

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2019.02.039

EGCG对 β -胡萝卜素乳液物理稳定性的影响

刘蕾¹ 陈历水¹ 马莺² 高彦祥³

(1. 中粮营养健康研究院有限公司品牌食品研发中心, 北京 102209; 2. 哈尔滨工业大学化工与化学学院, 哈尔滨 150090;
3. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 以 β -胡萝卜素为芯材, 利用 α -乳白蛋白(α -LA)为乳化剂制备了不同pH值的乳液, 并利用表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)作为抗氧化剂添加到乳液中, 测定了乳液的粒径、电位、包埋率、快速稳定性、界面蛋白含量, 考察了pH值和EGCG添加量对 β -胡萝卜素乳液物理稳定性的影响, 并对稳定性机理进行了研究。结果表明: EGCG添加量对pH值2.0和pH值7.0的乳液粒径、电位和包埋率没有显著影响($p > 0.05$), 但对不同pH值乳液的快速稳定性影响显著($p < 0.05$)。在pH值2.0的乳液中, 当EGCG添加量大于0.2%时, 随着EGCG添加量的增加, 乳液稳定性下降; 在pH值7.0的乳液中, 当EGCG添加量小于0.02%时, 乳液的稳定性比未添加EGCG的乳液稳定性高; 当EGCG添加量在0.02%~0.10%时, 随着EGCG添加量的增大, 乳液稳定性降低。当EGCG添加量大于0.10%时, EGCG的添加使 β -胡萝卜素乳液快速分层, 不能得到稳定乳液, 原因是EGCG可以与 α -LA相互作用使 α -LA沉淀, 致使没有足够的 α -LA作为乳化剂稳定乳液。

关键词: β -胡萝卜素; 乳液; α -乳白蛋白; 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG); 稳定性

中图分类号: TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2019)02-0340-10

Effect of EGCG on Physical Stability of β -carotene Encapsulated in Oil-in-water Emulsions

LIU Lei¹ CHEN Lishui¹ MA Ying² GAO Yanxiang³

(1. Brand Food R&D Center, COFCO Nutrition and Health Research Institution, Beijing 102209, China

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

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

Abstract: β -Carotene is used in food industry as a precursor of vitamin A with potent antioxidant activity through singlet oxygen quenching and deactivation of free radicals. Nevertheless, their utilization as nutraceutical ingredients in food industry is currently limited because of their poor water-solubility, high melting point, chemical instability and low bioavailability. Emulsion-based systems are often a better choice for delivering bioactive lipids such as β -carotene into functional foods since the emulsion increases bioavailability. The physical properties of β -carotene emulsions were characterized, which were stabilized by α -lactalbumin (α -LA) at different pH values with (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as antioxidant. The particle size, zeta-potential, encapsulation rate, stability index and interfacial protein of the emulsions were measured. EGCG addition had no effect on particle size, zeta-potential and encapsulation rate of the emulsions, however, the addition of EGCG significantly influenced the physical stability of the emulsions. When the addition of EGCG was higher than 0.2% in the emulsions at pH value of 2.0, the physical stability was decreased with the increase of addition. The stability of emulsions at pH value of 7.0 was improved by the addition of EGCG in the range of 0.002 5% ~ 0.020 0%, however, the stability of the emulsions was decreased when the EGCG addition was within 0.02% ~ 0.10%. When the addition of EGCG was higher than 0.10%, the emulsions were separated into two phases quickly. In the mechanism study, the presence of EGCG changed the size and turbidity in α -LA solution when the addition was above 0.05%. Isothermal titration calorimetry (ITC) analysis implied that

收稿日期: 2018-08-21 修回日期: 2018-09-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31371835)

作者简介: 刘蕾(1987—), 女, 博士后, 主要从事功能食品研究, E-mail: liulei5@cofco.com

通信作者: 高彦祥(1961—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事功能食品研究, E-mail: drgyx@sina.com

EGCG can interact with α -LA, with about five EGCG molecules integrated with one α -LA molecule. β -carotene emulsions destabilized by EGCG addition (greater than 0.10%) may due to the interaction between EGCG and α -LA.

Key words: β -carotene; emulsion; α -lactalbumin; (–)-epigallocatechin-3-gallate; stability

0 引言

β -胡萝卜素是一种脂溶性类胡萝卜素,具有合成维生素A、猝灭单线态氧和使自由基失活等多种生物学功能。但由于 β -胡萝卜素在水中的溶解度低,熔点高,在光和热的环境中容易发生化学降解等性质限制了其在食品工业中的应用。利用水包油的乳液传递 β -胡萝卜素是一种成本较低,可以提高其水溶性、稳定性及生物利用率的方法^[1-2]。

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是茶叶茶多酚中含量最高同时抗氧化活性最强的物质。乳蛋白和茶多酚可以多种方式进行相互作用,形成的复合物对乳液的物理及化学稳定性都有一定的影响。RASHIDINEJAD等^[3]研究了EGCG对牛奶脂肪球稳定性的影响,实验中利用离心的方法将牛奶的脂肪球从牛奶中分离出来后溶解在缓冲溶液中,利用相同的缓冲溶液将EGCG加入只含有脂肪球的乳液中,EGCG显著改变了乳脂肪球的粒径和zeta-电位;并利用透射电镜和傅里叶红外光谱研究了EGCG和乳脂肪球膜的相互作用,结果表明,EGCG可以与乳脂肪球膜的疏水区和亲水区相互作用。DI MATTIA等^[4]将茶多酚加入以 β -乳球蛋白和吐温20为复合乳化剂的乳液中,结果表明,茶多酚可以结合到油水界面上,茶多酚添加量越多,界面张力越小,茶多酚使油滴粒径变大但并没有影响乳液中的油脂氧化。

本文在不同pH值的 β -胡萝卜素乳液中添加不同含量的EGCG,测定EGCG对乳液物理稳定性(粒径、电位、包埋率和快速稳定性)的影响。为研究EGCG对乳液稳定性的影响机理,同时测定界面蛋白含量、 α -乳白蛋白(α -LA)与EGCG混合溶液的浊度变化和热力学参数指标,以期EGCG作为抗氧化剂添加到 β -胡萝卜素乳液中提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

α -LA,购于美国Daisco公司,纯度95%以上;EGCG,购于北京北实纵横科技发展有限公司,纯度99.5%以上;中链三酸甘油酯(Medium chain triacylglycerol, MCT),购于奎斯特国际有限公司;30% β -胡萝卜素-MCT悬浮液,购于浙江医药有限

公司新昌制药厂;柠檬酸、磷酸氢二钠、正己烷、碳酸钠、磷酸、无水乙醇,购于北京化工厂,纯度99.5%以上;考马斯亮蓝试剂、叠氮化钠,购于美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

