

乳清蛋白-海藻酸二醛乳液的消化特性研究

吴莎萍, 吴长玲, 吴峰华, 何志平, 刘兴泉, 王鹏*
(浙江农林大学食品与健康学院 杭州 311300)

摘要 为研究乳清蛋白(WPI)和海藻酸二醛(ADA)间的相互作用对 O/W 乳液中姜黄素体外消化的影响,采用紫外光谱、荧光光谱和红外光谱分析探究 WPI 和 ADA 间的相互作用,通过测定液滴尺寸、流变性、界面吸附率、乳化活性、浊度和分析姜黄素的释放特性研究复合物对乳液的影响。结果表明,在动态可逆共价键-席夫碱键的驱动下,WPI-ADA 复合物改善了乳液的界面吸附率、乳化活性、液滴尺寸和浊度。与 WPI 乳液相比,WPI-ADA 复合物乳液的界面吸附率和乳化活性等均有提高。当 ADA 添加量为 WPI 的 0.8%时,乳液的液滴尺寸较小(214.5 nm)、浊度较低(30 061.8),乳化活性指数(295.2 m²/g)和乳化稳定性(0.617)较高。此外,WPI-ADA 复合物乳液在模拟胃肠液中具有较高的稳定性,并且提高了姜黄素的生物利用度。

关键词 疏水性活性物质; 蛋白-多糖复合物; 分子间相互作用; 体外消化

文章编号 1009-7848(2024)11-0095-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.11.010

植物源生物活性化合物因具有多种生物活性功能而备受研究者关注。然而,大多数生物活性化合物水溶性差,在加工及储藏过程中易受光、热或氧气等因素的影响而分解,限制了其在食品领域中的应用。此外,生物活性物质通过人体胃肠道时,易在胃酸和各种酶的作用下发生降解,这极大地降低了它们的稳定性和生物活性。O/W 乳液是包埋疏水性活性物质的主要体系之一。然而,乳液体系在热力学上不稳定,向其中添加两亲性聚合物可以有效避免相分离和提高稳定性。

蛋白质和多糖作为天然生物聚合物,不但具有良好的界面特性和丰富的营养价值,而且其来源广泛并具有可生物降解的功能,是用于乳液稳定的理想材料^[1]。Xie 等^[2]通过静电相互作用制备大米蛋白水解物(RH)和壳聚糖(CH)乳液。CH/RH 复合物有助于在液滴上形成更厚、更强的界面层和更稳定的网络结构,从而提高乳液的稳定性。CH/RH 以质量比 1:1 复合时能够形成更稳定乳液。Zhang 等^[3]利用共价反应对乳清蛋白分离物(WPI)/高甲氧基果胶(HMP)/绿原酸(CA)进行改性,并利用生成的复合物用于制备番茄红素乳液。与 WPI 稳定的乳液相比,WPI-HMP 和 WPI-CA

二元复合物和 WPI-HMP-CA 和 WPI-CA-HMP 复合物稳定的乳液均增强了乳液的稳定性。由复合物稳定的乳液在体外胃肠道中延缓了脂质的分解并降低了番茄红素的生物可及性。

本研究探讨乳清蛋白(WPI)和海藻酸二醛(ADA)复合物间的动态可逆共价相互作用对乳液中姜黄素(CUR)稳定性和消化特性的影响。通过紫外光谱、内源荧光光谱、三维荧光光谱和红外光谱研究 WPI-ADA 间、WPI-ADA-CUR 间的相互作用力;通过超声乳化法制备乳液体系,测定乳液液滴尺寸、Zeta 电位、包埋率、界面吸附率、乳化活性、浊度等乳液理化性质,通过流变试验研究乳液的表观黏度和模量。此外,对乳液在体外消化过程中姜黄素的 DPPH 自由基清除率、保留率和生物利用度进行评估。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳清蛋白(Whey protein, WPI)、姜黄素(Curcumin, CUR),上海麦克林生化科技有限公司;海藻酸钠(Sodium alginate, ALG),南京化学试剂有限公司;中链甘油三酯(Medium chain triglycerides, MCT)、人工胃液(Simulated gastric fluid, SGF)、人工小肠液(Simulated intestinal fluid, SIF),上海源叶生物科技有限公司。

收稿日期: 2023-11-08

第一作者: 吴莎萍,女,硕士生

通信作者: 王鹏 E-mail: wpeng@zafu.edu.cn

1.2 仪器与设备

旋转流变仪(HR-1),美国TA仪器有限公司;粒径仪(Nano ZS),英国马尔文仪器有限公司;傅里叶红外光谱仪(Nicolet iS20),美国赛默飞世尔科技公司;高速性高剪切分散乳化机(FA25),上海弗鲁克科技发展有限公司;超声波细胞粉碎机(JY-99-IIDN),宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 WPI-ADA复合物的制备 将WPI溶解在去离子水中(5 mg/mL),随后将ADA添加到WPI溶液中,ADA的添加量为WPI质量的0%,0.2%,0.4%,0.8%,1.6%和3.2%,在37℃反应30 min后得到WPI-ADA复合物,分别记为WAC-0、WAC-1、WAC-2、WAC-3、WAC-4和WAC-5。

1.3.2 紫外光谱的测定 配制蛋白质质量浓度为0.5 mg/mL的WPI-ADA和WPI-ADA-CUR溶液,其中,CUR的质量浓度为0.05 mg/L,最终溶液中的乙醇体积分数不超过2%。紫外光谱的波长范围设定为240~400 nm,测定样品在该范围下的紫外吸收,以去离子水的紫外吸收为空白。

1.3.3 荧光光谱的测定 根据Yan等^[4]的方法并稍作修改。配制蛋白质质量浓度为1 mg/mL的WPI-ADA和WPI-ADA-CUR溶液,其中,CUR的质量浓度为0.1 mg/L,最终溶液中的乙醇体积分数不超过2%。在激发波长为280 nm条件下,测定其在290~500 nm内的发射光谱。

为了测定三维荧光光谱,将激发波长扫描范围设定为200~500 nm,发射波长扫描范围设定为200~500 nm,激发波长间隔10 nm,发射波长间隔5 nm,扫描速度为2 400 nm/min,激发/发射狭缝为5 nm。

1.3.4 O/W乳液的制备

1.3.4.1 油相 将1 mg/mL CUR粉末溶于中链甘油三酯中,避光搅拌过夜。

1.3.4.2 水相 按1.3.1节配制水相,备用。

1.3.4.3 O/W乳液 将10 g油相和190 g水相混合,并用高速分散仪在10 000 r/min下剪切3 min,得到粗乳液。使用超声处理器(20 kHz,600 W,探头直径1.5 mm)超声10 min(开3 s,关3 s)制备乳液,制备过程中使用冰浴。

1.3.5 傅里叶变换红外光谱(FTIR) 将干燥后的

CUR、ADA、WPI和乳液样品与KBr粉末一起研磨,将混合粉末通过压片机制成薄片。在400~4 000 cm^{-1} 范围内测定收集红外光谱信号,分辨率为4 cm^{-1} 。

