

# 断层扫描成像法研究荧光标记酥油微胶囊微结构

石 燕, 郑为完, 邹 金, 张雪春, 刘 凡

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学食品科学与工程系, 江西 南昌 330047

**摘 要** 用异硫氰酸荧光素作为荧光探针, 在碱性条件下标记酪蛋白, 根据标记前后吸收光谱、荧光光谱的变化情况对异硫氰酸荧光素和酪蛋白相互作用进行了初步探讨。用 SephadexG-50 层析柱分离出荧光标记物, 以荧光标记酪蛋白作乳化剂, 采用喷雾干燥法制备荧光标记酥油微胶囊, 用激光扫描共聚焦显微镜在 488 nm 的 Ar<sup>+</sup> 激光光源激发下断层扫描酥油微胶囊微结构。结果表明, 酪蛋白是在油水界面膜和微胶囊表面聚结。制备出的酥油微胶囊有单核和多核两种形式, 微胶囊为园球形, 表面光滑, 无裂缝, 无凹陷, 微胶囊壁表面完整, 壁结构较为致密, 其颗粒尺寸为有明显差异的大小颗粒组成, 而且小颗粒附着在大颗粒上, 形成了部分附聚粉, 有助于微胶囊溶解, 是一种较为理想的微胶囊制品。

**关键词** 断层扫描成像; 荧光标记; 微结构; 微胶囊; 酥油

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)03-0719-04

## 引 言

微胶囊技术是当今发展迅速且应用广泛的高新技术之一, 在食品<sup>[1,2]</sup>、医药<sup>[3,4]</sup>、生物技术<sup>[5,6]</sup>、化工材料<sup>[7]</sup>等许多领域中得到了广泛应用。微胶囊技术可以使许多传统技术不可能解决的问题得以解决, 特别是在食品工业中, 过去由于技术水平不高而不能开发的一些食品成分, 现今通过微胶囊技术得以开发生产, 因此国际上将微胶囊技术列入 21 世纪重点发展和推广应用的新技术之一。然而对于微胶囊技术本身, 在基础理论上还有一些问题需要深入研究, 特别是对微胶囊微结构研究尚无一个统一的理论指导, 这样在一定程度上限制了微胶囊技术的发展。

激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)是 20 世纪 80 年代中期发展起来并得到广泛应用的新技术, 在传统光学显微镜基础上, LSCM 用激光作为光源, 采用共轭聚焦原理和装置, 并利用计算机对所观察的对象进行数字图像处理观察、分析和输出。其特点是可以对样品进行断层扫描和成像, 进行无损观察和分析细胞的三维空间结构<sup>[8,9]</sup>, 在生物、医学等研究领域应用中应用极其广泛<sup>[10,11]</sup>。LSCM 也可以对食品结构进行二维和三维的断层扫描<sup>[12]</sup>, 从而获得食品微观结构的二维和三维图像, 包括微观结构的形态, 孔隙大小等。因此, 把 LSCM 应用于食品体系结构研究, 特别是微胶囊微结构研究是一项新技术在新领域的应用。

异硫氰酸荧光素(FITC)为荧光免疫分析中常见的荧光探针之一, 其量子产率高, 有较好的光稳定性和低温度系数。在碱性条件下, FITC 分子中的异硫氰基可直接与蛋白质中的氨基(主要为赖氨酸的  $\epsilon\text{-NH}_2$ )经碳酰化反应形成硫碳氨基键, 成为荧光蛋白标记<sup>[13,14]</sup>。本文选择异硫氰酸荧光素作为荧光探针, 在碱性条件下标记酪蛋白, 以荧光标记酪蛋白作乳化剂, 制备荧光标记酥油微胶囊, 采用 LSCM 研究微胶囊微结构, 这方面研究还未见文献报道。