M-110型高压微射流均质机,美国Microfluidizer公司;Zatasizer Nano-ZS90型激光粒度仪,英国马尔文公司;HD-1型高速乳化均质机,北京华远航实验设备厂;UV-1800型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;TurbiscanLab Expert浓缩体系稳定性分析仪,法国Formulation公司;RC2-S型超高速离心机,美国Sorvall仪器公司;S22-2型恒温磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司;2100N型浊度计,美国HACH公司;Nano型等温滴定量热仪,美国TA公司。

1.3 方法

1.3.1 β -胡萝卜素乳液制备

将质量分数1.5%的 α -LA溶解于0.1 mol/L pH值2.0或pH值7.0的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液中,在室温(20℃)下搅拌4 h至 α -LA全部溶解,待用。将30%的 β -胡萝卜素-MCT悬浮液加热溶解于MCT中至其完全溶解待用,溶解方法参照XU等^[5]的方法,并做了一定的调整。

在高速剪切仪的搅拌下将溶解有 β -胡萝卜素的MCT缓慢加入 α -LA溶液中,12 000 r/min剪切10 min,形成粗乳液。将制备的粗乳液进一步通过微射流(82.7 MPa)均质,循环3次^[6]。由此制备的 β -胡萝卜素乳液(10%油相(含有0.5% β -胡萝卜素),1.5% α -LA)用于后续实验。

取制备好的 β -胡萝卜素乳液与不同浓度的EGCG缓冲溶液等质量混合。乳液中各组分的最终质量分数为:MCT 5%(其中含有0.5% β -胡萝卜素), α -LA 0.75%。pH值2.0乳液中EGCG添加量:0.002 5%、0.005 0%、0.010 0%、0.020 0%、0.050 0%、0.100 0%、0.200 0%、0.400 0%、0.500 0%;pH值7.0乳液中EGCG添加量:0.002 5%、0.005 0%、0.010 0%、0.020 0%、0.050 0%、0.100 0%。

1.3.2 乳液粒径和电位测定

测定 β -胡萝卜素乳液粒径分布(Polydispersity index, PDI)、z-平均粒径和zeta-电位,基于动态光散射原理进行粒径和电位分析。在粒径和电位测定之

前,利用与制备 β -胡萝卜素乳液相同的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH值2.0和pH值7.0)将乳液稀释,以避免由于液滴浓度过大而引起的多重散射效应影响测定结果。在最终的测定溶液中乳液液滴质量分数应小于0.005%^[7]。

1.3.3 乳液包埋率测定

β -胡萝卜素乳液包埋率测定方法参照SURH等^[8]的方法并进行一些调整。在1.0 mL的乳液中加入3.0 mL的正己烷,振荡30 s。混合均匀后在离心力10 000 g条件下离心5 min。取上清液于10 mL容量瓶中用正己烷定容。在450 nm下测定 β -胡萝卜素的吸光度。根据标准曲线计算出 β -胡萝卜素的含量。由此测出的含量即为未被包埋的 β -胡萝卜素的含量。包埋率计算公式为

$$A = \left(1 - \frac{C_1}{C_0}\right) \times 100\%$$

式中 A——包埋率, %

C_1 ——未被包埋的 β -胡萝卜素质量浓度, mg/mL

C_0 —— β -胡萝卜素质量浓度, mg/mL

1.3.4 乳液快速稳定性测定

本实验对 β -胡萝卜素乳液的快速稳定性进行了分析。Turbiscanlab Expert浓缩体系稳定性分析仪采用脉冲近红外光源(波长 $\lambda = 880$ nm)自下而上扫描样品,两个同步光学探测器分别搜集透射光(Transmission, TM)和背散射光(Backscattering, BS)。在一定时间内连续对样品进行扫描,即可获得透射光和背散射光信号对样品高度的函数曲线图。每次扫描产生一条扫描曲线,在扫描时间内对不同扫描曲线进行比较分析即可反映样品中颗粒的运动趋势,进而预测出乳液的稳定性^[9]。

β -胡萝卜素乳液的样品浊度高,透射光强度小。根据仪器规定,在样品透光率小于0.2%时,即采用背散射光数据对样品进行分析。在测定中, β -胡萝卜素乳液的透光率小于0.1%,因此本实验中采用背散射光的变化进行样品稳定性分析。因为影响扫描曲线的因素除了乳液自身因素之外还有环境因素,因此,不同样品的背散射光曲线没有可比性。在分析比较不同样品的稳定性时,通常采用背散射光强变化值(Δ BS值)。 Δ BS值排除了系统误差对样品扫描曲线的影响,因此比较在相同扫描时间内不同样品 Δ BS值可以对乳液的稳定性进行预测^[10]。

1.3.5 乳液界面 α -LA含量测定

为了测定界面蛋白含量,通过超高速离心法将乳液中游离相 α -LA与界面 α -LA分离,参照FARAJI等^[11]的方法。将乳液置于10 mL的超高速

离心管中,在超高速离心机中离心50 min,离心力为36 000 g。为避免 β -胡萝卜素在离心过程中发生氧化,将离心机温度设定在10℃。离心结束后,利用带有长针头的注射器小心分离下层清液和上层乳析层。

取一定体积的下清液通过0.1 μ m聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride, PVDF)膜进行过滤,去掉较大液滴乳析层颗粒^[12]。取一定量过滤后的下层清液,利用考马斯亮蓝法测定下清液中蛋白含量^[13]。

1.3.6 溶液制备

α -LA溶液:将1.5% α -LA溶解在0.1 mmol/L柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH值7.0)中,室温下搅拌4 h,使 α -LA完全溶解,待用。

EGCG溶液:将1.0% EGCG溶解在0.1 mmol/L柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH值7.0)中,超声处理2 min,并在室温下搅拌10 min,使EGCG完全溶解。室温下,EGCG在pH值7.0的缓冲溶液中容易发生氧化,因此EGCG溶液现用现配。将1.0%的EGCG溶液进行不同倍数的稀释得到不同浓度的EGCG溶液用于后续实验。

α -LA与EGCG混合溶液:将1.5%的 α -LA溶液与等质量的不同浓度的EGCG溶液混合,混合溶液中 α -LA质量分数为0.75%,EGCG质量分数为0、0.002 5%、0.005 0%、0.010 0%、0.020 0%、0.050 0%、0.100 0%、0.200 0%、0.400 0%、0.500 0%。溶液混合1 h后,进行粒径和浊度的测定^[14]。