1.3.6 乳液微观结构的观察 使用光学显微镜以100倍放大倍数观察O/W乳液的微观结构。

1.3.7 粒径、PDI和Zeta电位的测定 测试前用去离子水将乳液稀释100倍,取1 mL稀释后的乳液置于样品池中,利用粒径仪在室温下测定乳液粒径和电位。

1.3.8 包埋率的测定 根据Jiang等^[5]报道的方法测定包埋率,并稍作修改。简言之,取1 mL乳液加入5 mL三氯甲烷,充分涡旋后在25℃下以8 000 r/min转速离心5 min。然后立即收集下清液,根据CUR溶液的标准曲线,在波长425 nm处测定未封装CUR的质量浓度(mg/L)。为了量化乳剂中CUR的总量,用乙醇提取样品。简单地说,将1 mL乳剂添加到5 mL乙醇中,并在8 000 r/min转速下将混合物在25℃下离心15 min,收集上清液并用乙醇稀释至适当浓度,并在波长425 nm处测定吸光值。

1.3.9 蛋白质界面吸附率的测定 参考Jiang等^[6]的方法并稍作修改。将制备的新鲜乳液在8 000 r/min转速下离心15 min,使用注射器吸取下清液并用0.22 μm 的滤膜过滤。福林酚法用于测定过滤水相的蛋白质质量浓度。界面吸附率的计算方法见式(1)。

$$\text{界面吸附率}(\%) = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: C_0 为水相中初始的蛋白质质量浓度,g/mL; C_1 为下清液中非吸附蛋白质质量浓度,g/mL。

1.3.10 乳化性能的测定 乳化性能根据Li等^[7]的方法进行测定。乳液形成后立即从容器底部取出乳液(50 μL),然后用5 mL 0.1%十二烷基硫酸钠溶液稀释,在波长500 nm处测量吸光度。使均质乳液静置10 min后,在波长500 nm处测定乳液的吸光度。为避免负值,乳化稳定指数(ESI)用OD值表示。乳化活性指数(EAI)计算方法见式(2)。

$$\text{EAI}(\text{m}^2/\text{g}) = (2 \times 2.303 \times A_0 \times \text{DF}) / (10000 \times \theta \times L \times C) \quad (2)$$

式中: A_0 为吸光度;DF为稀释倍数; C 为蛋白

质量浓度, g/mL; L 为光路, 1 cm; θ 为油体积分数, %。

1.3.11 浊度的测定 乳液浊度根据 Wang 等^[8]的方法测定的。简而言之, 使用磷酸盐缓冲溶液 (10 mmol/L, pH 7.0) 将乳液稀释 200 倍, 并将磷酸盐缓冲溶液用作空白对照。测量稀释后的乳液在波长 600 nm 处的吸光度。浊度 (T) 计算方法见式 (3)。

$$T(\text{cm}^{-1}) = 2.303 \times A \times D/L \quad (3)$$

式中: A 为稀释乳液在 600 nm 处的吸光度; D 为稀释倍数; L 为 1 cm 的光程差。

1.3.12 流变学特性的测定 乳液流变特性的测定参考 Xiong 等^[9]的方法。设定应变为 0.5%, 角频率范围为 1.0~100.0 rad/s, 记录测量过程中的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'')。和使用直径 40 mm 的平行板, 设置间距 500 μm , 剪切速率为 0.01~100 s^{-1} , 记录测量过程中的黏度值。使用 Herschel-Bulkley 模型分析剪切速率与剪切应力之间的关系。

$$\sigma (\text{Pa}) = \sigma_0 + K \times \gamma^n \quad (4)$$

式中: σ 为剪切应力, Pa; σ_0 为表观屈服应力, Pa; K 为稠度系数, $\text{Pa} \cdot \text{s}^n$; γ 为剪切速率, s^{-1} ; n 为流动行为指数。

1.3.13 体外模拟消化 根据 Zhong 等^[10]的研究, 使用模拟胃肠道消化液消化乳液, 并确定 CUR 保留率, 消化物抗氧化能力和生物利用度。将样品加入 SGF 中, 调节 pH 值至 1.2, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h (100 r/min)。模拟胃部消化完成后, 将胃消化样品加入 SIF 中, 调节 pH 值至 7.0, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h (100 r/min)。收集消化液以进行进一步分析。

1.3.13.1 抗氧化能力 消化物的抗氧化能力通过 DPPH 自由基清除率来表示。简而言之, 将 DPPH 甲醇溶液和消化产物上清液混合, 反应 30 min 后在波长 517 nm 处测定吸光值。

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\%) = [1 - (A_2 - A_1)/A_0] \times 100 \quad (5)$$

式中: A_0 、 A_1 和 A_2 分别是试剂、空白和消化产物在波长 517 nm 处的吸光值。

1.3.13.2 CUR 保留率和生物利用度 根据 Zhang 等^[11]的方法测定 CUR 的保留率, 将乙醇添加到消化物中以提取 CUR, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 测定上清液在波长 425 nm 处的吸光度。根据 Zeng

等^[12]的方法测定 CUR 生物利用度。将消化物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 16 000 r/min 转速下离心 30 min, 取中间透明层 (即溶解 CUR 的胶束部分) 与乙醇以体积比 1:1 混合, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定吸光值。

$$\text{保留率}(\%) = C_1/C_0 \times 100 \quad (6)$$

$$\text{生物利用度}(\%) = C_2/C_0 \times 100 \quad (7)$$

式中: C_0 为初始乳液中 CUR 的含量, mg/mL; C_1 为原始消化物中的 CUR 含量, mg/mL; C_2 为胶束部分 CUR 的质量浓度, mg/mL。

1.4 数据分析

所有数据采用 DPS 数据处理系统进行显著性分析, 所有数据通过 Origin Pro 2022 b 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 紫外光谱分析

紫外光谱图用于研究蛋白质的构象变化以及证明小分子与蛋白质之间是否存在相互作用, 当小分子和蛋白质相互作用时, 蛋白质的吸收光谱可能会出现增强或减小的情况^[13]。图 1a 为 WPI 及 WPI-ADA 复合物的紫外光谱图。由于酪氨酸 (Trp) 和色氨酸 (Trp) 等芳香族氨基酸的存在, WPI 在波长 280 nm 处具有固定的吸收峰。随着 ADA 质量分数的增加, WPI 在波长 280 nm 处的吸光度增加, 而最大吸收波长没有变化, 这表明 WPI-ADA 复合物是由 WPI 和 ADA 之间的相互作用形成的^[14]。图 1b 为 WPI-ADA-CUR 的紫外光谱图, 当 CUR 加入时, WPI 在波长 280 nm 处的吸光度增加, 这表明 WPI 和 CUR 之间存在相互作用, WPI 的微环境发生了变化^[13]。

2.2 内源荧光光谱分析

为了研究 WPI-ADA 复合物的相互作用机制, 本试验对 WPI-ADA 的内源性荧光光谱进行测定。图 2a 为 WPI 及 WPI-ADA 复合物在波长 280 nm 激发波长下的内源性荧光光谱图。蛋白质中存在色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 等芳香族氨基酸, 在波长 280 nm 激发波长下具有固有荧光特性, 蛋白质的荧光发射光谱代表了其构象和三级结构信息^[15]。WPI 在波长 329 nm 处具有最大荧光强度, 然而, WPI 的荧光强度随着 ADA 质量分数

