韩田田, 叶可, 裘天航, 等. 壳聚糖-Ca^{2+}协同增强虾青素纳米分散体的稳定性及其机制探究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(16): 86−94. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070186

HAN Tiantian, YE Ke, QIU Tianhang, et al. Investigation into the Synergistic Enhancement of Astaxanthin Nanodispersion Stability by Chitosan-Ca^{2+} and Its Underlying Mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(16): 86−94. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070186

·研究与探讨·

壳聚糖-Ca^{2+}协同增强虾青素纳米分散体的稳定性及其机制探究

韩田田[1], 叶　可[1], 裘天航[1], 罗　路[2], 陈小娥[1], 张　晶[1,*], 程　铭[1,*]

（1.浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江舟山 136000;
2.浙江海洋大学船舶与海运学院, 浙江舟山 136000）

摘　要: 为提高虾青素（Astaxanthin，AST）的稳定性和生物利用率，以大豆分离蛋白（Soy protein isolates，SPI）为原料，制备了包埋虾青素的 SPI/壳聚糖（Chitosan，CS）复合纳米颗粒，探究 CS 对虾青素包埋率的影响。然后，引入 Ca^{2+}作为稳定剂，探究 Ca^{2+}对 SPI/CS/AST 纳米分散体稳定性的影响及其作用机制。结果表明，当 CS 浓度为 0.6 mg/mL 时，AST 的包埋率达到 59.57%，比不加 CS 时提高了 11%。在该 CS 浓度下，当 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL 时，虾青素的包埋率进一步提升为 73.55%，比不加 Ca^{2+}提高了 20%。同时，在储藏温度为 4 ℃ 时，AST 的保留率比不加 Ca^{2+}时提高了 14%。在紫外照射下，0.2 mg/mL Ca^{2+}对纳米分散体中虾青素的保护效果最佳，比不加 Ca^{2+}提高了 23%，且包埋后的 AST 在模拟胃液和模拟肠液中的保留率达 78.35% 和 67.18%。紫外和荧光光谱分析显示，Ca^{2} 通过离子键桥连、静电中和及构象调节作用影响纳米分散体的氢键和疏水相互作用，从而提升其稳定性。综上，本研究通过 SPI/CS 复合壁材与 Ca^{2+}协同作用，成功构建了高稳定性的 AST 纳米递送体系，为 AST 在功能食品开发中的应用提供了理论依据。

关键词: 虾青素, Ca^{2+}, 壳聚糖, 纳米分散体, 稳定性

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)16−0086−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070186　　本文网刊:

Investigation into the Synergistic Enhancement of Astaxanthin Nanodispersion Stability by Chitosan-Ca^{2+} and Its Underlying Mechanism

HAN Tiantian[1], YE Ke[1], QIU Tianhang[1], LUO Lu[2], CHEN Xiao'e[1], ZHANG Jing[1,*], CHENG Ming[1,*]

（1.College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 136000, China;
2.School of Naval Architecture and Maritime, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 136000, China）

Abstract: To enhance the stability and bioavailability of astaxanthin (AST), soy protein isolates (SPI) were used as the raw material to prepare SPI/chitosan (CS) composite nanoparticles for the encapsulation of AST. The study investigated the effect of CS on the encapsulation efficiency of AST. Ca^{2+} were then introduced as stabilizer to investigate their effect on the stability of the SPI/CS/AST nanodispersion and to elucidate the underlying mechanism. The results demonstrated that at a CS concentration of 0.6 mg/mL, the encapsulation efficiency of AST reached 59.57%, representing an 11% increase compared to samples without CS. Under this CS concentration, when Ca^{2+} was added at 0.2 mg/mL, the AST encapsulation efficiency further rose to 73.55%, a 20% improvement over samples without Ca^{2+}. Moreover, at a storage temperature of 4 ℃,

收稿日期: 2025−07−17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目（32502156）;浙江海洋大学引进人才科研专项基金（JX6311131023）。

作者简介: 韩田田（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物的提取与开发, E-mail: 19858054908@163.com。

*** 通信作者:** 张晶（1994−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品微生物资源开发与功能食品, E-mail: 2022152@zjou.edu.cn。
程铭（1993−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品资源开发与利用, E-mail: chengm@zjou.edu.cn。

the retention rate of AST increased by 14% with Ca^{2+} addition. Under ultraviolet irradiation, 0.2 mg/mL Ca^{2+} provided the most effective protection for AST within the nanodispersion, enhancing retention by 23% compared to those without Ca^{2+}. Furthermore, the retention rates of encapsulated AST in simulated gastric and intestinal fluids reached 78.35% and 67.18%, respectively. Ultraviolet and fluorescence spectroscopy analysis revealed that Ca^{2+} enhanced stability by influencing hydrogen bonds and hydrophobic interactions in the nanodispersion through ionic bridging, electrostatic neutralization, and conformational regulation. In summary, this study successfully established a highly stable AST nano-delivery system through the synergistic effect of SPI/CS composite wall materials and Ca^{2+}, providing a theoretical basis for the application of AST in the development of functional foods.

Key words: astaxanthin; Ca^{2+}; chitosan; nanodispersion; stability

虾青素(Astaxanthin, AST)是一种酮类类胡萝卜素，红色固体粉末，不溶于水，可溶于乙醇、乙酸乙酯和二甲基亚砜等有机溶剂[1]。AST 具有优异的抗氧化、抗癌和抗炎等生物学活性[2]，广泛应用于食品[3]、药品[4] 和化妆品[5] 行业。AST 的多种生理功能主要源于其分子结构中存在的酮基、羟基和长链共轭不饱和双键[6]。然而，这种特殊结构也使 AST 对光、热和氧等因素敏感，在加工储藏过程中不稳定，易发生异构化和降解。由于水溶性差、在生物体内分散性不佳等特性，AST 存在生物利用率较低的问题，这极大地限制了其实际应用[7]。研究发现，利用蛋白质和多糖构建的复合纳米递送系统可显著提升虾青素的稳定性，并能有效保护虾青素免受环境因素降解，还可改善其水溶性和肠道吸收效率，使生物活性得到充分发挥[8−10]。

