doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2021.08.036

酶辅助乳化制备姜黄素脂肪乳研究

江连洲　孙铭悦　佟晓红　成晓祎　崔文玉　王　欢
(东北农业大学食品学院,哈尔滨 150030)

摘要:选用碱性蛋白酶辅助乳化,利用酶解膨化大豆粉产生的蛋白和磷脂作为乳化剂制备了天然姜黄素脂肪乳。通过流体动力学半径及其分布的测量、激光共聚焦显微镜观察和荧光光谱分析等来表征脂肪乳粒径、电位、微观结构及脂肪乳内蛋白的荧光强度变化,以氧化稳定性、包埋率和生物利用率来评价脂肪乳的稳定性能和对姜黄素的负载效果。结果表明,随着姜黄素添加量的增加,脂肪乳平均粒径先增加、后趋于稳定,在添加量为 0.6% 时,平均粒径为 1 127.42 nm,电位绝对值最大,为 38.67 mV。激光共聚焦显微镜观察结果表明,乳液中油滴和蛋白分布比较均匀,形成了包裹较好的液滴。在 0.6% 添加量下的脂肪乳储存 14 d 时的氧化稳定性最好,POV 值最小,仅为 3.15 mmol/kg,储存 21 d 时 TBARS 值为 0.56 mmol/kg;姜黄素包埋率高达 72.58%,经体外消化后生物利用率为 55.22%。荧光光谱分析表明,过量的姜黄素会使脂肪乳中蛋白质的荧光强度显著降低。因此,在姜黄素添加量为 0.6% 时,通过酶辅助法可制备稳定性较高、运载效果较好的脂肪乳。

关键词:膨化大豆粉;姜黄素;脂肪乳;酶解;运载体系;营养递送
中图分类号:TS210　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-1298(2021)08-0346-09　　**OSID**:

Preparation of Curcumin Fat-emulsion by Enzyme-assisted Emulsification

JIANG Lianzhou　SUN Mingyue　TONG Xiaohong　CHENG Xiaoyi　CUI Wenyu　WANG Huan
(*College of Food Science*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*)

Abstract: Fat-emulsions were prepared with alkaline protease assistance of soybean extrudate powders. Protein and phospholipid produced by enzymatic hydrolysis of the soybean extrudate powders were used as emulsifier to prepare natural curcumin fat-emulsion. The particle size, Zeta potential and microstructure of protein in fat-emulsion were characterized by measuring hydrodynamic radius and its distribution, confocal laser scanning microscope and fluorescence spectrum were used for the fluorescence intensity assays. The stability of fat emulsion loaded curcumin and the loading effect of curcumin were evaluated by oxidation stability, encapsulation efficiency and bioavailability. The results revealed that with the increase of addition of curcumin, the average particle size of fat-emulsions was increased first and then got stability. When the curcumin was added at 0.6%, the max absolute value of Zeta potential was 38.67 mV and the particle size of fat-emulsion was only 1 127.42 nm. The subsequent increase in average particle size were not significant. The laser confocal scanning microscope observed that the oil droplets and protein in the emulsion were more evenly distributed, forming well-wrapped droplet. The POV value was only 3.15 mmol/kg, and the TBARS value was 0.56 mmol/kg, exhibited excellent stability after 21 days storage. The encapsulation efficiency of the fat-emulsion and the bioavailability after the intestinal conditions of curcumin was respectively as high as 72.58% and 55.22% at 0.6%. Fluorescence spectroscopy showed that the fluorescence intensity of protein in fat-emulsions was reduced because of excess curcumin. Therefore, when the amount of curcumin was 0.6%, the novel fat-emulsions with high stability and great transport effect can be prepared by the enzymatic assisted method. These findings may be helpful for designing delivery emulsions to improve the bioavailability of lipophilic substances.

Key words: soybean extrudate powders; curcumin; fat-emulsion; enzyme hydrolysis; delivery system; nutrition delivery

收稿日期:2021-04-25　修回日期:2021-05-21
基金项目:东北农业大学“青年才俊”项目(19QC29)、黑龙江省博士后面上项目(LBH-Z20089)、山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2019JZZY010722)和黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2019ZX08B01)
作者简介:江连洲(1960—),男,教授,博士生导师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail:jlzname@163.com
通信作者:王欢(1987—),女,讲师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail:whname@neau.edu.cn

0　引言

姜黄素(Curcumin, CUR)是姜黄的天然多酚化合物,具有多种生物活性,例如抗氧化、抗增殖、抗炎和抗癌特性。姜黄素对 pH 值和温度较敏感,故易于氧化和化学降解,其生物利用度较低,导致其应用受到极大的限制[1]。因此,需要采取一些有效的手段将这种化合物应用于食品中,并实现营养递送。文献[2]制备了姜黄素纳米乳液,研究表明纳米乳液可以实现姜黄素的包埋和运载,且稳定性较好。文献[3]研究表明,在 140℃下将过量的姜黄素添加到一定量的香精油中溶解,不会引起姜黄素的降解。这些为酶法辅助制备负载姜黄素的新型大豆脂肪乳提供了基础。

基于乳液的递送系统在生物活性营养素运载中起着重要作用。常规乳液是热力学不稳定的体系,存在许多物理化学机制(如奥斯特瓦尔德熟化、絮凝、乳化和聚结),随着贮藏时间的延长,其稳定性逐渐降低[4]。脂肪乳是一种将脂质以小液滴状分散在水中,形成非均相的水包油(O/W)型乳液,能够明显提高疏水生物活性物质在水溶液中的溶解度和生物利用度[5]。近年来,研究表明,将脂肪乳作为溶剂与某些活性物质组合能达到控释的目的[6]。文献[7]利用大豆卵磷脂作为乳化剂,以大豆油为油相,通过高速剪切和高压均质制备了姜黄素脂肪乳。

制备乳液低耗能方法之一的相转变温度法是利用体系内部发生相变所释放的化学能实现乳化,然而,相比于超声、高压均质和研磨法,这种相转变温度法制备的乳液稳定性差、使用局限性较大。文献[8]利用生物酶酶解大豆粉过程中得到的优质组分蛋白(或肽)和磷脂作为天然乳化剂,吸附在油、水界面,并降低界面张力,可以形成天然且稳定的水包油(O/W)型乳液体系,这种低能乳液即为相转变温度法产生的乳液。但有关利用生物酶辅助相转变温度法制备脂肪乳作为生物活性物质递送体系尚未见深入的研究。

