

## 苹果果胶对不同来源油体乳液稳定性和脂肪酸利用率的影响

武利春<sup>1</sup>, 孙禹凡<sup>1</sup>, 康梦雪<sup>1</sup>, 齐宝坤<sup>1</sup>, 李 杨<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030

<sup>2</sup>黑龙江省绿色食品科学研究院 哈尔滨 150000)

**摘要** 为探究果胶(0~5 g/L)对大豆或花生油体复合乳液稳定性和脂肪酸利用率的影响,借助动态光散射、凝胶电泳、激光共聚焦显微镜和气相色谱等评价复合乳液储存稳定性,并在此基础上,研究体外模拟消化对复合乳液界面蛋白结构、乳液结构和脂肪酸利用率的影响。得出结果:当果胶含量<3 g/L时,乳液的储存稳定性高度依赖于果胶含量;当果胶含量>1.5 g/L时,果胶通过降低乳液聚集程度和增加液滴间静电排斥的方式,显著改善乳液稳定性;当果胶含量介于3~5 g/L时,果胶对乳液的稳定作用达到平衡。在体外模拟消化试验中,胃蛋白酶水解界面蛋白形成低于15 ku的小肽,而果胶可抑制胃蛋白酶水解界面蛋白。负电肽的形成和胆盐的添加以及游离脂肪酸的释放使得乳液 $\zeta$ -电位显著降低。与大豆油体相比,果胶通过延缓界面蛋白水解和控制大豆复合乳液粒度大小,使得大豆复合乳液脂肪酸利用率降低3.3%。相反,与花生油体相比,因花生复合乳液具有更大的胰蛋白酶水解面积,故花生复合乳液脂肪酸利用率增加33.8%。

**关键词** 油体;苹果果胶;储存稳定性;体外模拟消化;脂肪酸利用率

**文章编号** 1009-7848(2023)04-0076-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.008

油体(Oil bodies, OBs)是种子用于存储甘油三酯的细胞器,其结构呈球状,直径为0.5~2.5  $\mu\text{m}$ ,球体内部疏水基质为甘油三酯,球体表面被由磷脂与结构蛋白构成的半单位膜包裹,其中甘油三酯、磷脂和结构蛋白分别约占OBs干质量的90%,2%和1%,此外OBs富含必需脂肪酸、生育酚和植物甾醇等物质,具有预防心脑血管病和癌症的作用<sup>[1-2]</sup>。OBs可以通过湿法磨浆的方法分离得到,与水混合可形成乳液,相比于蛋白类人造乳液,此过程无需额外的均质处理<sup>[3]</sup>。OBs不仅可作为疏水活性物质的天然载体<sup>[4-5]</sup>,还可直接加到其它乳液体系中,开发低饱和脂肪酸新产品,如沙拉酱、千岛酱、酸奶等<sup>[6-7]</sup>,具有广泛的应用前景。

大量研究表明OBs易聚集分层,这主要是由于在OBs提取过程中,储存蛋白(7S,11S,2S和酶类)从液泡中渗漏并吸附在油体表面,导致液滴表面电荷量减少,OBs聚集失稳,从而限制OBs的应用<sup>[1,8]</sup>。近年来,人们发现阴离子多糖携有大量的负电荷,可增加乳液液滴间静电斥力和空间位阻,提

升乳液稳定性<sup>[9-10]</sup>。果胶是一种典型的阴离子杂多糖,其主链由 $\alpha$ -1,4-半乳糖醛酸单元构成,侧链由不同的中性糖残基组成<sup>[11]</sup>。果胶分子中含有大量的羟基和羧基,从而决定果胶具有良好的水溶性和电荷修饰性能<sup>[12]</sup>。羟基作为典型的极性官能团,能与水分子形成氢键,从而保证果胶在水中的溶胀特性,增加乳液体系黏度,减缓乳液分层,进而影响果胶稳定的乳液在功能活性物质缓/控释、载药量和包封率等方面的性质<sup>[13-16]</sup>。

目前,OBs体外消化试验多针对一种或几种OBs乳液<sup>[17-18]</sup>,而针对果胶稳定的不同OBs乳液脂肪酸利用率的研究较少。之前的研究表明大豆和花生油体具有良好的热稳定性和氧化稳定性<sup>[19]</sup>。本试验研究了中性条件下,不同含量的果胶(0~5 g/L)对大豆和花生油体乳液稳定性的影响,并探讨体外模拟消化对果胶复合乳液界面组成和微观结构的影响,以及果胶对OBs中脂肪酸利用率的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

大豆和花生购自哈尔滨农贸市场。大豆的水分、蛋白质和油脂含量分别为10.89%,25.76%和18.42%,花生的水分、蛋白质和油脂含量分别为

收稿日期:2022-04-23

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31801579);  
黑龙江省自然科学基金项目(LH2019C032)

第一作者:武利春,女,硕士生

通信作者:李杨 E-mail: yangli@neau.edu.cn

4.98%, 19.80% 和 58.27%。苹果果胶(P6030-25g)和胃蛋白酶(P6390-100g),北京博奥拓达科技有限公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(P1200-25T)和预染彩虹蛋白 marker(PR1950-20T),北京索莱宝科技有限公司;尼罗红(S19279-1g)、尼罗蓝(S19278-5g)和胰蛋白酶(S10031-100g),上海源叶生物科技有限公司;所有有机溶剂和化学试剂均为分析纯级。

