



pH 和热处理对负载叶黄素的尼罗罗非鱼分离蛋白乳液 贮藏稳定性和体外消化的影响

陈艾霖¹, 林琼妮¹, 张若兰¹, 洪鹏志^{1,2}, 周春霞^{1,2*}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室,

广东省海洋食品工程技术研究中心, 广东 湛江 524088;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江), 广东 湛江 524088)

摘要: 为了提高叶黄素的稳定性和生物利用率, 以罗非鱼分离蛋白(TPI)为乳化剂, 高压均质制备负载叶黄素(200 μg/mL)的TPI乳液, 探讨不同pH(3.0、7.0和10.0)条件下, 热处理(70 °C, 30 min)对乳液粒径、乳析指数、叶黄素含量、体外抗氧化活性和体外消化的影响。结果显示, 热处理导致TPI乳液的粒径减小, 液滴分布均匀, 贮藏稳定性增强。pH 3.0时, 负载叶黄素的TPI乳液稳定性差, 叶黄素降解, 乳液色泽明显变化。而在pH 7.0和10.0条件下, 70 °C热处理不会造成叶黄素降解, 4 °C贮藏28 d无明显分层。经体外模拟胃肠道消化后, 游离脂肪酸释放速率加快, pH 7.0时, 经过热处理后, 乳液的叶黄素生物利用率由18.65%±1.06%提高至35.69%±2.06%。pH 7.0时, 乳液游离脂肪酸释放量和生物利用率达94.22%±0.60%和35.69%±2.06%, ATBS自由基清除能力为59.17%±0.66%。研究表明, 在中性和碱性条件下结合热处理可以提高TPI乳液负载叶黄素的稳定性和生物利用率, 保护叶黄素的抗氧化活性, 为负载叶黄素的TPI乳液的开发及应用提供了参考。

关键词: 尼罗罗非鱼; 分离蛋白; 乳液; 叶黄素; pH; 热处理; 稳定性; 体外消化

中图分类号: TS 254.4; S 985

文献标志码: A

叶黄素是广泛存在于万寿菊(*Tagetes erecta*)、玉米(*Zea mays*)、蛋黄等食品中的含氧类胡萝卜素^[1]。叶黄素分子中含有共轭双键, 具有特殊的猝灭单线态氧的能力^[2], 可作为自由基清除剂^[3], 具有改善老龄性黄斑变性和心血管疾病、预防白内障、降低患癌率等多种功效, 备受消费者的青睐^[4]。但因其亲脂性和不稳定性, 难以渗入水基食品中, 易受热、光照、氧化降解^[5], 极大限制其在功能食品中的应用。

近年来许多研究者发现, 乳液可作为亲脂性生物活性化合物的输送体系, 以克服疏水性物

质的缺点^[6]。目前, 负载叶黄素乳液的水相乳化剂主要有蛋白质类、多糖类和磷脂等。蛋白质是一种可再生和具有表面活性的天然分子, 能在油水界面上形成吸附层, 延迟乳液相分离^[7]。以酪蛋白酸钠作为乳化剂, 高压均质制备叶黄素纳米乳液, 能够有效提高乳液自由基清除能力, 且乳液热稳定性高^[8]。天然乳化剂-玉米纤维胶已被用作负载叶黄素乳液的新型乳化剂, 乳液粒径为(172.0±2.3) nm, 在23 °C下能稳定7 d, 生物利用率提高了32.4%^[9]。然而, 以水产蛋白质作为乳化剂制备乳液负载叶黄素的研究目前尚未见报道。

收稿日期: 2021-05-18 修回日期: 2021-06-30

资助项目: 广东省科技计划项目(2017A020208067); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目(2019KJ150)

第一作者: 陈艾霖(照片), 从事水产品深加工研究, E-mail: ailinchenwei@163.com

通信作者: 周春霞, 从事水产加工与贮藏研究, E-mail: zhoucx@gdou.edu.cn



罗非鱼分离蛋白 (tilapia protein isolate, TPI) 由肌球蛋白、肌动蛋白和小分子的水溶性肌浆蛋白组成^[10], 营养价值高, 易消化^[11], 作为乳化剂可抵抗油滴絮凝, 且在乳液中起抑制脂质氧化作用^[12]。因此, 开发 TPI 乳液输送体系来负载叶黄素, 保护和有效递送叶黄素, 提高叶黄素的稳定性和生物利用率势在必行。

