

乳糖酶生物黏附纳米微囊的制备及黏附性评价

贺红军^{1,2}, 孔保华^{1*}, 孙承锋², 姜竹茂²

1. 东北农业大学食品学院(哈尔滨 150030); 2. 烟台大学化学生物理工学院(烟台 264005)

摘要 采用复乳法制备生物黏附乳糖酶纳米微囊, 以壳聚糖和卡波姆作为黏附材料, 分别考察了壳聚糖和卡波姆单独表面修饰以及协同表面修饰对纳米微囊理化性质的影响, 采用外翻肠囊法考察纳米微囊在离体大鼠小肠黏膜的滞留程度。相对分子质量为120 kDa、脱乙酰度为95%的壳聚糖和934P型号的卡波姆作为修饰材料制备的纳米微囊粒径大小均匀、Zeta电位绝对值和包封率较高。体外黏附试验结果表明, 壳聚糖、卡波姆修饰的纳米微囊在小肠黏膜的滞留率显著高于未修饰纳米微囊, 壳聚糖/卡波姆(质量比为2:1)协同修饰纳米微囊的黏附性最高, 小肠黏膜滞留率可达(91.1±3.4)%。

关键词 乳糖不耐症; 乳糖酶; 生物黏附纳米微囊; 壳聚糖; 卡波姆

Preparation of Bioadhesive Lactase-loaded Nanocapsules and Evaluation of Its Bioadhesion in Vitro

He Hong-jun^{1,2}, Kong Bao-hua^{1*}, Sun Cheng-feng², Jiang Zhu-mao²

1. College of Food Science, Northeast Agricultural University (Harbin 150030);

2. Chemistry and Biology College, Yantai University (Yantai 264005)

Abstract The bioadhesive nanocapsules loaded with lactase were prepared by double emulsion method. Two types of bioadhesive materials, chitosans and carbopols were chosen. The effects of surface modification of nanocapsules with chitosan and carbopol, whether alone or combinatorial, on the physicochemical characteristics were investigated. The adhesion of nanocapsules at the surface of intestinal mucous was evaluated by everted gut sac method in vitro. Nanocapsules with uniform particle size, high Zeta potential and encapsulation efficiency were obtained using chitosan (120 kDa, 95%) or carbopol (934P) as coating material. In vitro adhesion test showed that, the retention ratio of nanocapsules coated with chitosan or carbopol was significantly higher than that of uncoated one. A combinatorial coating of chitosan and carbopol with different ratios had more effective effect. When the ratio of chitosan and carbopol was 2 : 1, the highest mucoadhesion was achieved, reaching the retention ratio of (91.1±3.4)%.

Keywords lactose intolerance; lactase; bioadhesive nanocapsules; chitosan; carbopol

牛乳中含有约5%乳糖, 不能被人体直接吸收, 需要在小肠中乳糖酶的作用下分解为能被人体正常吸收的葡萄糖和半乳糖。乳糖不耐症是指人体不能分解并代谢乳糖, 这是由于肠道内缺乏所需的乳糖酶而造成的。乳糖酶缺乏可对各年龄段人口构成危害, 关系到世界人口的营养和健康问题。口服外源性的乳糖酶以辅助乳糖消化吸收是目前广泛关注的研究热点。近年来, 已有大量商品化的乳糖酶水剂、片剂上市, 但在应用过程中仍然存在一些问题: 口服的乳糖酶水剂或片剂在体内肠道的滞留时间短, 必须于饮用乳之前口服或直接滴入乳中同时饮用, 所以要随时服用, 非常麻烦和不便。脂质体^[1-2]和聚合物微囊^[3]是乳糖酶制剂研究的新领域, 使用天然的或合成的材料包埋乳糖酶, 有望克服以上缺点。聚乳酸纳米微囊, 具有优良的生物降解性、高比表面积、保护内部包埋的药物等优点, 是目前极具潜力的载体系统。