## 1 实验部分

### 1.1 原料与试剂

酥油(西藏宝信食品有限公司提供), 酪蛋白(国外进口); 异硫氰酸荧光素( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Johnson Matthey Company), SephadexG-50 (Sigma), 碳酸盐缓冲溶液(pH 9.60), 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4), 二次蒸馏水, 磷酸氢二钠(A. R.), 柠檬酸三钠(A. R.), 乳化剂、麦芽糊精、稳定剂均为食品级。

### 1.2 仪器与设备

Leica TCS SP2 激光扫描共聚焦显微镜(德国 Leica 公司), F-4500 型荧光分光光度计(日本 HITACHI 公司), UV-8500PC 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司), 层析柱( $1.6 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$ )(上海厦美生化科技发展有限公司), 自动收集器(BSZ-16)(上海青浦沪西仪器厂), 恒

收稿日期: 2010-05-02, 修订日期: 2010-08-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(20766004)和食品科学与技术国家重点实验室自由探索资助课题(SKLF-TS-200924)资助

作者简介: 石 燕, 1964 年生, 南昌大学食品科学与工程系副教授 e-mail: kwei@ncu.edu.cn

流泵(HL-1)(上海青浦沪西仪器厂), SLS 高压均质机(上海申鹿均质机有限公司), MDR·P-5 型离心、压力喷雾干燥机(锡山市现代喷雾干燥机厂), pHs-2C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂), GKC 可控硅恒温水浴锅(上海锦屏仪器仪表有限公司), RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 凝胶柱的制备

称取一定量的 SephadexG-50 干燥颗粒, 加入一定体积的水, 放入水浴锅中将湿凝胶逐渐升温至沸腾, 加热 2~3 h, 赶去气泡, 装入层析柱(1.6 cm×40 cm)中。

#### 1.3.2 荧光标记方法

准确称取一定量的酪蛋白置于 5 mL 比色管中, 依次加入 1.5 mL 水, 0.5 mL 碳酸盐缓冲溶液, 摇匀后缓慢滴加 0.1 mL FITC 溶液(0.1 mg·mL<sup>-1</sup>), 混合均匀后避光置于冰箱(4 ℃)中反应 12 h, 定容至 25 mL 容量瓶, 摇匀, 取一定量的反应液对 PBS 透析、过 SephadexG-50 层析柱, 分离出荧光标记物(酪蛋白-FITC), 采用荧光光谱法和紫外光谱法进行检测, 收集, 备用。

#### 1.3.3 紫外-可见吸收光谱的测定

用 UV-8500PC 型紫外-可见分光光度计扫描酪蛋白, FITC 及酪蛋白-FITC 的吸收光谱。

#### 1.3.4 荧光光谱测定

分别固定激发波长  $\lambda_{ex} = 290$  nm,  $\lambda_{ex} = 488$  nm, 激发狭缝 2.5 nm, 发射狭缝 2.5 nm, 测定酪蛋白, FITC 及酪蛋白-FITC 的荧光光谱。

#### 1.3.5 含有荧光标记物的酥油微胶囊的制备

将收集到的荧光标记物(酪蛋白-FITC)溶液通过旋转蒸发仪进行浓缩, 根据一定的配比, 按下列工艺流程制备含有荧光标记物的酥油微胶囊。

酥油→加热溶解→离心分层(脱水去杂)→精酥油  
精酥油+乳化剂  
↓  
混合→均质→喷雾干燥→筛分→成品

麦芽糊精+水+稳定剂+乳化剂(标记了 FITC 的酪蛋白)

#### 1.3.6 激光扫描共聚焦显微镜观察酥油微胶囊微结构

在 488 nm 的 Ar<sup>+</sup> 激光光源激发下, 对荧光标记的酥油微胶囊进行断层扫描。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酪蛋白-FITC 的紫外-可见吸收光谱

图 1 为酪蛋白, FITC 及酪蛋白-FITC 的吸收光谱, FITC 的最大吸收峰为 492 nm, 加入酪蛋白后, 最大吸收峰为 494 nm, 位移了 2 nm, 且吸收峰下降。酪蛋白最大吸收峰为 276.5 nm, 加入 FITC 后, 吸收峰位置不变, 吸收峰强度略有改变。这说明在酪蛋白中加入荧光探针 FITC 后, 酪蛋白结构基本不变。