## 1.2 仪器与设备

AP324Y 分析电子天平,日本岛津(中国)有限公司;JJ-2 组织捣碎机,常州市国旺仪器制造有限公司;PHS-2FpH 计,上海仪电科学仪器有限公司;NANOZS90 纳米粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;MODELBE-210 型垂直电泳仪,日本 BIOCRAFT 公司;凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司;TCSSP8 激光共聚焦扫描显微镜,德国莱卡公司;7890 气相色谱仪,美国安捷伦科技(中国)有限公司;GL-21M 离心机,湖南湘仪离心机有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 制备大豆和花生油体乳液 改进 Zhao 等<sup>[20]</sup>提取油体的方法,将大豆和花生浸泡 18 h 后,与 9 倍体积的去离子水混合磨浆,4 层 200 目脱脂纱布过滤,直接往浆液中加入质量分数 20% 的蔗糖颗粒,充分搅拌直至蔗糖完全溶解,将浆液以 14 000×g 离心 30 min,通过分液漏斗收集上浮乳状物。为进一步富集油体,再次将乳状物分散在 20% 蔗糖溶液中,继续以 14 000×g 离心 30 min。将上层的乳状物分散在 9 倍体积的去离子水中,离心(14 000×g, 30 min),该水洗步骤重复 3 次,最终上浮乳状物为 OBs。提取过程在 4 °C 下进行。将 10 g OBs 分散在 90 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0, 10 mmol/L)中,得到大豆油体乳液(Soybean oil body, SOB)和花生油体乳液(Peanut oil body, POB)。

1.3.2 制备果胶稳定的油体乳液 将 1 g 苹果果胶(Apple pectin, AP)溶于 100 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0, 10 mmol/L)中,10% SOB 或 POB 和 10 g/L 苹果果胶按比例稀释,用磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0, 10 mmol/L)定容。最后配成不同果胶含量(0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 g/L)的 5% OBs 乳液。将 8 mL

样品置于透明的玻璃瓶中,25 °C 静置 1 周后拍照。

1.3.3  $\zeta$ -电位和粒径测定 取 20  $\mu$ L 样品分散于 10 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0, 10 mmol/L)中,样品遮光率达 15%~20%。用马尔文纳米粒度仪测定  $\zeta$ -电位、平均粒径和粒径分布,分散相和连续相的折射率分别为 1.456 和 1.330,测定温度 25 °C,平衡时间 120 s。

1.3.4 体外模拟消化 采用胃和小肠组成的二步模拟模型评估果胶对乳液中脂肪酸利用率的影响。按照 10% SOB 或 POB:磷酸盐缓冲液(pH 7.0, 10 mmol/L):10 g/L 苹果果胶=10:7:3 (体积比)混合,得到 1.5 g/L 果胶稳定的大豆和花生油体乳液,分别命名为 SOB-AP 和 POB-AP。准备模拟胃液(Simulated gastric fluid, SGF)和模拟肠液(Simulated intestinal fluid, SIF)<sup>[18]</sup>。

胃阶段:将 30 mL 乳液与 30 mL 含 2 g/L NaCl 溶液(pH 1.5)混合,在摇床中 37 °C 温育 10 min 加入 64 mg 胃蛋白酶,用 6 mol/L HCl 将体系 pH 值调节至 2.0,然后,在 37 °C 水浴、150 r/min 的摇床中持续振荡 2 h。

小肠阶段:用 3 mol/L NaOH 将 60 mL 胃消化液的 pH 值调至 7.0。取 50 mL 用于小肠消化。将 50 mL 胃消化液与 50 mL SIF (SIF: 6.8 g/L  $K_2HPO_4$ 、5 mg/mL 猪胆盐、1.6 mg/mL, pH 7.0)混合后置于 37 °C 水浴、150 r/min 摇床中持续振荡 2 h。在小肠消化过程中,持续向系统中添加 0.1 mol/L NaOH 溶液以维持 pH 7.0,并记录 NaOH 随时间的消耗量。

1.3.5 SDS-PAGE 对未消化的乳液、经胃肠消化后的乳液和胃蛋白酶进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 和考马斯亮蓝蛋白质染色参照 Niki-foridis 等<sup>[21]</sup>的方法。标准蛋白分子质量为 15.0~130.0 ku。5 mg/mL 样品和含  $\beta$  巯基乙醇的上样缓冲液等体积混合后,100 °C 处理 5 min,取 10  $\mu$ L 样品做电泳试验。分离胶和浓缩胶的质量浓度分别为 150 g/L 和 50 g/L,分离胶和浓缩胶电压分别为 80 V 和 120 V。电泳结束后,凝胶经考马斯亮蓝 R250 染色液染色 30 min 后,脱色至凝胶透明条带清晰,并对电泳胶片拍照。

1.3.6 激光共聚焦显微镜 采用激光共聚焦显微镜(Confocal laser scanning microscope, CLSM)改

进 Nikiforidis 等<sup>[21]</sup>的方法,在 25 ℃下观察。采用 Ar/Kr 和 He/Ne 双通道激光模式,激发波长分别是 488 nm 和 633 nm。将 0.5 g 尼罗红和 0.05 g 尼罗蓝溶于 5 mL 异丙醇后过 0.22 μm 有机系滤膜,备用。样品经磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0, 10 mmol/L)适当稀释后测定,在 1 mL 样品中加入 20 μL 尼罗红染液和 50 μL 尼罗蓝染液,混匀,避光静置 30 min,将 5 μL 染色的样品滴于载玻片上,盖上盖玻片并用甘油密封。图片中绿色表示蛋白质,红色表示油脂。

**1.3.7 游离脂肪酸测定** 小肠是脂肪水解形成游离脂肪酸(Free fatty acid, FFA)的重要阶段,在模拟小肠消化阶段,使用 0.1 mol/L NaOH 滴定系统,以维持 pH 7.0。FFA 释放量用 NaOH 消耗量表示,单位 μL。

**1.3.8 脂肪酸生物利用率测定** 在模拟胃肠消化后,分别取 50 mL 未消化的乳液和消化液按照 GB 5009.168-2016(第二法 外标法)<sup>[22]</sup>进行脂肪酸含量和组成测定。用 GS-MS 鉴定和分析脂肪酸甲酯,使用 SP-2560 柱(100 m×0.25 mm×0.20 μm),柱温 140 ℃保持 5 min,然后以 4 ℃/min 速率升至 240 ℃保持 17 min。进样口温度 260 ℃,氮气的速度 0.6 mL/min,脂肪酸甲酯保留时间和标准样品保留时间比对,脂肪酸甲酯含量用全部校正峰面积进行定量分析。脂肪酸含量计算公式:

$$\text{脂肪酸含量}(\%) = \frac{\text{样品中 FFA 含量}(\text{mg/kg})}{\text{样品总 FFA 含量}(\text{mg/kg})} \times 100 \quad (1)$$