本研究以聚乳酸作为壳材, 采用复乳法制备生物黏附性乳糖酶纳米微囊, 比较了壳聚糖和卡波姆单独以及协同表面修饰对纳米微囊理化性质的影响, 体外

考察在大鼠小肠黏膜的黏附程度, 旨在延长乳糖酶在小肠黏膜的滞留时间, 提高其口服生物利用度。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

中性乳糖酶: 哈尔滨美华生物技术股份有限公司; 聚乳酸: 济南岱罡生物科技有限公司; 壳聚糖: 浙江金壳生物科技有限公司; 卡波姆: 上海昌为医药辅料技术有限公司; 其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

JYD-900探头式超声波细胞粉碎机: 上海之信仪器有限公司; GL-21M冷冻干燥机: 北京博医康试验仪器有限公司; 激光散射粒度分析仪: 英国Malvern Instruments公司; TGL-16B高速台式离心机: 上海离心机安亭科学仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 生物黏附纳米微囊的制备

采用W₁/O/W₂复乳法^[4]。首先, 将0.5 mL、2%的乳糖酶溶液(W₁)注入5 mL含100 mg聚乳酸的油相有机溶剂中(O), 超声波分散制得初乳液(W₁/O), 然

*通讯联系; 基金项目: 烟台大学科研启动基金

后加入到50 mL含有1%稳定剂的外水相中(W₂), 经过分散乳化, 制得复乳液(W₁/O/W₂)。将该复乳液迅速倾入150 mL含有0.5%壳聚糖的稀醋酸溶液(或卡波姆的水溶液或壳聚糖/卡波姆的稀醋酸溶液)中, 常温常压下搅拌至溶剂挥发完毕, 即得纳米微囊的悬浮液。20 000 g离心收集纳米微囊, 用去离子水清洗3遍后冻干, 贮存于干燥器中备用。

1.3.2 粒径大小及粒径分布的测定

平均粒径及其分布采用激光散射粒度分析仪在25 °C下进行。把纳米微囊的冻干粉分散于等渗磷酸盐缓冲溶液中, 于合适的测试浓度下进行测定。微囊粒径大小以平均粒径表示, 粒径分布以分布指数表示。

1.3.3 表面Zeta电位的测定

采用表面Zeta电位分析仪测定纳米微囊表面的Zeta电位, 把乳糖酶纳米微囊分散在等渗磷酸盐缓冲溶液中, 于合适的浓度下进行测定。所有的测量均在25 °C和(100~2 000) Hz的条件下进行。

1.3.4 包封率的测定

分别测定制备过程中加入总的乳糖酶的活性以及微囊化后上清液中游离酶的活性^[5]。根据下式计算乳糖酶的包封率:

乳糖酶包封率=(加入酶的总活性-上清液酶的活性)/加入酶的总活性×100%

1.3.5 乳糖酶的活性测定

参照文献[6], 取1 mL、0.25%邻硝基酚β-D半乳糖苷(o-nitrophenyl, β-D-galactopyranoside, ONPG)溶液于试管中, 加入2.5 mL、0.2 M醋酸缓冲溶液(pH4), 37 °C水浴中预热5 min, 加入0.5 mL酶液或纳米微囊悬液, 继续保温15 min, 取1 mL反应液加入盛有1 mL、5%Na₂CO₃溶液的试管中终止反应, 定容至10 mL, 420 nm波长下测定吸光度。以加热灭活的酶液同样处理作为空白。在上述条件下, 每分钟水解产生1 μmol邻硝基酚(o-nitrophenyl, ONP)的酶量定义为1ONPG单位, 记为OHA(OHA = ONPG-Hydrolyzing Activity)。

