相对释放量}(\%) = \frac{A_t - A_0}{A_t - A_0} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A_t - 载肽微球相应时间模拟胃/肠液上清液吸光值; A_j - 空白微球相应时间模拟胃/肠液上清液吸光值; A_i - 对应载肽量肽相应时间模拟胃/肠液上清液吸光值; A_0 - 相应时间空白模拟胃/肠液上清液吸光值。

以消化时间为横坐标,累计相对释放量为纵坐标,制作载肽微球释放曲线。所有测量平行三次。

1.3 数据处理

分别用SPSS 19.0和Design-Expert 8.0.6进行相应数据分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 海藻酸钠溶液浓度对包埋率的影响 海藻酸钠溶液浓度对包埋率的影响实验结果见图1。

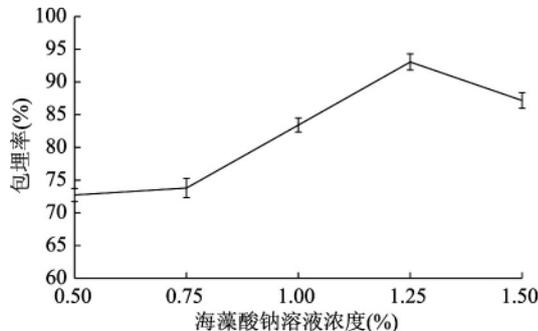


图1 海藻酸钠溶液浓度对包埋率的影响
Fig.1 Effect of sodium alginate concentration on peptides loading efficacy

由图1可知,包埋率随海藻酸钠溶液浓度的增加呈先增加后减少的趋势。在0.50%~0.75%的范围内时,微胶囊包埋率变化不大;在0.75%~1.25%的范围内时,包埋率逐渐上升;在1.25%~1.50%的范围内时,包埋率则逐渐下降,当海藻酸钠溶液浓度为1.25%时包埋率达到最大值。低浓度海藻酸钠微球性状不规则,过滤时容易破裂,降低了包埋率;而当海藻酸钠的浓度超过1.50%时,肽粉只能均匀分散其中,但是高浓度的海藻酸钠难以通过锐孔,形成的颗粒有严重的拖尾现象,使得包埋率降低。因此,在本实验中,最适的海藻酸钠溶液浓度在1.25%左右。

2.1.2 壳聚糖溶液浓度对包埋率的影响 壳聚糖溶液浓度对包埋率的影响实验结果见图2。

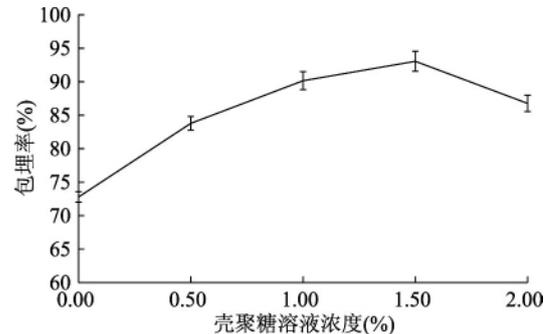


图2 壳聚糖溶液浓度对包埋率的影响
Fig.2 Effect of chitosan concentration on peptides loading efficacy

由图2可知,微胶囊的包埋率随壳聚糖溶液浓度增加呈先增大后减小的趋势。当壳聚糖溶液浓度为1.50%时,包埋率最大。壳聚糖浓度适当增加可以提高包埋率,而浓度过高时使得微球软塌易破裂,导致微胶囊包埋率降低。Anjani K等^[17]报道,壳聚糖与海藻酸钠的结合减少了正乙酰化程度,可有效减小海藻酸钠-钙网状结构的缝隙;张志辰等^[18]则报道,壳聚糖浓度过高时会降低海藻酸钙膜的机械强度,这一结果是在壳聚糖的伯胺基与海藻酸盐分子链上的羧基结合完毕后,多余的带电壳聚糖分子影响海藻酸钙膜造成的。因而,在本实验中,最适的壳聚糖溶液浓度在1.50%左右。