壳聚糖(Chitosan, CS)是由几丁质脱乙酰得到的一种线性多糖，由氨基葡萄糖通过 β-1,4 糖苷键连接而成的碱性多糖，具有增黏性、保湿性、生物相容性等诸多优良特性，被广泛应用于复合输送系统。作为地球上第二丰富的生物聚合物，CS 在自然界含量很高，仅次于纤维素[11]。CS 因其公认的高生物相容性，生物降解性和生物粘附性而被认定为制备纳米颗粒的良好载体。CS 中的氨基和羟基可以与蛋白质交联形成稳定的复合物[12]，这种结合通过静电相互作用发生，在颗粒的变性和聚集中提供干扰，使乳液更加稳定继而获得更高的封装效率。带负电荷的蛋白质可以与带正电荷的 CS 分子产生静电相互作用，主要用于生产负载营养保健品的聚电解质复合物[13]。Chen 等[14] 使用 CS 和玉米醇溶蛋白交联形成纳米复合物对槲皮素进行包埋，槲皮素在纳米复合物中表现出良好的光、热和储存稳定性，并且玉米醇溶蛋白-CS 纳米复合物还可以控制消化过程中槲皮素的释放。

静电相互作用是蛋白质与多糖复合的主要驱动力，但静电相互作用力较弱，并且纳米分散体因其颗粒尺寸微小，具有极高的比表面积，容易发生聚集和沉降，导致纳米分散体的稳定性较差[9]。多糖、蛋白质等聚电解质可以与带有相反电荷的小分子通过离子交联形成纳米颗粒[10]。离子交联法操作简便、条件可控、细胞毒性低、生物相容性好、包封率高，已广泛应用于医药、农业、环境和食品等领域[15−16]。Ca^{2+}通常作为离子交联剂，以提高递送体系的稳定性。Teng 等[17] 通过由 Ca^{2+}诱导的离子凝胶化法，制备包埋脂溶性维生素 D3 的大豆分离蛋白(Soy protein isolates, SPI)和羧甲基壳聚糖复合纳米颗粒，包封率高达 96.8%，并且使维生素 D3 在胃肠道环境中具有良好的控释效应。de Moura 等[18] 用木槿提取物、菜籽油和果胶制备了 W/O/W 乳液，并以氯化钙作为离子交联剂制备了木槿提取物花青素微胶囊，包埋率高达 93.9%，并提高了花青素的稳定性。

因此，本文以 SPI 和 CS 为壁材制备 SPI/CS/AST 纳米分散体，评价不同 CS 浓度的纳米分散体对 AST 包埋率的影响。进一步添加不同浓度的 Ca^{2+}使用离子交联法制备纳米分散体，通过形成稳态化纳米分散体以提高虾青素的稳定性和保留率，并判断 SPI/CS/AST 纳米分散体在形成过程中涉及的相互作用机制，为 AST 在食品领域的应用提供参考价值。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

AST(纯度 ≥96%)、CS(脱乙酰度≥90%)、胰蛋白酶(10000 U/mg)、猪胆盐(生化试剂)　麦克林生化技术有限公司；SPI(纯度≥91%)　江苏燕科生物工程有限公司；乙醇、丙酮、乙酸、无水氯化钙(生化试剂)　国药集团化学试剂有限公司；尿素(≥99%)　中国山东有限公司；其他试剂均为分析纯。

XS205 电子分析天平、FE20K pH 计　梅特勒-托利多仪器上海有限公司；UV-1800 紫外分光光度计　日本岛津有限公司；F-7000 荧光光谱仪　日本日立公司；FreeZone 真空冷冻干燥机　美国 Labconco 公司；Thermo ST8R 高速冷冻离心机　美国赛默飞世尔科技公司；HJ-4 磁力搅拌器、RV 8 真空旋转蒸发仪　德国 IKA 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　SPI/CS/AST 纳米分散体的制备　参考 Zhao 等[19] 的方法制备 SPI/CS/AST 纳米分散体并稍作修改。将 SPI 粉末溶解在蒸馏水中，在室温下充分搅拌 1 h 制得 1.0 mg/mL 的 SPI 溶液。将 CS 用 2% 的乙酸溶解，按 0、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mg/mL 的浓度分别加入 SPI 溶液中，充分混合后置于 80 ℃ 水浴 20 min 形成 SPI/CS 复合物，冷却至室温备用。将 AST 溶于无水乙醇中，在室温避光的条件下磁力

搅拌 1 h, 得到浓度为 300 μg/mL 的 AST 乙醇溶液, 按照 1∶2(v/v)的比例混合 AST 溶液和 SPI/CS 复合物。然后旋转蒸发除去乙醇, 得到 SPI/CS/AST 纳米分散体。

1.2.2 虾青素包埋率的测定 根据 Gu 等[20] 的方法并稍作修改。准确移取 1 mL 纳米分散体于离心管中, 加入 2 mL 丙酮, 超声处理 5 min 使颗粒充分破碎, 随后以 4000 r/min 离心 10 min, 收集上层有色丙酮溶液。重复上述提取步骤直至有机相无色, 合并所有有机相后, 于 475 nm 波长处测定其吸光度值, 试验预先建立 AST 丙酮溶液在 475 nm 下的标准浓度-吸光度标准曲线, 通过样品测得吸光度对照标准曲线换算得到对应 AST 质量, 即为被包埋 AST 的量。根据公式(1)计算包埋率。

$$包埋率(\%)=\frac{被包埋的\ AST\ 量}{AST\ 初始加入量}\times 100 \qquad 式(1)$$

1.2.3 Ca^{2+}浓度优化 为了获得更加均一、稳定的纳米分散体, 先将 0.6 mg/mL 的 CS 溶液与 SPI 溶液按 1∶1(v/v)充分混合, 再将 AST 溶液与 SPI/CS 复合物按 1∶2(v/v)比例混合, 得到 SPI/CS/AST 纳米分散体。在 SPI/CS/AST 中分别加入 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mg/mL 的 $CaCl_2$, 对照组加入等量的蒸馏水, 其他条件保持不变。以 AST 包埋率为评价指标, 综合筛选最优 Ca^{2+}添加浓度。

1.2.4 纳米分散体的储存稳定性 将 1.2.3 得到的 SPI/CS/AST 纳米分散体密封在样品瓶中, 分别在 4 ℃ 和 25 ℃ 的黑暗环境中储存 8 周。每隔一周时间取样 1 mL 至离心管, 向其中加入 2 mL 丙酮, 涡旋混匀后超声处理 5 min, 促使颗粒结构解离。然后将混合液在 4000 r/min 下离心 10 min, 收集含有 AST 的上层溶液, 重复上述步骤直至有机相呈无色。合并所有有机相, 于 475 nm 波长处测定其吸光度值, 然后采用建立的虾青素标准曲线定量, 计算纳米分散体中 AST 含量。根据公式(2)计算 AST 的保留率。

$$AST保留率(\%)=\frac{C_1}{C_0}\times 100 \qquad 式(2)$$

式中: C_1 和 C_0 分别表示复合物中 AST 的含量(μg/mL)和为储存初始(第 0 周)纳米分散体中 AST 含量(μg/mL)。

1.2.5 纳米分散体的 pH 稳定性 使用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 溶液分别调节纳米分散体的 pH 至 3、5、7、9、11, 静置 24 h。AST 提取与保留率测定参照 1.2.4。