1.3.7 溶液浊度测定

利用浊度仪测定 α -LA与EGCG混合溶液的浊度。浊度仪的光学系统包括一套(870 \pm 30) nm光发射二极管(LED)装置、一个90°散射光检测器和一个LED检测器。测量过程中,由光源发出平行的光束通过溶液,其中一部分光被吸收和散射,另一部分透过溶液。利用90°散射光检测器进行散射光检测。入射光恒定的条件下,在一定浊度范围内,散射光强度与溶液的浑浊度成正比,测量时选择散射光浊度单位(Nephelometric turbidity units, NTU)模式,测量温度为25℃。

1.3.8 α -LA与EGCG相互作用程度测定

等温滴定量热技术(Isothermal titration calorimetry, ITC)是一种利用反应热量变化表征反应进行程度的技术。测定反应过程中热量的变化,建立反应物质总体的浓度变化与反应热量变化之间的函数,并结合一定的数学模型,计算热力学参数。微量热等温滴定技术具有灵敏度高、实时在线的特点,并且测量仪器具有差热功率补偿系统,可快速平衡

热量以便连续滴定。通过 ITC 实验,可同时获得多个热力学参数,如吉布斯自由能变化量 ΔG 、反应焓变 ΔH 、反应熵变 ΔS 及结合常数 K 。

本实验中应用 ITC 测定 EGCG 与 α -LA 在连续滴定过程中的热量变化。实验在 25℃ 条件下进行。在进行实验之前,将 EGCG 溶液和 α -LA 溶液进行过滤(0.45 mm 水系膜),过滤完成后进行真空脱气。取脱气完全的 α -LA 溶液 300 μ L 注入样品池中,50 μ L 的 EGCG 溶液置于注射器中。在滴定之前,先将仪器平衡 3 600 s。待仪器平衡后,300 s 后开始滴定,在滴定过程中,设置温度为 25℃,注射器搅拌速率为 300 r/min,反应时间间隔为 300 s。每滴滴定液的体积为 2.0 μ L,连续滴定 25 滴。对照实验是将同样浓度的 EGCG 溶液滴定到只含有缓冲溶液的样品池中,将样品的滴定曲线减去对照实验的滴定曲线即为样品实际热量变化曲线。根据样品的热力学曲线,选择合适的结合模型进行在线模拟,计算得到热力学参数。

1.4 数据分析

在所有实验中,每个样品设置 3 个平行样品,并根据实验结果计算平均值和标准差。实验中使用 GraphPad Prism 5 (美国 GraphPad Software 公司)软件,利用 ANOVA 方差分析和 Turkey 检验进行分析。

2 结果与分析

2.1 β -胡萝卜素乳液粒径和电位

pH 值是影响 EGCG 发挥抗氧化或促氧化作用的因素。酸性环境增强了金属离子的溶解性和稳定性,使金属离子可催化更多的氧化反应。随着 pH 值的提高,EGCG 的抗氧化活性增强,但金属离子由于溶解度问题,其催化的氧化反应减少^[15]。为了研究 EGCG 在 β -胡萝卜素乳液中发挥抗氧化/促氧化

作用,制备了 pH 值 2.0 和 pH 值 7.0 的 β -胡萝卜素乳液,研究不同 pH 值和 EGCG 添加量对 β -胡萝卜素乳液粒径(z -平均粒径)和电位(zeta-电位)的影响,实验结果如表 1 所示。由于在 pH 值 7.0 的乳液中,当 EGCG 添加量大于 0.1% 时,乳液快速分层,无法得到稳定的 β -胡萝卜素乳液,因此没有进行粒径和电位的测定。

由表 1 可以得出,在 pH 值 2.0 的乳液中,EGCG 的加入对 β -胡萝卜素乳液的粒径没有显著影响($p > 0.05$)。SABOURI 等^[16]报道了将不同含量的 EGCG(质量分数 0.05% ~ 0.90%)添加到以酪蛋白为乳化剂的乳液中,EGCG 添加量对乳液粒径没有显著性影响。这与本实验结果相同。在 pH 值 7.0 的乳液中添加不同含量的 EGCG 使乳液粒径有显著减小趋势。EGCG 的加入使 α -LA 的团聚状态解离,使其更容易吸附到水油界面上,形成较小的液滴^[17],因此,本实验中 EGCG 的加入使乳液粒径减小可能是因为 α -LA 在团聚状态时形成的乳液粒径比较大,加入 EGCG 后使 α -LA 的团聚状态解离,使其更容易吸附到水油界面上,形成了粒径较小的液滴。不同 pH 值乳液中, β -胡萝卜素乳液的粒径有显著性差异。其中 pH 值 7.0 的乳液粒径显著大于 pH 值 2.0 乳液的粒径。这可能是因为 α -LA 在 pH 值 2.0 时,发生部分变性,形成熔球状构型。相比在中性环境中的 α -LA,pH 值 2.0 的 α -LA 分子失去三级结构,结构变得更加松散,表面疏水性增加。这会使其表面活性增加,快速吸附到油滴界面上,在通过微射流的过程中,形成较小的液滴。

在 pH 值 2.0 和 pH 值 7.0 的乳液中,EGCG 的加入没有显著影响 β -胡萝卜素乳液的电位($p > 0.05$),此结果与 SABOURI 等^[16]的结果相同。这主要是因为 EGCG 是不带电荷的小分子物质,因其自

表 1 EGCG 添加量对不同 pH 值 β -胡萝卜素乳液粒径和电位的影响

Tab.1 Influence of EGCG on particle size and zeta-potential of β -carotene emulsions at different pH values

EGCG 添加量/%	粒径/nm		电位/mV	
	pH 值 2.0	pH 值 7.0	pH 值 2.0	pH 值 7.0
0	(182.43 \pm 2.81) ^a	(230.93 \pm 1.33) ^a	(42.70 \pm 0.42) ^a	(-16.03 \pm 0.80) ^a
0.002 5	(180.35 \pm 4.37) ^a	(225.70 \pm 1.35) ^b	(45.00 \pm 0.57) ^a	(-15.27 \pm 0.84) ^a
0.005 0	(179.55 \pm 3.39) ^a	(226.10 \pm 0.95) ^b	(44.97 \pm 1.29) ^a	(-15.73 \pm 0.25) ^a
0.010 0	(179.28 \pm 2.44) ^a	(227.85 \pm 2.46) ^b	(45.75 \pm 0.21) ^a	(-15.60 \pm 0.61) ^a
0.020 0	(181.70 \pm 3.81) ^a	(227.25 \pm 1.69) ^b	(46.45 \pm 0.21) ^a	(-16.50 \pm 0.44) ^a
0.050 0	(182.38 \pm 3.44) ^a	(222.18 \pm 2.34) ^c	(45.35 \pm 0.35) ^a	(-16.23 \pm 1.65) ^a
0.100 0	(183.93 \pm 1.52) ^a	(221.35 \pm 1.58) ^c	(44.40 \pm 0.28) ^a	(-15.87 \pm 0.75) ^a
0.200 0	(181.73 \pm 4.92) ^a		(45.50 \pm 0.42) ^a	
0.400 0	(183.25 \pm 2.47) ^a		(44.40 \pm 0.57) ^a	
0.500 0	(183.85 \pm 1.85) ^a		(45.10 \pm 0.99) ^a	

