

钙离子对亚麻籽胶-紫苏分离蛋白负载DHA藻油乳液储藏特性与递送虾青素效果的影响

孙梦嘉, 全双, 陈亚淑, 陈洪建, 彭登峰, 邓乾春

(中国农业科学院油料作物研究所, 农业农村部油料加工重点实验室, 油料脂质化学与营养湖北省重点实验室, 武汉430062)

摘要: DHA藻油是补充 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸的重要非动物来源, 但因其自身水溶性差、易氧化产生不良风味等特点, 极大约束了其摄入途径。据此, 采用高压微射流技术与逐层沉积技术(LBL)制备负载DHA的亚麻籽胶(FG, 质量分数为0.4%) - 紫苏分离蛋白(PPI, 质量分数为0.225%)双层乳液, 研究 Ca^{2+} 添加量(0%~0.5%)对上述双层乳液体系稳定性的影响; 同时, 采用INFOGEST体外模拟消化模型, 探究PPI-DHA藻油单层乳液、FG-PPI-DHA藻油双层乳液、 Ca^{2+} -FG-PPI-DHA藻油双层乳液中DHA的消化特性, 以及上述3种体系递送虾青素的效率, 并通过监测其在消化过程中粒径分布、电荷特性及微观状态变化等解释其内在机理。结果表明: DHA藻油双层乳液储藏20 d后, 未添加 Ca^{2+} 的双层乳液的粒径从10.4 μm 降低至4.3 μm , Zeta-电位从-23 mV降低至-33 mV, Ca^{2+} 添加量为0.4%的双层乳液的粒径和电位未发生显著变化, 乳液液滴分布均匀, 无分层、絮凝、沉淀现象; DHA藻油双层乳液储藏20 d后, 添加 Ca^{2+} 的双层乳液的Turbiscan抗重力稳定性指数(TSI)较未添加 Ca^{2+} 的双层乳液有明显改善; 3种乳液体系模拟消化过程中, 游离脂肪酸释放量分别为68.88%、50.84%、52.32%, 虾青素生物可及性分别为47.42%、12.54%、9.66%。说明添加 Ca^{2+} 有利于DHA藻油双层乳液的稳定储藏, 但对消化过程中脂肪酸与虾青素的释放具有一定迟缓效果, 研究结果可为设计靶向递送体系提供重要理论依据。

关键词: DHA藻油; 虾青素; 亚麻籽胶; 紫苏分离蛋白; 乳液递送体系

中图分类号: TS225.6; TS201.7 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)04-0109-09

Effect of calcium ions on storage properties and astaxanthin delivery efficiency of DHA algae oil-loaded emulsion using flaxseed gum-perilla protein isolate

SUN Mengjia, QUAN Shuang, CHEN Yashu, CHEN Hongjian, PENG Dengfeng, DENG Qianchun

(Hubei Key Laboratory of Lipid Chemistry and Nutrition, Key Laboratory of Oilseeds Processing of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

Abstract: DHA algae oil is an important non-animal source for supplementing $\omega-3$ polyunsaturated fatty acids ($\omega-3$ PUFA), but due to its poor water solubility and easy oxidation to produce bad flavor, its intake route is greatly restricted. Accordingly, high-pressure micro-jet

收稿日期: 2021-04-21; 修回日期: 2021-11-22

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2020BCA086); 国家自然科学基金项目(32001740); 武汉市企业技术创新项目(2020020602012122)

作者简介: 孙梦嘉(1994), 女, 硕士研究生, 研究方向为脂质营养与健康(E-mail)1072326646@qq.com。

通信作者: 邓乾春, 研究员(E-mail)dengqianchun@caas.cn。

technology and layer by layer (LBL) were used to prepare DHA-loaded flaxseed gum (FG, mass fraction 0.4%) - perilla protein isolate (PPI, mass fraction 0.225%) double-layer emulsion, focusing on the effect of calcium ion addition (0% - 0.5%) on the stability of the above-mentioned double-layer emulsion system. At the

same time, the INFOGEST in vitro simulated digestion model was used to explore the digestion characteristics of DHA in PPI - DHA algae oil single - layer emulsion, FG - PPI - DHA algae oil double - layer emulsion, and Ca^{2+} - FG - PPI - DHA algae oil double - layer emulsion, as well as the efficiency of astaxanthin delivery by the above three systems, and its internal mechanism was explained by monitoring its particle size distribution, charge characteristics and microscopic state changes during the digestion process. The results showed that after 20 d storage of the DHA algae oil double - layer emulsion, the particle size and *Zeta* - potential of the double - layer emulsion without Ca^{2+} decreased from 10.4 μm to 4.3 μm , from -23 mV to -33 mV, respectively, but for the double - layer emulsion with 0.4% Ca^{2+} addition, the particle size and *Zeta* - potential did not change significantly, the emulsion droplets were evenly distributed, and there was no delamination, flocculation, or sedimentation. After 20 d storage of the DHA algae oil double - layer emulsion, the Turbiscan anti - gravity stability index (TSI) of the Ca^{2+} - added double - layer emulsion was significantly improved compared with the non - Ca^{2+} - added double - layer emulsion. During the simulated digestion process of the three emulsion systems, the release of free fatty acids in the three systems was 68.88%, 50.84% and 52.32% respectively, and the bioavailability of astaxanthin in the simulated digestion process was 47.42%, 12.54% and 9.66%, respectively. It shows that the addition of Ca^{2+} is beneficial to the stable storage of the DHA algae oil double - layer emulsion, but has a certain retarding effect on the release of fatty acids and astaxanthin during the digestion. The research results provide an important theoretical basis for designing a targeted delivery system.