实际的食物乳液应用中, pH 和温度的变化会影响乳液的稳定性和活性物质的生物利用率^[13]。一些软饮料呈酸性 (pH 2.5~4.0), 乳制品呈弱碱性 (pH 7.0~7.4), 以及食物乳液在制备过程中需要进行热加工 (巴氏杀菌、灭菌或烹饪), 探究乳液的耐酸碱能力和提高其热稳定性在食品领域中具有广阔的发展前景^[14]。pH 变化和热处理会影响乳液的絮凝和聚集, 乳液的稳定性又会对其消化性有显著的影响。研究表明, 在胃消化过程中, 液滴的大小和界面层的组成差异会影响乳液的稳定性, 进而影响脂质消化的速率和程度^[15]。乳液在胃阶段表现出不同的理化性质还与蛋白质的类型和蛋白质预处理的方式有关^[16]。Ye 等^[17]通过体外动态消化模型发现, 经 90 °C 加热 20 min 的乳清分离蛋白乳液比未经热处理的乳液游离脂肪酸释放量大。因此, 了解乳液的物理化学稳定性和体外消化至关重要。

本实验比较不同 pH (3.0、7.0、10.0) 条件下, 热处理 (70 °C, 30 min) 对负载叶黄素的 TPI 乳液稳定性和体外消化的影响, 旨在开发稳定、生物利用率高的乳液输送系统, 进一步拓宽叶黄素在食品领域中的应用。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 购自湛江东风市场; 玉米油购自益海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司; 叶黄素 (纯度 ≥90%, HPLC 级)、胃蛋白酶 (15 000 U/mg)、猪胆盐 (胆酸含量 ≥60%)、胰脂肪酶 (30 000 U/g)、1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH, 98.0%)、2,2-联氨-双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS, 98%), 上海源叶生物科技有限公司; 尼罗红, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 尼罗蓝, SIGMA 试剂公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验仪器与设备

Avanti J-26sxp 落地高速冷冻离心机, 美国

Beckman 公司; VAP-450 自动凯氏定氮仪, 德国 Gerhardt 公司; MARS III 模块化高级流变仪, Thermo 仪器公司; FV3000 激光扫描共聚焦显微镜, 奥林巴斯仪器公司; NanoBrook Omni 激光粒度仪, 美国布鲁克海文仪器公司; 超高压纳米均质机, 加拿大 ATS 仪器公司; Cintra1010 紫外分光光度计, 澳大利亚 GBC 仪器公司; ALPHA1-2LD plus 冷冻干燥机, 德国 Martin Christ Gefrier-trocknungsanlagen 公司; DF-101S 恒温水浴锅, 巩义市予华仪器有限责任公司。

1.3 TPI 的提取

取鲜活尼罗罗非鱼背部白肉绞碎, 按照 1 : 9 (质量体积比) 的比例与冰蒸馏水混合, 用匀浆机搅拌 3 min, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 11.0, 磁力搅拌提取 15 min 后再离心 (10 000 r/min, 20 min, 4 °C)。将离心后的上清液通过 8 层纱布过滤, 滤液用 1 mol/L HCl 调节 pH 值为 5.5 后离心 (10 000 r/min, 20 min, 4 °C), 所得沉淀用冰蒸馏水分散并调节 pH 为 7.0, 透析后冷冻干燥备用。参考国家标准^[18]测量 TPI 的粗蛋白质含量为 96.05%±0.76%。实验过程中操作人员严格遵守实验动物福利伦理规范。

1.4 乳液的制备

将 TPI 粉末分散到蒸馏水中, 配制蛋白浓度为 1.0% (质量分数) 的分散体系, 磁力搅拌 2 h 使之完全溶解, 调整 TPI 溶液的 pH 值分别为 3.0、7.0 和 10.0, 涡旋振荡 30 min。添加 0.2% (质量分数) 的叶黄素于玉米油中, 4 °C 避光搅拌使之完全溶解。将 TPI 溶液与含叶黄素的玉米油按 9 : 1 (质量比) 混合, 12 000 r/min 高速剪切 2 min 获得粗乳液。粗乳液于 60 MPa、4 °C 高压均质 5 次获得细乳液。新制备的乳液转移到棕色离心管中, 于 70 °C 水浴加热 30 min, 冷却至室温, 对照组不加热, 所有样品贮藏存于 4 °C 进行乳液性质测定。

1.5 粒径的测定

将新鲜制备的乳液稀释 300 倍避免多重散射, 利用激光粒度仪测定制备的乳液的初始粒径。叶黄素乳液于 4 °C 贮藏 28 d, 测定其平均粒径 (nm)。

1.6 叶黄素含量的测定

参考李季楠等^[8]的方法, 以二甲基亚砜 (DMSO) 作为溶剂, 配置浓度为 2~10 μg/mL 的叶黄素溶液, 于 460 nm 测定吸光度, 绘制标准曲线 ($y=0.1052x-0.0007$; $R^2=0.9993$)。取 400 μL