1.2.6 纳米分散体的热稳定性 样品分别在 60、65、70、75 和 80 ℃ 温度下水浴加热 30 min。AST 提取与保留率测定参照 1.2.4。

1.2.7 纳米分散体的光稳定性 将 SPI/CS/AST 纳米分散体置于样品瓶中, 放在在紫外灯下照射 1、2、3、4 和 5 h, AST 提取与保留率测定参照 1.2.4。

1.2.8 胃肠稳定性和生物可及性 使用模拟胃肠消化模型测定纳米分散体的胃肠稳定性和生物可及性, 该模型基于以前的方法并稍作修改[21]。

首先制备模拟胃液(含 3.2 g/L 胃蛋白酶, 2.0 g/L 氯化钠, pH2.0)和模拟肠液(含 6.8 g/L KH_2PO_4, 10.0 g/L 猪胆盐和 5.0 g/L 胰蛋白酶, pH7.0)。将 10 mL 纳米分散体与 10 mL 胃液混合。将混合物的 pH 调至 2.0, 并在 37 ℃ 下以 100 r/min 持续摇动 2 h, 每隔 0.5 h 取出 2 mL 消化液。模拟胃消化后, 加入等体积的肠液, 并将体系的 pH 调整到 7.0。得到的混合物在摇床(37 ℃, 100 r/min)中进一步消化 4 h, 每隔 1 h 取出 2 mL 消化液。用丙酮提取消化液中的 AST, 将混合物超声 5 min, 在 8000 r/min 下离心 5 min 后, 收集含有 AST 的上层溶液, 重复进行直到有机相无色。合并有机相, 测量其在 475 nm 处的吸光度, 根据 AST 标准曲线和公式(3)计算模拟胃肠消化过程中 AST 的保留率。

$$AST保留率(\%)=\frac{C_1}{C_0}\times 100 \qquad 式(3)$$

式中: C_1 和 C_0 分别代表消化液中 AST 的含量(μg/mL)和消化起始未消化原液中 AST 含量(μg/mL)。

在模拟胃肠消化过程结束后, 取出消化液 3 mL, 参照 1.2.4 测定消化液中 AST 含量, 按照式(4)计算 AST 生物可及性。

$$AST生物可及性(\%)=\frac{C_2}{C_0}\times 100 \qquad 式(4)$$

式中: C_2 和 C_0 分别代表胶束相中 AST 含量(μg/mL)和消化起始纳米分散体中 AST 含量(μg/mL)。

1.2.9 表面疏水性分析 参考 Zhang 等[22] 描述的 ANS 探针方法测定 Ca^{2+}优化后的 SPI/CS/AST 纳米分散体的表面疏水性。首先将 ANS 溶于 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH6.0), 使其浓度达到 8 mmol/L。采用 Bradford 法测定样品蛋白含量, 随后用蒸馏水将待测样品稀释为蛋白终浓度 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的系列梯度溶液。取 3.0 mL 不同蛋白浓度的样品液, 分别加入 15 μL ANS 储备液混匀, 室温避光孵育 15 min; 采用酶标仪在激发波长 365 nm、发射波长 485 nm 条件下测定各组荧光强度。计算荧光强度和样品蛋白质浓度之间的斜率, 即为表面疏水性 S_0-ANS。

1.2.10 紫外光谱分析 使用紫外可见分光光度计在 230~600 nm 的波长范围内对不同 Ca^{2+}浓度的 SPI/CS/AST 纳米分散体的紫外吸收光谱进行扫描。

1.2.11 荧光光谱分析 荧光光谱按照 Liu 等[23] 的方法进行测定, 并稍作修改。将激发波长设置为 280 nm, 发射波长范围设置为 300~450 nm, 在室温下记录不同 Ca^{2+}浓度 SPI/CS/AST 纳米分散体的荧光光谱。

1.3　数据处理

所有实验均重复三次，结果表示为平均值±标准偏差。使用 Origin 2022 和 SPSS 27 软件进行统计图绘制与差异性分析，$P<0.05$ 为差异显著。

2　结果与分析

2.1　CS 浓度对 AST 包埋率的影响

从图 1 中可以看出，不同 CS 浓度下，SPI/AST 纳米分散体均呈现出澄清透明的橘红色外观。随着 CS 浓度的升高，溶液颜色由深变浅，并且 SPI/CS/AST 纳米分散体对虾青素的包埋率呈先增后减趋势，当 CS 浓度为 0.6 mg/mL 时达到最高，为 59.57%，比不加 CS 时提升了 11%。说明 CS 的添加促进了 SPI/CS 复合物与 AST 的结合，这是由于 SPI 带负电荷，而 CS 带正电荷，在复合物的合成中，CS 和 SPI 在静电引力下发生凝聚作用，对 AST 进行更好的包埋[24]。CS 浓度继续增加至 0.8 mg/mL 时，纳米分散体的包埋率下降至 57.93%。说明随着 CS 浓度的增高，生成的凝聚物增多，多余的 CS 所带的正电荷会破坏体系的电荷平衡，从而导致包埋率下降[24]。