脂肪酸利用率按如下公式计算:

$$\text{利用率}(\%) = \frac{\text{胶束中 FFA 含量}(\text{mg/kg})}{\text{未消化乳液中 FFA 含量}(\text{mg/kg})} \times 100 \quad (2)$$

## 1.4 数据处理

对所有乳液做 3 次重复分析,结果表示为“平均值±标准差”。使用 SPSS 22.0 软件进行单因素 ANOVA 方差分析,邓肯检验用于显著性分析( $P < 0.05$ , 差异显著)。

## 2 结果与分析

### 2.1 果胶浓度对 SOB 和 POB 稳定性的影响

图 1a 为 AP 质量浓度对 SOB 和 POB 平均粒径和储存稳定性的影响。未加入 AP 的 SOB 和 POB 平均直径分别为(1.77±0.30) μm 和(1.73±0.31) μm。AP 含量<1.5 g/L 时,随着 AP 含量的增加,两种乳液的粒径无显著变化( $P < 0.05$ );当 AP 含量为 1.5~3 g/L 时,SOB 粒径随 AP 含量的增加而逐渐下降,而 POB 粒径随 AP 含量的增加而增大;当 AP 含量>3 g/L 时,两种乳液粒径不再随 AP 含量的增加而改变。当 AP 含量为 5 g/L 时,SOB 和 POB 平均粒径分别为(0.98±0.29) μm 和(2.33±0.44) μm。观察图 1,乳液存放 1 周后,AP 含量<1.5 g/L 的乳液分层,未添加 AP 的乳液层油脂析出;AP 含量>1.5 g/L 的乳液存放 1 周后未出现分层和不稳定现象。如图 1b 所示,在 pH 7.0 时,SOB【ζ-电位(-8.67±0.34) mV】和 POB【ζ-电位(-6.32±0.44) mV】的表面电荷为负,这是因为乳

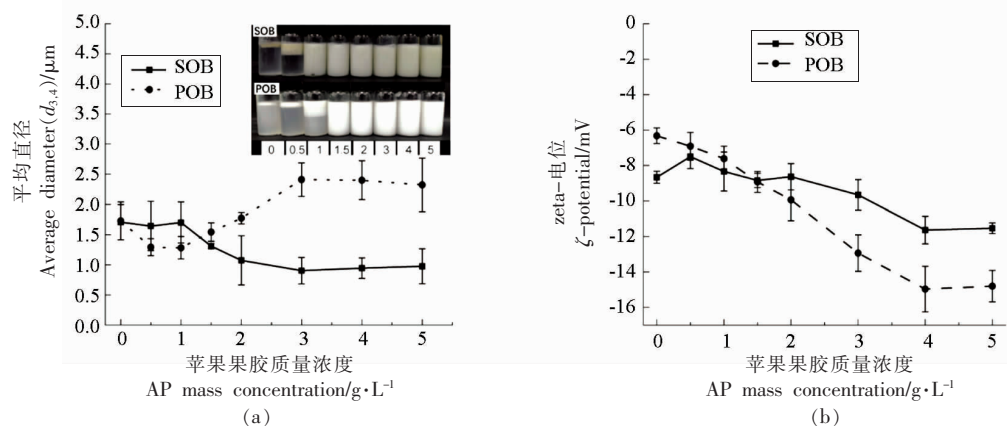


图 1 AP 浓度对 SOB 和 POB 平均直径和储存稳定性(a)和 ζ-电位(b)的影响

Fig.1 The influence of AP concentration on mean diameter and storage stability (a) and the ζ-potential (b) of SOB and POB



液等电点的 pH 值(4.5~5.5)低于 7。当 AP 含量低于 1.5 g/L 时,乳液  $\zeta$ -电位随 AP 含量的增加无显著变化( $P < 0.05$ );当 AP 含量介于 1.5~4 g/L 时,随 AP 含量的增加乳液  $\zeta$ -电位增加;当 AP > 3 g/L,两种乳液  $\zeta$ -电位不再随 AP 含量的增加而改变, $\zeta$ -电位趋于稳定。这些结果表明,AP < 1.5 g/L 时,乳液液滴间的静电斥力不足以克服液滴间的吸引力,从而导致乳液聚集。当 AP 含量介于 1.5~3 g/L 时,AP 可通过增加乳液表面静电排斥和降低乳液聚集的方式增加乳液储存稳定性,这是因为 AP 是一种典型阴离子多糖,带有大量的负电离子,这使得乳液  $\zeta$ -电位降低,液滴间的静电斥力增大<sup>[23]</sup>。当 AP 含量 > 0.3 时,乳液体系达到平衡,即使增加果胶浓度,也不会改变液滴大小和表面电荷,这是因为带负电的果胶对体系电荷的增加是有限的,当体系电荷接近果胶实际所带电荷时,果胶电荷的累积效应消失,从而达到电荷平衡状态<sup>[24]</sup>。在接下来体外模拟消化试验中,以未添加果胶的 SOB 和 POB 为对照,探究 AP(1.5 g/L)对 SOB 和 POB 脂肪酸利用的影响。