### 2.2 酪蛋白-FITC 的荧光光谱

图 2 为酪蛋白, FITC 及酪蛋白-FITC 的荧光光谱, 图 2

(a) 激发波长  $\lambda_{ex} = 290$  nm, 酪蛋白的荧光发射波长  $\lambda_{em} = 350$  nm, 酪蛋白-FITC 的荧光发射波长仍为 350 nm, 酪蛋白中加入 FITC 后, 蛋白质的发射波长没有改变, 但荧光强度增加了。FITC 在此激发波长下没有吸收。图 2(b) 激发波长  $\lambda_{ex} = 488$  nm, FITC 的荧光发射波长  $\lambda_{em} = 523.4$  nm, 酪蛋白-FITC 的荧光发射波长  $\lambda_{em} = 523$  nm, FITC 中加入酪蛋白后, 发射波长略有位移, 荧光强度减少, 酪蛋白对 FITC 荧光发生了猝灭作用。酪蛋白在此激发波长无荧光吸收。

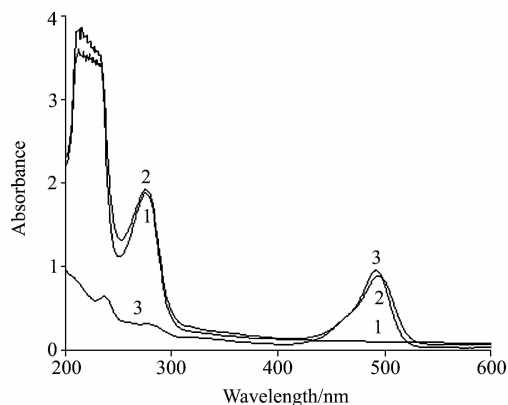


Fig. 1 Absorption spectra of casein-FITC

1: Casein; 2: Casein-FITC; 3: FITC

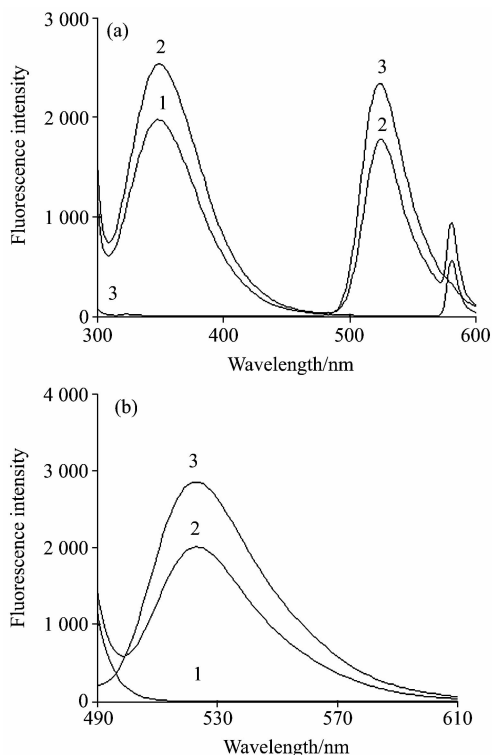


Fig. 2 Fluorescence spectra of casein-FITC

1: Casein; 2: Casein-FITC; 3: FITC

### 2.3 激光扫描共聚焦显微镜研究酥油微胶囊结构

#### 2.3.1 表面超微结构

图 3 为激光扫描共聚焦显微镜下观测到的酥油微胶囊表面超微结构, 图 3(a) 为未加荧光探针的微胶囊, 图 3(b) 为用

荧光探针 FITC 标记乳化剂酪蛋白后,微胶囊表面发出绿色荧光。微胶囊为球形,表面光滑,无裂缝,无凹陷,其颗粒尺寸为明显差异的大小颗粒组成,而且小颗粒附着在大颗粒上,形成了部分附聚粉。