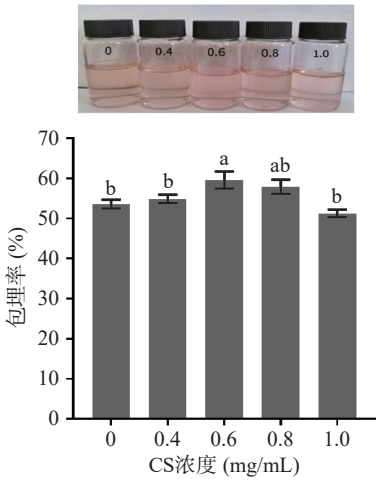


图 1　不同浓度的 CS 对 AST 包埋率的影响

Fig.1　Effect of different concentrations of CS on AST encapsulation rate

注：不同小写字母表示样品间的显著性差异（$P<0.05$），图 2、图 7、图 8 同。

2.2　Ca^{2+}对虾青素包埋率的影响

图 2 所示，当 SPI/CS/AST 纳米分散体形成后，在不同 Ca^{2+}浓度下，溶液均呈现出澄清透明的淡粉色外观。随着 Ca^{2+}浓度升高，溶液颜色由深变浅。在 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL 时，SPI/CS/AST 纳米分散体的外观颜色最深。这与测定的数据结果相一致，当 Ca^{2+}浓度为 0 mg/mL 时，SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的包埋率仅为 61.09%。随着 Ca^{2+}浓度的增加，包埋率呈现先上升后下降的趋势。在 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL 时，SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的包埋率达到最大，为 73.55%，比不加 Ca^{2+}时提高了 20%。说明在该浓度下形成的纳米颗粒较小，增加了纳米粒子的数量，包埋了更多的 AST，减少粒子表面残余的 AST，进而提高了复合物的包埋率[25]。但当 Ca^{2+}浓度增加至 0.3 mg/mL 时，AST 的包埋率下降至 58.12%，显著（$P<0.05$）低于对照组。Ca^{2+}浓度的增加会导致体系 pH 降低，引起大豆分离蛋白的沉降，表面电荷变弱，从而导致 SPI 与 CS 间的静电引力变弱[26]，因此随着体系中 Ca^{2+}浓度的持续增加，体系中形成的纳米复合物逐渐减少，导致包埋的 AST 减少，体系中残余的 AST 增多。

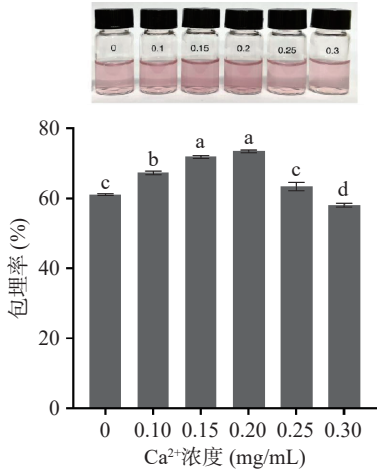


图 2　Ca^{2+}浓度对虾青素包埋率的影响

Fig.2　Effect of Ca^{2+} concentration on AST encapsulation rate

2.3　Ca^{2+}对 SPI/CS/AST 纳米分散体储存稳定性的影响

储存稳定性是评价一个递送系统是否能应用于实际生产的最关键指标之一。图 3 为不同 Ca^{2+}浓度下 SPI/CS/AST 纳米分散体分别在 4 ℃ 和 25 ℃ 条件下储存 8 周的 AST 保留率。在 4 ℃ 下储存 8 周后，不含 Ca^{2+}的 SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的保留率仅为 69.16%。当 Ca^{2+}浓度达到 0.2 mg/mL 时，AST 的保留率最高，为 79.27%，比不加 Ca^{2+}时提高了 14%。在 25 ℃ 下储存 8 周后，不含 Ca^{2+}的纳米分散体中 AST 的保留率为 64.15%，随着 Ca^{2+}浓度的升高，SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的保留率有所提高，同样，在 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL 时，AST 的保留率最高为 73.67%，比不加 Ca^{2+}时提升了 15%。Ca^{2+}与蛋白质和多糖中的羧基、羟基等基团具有交联作用[27]，增强网络结构[28]，提高纳米分散体的稳定性。同时，Ca^{2+}能够与水分子结合形成稳定的水化层[29]，阻止颗粒相互靠近，进而降低颗粒聚集速度，增强储存稳定性。可见，在 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL 的情况下，4 ℃ 时储存的纳米分散体中 AST 的保留率高于 25 ℃ 条件下的。低温能够降低 SPI 和 CS 的分子热运动速率，维持二者间静电以及氢键相互作用的稳定性，使纳米载体的核壳结构保持致密[30]。因此，SPI/CS/AST 纳米分散体更适于在 4 ℃ 条件下储存，并且 0.2 mg/mL Ca^{2+}能够显著增加 SPI/CS/AST 纳米分散体在储存过程中 AST 的保留率。

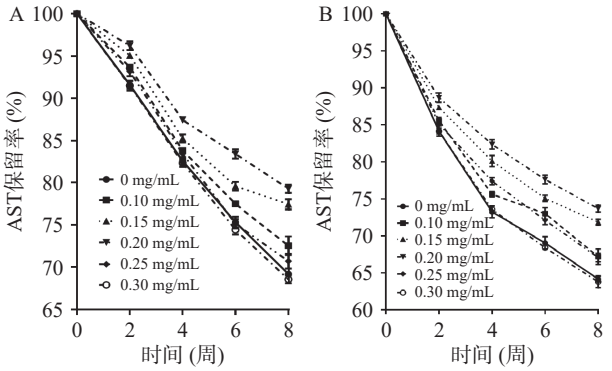


图 3 不同 Ca^{2+}浓度处理 SPI/CS/AST 纳米分散体的储存稳定性分析

Fig.3 Storage stability analysis of SPI/CS/AST nanodispersion treated with different Ca^{2+} concentration

注: A: 4 ℃; B: 25 ℃。

2.4 Ca^{2+}对 SPI/CS/AST 纳米分散体 pH 稳定性的影响

复合体系中蛋白质和多糖带电基团的解离程度会受 pH 变化的影响[31], 进而影响纳米分散体的结构和稳定性。因此, 在添加不同浓度 Ca^{2+}的基础上, 探究了 pH 对 SPI/CS/AST 纳米分散体稳定性的影响。从图 4 中可以看出, 在不同 pH 条件下, Ca^{2+}提高了 SPI/CS/AST 纳米分散体的稳定性。随着 Ca^{2+}浓度的升高, AST 保留率均呈现先上升后下降的趋势, 并在 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL、pH 为 7 时 AST 的保留率达到最高, 为 95.22%, 比不加 Ca^{2+}时提高了 5%。可以看出, 在中性条件下, SPI/CS/AST 纳米分散体最稳定。与不加 Ca^{2+}相比, Ca^{2+}显著提高了 SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 在不同 pH 环境下的保留率。但在 pH 为 3、9 和 11 的环境下, AST 仍降解较多。在 pH 为 3 的酸性条件下, SPI 因过度带正电发生解聚, 使 AST 暴露, 降解加速[32]。在 pH 为 9 和 11 的碱性条件下, CS 因去质子化从水溶性转为疏水性, 纳米分散体发生团聚沉淀。同时, SPI 因过度带负电变性沉淀, 加速 AST 与氧气接触, 从而发生降解[33]。而 pH 为 5 的环境下, 虽然 Ca^{2+}的添加使纳米分散体的 AST 保留率较高, 但此时 pH 接近 SPI 的等电点, 颗粒容易聚集沉淀[34], 破坏纳米分散体的稳定性。因此, SPI/CS/AST 纳米分散体更适于在中性环境下应用。