2.1.3 CaCl₂溶液浓度对包埋率的影响 CaCl₂溶液浓度对包埋率的影响实验结果见图3。

由图3可知,微胶囊的包埋率随着CaCl₂溶液浓度增加呈先增大后减少的趋势。当CaCl₂溶液浓度在1.00%~2.00%时,包埋率随着CaCl₂溶液浓度的增加而增加;而当CaCl₂溶液浓度大于2.00%之后,包埋率随CaCl₂溶液浓度增加而减小。当CaCl₂溶液浓度在2.00%时,微胶囊的包埋率达到最大值。钙离子的浓度较低时包埋率较低,此时海藻酸钠除了交联作用外,剩余的阴离子海藻酸多糖通过静电作用与阳离子壳聚糖相互作用,此时形成的膜较薄,容易破裂;而当钙离子浓度高于最适浓度后包埋率呈降低趋势,海藻酸钠进入高度浓度钙离子凝固浴迅速形成致密的凝胶胶束,这一结构减少了壳聚糖与海藻酸钠的结合,使得海藻酸-钙膜的缝隙

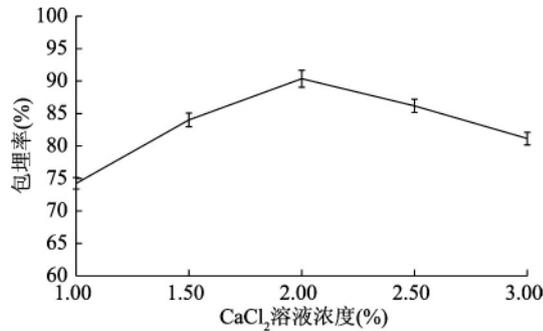
图3 CaCl₂ 溶液浓度对包埋率的影响

Fig.3 Effect of calcium chloride concentration on peptides loading efficacy

较多,也会降低包埋率,Gaserod等^[19]早期也报道过钙离子与壳聚糖竞争结合海藻酸钠,以及过多的钙离子会减少海藻酸钠与壳聚糖的静电结合作用。因此,在本实验中,最适CaCl₂溶液浓度在2.0%左右。

2.2 响应面优化实验

在单因素实验的基础上,以包埋率为响应值,对海藻酸钠溶液浓度、壳聚糖溶液浓度以及CaCl₂溶液浓度进行三因素三水平响应面优化,得到表2的实验结果。

对该实验结果进行回归模型建立以及相关回归方程方差分析,分析结果见表3。得到以响应值Y包埋率(%),A:海藻酸钠、B:壳聚糖、C:CaCl₂建立的二次回归方程:

$$Y = -160.382 + 298.805A - 1.856B + 59.0495C + 44.26AB - 13.8AC - 5.97BC - 130.712A^2 - 14.348B^2 - 7.378C^2$$

由表3可知,模型项显著($F = 93.32$, $p < 0.0001$),表明该模型具有统计学意义;且失拟项不显著($p = 0.0754 > 0.05$),表示无失拟因素存在,即可以用回归方程对实验进行预测分析。 $R^2_{adj} = 0.9811$ (> 0.80), $C.V.\% = 0.98\%$,进一步说明模型

表2 响应面设计方案及实验结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

编号	A	B	C	R: 包埋率 (%)
1	1	-1	0	80.01
2	0	1	1	87.06
3	0	0	0	93.05
4	0	0	0	93.35
5	0	0	0	92.88
6	-1	0	1	84.42
7	-1	1	0	71.38
8	0	0	0	92.17
9	1	0	1	85.58
10	0	0	0	93.47
11	0	1	-1	87.44
12	0	-1	-1	85.06
13	0	-1	1	90.65
14	1	0	-1	84.97
15	1	1	0	88.65
16	-1	0	-1	76.91
17	-1	-1	0	84.87

拟合度较好。综合分析可知,用方程拟合三项因素对包埋率的影响是可行的,可以得到拟合度较好的模型并用于预测最优组合方案,从而得到最大包埋率。

从表3结果来看,一次项A(海藻酸钠)、B(壳聚糖)及C(CaCl₂)均对包埋率有显著影响($p < 0.05$),其中 $A > C > B$,A(海藻酸钠)对包埋率影响显著;二次交互项AB、AC、BC均对包埋率有显著影响,且 $AB > AC > BC$ 。