以未包埋的乳糖酶活性作为100%, 计算其相对活力。

1.3.6 体外小肠黏膜黏附试验

荧光染料香豆素-6标记纳米微囊的制备: 将10 μg香豆素-6与100 mg聚乳酸一起加入到5 mL油相有机溶剂中, 其它步骤同1.3.1。

采用外翻肠囊法^[7]。SD雄性大鼠, 体重范围200~250 g。禁食供水饲养24 h后, 断颈处死, 取小肠(空肠), 用生理盐水(0.9%NaCl溶液)冲洗后切成4 cm长的片段, 用玻璃棒使其外翻, 置于相对湿度约为90%的密闭容器中备用。将香豆素-6标记的修饰纳米微囊用磷酸盐缓冲溶液分散, 配成10 mg/mL的微囊悬浮液。把外翻的小肠置于其中培养2 h, 并保持在液面5 mm以下。然后, 用生理盐水冲刷小肠黏膜表面除去未黏附的微囊, 把小肠组织进行匀浆。此后,

加入准确计量的乙腈, 于冰浴中超声萃取其中的香豆素-6。萃取液用荧光分光光度计测量香豆素-6的量。对照标准曲线, 由测得的小肠表面荧光测量值计算得到表面黏附的微囊量。每个测量值取3次试验测量的平均值±SD。未修饰的纳米微囊作为对照组。

1.3.7 统计分析

每个试验重复三次, 结果表示为平均数±SD。数据统计分析采用Origin 8.0软件中的one-way analysis of variance(ANOVA)程序进行, $p < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖修饰的黏附纳米微囊的物化性质

不同种类壳聚糖修饰纳米微囊的粒径、表面Zeta电位和包封率结果列于表1。由表中数据可以看出, 对于相同的脱乙酰度(95%), 纳米微囊的平均粒径随着相对分子质量的增加而增大。对于相同的相对分子质量(120 kDa), 脱乙酰度的变化对纳米微囊的平均粒径影响不大, 粒径分布指数随脱乙酰度的升高而减小。随着微囊表面壳聚糖链段的引入, 表面电荷发生了反转, 由负变正, 不同脱乙酰度的壳聚糖修饰对纳米微囊的表面电荷影响最为显著($p < 0.05$)。壳聚糖的相对分子质量对纳米微囊表面电荷影响不大($p > 0.05$)。随着壳聚糖相对分子质量和脱乙酰度的增加, 包封率逐渐增大, 但变化不明显($p > 0.05$)。

表1 不同种类壳聚糖表面修饰对纳米微囊物化性质的影响

| 类型 | 平均粒径/nm | 粒径分布指数 | Zeta电位值/mV | 包封率/% |
|------------------------|---------|--------|------------------------|-----------------------|
| 对照组 | 162 | 0.128 | -23.7±1.4 ^a | 84.2±3.7 ^a |
| 相对分子质量50 kDa, 脱乙酰度95% | 123 | 0.175 | 56.1±1.9 ^b | 72.7±4.3 ^b |
| 相对分子质量100 kDa, 脱乙酰度95% | 205 | 0.149 | 58.2±1.6 ^{bc} | 85.3±2.4 ^a |
| 相对分子质量150 kDa, 脱乙酰度95% | 346 | 0.252 | 56.4±1.7 ^b | 87.4±3.1 ^a |
| 相对分子质量120 kDa, 脱乙酰度85% | 214 | 0.198 | 36.9±1.1 ^c | 81.6±4.2 ^a |
| 相对分子质量120 kDa, 脱乙酰度90% | 229 | 0.165 | 47.7±1.6 ^d | 84.1±3.8 ^a |
| 相对分子质量120 kDa, 脱乙酰度95% | 232 | 0.133 | 60.8±1.4 ^e | 85.6±3.2 ^a |

数据表示为平均值±标准差(n=3); ^{a-e}在同一列字母中, 相同则表示差异不显著, 不同则表示差异显著($p < 0.05$)。

2.2 卡波姆修饰的黏附纳米微囊的物化性质

不同类型的卡波姆修饰纳米微囊的粒径大小及其分布、Zeta电位和包封率结果列于表2。卡波姆934P和974P修饰的纳米微囊平均粒径大小相近, 卡波姆934P修饰纳米微囊的粒径分布更窄些。相比之下, 卡波姆971P修饰的纳米微囊的平均粒径较小, 粒径分布指数较大。与对照组未经修饰的纳米微囊相比, 经卡波姆表面修饰后, 使纳米微囊的表面电荷呈现更大的负电性, 卡波姆934P、971P和974P修饰纳米微囊的