本文选用姜黄素作为亲脂性生物活性物质,利用碱性蛋白酶辅助酶解膨化大豆,将姜黄素溶解在大豆酶解物中,利用水解后的蛋白、磷脂等作为天然乳化剂,制备自发形成、稳定性更佳的新型脂肪乳。为解决姜黄素生物利用率低等问题,本文对以酶解制备大豆乳液为原料负载姜黄素的脂肪乳进行评估,并对其包埋率随储存时间的变化进行研究,以期实现姜黄素更高的稳定性能和生物利用度。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

全脂膨化大豆(蛋白质量分数 40%、油脂质量分数 20%),山东高唐蓝山集团总公司;Alcalase 2.4 L 碱性蛋白酶,诺维信(中国)生物技术有限公司;姜黄素、胃蛋白酶、胰蛋白酶、猪胆酸盐、尼罗蓝、尼罗红、1,1,3,3-四乙氧基丙烷,美国 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2　仪器与设备

Mastersize2000 型激光粒度分析仪,英国伍斯特郡马尔文仪器有限公司;F－4500 型荧光分光光度计,日本日立公司;722 型可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;THZ－80 型水浴恒温振荡器,天津常仪仪器设备有限公司;LGR20－W 型台式高速冷冻离心机,北京京立离心机有限公司;TCS SP8 型激光共聚焦显微镜,日本岛津制作公司。

1.3　方法

1.3.1　脂肪乳制备

参照文献[9]的方法,全脂大豆经挤压膨化后按照液料比 6 mL/g 进行水解,水浴 55℃恒温搅拌。用 2 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 9.0。通过 Alcalase 2.4 L 碱性蛋白酶(质量分数 1.5%)酶解 90 min。随着酶解进行,每 9 min 加入固定量的姜黄素,使添加的姜黄素质量分数分别达到 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%。经中性条件下灭酶 5 min。冷却,室温(20℃)、9 000 r/min 条件下离心 20 min,分离得到负载姜黄素的膏状脂肪乳,记为 E0、E0.2、E0.4、E0.6、E0.8、E1.0。

1.3.2　脂肪乳微观结构观察

参照文献[10]的方法,采用激光共聚焦显微镜进行微观结构观察,激发光的波长分别是 488 nm 和 633 nm。样品稀释至 20 mg/mL。配制 1 mg/mL 的尼罗红染液和 10 mg/mL 的尼罗蓝染液(异丙醇作溶液),分别对油脂和蛋白染色,时间为 40 min。染色后的样品置于载玻片,盖上盖玻片密封。用 100 倍油镜采集样品图像。

1.3.3　脂肪乳粒径、电位分析

参照文献[11]的方法,采用马尔文激光粒度仪测定乳状液体积平均粒径及其分布情况,将乳状液用去离子水稀释 1 000 倍,充分振荡,颗粒折射率为 1.520,分散剂折射率为 1.333,操作温度为 25℃。电位测定前采用蒸馏水将不同姜黄素添加量的脂肪乳稀释 1 000 倍,混匀。稀释后的样品置于 Zeta 池中。平衡 120 s 后,在 25℃下测定电位,每个样品重复 3 次测量。

1.3.4 乳化活性及乳化稳定性

乳化活性及乳化稳定性的测定参照文献[12]的方法加以修改。将不同姜黄素添加量的脂肪乳用 0.1% SDS(十二烷基硫酸钠)溶液稀释到确定倍数,在波长 532 nm 处用紫外分光光度计测定吸光度,计算乳化活性指数(EAI)。静置 30 min 后测定吸光度,计算乳化稳定性指数(ESI),公式分别为

$$E = 2 \times 2.303 \frac{A_0 N}{10\,000 C\varphi} \tag{1}$$

$$S = \frac{30 A_0}{A_0 - A_{30}} \tag{2}$$

式中 E——乳化活性指数,m^2/g

S——乳化稳定性指数,min

N——稀释倍数,取 250

C——乳化液形成前蛋白质水溶液中蛋白质质量浓度,g/mL

φ——乳化液中油相体积分数,%

A_0——0 min 时的吸光度

A_{30}——30 min 时的吸光度

1.3.5 氧化稳定性

(1)POV 值

参照文献[13]的方法,采用硫氰化铁法测定过氧化值(POV 值),脂肪乳氢过氧化物含量的测定是将样品置于 45℃干燥箱中加速氧化,并于 0、3、5、7、14、21 d 取出分装小样进行氧化实验的测定,以不添加乳液的一组为对照。

(2)TBARS 值

次级氧化产物——丙二醛含量的测定采用硫代巴比妥酸反应物(TBARS)法,由文献[14]的方法稍作改动。将 2 mL 样品和 4 mL 硫代巴比妥酸试剂混合于试管中,混匀后沸水浴加热 15 min,冷却至室温,4 000 r/min 离心 20 min,经 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤,测定上清液在 532 nm 波长处的吸光度。样品中 TBARS 值可以通过 1,1,3,3-四乙氧基丙烷标准曲线计算。

1.3.6 荧光光谱分析

脂肪乳的荧光光谱分析根据文献[15]方法并进行了修改,将脂肪乳用 PBS(10 mol/L 磷酸盐缓冲液、pH 值 7.0)稀释至蛋白质质量浓度为 0.15 mg/mL,涡旋混合 20 s 后采用 F-4500 型荧光分光光度计测定荧光图谱。设置激发波长为 295 nm,发射波长为 300 ~ 500 nm,狭缝宽度均为 5 nm,重复 3 次实验。

1.3.7 姜黄素包埋率

测定包埋率需对不同姜黄素添加量的脂肪乳总姜黄素含量和表面姜黄素含量进行定量,本文分别对储存第 0 天、第 7 天、第 14 天的脂肪乳姜黄素包埋率进行测定。绘制标准曲线($R^2 > 0.999$),并计算对应姜黄素含量。