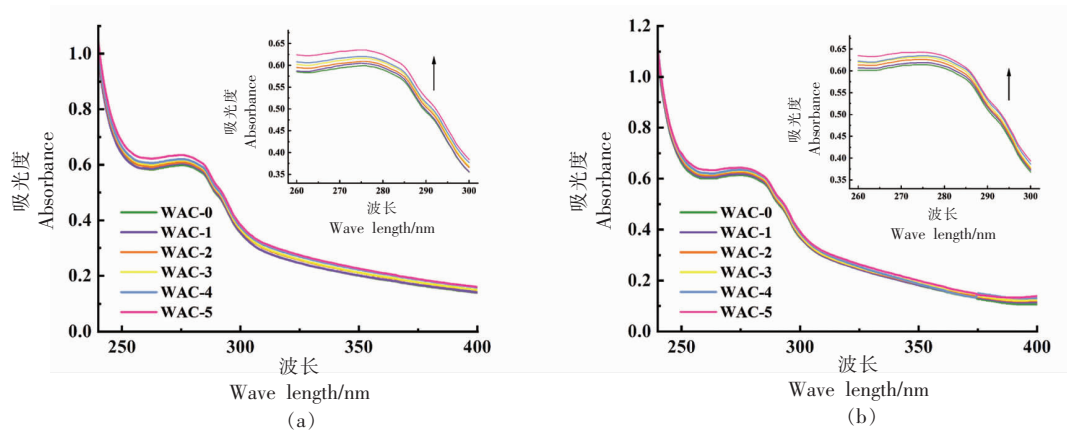


图1 WPI-ADA(a)和 WPI-ADA-CUR(b)的紫外光谱图

Fig.1 UV spectra of WPI-ADA (a) and WPI-ADA-CUR (b)

的增加而降低,最大荧光强度从 1 796 800(WAC-0)降低到了 1 609 969(WAC-5),这归因于 WPI 和 ADA 之间的相互作用^[6]。荧光强度的变化可以通过 ADA 共价交联引起的 WPI 中芳香族氨基酸残基周围的变化来解释,WPI-ADA 复合物的荧光强度随 ADA 的增加而降低可归因于芳香族氨基酸残基的屏蔽效应,由于高水平的共价交联使 WPI 的三级构象更加紧密^[7]。图 2b 为 WPI-ADA-

CUR 的荧光发射光谱,当 CUR 加入 WPI-ADA 时,最大荧光强度随着 ADA 质量分数的增加而降低,并且最大发射波长发生轻微蓝移(从 335 nm 到 330 nm)。这说明 CUR 的加入使 WPI 微环境的极性降低,进而导致最大波长的蓝移,这可能是 Trp 和 Tyr 氨基酸残基的隐藏所诱导的荧光淬灭效应^[18]。

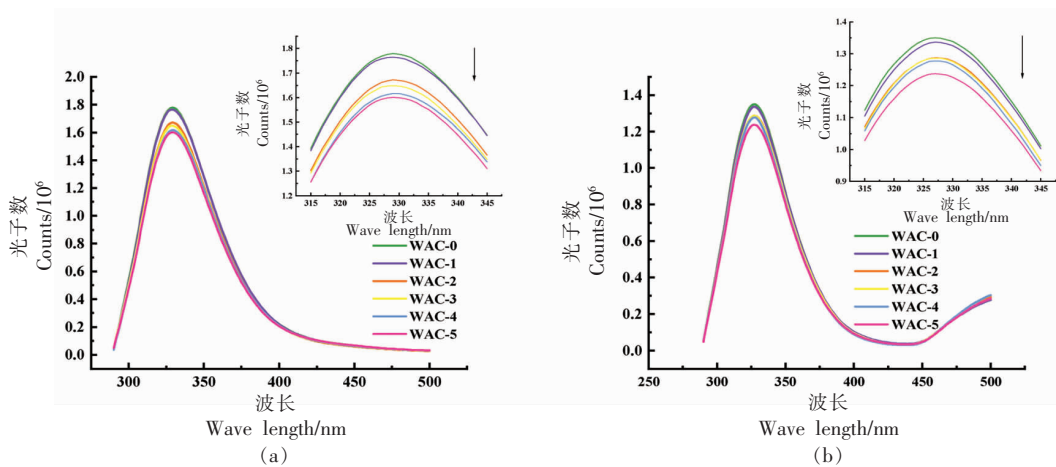


图2 WPI-ADA(a)和 WPI-ADA-CUR(b)的荧光发射光谱

Fig.2 Fluorescence emission spectra of WPI-ADA (a) and WPI-ADA-CUR (b)

2.3 三维荧光光谱分析

为了进一步研究 WPI-ADA 以及 WPI-ADA-CUR 相互作用前、后 WPI 的构象和微环境的变化,本试验进行了三维荧光光谱测定。图 3 为 WPI-ADA 和 WPI-ADA-CUR 的三维荧光光谱图,激发波长=发射波长($\lambda_{ex}=\lambda_{em}$)处的峰为瑞利散

射峰。比较 WPI 和 WPI-ADA 复合物的三维荧光光谱,观察到最大荧光强度随着 ADA 质量分数的增加而降低(从 2 816 到 2 517),这表明 WPI 的内源性荧光被淬灭,进一步验证了图 3a 中的结果。WPI-ADA-CUR 三维荧光光谱图显示,添加 CUR 后等高线处荧光强度降低,并观察到 λ_{em} 从 335 nm

