

甜菜果胶-WPI 复合对 β -胡萝卜素乳液消化特性的影响*

曲桂芹 王盼 郇金龙 殷丽君

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 基于静电吸附原理和酶促交联原理, 分别采用静电自组装与酶促交联技术对 β -胡萝卜素乳液进行界面改性, 将甜菜果胶层吸附于蛋白乳液界面。结果表明, 以乳清分离蛋白(WPI)作为乳化剂, 果胶质量分数为 0.15% 时, 可以制备出两种改性 β -胡萝卜素乳液。尽管改性乳液的粒径明显大于原乳液, 但是, 消化后 β -胡萝卜素的生物有效率明显低于原乳液, 表明改性后的 β -胡萝卜素乳液具有一定的缓释功能。并且, 果胶间以酶促交联形式存在的改性乳液受 pH 值的影响更小, 缓释效果更突出。

关键词: β -胡萝卜素乳液 蛋白乳化剂 甜菜果胶 消化特性 静电自组装技术 酶促交联

中图分类号: TS201.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)01-0184-07

引言

蛋白类乳化剂因其安全性而在食品行业被广泛应用, 但由于蛋白自身对环境因素敏感, 易发生凝聚而导致以单一的蛋白质作为乳化剂制得的乳状液稳定性较差。目前, 对于改善蛋白质乳状液稳定性的研究报道较多^[1-6], 大多集中在以下 3 方面: 采用静电自组装技术(Layer-by-layer technology, LBL), 利用静电吸附作用在乳化液界面上形成蛋白-多糖静电吸附层; 运用酶促交联剂或酶引发乳化界面上的蛋白质与其他聚电解质分子间或分子内发生共价交联; 运用美拉德反应机理, 使乳化液界面上的蛋白糖基化而产生蛋白-多糖复合界面。

甜菜果胶是从甜菜榨糖后残余甜菜渣中提取而来的新型果胶。与其他果胶相比, 甜菜果胶“毛发区”存在阿魏酸基团^[4-10], 约占中性糖残基含量的 0.61% ~ 2.5%^[11]。较多的研究已表明, 阿魏酸以单体或残基形式存在时, 都能被一些氧化还原酶氧化而发生交联^[12-13]。

在此前的研究中笔者曾采用 LBL 技术成功制备出以蛋白质为第 1 层界面, 果胶为第 2 层界面的乳清分离蛋白(WPI)乳状液。为了避免已经吸附的果胶层在乳液 pH 值变化时发生解吸, 前期研究中还进一步探索了基于酶促交联原理的改良方法, 即首先通过改变乳化液 pH 值使乳液中蛋白质带正电, 然后加入带负电的甜菜果胶使之吸附在乳化液

界面上, 再加入辣根过氧化物酶(HRP)在蛋白质乳液表面催化甜菜果胶间共价交联并在乳液表面形成具有一定刚性的果胶“保护壳”。前期研究结果表明, 基于静电吸附原理或者酶促交联原理构建的蛋白乳液界面上的果胶层都对提高乳液稳定性起到明显效果, 但是酶促交联后的乳状液由于受到更稳固的果胶层保护, 因此具有更强的抗环境变化能力^[14-16]。

β -胡萝卜素低水溶性和低稳定性限制了其更广泛的应用。 β -胡萝卜素乳液是近年来被广泛研究和应用的一种改造 β -胡萝卜素性质的运载体系。在笔者此前的研究中, 已经制备出最小粒径达到 50 nm 的 β -胡萝卜素粒子分散体系^[17], 以乳液形式存在的 β -胡萝卜素因粒子粒径减小, 比表面积增加而提高了 β -胡萝卜素的溶解性^[18], 并且其生物有效性也得到了提升^[19]。

为了进一步改善其稳定性, 本文采用 LBL 技术制备界面改性 β -胡萝卜素乳液, 并探索以 LBL 为技术平台, 结合酶促交联原理的果胶-蛋白- β -胡萝卜素乳液制备的可行性, 在此基础上进一步研究界面重构对于 β -胡萝卜素乳液的消化性质和缓释功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

β -胡萝卜素(质量分数 80% 以上, 日本和光纯药业株式会社), 大豆油(市售, 食品级未纯化, 嘉里

收稿日期: 2012-12-03 修回日期: 2012-12-24

* 国家自然科学基金资助项目(31371719)和公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(201303079)