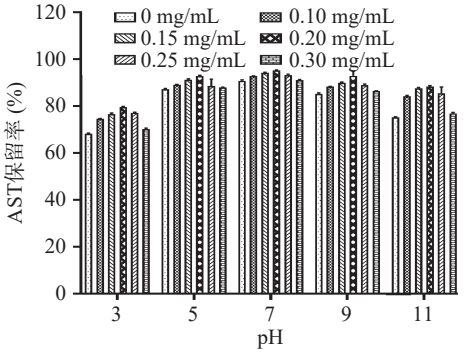


图 4 Ca^{2+}浓度对 SPI/CS/AST 纳米分散体 pH 稳定性的影响

Fig.4 Effect of Ca^{2+} concentration on pH stability of SPI/CS/AST nanodispersion

2.5 Ca^{2+}对 SPI/CS/AST 纳米分散体热稳定性的影响

含纳米分散体的食品在制备和消费过程中, 会经过热处理, 如消毒、巴氏杀菌和蒸煮等[35], 经过热处理后蛋白质分子发生聚集, 使其原有的优良功能性质变差[36], 影响纳米分散体对 AST 的包埋效果。图 5 为不同 Ca^{2+}浓度下 SPI/CS/AST 纳米分散体分别在 60、65、70、75 和 80 ℃ 水浴加热条件下 AST 保留率的变化情况。随着温度的升高, SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的保留率呈现下降趋势。而添加适当浓度的 Ca^{2+}有效地提高了 AST 的保留率, 增强了 SPI/CS/AST 纳米分散体的稳定性, 且当 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL、温度为 60 ℃ 时, AST 的保留率最高, 达到 89.17%, 比不加 Ca^{2+}时提高了 4%。Ca^{2+}与蛋白质结合能够提高蛋白质的热变性温度, 增强对高温的耐受性[37]。同时, Ca^{2+}促进分子间交联, 形成更紧密的网络结构, 减少高温下的分子运动, 防止纳米分散体的稳态化结构被破坏[28]。

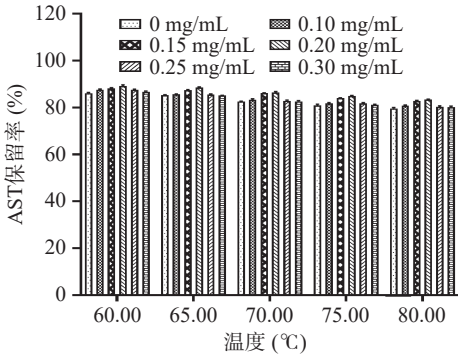


图 5 Ca^{2+}浓度对 SPI/CS/AST 纳米分散体热稳定性的影响

Fig.5 Effect of Ca^{2+} concentration on thermal stability of SPI/CS/AST nanodispersion

2.6 Ca^{2+}对 SPI/CS/AST 纳米分散体光稳定性的影响

郭红星等[38] 在研究光照对虾青素稳定性影响时, 做了多种光照条件下虾青素的含量变化, 发现太阳光和紫外光照射对虾青素的影响程度相当, 且这两组的虾青素含量下降得也最为显著。因此, 研究了不同 Ca^{2+}浓度下 SPI/CS/AST 纳米分散体在紫外照射 1、2、3、4、5 h 时的虾青素保留率(图 6)。在紫外照射条件下, SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的保留率均出现大幅下降, 并且照射的前 2 h 下降速度较快, 随着时间的延长, 下降速度趋于平缓。紫外照射 5 h 时, 不含 Ca^{2+}的 SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的保留率仅为 42.04%, 当 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL, AST 的保留率达到最高, 为 51.52%, 比不加 Ca^{2+}时提高了 23%。Ca^{2+}能够与紫外照射产生的自由基反应[39], 减少自由基对蛋白质和多糖的氧化损伤, 从而保护纳米分散体的结构完整性。

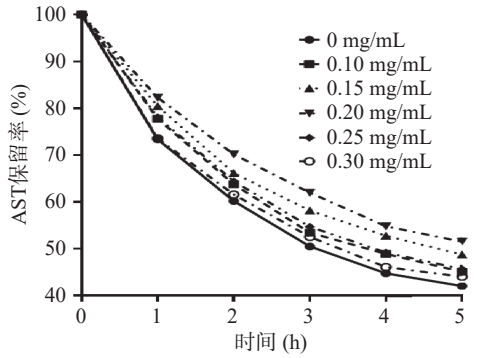


图 6　Ca^{2+}浓度对 SPI/CS/AST 纳米分散体紫外照射稳定性的影响

Fig.6　Effect of Ca^{2+} concentration on UV irradiation stability of SPI/CS/AST nanodispersion

2.7　胃肠消化稳定性与生物可及性分析

图 7A 中可以看出，在模拟胃肠道消化过程中，AST 的保留率均有所下降。2 h 的模拟胃液消化，对于 Ca^{2+}浓度为 0 mg/mL 的纳米分散体，AST 的保留率仅为 72.34%，随着 Ca^{2+}浓度的增加，SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的保留率先增加后减少，在 0.2 mg/mL 时达到最高，此时 AST 保留率为 78.35%。模拟肠液消化 4 h 后，Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL 时，SPI/CS/AST 纳米分散体中的 AST 保留率仍最高，为 67.18%，比不加 Ca^{2+}时提高了 13%，Ca^{2+}可以与 SPI/CS 分子链上的羟基通过氢键作用增强网络致密性，使纳米分散体的三维结构更稳定，减少胃酸、胃蛋白酶对 AST 的直接破坏[40]。