注:同列不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

身不带电荷,不会影响界面电位。有文献报道 EGCG 可以通过疏水相互作用和氢键与乳蛋白相互作用^[18-19]。但由于 EGCG 不带电荷,在一定添加量的范围内,不能改变乳液的电位。在不同 pH 值条件下, β -胡萝卜素乳液的电位有显著性差异($p < 0.05$)。在 pH 值 2.0 时,乳液电位大于 40 mV,而 pH 值 7.0 的乳液中,电位在 -15 mV 左右。这主要是因为 α -LA 的等电点 pI 值在 4.0 ~ 5.0 之间^[17],当乳液 pH 值为 2.0 时,低于其 pI 值, α -LA 带正电,同时因为蛋白变性使得更多的电荷暴露出来,使电位较高;当乳液 pH 值为 7.0 时,高于其 pI 值, α -LA 带负电荷,使乳液电位为负值。

2.2 β -胡萝卜素乳液包埋率

乳液中 β -胡萝卜素的包埋率影响其生物利用率和贮藏稳定性,因此在本实验中测定不同 EGCG 添加量对 β -胡萝卜素乳液包埋率的影响,结果如图 1 所示,图中相同小写、大写字母分别表示 pH 值 7.0、pH 值 2.0 时没有显著性差异。

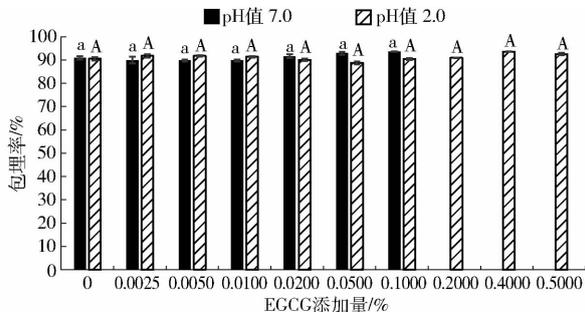


图1 EGCG添加量对不同pH值 β -胡萝卜素乳液包埋率的影响

Fig.1 Influence of EGCG on encapsulation rate of β -carotene emulsions at different pH values

从图1中可得,在pH值2.0和pH值7.0的 β -胡萝卜素乳液中,不同添加量的EGCG对 β -胡萝卜素的包埋率没有显著影响。茶多酚因分子内含有多个苯环,具有一定的疏水性,而茶多酚分子中大量的羟基使其具有良好的水溶性^[17],因此,茶多酚可以结合到水油界面上,对 α -LA有竞争性吸附或替代性吸附作用,进而影响 β -胡萝卜素乳液的包埋率。刘蕾等^[20]报道了以 α -LA为乳化剂的 β -胡萝卜素乳液中, α -LA的添加量为0.25%~3.00%时,单位界面面积上 α -LA的质量为3.1~5.5 mg/m²,因此,在乳液的水油界面上 α -LA发生了多层吸附。本研究中 α -LA的添加量为0.75%时,在 β -胡萝卜素乳液的界面上, α -LA发生了多层吸附,EGCG可能与界面上多层蛋白的外层 α -LA相互作用,并没有与内层界面蛋白发生竞争性吸附或替代性吸附。因此,EGCG的加入没有影响乳液的包埋率。pH值

2.0和pH值7.0乳液的包埋率之间没有显著性差异,进一步说明 α -LA已经完全覆盖油滴界面,因此两者包埋率之间没有显著差异。

2.3 β -胡萝卜素乳液快速稳定性

利用Turbiscan Lab Expert浓缩体系稳定性分析仪进行乳液快速稳定性分析,是在一定时间内对乳液进行多次扫描,得到乳液的背散射光扫描曲线,根据扫描曲线的变化进行乳液的快速稳定性分析。对pH值2.0乳液的扫描曲线分析可得,乳液中部的背散射光值(BS值)随着扫描时间的延长逐渐增大,而乳液下部和上部的BS值没有明显变化。因此,对于pH值2.0的 β -胡萝卜素乳液,其在贮藏过程中乳液液滴发生絮凝或聚集现象,使乳液粒径增大,当乳液粒径增大到一定程度时会发生分层现象,引起乳液失稳^[21-22]。

由于pH值2.0的 β -胡萝卜素乳液的失稳机理是乳液液滴发生团聚,因此,分析 Δ BS值时选择乳液中部背散射光变化值。不同EGCG添加量的pH值2.0的 β -胡萝卜素乳液在扫描过程中 Δ BS值随扫描时间的变化如图2所示。从图2可以得出,pH值2.0的 β -胡萝卜素乳液在55℃的扫描过程中, Δ BS值呈增大趋势,这说明乳液中液滴的团聚速率逐渐增大,即乳液的物理稳定性变差。当EGCG添加量小于0.2%时,乳液的 Δ BS值与未添加EGCG乳液的 Δ BS值没有显著性差异;当EGCG添加量大于0.2%时,乳液 Δ BS值显著大于未添加EGCG乳液的 Δ BS值,表明当EGCG添加量大于0.2%时,乳液的物理稳定性受EGCG添加的影响呈降低趋势。

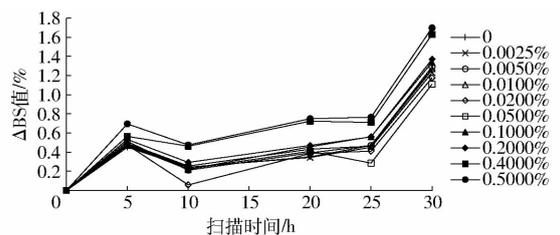


图2 EGCG添加量对pH值2.0的 β -胡萝卜素乳液扫描过程中 Δ BS值的影响

Fig.2 Influence of EGCG on Δ BS of β -carotene emulsions during scan procedure at pH value of 2.0

对pH值7.0的乳液进行扫描,乳液下部的BS值减小同时上部的BS值增加,中部的BS值没有明显变化。这主要是因为乳液发生了乳析现象即油滴上浮现象。当乳液发生乳析现象时,液滴的上浮导致乳液上部的背散射光值增大,同时引起乳液下部出现澄清,因此,乳液下部的背散射光值减小,更多的光可以通过样品而不发生散射。