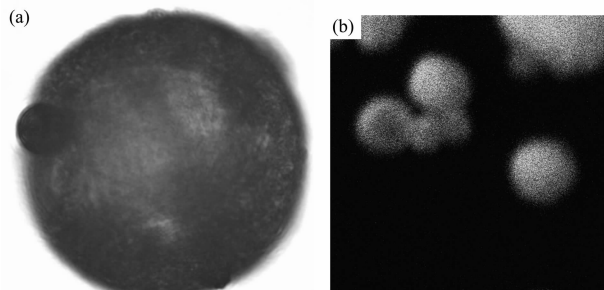


Fig. 3 Surface microstructure of ghee microencapsulation

### 2.3.2 内部超微结构

激光共聚焦扫描显微镜断层扫描得到微胶囊酥油内部超微结构(图 4),结果表明微胶囊存在多核(a)和单核(b)两种形式。这是因为,在喷雾干燥过程中,水先从雾滴表面蒸发,并在表面形成固相,逐步扩展形成固体壁膜,壁膜内包含的壁材溶液再进一步干燥。当内部的溶液透过壁膜表面蒸发时可造成壁膜上出现孔洞,溶剂通过壁膜扩散蒸发速度对形成孔洞有很大影响。在溶剂蒸发过程中易形成球形包覆膜,这种包覆膜可以围绕一个或几个囊心液滴形成<sup>[15]</sup>。

### 2.3.3 蛋白质在酥油微胶囊化过程中的聚结

将制备出的含有荧光标记物的微胶囊在 488 nm 的  $Ar^+$

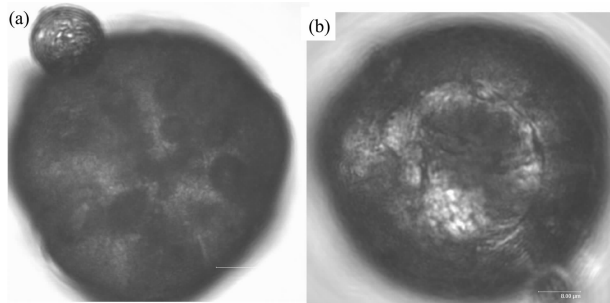


Fig. 4 Inner microstructure of ghee microencapsulation

激光光源激发下,断层扫描,在激光共聚焦扫描显微镜下观测酥油微胶囊内部超微结构(图 5)。用荧光探针 FITC 标记乳化剂酪蛋白后,微胶囊发出绿色荧光。

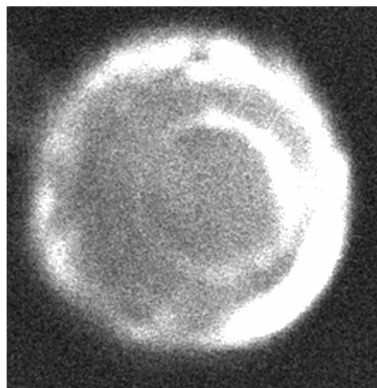


Fig. 5 Inner microstructure of ghee microencapsulation

从图 5 可以看到,在芯材和壁材界面以及微胶囊表面有绿色荧光出现,也就是说酪蛋白聚集在这两个位置,这是因为,在喷雾干燥时在 O/W 体系微胶囊壁结构的形成过程中,由于蛋白质分子具有表面活性,能够降低表面张力,倾向于向液滴表面与油水界面膜聚结<sup>[16]</sup>。实验结果表明,绿色荧光包裹在芯材界面和微胶囊表面,这也进一步说明了酪蛋白是在油水界面膜和微胶囊表面聚结。

## 3 结 论

荧光探针 FITC 标记酪蛋白制备的酥油微胶囊有单核和多核两种形式,微胶囊为园球形,表面光滑,无裂缝,无凹陷,微胶囊壁表面完整,壁结构较为致密,其颗粒尺寸为有明显差异的大小颗粒组成,而且小颗粒附着在大颗粒上,形成了部分附聚粉,有助于微胶囊溶解。同时,绿色荧光包裹在芯材和壁材界面及微胶囊表面,说明酪蛋白是在油水界面膜和微胶囊表面聚结,增强了微胶囊成膜性。断层扫描成像法研究微胶囊微结构优势明显,可以为油脂微胶囊化工艺技术提供理论指导。