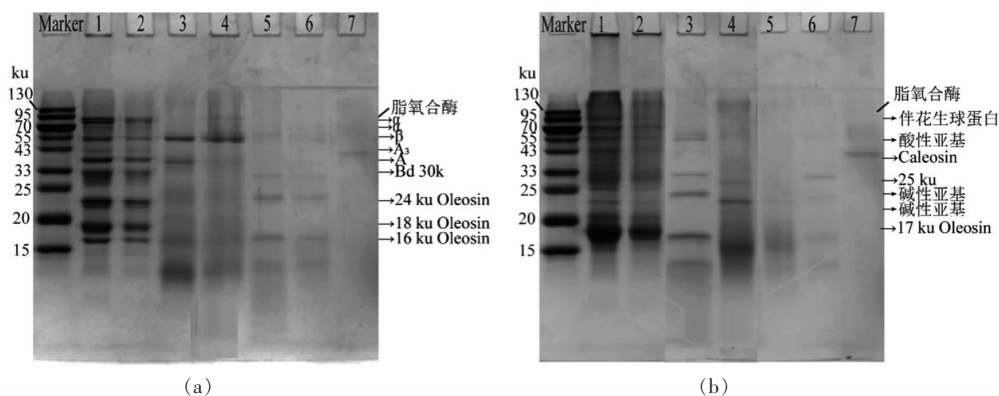
## 2.2 界面蛋白的水解

SOB 和 POB 界面蛋白组成如图 2a 和 2b 所示,界面蛋白由低分子质量 Oleosin 蛋白(分子质量 15~25 ku)和外源蛋白(分子质量 > 41 ku)构成。不同来源 OBs 的界面蛋白组成不同,这是由于蛋白编码基因不同,SOB 乳液 Oleosin 有 3 种同源

体,分别是 16, 18, 24 ku<sup>[25]</sup>。在 POB 中仅观察到 17 ku Oleosin<sup>[26]</sup>。

体外模拟消化对 SOB 和 SOB-AP 乳液界面组成的影响如图 2a 所示,条带 1 和条带 2 的蛋白质组成和分子质量相似,表明 AP 与 SOB 结合是非共价结合;条带 3 和 4 中,乳液经胃消化 2 h 后,分子质量高于 15 ku 的蛋白质条带变浅,Oleosin 蛋白质发生降解,胶片底部出现分子质量低于 15 ku 的新条带,而在条带 4 顶部观察到高分子质量的蛋白质,这说明 AP 可减缓胃蛋白酶对 SOB-AP 界面蛋白的水解;条带 5 和 6 中,经小肠消化 2 h 后,分子质量高于 15 ku 的条带颜色进一步变浅,低于 15 ku 的条带变深;分子质量在低于 15 ku,相比于条带 6,条带 5 显示更低分子质量的蛋白水解肽,这说明在小肠消化阶段,SOB 和 SOB-AP 界面蛋白被胰蛋白酶进一步水解。

体外模拟消化对 POB 和 POB-AP 乳液界面组成的影响如图 2b 所示,条带 1 和条带 2 具有相似的组成,表明 AP 稳定 POB 也是通过非共价结合。条带 3 和 4 为 POB 和 POB-AP 胃消化 2 h 后的界面蛋白组成,界面蛋白发生不同程度水解,在胶片底部,低于 15 ku 的蛋白质条带增加,条带 3 底端水解肽的分子质量低于条带 4,说明 POB 比 SOB 在胃消化阶段界面蛋白更充分,AP 可抑制胃蛋白酶水解 POB-AP 界面蛋白。条带 5 和 6 为 POB 和 POB-AP 小肠消化 2 h 后的界面蛋白组



注:M:marker;条带 1:消化前油体乳液中的蛋白质图谱;条带 2:消化前 AP 稳定的油体乳液中的蛋白质图谱;条带 3:胃消化后油体乳液中的蛋白质图谱;条带 4:胃消化后 AP 稳定的油体乳液中的蛋白质图谱;条带 5:小肠消化后油体乳液中的蛋白质图谱;条带 6:小肠消化后 AP 稳定的油体乳液中的蛋白质图谱;条带 7:胃蛋白酶。

图 2 SOB、SOB-AP(a)和 POB、POB-AP(b)体外模拟消化中蛋白质的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE map of SOB and SOB-AP (a) and POB and POB-AP (b) *in vitro* simulated digestion

成,分子质量低于 15 ku 水解肽的颜色变浅,POB-AP 水解肽的分子质量低于 POB,这表明在小肠消化阶段,POB 和 POB-AP 界面蛋白被完全水解。

### 2.3 $\zeta$ -电位分析

SOB、SOB-AP、POB、POB-AP 在体外模拟消化过程中  $\zeta$ -电位的变化如图 3 所示。消化前,乳液的电位(pH 7.0)约为-10 mV。经过胃消化后,样品电位(pH 7.0)显著降低( $P<0.05$ ),而样品间  $\zeta$ -电位无显著差异( $P<0.05$ ),这可能是由于界面蛋白发生水解(图 1),水解生成的肽不能稳定乳液,导致乳液内部油脂释放,电位降低。当乳液进入肠消化阶段后,乳液电位进一步(pH 7.0)降低,SOB 和 SOB-AP 电位分布在-60 mV 和-65 mV 之间,POB 和 POB-AP 电位分布在-55 mV 和-60 mV 之间。测定的乳液电位的 pH 相同,电位的降低可能与肠液中盐离子和胆盐以及胰蛋白酶水解界面蛋白产生的带负电多肽有关<sup>[27]</sup>。

### 2.4 结构变化

SOB、POB、SOB-AP、POB-AP 在体外模拟消化过程中粒径分布的变化如图 4a 和 4b 所示。最初,SOB、SOB-AP、POB 和 POB-AP 具有较宽的粒径分布范围(100~10 000 nm),且呈双峰或三峰分布,表明乳液在 pH 7.0 处液滴聚集,加入 AP 后,乳液粒径分布左移,乳液平均粒径减小,仍呈多峰分布,表明 AP 可减轻油体乳液聚集,这与图 1 结果一致。图 5a~5d 的 CLSM 图像也证实了在 pH 7.0 处,乳液发生聚集和聚合,AP 可通过增加静电排斥而使聚集的液滴分散形成更小的聚集形式。

体外模拟消化对 SOB 和 SOB-AP 的影响如

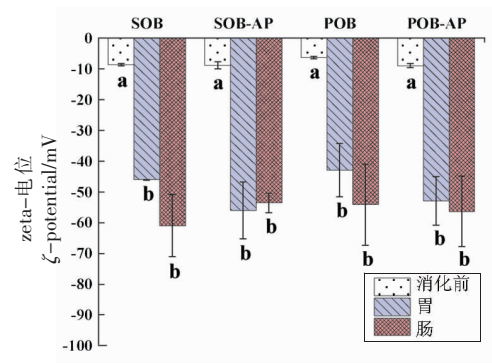


图 3 SOB、SOB-AP、POB、POB-AP 在体外模拟消化过程中  $\zeta$ -电位的变化

Fig.3 The change of  $\zeta$ -potential of SOB, SOB-AP, POB, POB-AP *in vitro* simulated digestion