表面Zeta电位值差别不显著 ($p>0.05$)。934P和974P修饰纳米微囊的包封率相近, 971P 修饰纳米微囊的包封率相对较低。

表2 不同型号的卡波姆修饰对纳米微囊物化性质的影响

| 类型 | 平均粒径 /nm | 粒径分布指数 | Zeta电位值 /mV | 包封率/% |
|---------|----------|--------|------------------------|-----------------------|
| 对照组 | 162 | 0.128 | -23.7±1.4 ^a | 84.2±3.7 ^a |
| 934P 型号 | 286 | 0.136 | -30.4±1.2 ^b | 90.4±2.3 ^a |
| 971P 型号 | 228 | 0.273 | -28.6±1.1 ^b | 70.1±3.4 ^b |
| 974P 型号 | 291 | 0.172 | -30.9±1.1 ^b | 88.9±3.1 ^a |

数据表示为平均值±标准差 (n=3); ^{a-b}在同一列字母中, 相同则表示差异不显著, 不同则表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.3 壳聚糖/卡波姆协同修饰的黏附纳米微囊的物化性质

从上述试验结果可以看出, 相对分子质量为120 kDa、脱乙酰度为95%的壳聚糖和934P型号的卡波姆作为修饰材料制备的纳米微囊粒径、表面Zeta电位和包封率较好。因此, 接下来的试验选择这两种作为黏附材料, 比较不同质量比(1:2, 1:1, 2:1)的壳聚糖/卡波姆协同修饰纳米微囊的物化性质, 列于下表3中。随着壳聚糖/卡波姆中壳聚糖比例的增大, 纳米微囊的粒径越来越小, 粒径分布指数变化不大, 表面Zeta电位值越来越高 ($p<0.05$)。包封率随着壳聚糖比例的升高有降低的趋势, 但都不低于85% ($p>0.05$)。

表3 不同类型的壳聚糖和卡波姆修饰对纳米微囊物化性质的影响

| 类型 | 平均粒径/nm | 粒径分布指数 | Zeta电位值 /mV | 包封率/% |
|---------------------------|---------|--------|------------------------|-----------------------|
| 对照组 | 162 | 0.128 | -23.7±1.4 ^a | 84.2±3.7 ^a |
| 相对分子质量120 kDa、脱乙酰度95%的壳聚糖 | 232 | 0.133 | 60.8±1.4 ^b | 85.6±2.6 ^a |
| 934P型号的卡波姆 | 286 | 0.136 | -30.4±1.2 ^c | 90.4±2.3 ^a |
| 壳聚糖/卡波姆 (质量比: 1:2) | 264 | 0.142 | 16.9±1.0 ^d | 89.1±3.1 ^a |
| 壳聚糖/卡波姆 (质量比: 1:1) | 251 | 0.135 | 33.5±1.3 ^e | 87.6±4.2 ^a |
| 壳聚糖/卡波姆 (质量比: 2:1) | 242 | 0.141 | 47.9±1.1 ^f | 85.9±3.8 ^a |