到 330 nm 处的蓝移, 这表明 Trp 和 Tyr 氨基酸残基周围微环境的疏水性增加, 这归因于 WPI 与

CUR 之间的相互作用^[19], 进一步验证了图 2b 中的结果。

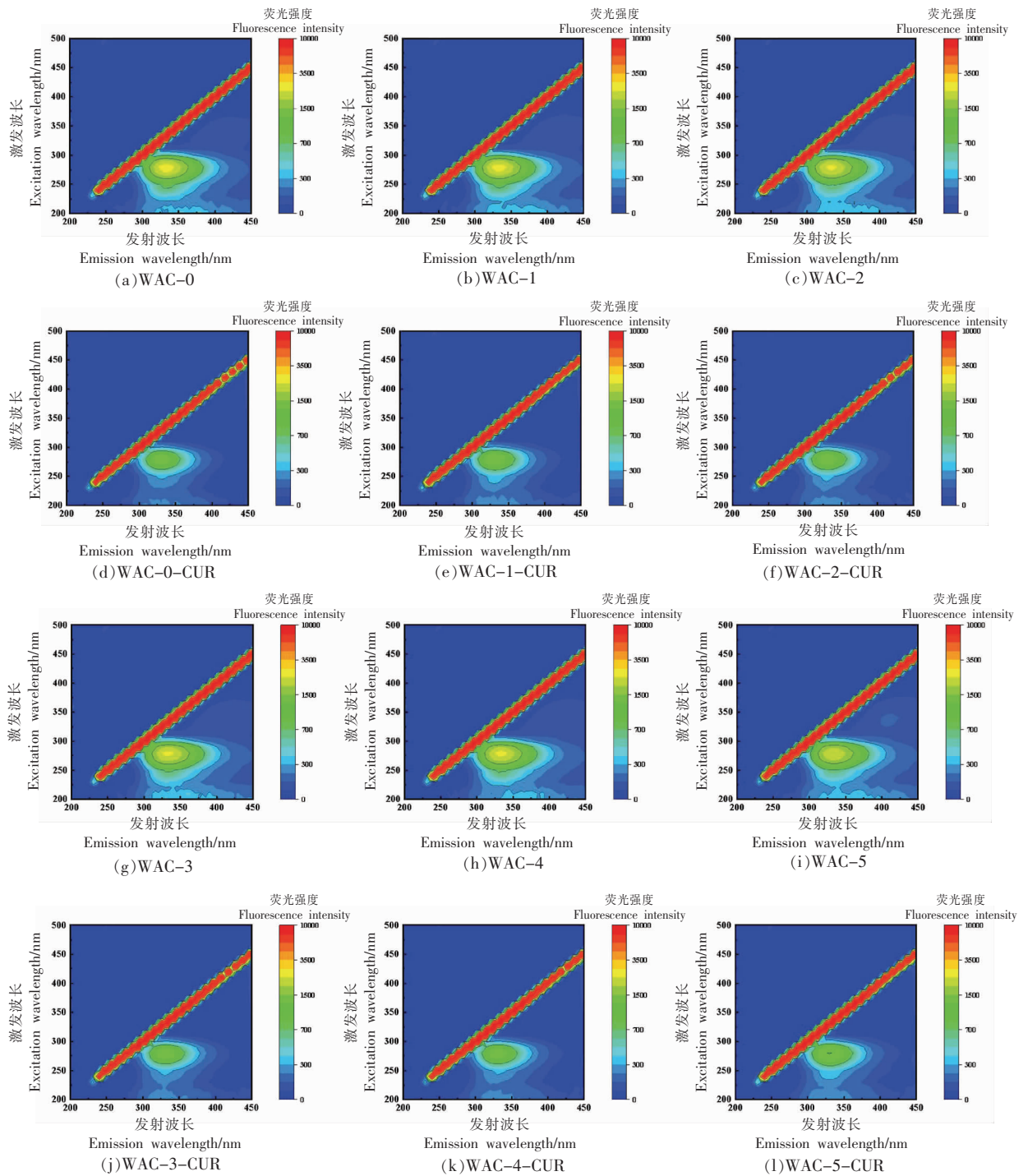


图 3 三维荧光光谱分析

Fig.3 Three-dimensional fluorescence spectra analysis

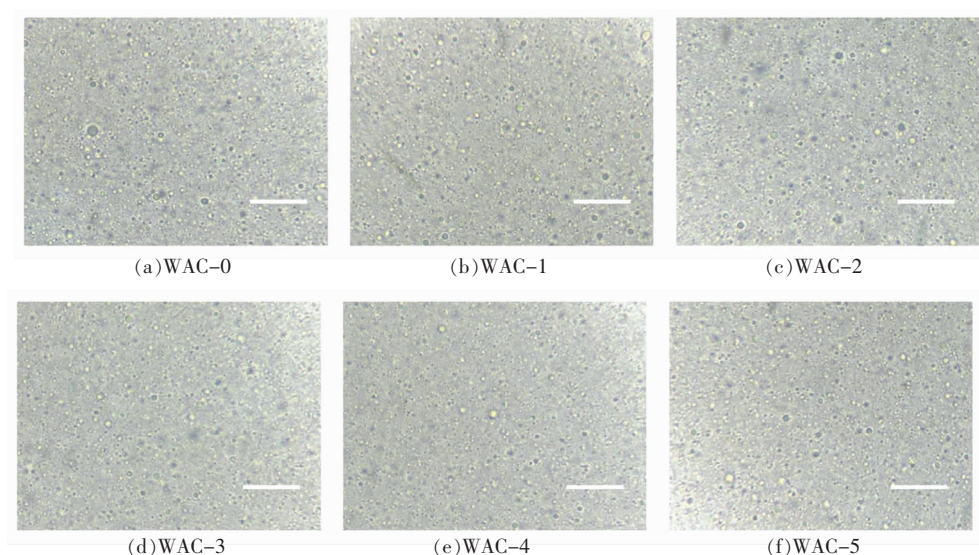
2.4 乳液的理化性质分析

WPI-ADA 乳液的光学显微镜图像如图 4 所

示。图像中显示的乳液液滴表现出黄色、透明的油滴。通过观察可以发现, WAC-0 乳液中的乳液液

滴形状大小并不均匀,还存在一些粒径较大的油滴,可能是由于乳液体系中的部分乳液液滴相互聚集引起的。随着 ADA 的加入,乳液表现出相对均匀的微观结构,这与粒径以及 PDI 的结果一致。表 1 为 WPI-ADA 乳液的粒径、PDI、Zeta 电位和包埋率。随着 ADA 的增加,乳液的平均粒径呈现先减小后增加的趋势。从 264.8 nm(WAC-0)减小到 214.5 nm(WAC-3),再增加到 246.1 nm(WAC-5)。这可能是因为 ADA 的添加增加了油、水界面

处吸附蛋白质的含量,形成更稳定的界面层,从而减少液滴的聚集并减小粒径^[20]。然而,过多 ADA 的存在可能诱导絮凝的产生,导致聚集体形成,从而使乳液粒径增加^[21]。WPI 稳定的乳液显示出最低的电位绝对值,约为 43.1 mV,所有 WPI-ADA 复合物乳液的电位绝对值更高($P<0.05$),这可能是由于 ADA 增加了液滴上的表面电荷数量,乳液的电位绝对值增加在乳液液滴之间提供了高能量屏障,从而提供了良好的静电排斥性^[7]。



注:图中比例尺代表 10 μm 。

图 4 WPI-ADA 乳液的光学显微镜图像

Fig.4 Optical microscopy images of WPI-ADA emulsions

表 1 WPI-ADA 乳液的粒径、Zeta 电位、PDI 值和包埋率

Table 1 The particle size, Zeta potential, PDI value and encapsulation efficiency of WPI-ADA emulsions

乳液	粒径/nm	PDI 值	Zeta 电位/mV	包埋率/%
WAC-0	264.8 \pm 7.4 ^a	0.328 \pm 0.012 ^a	-43.1 \pm 1.2 ^a	97.8 \pm 0.4 ^a
WAC-1	251.9 \pm 1.8 ^b	0.327 \pm 0.019 ^a	-45.4 \pm 1.0 ^b	97.5 \pm 0.6 ^a
WAC-2	229.3 \pm 1.4 ^d	0.323 \pm 0.042 ^a	-45.4 \pm 0.8 ^b	97.9 \pm 0.3 ^a
WAC-3	214.5 \pm 1.9 ^e	0.314 \pm 0.034 ^a	-45.0 \pm 1.1 ^b	97.6 \pm 0.2 ^a
WAC-4	237.8 \pm 1.2 ^{cd}	0.317 \pm 0.032 ^a	-44.8 \pm 1.1 ^b	97.1 \pm 0.2 ^a
WAC-5	246.1 \pm 2.1 ^{bc}	0.318 \pm 0.031 ^a	-46.4 \pm 0.2 ^b	97.2 \pm 0.2 ^a

注:同一列不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。

2.5 蛋白质界面吸附率分析

WPI-ADA 乳液的蛋白质界面吸附率如图 5 所示。蛋白质乳化剂在油水界面的吸附率对乳液起着至关重要的作用,因为它会影响乳液的形成、稳定性和性能^[6]。随着 ADA 质量分数的增加,WPI

的界面吸附率从 19.9%升高到了 32.2%。这一结果表明更多的 WPI 被吸附到乳液的界面上,ADA 可能通过负电荷排斥相互作用来促进 WPI 对油水界面的连续吸附,WPI 与 ADA 之间的共价作用改变了 WPI 界面吸附性能^[22]。这与 Chen 等^[23]的报道