图 4a 所示,经胃消化 2 h 后,SOB 粒径分布左移,呈多峰分布;相反,SOB-AP 粒径分布右移,粒径集中分布在 1~10  $\mu\text{m}$ 。图 5e 的 CLSM 中代表蛋白质的绿色荧光和代表油脂的红色荧光的强度增加,乳液局部形成大的聚集体,表明 SOB 表面蛋白被水解,油体内油脂释放;图 5f 中观察到蛋白质吸附在油脂周围,并且蛋白质以不完整的圆环形式存在,表明 AP 可抑制胃蛋白酶水解界面蛋白,然而,这种抑制作用有限。试验 SGF 为 pH 2.0,远低于 OBs 等电点(约 4.5),带负电的 AP 分子可通过静电相互吸附在带正电荷的 SOB 表面,增加乳液界面空间位阻,阻止胃蛋白酶与乳液表面蛋白水解位点接触<sup>[24]</sup>。当乳液进入小肠消化 2 h 后,如图 4a 所示,SOB、SOB-AP 粒径分布左移,粒径分布在 0.01~1  $\mu\text{m}$ ,呈双峰分布,这可能是因为

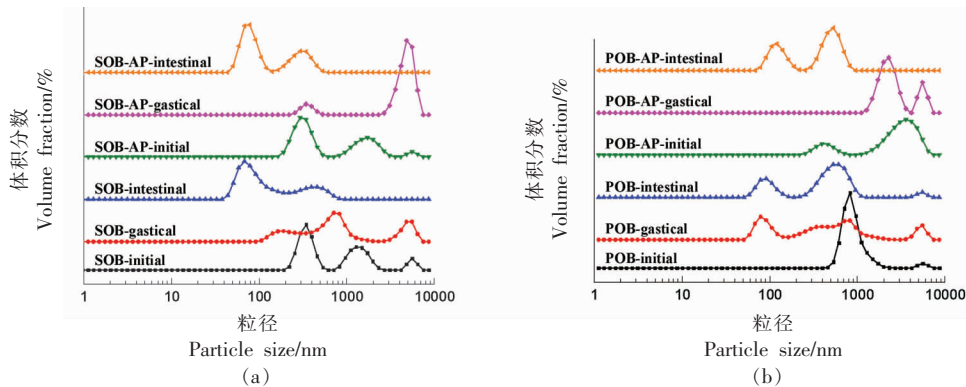


图 4 SOB、SOB-AP(a)和 POB、POB-AP(b)在体外模拟消化过程中粒径分布

Fig.4 The change of the particle size distribution of SOB and SOB-AP (a) and POB and POB-AP (b) *in vitro* simulated digestion

乳液进入小肠消化系统后,胆盐会迅速吸附在乳液界面上,从而激活脂肪酶,油脂以单甘油酯、二甘油酯和游离脂肪酸的形式存在<sup>[27]</sup>。图 5i~5l 显示小肠消化后乳液的微观结构,为更加清晰观察乳液状态,图 5i~5k 左下角为局部放大图。在图 5i 和 5j 中观察到,SOB 界面被完全水解,而 SOB-AP 中存在较小的胶束,表明 SOB-AP 中存在少量未完全水解的油脂。

体外模拟消化对 POB 和 POB-AP 的影响如图 4b 所示,经胃消化 2 h 后,POB 粒径分布(0.01~10  $\mu\text{m}$ )左移,相反,POB-AP 粒径分布(1~10  $\mu\text{m}$ )右移,呈明显双峰分布。在图 5g CLSM 中观察到乳液局部形成较大的油脂聚集体,表明界面蛋白

水解(图 2),油脂从油体内释放。在图 5h 中观察到小脂滴和局部大脂滴的存在,说明在胃消化阶段,AP 可减缓油脂的释放,POB 界面的 Oleosin 由双亲 N 端、中央疏水区域和双亲 C 端构成,位于油体表面的 N 端和 C 端更容易与蛋白酶接触,促使蛋白水解,乳液稳定性降低,乳液液滴发生聚集和聚合<sup>[28]</sup>。如图 4b 所示,在小肠消化 2 h 后,POB 和 POB-AP 粒径分布左移,POB 呈三峰分布,POB-AP 呈明显双峰分布。如图 5k 所示,POB 大部分被水解形成微小液滴,局部存在较大的蛋白油脂胶束,而 POB-AP 中,在油脂周围形成大量蛋白絮状物,这可能是 AP 分子与胆盐相互作用,在油脂周围形成的网络结构。