进一步分析交互作用,由响应曲面图及等高线可知,AB、AC及BC的等高线均呈椭圆形,表明该三项因素两两交互作用明显。其中AB的变化较另外

表3 响应面回归方程方差分析

Table 3 ANOVA for the response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	
模型	639.63	9	67.12	93.32	<0.0001	*
A	58.48	1	58.48	81.31	<0.0001	*
B	4.59	1	4.59	6.38	0.00394	*
C	22.21	1	22.21	30.88	0.0009	*
AB	122.43	1	122.43	170.23	<0.0001	*
AC	11.90	1	11.90	16.55	0.0048	*
BC	8.91	1	8.91	12.29	0.0097	*
A ²	281.01	1	281.01	390.71	<0.0001	*
B ²	54.18	1	54.18	75.32	<0.0001	*
C ²	14.32	1	14.32	19.92	0.0029	*
残差	5.03	7	0.72			
失拟项	3.99	3	1.33	5.07	0.0754	-
纯误差	1.05	4	0.26			
总和	609.13	16				

注“*”表示显著($p < 0.05$),“-”表示不显著。

两项快,进一步说明 AB 项对包埋率的影响较其它两项更为明显。

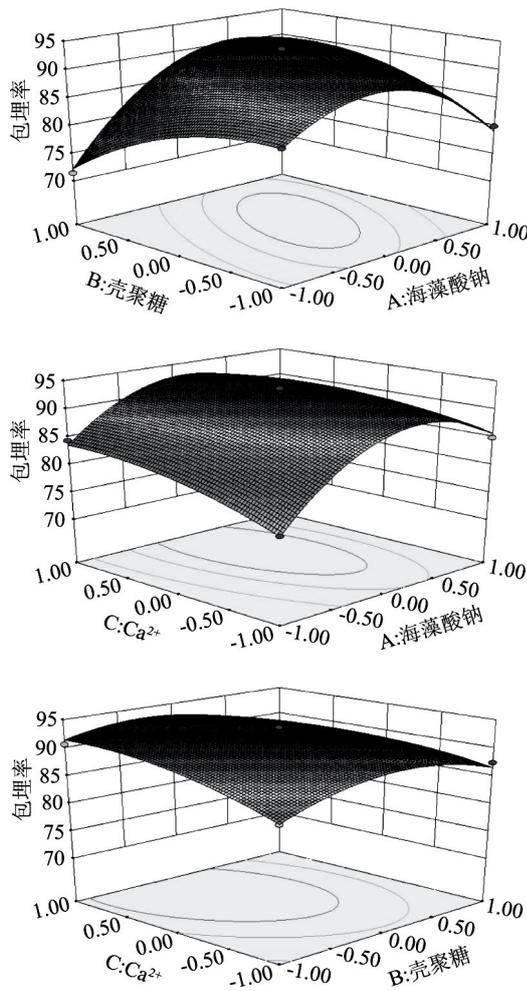


图4 各项实验因素交互作用

Fig.4 Interaction of experimental factors conditions on peptides loading efficacy

对所求的二次方程求导,得到 $A = 1.28\%$ 、 $B = 1.51\%$ 、 $C = 2.20\%$ 。即最优工艺组合为:海藻酸钠溶液浓度为 1.28% ,壳聚糖溶液浓度为 1.51% , $CaCl_2$ 溶液浓度为 2.20% 。对该工艺参数进行验证实验,得到包埋率为 $95.20\% \pm 0.13\%$,在误差允许范围内略高于预测值 93.50% ($RSD = 1.27\%$),表明该模型准确可信。同时还以最佳工艺制备了单一海藻酸钠- $CaCl_2$ 载肽微胶囊,测得其包埋率为 $85.32\% \pm 0.50\%$,比复合壁材的包埋率低 10% 左右。这一实验结果与单因素实验结果相吻合,亦说明复合壁材的选择是合理且有意义的。

2.3 电镜扫描

为了直观反映微胶囊制备效果,分别采用光学显微镜和扫描电子显微镜对样品进行观察,具体见图5、图6。

经冷冻干燥后,整体观察对比观察。由图5可知单一壁材海藻酸钠制备的微球表面凹凸粗糙,结构松散,孔隙较大,而复合壁材海藻酸钠-壳聚糖制备的微球表面平滑,结构密实均一;由图6可知,复合壁材海藻酸钠-壳聚糖制备的微球几乎无空隙,且