Key words: DHA algae oil; astaxanthin; flaxseed gum; perilla protein isolate; emulsion delivery system

藻油是 ω -3 长链多不饱和脂肪酸(ω -3 LC - PUFA) DHA 的重要来源,其不仅能够促进脑部发育,还有助于降低全身性疾病和慢性综合征的风险^[1]。然而,DHA 藻油的易氧化产生腥味和水溶性差等问题极大地限制了其在食品工业中的应用。研究表明,使用蛋白质 - 多糖制备双层 O/W 乳液可通过在油滴表面形成致密且较厚的界面层,起到掩盖或缓释风味物质的作用^[2]。紫苏分离蛋白(PPI)作为一种油料作物来源的天然乳化剂,不仅可以提高食品的营养价值和感官品质,而且对产品的食用和加工性能具有一定的改善作用^[3]。亚麻籽胶(FG)作为一种天然多糖类物质,表现出显著的持水能力和流变特性,可作为增稠剂应用于替代食品和非食品工业中^[4]。此外,FG 还可降低与糖尿病及心脏疾病相关疾病的风险^[5]。利用 PPI 与 FG 之间的静电相互作用、氢键、疏水相互作用力等,采用逐层沉积技术(LBL)制备双层乳液,可在一定程度上稳定 DHA 藻油乳液,并掩盖异味。然而 PPI 与 FG 稳定的乳液体系仍然存在易分层和储藏稳定性不佳的问题,需要进一步完善。钙离子(Ca^{2+})可作为营养强化剂或微环境调节剂添加到液体食品中,其经常被添加到乳液产品中以改善离子环境。同时,在

多糖稳定的乳液中添加 Ca^{2+} 可以影响水溶液中多糖链的有序与无序状态之间的平衡,从而影响乳液的流动一致性指数、稳定性及消化特性^[6]。目前已有研究将 Ca^{2+} 作为交联剂应用于黄原胶及其他带电荷的多糖中^[7]。

若能实现乳液体系的稳定调控,还可用来负载多种活性成分,以提升多营养组分的协同增效作用。虾青素(AST)具有较强的抗氧化性,其单线态氧猝灭活性分别比 β -胡萝卜素与维生素 E 高 40 倍与 1 000 倍^[8],但由于虾青素的强疏水性及低口服生物利用度极大地限制了其在食品工业中的应用,目前亟需研究设计不同口服递送体系提高虾青素的生物可及性。基于以上背景,本文采用高压微射流技术与逐层沉积技术制备负载 DHA 藻油的 FG - PPI 双层乳液,首先研究 Ca^{2+} 添加量对 FG - PPI 包埋 DHA 藻油乳液储藏稳定性的影响,同时研究 PPI - DHA 藻油单层乳液、FG - PPI - DHA 藻油双层乳液、 Ca^{2+} - FG - PPI - DHA 藻油双层乳液中 DHA 的消化特性,以及上述 3 种乳液体系递送虾青素的效率,并监测乳液粒径、*Zeta* - 电位、Turbiscan 抗重力稳定性指数(TSI)、微观结构、流变特性等以探究内在机理,为相关富含 ω -3 PUFA 的双层 O/W 乳液体系的构建提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DHA藻油,嘉必优股份有限公司;亚麻籽,甘肃省农业科学院;紫苏分离蛋白(PPI,蛋白质含量94.36%),陕西瑞滋生物科技有限公司;虾青素、黏蛋白、 α -淀粉酶、胃蛋白酶、胆汁盐、胰酶、脂肪酶,美国Sigma-Aldrich公司;氢氧化钠标准液;氯化钙、磷酸二氢钾、盐酸、氢氧化钠、尼罗红等,均为分析纯。

高速剪切均质机,德国IKA公司;M-110E高压微射流均质机,美国MiFIC公司;Mastersizer 3000微米激光粒度仪、ZetaSizer Nano-ZS纳米粒径分析仪,英国马尔文仪器公司;Turbiscan多重光散射仪,法国Formulation公司;动态流变仪,美国TA仪器公司;激光共聚焦显微镜,日本尼康公司。

1.2 实验方法

1.2.1 亚麻籽胶(FG)的提取

称取100 g亚麻籽,用去离子水洗涤除灰,再与900 mL去离子水混合,然后参考文献[4]的方法,在60℃水浴中用磁力搅拌器以3 000 r/min的转速搅拌2 h,再以4 500 r/min离心10 min,分离亚麻籽壳与不溶性杂质,得到黏稠液体。将黏稠液体与95%乙醇按体积比1:10混合,于4℃沉淀过夜,再于4℃、7 000 r/min条件下离心15 min,收集下层沉淀,冷冻干燥后研磨,得到FG粉末。

1.2.2 PPI-DHA藻油单层乳液的制备

采用5 mmol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7)配制质量分数为0.5%的PPI溶液,于4℃搅拌过夜,使用前离心获得上清液,作为乳化剂备用。分别将水相PPI溶液与油相DHA藻油以质量比9:1混合,使用高速剪切均质机在10 000 r/min转速下分散2 min获得粗乳液,再使用微射流均质机在约69 MPa压力下均质循环4次,获得PPI-DHA藻油单层乳液。

1.2.3 FG-PPI-DHA藻油双层乳液的制备

按1.2.2的方法获得PPI-DHA藻油单层乳液,再使用0.1 mol/L HCl与1 mol/L HCl将单层乳液的pH调至5后备用。采用5 mmol/L PBS(pH 5)配制质量分数为0.8%的FG溶液,使用磁力搅拌器在500 r/min下搅拌过夜备用。将单层乳液与FG溶液以质量比1:1混合,得到FG(质量分数0.4%)-PPI-DHA藻油双层乳液。

为了考察 Ca^{2+} 对FG-PPI-DHA藻油双层乳液的影响,对FG溶液配制过程稍作修改,在FG溶

液中添加氯化钙至 Ca^{2+} 质量分数分别为0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%,最终得到 Ca^{2+} 质量分数分别为0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%的 Ca^{2+} -FG-PPI-DHA藻油双层乳液。

1.2.4 乳液理化性质的测定

1.2.4.1 流变学特性

根据Liu等^[9]的方法使用动态流变仪对乳液进行流变学特性的测定。测定条件:量筒夹具(20 mm的直径,0°的平板),温度(25.0 ± 0.1)℃。当剪切速率从0.01 s⁻¹提高到100 s⁻¹时,测定溶液剪切黏弹性的储能模量(G')和损耗模量(G''),测量频率范围为0~200(°)/s。