一致,高肉桂醛含量促进了与壳聚糖的席夫碱反应,有利于降低界面张力和增加壳聚糖在界面的吸附量,形成类固态的界面膜。

2.6 乳化性能分析

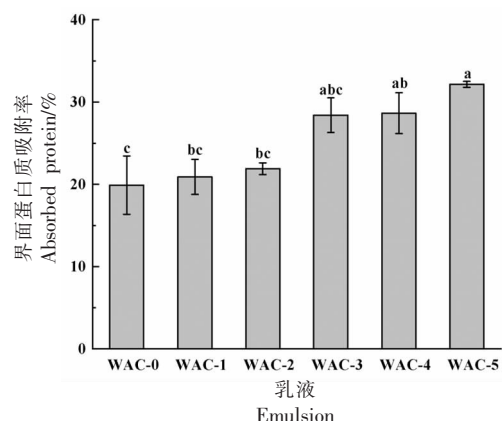
图 6 显示了 WPI-ADA 乳液的乳化活性指数 (EAI) 和乳液稳定指数 (ESI, 用 OD 值表示)。EAI 和 ESI 是表征乳液乳化活性和乳液稳定的重要指标, EAI 反映了水相和油相界面处吸附的能力, ESI 表示蛋白质在乳液储存后保留在油水界面的能力^[24]。如图所示,随着 ADA 的加入,乳液的 EAI 呈现先上升后下降的趋势,由 276.4 m²/g (WAC-0) 升高至 295.2 m²/g (WAC-3), 后又降至 288.2 m²/g, ESI 从 0.591 (WAC-0) 增加至 0.617 (WAC-3)。结果表明, WPI-ADA 的共价交联能显著改善 WPI 的 EAI 和 ESI, 形成具有更高弹性的油水界面^[25]。乳化活性的增加可以归因于 WPI-ADA 的共价交联使 WPI 更具两亲性, 因此在 O/W 界面处具有更高的乳化活性和可吸附性, 并且通过增加空间排斥防止液滴之间的聚集^[26]。然而, 随着 ADA 添加量不断增加, 乳液中的 WPI 可能发生聚集, 从而使乳液的乳化特性降低^[27]。

2.7 浊度分析

图 7 为 WPI-ADA 乳液的浊度。浊度不仅与乳液液滴的大小有关, 而且与液滴形状和分布密切相关, 与乳液稳定性呈负相关关系^[8]。随着 ADA 添加量的增加, 浊度呈现先降低后升高的趋势, 先从 34 299.3 (WAC-0) 降低到 30 061.8 (WAC-3), 再升高至 32 564.4 (WAC-5)。这是因为添加的 ADA 通过阻止乳液液滴的聚集减小了乳液粒径, 增加了光散射, 而过多的 ADA 可能导致界面蛋白的聚集, 从而影响乳液浊度^[28]。这些结果与乳液粒径一致。

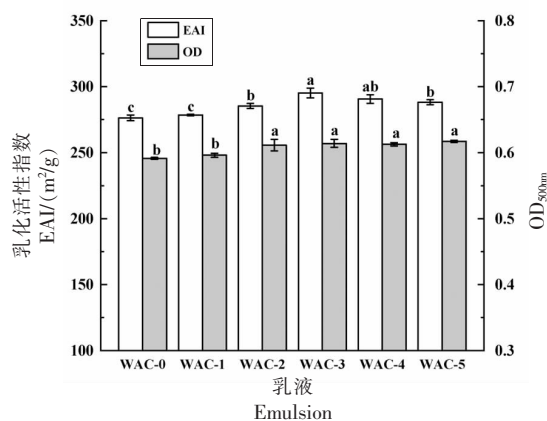
2.8 流变学特性分析

图 8a 显示了 WPI-ADA 乳液的黏度随剪切速率变化的情况。乳液体系中的水相黏度、液滴大小或者蛋白质的絮凝和聚集都可能引起乳液黏度的变化^[29]。所有乳液样品都表现出剪切稀化行为, 这可能是因为剪切力诱导液滴在流动方向上发生了重排^[20]。当剪切速率持续增加时, 乳液黏度逐渐稳定, 表现出牛顿流体的特性。为了进一步研究不同 WPI-ADA 比例对乳液的影响, 对乳液进行了黏弹



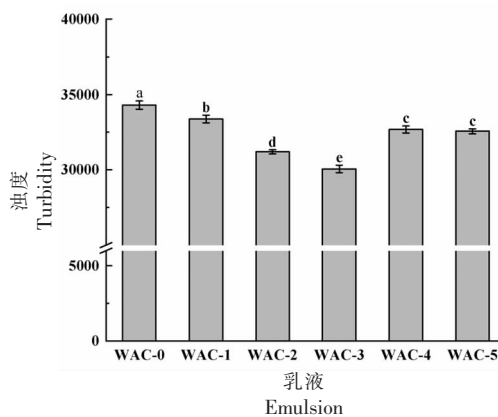
注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 5 WPI-ADA 乳液的蛋白质界面吸附率
Fig.5 The percentage of adsorbed proteins of WPI-ADA emulsions



注:不同字母表示同一组内有显著差异($P<0.05$)。

图 6 WPI-ADA 乳液的 EAI 和 ESI
Fig.6 EAI and ESI of WPI-ADA emulsions



注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 7 WPI-ADA 乳液的浊度
Fig.7 Turbidity of WPI-ADA emulsions

性测试。如图 8c 所示, G' 和 G'' 虽然都随着角频率的增加而增加, 但是 G' 和 G'' 大约在 3 rad/s 处有明显的交叉。在低频 (<3 rad/s) 下, 和 G'' 高于 G' , 表示乳液具有黏性特征; 在高频 (>3 rad/s) 下, G' 高于 G'' , 表示乳液具有弹性特征^[30]。表示乳液的状态由黏性主导转变为弹性主导的。根据 Her-

schel-Bulkley 模型研究 WPI-ADA 乳液剪切应力与剪切速率的关系。如表 2 所示, WPI-ADA 乳液的剪切应力与剪切速率显示出与 Herschel-Bulkley 模型的良好相关性 ($R^2 > 0.95$)。随着 ADA 量的增加, σ_0 值从 0.0053 逐渐增加至 0.0160, 表明乳液的稳定性有所增加^[31]。