由于pH值7.0的乳液在贮藏过程中易发生乳

析,所以乳液上部的 Δ BS值的变化比较大,可以代表乳液的不稳定现象。因此,在分析pH值7.0的 β -胡萝卜素乳液的 Δ BS值时选择乳液上部的背散射光变化值。pH值7.0的 β -胡萝卜素乳液 Δ BS值随扫描时间的变化如图3所示。从图中可以得出,在55℃的扫描过程中乳液的 Δ BS值逐渐增大,这说明乳液的油滴上浮速率逐渐增大。同时当EGCG添加量为0.0025%~0.0200%时,添加了EGCG的 β -胡萝卜素乳液比未添加EGCG乳液的 Δ BS值小;在此添加量范围内,随着EGCG添加量的增加, Δ BS值逐渐增大,这说明虽然EGCG的添加使 β -胡萝卜素乳液的物理稳定性提高,但随着EGCG添加量的增加,乳液物理稳定性仍呈下降趋势;当EGCG添加量为0.05%和0.10%时,添加了EGCG的乳液的 Δ BS值比未添加EGCG的乳液的 Δ BS值大。这说明当有大量EGCG添加到 β -胡萝卜素乳液中时会使乳液的物理稳定性显著变差。

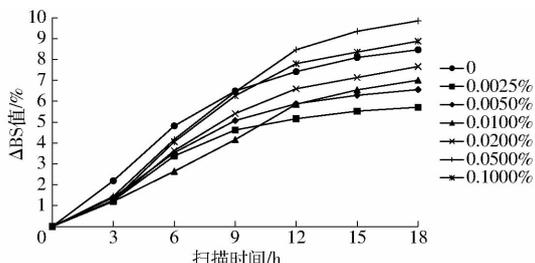


图3 EGCG添加量对pH值7.0的 β -胡萝卜素乳液扫描过程中 Δ BS值的影响

Fig.3 Influence of EGCG on Δ BS of β -carotene emulsions during scan procedure at pH value of 7.0

从以上结果中可以得出,将EGCG添加到pH值2.0和pH值7.0的 β -胡萝卜素乳液中,对乳液稳定性的影响不同。当将EGCG添加到pH值2.0的 β -胡萝卜素乳液中时,当添加量大于0.2%时,会引起乳液稳定性的显著性下降;而将EGCG添加到pH值7.0的 β -胡萝卜素乳液中时,当添加量为0.0025%~0.0200%时,EGCG的添加使 β -胡萝卜素乳液的物理稳定性提高,当EGCG添加量大于0.02%时,EGCG的添加使 β -胡萝卜素乳液的物理稳定性下降。

为了比较在相同EGCG添加量时不同pH值乳液的稳定性,计算了不同pH值乳液的TSI(Turbiscan稳定性指数)值,结果如表2所示。从表中可得,pH值7.0的 β -胡萝卜素乳液的TSI值显著高于pH值2.0的 β -胡萝卜素乳液的TSI值,说明在乳液中添加相同含量的EGCG时,pH值2.0的乳液的稳定性高于pH值7.0的乳液。这可能是因为pH值2.0的乳液中 α -LA变性,乳化性质提高,致

使制备乳液的物理稳定性提高^[17]。

表2 pH值2.0和pH值7.0的 β -胡萝卜素乳液在扫描过程中TSI值比较

Tab.2 Comparison of Turbiscan stability index (TSI) of β -carotene emulsions at different pH values

EGCG 添加量/%	TSI 值	
	pH 值 2.0	pH 值 7.0
0	0.1 ^a	4.8 ^A
0.0025	0.6 ^a	4.1 ^A
0.0050	0.7 ^a	4.1 ^A
0.0100	0.8 ^a	3.6 ^B
0.0200	0.9 ^b	4.4 ^A
0.0500	0.7 ^a	4.1 ^A
0.1000	0.5 ^a	4.4 ^A
0.2000	1.0 ^b	
0.4000	0.4 ^a	
0.5000	0.5 ^a	

注:不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同。

2.4 β -胡萝卜素乳液界面 α -LA含量

利用超高速离心法,将乳液中 β -胡萝卜素油滴和连续水相分开,由于水相中既含有 α -LA同时又含有EGCG,为了在测定 α -LA时不受EGCG的干扰,选择考马斯亮蓝法测定水相中 α -LA含量。利用总的 α -LA添加量减去水相中 α -LA含量即可得到界面 α -LA含量。

界面 α -LA含量如图4所示。在pH值2.0的乳液中,当EGCG添加量小于0.1%时,EGCG的添加量对界面 α -LA含量没有显著影响($p > 0.05$)。当EGCG添加量大于0.1%时,随着EGCG添加量的增加,界面 α -LA含量呈下降的趋势($p < 0.05$)。这可能是因为虽然在利用考马斯亮蓝法测定蛋白含量时不受多酚的影响,但当EGCG添加量比较高时(大于0.1%),测定结果可能会受到EGCG含量的影响。因此当EGCG添加量高于0.1%时,界面 α -LA含量逐渐减少可能是由EGCG干扰所致。在pH值7.0的乳液中,随着EGCG添加量的增加,界面 α -LA含量逐渐降低,这可能与EGCG干扰有关。

比较pH值7.0和pH值2.0的界面 α -LA含量可以得出,pH值7.0乳液中,界面 α -LA含量显著高于pH值2.0乳液体系中的界面 α -LA含量,其中pH值2.0乳液中,界面 α -LA质量浓度为0.94~1.94 mg/mL;pH值7.0乳液体系中,界面 α -LA质量浓度为1.81~2.22 mg/mL。这可能是因为虽然pH值2.0体系中 α -LA的表面疏水性比pH值7.0的 α -LA大,但pH值2.0体系中电位是pH值7.0体系中电位的3倍左右,使得 α -LA结合到界面上的阻力增加,由于电位的阻力可能大于表面疏水性

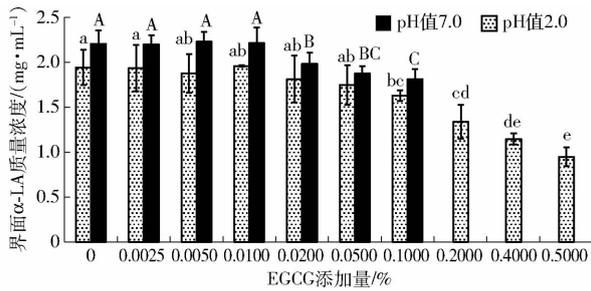


图4 β -胡萝卜素乳液中EGCG添加量对界面 α -LA含量的影响

Fig. 4 Influence of EGCG on interfacial α -LA concentration of β -carotene emulsions at different pH values