数据表示为平均值±标准差 (n=3); ^{a-f}在同一列字母中, 相同则表示差异不显著, 不同则表示差异显著 ($p<0.05$)。

2.4 黏膜黏附试验

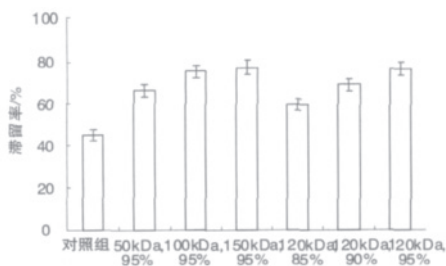


图1 不同种类壳聚糖表面修饰对纳米微囊的小肠黏膜黏附性能的影响

本研究分别考察了壳聚糖、卡波姆单独修饰以及协同修饰纳米微囊在大鼠离体小肠黏膜的滞留率。从图1中可以看出, 对于相同的脱乙酰度(95%), 壳聚

糖相对分子质量越大, 小肠黏膜滞留率越高。当壳聚糖的相对分子质量大于100 kDa时, 小肠黏膜的滞留率变化不显著 ($p>0.05$)。对于相同的相对分子质量(120 kDa), 小肠黏膜滞留率随壳聚糖脱乙酰度的增大而显著升高 ($p<0.05$)。

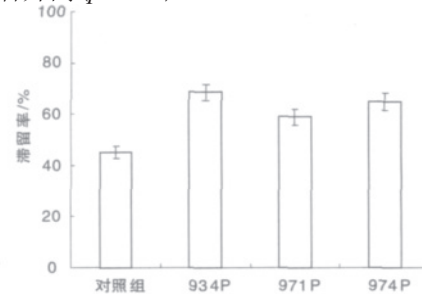


图2 不同种类卡波姆表面修饰对纳米微囊的小肠黏膜黏附性能的影响

图2比较了三种不同型号的卡波姆修饰对纳米微囊的小肠黏膜滞留率的影响。卡波姆934P修饰纳米微囊的小肠黏膜滞留率最高。

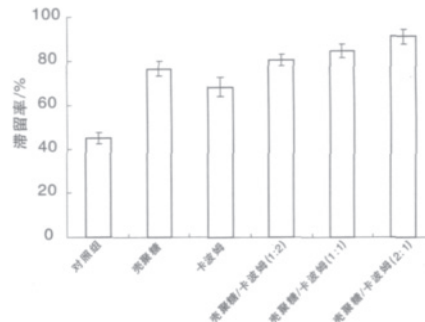


图3 壳聚糖和卡波姆协同表面修饰对纳米微囊的小肠黏膜黏附性能的影响

从图3中可以看出, 壳聚糖、卡波姆修饰纳米微囊在小肠黏膜的滞留率均明显高于未修饰的聚乳酸纳米微囊 ($p<0.05$)。壳聚糖修饰纳米微囊的小肠黏膜滞留率高于卡波姆修饰的纳米微囊, 不同比例的壳聚糖/卡波姆协同修饰纳米微囊的滞留率均高于壳聚糖和卡波姆单独修饰, 当修饰材料壳聚糖和卡波姆质量比为2:1时, 纳米微囊的黏附性最高, 在小肠黏膜的滞留率可达(91.1±3.4%)。

在众多黏附材料中, 以壳聚糖和卡波姆的应用和研究最广泛^[8-10]。卡波姆修饰的纳米微囊与肠黏膜黏蛋白的生物黏附主要为氢键作用。壳聚糖不仅能与肠黏膜中的糖蛋白形成氢键, 而且能够调节微囊表面的电荷为正, 与带负电荷的黏蛋白产生电荷吸引作用, 使得这种黏附作用更强^[11]。当m(壳聚糖):m(卡波姆)=2:1协同作用来修饰纳米微囊时, 能达到最好的黏附效果。可能的原因, 壳聚糖分子和卡波姆分子在微囊表面存在某种相互作用, 壳聚糖与糖蛋白之间的氢键、与黏蛋白之间的正负电荷吸引以及卡波姆与黏蛋白之间的氢键同时起作用, 相互促进产生协同效应, 使纳米微囊的肠黏膜黏附性能达到最佳状态。

γ-氨基丁酸的生理功能及在食品中应用的研究进展

周小理¹, 赵琳²

1. 上海应用技术学院, 香料香精技术与工程学院 (上海 200235)

2. 上海师范大学, 生命与环境科学学院 (上海 200234)