根据文献[16]进行修改,测定脂肪乳中姜黄素包埋率:将定量脂肪乳分散在 DMSO(二甲基亚砜)中,并涡旋振荡 2 min,静置后在 432 nm 处测定吸光度,根据姜黄素标准曲线计算出姜黄素的浓度和样品的表面姜黄素含量。取适量脂肪乳溶解在 DMSO 中,涡旋振荡 2 min,在 60 W 条件下超声振荡萃取 10 min 后,以 5 000 r/min 离心 5 min。收集上清液,洗涤沉淀 3 次。收集洗涤清液在 432 nm 处测定吸光度。根据姜黄素标准曲线计算出样品中总姜黄素含量。脂肪乳的姜黄素包埋率计算公式为

$$E' = \left(1 - \frac{C_0}{C'}\right) \times 100\% \tag{3}$$

式中 E'——样品的姜黄素包埋率,%

C_0——表面姜黄素质量浓度,mg/mL

C'——总姜黄素质量浓度,mg/mL

1.3.8 体外模拟消化分析

参照文献[17]的方法,使用胃蛋白酶和胰蛋白酶对脂肪乳进行胃肠消化模拟。用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L、pH 值 7.0)稀释样品至所需倍数,与模拟胃液(SGF)以体积比 1∶1 混合,并使用 1 mol/L HCl 将 pH 值调节至 3.0,在消化混合物中加入胃蛋白酶使之活性达到 2 000 U/mL,将混合物在水浴振荡器(37℃、120 r/min)中反应 2 h。SGF 消化 2 h 后,取出胃消化样品与模拟肠液以体积比 1∶1 混合,用 1 mol/L NaOH 将 pH 值增加至 7.0,添加胰蛋白酶(活性为 100 U/mL),混合物在相同条件下孵育 2 h。调节体系 pH 值使之始终为 6.9 ~ 7.0。分别收集胃消化和肠消化后消化样品,以测定在体外消化后粒径和姜黄素生物利用率。

1.3.9 姜黄素生物利用率

参照文献[1]的方法,测定经体外模拟胃肠消化后的样品中姜黄素含量来计算姜黄素生物利用率。分别取适量胃消化和肠消化结束后的消化液于 4℃用 5 000 r/min 低温离心 10 min 后取清液层。利用紫外分光光度法,测定姜黄素浓度,根据标准曲线分别计算出胃、肠消化后清液层的姜黄素含量。脂肪乳中姜黄素的生物利用率计算公式为

$$Y = \left(1 - \frac{C_1}{C_2}\right) \times 100\% \tag{4}$$

式中 Y——姜黄素生物利用率,%

C_1——清液层中姜黄素质量浓度,mg/mL

C_2——消化前样品中姜黄素质量浓度,mg/mL

1.3.10　数据统计及分析

所有数据均为 3 次重复试验结果，表示为平均值 ± 标准差。采用 Origin 2019 软件进行图表绘制，SPSS 23.0 用于数据分析，显著性水平为 $P<0.05$。

2　结果与讨论

2.1　脂肪乳微观结构观察

激光共聚焦显微镜可观察乳液中油脂和蛋白的分布情况，形成 O/W 乳液后可观察到圆形液滴，如图 1 所示。结果表明，添加姜黄素后，脂肪乳液滴变小。添加量为 0.6% 时，乳液中油滴和蛋白分布比较均匀，且蛋白包裹在油滴外侧，信号较强。姜黄素添加量在 0.8% 和 1.0% 时，脂肪乳平均液滴大小没有显著变化，但液滴分布不均匀，少量的油滴变大，游离在外侧，可能的原因是蛋白有少量聚集或吸附到乳液界面，影响乳液界面蛋白油脂分布情况。文献[18]的研究结果表明，蛋白质分子之间的疏水相互作用导致其他蛋白质（在水相中未吸附的）迁移到 O/W 界面，影响乳液界面组成。

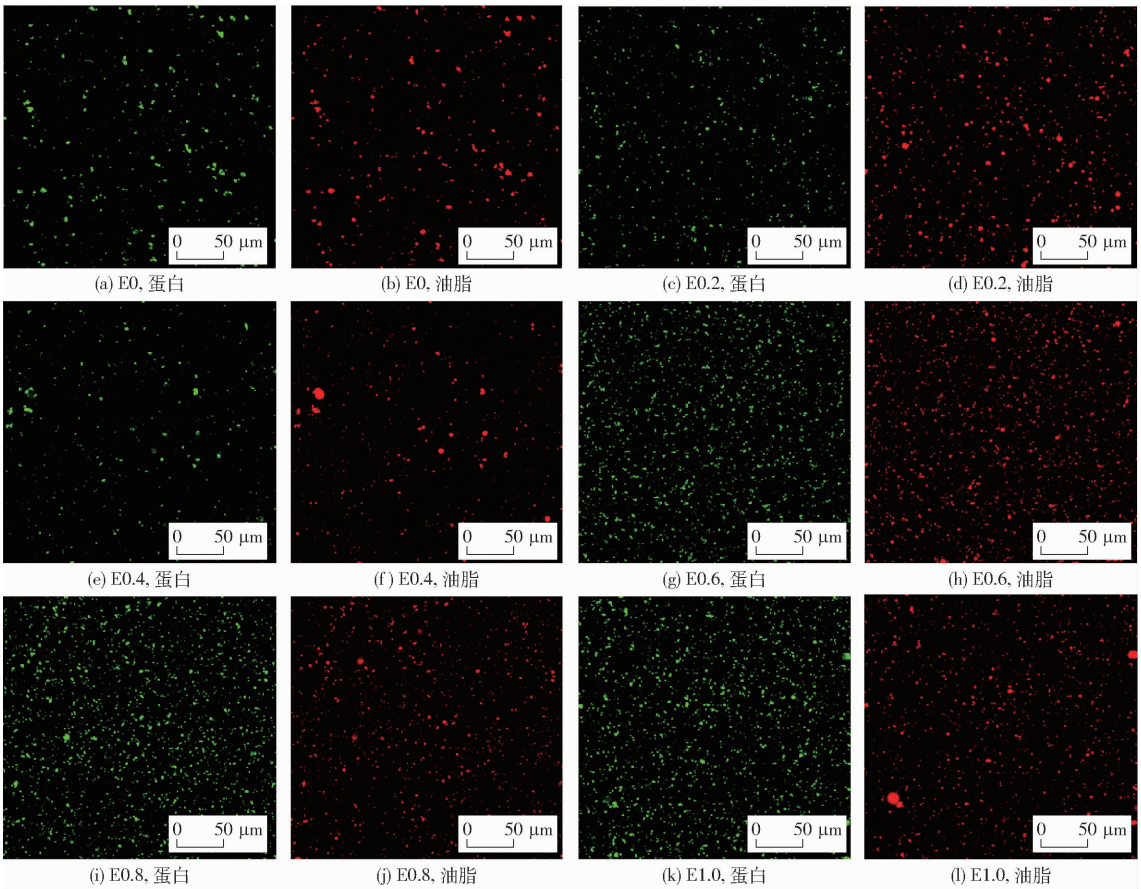

图 1　不同姜黄素添加量脂肪乳的激光共聚焦显微镜图像（CLSM）

Fig. 1　CLSM figures of fat-emulsions loading curcumin at different concentrations