1.2.4.2 粒径及粒径分布

以5 mmol/L PBS(pH 5)作为分散剂,使用微米激光粒度仪测定乳液的粒径($D_{(4,3)}$)及粒径分布^[10](油相DHA藻油的折射率为1.510,分散相水的折射率为1.330)。

1.2.4.3 Zeta-电位

将乳液用5 mmol/L PBS(pH 5)以体积比1:250的比例进行稀释,再使用纳米粒径分析仪测量乳液的Zeta-电位^[11]。

1.2.4.4 Turbiscan抗重力稳定性指数(TSI)

根据Raikos等^[12]的方法,将乳液装入特定的玻璃瓶中,使瓶身外部保持干净、透光性良好,通过多重光散射仪测定乳液的TSI。该仪器通过扫描样品的高度采集每次透射和反向散射数据,光源从上到下以30 s的间隔扫描一次样品,在25℃下测量反射光与透射光的比率,最后使用Turbisoft 2.1软件计算TSI以评估乳液的稳定性。

1.2.5 负载虾青素的DHA藻油乳液的制备及其体外模拟消化评价

1.2.5.1 乳液的制备

在油相DHA藻油中均添加0.5 mg/mL的虾青素,分别按照1.2.2和1.2.3的方法制备负载虾青素的PPI-DHA藻油单层乳液(简记为SL)、FG-PPI-DHA藻油双层乳液(简记为DL)、 Ca^{2+} -FG-PPI-DHA藻油双层乳液(简记为CDL, Ca^{2+} 质量分数经优化获得)。

1.2.5.2 体外模拟消化评价

参照文献[13]的方法并稍作修改,对负载虾青素的DHA藻油乳液进行体外模拟消化实验(包括口腔、胃、小肠3个阶段)。并在每一阶段模拟消化完成后对样品的粒径及粒径分布、Zeta-电位和激光共聚焦显微镜(CLSM)下的微观形态进行测定

(将样品用尼罗红染色后在 100 倍油镜下观察并拍摄得到图片)。

1.2.5.2.1 模拟口腔消化阶段

按照 Cheng 等^[14]的方法配制口腔模拟消化液(SSF)。取 0.06 g 黏蛋白于 16 mL SSF 中,搅拌均匀后于 4℃ 冰箱中过夜,取出待恢复至室温后,立刻与 20 mL 乳液(将样品稀释至油相含量为 2.5%)混合均匀,再加入 100 μL 0.3 mol/L 氯化钙溶液与 2.875 μL 去离子水,将混合溶液置于棕色具塞烧瓶中,于 37℃ 恒温空气摇床以 100 r/min 的速率孵育 2 min。

1.2.5.2.2 模拟胃消化阶段

取 2 g 氯化钠粉末和 7 mL 盐酸于去离子水中溶解,并定容至 1 L,得到胃模拟消化液(SGF)。将 16 mL SGF 与 20 mL 按 1.2.5.2.1 方法经口腔消化后的溶液混合,用移液器加入 1 mol/L HCl 调节 pH 至 3.0,并记录 HCl 的使用量(以毫升计),再加入 1 mL 胃蛋白酶液、10 μL 0.3 mol/L 氯化钙溶液和去离子水(加入量为 2.99 mL - V_{HCl}),于 37℃ 恒温空气摇床以 100 r/min 的速率孵育 2 h。

1.2.5.2.3 模拟小肠消化阶段

取 3.5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 与 32.87 g 氯化钠溶解于 150 mL 去离子水中,得到肠模拟消化液(SIF)。称取 0.1875 g 胆汁盐溶解于 3.5 mL pH 为 7 的 PBS 中,制得胆汁盐溶液,使用前恢复至室温;另外将 0.06 g 脂肪酶溶解于 2.5 mL pH 为 7 的 PBS 中,搅拌均匀后立即使用。

取 20 mL 按 1.2.5.2.2 方法经胃消化后的溶液与 8 mL SIF 混合,加入 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,并记录 NaOH 的使用量(以毫升计)。随后加入 3 mL 胆汁盐溶液、40 μL 氯化钙溶液和去离子水(加入量为 3.96 mL - V_{NaOH})。然后使用 0.02 mol/L HCl 调节 pH 至 7.0,于 37℃ 恒温空气摇床以 100 r/min 的速率孵育 2 h。孵育过程中,测定游离脂肪酸(FFA)释放量。

1.2.6 FFA 释放量的测定

将样品溶液用 0.25 mol/L NaOH 滴定至 pH 为 9.0。取 30 mL 混合溶液倒入消化杯中,开始滴定前立刻加入 3 mL 胰酶和 2 mL 脂肪酶溶液,磁力搅拌的同时使用 0.15 mol/L NaOH 标准溶液加入 pH-stat 消化滴定仪开始滴定,记录滴定至 pH 为 7 时所消耗的 NaOH 溶液的体积,滴定过程中自动调节温度恒定在 37℃。按式(1)计算 FFA 释放量。

$$Y_1 = \frac{V \times c \times M_{\text{lipid}}}{m_{\text{lipid}} \times 2} \times 100\% \quad (1)$$

式中: Y_1 为 FFA 释放量; V 为消耗 NaOH 的体积, L ; c 为 NaOH 的浓度, mol/L; M_{lipid} 为油脂的平均相对分子质量, DHA 藻油为 328; m_{lipid} 为消化液中油脂的质量, g。