摘要 GABA是一种四碳非蛋白氨基酸, 是哺乳动物中枢神经重要的神经传递抑制素。该文介绍了γ-氨基丁酸分子结构、理化性质、在植物中的代谢途径以及生理功能。阐述了GABA在食品中的应用现状及前景。

关键词 γ-氨基丁酸; 食品; 应用

Physiological function of GABA and its application in food

Zhou Xiao-li¹, Zhao Lin²

1. School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai institute of technology (Shanghai 200235)

2. College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University (Shanghai 200234)

Abstract GABA, a four-carbon non-protein amino acid, is the major inhibitory neurotransmitter in mammalian brain. The study introduced the molecular structure, essential physiological property, mechanism and physiological function of gamma-amino butyric acid (GABA). The application of GABA in food industry is introduced as well, and the paper forecasts the application of GABA in food industry.

Keywords γ-amino butyric acid(GABA); food; application

γ-氨基丁酸(gamma-amino butyric acid, GABA)是一个四碳非蛋白氨基酸, 它广泛存在于动物、植物和微生物中。长期以来, GABA仅仅被认为是植物或微

生物的代谢产物。1950年, GABA在哺乳动物的中枢神经系统首次被发现, 并被认为是哺乳动物中枢神经重要的神经传递抑制素, 在调节神经元兴奋度上起着重

3 结论

不同相对分子质量和脱乙酰度的壳聚糖和不同型号的卡波姆表面修饰对纳米微囊的粒径、表面电荷和包封率具有一定的影响。相对分子质量为120 kDa、脱乙酰度为95%的壳聚糖和934P型号的卡波姆作为修饰材料制备的纳米微囊粒径大小均匀、Zeta电位绝对值和包封率较高。壳聚糖、卡波姆单独修饰以及壳聚糖/卡波姆协同修饰均能够延长乳糖酶纳米微囊在小肠黏膜的滞留。壳聚糖/卡波姆(质量比: 2:1)修饰的乳糖酶纳米微囊在小肠黏膜滞留率最高, 可达(91.1±3.4)%。

参考文献:

- [1] Rao DR, Chawan CB, Veeramachaneni R. Liposomal encapsulation of β-galactosidase: Comparison of two methods of encapsulation and in vitro lactose digestibility[J]. J Food Biochem, 1995, 18: 239-251.
- [2] Kwak HS, Ihm MR, Ahn J. Microencapsulation of β-galactosidase with fatty acid esters[J]. J Dairy Sci, 2001, 84: 1576-1582.
- [3] Ratzinger G, Wang XY, Wirth M, et al. Targeted PLGA microparticles as a novel concept for the treatment of lactose intolerance[J]. J Control Rel, 2010, 147: 187-192.
- [4] Stivaktakis N, Nikou K, Panagi Z, et al. PLA and PLGA microspheres of β-galactosidase: Effect of formulation

factors on protein antigenicity and immunogenicity[J]. J Biomed Mater Res Part A, 2004, 70A: 139-148.

- [5] 武波波, 李文献, 王少武, 等. 微胶囊化中性蛋白酶的技术研究[J]. 中国乳品工业, 2009, 37: 27-30.
- [6] 贾英民. 乳糖酶高产菌株分离筛选、发酵产酶及酶学性质的研究[D]. 河北农业大学硕士论文, 2004, 10.
- [7] Bravo-Osuna I, Vauthier C, Farabollini A, et al. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles[J]. Biomaterials, 2007, 28: 2233-2243.
- [8] Cui FY, Qian F, Yin CH. Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles[J]. Int J Pharm, 2006, 316: 154-161.
- [9] Guo JH. Investigating the bioadhesive properties of polymer patches for buccal drug delivery[J]. J Control Rel, 1994, 28: 272-279.
- [10] Takeuchi H, Matsui Y, Yamamoto H, et al. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats[J]. J Control Rel, 2003, 86: 235-242.
- [11] Hassan EE, Gallo JM. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength[J]. Pharm Res, 1990, 7: 491-495.