2.2　脂肪乳粒径、电位分析

流体动力学半径分布是评价乳液稳定性的重要指标，可以直观地评价液滴的分散状态。本文利用动态光散射技术探究不同姜黄素添加量下脂肪乳液滴分布情况及体积平均粒径 $D_{4,3}$。酶法辅助制备的大豆脂肪乳粒径分布如图 2a 所示。结果表明，脂肪乳粒径主要呈现单峰分布，分布较为均匀。从图 2b（图中不同字母表示数据之间差异显著（$P<0.05$））可知，未添加姜黄素的脂肪乳粒径最大，添加姜黄素后，随添加量的增加，粒径逐渐增大，这可能是因为在油相中所含的姜黄素导致乳液粒径变大[19]。同时，在添加量为 0.6% 时脂肪乳平均粒径显著增加，达到 1 127.42 nm。此添加量下峰宽较窄，表明此时脂肪乳中颗粒大小均匀。姜黄素添加量 0.8% 和 1.0% 的脂肪乳平均粒径增加不显著，分别为 1 145.29 nm 和 1 159.23 nm，峰宽较大，脂肪乳颗粒大小不均一。文献[19]的研究也发现，包埋姜黄素的乳液粒径随着姜黄素含量的增加而增加，达到一定浓度时乳液平均粒径逐渐趋于稳定。

电位绝对值可间接评价乳液的稳定程度。由图 2c可知，在添加姜黄素后，电位绝对值随着姜黄素添加量增加先增加再减小。其中，在添加量为 0.6% 时达到 38.67 mV，此时乳液分子间静电斥力较大，更易保持结构稳定[20]。

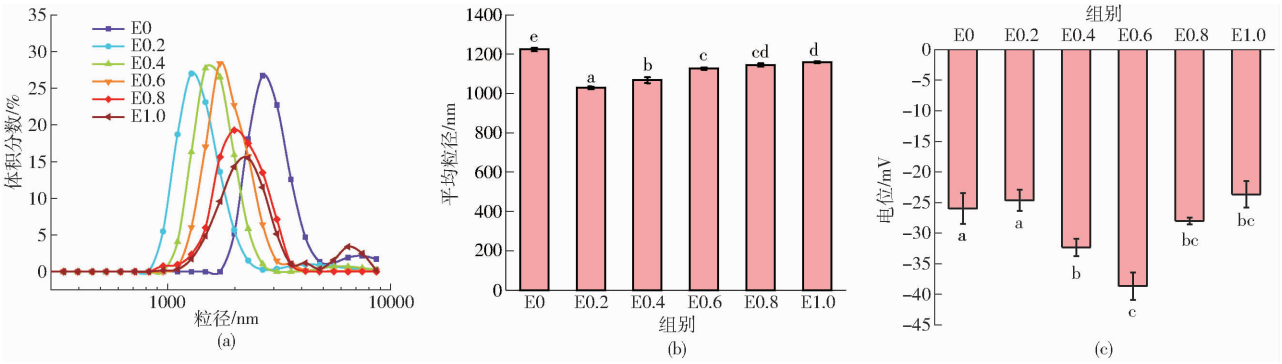

图 2 不同姜黄素添加量脂肪乳的流体动力学半径分布情况、平均粒径和电位

Fig. 2 Droplet diameter distributions and Zeta potential of fat-emulsions with curcumin at different concentrations

2.3 乳化活性及乳化稳定性

乳化活性及乳化稳定性可评价乳液的乳化性能[21]，结果表明，由于蛋白（多肽）和磷脂的共存体系作为乳化剂形成的液滴较稳定，利用酶辅助法制备大豆脂肪乳的乳化稳定性较高。如图 3（图中不同大写字母表示脂肪乳乳化活性指数之间差异显著（$P<0.05$），不同小写字母表示脂肪乳乳化稳定性指数之间差异显著（$P<0.05$））所示，随着姜黄素添加量的增加，乳化活性指数和乳化稳定性指数均呈显著降低的趋势，可能的原因是加入姜黄素会对乳化剂吸附到 O/W 界面的能力产生负面影响。在添加量为 0.6% 时，EAI 和 ESI 分别为 92.39 m^2/g 和 189.54 min，当添加量在 0.8% 和 1.0% 时乳化稳定性指数和乳化活性指数有显著降低（$P<0.05$），表明添加过多的姜黄素会影响乳液的乳化性能，可能的原因是其他蛋白质迁移到 O/W 界面，与 CLSM 观察到的现象相吻合。文献[22]指出，在弱酸性或接近中性 pH 值条件下，过量蛋白质吸附在界面层会导致乳化活性的降低。

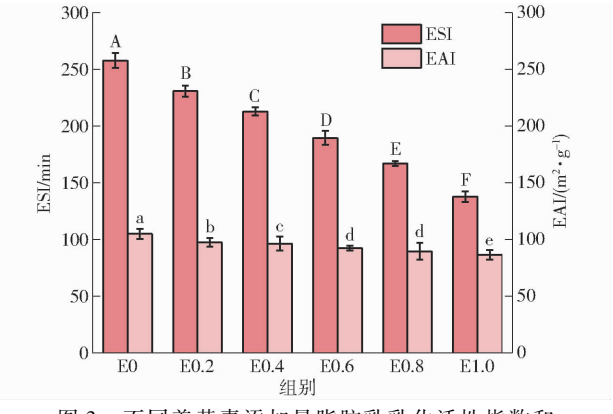

图 3 不同姜黄素添加量脂肪乳乳化活性指数和乳化稳定性指数

Fig. 3 EAI and ESI of fat-emulsions loading curcumin at different concentrations

2.4 氧化稳定性分析

本文采用测定乳液在 45℃ 干燥箱中经 0、3、5、7、14、21 d 储存后的氧化产物含量来评价不同姜黄素添加量脂肪乳的氧化稳定性，分别测定了脂肪乳的初级氧化产物含量（POV 值）和次级氧化产物含量（TBARS 值）。