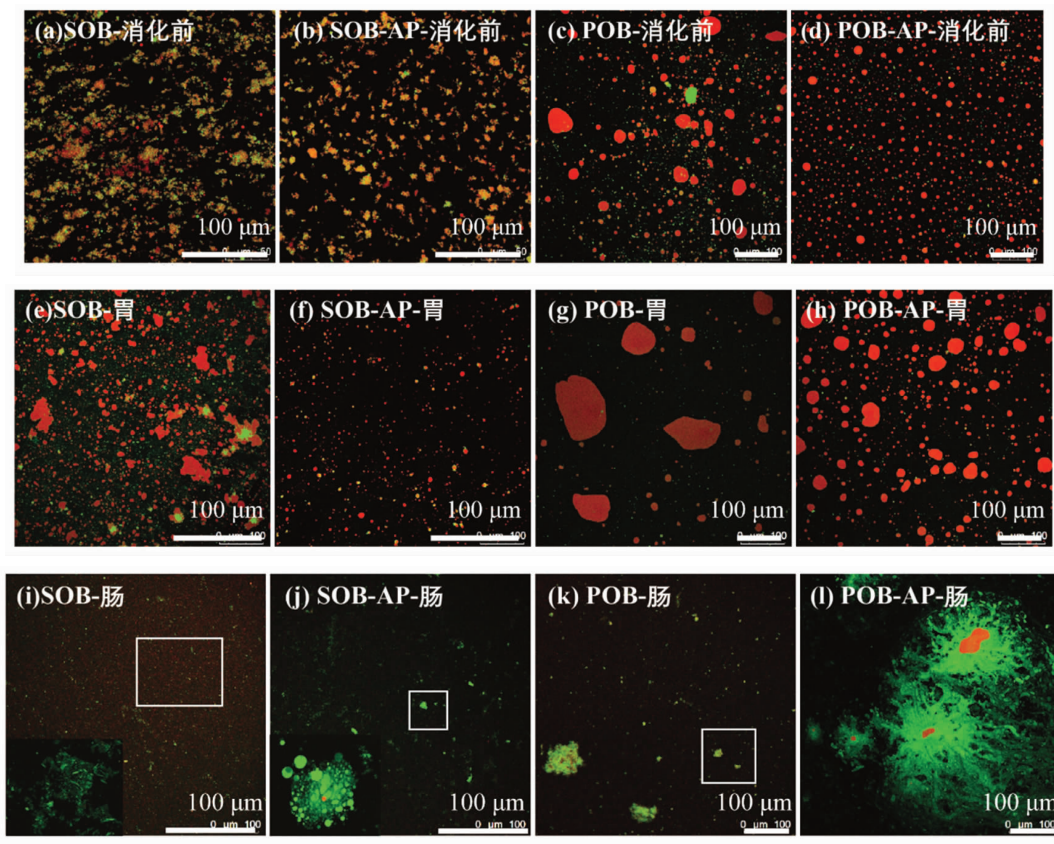


图 5 SOB、SOB-AP、POB、POB-AP 在体外模拟消化过程中微观结构的变化

Fig.5 The change of CLSM of SOB, SOB-AP, POB, POB-AP *in vitro* simulated digestion

## 2.5 FFA 的释放率分析

SOB、SOB-AP、POB、POB-AP 在小肠消化过程中脂肪酸释放情况如图 6 所示,POB 和 POB-AP 脂肪酸释放量高于 SOB 和 SOB-AP,这可能是由于花生油体油脂含量高于大豆油体,且界面厚

度低于大豆油体,有利于胆盐对花生油体界面分子的取代,进而释放更多的脂肪酸<sup>[13]</sup>。其次,乳液大小、界面组成、界面结构和体系黏度也会对脂肪酸释放产生影响<sup>[28]</sup>。小肠消化前 15 min,所有样品的脂肪酸迅速释放,15 min 后脂肪酸释放趋于平



缓,并在 90 min 后保持稳定,这是由于在小肠消化过程中,胆盐和盐离子促进胰蛋白酶水解界面蛋白,大量油脂迅速释放,并被脂肪酶分解形成脂肪酸,随着脂肪水解产物趋于饱和,脂肪酸释放减慢。小肠消化过程中 SOB 和 SOB-AP 脂肪酸释放速率相似,而 SOB-AP 脂肪酸释放量更低,这表明 AP 可减缓大豆油体乳液脂肪酸的释放,可能与果胶-胆盐相互作用、界面蛋白和乳滴大小有关。果胶可通过疏水作用力与胆盐结合,减少界面胆盐浓度,从而抑制脂肪酶的吸附和消化<sup>[29]</sup>。SOB-AP 界面蛋白在胃消化阶段水解程度低于 SOB (图 2),在乳液进入小肠后,未水解的蛋白质可能减缓脂肪酶水解。如图 4a,SOB-AP-胃的粒径主要以接近 10  $\mu\text{m}$  的液滴为主,而 SOB-胃(0.1~10  $\mu\text{m}$ )的液滴较小,乳液在进入小肠后,由于 SOB 界面面积更大,胰蛋白酶在 SOB 酶解位点更多,SOB 脂肪酸释放量更高。Oleosin 中央疏水肽段锚定于油脂中,与暴露在表面的 N 端和 C 相比,不易被胰蛋白酶水解,油体中磷脂也可以延缓油脂水解<sup>[24]</sup>。与 SOB-AP 相反,在进入小肠消化阶段,POB-AP 的脂肪酸释放率显著高于 POB( $P<0.05$ ),这可能是由于胃消化结束后,POB-AP 液滴小于 POB (图 5 和图 6),具有更大的界面面积,因此 POB-AP 界面蛋白被胰蛋白酶水解,导致 POB-AP 乳液内部脂肪快速释放并被脂肪酶水解。

表 1 大豆油和花生油中脂肪酸组成

Table 1 The fatty acid composition of soybean oil and peanut oil

样品	油体中油脂脂肪酸组成和模拟消化后乳液脂肪酸组成/%					
	棕榈酸(C16:0)	硬脂酸(C18:0)	油酸(C18:1)	亚油酸(C18:2)	花生酸(C20:0)	$\alpha$ -亚麻酸(C18:2)
大豆油	11.53 $\pm$ 0.05	4.16 $\pm$ 0.08	20.16 $\pm$ 0.16	55.48 $\pm$ 0.08	-	8.67 $\pm$ 0.02
花生油	13.56 $\pm$ 0.07	4.59 $\pm$ 0.03	40.52 $\pm$ 0.02	35.82 $\pm$ 0.06	1.72 $\pm$ 0.02	-

表 2 SOB、SOB-AP、POB、POB-AP 中脂肪酸在体外模拟消化中的利用率

Table 2 The accessibility of fatty acids of SOB, SOB-AP, POB, and POB-AP *in vitro* simulated digestion