1.2.7 不同 DHA 藻油乳液体系消化虾青素生物可及性的测定

按照 Salvia - Trujillo 等^[15]的方法并进行了一些修改。将 10 mL 消化后的乳液在 25℃ 下以 716 × g 离心 1 h, 收集含有溶解在混合胶束中的虾青素的上清液。在分析前,从胶束级分中丢弃未消化的上层油脂液体,得到含虾青素的胶束级分。将 5 mL 未消化乳液或胶束级分与 5 mL 二氯甲烷 - 甲醇(体积比 2:1)混合,在 5℃ 下以 137 × g 离心 10 min, 收集含虾青素的底层,将顶层再次重复处理,合并含虾青素的底层,用紫外分光光度计在 480 nm 处测量吸光度,通过标准曲线方程(由虾青素质量浓度与吸光度绘制的标准曲线获得)计算样品中虾青素含量,再按式(2)计算虾青素的生物可及性。

$$Y_2 = \frac{C_{\text{Micelle}}}{C_{\text{Raw}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: Y_2 为虾青素的生物可及性; C_{Micelle} 为胶束级分中虾青素的含量; C_{Raw} 为原始乳液(未消化乳液)中虾青素的含量。

1.2.8 数据分析

用 Origin 8.5 软件绘制图表,用 SPSS 12.0 对数据进行显著性分析($p < 0.05$ 时,表明具有显著性差异)。所有实验均做 3 个平行,结果以“平均值 ± 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 Ca^{2+} 质量分数对 FG - PPI - DHA 藻油双层乳液理化性质的影响

单层乳液在制备后很快出现分层现象,而双层乳液外观未见明显分层,因此探究 Ca^{2+} 质量分数对 FG - PPI - DHA 藻油双层乳液储藏稳定性的影响。

2.1.1 对流变学特性的影响

按 1.2.4.1 方法,测定不同 Ca^{2+} 质量分数的 FG - PPI - DHA 藻油双层乳液的流变学特性,结果见图 1。由图 1 可见:相同 Ca^{2+} 质量分数的双层乳液的储能模量(G')均高于损耗模量(G''),说明它们主要具有弹性行为特性;双层乳液的黏弹性随 Ca^{2+} 质量分数的增加总体呈增大趋势,这是由于随着 Ca^{2+} 质量分数的增加,其与 FG 形成更加致密的网状结构,导致 FG 的多糖分子之间缠结作用增强,流动阻力增大,使储能模量比损耗模量增加趋势更为显著^[16]。

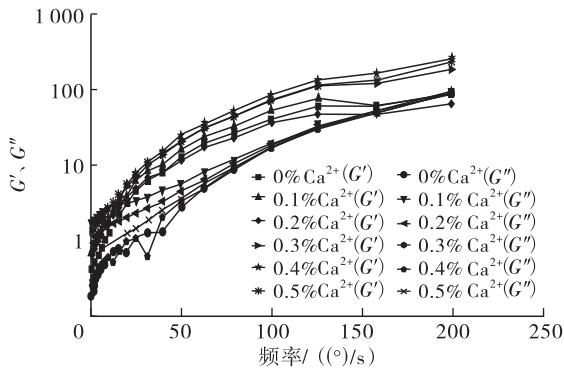


图1 Ca²⁺质量分数对FG-PPI-DHA藻油双层乳液的流变学特性的影响

2.1.2 对储藏稳定性的影响

2.1.2.1 乳液储藏前后的粒径及粒径分布

分别测定不同Ca²⁺质量分数的FG-PPI-DHA藻油双层乳液储藏0 d及20 d的粒径及粒径分布,结果见图2。由图2可见,储藏0 d时,未添加

Ca²⁺的双层乳液粒径较小,随着Ca²⁺质量分数的增加,乳液粒径呈先增大后减小的趋势,推测可能是因为低浓度Ca²⁺先与FG发生相互作用,导致蛋白质-多糖复合物包覆的液滴发生聚集,从而使乳液粒径增大,但当Ca²⁺质量分数较高时,乳液中的蛋白质-多糖-Ca²⁺发生相互作用形成更加致密的三维网状结构^[16],有效防止了液滴的聚集,因此粒径减小,粒径分布呈现更为均匀的趋势。而储藏20 d后,Ca²⁺质量分数为0%~0.3%的双层乳液粒径显著下降(未添加Ca²⁺的双层乳液粒径由储藏0 d时的10.4 μm降至储藏20 d时的4.3 μm),而Ca²⁺质量分数为0.4%~0.5%的双层乳液粒径几乎保持不变,结合流变学特性测定结果,推测可能是由于Ca²⁺结合到FG的链状结构中,使其形成网状结构从而降低液滴聚集造成的粒径增大现象。