## References

- [ 1 ] Maria Inês Teixeira, Leonardo R Andrade, Marcos Farina, et al. *Materials Science and Engineering*, 2004, 24(5): 653.
- [ 2 ] Drusch S, Berg S. *Food Chemistry*, 2008, 109(1): 17.
- [ 3 ] Biju S S, Saisivam S, Maria Gerald Rajan N S, et al. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, 58(1): 61.
- [ 4 ] Zhang Fu, Wu Qi, Liu Li-jun, et al. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 357(1): 22.
- [ 5 ] Ehab Taqieddin, Mansoor Amiji. *Biomaterials*, 2004, 25(10): 1937.
- [ 6 ] Ma J, Qi W T, Yang L N, et al. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(1): 172.
- [ 7 ] Wang J P, Zhao X P, Guo H L. *Optical Materials*, 2008, 30(8): 1268.
- [ 8 ] Guo H X, Heinämäki J, Yliruusi J. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 186(2): 99.
- [ 9 ] Lamprecht A, Schfer U F, Lehr C-M. *European Journal of Pharmaceutics and Ciopharmaceutics*, 2000, 49(1): 1.
- [ 10 ] Halbhuber Karl-Jürgen, König Karsten. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2003, 185(1): 1.
- [ 11 ] Roldán J C, Chang E, Kelantan M, et al. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2010. 1.
- [ 12 ] Chen Pei, Yu Long, Simon George, et al. *Journal of Cereal Science*, 2009, 50(2): 241.

- [13] DAI Guo-liang, DAI Lian-hua, YU Yong, et al(戴国亮, 代莲花, 于泳, 等). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 2005, 63(7): 559.
- [14] Johan Benesch, Graham Hungerford, Klaus Suhling, et al. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, 312(2): 193.
- [15] LIANG Zhi-qi(梁治齐). *Microcapsule Technology and Application*(微胶囊技术及其应用). Beijing: China Light Industry Press(北京: 中国轻工业出版社), 1999. 113.
- [16] ZHU Xuan, HUANG Hui-ming, XU Shi-ying(朱选, 黄慧敏, 许时婴). *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology* (中国食品学报), 2003, 3(1): 32.

## Study on the Microstructure of Fluorescent Labelling Ghee Microcapsules by Tomoscan Imaging

SHI Yan, ZHENG Wei-wan, ZOU Jin, ZHANG Xue-chun, LIU Fan

State Key Laboratory of Food Science and Technology and Department of Food Science and Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China

**Abstract** In the present paper, fluorescein isothiocyanate was chosen as a fluorescence probe to mark casein protein in alkaline conditions. The interaction of the casein protein marked or not marked and fluorescein isothiocyanate was preliminarily discussed by the spectrum changes of UV-absorption and fluorescence spectrometry. Fluorescent marker was separated from SephadexG-50 chromatography column. With it as an emulsifier, the fluorescently-labeled ghee microcapsules were prepared by spray drying. And using laser scanning confocal microscope by tomoscan imaging to detect the microstructure of ghee microcapsules with the excitation of 488 nm argon-ion laser, the results showed that the casein protein assembled in the membrane surface of oil-water interface and microcapsules. The ghee microcapsules had two forms, namely mononuclear and multinuclear. The microcapsule was spherical. Its surface was smooth with no crack and no hollow. Its wall surface was intact and wall structure was relatively dense. The particle size showed obvious difference. Small particles attached to large particles, forming partial agglomerating powders to contribute to enhancing the solubility of microcapsules. These prove that the ghee microcapsule is an ideal microcapsule product.

**Keywords** Tomoscan imaging; Fluorescent labelling; Microstructure; Microcapsule; Ghee

(Received May 2, 2010; accepted Aug. 6, 2010)