样品	体外模拟消化后乳液脂肪酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$							利用率/ %
	棕榈酸 (C16:0)	硬脂酸 (C18:0)	油酸 (C18:1)	亚油酸 (C18:2)	花生酸 (C20:0)	$\alpha$ -亚麻酸 (C18:2)	总含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	
SOB	326.6 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	238.2 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>	791.0 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>	2 086.2 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	-	328.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3 929.5	54.4
SOB-AP	433.8 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	234.2 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	760.5 $\pm$ 0.8 <sup>d</sup>	1 953.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	-	307.8 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	3 689.9	51.1
POB	555.8 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	265.8 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	1 686.5 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1 533.4 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>	70.5 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	-	4 252.5	49.4
POB-AP	926.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	399.1 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	2 841.3 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	2 602.8 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	122.3 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	-	7 218.0	83.2

注:同列不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。“-”表示未检出。

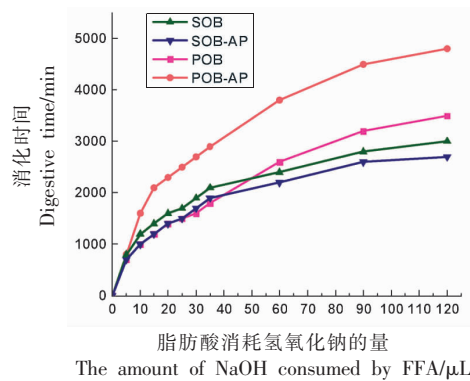


图 6 SOB、SOB-AP、POB、POB-AP 在体外模拟消化过程中 FFA 的释放

Fig.6 The FFA released from SOB, SOB-AP, POB, POB-AP *in vitro* simulated digestion

## 2.6 脂肪酸利用率分析

表 1 列出大豆油和花生油中脂肪酸组成。6 种脂肪酸为油脂中脂肪酸的主要构成,占总脂肪酸组成 99% 以上。选此 6 种脂肪酸进行脂肪酸利用率的计算,SOB 和 SOB-AP 中总脂肪酸含量为 7 218.0  $\text{mg}/\text{kg}$ ;POB 和 POB-AP 总脂肪酸含量 8 600.9  $\text{mg}/\text{kg}$ 。

如表 2 所示,SOB 利用率为 54.4%,SOB-AP 生物利用率为 51.1%,AP 使 SOB 脂肪酸利用率降低,这可能与乳液界面蛋白的水解(图 2)和乳液大小有关(图 4 和图 5)。此外,胆盐和胰蛋白酶相

互作用,抑制了胰蛋白酶水解界面蛋白。Oleosin和磷脂可以降低胃蛋白酶和脂肪酶酶解能力,降解的Oleosin会降低脂肪酶与油滴的有效接触面积,从而影响乳液中脂肪酸的释放<sup>[30]</sup>。POB利用率为49.4%,POB-AP利用率为83.2%,与大豆油体相反,表明AP提高了脂肪酸利用率,这可能与乳液大小有关(图3和图4)。

### 3 结论

探究了不同AP浓度制备的OBs(SOB和POB)复合乳液的储存稳定性和体外消化特性,得出以下结论:

1) 当果胶含量 $<3$  g/L时,乳液的储存稳定性高度依赖于果胶含量;当果胶含量 $>1.5$  g/L时,果胶通过降低乳液聚集程度和增加液滴间静电排斥的方式,显著改善乳液稳定性;当果胶含量介于 $3\sim 5$  g/L时,果胶对乳液的稳定作用达到平衡。

2) 胃蛋白酶可水解界面蛋白形成分子质量低于15 ku的肽,而其活性受到AP抑制。

3) 在消化过程中,因负电肽的形成和胆盐的添加以及游离脂肪酸的释放,乳液 $\zeta$ -电位显著降低。

4) 胃消化结束后,SOB和POB粒径分布左移,SOB-AP和POB-AP粒径分布右移,界面蛋白水解,乳滴破裂。小肠消化结束后,SOB,SOB-AP,POB和POB-AP粒径分布左移。相比于SOB,SOB-AP的脂肪酸利用率降低3.3%。相比于POB,POB-AP脂肪酸利用率增加33.8%。

### 参 考 文 献

- [1] HUANG A H C. Plant lipid droplet and their associated proteins: Potential for rapid advances[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(3): 1894-1918.
- [2] NIKIFORIDIS C V, MATSAKIDOU A, KIOSSEOG-LOU V. Composition, properties and potential food applications of natural emulsions and cream materials based on oil bodies[J]. *RSC Advances*, 2014, 48(4): 25067-25078.
- [3] DELEU M, VACA-MEDINA G, FABRE J F, et al. Interfacial properties of oleosins and phospholipids from rapeseed for the stability of oil bodies in aqueous medium[J]. *Colloids Surface B Biointerfaces*, 2010, 80(2): 125-132.
- [4] BHATLA S C, KAUSHIK V, YADAV M K. Use of oil bodies and oleosins in recombinant protein production and other biotechnological applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(3): 293-300.
- [5] ZHENG B J, ZHANG X Y, LIN H L, et al. Loading natural emulsions with nutraceuticals using the pH-driven method: Formation & stability of curcumin-loaded soybean oil bodies[J]. *Food & Function*, 2019, 10(9): 5473-5484.
- [6] MERT B, VILGIS T A. Hydrocolloid coated oleosomes for development of oleogels[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 119: 106832.
- [7] GALLIER S, GORDON K C, SINGH H. Chemical and structural characterisation of almond oil bodies and bovine milk fat globules[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(4): 1996-2006.
- [8] SUKHOTU R, SHI X, HU Q, et al. Aggregation behaviour and stability of maize germ oil body suspension[J]. *Food Chemistry*, 2014, 164: 1-6.
- [9] LIN J W, MENG H C, YU S J, et al. Genipin-crosslinked sugar beet pectin-bovine serum albumin nanoparticles as novel pickering stabilizer[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 106306.
- [10] QIU C Y, ZHAO M M, MCCLEMENTS D J. Improving the stability of wheat protein-stabilized emulsions: Effect of pectin and xanthan gum addition[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 43: 377-387.
- [11] 刘琪. 果胶结构对其乳化及乳液体外消化性质的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.  
LIU Q. The effects of pectin structures on emulsifying and *in-vitro* digestive properties of emulsion[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.
- [12] WUSIGALE, LIANG L, LUO Y C. Casein and pectin: Structures, interactions, and applications[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 97: 391-403.
- [13] ALBA K, KONTOGIORGOS V. Pectin at the oil-water interface: Relationship of molecular composition and structure to functionality[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 68: 211-218.
- [14] SHISHIR M R I, KARIM N, XIE J H, et al. Colonic delivery of pelargonidin-3-O-glucoside using pectin-chitosan-nanoliposome: Transport mechanism and bioactivity retention[J]. *International Journal Bio-*