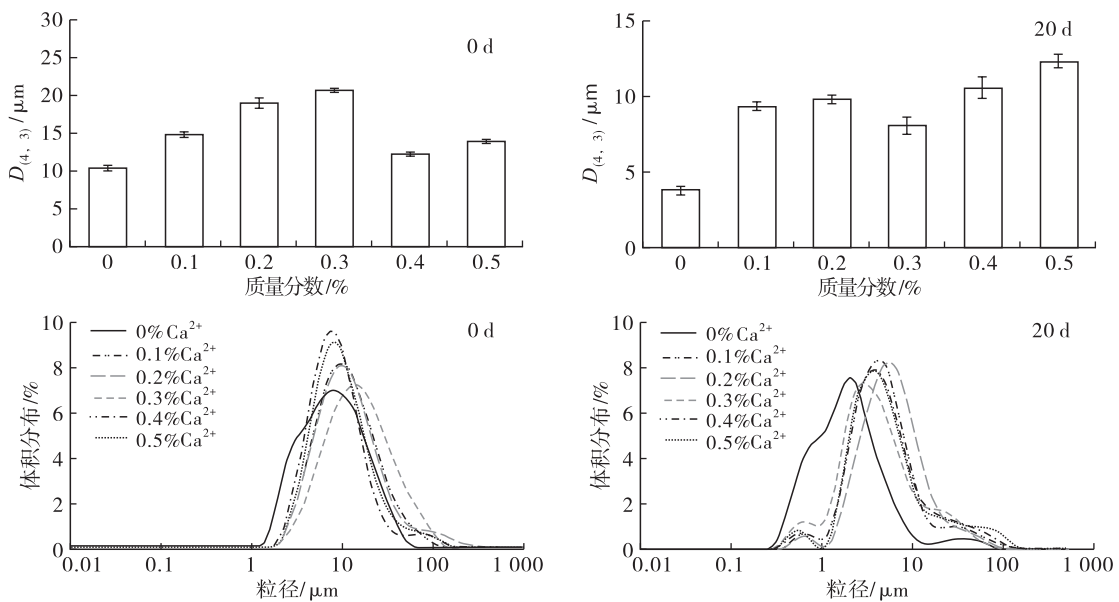


图2 Ca²⁺质量分数对FG-PPI-DHA藻油双层乳液储藏0 d与20 d的粒径和粒径分布的影响

2.1.2.2 乳液储藏前后的Zeta-电位及外观形貌

分别测定不同Ca²⁺质量分数的FG-PPI-

DHA藻油双层乳液储藏0 d及20 d的Zeta-电位,结果见图3。

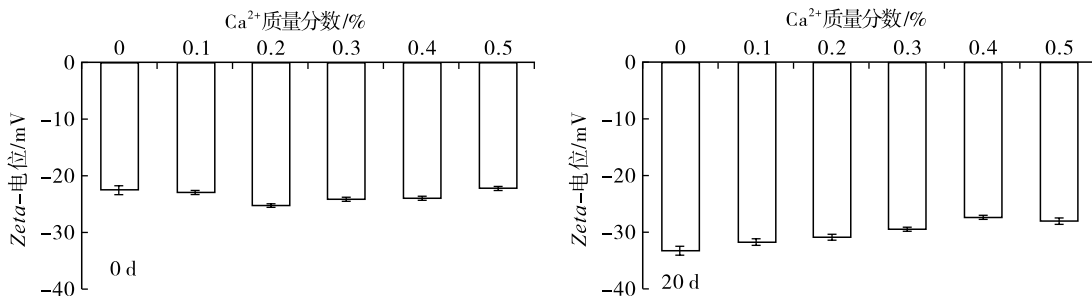


图3 Ca²⁺质量分数对FG-PPI-DHA藻油双层乳液储藏0 d与20 d的Zeta-电位的影响

由图3可见,在储藏0 d时,Ca²⁺质量分数对FG-PPI-DHA藻油双层乳液所带电荷的影响较

小,结合外观形貌观察结果,双层乳液均处于较为稳定的状态,这是因为Ca²⁺能够与FG分子发生交联

作用形成三维网状结构,这种网状结构能够将多糖分子内部结构排列得更加紧密,从而降低乳液分散相的流动性,产生较高的黏度来稳定乳液体系。储藏20 d后, Ca^{2+} 质量分数的差异对乳液电位影响较小,且仍能够观察到质量分数为0.4%~0.5%的 Ca^{2+} 双层乳液体系所带电荷变化较小,表明高黏度

且致密的水相能够有效提高乳液的稳定性。

2.1.2.3 乳液储藏前后的 TSI

TSI 是乳液对相分离抵抗力的定量度量,TSI 值越高,越不稳定,越容易相分离^[17]。测定不同 Ca^{2+} 质量分数的 FG-PPI-DHA 藻油双层乳液储藏0 d及20 d的 TSI,结果见图4。