作者简介: 曲桂芹, 副教授, 主要从事果蔬品质改良及功能性食品研究, E-mail: quguiqin2000@sina.com

通讯作者: 殷丽君, 教授, 博士生导师, 主要从事食品材料微细化加工及相关评价技术研究, E-mail: ljyin@cau.edu.cn

粮油中国有限公司), 叠氮化钠(德国 SIGMA 公司), 乳清分离蛋白(Whey protein isolate, WPI, 美国 Glanbia 公司), 酪蛋白钠(Sodium caseinate, SC, 日本 wako 公司), 甜菜果胶(Pectin Betapecc RU 301, 酯化度大于 50%, 德国 Herbstreith & Fox KG 公司), 辣根过氧化物酶(Horse radish peroxidase, HRP, 250 u/mg, 瑞士 Roche 公司), 猪胆汁提取物, II 型(批号 058K0066, EC 232-369-0, 德国 SIGMA 公司), 猪胰脂酶, II 型(批号 096K0747, EC 232-61-9, 德国 SIGMA 公司), 乙腈(色谱级, 德国 CNW Technologies GmbH 公司), 无水乙醇(色谱级, 天津市津科精细化工研), 双氧水(质量分数 30%, 国药集团化学试剂有限公司), 此外甲醇、乙醇、乙二胺四乙酸(EDTA)、硫酸钠、碳酸氢钠、蒸馏水、盐酸(北京化学试剂厂)皆为分析纯。

1.2 仪器设备

NS1001L 型高压均质机(意大利 Niro Soavi 公司), LS230 型激光粒度分析仪(美国 Beckman Coulter 公司), T-25 型高速乳化均质机(德国 IKA 公司), S-6 型超大功率磁力搅拌器(北京北德科学器材有限公司), HZS-H 型恒温水浴振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司), GL-20G-II 型高速离心机(上海安亭科学仪器公司), 微孔滤膜(美国 Millipore 生物科技技术公司, 0.45 μm), LC-10Atvp 型液相色谱泵(日本岛津公司), SPD-10Avp 型紫外可见检测器(日本岛津公司), C18 反向色谱柱(迪马公司, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), C18 提取柱(美国奥泰 Alltech 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 β -胡萝卜素乳液的制备

制备方法参照殷丽君等的方法^[20]。首先将质量分数 1% WPI(或者 SC)和 0.02% 叠氮化钠溶解于 0.1 mol/L, pH 值为 7.0 的碳酸氢钠缓冲液中, 磁力搅拌 4 h 以上, 以此作为水相。将质量分数 0.25% 的 β -胡萝卜素溶于大豆油中, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 经恒温磁力搅拌器完全溶解, 此为油相。水相与油相的体积比为 9:1, 两相直接混合, 经过高速乳化均质机在 15 000 r/min 速度下初均质 5 min, 制成粗乳液。粗乳液在高压均质机在 140 MPa 压力下, 一次均质得到油相体积分数 10%, β -胡萝卜素质量分数 0.025%, WPI 质量分数 0.9% 的最终 β -胡萝卜素乳液。采用同样方法, 以 SC 为乳化剂制备一批 β -胡萝卜素乳液, 将制备的乳液迅速转移至棕色瓶中包封, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光存放。

1.3.2 甜菜果胶-蛋白- β -胡萝卜素乳液的制备

对酈金龙等提出的制备方法加以改进^[14,16]。

(1) 基于静电吸附原理的制备方法

甜菜果胶溶液: 将一定量甜菜果胶粉末溶于 50 mmol/L 碳酸氢钠缓冲液(pH 值 7.0)中, 搅拌至果胶全部溶解, 得质量分数为 0.005 g/mL 的甜菜果胶溶液。

一级乳液: 分别用 SC 和 WPI 两种乳化剂制备两种 β -胡萝卜素乳液(方法见 1.3.1 节)。

二级乳液: 将一级乳液以适当比例混合获得二级乳液, 使二级乳液总体系中 β -胡萝卜素乳液的体积分数为 50%, 甜菜果胶质量分数分别为 0.05%、0.075%、0.1%、0.125%、0.15%、0.175%、0.2%、0.225%, 用 1 mol/L 的盐酸调节 pH 值至 4。

(2) 基于酶促交联原理的制备方法

甜菜果胶溶液制备同上; 双氧水配制成质量分数 0.3%; 辣根过氧化物酶(HRP)配制成 60 u/mL, -20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

一级乳液: 采用 WPI 作为乳化剂制备 β -胡萝卜素乳液(方法见 1.3.1 节)。

二级乳液: 一级 β -胡萝卜素乳液体积分数为 50%, 甜菜果胶以一定体积分数($\leq 50\%$)与 β -胡萝卜素乳液混合, 以过氧化氢与甜菜果胶溶液体积比 1:30 的比例和 HRP 与果胶溶液体积比 1:7.5 的比例加入过氧化氢和 HRP, 再用 1 mol/L 的盐酸将溶液调节 pH 值至 4.0。之后将溶液避光放置在水浴震荡箱内, 35 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 4 h, 取出后静置避光保存。