由图 4a 可知，所有样品在第 0 天至第 7 天时的 POV 值没有显著增加，且不同姜黄素添加量的脂肪乳之间没有显著差异。第 7 天后，所有样品 POV 值显著增加，第 14 天添加姜黄素 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 和 1.0% 的乳液 POV 值分别增加至 6.215、5.56、3.99、3.15、2.71、3.05 mmol/kg。添加量为 0.6% 的脂肪乳在第 14 天时的 POV 值较低，仅为 3.15 mmol/kg，表明此条件下脂肪乳稳定性好，氧化产物较少，不易受到氧气的破坏。姜黄素添加量达到 0.8% 和 1.0% 时与 0.6% 样品相比 POV 值差异不显著，表明较高姜黄素添加量脂肪乳氧化程度均较低，且随着储藏时间增加，受到姜黄素添加量的

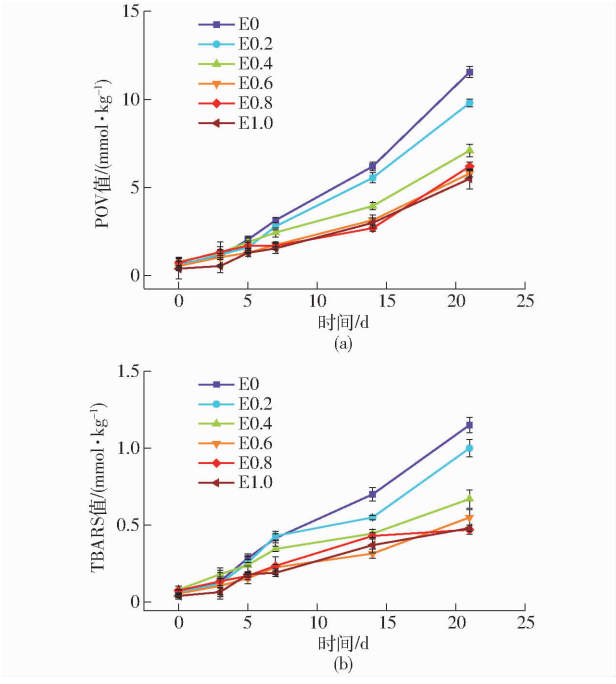

图 4 不同姜黄素添加量脂肪乳 POV 值和 TBARS 值

Fig. 4 POV values and TBARS values of fat-emulsions loading curcumin at different concentrations

影响较小。

次级氧化产物丙二醛生成物(TBARS 值)的结果如图 4b 所示，在氧化初期所有样品的 TBARS 值没有显著差异。在经过 7 d 后，部分初级氧化产物转化为次级氧化产物，乳液的 TBARS 值有所增加，但均不超过 0.50 mmol/kg。文献[23]采用高速剪切制备姜黄素 MCT/Pickering 乳剂，在第 7 天的 TBARS 值约为 0.65 mmol/kg，由此可见，酶法辅助制备的大豆姜黄素乳液具有较传统高速剪切制备的乳液更好的氧化稳定性。酶法辅助制备过程中蛋白质(多肽)吸附在油滴表面后形成一层黏弹性蛋白膜，可以有效阻止脂质氧化的引发剂扩散到油滴内部，同时限制水相中的过渡金属与油相相互作用，从而起到抑制油脂氧化的作用[13]。脂肪乳 E0、E0.2、E0.4、E0.6、E0.8 和 E1.0 在第 14 天的 TBARS 值分别增加至 0.70、0.55、0.45、0.32、0.43、0.37 mmol/kg，表明在姜黄素添加量较少时，乳液的氧化稳定性受到姜黄素添加量的影响，且添加量为 0.6% 的脂肪乳 TBARS 值最低，与 POV 值的结果一致。在储存 21 d 时，姜黄素添加量为 0.6% 脂肪乳的 TBARS 值仅为 0.56 mmol/kg，产生较少的次级氧化产物。当姜黄素添加量在 0.6% 以上时，脂肪乳的 TBARS 值没有明显变化，表明过多的姜黄素添加量不会显著抑制脂肪乳的次级氧化产物的生成。

2.5　荧光光谱分析

脂肪乳外层水相中的大豆蛋白含有疏水性氨基酸残基(色氨酸和酪氨酸)，是蛋白质的主要荧光基团，蛋白质具有的内源荧光对疏水性的色氨酸和酪氨酸极性变化敏感[24]。本研究测定了姜黄素添加量在 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 和 1.0% 的脂肪乳内源荧光光谱。

如图 5 所示，脂肪乳水相中的大豆蛋白在发射波长 332 nm 处具有最大荧光强度，说明色氨酸所处的微环境具有较高的疏水性。由图 5 可知，未添加姜黄素的脂肪乳荧光强度达到 3 300.32，加入姜黄素后，E0.2、E0.4 和 E0.6 的最大荧光强度分别为 2 880.85、2 514.10 和 2 013.24，表明姜黄素的添加使蛋白质的色氨酸微环境疏水性增加，此时荧光强度稍有降低。然而，姜黄素添加量增加至 0.8% 和 1.0% 时，脂肪乳水相中的蛋白质最大荧光强度显著降低至 1 787.17 和 1 710.64，表明姜黄素含量的增加使大豆蛋白发生内源荧光猝灭现象。文献[25]的研究结果表明，荧光光谱显示蛋白质和酚类物质的相互作用可导致荧光猝灭。同样地，文献[26]的研究表明，姜黄素添加量的增加会促进大豆蛋白与姜黄素的相互作用，发生静态荧光淬灭。因此，在姜黄素添加量大于 0.6% 时，未包埋在油相中的游离姜黄素可能会在酶法制备脂肪乳的过程中与大豆蛋白通过非共价作用相结合，从而间接降低其包埋率和生物利用率。

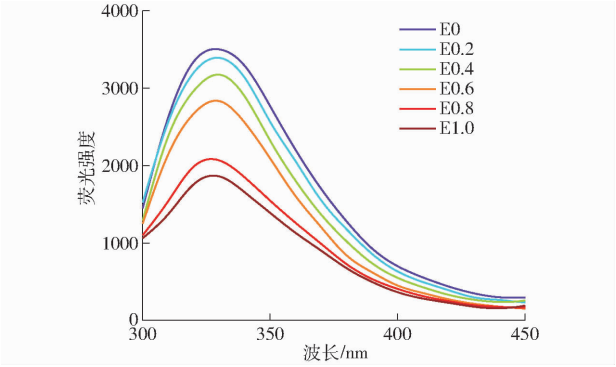

图 5　不同姜黄素添加量脂肪乳的荧光光谱

Fig. 5　Fluorescence spectrum of fat-emulsions loading curcumin at different concentrations