- logical Macromolecules, 2020, 159: 341–355.
- [15] SCHMIDT U S, SCHMIDT K, KURZ T, et al. Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water-emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 46:59–66.
- [16] 吕思伊, 卢琪, 潘思轶. 包封姜黄素的果胶-核桃蛋白复合物乳液稳定性及体外消化[J]. 食品科学, 2021, 42(8): 1–9.
- LÜ S Y, QI Q, PAN S Y. Stability and vitro digestion of pectin-walnut proteins stabilized emulsion encapsulating curcumin[J]. Food Science, 2021, 42(8): 1–9.
- [17] HE S H, LIU C H, WANG R C, et al. Comparison of two different natural oil body emulsions: *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Journal Oleo Science, 2020, 69(12): 1609–1618.
- [18] GALLIER S, SINGH H. Behavior of almond oil bodies during *in vitro* gastric and intestinal digestion[J]. Food & Function, 2012, 3(5): 547–555.
- [19] 武利春, 孙禹凡, 陈亚双, 等. 巴氏灭菌对不同油脂体乳液氧化稳定性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(7): 23–30
- WU L C, SUN Y F, CHEN Y S, et al. Effect of pasteurization on the oxidative stability of oil bodies emulsion from various crops[J]. Food Science, 2022, 43(7): 23–30.
- [20] ZHAO L P, CHEN Y M, YAN Z H, et al. Physicochemical and rheological properties and oxidative stability of oil bodies recovered from soybean aqueous extract at different pHs[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61: 685–694.
- [21] NIKIFORIDIS C V, KIOSSEOGLOU V, SCHOLTEN E. Oil bodies: An insight on their microstructure—maize germ vs sunflower seed[J]. Food Research International, 2013, 52(1): 136–141.
- [22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品中脂肪酸的测定: GB 5009.168–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard determination of fatty acids in food: GB 5009.168–2016 [S]. Beijing: China Standard Press, 2016.
- [23] SALMINEN H, WEISS J. Electrostatic adsorption and stability of whey protein-pectin complexes on emulsion interfaces[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 410–419.
- [24] VERKEMPINCK S H E, KYOMUGASHO C, SALVIA-TRUJILLO L, et al. Emulsion stabilizing properties of citrus pectin and its interactions with conventional emulsifiers in oil-in-water emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 85: 144–157.
- [25] LIU C H, WANG R C, HE S H, et al. The stability and gastro-intestinal digestion of curcumin emulsion stabilized with soybean oil bodies[J]. LWT—Food Science and Technology, 2020, 131(12): 109663.
- [26] LIU C, HAO L H, CHEN F S, et al. Study on extraction of peanut protein and oil bodies by aqueous enzymatic extraction and characterization of protein[J]. Journal of Chemistry, 2020, 2020: 1–11.
- [27] WANG X, YE A Q, DAVE A, et al. *In vitro* digestion of soymilk using a human gastric simulator: Impact of structural changes on kinetics of release of proteins and lipids[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106235.
- [28] WEI R J, ZHAO S J, ZHANG L, et al. Upper digestion fate of citrus pectin-stabilized emulsion: An interfacial behavior perspective[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 264: 118040.
- [29] 魏汝君. 柑橘果胶稳定橘油混合乳液的消化机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- WEI R J. The digestion fate of citrus pectin stabilized citrus oil-based emulsions[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [30] CHANG M T, TSAI T, LEE C Y, et al. Elevating bioavailability of curcumin via encapsulation with a novel formulation of artificial oil bodies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(40): 9666–9671.

## Effect of Apple Pectin on the Storage Stability and Fatty Acid Accessibility from Various Oil Bodies Emulsion

Wu Lichun<sup>1</sup>, Sun Yufan<sup>1</sup>, Kang Mengxue<sup>1</sup>, Qi Baokun<sup>1</sup>, Li Yang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030

<sup>2</sup>Heilongjiang Institute of Green Food Science, Harbin 150000)

**Abstract** In order to investigate the influence of concentration of AP to the storage stability and fatty acid accessibility, different concentration of AP (0–5 g/L) was applied as the stabilizer. The storage stability was determined by dynamic light scattering and visual stability. Meanwhile, the influence of *in vitro* simulated digestion on the protein structure, emulsion structure and fatty acid accessibility was also investigated using the sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, dynamic light scattering technologies, confocal laser scanning microscopy, the release of fatty acid and gas chromatography. The results show that the storage stability of SOB and POB is highly dependent on the AP concentration when the AP concentration is less than 3 g/L. The storage stability of emulsions is significantly improved when the AP concentration is higher than 1.5 g/L, this is due to the decreasing of aggregation and increasing of surface charge values. When the AP concentration is between 3–5 g/L, the influence of pectin to the stability of emulsion reaches a balance statue. During *in vitro* simulated digestion, the activity of pepsin can be inhibited by adding AP, peptides below 15 ku is formed during the testing. The  $\zeta$ -potentials of emulsion significantly reduces due to the formation of negatively charged peptides, increasing of bile salts, and releasing of free fatty acids. In the testing, the free fatty acid accessibility decreases by 3.3% with 1.5 g/L of AP compared with OBs without AP, this is due the inhibits of pepsin during the hydrolysis of OBs proteins and the controlling of SOB–AP size. However, the free fatty acid accessibility increases by 33.8% with POB. This is due to the bigger hydrolyzed area of trypsin in POB–AP.

**Keywords** oil bodies; apple pectin; storage stability; *in vitro* simulated digestion; fatty acid accessibility