1.3.3 β -胡萝卜素乳液中粒子粒径检测

采用动态激光粒度分析仪测量颗粒的粒径分布, 设定 β -胡萝卜素折射率为 1.47, 蒸馏水折射率为 1.33 进行粒径检测, 每个样品作 3 个平行, 每个平行分析一次, 结果以 3 次的表面加权直径平均值表示。粒径分布用跨度 S 表示, $S = (d_{90} - d_{10}) / d_{50}$, S 值越小, 表明样品中粒子的粒径分布越均匀, d_{90} 、 d_{10} 和 d_{50} 分别相当于检测到的粒子粒径从小到大排列, 体积累计到 90%、10%、50% 时的体积直径。

1.3.4 β -胡萝卜素乳液中 β -胡萝卜素的检测

改进于殷丽君等的方法^[21]。

(1) 样品前处理

在检测乳液中 β -胡萝卜素含量时需要先经过提取柱分离。首先配制螯合溶液, 其中 Na_2SO_4 质量分数为 5%, EDTA 浓度为 1 mmol/L。将 2 μL 样品溶解于 2 mL 螯合溶液中, 混匀, 取出 1 mL 样品液加到 C18 固相柱的顶端, 分别以 10 mL 去离子水、5 mL 体积分数为 10% 的乙醇、以及 10 mL 体积比为 6.5:3.5 的乙腈/乙醇溶液洗脱, 收集乙腈/乙醇洗脱液, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 采用 HPLC 测定。最后, 再用 3 mL 甲醇、5 mL 纯净水清洗 C18 固相

柱,待下次使用。

(2) 高效液相检测

β -胡萝卜素测定的色谱条件为:C18反相色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);流动相为乙腈/乙醇体积比6.5:3.5,等梯度洗脱,流速1.6 mL/min,检测器波长450 nm,柱温40 $^{\circ}$ C,进样量50 μ m。高效液相色谱测得峰面积与 β -胡萝卜素浓度拟合的标准曲线: $y = 68\ 754x + 5\ 262, R^2 = 0.999\ 7$ 。

1.3.5 β -胡萝卜素乳液的体外模拟消化过程

体外消化模型的建立参照 Beysriat 等的研究成果^[22]。具体操作步骤如下:①将制备好的乳液样品置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中,放置1 h。②用1 mol/L的盐酸将样品pH值调至2.0,置于37 $^{\circ}$ C培养箱中,95 r/min振荡1 h。③将胆盐和胰脂酶用0.1 mol/L的碳酸氢钠充分溶解,使得该溶液中胆盐质量浓度为12 mg/mL,胰脂酶质量浓度为2 mg/mL。样品用0.9 mol/L的碳酸氢钠调至pH值5.3后,取30 mL,向其中加入7.5 mL的胆盐、胰脂酶、碳酸氢钠混合液。将样品置于37 $^{\circ}$ C的培养箱,保存2 h。④取出样品,用1 mol/L的NaOH调节pH值至7.5,然后放置于37 $^{\circ}$ C的恒温振荡培养箱,95 r/min振荡2 h。

1.3.6 β -胡萝卜素生物有效性的测定

在体外消化之后,一部分 β -胡萝卜素在胆盐和

胰脂酶的作用下转化成溶于水的胶束形式,这部分水溶液需要通过高速离心处理从消化液中分离出来,条件是15 000 r/min,60 min,10 $^{\circ}$ C,并经过0.45 μ m的滤膜过滤,其中 β -胡萝卜素的浓度直接由高效液相色谱测定。 β -胡萝卜素生物有效性的描述参照 Veda 等的文献^[23],即离心后澄清液中 β -胡萝卜素浓度占原乳液中 β -胡萝卜素浓度的百分比。

2 结果与分析

2.1 改性 β -胡萝卜素乳液的制备

由WPI和SC两种乳化剂制备果胶质量分数分别为0.05%、0.075%、0.1%、0.125%、0.15%、0.175%、0.2%、0.225%的两种静电吸附改性 β -胡萝卜素乳液,通过静置观察分层现象来初步选择适宜的乳化剂和果胶浓度。LBL技术是利用电解质分子间的静电作用,将带有不同电荷的离子型表面活性剂或聚电解质交替沉积在微粒表面,由于甜菜果胶的等电点在3.6左右,而WPI和SC中蛋白的等电点在4.6以上,所以在pH值为4的环境里果胶带负电,蛋白乳化的液滴表面带正电,可以通过静电吸附在乳化界面发生作用。静置3 d后结果如图1所示。