2.6　姜黄素包埋率

姜黄素的包埋率以及生物利用率是乳液作为生物活性物质递送体系的关键评价指标。姜黄素的包埋率会随着乳液的凝聚、聚集和氧化分解等因素发生变化。本研究测定了不同姜黄素添加量脂肪乳储存第 0 天、第 7 天、第 14 天的姜黄素包埋率，如图 6(图中不同大写字母表示不同姜黄素添加量乳液原始包埋率之间的差异显著($P<0.05$)，不同小写字母表示储存过程中姜黄素包埋率之间的差异显著($P<0.05$))所示。

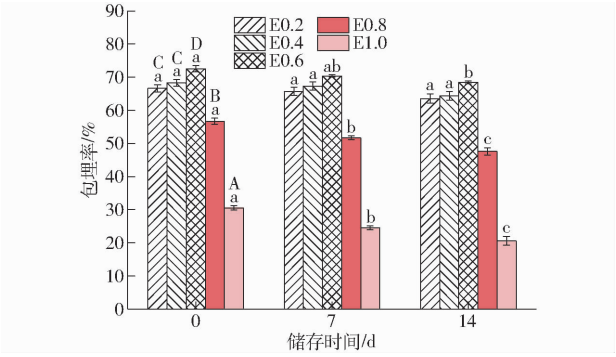

图 6　不同姜黄素添加量脂肪乳在储存过程中的姜黄素包埋率

Fig. 6　Encapsulation efficiency of fat-emulsions loading curcumin at different concentrations during storage

结果表明，原始(第 0 天)乳液 E0.2、E0.4 和 E0.6 的姜黄素包埋率分别为 66.62%、68.30% 和 72.58%，表明酶法辅助制备的大豆脂肪乳可以较好地负载姜黄素，且随着姜黄素的增加，包埋率增大。文献[27]中开发了用于包裹姜黄素的羧甲基玉米醇溶蛋白纳米粒子，包埋率为 66.70%，可见酶法制备的大豆脂肪乳相较于传统纳米乳液体系有较高的包埋率。然而，当继续添加姜黄素至添加量 0.8%

和 1.0%时,姜黄素包埋率显著降低至 56.70% 和 30.54%,表明过量添加姜黄素并不会使姜黄素包埋率增加,反而会对包埋效果产生较大负面影响。可能的原因是制备的大豆脂肪乳中蛋白和磷脂吸附的界面层十分稳定,过量的游离姜黄素无法进入并包埋在乳液的油相中。文献[28]中表示,不同的芯壁比在固定的乳化体系中会造成表面电荷的变化,从而影响乳化体系中颗粒的大小和分布,间接影响包埋率和稳定性,并推测在芯壁比增加到某一值后,乳化体系固定且表面电荷的变化不明显。

在乳液储存第 7 天时,E0.2、E0.4 和 E0.6 的姜黄素包埋率由 66.62%、68.30% 和 72.58% 下降到 65.87%、67.23% 和 70.34%,并没有大幅度降低,表明此时乳液发生了轻微的氧化,间接影响了对姜黄素的包埋效果。而姜黄素添加量为 0.8% 和 1.0% 的乳液包埋率有显著降低,可能的原因是在贮存过程中,脂肪乳内部有少量姜黄素暴露于乳液表面,且游离姜黄素随添加量的增加而增多,导致包埋率有显著降低。

当储存第 14 天时,E0.2、E0.4 和 E0.6 的姜黄素包埋率分别为 63.56%、64.37% 和 68.45%,没有显著降低,且总体姜黄素包埋率均在 60% 以上;E0.8 和 E1.0 的姜黄素包埋率分别降低至 47.61% 和 20.60%,表明随着储存时间的增加乳液发生的聚集、凝聚和氧化分解使姜黄素的包埋率显著降低。因此,当姜黄素添加量大于 0.6% 时,添加过量姜黄素的脂肪乳不能在储存第 14 天后保留更多的姜黄素,反而会降低脂肪乳对姜黄素的保护作用。文献[29]的研究表明,大豆蛋白-姜黄素-大豆多糖复合物中在 20 h 后有 56% ~ 60% 的姜黄素释放。同样地,文献[30]报道了随着储存时间的延长,姜黄素在蛋白质水解产物纳米乳剂中的流失率达到 36.26% ~44.66%。对比可知,在姜黄素添加量合适的情况下,酶法辅助制备的大豆脂肪乳相比常规的姜黄素负载方法有较好的包埋效果。

2.7 姜黄素生物利用率

生物利用率可衡量乳液运载体系经胃肠消化后的递送效果,生物活性物质会不断在胰脂肪酶和猪胆酸盐作用下水解,并被载入到由胆盐和脂肪酸组成的混合胶束中,进而被小肠上皮细胞吸收[31]。因此可以通过测定胶束中姜黄素的浓度得到生物利用率。本文测定了不同姜黄素添加量脂肪乳在胃肠消化后的姜黄素生物利用率。由表 1 可知,姜黄素在胃肠消化后的生物利用率与脂肪乳粒径呈负相关。

表 1 不同姜黄素添加量脂肪乳经胃肠消化后的粒径、生物利用率

Tab.1 Particle size and bioavailability of fat-emulsions loading curcumin at different concentrations after GIF digestion

组别	胃消化		肠消化	
	粒径/nm	生物利用率/%	粒径/nm	生物利用率/%
游离姜黄素		(42.73 ± 0.56)^{a}		(38.53 ± 0.72)^{d}
E0.2	(1 430.40 ± 8.19)^{a}	(23.23 ± 0.47)^{b}	(936.54 ± 11.13)^{a}	(59.35 ± 0.58)^{a}
E0.4	(1 487.85 ± 8.52)^{b}	(17.16 ± 0.54)^{b}	(943.56 ± 17.67)^{b}	(59.13 ± 0.50)^{a}
E0.6	(1 587.00 ± 13.33)^{c}	(9.05 ± 0.52)^{d}	(1 144.44 ± 2.65)^{c}	(55.22 ± 0.62)^{b}
E0.8	(1 594.80 ± 18.00)^{c}	(8.62 ± 0.38)^{d}	(1 329.12 ± 7.42)^{c}	(48.34 ± 0.95)^{c}
E1.0	(1 466.40 ± 8.06)^{a}	(14.76 ± 1.02)^{c}	(1 341.00 ± 12.73)^{a}	(48.69 ± 0.69)^{c}