的作用,使得pH值2.0体系中界面 α -LA含量小于pH值7.0体系的界面 α -LA含量^[23-24]。

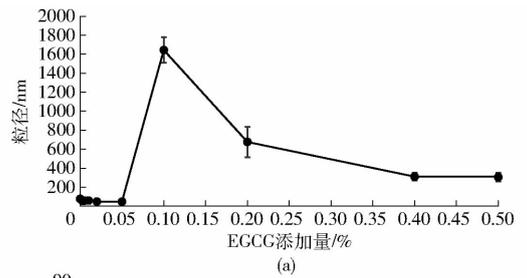
2.5 α -LA溶液粒径

将EGCG作为抗氧化剂添加到pH值7.0以 α -LA为乳化剂的 β -胡萝卜素乳液中时,当EGCG添加量大于0.1%时,乳液快速分层,不能得到稳定的乳液。为了研究pH值7.0的 β -胡萝卜素乳液中添加大量EGCG导致乳液稳定性急剧下降的机理,将研究体系简化,研究了在 α -LA溶液中添加不同含量的EGCG对 α -LA性质的影响。

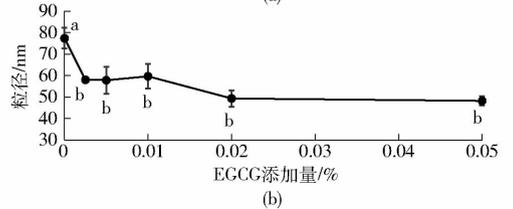
在溶液中添加不同含量的EGCG对 α -LA粒径的影响如图5所示。从图5a可以看出,当EGCG添加量为0.0025%~0.0500%时,随着EGCG添加量的增加, α -LA粒径没有显著性变化($p > 0.05$);但与未添加EGCG的 α -LA溶液粒径相比,添加了EGCG的溶液的粒径比未添加EGCG的 α -LA粒径小($p < 0.05$)。这可能是因为,在溶液中, α -LA呈团聚状态,当少量EGCG加入之后,会使 α -LA的团聚解离,使粒径降低。此结果与前面加入EGCG后使乳液粒径减小相一致。

当EGCG添加量大于0.05%时, α -LA的粒径先增大后减小,并显著高于未添加EGCG和添加较少的EGCG溶液(0.0025%~0.0500%)的粒径($p > 0.05$)(图5b)。这主要是因为当EGCG添加量为0.1%时,溶液中颗粒粒径增大,使溶液呈现浑浊的状态,但并没有引起快速的沉淀;当EGCG添加量继续增大时,即添加量为0.2%~0.5%时,EGCG的加入使溶液快速产生沉淀。当测定产生沉淀的溶液粒径时,测定的是上清液的粒径,从而得到的溶液粒径减小。

SHPIGELMAN等^[26]报道了将EGCG加入 β -乳球蛋白溶液中,随着EGCG添加量的增加,两者形成了粒径较大的复合物,溶液发生浑浊;STASZEWSKI等^[26]报道了茶多酚与 β -乳球蛋白和酪蛋白肽的相互作用,研究了不同pH值和茶多酚添加量对复合



(a)



(b)

图5 pH值7.0条件下不同EGCG添加量对 α -LA溶液粒径的影响

Fig. 5 Influence of EGCG on particle size of α -LA in solutions at pH value of 7.0

物粒径、电位和结构的影响。结果表明,在 β -乳球蛋白在pH值4.5时与茶多酚形成了粒径较大的复合物,而酪蛋白肽在pH值3.0时与茶多酚形成了粒径较大的复合物。

在本实验中,当EGCG添加量大于0.1%时,溶液粒径增大,说明EGCG与 α -LA发生了相互作用,形成了粒径较大的复合物。当复合物粒径继续增大时,溶液产生沉淀。

2.6 α -LA溶液浊度

粒径作为衡量溶液中颗粒大小的指标,可以表征EGCG的添加对 α -LA粒径的改变,或EGCG与 α -LA形成复合物的粒径^[26]。浊度作为衡量溶液浑浊程度的指标,是一个宏观的指标,不仅与溶液中不溶解物质的浓度有关系,还与不溶解物质的粒径大小、形状和折射指数有关^[27]。

EGCG添加量对 α -LA溶液浊度的影响如图6所示。从图中可得,随着EGCG添加量的增加(0.0025%~0.0500%),EGCG和 α -LA的混合溶液的浊度逐渐增大。当EGCG添加量大于0.0500%时,溶液浊度超过了浊度计的量程,说明在溶液中已经形成了较大的颗粒。随着EGCG添加量的增加,溶液的浊度逐渐增大,并产生沉淀。

将不同含量EGCG加入蛋白溶液,当EGCG的添加量较少时,EGCG可以与蛋白通过疏水相互作用形成可溶性复合物,但当EGCG的添加量比较大时,EGCG可作为多齿配体,使蛋白形成二聚体。随着EGCG的添加量继续增多,蛋白之间以及蛋白-EGCG复合物之间的桥联继续增多,形成了粒径较大的聚集体,甚至产生沉淀^[27]。从本实验结果中可以得出,当EGCG添加量低于0.05%时,EGCG与

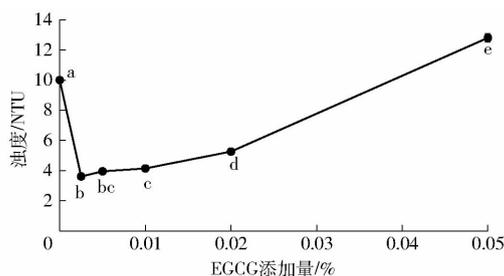


图 6 pH 值 7.0 条件下不同 EGCG 添加量对 α -LA 溶液浊度的影响

Fig. 6 Influence of EGCG on turbidity of α -LA solutions at pH value of 7.0

α -LA 形成可溶性复合物; 当 EGCG 添加量大于 0.05% 时, EGCG 和 α -LA 形成了粒径较大的聚集体, 使溶液的粒径和浊度增大。

未添加 EGCG 的 α -LA 溶液的浊度和 EGCG 添加量较小 (0.002 5% ~ 0.020 0%) 时溶液的浊度相比较发现, 后者的浊度比前者的浊度低, 即少量 EGCG 的加入会使 α -LA 溶液的浊度降低, 这与将少量 EGCG (0.002 5% ~ 0.020 0%) 添加到 α -LA 溶液中使 α -LA 的粒径减小相一致。

由 α -LA 溶液粒径和浊度随 EGCG 添加量的变化可得, 当 EGCG 添加量大于 0.1% 时, EGCG 的加入使 α -LA 发生沉淀, 没有足够的 α -LA 作为乳化剂稳定 β -胡萝卜素, 从而引起乳液的迅速失稳。