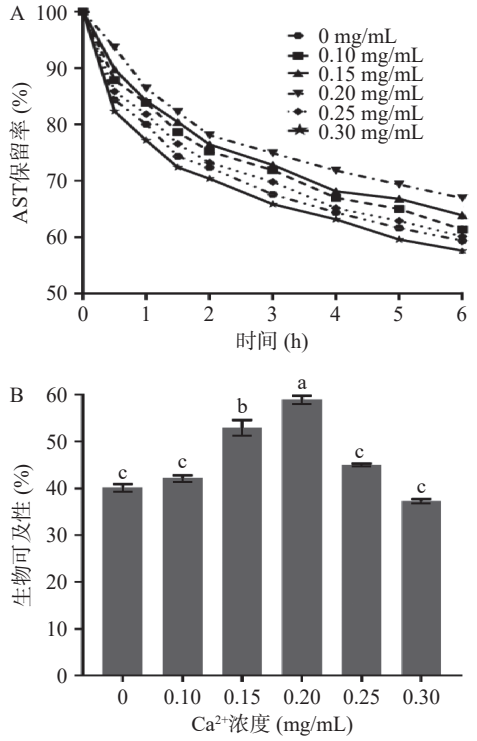


图 7　Ca^{2+}浓度对 SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的模拟胃肠消化稳定性(A)和生物可及性(B)的影响

Fig.7　Effects of Ca^{2+} concentration on simulated gastrointestinal digestion stability (A) and bioaccessibility (B) of AST in SPI/CS/AST nanodispersion

图 7B 显示，当 Ca^{2+}浓度为 0 mg/mL 时，纳米分散体中 AST 的生物可及性为 40.01%，随着 Ca^{2+}浓度的增加，SPI/CS/AST 纳米分散体中 AST 的生物可及性显著增加(P<0.05)，在 0.2 mg/mL 时达到最高，此时 AST 生物可及性为 59.01%。Ca^{2+}可与 SPI 中的-COOH 及 CS 中的-NH_2 形成离子键或配位键，充当分子桥连接 SPI 与 CS 分子链。这种交联作用会改变纳米分散体的空间网络结构，使其粒径分布更均匀、表面电荷更稳定，从而在胃肠道消化过程中减少 AST 的提前泄漏，促进其在吸收部位的可控释放[41]。但当 Ca^{2+}浓度高于 0.2 mg/mL 时，纳米颗粒之间的静电斥力减小，发生过度聚集，从而减小了 AST 与消化酶的接触面积，降低 AST 的生物可及性[42]。

2.8　表面疏水性分析

从图 8 中可以看出，与不添加 Ca^{2+}相比，当 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL 时，SPI/CS/AST 纳米分散体的表面疏水性显著提高(P<0.05)，稳定性强[43]。疏水性的增强使蛋白质分子的移动与伸展减少，构建出更为稳固的结构。Ca^{2+}可通过离子键作用改变蛋白表面氨基酸残基所处微环境，调控蛋白构象变化，最终实现颗粒表面疏水性与体系稳定性的同步改善[44]。

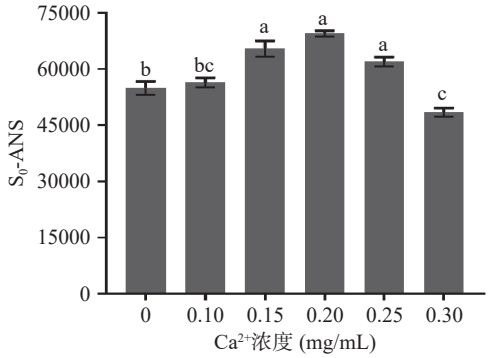


图 8　Ca^{2+}浓度对 SPI/CS/AST 纳米分散体表面疏水性的影响

Fig.8　Effect of Ca^{2+} concentration on surface hydrophobicity of SPI/CS/AST nanodispersion

2.9　紫外光谱和荧光光谱分析

从图 9A 中可以看出，在波长扫描范围内，不同 Ca^{2+}浓度的 SPI/CS/AST 纳米分散体展现出相似的紫外吸收光谱特征，均在 245 nm 处出现明显吸收峰。这是因为蛋白质分子中，色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基因含有共轭 π 电子体系，能够产生 π-π 跃迁，从而引发紫外吸收现象[45]。随着 Ca^{2+}浓度的增加，纳米分散体的紫外吸收强度有所上升，当 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL 时，纳米分散体的紫外吸收强度达到最高。此时复合物的构象有序性与分散性达到平衡，既保证氨基酸残基的充分暴露，又避免颗粒团聚[46]。

从图 9B 中可以看出，所有组别中 SPI/CS/AST 纳米分散体的内源荧光光谱均呈现下降趋势。无 Ca^{2+}时，荧光强度最高，因为 SPI/CS 的分子链因静电排斥保持良好分散，避免荧光基团间的近距离相互作

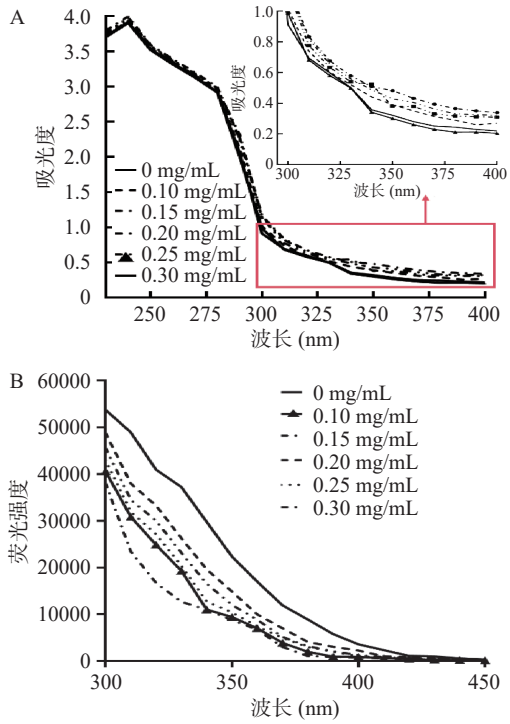


图 9 Ca^{2+}浓度对 SPI/CS/AST 纳米分散体紫外光谱(A)和荧光光谱(B)的影响

Fig.9 Effects of Ca^{2+}concentration on UV spectra (A) and fluorescence spectra (B) of SPI/CS/AST nanodispersion

用,降低了表面缺陷对荧光的吸附或猝灭[47]。在 Ca^{2+}浓度为 0.2 mg/mL 时,荧光强度高于其他加 Ca^{2+}组。说明 Ca^{2+}浓度的增加促进了 SPI 的变性和肽链的展开,使得蛋白质内部芳香族氨基酸转移到表面,导致荧光强度的增加[48],但纳米颗粒因 Ca^{2+}桥连开始轻微聚集(粒径增大),导致荧光仍低于无 Ca^{2+}状态。