注:同列数据不同字母表示差异显著(P <0.05)。

经 SGF 消化 2 h 后,胃蛋白酶水解诱导疏水域的暴露,这可能导致脂肪乳聚集,平均液滴大小显著增加[3]。未经脂肪乳包裹的姜黄素释放消化了 42.73%,E0.2、E0.4 和 E1.0 分别消化了 23.23%、17.16% 和 14.76% 的姜黄素,表明经过脂肪乳包埋的姜黄素释放量显著降低。E0.6 仅消化利用了 9.05% 的姜黄素,表明此姜黄素添加量可以将姜黄素在胃消化液中的释放控制在较低水平。文献[32]提出,当在 pH 值 7.2 的 PBS 中孵育时,超过 30% 的游离姜黄素仅需 30 min 即可降解。

经 SIF(模拟肠液)孵育 4 h,胰蛋白酶分解了来自胃消化液的大液滴导致粒径减小。游离姜黄素在肠液中的生物利用率较低,仅为 38.53%,而脂肪乳中的姜黄素利用率显著增加,E0.2、E0.4、E0.6、E0.8 和 E1.0 分别消化利用了剩余的 59.35%、59.13%、55.22%、48.34% 和 48.69% 的姜黄素,表明经肠道消化液中胰蛋白酶的作用打破了原有的乳液结构,消化了油相中的姜黄素。文献[33]的研究结果也表明,蛋白质水解产物乳化剂可以显著促进姜黄素在纳米乳液中的释放,生物利用率达到 53.24%。综合胃肠消化情况,姜黄素添加量在 0.6% 时,酶法制备的新型大豆脂肪乳可以较好地包埋姜黄素,且在 SGF 消化液中有较低的释放量,在

SIF 中有较大的生物利用率，表明该包封达到了控制释放的效果。

3　结束语

以膨化大豆为原料，利用酶法辅助制备了姜黄素添加量 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的脂肪乳。研究表明，添加姜黄素的脂肪乳粒径随着姜黄素含量增加而增大，添加量达到 0.6% 时乳液粒径不再显著增加，此时电位绝对值最大。乳液在姜黄素添加量达到 0.6% 时，乳液蛋白包裹油滴外侧，没有游离的油滴，此时脂肪乳的乳化稳定性和乳化活性较高。姜黄素的添加会降低脂肪乳的氧化程度，在添加量大于 0.6% 时对脂肪乳的氧化程度影响微弱。荧光光谱结果表明，添加过量姜黄素会使未包埋的姜黄素以游离状态与大豆蛋白结合，发生荧光淬灭，导致包埋率和生物利用率降低。在添加量为 0.6% 时，脂肪乳对姜黄素的包埋率高达 72.58%，高于传统纳米乳液。体外消化实验表明，酶法辅助制备的姜黄素脂肪乳运载体系具有高效的缓释效果。因此，酶法辅助制备的大豆脂肪乳构建的姜黄素运载体系可实现对姜黄素更好的包埋及利用，具有广阔的应用前景。

参　考　文　献

[1] 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, 2020, 131:109663.

[2] AHMEND K, LI Y, MCCLEMENTS D J, et al. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties [J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 799 - 807.

[3] YANG Q Q, SUI Z Q, LV W, et al. Soybean lecithin-stabilized oil-in-water (O/W) emulsions increase the stability and in vitro bioaccessibility of bioactive nutrients [J]. Food Chemistry, 2020, 338:128071.

[4] ZHAI Z L, YE S F, YAN X Y, et al. Ultra-stable soybean oil-in-water emulsions stabilized by a polymeric surfactant derived from soybean oil [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 160:113093.

[5] 李晓锋. 载药脂肪乳的制备与质量评价[J]. 华西药学杂志, 2019,34(5): 98 - 103.
LI Xiaofeng. Preparation and quality evaluation of drug-loaded fat emulsion[J]. West China Journal Pharmaceutical Sciences, 2019,34(5): 98 - 103. (in Chinese)

[6] 唐顺之, 牛亚伟, 关伟键, 等. 不同磷脂成分的研究及其乳化能力的比较[J]. 食品科技, 2019, 44(3): 266 - 271.
TANG Shunzhi, NIU Yawei, GUAN Weijian, et al. Comparison of the composition and emulsifying ability of different phospholipids[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(3): 266 - 271. (in Chinese)

[7] MA P, ZENG Q H, TAI K D, et al. Preparation of curcumin-loaded emulsion using high pressure homogenization: impact of oil phase and concentration on physicochemical stability [J]. LWT—Food Science and Technology, 2017, 84(2):34 - 46.

[8] IMURA T, NAKAYAMA M, TAIRA T, et al. Interfacial and emulsifying properties of soybean peptides with different degrees of hydrolysis [J]. Journal of Oleo Science, 2015, 64(2): 183 - 189.

[9] LI Y, SUI X N, QI B K, et al. Optimization of ethanol-ultrasound-assisted destabilization of a cream recovered from enzymatic extraction of soybean oil [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2014,91(1):159 - 168.

[10] 王喜波, 于洁, 王小丹, 等. 基于美拉德反应的酶改性大豆蛋白冻融稳定性研究[J/OL]. 农业机械学报, 2018, 49(5): 361 - 367.
WANG Xibo, YU Jie, WANG Xiaodan, et al. Investigation on freeze-thaw stability of soy protein via enzymatic modification based on Maillard reaction[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2018,49(5):361 - 367. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? flag=1&file_no=20180543&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.05.043. (in Chinese)

[11] TANG C H, CHOI S M, MA C Y. Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 40(2): 96 - 104.

[12] 江连洲, 佟晓红, 刘宝华, 等. 酶种类对生物解离大豆蛋白酶解物功能性和苦味的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2018, 49(8): 368 - 374.
JIANG Lianzhou, TONG Xiaohong, LIU Baohua, et al. Effect of enzymatic species on function and bitterness of enzyme-assisted aqueous extraction soybean protein hydrolysates [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2018,49(8):368 - 374. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? flag=1&file_no=20180844&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.08.044. (in Chinese)

[13] SHAO Y, TANG C H. Characteristics and oxidative stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions: influence of ionic strength and heat pretreatment [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 37(3): 149 - 158.