2.7 α -LA 与 EGCG 相互作用热力学参数测定

在溶液中蛋白可以与 EGCG 相互作用, 形成非共价复合物^[26]。为了研究 α -LA 与 EGCG 相互作用机理, 采用等温滴定量热仪测定了 α -LA 与 EGCG 的相互作用程度。 α -LA 与 EGCG 在相互作用过程中的热量变化如图 7 所示, 图中 Q 、 t 、 ΔQ 分别代表热量、时间、热量变化值。图中表示 EGCG 滴入到样品池中的 α -LA 溶液后, 补偿热功率随着滴定数变化的热功率曲线, 每一个热功率峰代表着每一次滴定过程。热功率 (dQ/dt) 大于零表示反应为吸热反应。

将每一次滴定产生的热功率峰进行积分, 减去对照的峰面积, 即可求出在滴定过程中产生的热量, 如图 7 所示。随着滴定次数的增加, ΔQ 绝对值先增加后减小, 最终维持在 0 附近。当 ΔQ 不再改变时, 表示反应达到平衡, 生成物的量不再变化。结果显示, 反应的热量变化与配体浓度能够很好地符合多位点结合模型, 因此, 拟合的数据是有效的。在进行拟合时, 第 1 个点的数据需要去掉, 因为在第 1 次滴定前, 等温滴定量热仪需要热平衡 1 h, 在平衡过程中, 注射器中的配体会产生扩散, 部分配体已经与样品发生反应, 第 1 次滴定的有效体积会减少^[28]。

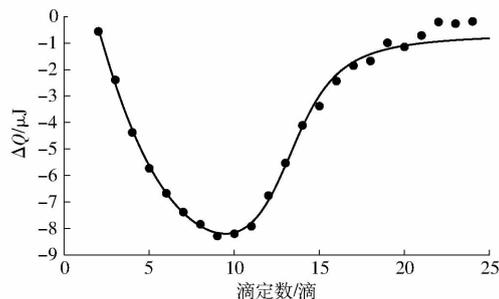
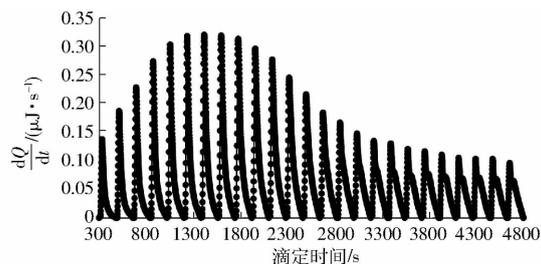


图 7 α -LA 与 EGCG 相互作用的等温滴定量热测定

Fig. 7 Quantitative calorimetric determination of isothermal droplets under interaction of α -LA and EGCG

由表 3 可以得出, α -LA 与 EGCG 的结合符合多位点结合模型, 共有两个结合位点。其中结合位点 1 的结合常数 K_1 是结合位点 2 的结合常数 K_2 的 5.5 倍, 因此, 在 α -LA 分子中结合位点 1 对 EGCG 的结合强度更高。两个结合位点的反应焓变也存在显著差异, 其中结合位点 1 的焓变为正值, 而结合位点 2 的焓变为负值, 这主要是由结合位点 1 比结合位点 2 的结合强度高所致。由 α -LA 与 EGCG 的结合比例 (α -LA 和 EGCG 结合物质的量之比) N_1 和 N_2 可得, 结合位点 1 中 1 分子 α -LA 可以与 4 分子 EGCG 结合; 而结合位点 2 对 EGCG 的结合强度小, 1 分子 α -LA 可以与 1 分子 EGCG 结合。因此, 在 α -LA 与 EGCG 的结合过程中, 1 分子 α -LA 可以与 5 分子 EGCG 结合。

表 3 pH 值 7.0 条件下 ITC 测定的 α -LA 与 EGCG 相互作用结果

Tab. 3 ITC analyses of EGCG reacting with α -LA at pH value of 7.0

ITC 参数	数值
结合常数 K_1	1 195 259.9
结合常数 K_2	217 142.28
焓变 $\Delta H_1 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	0.952 455 36
焓变 $\Delta H_2 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	-3.277 299 2
吉布斯自由能变 $\Delta G_1 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	-34 685.96
吉布斯自由能变 $\Delta G_2 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	-30 458.45
熵变 $\Delta S_1 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	116.35
熵变 $\Delta S_2 / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	102.15
结合物质的量比 N_1	0.25
结合物质的量比 N_2	1.2

将 α -LA 与 EGCG 混合溶液的粒径和浊度数据与 ITC 数据相结合可以发现,当 EGCG 的添加量小于 0.1% 时, α -LA 与 EGCG 的物质的量之比小于 1:5, α -LA 分子上有大量空闲的位置可以与 EGCG 结合;当 EGCG 添加量为 0.1% 时, α -LA 与 EGCG 的物质的量之比为 1:4, α -LA 与 EGCG 结合的第 1 个位点已经饱和,使 α -LA 溶液的粒径开始变大,形成了粒径比较大的非共价复合物,混合溶液的浊度开始增大。当 EGCG 添加量大于 0.1% 时, α -LA 与 EGCG 的物质的量之比大于 1:5,溶液中粒径增大,并发生了沉淀。

3 结论

(1)EGCG 添加量对 pH 值 2.0 和 pH 值 7.0 的乳液粒径、电位和包埋率没有显著性影响。这与 EGCG 添加量没有显著影响界面 α -LA 含量有关。在 pH 值 7.0 的乳液中,添加了 EGCG 的乳液粒径显著小于未添加 EGCG 乳液的粒径,这主要与 EGCG 的加入减少了 α -LA 分子间的团聚,促进其吸附到水油界面使乳液粒径减小有关。

(2)在 pH 值 2.0 的乳液中添加小于 0.2% 的 EGCG 对乳液的快速稳定性没有显著性影响,但当 EGCG 添加量大于 0.2% 时,随着 EGCG 添加量的增大,乳液的稳定性降低;将 EGCG 添加到 pH 值 7.0 的 β -胡萝卜素乳液中时,添加量小于 0.02% 时,乳液的稳定性比未添加 EGCG 的乳液的稳定性高,当 EGCG 添加量大于 0.02% 时,随着 EGCG 添加量的增大,乳液的稳定性降低。