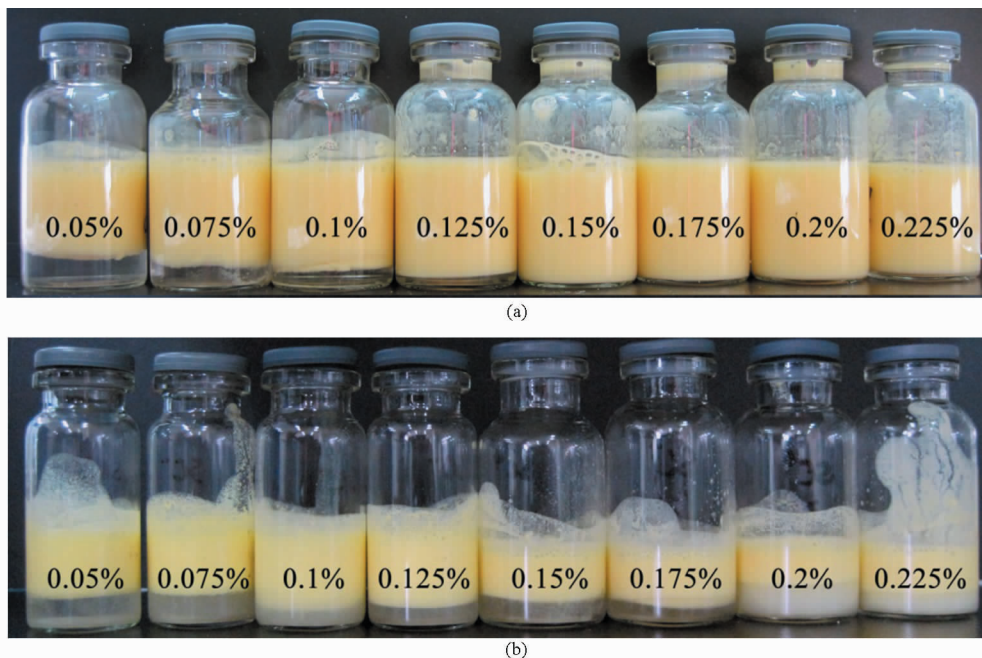


图1 用WPI和SC制备的两种静电吸附型改性乳液

Fig.1 Two series of electrostatic adsorption-modified emulsion made by WPI and SC

(a) WPI (b) SC

SC制备的乳液在与任何浓度果胶混合时,均发生分层现象,原因可能是酪蛋白钠溶于水后的pH值接近中性,在pH值为4时可能会使带正电的钠离子解离出来,从而干扰了乳液的稳定性和果胶的

吸附;以WPI制备的乳液则在果胶质量分数达到0.15%之后保持稳定状态。之前针对不含 β -胡萝卜素的乳液研究结果也证明在果胶质量分数达到0.125%之后,改性乳液处于稳定状态,并且 ζ 电势

在此过程中的变化从正到负并在果胶浓度达到 0.125% 之后基本保持稳定,说明果胶与蛋白的界面吸附已经饱和。产生分层现象原因可能是,随着果胶的加入,界面上带正电的静电荷不断被中和,因此粒子间彼此的静电排斥作用逐渐减小,当果胶的浓度达到了临界点,使粒子表面负电荷所产生的静电排斥作用大于粒子间的范德华吸引力时,才阻止了聚凝显现的产生^[24]。根据实验结果与分析,选择乳化剂 WPI 质量分数 0.15%,果胶质量分数 0.15% 制备静电吸附的改性乳液。由于酶促交联改性的乳液是在静电吸附的改性乳液基础上制备的,因此制备酶促交联乳液时也选择 WPI 质量分数 0.15%,果胶质量分数 0.15%。

采用 WPI 为乳化剂和 0.15% 的果胶制备出静电吸附和酶促交联两种改性乳液,根据两种改性原理推断,静电吸附的改性乳液易受乳液中 pH 值的影响,当 pH 值改变时,蛋白以及果胶所带电荷也将随之改变,果胶吸附于乳化界面的静电力将减弱甚至不复存在,从而发生吸附层部分乃至全部脱落现象;而酶促交联的改性乳液,则由于在果胶吸附层分子间通过辣根过氧化物酶催化形成了稳定的共价交联结构,不会因乳液中 pH 值的改变而使果胶吸附层从蛋白界面上脱落。因此在不同的 pH 值下,两种改性乳液应表现出不同的物理性质,为了进一步证明两种改性乳液的成功制备,通过检测乳液的粒径和分布证实了这一推断,结果如图 2 所示。