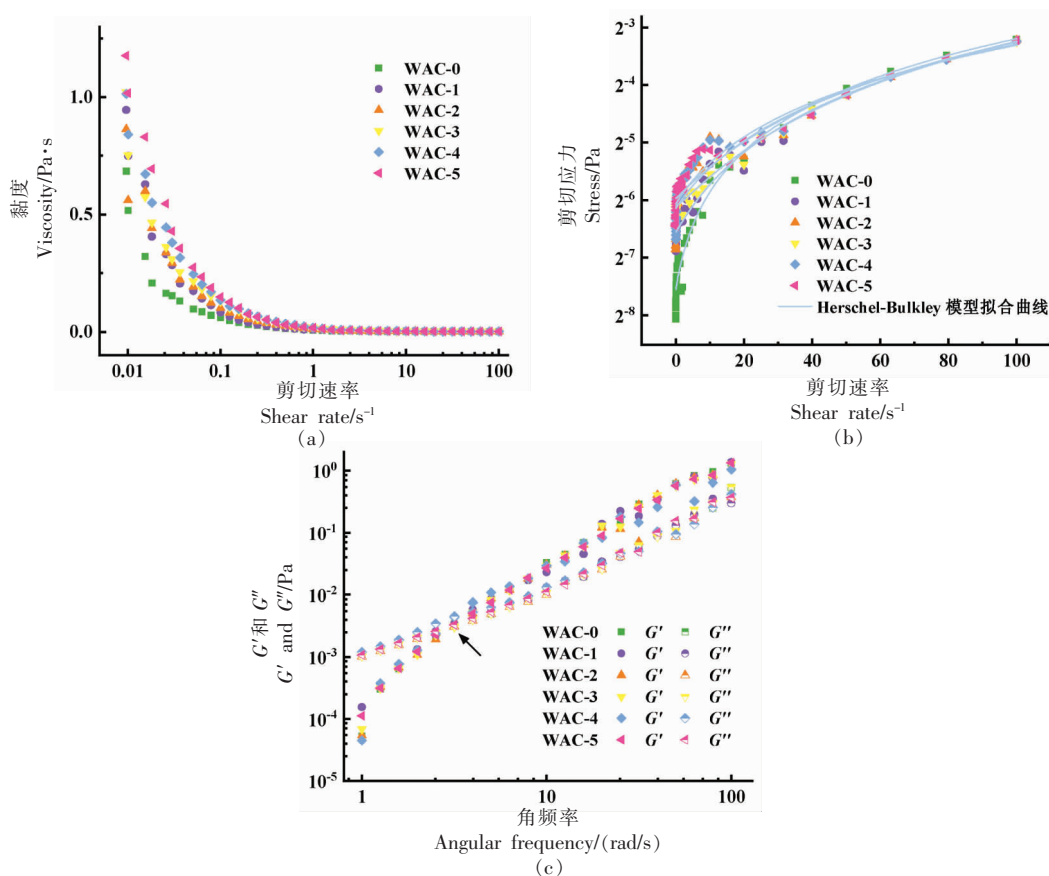


图 8 WPI-ADA 乳液黏度 (a)、频率扫描曲线 (b) 和剪切应力 (c)

Fig.8 Viscosity (a) and frequency sweeps curves (b) and stress (c) of WPI-ADA emulsions

表 2 WPI-ADA 乳液的 Herschel-Bulkley 模型

Table 2 Herschel-Bulkley model of WPI-ADA emulsions

乳液	σ_0/Pa	$K/\text{Pa}\cdot\text{s}^n$	$n/\text{Pa}\cdot\text{s}$	R^2
WAC-0	0.0053	0.0014	0.9394	0.9964
WAC-1	0.0107	0.0007	1.0597	0.9871
WAC-2	0.0142	0.0009	0.9976	0.9564
WAC-3	0.0146	0.0004	1.1776	0.9932
WAC-4	0.0149	0.0011	0.9524	0.9655
WAC-5	0.0160	0.0006	1.0871	0.9693

2.9 FTIR 分析

图 9a 为 WPI、ADA 和 CUR 的 FTIR。WPI 在 1739 cm^{-1} 处的特征峰代表 C=O 键的伸缩振动, 1650 cm^{-1} 处的特征峰与 C=O 键伸缩振动有关,

1542 cm^{-1} 和 1395 cm^{-1} 处的特征峰与 -NH 弯曲 C-N 伸缩振动有关^[32]。在 ADA 红外谱图的 1734 cm^{-1} 处发现了新的吸收峰, 对应于醛基 -CH 的弯曲振动, 表明经过高碘酸钠氧化后形成了醛

基^[33]。CUR 的特征峰出现在 1509 cm^{-1} (芳香环中 C-C 键的拉伸振动), 1280 cm^{-1} (C-O 键的伸缩振动)、 1154 cm^{-1} 和 1028 cm^{-1} (芳香环 C-H 键的平面内和平面外弯曲振动) 处。CUR 制备成 O/W 乳液后, 特征峰消失, 这表明 CUR 已成功封装在乳液中^[34]。图 9b 为 WPI-ADA 乳液的 FTIR 光谱。WPI-

ADA 乳液在 1741 cm^{-1} 处的特征峰与脂质和脂肪酸 C=O 的伸缩振动有关^[35]; 席夫碱的 C=N 伸缩振动峰在 $1650\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, 而该区域被 WPI 的酰胺 I 带覆盖; ADA 中 1734 cm^{-1} 处的醛基峰在 WPI-ADA 乳液红外谱图中消失, 这可能是由于席夫碱反应, WPI-ADA 乳液的羰基已被消耗^[36]。

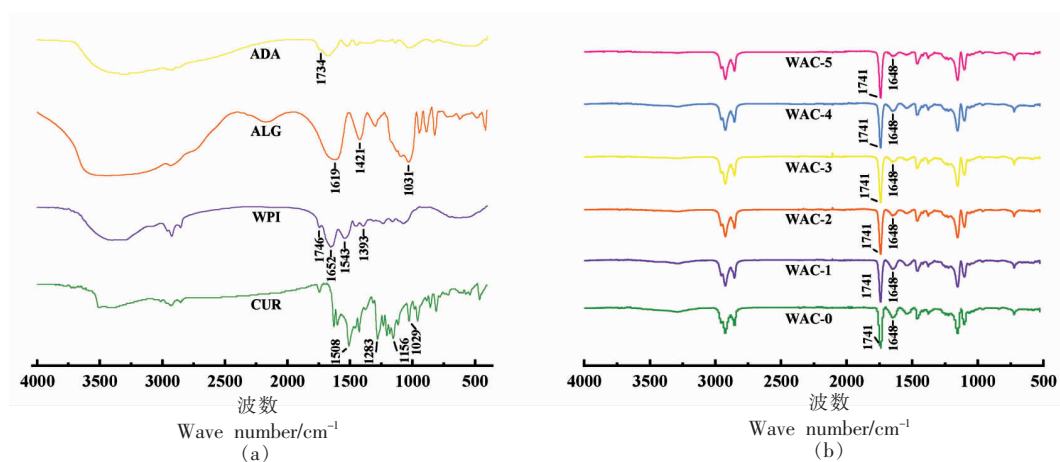


图 9 CUR、WPI、ALG、ADA(a)和 WPI-ADA 乳液(b)的 FTIR 图

Fig.9 FTIR spectra of CUR, WPI, ALG, ADA (a) and WPI-ADA emulsions (b)

2.10 体外模拟消化

图 10a 为 WPI-ADA 乳液在体外模拟消化过程中 DPPH 自由基清除活性的变化情况。WPI 乳液的 DPPH 自由基清除率在体外模拟消化后明显降低, 而 WPI-ADA 复合物乳液在体外消化后仍保持较高的抗氧化能力。这可能与 WPI-ADA 复合物使 CUR 的共轭二烯结果更容易向 DPPH 提供质子并提高 CUR 的自由基清除能力有关^[37]。这证实了 WPI-ADA 复合物乳液体系对 CUR 的抗氧化活性具有保护作用。如图 10b 所示, 在 SGF 中消化 2 h 后, WPI-ADA 乳液的 CUR 保留率分别为 79.6% (WAC -0), 83.0% (WAC -1), 83.0% (WAC -2), 84.7% (WAC -3), 89.7% (WAC -4) 和 93.1% (WAC -5)。在 SIF 中消化 4 h 后, WPI-ADA 乳液的 CUR 保留率分别为 20.3% (WAC -0), 24.1% (WAC -1), 27.9% (WAC -2), 29.2% (WAC -3), 30.4% (WAC -4) 和 34.2% (WAC -5)。在体外消化过程中, CUR 保留率降低的主要原因是由于体外模拟消化阶段的 CUR 降解。为研究 CUR 在体外模拟消化阶段抗氧化能力的变化, 评价了 CUR 的 DPPH 自由基清除活性。图 10c 结果表明, CUR