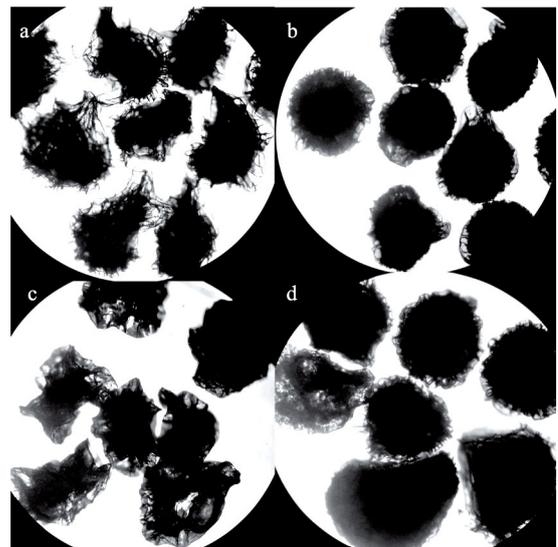


图5 两种微胶囊光学显微镜观察图(40×)

Fig.5 Optical microscopy images of Alg microcapsules and Alg/CS microcapsules(40×)

注:a:单一壁材海藻酸钠空白微胶囊;
b:复合壁材海藻酸钠-壳聚糖空白微胶囊;
c:单一壁材海藻酸钠载肽微胶囊;
d:复合壁材海藻酸-壳聚糖载肽微胶囊;图6同。

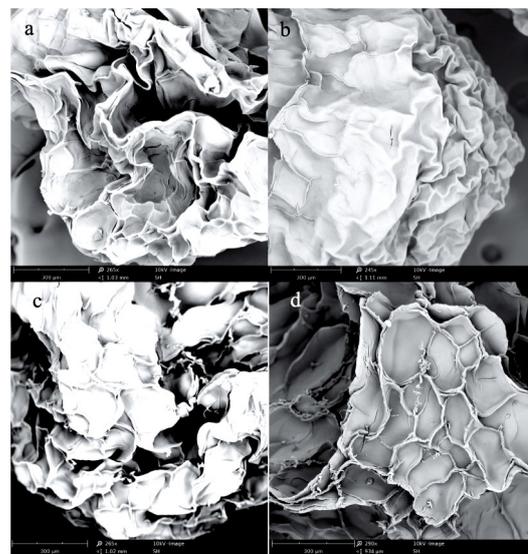


图6 两种微胶囊扫描电镜图

Fig.6 Scanning electron microscopy images of Alg microcapsules and Alg/CS microcapsules

注:a:265× b:245× c:265× d:290×。

微囊壁较厚无裂纹。壳聚糖的酰基基团修饰作用使得复合壁材微胶囊囊壁光滑,同时这种作用力使得钙离子和海藻酸钠羧酸根离子基团之间形成空间位阻,增加了疏水性,在这两种作用力的共同作用下,复合壁材微胶囊的结构致密均匀。Estevinho等^[20]也报道,在制备 V_{B12} 和 V_C 微胶囊时,海藻酸钠的存在使得以壳聚糖为壁材的微球形态规则且表面更为光滑,内容物更稳定。实验结果说明,由复合壁材组成的微囊结构比单一壁材的结构更为稳定,能够更好地保护目标抗氧化肽。