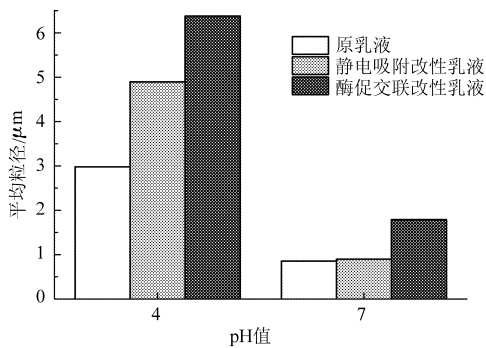


图 2 不同 pH 值下原乳液和改性乳液的平均粒径

Fig. 2 Mean particle sizes of original and modified emulsions in different pH value

从图 2 可以看出,在 pH 值为 4 时可以发生静电吸附作用,原乳液、静电吸附的改性乳液和酶促交联的改性乳液的粒子粒径呈现 3 种不同线性的分布。蛋白质界面上通过静电作用吸附了甜菜果胶,因此界面变厚,表现为粒子平均粒径的增大,而酶促交联改性的乳液平均粒径要大于静电吸附的乳液,原因可能是在静电吸附到蛋白上的果胶层外还会有更多的果胶通过酶促反应交联到果胶层上,因此以酶促交联改性形成的果胶壳要厚于靠静电力吸附的

果胶壳。

当 pH 值从 4 调整为 7 时,原乳液和静电吸附改性乳液平均粒径大幅度减小,并且两者基本减小到同一水平,这是因为在 pH 值为 7 时,对于原乳液而言,乳液粒子间的静电排斥作用增大,使得原本相互聚集的粒子重新分散,表现为粒径下降;对于静电吸附的改性乳液而言,在 pH 值为 7 时,蛋白界面与果胶界面都带负电,导致静电吸附作用力完全丧失,从而果胶吸附层从 WPI 界面上脱落,使之基本还原为普通乳液,随着乳液粒子间的静电排斥作用增大,粒径下降。而酶促交联的改性乳液在 pH 值为 7 时平均粒径也下降,但是其下降后的粒径仍然大于原始乳液以及静电吸附改性乳液,这一方面是 pH 值为 7 时,乳液粒子间的静电排斥作用增大,会使粒径减小,另一方面,由于甜菜果胶通过共价交联而牢固结合,因此果胶吸附层不会因为 pH 值的改变而发生结构破裂、脱落,相对于原始乳液以及静电吸附改性乳液而言,其粒径也会偏大。

实验中的其他结果(未显示)也表明,原乳液、静电吸附改性乳液和酶促交联改性乳液三者的粒径 S 值依次为 1.61、0.81 和 1.06。S 值是表征粒子均一性的参数,S 值越小说明乳液中粒子大小越均匀,乳液越稳定。原乳液的 S 值最大,说明两种改性乳液的粒径大小更为均一,原因可能是在 pH 值为 4 时,原乳液的乳化界面只有蛋白保护,蛋白很不稳定,而改性乳液在蛋白外吸附了果胶,从而增加了稳定性。

需要说明的是,在前期研究中,利用分光光度法分别检测蛋白-辣根过氧化物酶反应液以及甜菜果胶-辣根过氧化物酶反应液的吸光度变化时,发现吸光度变化只出现在甜菜果胶-辣根过氧化物酶反应体系中,而未出现在蛋白-辣根过氧化物酶反应体系中,说明在所控制的实验条件中蛋白之间无法在辣根氧化物酶催化下发生交联反应,而甜菜果胶间则能够形成交联结构。与此同时,前期研究还采用 SDS-PAGE 电泳法检测了蛋白-辣根过氧化物酶反应液以及蛋白-甜菜果胶-辣根过氧化物酶反应液的分子水平交联反应过程,发现无论在蛋白之间还是蛋白与甜菜果胶之间都未出现大分子的交联产物,说明在所控制的实验条件中无法在辣根氧化物酶催化下发生蛋白质间或者蛋白质与甜菜果胶间的交联反应。因此可以认为,交联现象是发生在甜菜果胶分子之间的,这与 Littoz 等的研究结果一致^[25]。

多种检测手段都未发现在乳液界面上发生了蛋白质与甜菜果胶或者蛋白质与蛋白质之间的交联反应。

综上,通过与原乳液的比较,可以看出两种改性乳液确实具备与原乳液之间不同的粒径特性和物理稳定性,不仅进一步证明了两种改性乳液在乳化界面上发生了改变,同时也说明发生酶促交联的果胶吸附乳液在环境 pH 值发生变化时更具稳定性。