的生物利用度分别为 31.3% (WAC -0), 37.0% (WAC -1), 40.0% (WAC -2), 47.6% (WAC -3), 50.0% (WAC -4) 和 56.7% (WAC -5)。这可以归因于没有 WPI-ADA 复合物的保护, WPI 更容易被消化酶消化, 导致乳液液滴的不稳定, CUR 提前释放^[38]。在这种情况下可能会导致 CUR 的降解, 从而降低生物可及性。因此, WPI-ADA 复合物乳液是 CUR 的有效载体。

3 结论

本研究利用 WPI-ADA 复合物制备了 O/W 乳液, 用于运载 CUR, 对制备的 O/W 乳液的理化特性和递送性能(体外模拟消化)进行了研究。结果表明, WPI-ADA 乳液能够成功负载疏水性活性物质姜黄素, 并且具有较高的封装效率(97.15%~97.9%)。紫外光谱、荧光光谱和 FTIR 分析表明, WPI 和 ADA 的主要结合力为动态可逆共价键-席夫碱键。在席夫碱键的驱动下, WPI-ADA 复合物能够改善乳液的理化性质和姜黄素的释放特性。与 WPI 乳液相比, WPI-ADA 复合物乳液的界面吸附率、乳化活性、浊度等均有所提高。当 ADA 添加量为

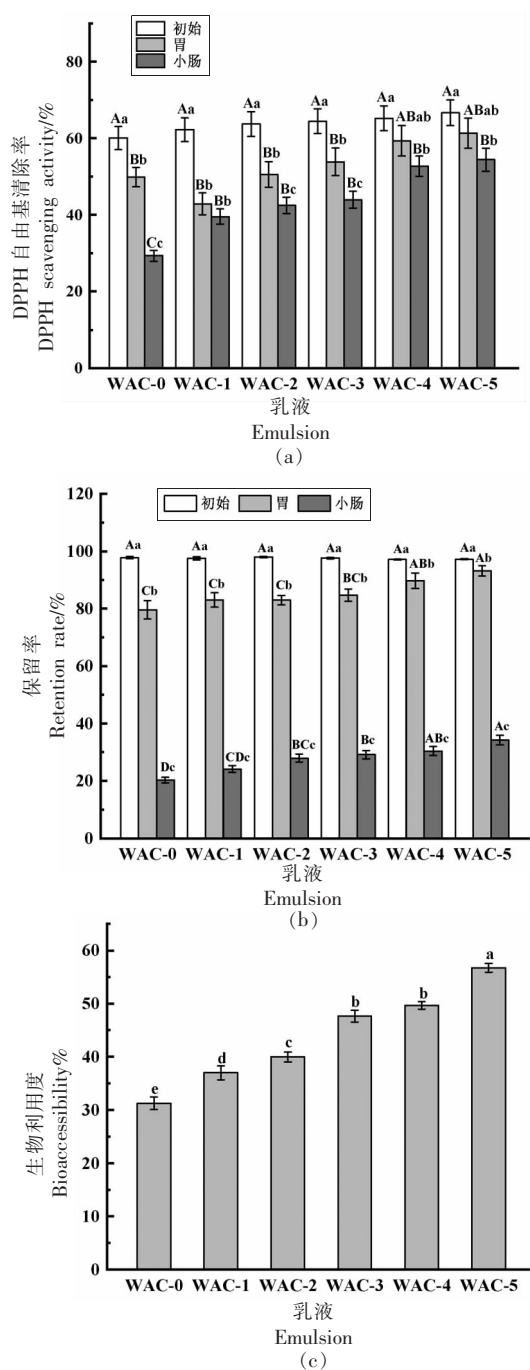


图 10 WPI-ADA 乳液在体外模拟消化后的 DPPH 自由基清除率(a)、保留率(b)和生物利用度(c)

Fig.10 The DPPH scavenging ability (a), retention rate (b) and bioaccessibility (c) of WPI-ADA emulsions after *in vitro* digestion

WPI 的 0.8% 时, 乳液的液滴尺寸较小 (214.5 nm)、浊度较低 (30 061.8), 乳化活性指数 (295.2 m^2/g) 和乳化稳定性 (0.617) 较高。体外模拟消化试验表明, 与 WPI 乳液相比, WPI-ADA 复合物乳液

在模拟胃肠液中的稳定性更高, 并且提高了姜黄素的生物利用度。研究结果为蛋白-多糖复合物修饰 O/W 乳液以及疏水性活性物质在乳液体系中的递送提供了理论支持。

参 考 文 献

- [1] CUI L J, GUO J X, MENG Z. A review on food-grade-polymer-based O/W emulsion gels: Stabilization mechanism and 3D printing application[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 139: 108588.
- [2] XIE H X, OUYANG K F, SHI W Y, et al. Enhancing the interfacial stability of O/W emulsion by adjusting interactions of chitosan and rice protein hydrolysate[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 137: 108406.
- [3] ZHANG Y Y, ZHANG T H, DONG C, et al. Lycopene-loaded emulsions stabilized by whey protein covalently modified with pectin or/and chlorogenic acid: Enhanced physicochemical stability and reduced bio-accessibility[J]. Food Chemistry, 2023, 417: 135879.
- [4] YAN M, DIAO M X, ZHANG C H, et al. Lactoferrin-ginsenoside Rg3 complex ingredients: Study of interaction mechanism and preparation of oil-in-water emulsion[J]. Food Chemistry, 2021, 363: 130239.
- [5] JIANG T, CHARCOSSET C. Encapsulation of curcumin within oil-in-water emulsions prepared by premix membrane emulsification: Impact of droplet size and carrier oil type on physicochemical stability and *in vitro* bioaccessibility [J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131825.
- [6] JIANG W, ZHANG Y F, MCCLEMENTS D J, et al. Impact of pea protein-inulin conjugates prepared via the Maillard reaction using a combination of ultrasound and pH-shift treatments on physical and oxidative stability of algae oil emulsions[J]. Food Research International, 2022, 156: 111161.
- [7] LI D, ZHAO Y, WANG X, et al. Effects of (+)-catechin on a rice bran protein oil-in-water emulsion: Droplet size, zeta-potential, emulsifying properties, and rheological behavior[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 105306.
- [8] WANG W N, WANG R Y, YAO J, et al. Effect of ultrasonic power on the emulsion stability of rice