2.4 体外释放实验

单一壁材海藻酸钠-CaCl₂ 载肽微胶囊和复合壁材海藻酸钠-壳聚糖-CaCl₂ 载肽微胶囊在人工胃肠液中连续释放情况的检测结果见图 7。

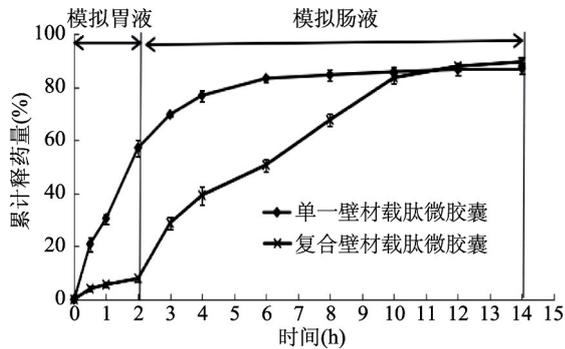


图7 载肽微胶囊在模拟胃肠液中连续释放曲线

Fig.7 Release profile of peptide microcapsules in SGF and SIF

由图 7 可知,单一壁材载肽微胶囊经模拟胃液 (pH=2.0) 消化作用 2 h 后,累计释放了 57.08% 的多肽,且这一过程相当快,而复合壁材微胶囊经 2 h 的模拟胃液消化后,仅释放了 7.89%,缓慢释放;进入模拟肠液 (pH=6.8) 后,单一壁材载肽微胶囊释放速率减缓,4 h 后释放趋于平稳,经 12 h 的模拟肠液消化后,累计释放量为 86.96%。与单一壁材不同的是,复合壁材载肽微胶囊进入模拟肠液后,1 h 时累计释放量为 32.05%,迅速释放,是 2 h 模拟胃液累积释放量的 4 倍,10 h 后,释放趋于平稳,经模拟肠液消化作用 12 h 后,累积释放量达到 89.41%。实验结果表明,以海藻酸钠和壳聚糖为复合壁材包埋水牛乳抗氧化肽可以较好地抵抗模拟胃液的消化,而在较为温和的模拟肠液中则能缓慢释放。Mukhopadhyay P 等^[9]报道经壳聚糖-海藻酸钠包埋的胰岛素对环境 pH 敏感,在酸性条件下几乎不释放,在中性环境中可以缓慢释放,经过复合壁材包埋的胰岛素经口服可以有效延长胰岛素在糖尿病模型小鼠体内降血糖的时间;李瑞伟等^[12]用海藻酸钠-壳聚糖制备的草鱼出血病细胞疫苗在 pH2.3 的盐酸溶液处理 3 h 累计释放量仅为 15.57%,而在 pH7.4 的 PBS 中 3 h 释放量为 30%,且在 14 d 后才基本释放完全,较好地达到了让疫苗缓慢释放的用药需求。综合分析可知,以壳聚糖-海藻酸钠为复合壁材制备的载水牛乳活性肽微胶囊也具备在体内缓释从而提高该活性肽生物利用率的潜能。

3 结论

在单因素实验的基础上,经响应面优化得到锐孔法制备载水牛乳多肽微胶囊最佳工艺组合:海藻酸钠溶液浓度 1.28%,壳聚糖溶液浓度 1.51%,CaCl₂ 溶液浓度 2.20%,包埋率为 95.20%。扫描电镜观察发现这种复合壁材载肽微胶囊结构紧密均匀。在模拟体外消化实验中,经人工胃液消化 2 h,累计释放量仅为 7.89%,经肠液消化 12 h 后,释放量为 89.41%,表现出耐酸和缓释功能,对比分析认为该

技术较好地达到了让抗氧化活性肽在肠道环境中缓释并发挥作用的目的,所需壁材配制的浓度相对较低,有利于工业化推广。该项技术为生产高利用价值的水牛乳活性肽产品提供了一种新方法,也将为相关食品功能性成分的产业化提供了一项新的技术手段。

参考文献

- [1]梁晓琳,谭凯燕,苏海雁,等.乳源抗氧化活性肽的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2014(9):2776-2782.
- [2]闭秋华.水牛乳抗氧化活性多肽的研究[D].南宁:广西大学,2012.
- [3]Shanmugam V P, Kapila S, Sonfack T K, et al. Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein [J]. International Dairy Journal 2015, 42: 1-5.
- [4]李玲,唐艳,农皓如,等.水牛乳多肽对衰老模型小鼠机体抗氧化作用的研究[J].食品科技,2012(9):62-65.
- [5]张路.锐孔法和复合凝聚法制备玉米肽微胶囊[D].长春:吉林农业大学,2012.
- [6]张生生,闫静芳,陆兆新,等.锐孔凝固浴法制备表面活性肽微胶囊[J].食品工业科技,2015(12):221-225.
- [7]王勇,解玉冰,冯小军.壳聚糖/海藻酸钠生物微胶囊的研究进展[J].生物工程进展,1999(2):14-17.
- [8]刘欣,郭星尧,韩亚,等.海藻酸钠为囊材锐孔法制备铁叶绿酸钠微囊[J].现代食品科技,2009(9):1043-1045.
- [9]Mukhopadhyay P, Chakraborty S, Bhattacharya S, et al. pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery [J]. International Journal of Biological Macromolecules 2015, 72: 640-648.
- [10]杨利芳.胰岛素的海藻酸盐-壳聚糖微球载体制备和口服给药研究[D].西安:西北大学,2007.
- [11]Tahtat D, Mahlous M, Benamer S, et al. Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58: 160-168.
- [12]李瑞伟,曾令兵,张辉,等.草鱼出血病细胞疫苗微囊制备与体外释放研究[J].上海海洋大学学报,2013(2):212-218.
- [13]王晓琴.小球藻抗肿瘤多肽的分离及其微囊化研究[D].广州:华南理工大学,2012.
- [14]钟兴业.水牛乳清蛋白抗氧化肽的分离纯化及产品开发生[D].南宁:广西大学,2014.
- [15]黄财顺,李宝才,向诚.人工胃肠液模型在药物稳定性研究中的应用现状[J].天然产物研究与开发,2015(10):1836-1841.
- [16]张杰.蛋白类药物海藻酸盐微胶囊的制备及体外释放行为的研究[D].大连:大连理工大学,2007.
- [17]Anjani K, Kailasapathy K, Phillips M. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening [J]. International Dairy Journal 2007, 17(1): 79-86.
- [18]张志辰,王英,董明盛,等.壳聚糖-海藻酸钠液芯微胶囊机械强度优化研究[J].江苏农业科学,2010(1):268-269.