3 结论

本研究制备了负载 AST 的 SPI/CS 复合纳米颗粒,当 CS 浓度为 0.6 mg/mL 时,纳米分散体中虾青素的包埋率最大,为 59.57%,比不加 CS 时提高了 11%。进一步研究表明,添加 0.2 mg/mL Ca^{2+}可显著提高 AST 包埋率,达 73.55%,比不加 Ca^{2+}时提高了 20%。此外,在此条件下纳米分散体在储存及加工过程中(pH、温度、光照条件下)的稳定性显著增强,且表现出最佳的胃肠消化稳定性与生物可及性。表面疏水性和多光谱分析表明,CS 与 SPI 通过氢键和疏水相互作用形成稳定复合物,实现了对 AST 的有效包埋。综上,本研究通过在 SPI/AST 纳米分散体中引入 CS 和 Ca^{2+},有效改善了体系稳定性和 AST 保留率,为 AST 包埋递送体系在食品加工中的应用提供了理论依据。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 方溶熙, 周鹏, 谢云霄, 等. 基于深共晶溶剂溶解的虾青素及其乳液包埋体系制备与调控[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2022, 50(5): 8. [FANG R X, ZHOU P, XIE Y X, et al. Preparation and regulation of astaxanthin and its emulsion embedding system based on deep eutectic solvent dissolution[J]. Journal of Shaanxi Normal University: Natural Science Edition, 2022, 50(5): 8.]

[2] ZHANG J, LIU M Z, HAN T T, et al. Advance toward function, production, and delivery of natural astaxanthin: A promising candidate for food ingredients with future perspectives[J]. Food Chemistry, 2025, 463(4): 141428.

[3] CAO Y R, YANG L, QIAO X, et al. Dietary astaxanthin: An excellent carotenoid with multiple health benefits[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(18): 3019−3045.

[4] DANG Y M, LI Z X, YU F Q H. Recent advances in astaxanthin as an antioxidant in food applications[J]. Antioxidants, 2024, 13(7): 879.

[5] DUTTA S, KUMAR S P J, BANERJEE R. A comprehensive review on astaxanthin sources, structure, biochemistry and applications in the cosmetic industry[J]. Algal Research, 2023, 74: 103168.

[6] ZHAO T, YAN X J, SUN L J, et al. Research progress on extraction, biological activities and delivery systems of natural astaxanthin[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91: 354−361.

[7] XU J, GU J, LI X, et al. Influence of molecular structure of astaxanthin esters on their stability and bioavailability[J]. Food Chemistry, 2021, 343: 128497.

[8] CHEN Y N, SU W T, TIE S S, et al. Advances of astaxanthin-based delivery systems for precision nutrition[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 127: 63−73.

[9] 陈羚. β-胡萝卜素蛋白纳米载体的生物利用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020. [CHEN L. Bioavailability of β-carotene protein nanocarriers[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.]

[10] 李佳纪. 酶解大豆蛋白-海藻酸钠复合凝聚微胶囊的制备及其性能表征[D]. 成都: 西华大学, 2020. [LI J J. Preparation of enzymatic soy protein-sodium alginate composite cohesive microcapsules and characterization of their properties[D]. Chengdu: Xihua University, 2020.]

[11] NAZURAH R N F, NORANIZAN M A, NOR-KHAIZURA M A R, et al. The potential of chitosan-based film with curry leaf essential oil as natural insect-repellent food packaging[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2022, 34: 100993.

[12] WANG S, YE X Q, SUN Y, et al. Nanocomplexes derived from chitosan and whey protein isolate enhance the thermal stability and slow the release of anthocyanins in simulated digestion and prepared instant coffee[J]. Food Chemistry, 2021, 336: 127707.

[13] JIANG G, LI Z, MING J. Preparation of astaxanthin-encapsulated complex with zein and oligochitosan and its application in food processing[J]. LWT-Food Science & Technology, 2019, 106: 179−185.

[14] CHEN S, MA X H, HAN Y H, et al. Effect of chitosan molecular weight on zein-chitosan nanocomplexes: Formation, characterization, and the delivery of quercetagetin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 2215−2223.

[15] 谭啸, 邱婷婷, 李若男, 等. 壳聚糖纳米粒子的制备和在食品抑菌中的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 347−353. [TAN X, QIU T T, LI R N, et al. Preparation of chitosan nanoparticles and research progress in food bacteriostasis[J]. Food Science, 2020, 41