2.2 改性 β -胡萝卜素乳液消化特性

在经过 5 h 的消化之后,原乳液的 β -胡萝卜素生物有效性高达 37.488%,而静电吸附型和酶促交联型的改性乳液的生物有效性分别为 2.035% 和 1.389%,远低于原乳液。由此可见改性乳液的蛋白界面外层覆盖的果胶层,可明显阻碍 β -胡萝卜素的消化,而且酶促交联的果胶层阻碍效果要强于静电吸附的果胶层,可能是因为模拟肠部消化环境的 pH 值在 5.3 左右,接近 WPI 的等电点,在此 pH 值下部分 WPI 带负电,无法与同带负电的果胶发生静电吸附,导致部分果胶吸附层发生脱落而使保护效果有所减弱。

为了明确两种改性乳液的缓释效果,研究中进一步设计了 β -胡萝卜素缓释的追踪实验。在本实验中,消化开始后,每隔 1 h 取一次样(开始 1 h 为 pH 值为 2 的胃部模拟,之后的消化都在 pH 值为 5.3 加入胆盐和脂酶的条件下进行),并立即进行离心处理和 β -胡萝卜素液相检测。

如图 3 所示,消化的前 2 h,两种改性乳液均无 β -胡萝卜素释放出来。原因可能是在消化的前 1 h 模拟的是胃部消化,并无胆盐和胰脂酶的加入。第 2 小时开始虽然加入了胆盐和胰脂酶却未能将油滴外面的结构破坏,所以直至第 3 小时结束后,界面结构较为松散的静电吸附改性乳液才开始有 β -胡萝卜素释放到水相中。正常的模拟消化过程只需 5h,结果表明,第 4 小时内静电吸附的改性乳液 β -胡萝卜素转化率要明显高于酶促交联的改性乳液,而第 5 小时内两种乳液的转化效率趋同,但前者的转化率依旧明显高于后者。在延时消化过程中,即第 6 和第 7 小时内,酶促交联的乳液转化效率极大地提高,可能是因为延长的消化时间内酶促交联的果胶壳被破坏的程度产生了突越,从而有助于提高 β -胡萝卜素的转化效率,而在这段时间内静电吸附

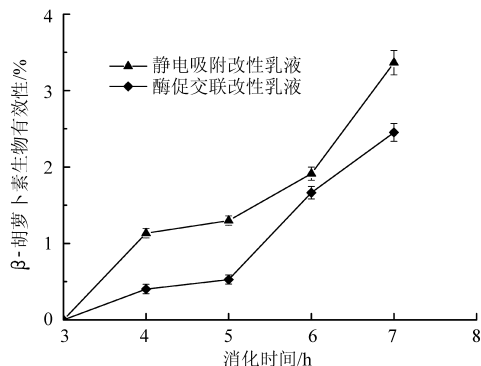


图 3 两种改性 β -胡萝卜素乳液对 β -胡萝卜素的缓释效果

Fig. 3 Effect of modified emulsions on the release of β -carotene

的乳液 β -胡萝卜素释放速率和效率依旧很高,并保持继续增加的趋势。

从上面的分析可以看出,两种改性乳液都起到了缓释的效果,酶促交联的乳液效果更为明显,从变化趋势上看,影响 β -胡萝卜素释放的最主要因素是甜菜果胶的存在以及果胶层的交联结构。由于果胶在人体内是不能被代谢和消化的,所以尽管随着时间的延长,消化率有所增加,但相对于原乳液(图 2)的消化率还是明显较小。

3 结束语

以 LBL 技术为基础,制备了以 WPI-甜菜果胶静电吸附层为界面的 β -胡萝卜素乳液,以及以界面上 WPI-甜菜果胶静电吸附为基础,结合酶促交联原理的以 WPI-交联甜菜果胶吸附层为界面的 β -胡萝卜素乳液。确定了甜菜果胶的最佳工作质量分数为 0.15% 和适宜的 WPI 质量分数为 0.15%。通过粒径分析比较了原乳液和两种改性乳液的平均粒径和跨度,研究表明两种改性乳液均使果胶成功吸附蛋白表面从而致使粒径增大。其中,酶促交联的改性的乳液界面稳定性更好,受 pH 值的影响也更小,并且在 pH 值为 7 时果胶壳并不发生脱落。