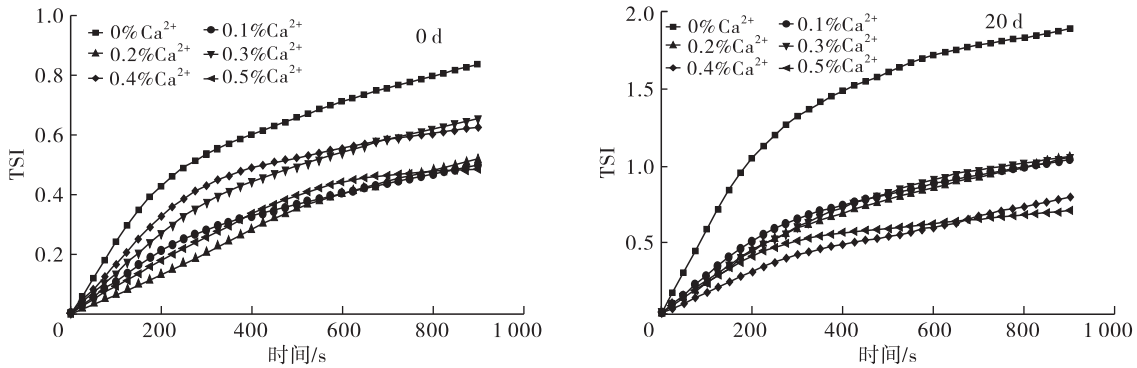


图4 Ca^{2+} 质量分数对 FG-PPI-DHA 藻油双层乳液储藏0 d与20 d的 TSI 的影响

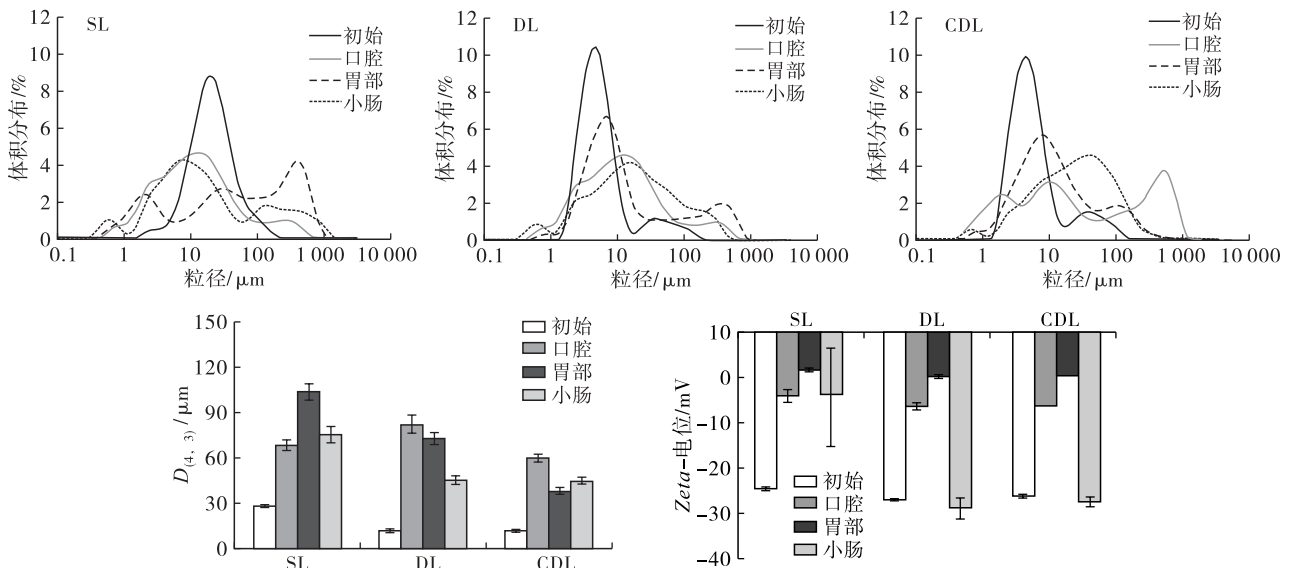
由图4可见, Ca^{2+} 对 FG-PPI-DHA 藻油双层乳液的 TSI 具有显著影响,无论是储藏0 d或储藏20 d的双层乳液,其 TSI 均受 Ca^{2+} 质量分数的影响,高质量分数(0.4%~0.5%)的 Ca^{2+} 双层乳液在储藏20 d后依旧保持相对较好的稳定状态。随着 Ca^{2+} 质量分数的增加,双层乳液的 TSI 值整体呈逐渐降低趋势。这种现象可归因于:①由于 Ca^{2+} 先加入到 FG 溶液中,增大了水相的黏度,与单层乳液混合后从而阻碍了乳滴的运动,防止液滴聚集的同时

提高其稳定性;② Ca^{2+} -FG-PPI 形成结构更为致密的界面膜降低了液滴与水相之间的密度比,进一步提高了乳液的稳定性。

综合上述实验结果,选择 Ca^{2+} 质量分数为0.4%的双层乳液进行后续实验。

2.2 负载虾青素的 DHA 藻油乳液的消化特性

负载虾青素的 DHA 藻油乳液经口腔、胃和小肠各阶段模拟消化后乳液体系的粒径及粒径分布、电荷特性的测定结果如图5所示。



注:初始为未消化的乳液。

图5 模拟消化过程中负载虾青素的 SL、DL、CDL 的粒径、粒径分布及 Zeta-电位

2.2.1 模拟口腔消化阶段

由图5可见,与初始相比,3种乳液经口腔消化后其粒径均有一定程度的增大,其中 SL 的粒径升高

至68.13 μm 。SL 粒径增长的原因可能是黏蛋白是一种带电的糖蛋白,能够促使乳液产生微小聚集现象,从而导致乳液的粒径略有增大^[18]。DL 经口腔

消化后,与初始相比其粒径升高至 81.67 μm ,乳滴产生较大程度的絮凝;而 CDL 经口腔消化后,与初始相比其粒径升高至 59.47 μm ,乳滴发生一定程度的聚集,可能是 Ca^{2+} 的添加能够使 PPI 形成“盐桥”,产生的网状结构更加有效地保护乳液,减轻黏蛋白及矿质盐离子的影响。CLSM 的观测结果显示,经口腔消化后,SL 没有发生明显的絮凝或聚集现象,而与 DL 相比,CDL 的粒径增大程度较小,乳液内部形态保持较为良好。

由图 5 可见,3 种乳液经口腔消化后其所带电荷绝对值均显著降低,推测原因是吸附到乳滴的油-水界面的部分阳离子导致乳液所带电荷下降。

2.2.2 模拟胃消化阶段

由图 5 可见,经胃消化后,SL 的粒径显著增加至 103.33 μm 。CLSM 的观测结果显示,经胃消化后,SL 有絮凝现象存在,且油滴分布不均匀,这是因为在强酸(pH 3.0)条件下(低于 PPI 等电点)胃蛋白酶水解 PPI 可能降低了乳滴聚集的稳定性^[19],因此乳滴大量聚集,导致粒径增大。经胃消化后,DL 的粒径增大至 72.73 μm (与初始相比),这是由于胃液中的高离子强度降低了表面液滴之间的静电排斥力,且一些被蛋白质包裹的液滴可能会被体系中存在其他表面分子所取代,导致乳滴聚集程度增加^[18]。CDL 经胃消化后,粒径增大至 37.7 μm (与初始相比),与 SL 和 DL 相比其粒径增大程度较低,这可能是因为胃消化过程中 Ca^{2+} 与 FG 形成的网状结构在一定程度上能保护部分乳液不受强酸性胃液环境的影响,但还是有部分乳液中一些被蛋白质包裹的液滴可能会被体系中存在其他表面分子所取代^[18]。CLSM 微观形态观察发现,CDL 经胃消化后乳滴粒径有一定程度的增大(与初始比),但聚集或絮凝现象不明显。

由于胃模拟消化过程在强酸(pH 3.0)条件下进行,游离氢离子能够吸附在乳滴界面,因此 3 种乳液体系的电位均带正电荷(如图 5 所示)。

2.2.3 模拟小肠消化阶段

由图 5 可见,SL 经小肠消化后,粒径增大至 75.40 μm (与初始相比)。CLSM 微观形态观察发现 SL 体系存在较大的絮凝体,推测小肠消化后由于胆汁盐造成乳液絮凝消化不完全(样品浓度较低,粒径测定不准确,导致微观结构未能拍摄到较大粒径的乳滴^[20]);另一部分原因可能是脂质的消化及胰酶的作用引起的脂肪消化产物(如 FFA,单酰基甘油和二酰基甘油)的置换而引起液滴聚集^[21],脂质