- bran protein-chlorogenic acid emulsion[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 84: 105959.
- [9] XIONG W F, REN C, TIAN M, et al. Emulsion stability and dilatational viscoelasticity of ovalbumin/chitosan complexes at the oil-in-water interface[J]. *Food Chemistry*, 2018, 252: 181-188.
- [10] ZHONG W G, LI J T, WANG C N, et al. Formation, stability and *in vitro* digestion of curcumin loaded whey protein/hyaluronic acid nanoparticles: Ethanol desolvation vs. pH-shifting method[J]. *Food Chemistry*, 2023, 414: 135684.
- [11] ZHANG M, CHEN H, FENG Z H, et al. A stable peony seed oil emulsion that enhances the stability, antioxidant activity, and bioaccessibility of curcumin[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2023, 173: 114408.
- [12] ZENG Z, DENG S Q, LIU Y, et al. Targeting transportation of curcumin by soybean lipophilic protein nano emulsion: Improving its bioaccessibility and regulating intestinal microorganisms in mice[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 142: 108781.
- [13] GUO Z Q, HUANG Y Q, HUANG J, et al. Formation of protein-anthocyanin complex induced by grape skin extracts interacting with wheat gliadins: Multi-spectroscopy and molecular docking analysis[J]. *Food Chemistry*, 2022, 385: 132702.
- [14] LIU C Z, LV N, REN G R, et al. Explore the interaction mechanism between zein and EGCG using multi-spectroscopy and molecular dynamics simulation methods[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 120: 106906.
- [15] TIRGARIAN B, FARMANI J, FARAHMANDFAR R, et al. Ultra-stable high internal phase emulsions stabilized by protein-anionic polysaccharide Maillard conjugates[J]. *Food Chemistry*, 2022, 393: 133427.
- [16] DAI S C, LIAN Z T, QI W J, et al. Non-covalent interaction of soy protein isolate and catechin: Mechanism and effects on protein conformation[J]. *Food Chemistry*, 2022, 384: 132507.
- [17] SEO C W, YOO B. Preparation of milk protein isolate/ κ -carrageenan conjugates by maillard reaction in wet-heating system and their application to stabilization of oil-in-water emulsions[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2021, 139: 110542.
- [18] KEERATI-U-RAI M, MIRIANI M, IAMETTI S, et al. Structural changes of soy proteins at the oil-water interface studied by fluorescence spectroscopy[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 93: 41-48.
- [19] HUANG H, BELWAL T, LIN X Y, et al. Novel bind-then-release model based on fluorescence spectroscopy analysis with molecular docking simulation: New insights to zero-order release of arbutin and coumaric acid[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 106356.
- [20] WANG T, WANG N, DAI Y J, et al. Interfacial adsorption properties, rheological properties and oxidation kinetics of oleogel-in-water emulsion stabilized by hemp seed protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 137: 108402.
- [21] 缪雨雁, 曹燕, 立静芝, 等. 不同黏度多糖阿拉伯胶和瓜尔胶对肌原纤维蛋白乳化性质的影响[J]. *食品科学*, 2023, 44(6): 57-64.
- MIAO Y Y, CAO Y, LI J Z, et al. Effects of polysaccharides with different viscosity-arabic gum and guar gum on the emulsifying properties of myofibrillar protein[J]. *Food Science*, 2023, 44(6): 57-64.
- [22] CAI Y J, DENG X L, LIU T X, et al. Effect of xanthan gum on walnut protein/xanthan gum mixtures, interfacial adsorption, and emulsion properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 79: 391-398.
- [23] CHEN H L, MCCLEMENTS D J, CHEN E M, et al. *In situ* interfacial conjugation of chitosan with cinnamaldehyde during homogenization improves the formation and stability of chitosan-stabilized emulsions[J]. *Langmuir*, 2017, 33(51): 14608-14617.
- [24] YU C P, LI S H, SUN S, et al. Modification of emulsifying properties of mussel myofibrillar proteins by high-intensity ultrasonication treatment and the stability of O/W emulsion[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2022, 641: 128511.
- [25] WU T Y, LIN L, ZHANG X Y, et al. Covalent modification of soy protein hydrolysates by EGCG: Improves the emulsifying and antioxidant properties[J]. *Food Research International*, 2023, 164: 112317.
- [26] GUO X N, XIONG Y L. Characteristics and functional properties of buckwheat protein-sugar Schiff base complexes[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2013, 51(2): 397-404.

- [27] 吴长玲, 聂鑫, 史志玲, 等. 大豆蛋白-磷脂酰胆碱纳米乳液高压均质工艺研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(9): 93-102.
WU C L, NIE X, SHI Z L, et al. Studies on high pressure homogeneous technique of soy protein-phosphatidyl choline nano emulsion[J]. Food Science and Technology, 2019, 19(9): 93-102.
- [28] WANG S R, WANG T Y, LI X Y, et al. Fabrication of emulsions prepared by rice bran protein hydrolysate and ferulic acid covalent conjugate: Focus on ultrasonic emulsification[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 88: 106064.
- [29] HE S H, GU C, WANG D G, et al. The stability and *in vitro* digestion of curcumin emulsions containing Konjac glucomannan[J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 117: 108672.
- [30] PAN Y Y, XU Y Y, ZHU L J, et al. Stability and rheological properties of water-in-oil (W/O) emulsions prepared with a soyasaponin-PGPR system [J]. Future Foods, 2021, 4: 100096.
- [31] ZHANG C, LI Y, WANG P, et al. Electrospinning of bilayer emulsions: The role of gum Arabic as a coating layer in the gelatin-stabilized emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 38-47.
- [32] LUO X, FAN S Q, HE Z S, et al. Preparation of alginate-whey protein isolate and alginate-pectin-whey protein isolate composites for protection and delivery of *Lactobacillus plantarum*[J]. Food Research International, 2022, 161: 111794.
- [33] ZOU Y C, ZHANG A P, LIN L, et al. Schiff base cross-linked dialdehyde cellulose/gelatin composite aerogels as porous structure templates for oleogels preparation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 224: 667-675.
- [34] RACZ C P, RACZ L Z, FLOARE C G, et al. Curcumin and whey protein concentrate binding: Thermodynamic and structural approach[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 139: 108547.
- [35] XIAO S L, AHN D U. Co-encapsulation of fish oil with essential oils and lutein/curcumin to increase the oxidative stability of fish oil powder [J]. Food Chemistry, 2023, 410: 135465.
- [36] ZHENG X J, ZHANG Q N, LIU J, et al. A unique high mechanical strength dialdehyde microfibrillated cellulose/gelatin composite hydrogel with a giant network structure[J]. RSC Advances, 2016, 6(76): 71999-72007.
- [37] MENG R, WU Z Z, XIE Q T, et al. Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextran nanoparticles to encapsulate curcumin: Physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties [J]. Food Chemistry, 2021, 340: 127893.
- [38] LI S S, LIU Y, QIN W, et al. Physicochemical stability and *in vitro* bioaccessibility of β -carotene emulsions stabilized with arabinoxylan hydrolysates-soy protein isolate conjugates[J]. LWT - Food Science and Technology, 2022, 157: 113120.

Studies on Digestive Characteristics of Whey Protein-alginate Dialdehyde Emulsions

Wu Shaping, Wu Changling, Wu Fenghua, He Zhiping, Liu Xingquan, Wang Peng*
(College of Food and Health, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300)

Abstract The interactions between whey protein (WPI) and alginate dialdehyde (ADA) identified by UV-vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy and infrared spectroscopy were investigated for effects on the *in vitro* digestive properties of curcumin in O/W emulsions. The influence of the complexes on the emulsions was studied by droplet size, rheological properties, interfacial adsorption rate, emulsifying activity, turbidity and curcumin release characteristics. The results showed that the interfacial adsorption rate, emulsifying activity, droplet size and turbidity of emulsions driven by dynamic reversible covalent bond-Schiff base bond were improved. Compared with WPI emulsions, WPI-ADA complexes emulsions had higher interfacial adsorption rate and emulsifying activity. When the amount of ADA added was 0.8% of WPI, the emulsions had smaller droplet size (214.5 nm), lower turbidity (30 061.8), higher emulsifying activity (295.2 m²/g), and better emulsifying stability (0.617). Furthermore, the WPI-ADA complexes emulsions, which were more stable in simulate gastrointestinal fluid, promoted the bioavailability of curcumin.

Keywords hydrophobic active substance; protein-polysaccharide complex; intermolecular interaction; *in vitro* digestive properties