(下转第 238 页)

理工大学 2012.

[12] 杨海燕, 于蒙, 刘姗姗, 等. 冷冻干燥法制备甜杏仁油微胶囊[J]. 食品科学 2012, 33(18): 36-40.

[13] 李新明, 李小兰, 周爱国. 喷雾减压冷冻干燥法生产孜然精油微胶囊[J]. 中国调味品 2005, 322(12): 17-22.

[14] Faria A F, Mignone R A, Montenegro M A, et al. Characterization and singlet oxygen quenching capacity of spray-dried microcapsules of edible biopolymers containing antioxidant molecules[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2010, 58: 8004-8011.

[15] Reineccius G A, Ward F M, Whorton C. Developments in gum acacias for the encapsulation of flavours [J]. American Chemical Society, 1995, 14: 161-168.

[16] Sousdaleff M, Baesso M L, Neto A M, et al. Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: stability, solubility, and food application [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2013, 61: 955-965.

[17] 于蒙. 甜杏仁油微胶囊化关键技术研究及中试[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学 2012.

(上接第 213 页)

性风味成分分析[J]. 食品科学 2010, 31(18): 278-282.

[15] 徐仁应, 卞玉海, 万燕萍, 等. 短链脂肪酸与结直肠肿瘤细胞凋亡关系的研究[J]. 肠外与肠内营养, 2013(5): 259-262.

[16] Taliana K A B, Narciza M d O A, Ana R R d A, et al. Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria[J]. LWT-Food Science and Technology 2016 (76): 209-215.

[17] Temizkan R, Yasar K, Hayaloglu A A. Changes during ripening in chemical composition, proteolysis, volatile composition and texture in Kashar cheese made using raw bovine, ovine or caprine milk [J]. International Journal of Food Science and Technology 2014, 12(49): 2643-2649.

[18] Natalia G T, Marta á, David D, et al. Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016(232): 103-110.

[19] 谢建春. 现代香味分析技术与应用[M]. 北京: 中国标准出版社 2008.

[20] Bertolino M, Dolci P, Giordano M, et al. Evolution of chemical-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in winter time [J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 1001-1011.

[21] Erhan S, Ali A H. Influence of curd heating on proteolysis and volatiles of Kashkaval cheese [J]. Food Chemistry, 2016 (211): 160-170.

[22] 张玥琪, 郭贝贝, 张丰义, 等. 蓝波奶酪挥发性风味成分的分离与鉴定[J]. 食品科学 2015, 36(16): 132-136.

[23] Singh T D M, Cadwallader K. Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2003, 2(4): 166-189.

[24] Ozturkoglu - Budak S, Gursoy A, Aykas D P, et al. Volatile compound profiling of Turkish Divle Cave cheese during production and ripening [J]. Dairy Science, 2016, 99(7): 5120-5131.

[25] 张晓鸣. 食品风味化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社 2009.

[26] Thomsen M, Gourrat K, Thomas - Danguin T, et al. Multivariate approach to reveal relationships between sensory perception of cheeses and aroma profile obtained with different extraction methods [J]. Food Research International, 2014, 62(8): 561-571.

[27] 衣宇佳, 田怀香, 汤坚. 国产类契达干酪的风味研究[D]. 无锡: 江南大学 2008.

[28] Curioni P M G, Bossel J O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry [J]. International Dairy Journal 2012, 12(12): 959-984.

(上接第 232 页)

[19] Gaserod O, Smidsrod O, Skjak - Braek G. Microcapsules of alginate-chitosan -- I. A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan [J]. Biomaterials, 1998, 19(20): 1815-1825.

[20] Estevinho B N, Carlan I, Blaga A, et al. Soluble vitamins (vitamin B₁₂ and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process [J]. Powder Technology, 2016, 289: 71-78.