改性后的乳液中 β -胡萝卜素的生物有效性明显低于原乳液,消化跟踪实验表明两种乳液均有缓释的作用,且酶促交联的改性乳液缓释效果更为明显。

参 考 文 献

- 齐军茹,彭志英. 蛋白乳化活性与分子结构的关系[J]. 中国食品添加剂,2004(2):52~55.
Qi Junru, Peng Zhiying. Relationship between the emulsifying activity of protein and it's molecular structure [J]. China Food Additives, 2004(2):52~55. (in Chinese)
- 张红. 蛋白质交联研究概况[J]. 粮食与油脂,2004(12):16~19.
Zhang Hong. Summarization of protein cross-linking [J]. Cereals & Oils, 2004(12):16~19. (in Chinese)
- 赵喜红,罗志刚,何小维. 蛋白-多糖复合物及其应用研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(6):1582~1584.
Zhao Xihong, Luo Zhigang, He Xiaowei. Research advance in the conjugation of protein and polysaccharide and its application

- [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007,35(6):1582~1584. (in Chinese)
- 4 许朵霞,许洪高,毛立科,等. 蛋白质多糖共价复合物的研究进展[J]. *食品研究与开发*,2008,29(11):186~189.
Xu Duoxia, Xu Honggao, Mao Like, et al. Research advances in the conjugation of protein and polysaccharide through covalent interaction [J]. *Food Research and Development*, 2008,29(11):186~189. (in Chinese)
- 5 孙哲浩,赵谋明. 蛋白质与果胶在界面上的交互作用[J]. *现代食品科技*,2006,22(2):240~242.
Sun Zhehao, Zhao Mouming. Interaction of protein and pectin in interface [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006,22(2):240~242. (in Chinese)
- 6 熊拯,郭兴凤,谈天. 蛋白质-阴离子多糖相互作用研究进展[J]. *粮食与油脂*,2006(10):15~17.
Xiong Zheng, Guo Xingfeng, Tan Tian. Research process in the interaction of protein-anionic polysaccharide [J]. *Cereals & Oils*, 2006(10):15~17. (in Chinese)
- 7 薛长湖,张永勤,李兆杰,等. 果胶及果胶酶研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2005,24(6):94~99.
Xue Changhu, Zhang Yongqin, Li Zhaojie, et al. Recent development of pectin and pectolytic enzyme [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005,24(6):94~99. (in Chinese)
- 8 孙元琳,汤坚. 果胶类多糖的研究进展[J]. *食品与机械*,2004,20(6):60~63.
Sun Yuanlin, Tang Jian. Research process in pectin polysaccharides [J]. *Food and Machinery*, 2004,20(6):60~63. (in Chinese)
- 9 Rombouts F M, Thibault J F. Feruloylated pectic substances from sugar beet pulp [J]. *Carbohydrate Research*,1986, 154(1):177~187.
- 10 Micard V, Thibault J F. Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins [J]. *Carbohydrate Polymers*,1999,39(3):265~273.
- 11 李兆龙. 甜菜果胶[J]. *食品工业*,1991(3):35~37.
- 12 王鹏,谢益民,范建云. 漆酶催化阿魏酸改善纸浆湿强度及其机理的研究[J]. *造纸科学与技术*,2008,27(5):6~10.
Wang Peng, Xie Yimin, Fan Jianyun. Study on mechanism of enhancement of wet strength of paper treated with laccase and ferulic acid [J]. *Paper Science & Technology*, 2008,27(5):6~10. (in Chinese)
- 13 马福敏,刘燕,王璋,等. 全麦粉中阿拉伯木聚糖氧化交联性质的研究[J]. *食品与发酵工业*,2008,34(9):20~26.
Ma Fumin, Liu Yan, Wang Zhang, et al. Studies on the oxidative cross-linking of arabinoxylans from whole wheat flour [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008,34(9):20~26. (in Chinese)
- 14 Li J L, Cheng Y Q, Wang P, et al. A novel improvement in whey protein isolate emulsion stability: generation of an enzymatically cross-linked beet pectin layer using horseradish peroxidase [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 26(2): 448~455.
- 15 崔健,酆金龙,王盼,等. 温度、pH和盐对乳清蛋白乳状液稳定性影响[J]. *食品工业科技*,2010,31(11):84~87.
Cui Jian, Li Jinlong, Wang Pan, et al. Influence of temperature, pH and salts on the stability of emulsions stabilized by whey protein [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010,31(11):84~87. (in Chinese)
- 16 酆金龙,程永强,赵文婷,等. 甜菜果胶酶促交联对蛋白质乳液稳定性影响的探索[J]. *农业机械学报*, 2011,42(2):138~143.
Li Jinlong, Liu Huan, Zhao Wenting, et al. Effect of enzymatically cross-linked beet pectin on stability of emulsion stabilized by protein [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2011, 42(2): 138~143. (in Chinese)
- 17 Yin L J, Chu B S, Kobayashi I, et al. Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of β -carotene nano-dispersions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2009,23(6):1617~1622.
- 18 McClements D J, Decker E A, Park Y, et al. Designing food structure to control stability, digestion, release and absorption of lipophilic food components[J]. *Food Biophysics*, 2008,3(2):219~228.
- 19 Wang P, Cheng Y Q, Liu H J, et al. Preliminary study into the factors modulating β -carotene micelle formation in dispersions using an in vitro digestion model [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012,26(2):427~433.
- 20 Yin L J, Kobayashi I, Nakajima M. Effect of polyglycerol esters fatty acids on the physicochemical properties and of β -carotene emulsions during digestion in simulated gastric fluid [J]. *Food Biophysics*, 2008,3(2):213~218.
- 21 殷丽君,韩清华,刘海杰,等. 溶剂替换法制备 β -胡萝卜素纳米粒子与稳定性[J]. *农业机械学报*, 2009,40(4):112~115.
Yin Lijun, Han Qinghua, Liu Haijie, et al. Preparation of β -carotene nanodispersions by solvent displacement technique and their stability [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2009, 40(4):112~115. (in Chinese)
- 22 Beysariat M, Decker E A, McClements D J. Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an in vitro human digestion model [J]. *Food Hydrocolloids*, 2006,20(6):800~809.
- 23 Veda S, Kamath A, Platel K, et al. Determination of bioaccessibility of β -carotene in vegetables by in vitro methods [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2006,50(11):1047~1052.
- 24 毛立科. β -胡萝卜素纳米乳液的制备及其理化性质的研究[D]. 北京:中国农业大学,2008.
- 25 Littoz F, McClements D J. Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase [J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22(7): 1203~1211.