[14] 刘竞男, 徐晔晔, 王一贺, 等. 高压均质对大豆分离蛋白乳液流变学特性和氧化稳定性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 80 - 85.
LIU Jingnan, XU Yeye, WANG Yihe, et al. Effect of high pressure homogenization on rheological properties and oxidation stability of soy protein isolate-stabilized emulsion[J]. Food Science, 2020, 41(1): 80 - 85. (in Chinese)

[15] 田甜, 江中洋, 王中江, 等. 射流空化对大豆分离蛋白-磷脂酰胆碱乳化特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(3): 99 - 105.
TIAN Tian, JIANG Zhongyang, WANG Zhongjiang, et al. Effect of jet cavitation on soy protein isolate-phosphatidylcholine emulsion properties[J]. Food Science, 2020, 41(3): 99 - 105. (in Chinese)

[16] KHARAT M, DU Z Y, ZHANG G D, et al. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: impact of pH, temperature, and molecular environment [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2017, 65(8): 1525 - 1532.

[17] MENG R, WU Z Z, XIE Q T, et al. Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties [J]. Food Chemistry, 2020, 340:127893.

[18] WANG Y H, WANG J M, WAN Z L, et al. Corn protein hydrolysate as a new structural modifier for soybean protein isolate based O/W emulsions [J]. LWT—Food Science and Technology, 2019, 118(11):108763.

[19] 王春颖. 蛋清蛋白高内相皮克林乳液的制备及其包埋姜黄素的性能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020: 36 - 37.
WANG Chunying. Preparation of high internal phase pickering emulsion stabilized by egg white protein and its properties of eembedding curcumin[D]. Changchun:Jilin University, 2020: 36 - 37. (in Chinese)

[20] 江连洲,温家煜,王禹涵,等. SPI 凝胶颗粒制备及其 Pickering 高内相乳液特性研究[J/OL]. 农业机械学报, 2020, 51(12):348 - 355.
JIANG Lianzhou, WEN Jiayu, WANG Yuhan, et al. Fabrication and characterization of high internal phase pickering emulsion manipulated by gel particles of soy protein[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(12):348 - 355. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? flag = 1&file_no = 20201238&journal_id = jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2020.12.038. (in Chinese)

[21] 王喜波, 徐晔晔, 于洁, 等. 高压均质对大豆蛋白柔性和乳化性的影响及相关性分析[J/OL]. 农业机械学报, 2018, 49(6): 362 - 367.
WANG Xibo, XU Yeye, YU Jie, et al. Effect of high pressure homogenization on flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate and correlation analysis[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(6): 362 - 367. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? flag = 1&file_no = 20180643&journal_id = jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.06.043. (in Chinese)

[22] TORREZAN R, THAM W P, BELL A E, et al. Effects of high pressure on functional properties of soy protein [J]. Food Chemistry, 2007, 104(1): 140 - 147.

[23] ZHAO Q, WU C, YU C, et al. High stability of bilayer nano-emulsions fabricated by Tween 20 and specific interfacial peptides [J]. Food Chemistry, 2020, 340:127877.

[24] 王丹丹, 毛晓英, 孙领鸽, 等. 氢过氧化物氧化对核桃蛋白结构和乳化特性的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 66 - 74.
WAN Dandan, MAO Xiaoying, SUN Lingge, et al. Effects of oxidation by hydrogen peroxide on the structure and emulsifing properties of walnut protein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(12): 66 - 74. (in Chinese)

[25] 袁婷兰, 朱雯婷, 陈先鑫, 等. 木犀草素-乳清蛋白复合物对乳液物理稳定性和氧化稳定性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 1 - 6.
YUAN Tinglan, ZHU Wenting, CHEN Xianxin, et al. Effect of whey protein - luteolin complexes on physical and oxidative stability of emulsions[J]. Food Science, 2018, 39(9): 1 - 6. (in Chinese)

[26] 冯芳, 蔡豪亮, 刘文豪, 等. 姜黄素与大豆蛋白的结合性及相互作用机制研究[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(3): 537 - 546.
FENG Fang, CAI Haoliang, LIU Wenhao, et al. Study on the complexation and interaction mechanism of curcumin with soybean proteins[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2020, 43(3): 537 - 546. (in Chinese)

[27] YU Y B, WU M Y, WANG C, et al. Constructing biocompatible carboxylic curdlan-coated zein nanoparticles for curcumin encapsulation [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108:106028.

[28] 何庆燕, 陈秋妹, 洪永祥, 等. 鸡肉-芸豆异源蛋白交联包埋姜黄素的研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(8): 178 - 183.
HE Qingyan, CHEN Qiumei, HONG Yongxiang, et al. Studies on encapsulation of curcumin with chicken/kidney bean heterologous proteins cross-linking[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(8): 178 - 183. (in Chinese)

[29] 陈飞平. 大豆蛋白作为姜黄素纳米输送载体的途径及机理[D]. 广州: 华南理工大学, 2017: 49 - 50.
CHEN Feiping. Soy protein as a nanocarrier for curcumin and the possible mechanisms involved[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017: 49 - 50. (in Chinese)

[30] 韦翠兰. 大豆肽-姜黄素纳米颗粒的构建及其微囊化的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019: 38 - 39.
WEI Cuilan. Study on construction of soybean peptide - curcumin nanoparticles and its microencapsulation[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019: 38 - 39. (in Chinese)

[31] 王中江, 张潇元, 车佳玲, 等. 薄荷油纳米乳液消化规律与稳定性研究[J/OL]. 农业机械学报, 2018, 49(10): 381 - 386,426.
WANG Zhongjiang, ZHANG Xiaoyuan, CHE Jialing, et al. Investigation on digestion law and stability of peppermint oil nanoemulsion[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(10):381 - 386, 426. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? file_no = 20181044&flag = 1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.10.044. (in Chinese)

[32] WANG Y J, AN M H, CHENG A L, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997, 15(12): 1867 - 1876.

[33] JIN H, LIU C, ZHANG S Y, et al. Comparison of protein hydrolysates against their native counterparts in terms of structural and antioxidant properties, and when used as emulsifiers for curcumin nanoemulsions [J]. Food & Function, 2020, 11(11): 10205 - 10218.