消化所产生的 FFA 也会影响乳滴的分布状态^[22]。DL 和 CDL 经小肠消化后,粒径分别为 45.27、44.23 μm ,CLSM 微观形态观察发现,这两种双层乳液中均无明显絮凝现象,推测乳液中大部分油脂已被脂肪酶消化,在小肠消化后粒径分布仅表示蛋白质的聚集或絮凝现象。

由图 5 可见:经小肠消化后,SL 表面所带的负电荷量显著降低(与初始相比),原因可能是脂质的消化及胰酶的作用引起的脂肪消化产物的置换而引起乳滴聚集,这与 Xu 等^[21]的研究结果一致;双层乳液表面所带的负电荷量均有增加趋势(与初始相比),推测原因是小肠模拟消化液中胆汁盐和脂肪酶会显著降低蛋白质吸附到界面的能力,部分取代蛋白质分子,且由于 pH 由 3 升至 7,随着阴离子胆汁盐吸附在液滴表面而造成乳液表面负电荷量的增大,同时表面活性成分 FFA 等吸附在界面,同样造成负电荷的增加^[23]。

小肠消化阶段,3 种负载虾青素的乳液 FFA 释放量如图 6 所示。

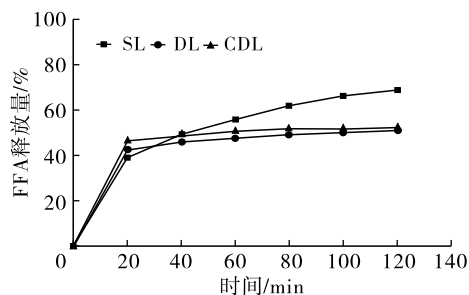


图 6 负载虾青素的 SL、DL、CDL 的 FFA 释放量

由图 6 可见,在初始的 20 min 内,3 种乳液体系中 FFA 均被快速释放,20 min 后随着消化时间的延长,双层乳液相对恒定释放 FFA,单层乳液 FFA 释放速率更快,但到达平衡状态较慢。该现象表明乳液体系中存在 FG 会影响脂肪的消化,这与 Boonlao 等^[8]的研究结果一致,即添加多糖可能会通过限制胆汁盐和脂肪酶在脂质液滴表面有效反应的途径来抑制脂质的消化过程。对于双层乳液,添加 Ca^{2+} 的双层乳液体系 FFA 释放量均略低于未添加 Ca^{2+} 的双层乳液体系。研究发现, Ca^{2+} 浓度较高可能会改变 FFA 的离子化状态与非离子化状态之间的平衡^[16]。未添加 Ca^{2+} 的双层乳液液滴在消化后聚集程度较高,脂肪酶与 DHA 藻油的接触面积降低,因此其 FFA 释放量略低于添加 Ca^{2+} 的双层乳液体系。

3 种 DHA 藻油乳液经小肠消化后,按 1.2.7 方法离心,3 种乳液体系均出现中间相,且为光学透明的淡橙色溶液,说明虾青素被溶解在混合胶束中。3

种乳液消化后虾青素的生物可及性见表 1。由表 1 可见,在 SL 与 DL 中,虾青素的生物可及性分别为 47.42% 和 12.54%,这与 Boonlao 等^[8]的研究结果一致,即在 WPI 和 WPI-XG 两种乳液体系中虾青素的释放程度分别为 46.2% 和 12.6%。在 DL 中虾青素的生物可及性较低,可能是由于 FG 的存在限制了胆汁盐和脂肪酶在脂质液滴界面反应的途径,从而抑制了胶束的形成,虾青素仍然保留在未消化的液滴中,导致其在水相中的溶解度降低^[24],另一方面可能是因为 FG 与释放的虾青素结合,形成致密结构的复合物分子^[25-26]。在 CDL 中虾青素生物可及性为 9.66%,推测该消化物中虾青素的位置发生了变化(因为虾青素极性较强),造成在脂质消化过程中包埋的虾青素应该从油滴中释放出来,并溶解在由胆汁盐和 FFA 形成的混合胶束中,但由于 Ca^{2+} 的存在,胶束倾向于聚集并最终形成较大的颗粒,以使其沉降到样品底部,乳液中不溶性钙盐进入到负载虾青素的混合胶束中,导致其生物可及性降低。综上所述,虾青素的生物可及性对小肠中存在的钙水平高度敏感,这在食品生产过程中具有重要的实际应用价值。例如,摄入富含类胡萝卜素的食品时其中富含的钙可能会导致类胡萝卜素的生物利用度下降,功能活性丧失等。

表 1 3 种乳液体系模拟消化后的虾青素生物可及性

乳液	虾青素生物可及性/%
SL	47.42 ± 0.35
DL	12.54 ± 0.57
CDL	9.66 ± 0.69

3 结 论

Ca^{2+} 对 FG-PPI 包埋 DHA 藻油乳液的粒径及分布、电荷特性、流变特性、抗重力稳定性指数与递送虾青素的效果均产生显著影响。随着 Ca^{2+} 质量分数的增加,FG-PPI-DHA 藻油双层乳液黏弹性总体呈现逐渐增大的趋势,且乳液储藏 20 d 后, Ca^{2+} 质量分数为 0.4% 的双层乳液体系粒径无明显变化,乳滴分布呈均匀的状态,同时乳液表面电荷也未发生显著变化,外观呈现稳定且均匀的状态。添加 Ca^{2+} 会在乳液消化过程中产生不溶性钙盐进入到负载虾青素的混合胶束中引起胶束沉淀,降低虾青素生物可及性,可能会导致 FFA 释放量下降,产生一定缓释效果。研究结果可为 $\omega-3$ PUFA 递送体系的食品生产提供一定的参考价值,为设计多营养素递送 LC-PUFA 与类胡萝卜素体系的构建提供理论基础。

参考文献:

- [1] MA N N, GAO Q R, LI X Y, et al. Enhancing the physicochemical stability and digestibility of DHA emulsions by encapsulation of DHA droplets in caseinate/alginate honeycomb-shaped microparticles [J]. Food Funct, 2020, 11(3): 2080-2093.
- [2] CHEN X W, CHEN Y J, WANG J M, et al. Phytosterol structured algae oil nanoemulsions and powders: improving antioxidant and flavor properties [J]. Food Funct, 2016, 7(9): 3694-3702.
- [3] 刘宁, 赵佳, 武选民, 等. 紫苏籽中不同蛋白组分的功能性质研究 [J]. 中国油脂, 2019, 44(6): 45-49.
- [4] QIAN K Y, CUI S W, WU Y, et al. Flaxseed gum from flaxseed hulls: extraction, fractionation, and characterization [J]. Food Hydrocolloid, 2012, 28(2): 275-283.
- [5] WANG Y, LI D, WANG L J, et al. Effects of drying methods on the functional properties of flaxseed gum powders [J]. Carbohydr Polym, 2010, 81(1): 128-133.
- [6] REN W, ZHAO S, LIANG Y, et al. Effects of hydrosoluble calcium ions and organic acids on citrus oil emulsions stabilized with citrus pectin [J/OL]. Food Hydrocolloid, 2020, 100: 105413 [2021-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105413>.
- [7] DARIO A F, HORTENCIO L M, SIERAKOWSKI M R, et al. The effect of calcium salts on the viscosity and adsorption behavior of xanthan [J]. Carbohydr Polym, 2011, 84(1): 669-676.
- [8] BOONLAO N, SHRESTHA S, SADIQ M B, et al. Influence of whey protein-xanthan gum stabilized emulsion on stability and in vitro digestibility of encapsulated astaxanthin [J/OL]. J Food Eng, 2020, 272: 109859 [2021-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109859>.
- [9] LIU W Y, FENG M Q, WANG M, et al. Influence of flaxseed gum and NaCl concentrations on the stability of oil-in-water emulsions [J]. Food Hydrocolloid, 2018, 79: 371-381.
- [10] LAN Y, CHEN B, RAO J. Pea protein isolate-high methoxyl pectin soluble complexes for improving pea protein functionality: effect of pH, biopolymer ratio and concentrations [J]. Food Hydrocolloid, 2018, 80: 245-253.
- [11] CHENG C, YU X, MCCLEMENTS D J, et al. Effect of flaxseed polyphenols on physical stability and oxidative stability of flaxseed oil-in-water nanoemulsions [J/OL]. Food Chem, 2019, 301: 125207 [2021-04-21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125207>.
- [12] RAIKOS V, DUTHIE G, RANAWANA V. Comparing the

- efficiency of different food – grade emulsifiers to form and stabilise orange oil – in – water beverage emulsions; influence of emulsifier concentration and storage time[J]. Int J Food Sci Technol, 2017, 52(2): 348 – 358.
- [13] BRODKORB A, EGGER L, ALMINNGER M, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion [J]. Nat Protoc, 2019, 14(4): 991 – 1014.
- [14] CHENG C, YU X, HUANG F H, et al. Effect of different structural flaxseed lignans on the stability of flaxseed oil – in – water emulsion: an interfacial perspective [J/OL]. Food Chem, 2021, 357: 129522 [2021 – 04 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129522>.
- [15] SALVIA – TRUJILLO L, QIAN C, MARTIN – BELLOSO O, et al. Influence of particle size on lipid digestion and β – carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions[J]. Food Chem, 2013, 141(2): 1472 – 1480.
- [16] YAN J, LIANG X, MA C, et al. Design and characterization of double – cross – linked emulsion gels using mixed biopolymers: zein and sodium alginate [J/OL]. Food Hydrocolloid, 2021, 113: 106473 [2021 – 04 – 21]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106473>.
- [17] CERIMEDO M S A, IRIART C H, CANDAL R J, et al. Stability of emulsions formulated with high concentrations of sodium caseinate and trehalose [J]. Food Res Int, 2010, 43(5): 1482 – 1493.
- [18] QIU C, ZHAO M, DECKER E A, et al. Influence of protein type on oxidation and digestibility of fish oil – in – water emulsions: gliadin, caseinate, and whey protein [J]. Food Chem, 2015, 175: 249 – 257.
- [19] GOLDING M, WOOSTER T J, DAY L, et al. Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids [J]. Soft Matter, 2011, 7(7): 3513 – 3523.
- [20] MUN S, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase[J]. Food Res Int, 2007, 40(6): 770 – 781.
- [21] XU D, YUAN F, GAO Y, et al. Influence of whey protein – beet pectin conjugate on the properties and digestibility of β – carotene emulsion during in vitro digestion[J]. Food Chem, 2014, 156: 374 – 379.
- [22] MCCLEMENTS D J. Enhanced delivery of lipophilic bioactives using emulsions: a review of major factors affecting vitamin, nutraceutical, and lipid bioaccessibility [J]. Food Funct, 2018, 9(1): 22 – 41.
- [23] ZHANG C L, XU W, JIN W P, et al. Influence of anionic alginate and cationic chitosan on physicochemical stability and carotenoids bioaccessibility of soy protein isolate – stabilized emulsions[J]. Food Res Int, 2015, 77: 419 – 425.
- [24] PARK S, MUN S, KIM Y R. Effect of xanthan gum on lipid digestion and bioaccessibility of β – carotene – loaded rice starch – based filled hydrogels[J]. Food Res Int, 2018, 105: 440 – 445.
- [25] YONEKURA L, NAGAO A. Intestinal absorption of dietary carotenoids [J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(1): 107 – 115.
- [26] LIU X, ZHANG R, MCCLEMENTS D J, et al. Nanoemulsion – based delivery systems for nutraceuticals: influence of long – chain triglyceride (LCT) type on in vitro digestion and astaxanthin bioaccessibility[J]. Food Biophys, 2018, 13(4): 412 – 421.

· 公益广告 ·



节能减排 提质增效
油脂加工 精准适度

《中国油脂》宣