(3)在 pH 值 7.0 乳液中添加 EGCG 使乳液迅速失稳的机理中,随着 EGCG 添加量的增加,EGCG 与 α -LA 混合溶液的粒径和浊度逐渐增大,当 EGCG 添加量大于 0.1% 时,混合溶液中形成了肉眼可见的复合物。通过 ITC 测定, α -LA 与 EGCG 的反应是吸热反应,在 α -LA 分子上有两个位点可以与 EGCG 相结合。第 1 个位点的结合强度比较大, α -LA 与 EGCG 的结合物质的量之比为 1:4;第 2 个位点的结合强度比较小, α -LA 与 EGCG 的结合物质的量之比为 1:1。因此 α -LA 与 EGCG 的结合物质的量之比为 1:5。在 pH 值 7.0 以 α -LA 为乳化剂的乳液中添加 EGCG 作为抗氧化剂时,其添加量需小于 0.1%。

参 考 文 献

- [1] RAO J, DECKER E A, XIAO H, et al. Nutraceutical nanoemulsions; influence of carrier oil composition (digestible versus indigestible oil) on β -carotene bioavailability[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(13): 3175 - 3183.
- [2] 刘夫国,王迪,杨伟,等.乳铁蛋白-多酚对 β -胡萝卜素乳液稳定性的影响[J/OL]. *农业机械学报*,2015,46(6):212 - 217.
LIU Fuguo, WANG Di, YANG Wei, et al. Effect of lactoferrin-polyphenol conjugates on stability of β -carotene emulsions[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*,2015,46(6):212 - 217. http://www.j-csam.org/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20150630&flag=1&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.10001298.2015.06.30. (in Chinese)
- [3] RASHIDINEJAD A, BIRCH E J, EVERETT D W. Interactions between milk fat globules and green tea catechins[J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 347 - 355.
- [4] DI MATTIA C D, SACCHETTI G, MASTROCOLA D, et al. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions[J]. *Food Research International*, 2009, 42(8): 1163 - 1170.
- [5] XU D, WANG X, JIANG J, et al. Influence of pH, EDTA, α -tocopherol, and WPI oxidation on the degradation of β -carotene in WPI-stabilized oil-in-water emulsions[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2013, 54(1): 236 - 241.
- [6] QIAN C, DECKER E A, XIAO H, et al. Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation; potential limitations of solid lipid nanoparticles[J]. *Food Research International*, 2013, 52(1): 342 - 349.
- [7] QIAN C, DECKER E A, XIAO H, et al. Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions; influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(3): 1221 - 1229.
- [8] SURH J, DECKER E A, MCCLEMENT D J. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(5): 596 - 606.
- [9] 毛立科. β -胡萝卜素乳液的制备及其理化性质研究[D].北京:中国农业大学,2008.
MAO Like. Study on the preparation and physicochemical properties evaluation of β -carotene nanoemulsion[D]. Beijing: China Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [10] 朱巧梅,韩湘,酆金龙,等.乳化剂与内水相镁盐浓度对油包水乳液稳定性的影响[J/OL]. *农业机械学报*,2015,46(8):217 - 223.
ZHU Qiaomei, HAN Xiang, LI Jinlong, et al. Influence of concentrations of emulsifier and magnesium salt contained in internal phase on stability of W/O emulsions[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2015, 46(8): 217 - 223. http://www.j-csam.org/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20150830&flag=1&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2015.08.030. (in Chinese)

- [11] FARAJI H, MCCLEMENT D J, DECKER E A. Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(14): 4558 – 4564.
- [12] KELLERBY S S, GU Y S, MCCLEMENT D J, et al. Lipid oxidation in a menhaden oil-in-water emulsion stabilized by sodium caseinate cross-linked with transglutaminase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(26): 10222 – 10227.
- [13] 魏桐. 辣椒果胶提取工艺及功能特性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
WEI Tong. Study on pectin exreaction from pepper and its functional characterization[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [14] 杨伟. 乳铁蛋白、EGCG和果胶三元复合物的形成机制及结构表征[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
YANG Wei. Fabrication mechanism and structural characteristics of the ternary aggregates by lactoferrin, EGCG and pectin [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [15] ZHOU L, ELIAS R J. Factors influencing the antioxidant and pro-oxidant activity of polyphenols in oil-in-water emulsions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(11): 2906 – 2915.
- [16] SABOURI S, GENG J, CORREDIG M. Tea polyphenols association to caseinate-stabilized oil-water interfaces[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 51: 95 – 100.
- [17] PERMYAKOV E A, BERLINER L J. Alpha-lactalbumin: structure and function[J]. *FEBS Letters*, 2000, 473(3): 269 – 274.
- [18] YUKSEL Z, AVCI E, ERDEM Y K. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(2): 450 – 456.
- [19] KANAKIS C D, IMED H, PHILIPPE B, et al. Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 1046 – 1055.
- [20] 刘蕾, 袁芳, 高彦祥. α -乳白蛋白提高 β -胡萝卜素乳液稳定性[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(增刊2): 423 – 429.
LIU Lei, YUAN Fang, GAO Yanxiang. α -lactalbumin enhancing emulsion stability of β -carotene [J]. *Transactions of the CSAE*, 2016, 32(Supp.2): 423 – 429. (in Chinese)
- [21] YUAN Y, GAO Y, ZHAO J, et al. Characterization and stability evaluation of beta-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions[J]. *Food Research International*, 2008, 41(1): 61 – 68.
- [22] 陈冬, 张晓阳, 刘尧政, 等. 姜油纳米乳液特性与贮藏稳定性研究[J/OL]. *农业机械学报*, 2016, 47(8): 233 – 240.
CHEN Dong, ZHANG Xiaoyang, LIU Yaozheng, et al. Property and storage stability of ginger oil nano-emulsions[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2016, 47(8): 233 – 240. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20160830&flag=1&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2016.08.030. (in Chinese)
- [23] MCCLEMENT D J. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components[J]. *Annual Review of Food Science & Technology*, 2010, 1: 241 – 269.
- [24] DICKINSON E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems[J]. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17(1): 25 – 39.
- [25] SHPIGELMAN A, COHEN Y, LIVNEY Y D. Thermally-induced β -lactoglobulin-EGCG nanovehicles: loading, stability, sensory and digestive-release study[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 29(1): 57 – 67.
- [26] STASZEWSKI M V, JARA F L, RUIZ A L T G, et al. Nanocomplex formation between β -lactoglobulin or caseinomacropptide and green tea polyphenols: impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity[J]. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4(4): 800 – 809.
- [27] YANG W, XU C Q, LIU F G, et al. Native and thermally modified protein-polyphenol coassemblies: lactoferrin-based nanoparticles and submicrometer particles as protective vehicles for (–)-epigallocatechin-3-gallate[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(44): 10816 – 10827.
- [28] 杨森培. 等温滴定量热技术在测定不同类型小分子相互作用中的应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
YANG Senpei. Application of isothermal titration calorimetry in the interaction between different types of small meolecules[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014. (in Chinese)