(23)：347−353.］
［16］ 孙涛, 刘伟佳, 谢晶, 等. 纳米壳聚糖的制备及其在食品保鲜应用中的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8)：293−299.［SUN T, LIU W J, XIE J, et al. Preparation of chitosan nanoparticles and its application in food preservation[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(8)：293−299.］
［17］ TENG Z, LUO Y C, 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.
［18］ de MOURA S C S R, BERLING C L, GERMER S P M, et al. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. alyces by ionic gelation：Pigment stability during storage of microparticles[J]. Food Chemistry, 2018, 241：317−327.
［19］ ZHAO P C, JI Y, YANG H, et al. Soy protein isolate-chitosan nanoparticle-stabilized pickering emulsions：Stability and *in vitro* digestion for DHA[J]. Marine Drugs, 2023, 21(10)：21100546.
［20］ GU L Y, JI S P, WU B, et al. Astaxanthin encapsulation in nanocapsule by high-pressure homogenization technology：A study on stability, antioxidant activity and *in vitro* release[J]. Journal of Dispersion Science and Technology, 2023, 45(6)：1129−1140.
［21］ LIU Q Y, QIN Y, CHEN J J, et al. Fabrication, characterization, physicochemical stability and simulated gastrointestinal digestion of pterostilbene loaded zein-sodium caseinate-fucoidan nanoparticles using pH-driven method[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 119：106851.
［22］ ZHANG M H, SUN H Y, WANG Y, et al. Preparation and characterization of a novel porous whey protein concentrate/pullulan gel induced by heating for Cu^{2+} absorption[J]. Food Chemistry, 2020, 322：126772.
［23］ LIU Y X, HUANG L, LI D H, et al. Re-assembled oleic acid-protein complexes as nano-vehicles for astaxanthin：Multispectral analysis and molecular docking[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103：105689.
［24］ GAN Q, WANG T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release[J]. Colloids and surfaces B：Biointerfaces, 2007, 59(1)：24.
［25］ GHRIB T, MASSOUD I, AL-OTAIBI A L, et al. Effects of terbium doping on structural, optical and photocatalytic properties of ZnO nanopowder prepared by solid-state reaction[J]. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers, 2020, 1(1)：239−250.
［26］ 曹琬琪. 壳聚糖-大豆分离蛋白纳米复合物的研究及应用[D]. 天津：天津科技大学, 2023.［CAO W Q. Research and application of chitosan-soybean isolate protein nanocomplexes[D]. Tianjin：Tianjin University of Science and Technology, 2023.］
［27］ ZHANG L Y, SHEN B H, ZHENG C M, et al. Chitosan/oxidized sodium alginate/Ca^{2+} hydrogels：Synthesis, characterization and adsorption properties[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 156：110368.
［28］ 郑家琪. 柑橘源 RG-I 型果胶凝胶机理及其应用研究[D]. 杭州：浙江大学, 2021.［ZHENG J Q. Research on the mechanism of RG-I pectin gel of citrus origin and its application[D]. Hangzhou：Zhejiang University, 2021.］
［29］ 杜帅. 卤盐/甲酸盐在水合物生成过程中作用机理的分子模拟[D]. 青岛：中国石油大学(华东), 2021.［DU S. Molecular simulation of halogenate/formate action mechanism during hydrate generation[D]. Qingdao：China University of Petroleum（East China）, 2021.］
［30］ BOUROUIS I, MCCLEMENTS D J, LI H, et al. Interaction mechanism between soy protein microgels and chitosan and the resulting physical properties：Effect of biopolymer ratio, pH and ionic strength[J]. Food Hydrocolloids, 2025, 168：111557.
［31］ 梁安源. pH 协同热处理对米渣蛋白-黄原胶复合物交互作用的影响[D]. 长沙：中南林业科技大学, 2021.［LIANG A Y. Effect of pH synergistic heat treatment on the interaction of rice residue protein-xanthan gum complexes[D]. Changsha：Central South Forestry University of Science and Technology, 2021.］
［32］ 任东雪, 陈鹏程, 郑璞, 等. γ-聚谷氨酸/壳聚糖纳米颗粒的制备及 pH 响应释放性能[J]. 功能高分子学报, 2020, 33(1)：9.［REN D X, CHEN P C, ZHENG P, et al. Preparation and pH-responsive release properties of γ-polyglutamic acid/chitosan nanoparticles[J]. Journal of Functional Polymers, 2020, 33(1)：9.］
［33］ 李英, 李煦, 王洪玲, 等. pH 响应壳聚糖马来酸盐水凝胶制备及其缓释性能[J]. 食品工业科技, 2023, 44(20)：250−256.［LI Y, LI X, WANG H L, et al. Preparation of pH-responsive chitosan maleate hydrogels and their sustained-release properties[J]. Food Industry Science and Technology, 2023, 44(20)：250−256.］
［34］ HALAHLAH A, PIIRONEN V, MIKKONEN K S, et al. Polysaccharides as wall materials in spray-dried microencapsulation of bioactive compounds：Physicochemical properties and characterization[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2023, 63(24)：34.
［35］ A'YUN Q, AZZAHRANI I N, HUYST A, et al. Heat stable whey protein stabilised O/W emuslions：Optimisation of the whey protein concentrate dry heat incubation conditions[J]. Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects, 2020, 603：9.
［36］ ZHOU Q X, XU J, YANG L, et al. Thermal stability and oral absorbability of astaxanthin esters from *Haematococcus pluvialis* in Balb/c mice[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(7)：3662−3671.
［37］ WEN C T, WU M W, ZHANG Z Y, et al. Effects of casein phosphopeptides on thermal stability and sensory quality of whey protein emulsions containing calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242：3.
［38］ 郭红星, 高望, 周尽学. 光照、加热对虾青素稳定性和抗氧化性的影响分析[J]. 科技视界, 2020(31)：84−85.［GUO H X, GAO W, ZHOU J X. Analysis of the effects of light and heating on the stability and antioxidant properties of astaxanthin[J]. Science and Technology Perspectives, 2020(31)：84−85.］
［39］ 曾庆晨. 外源钙对苦荞种子萌发的影响研究[D]. 成都：成都大学, 2024.［ZENG Q C. Effect of exogenous calcium on seed germination of buckwheat[D]. Chengdu：Chengdu University, 2024.］
［40］ LI B, LI N, BROUWERS H J H, et al. Understanding hydrogen bonding in calcium silicate hydrate combining solid-state NMR and first principle calculations[J]. Construction and Building Materials, 2020, 233：117347.
［41］ ALJEWICZ M, KEKLIK M, RECIO I, et al. Effect of polysaccharide-protein interactions on the multi-scale structure of hybrid micellar casein-xanthan gum systems[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 151：109833.
［42］ HOU J, CI H L, WANG P F, et al. Nanoparticle tracking analysis versus dynamic light scattering：Case study on the effect of

Ca^{2+} and alginate on the aggregation of cerium oxide nanoparticles［J］. Journal of Hazardous Materials, 2018, 360: 319−328.

［43］ DELAHAIJE R, WIERENGA P. Hydrophobicity enhances the formation of protein-stabilized foams［J］. Molecules, 2022, 27(7): 2358.

［44］ 段腊梅. 苹果梨渣多糖结构表征及其与乳清蛋白相互作用研究［D］. 锦州: 渤海大学, 2021. ［DUAN L M. Structural characterization of apple-pear pomace polysaccharide and its interaction with whey protein［D］. Jinzhou: Bohai University, 2021.］

［45］ DONON J, HABKA S, MONS M, et al. Conformational analysis by UV spectroscopy: The decisive contribution of environment-induced electronic Stark effects［J］. Chemical Science, 2021, 12(8): 2803−2815.

［46］ 王耀松, 马天怡, 胡荣蓉, 等. L-组氨酸修饰乳清蛋白结构及其热诱导凝胶特性［J］. 食品科学, 2021, 42(6): 16−23. ［WANG Y S, MA T Y, HU R R, et al. Structure of L-histidine-modified whey proteins and their thermally induced gel properties［J］. Food Science, 2021, 42(6): 16−23.］

［47］ 刘冠男. 琥珀酰化大豆蛋白/壳聚糖静电自组装乳液体系构建及应用［D］. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022. ［LIU G N. Construction and application of succinylated soy protein/chitosan electrostatic self-assembled emulsion system［D］. Harbin: Northeast Agricultural University, 2022.］

［48］ ZHOU X Q, BELAVEK K J, NAVARRO M X, et al. Ratio-based indicators for cytosolic Ca^{2+} with visible light excitation［J］. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2025, 122(7): e2410436122.