Preparation of β -carotene Emulsion Stabilized by Beet Pectin – Whey Protein Isolate Complex and Its Digestion Properties in Vitro Digestion Model

Qu Guiqin Wang Pan Li Jinlong Yin Lijun

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Layer-by-layer technology (LBL) and enzymatic cross-linking technology were used to make modified β -carotene emulsion. Two kinds of modified β -carotene emulsion were prepared by using whey protein isolate as emulsifier, and then 0.15% sugar beet pectin was added to cover the surface of particles under the action of electrostatic adsorption and enzymatic cross-linking. The results showed that compared with original emulsions, particle size of modified emulsions increases; however, the bioavailability of β -carotene in modified emulsions is obviously lower than that in original emulsion, and it suggests that β -carotene in modified emulsions, especially in emulsion modified through enzymatic cross-linking, has sustained-release function.

Key words: β -carotene emulsion Protein emulsifier Sugar beet pectin Digestion property Layer-by-layer technology Enzymatic cross-linking

(上接第 183 页)

Pulse Mode High-pressure Destruction Kinetics of *E. coli* in Carrot Juice

Hu Feifei Zhu Rui Yang Nan Yu Yong He Jinsong Zhu Songming

(School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The effect of pulse mode high-pressure on *E. coli* in fresh carrot juice was studied. Destruction kinetics of *E. coli* was investigated after pulse mode high-pressure treatment (300 ~ 600 MPa, 1 ~ 4 pulses). Enumeration was carried out in brain-heart infusion agar and violet-red bile agar to differentiate between surviving cells with and without injury. Results showed that with an increase in either pressure or pulse, both injured and killed cells increase significantly. At more than 400 MPa, the increase of pulse, rather than pressure, makes the sterilization effect better. Two pressure pulses at 500 MPa or a pressure pulse at 600 MPa destroys the entire population ($10^{7.8}$ cfu/mL) of *E. coli* in carrot juice. And on both BHIA and VRBA, pulse mode high-pressure destruction of *E. coli* in carrot juice follows first-order kinetics under experimental conditions. Modeling analysis showed that, for lethal effect, every 3.95, 1.76 and 0.83 pulses result in a decimal change of *E. coli* for 300, 350 and 400 MPa, respectively; for injured effect, every 1.68, 1.26 and 0.48 pulses result in a decimal change of *E. coli* for 300, 350 and 400 MPa, respectively. To achieve a same sterilization effect, when the pressure pulse decreases an order of magnitude the pressure has to increase by 229 MPa and 206 MPa, for BHIA and VRBA, respectively.

Key words: Carrot juice *E. coli* Ultra-high pressure Pulse Kinetics