叶黄素乳液于 5 mL 离心管中, 加入 3 mL 的 DMSO 进行振荡溶解, 以无负载叶黄素的乳液作为对照, 于 460 nm 测定吸光度值, 代入标准曲线计算叶黄素的含量 ($\mu\text{g/mL}$)。

1.7 乳析指数的测定

参照 Surh 等^[19]的方法, 略有改动, 测定叶黄素乳液的乳析指数。将乳液密封于 50 mL 玻璃瓶中 (内径 2.5 cm, 高度 6.0 cm), 于 4 °C 下贮藏。测定乳液贮藏 28 d 的乳析指数, 并对实物拍照。记录乳液析出清液层的高度 (H_s) 和乳液总高度 (H_t), 乳析指数 (CI, %) 计算公式:

$$CI = \frac{H_s}{H_t} \times 100\% \quad (1)$$

1.8 抗氧化性的测定

DPPH 自由基清除能力的测定 参考 Guan 等^[20]的方法并略作修改。取 100 μL 乳液样品于离心管中, 加入 3 mL DPPH 溶液 (0.1 mmol/L) 混合均匀, 暗反应 20 min 后离心 (5 000 r/min, 10 min, 25 °C) 并取上清液, 测定吸光度 (波长 517 nm), 记为 A_i ; 取 100 μL 乳液样品于离心管中, 加入 3 mL 体积分数 95% 的乙醇溶液, 混合反应后测定吸光度 (波长 517 nm), 记为 A_j ; 取 100 μL 体积分数 95% 的乙醇溶液于离心管中, 加入 3 mL DPPH 溶液 (0.1 mmol/L) 混合反应后相同条件下测定吸光度, 记为 A_0 。DPPH 自由基清除率 (%) 的计算公式:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

ABTS 阳离子自由基清除能力的测定 参考 Surh 等^[20]的方法并略作修改。将 10 mL ABTS 溶液 (7.0 mmol/L) 与 10 mL 过硫酸钾溶液 (2.45 mmol/L) 等体积混合, 暗反应 12~16 h 产生 ABTS 阳离子自由基后, 将上述混合溶液用体积分数 95% 的乙醇溶液稀释, 测定吸光度 (波长 734 nm) 为 0.70 ± 0.05 后备用。分别取 50 μL 的乳液样品于离心管中, 加入 3 mL ABTS 阳离子溶液, 暗反应 6 min, 测定吸光度 (波长 734 nm), 记为 A_t 。取 50 μL 体积分数 95% 的乙醇溶液, 加入 3 mL ABTS 阳离子溶液混合, 暗反应 6 min, 测定吸光度 (波长 734 nm), 记为 A_0 。ABTS 阳离子自由基清除率 (%) 的计算公式:

$$\text{ABTS 阳离子自由基清除率} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

1.9 模拟体外消化

构建体外模拟消化体系 参考 Gasa-Falcon 等^[21]的方法构建胃和肠两个阶段的体外模拟消化。模拟胃消化阶段: 取 15 mL 乳液样品与 15 mL 胃消化液 (含 2 mg/mL NaCl+7 mg/mL HCl+3.2 mg/mL 胃蛋白酶), 用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调 pH 至 2.0, 于恒温水浴磁力搅拌器中 (37 °C、105 r/min) 反应 2 h。模拟肠消化阶段: 将 30 mL 胃消化液样品用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 加入 3.5 mL 猪胆盐提取物 (54 mg/mL) 和 1.5 mL 盐溶液 (含 10 mmol/L CaCl_2 和 150 mmol/L NaCl), 用 1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 加入 2.5 mL 胰脂肪酶 (用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液配制成为 75 mg/mL), 于恒温水浴磁力搅拌器 (37 °C、105 r/min) 反应 2 h, 每隔 30 min 用 0.1 mol/L NaOH 滴定至 pH 为 7.0。

游离脂肪酸 (FFA) 释放量的测定 肠消化过程中, 每隔 30 min, 即第 30、60、90 和 120 min 测量滴定消耗的 NaOH 体积, 叶黄素乳液体系游离脂肪酸 (FFA, %) 释放量计算公式:

$$\text{FFA} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times m_{\text{NaOH}} \times M_{\text{玉米油}}}{2w_{\text{玉米油}}} \times 100\% \quad (4)$$

式中, V_{NaOH} 为产生 FFA 所消耗的 NaOH 体积 (mL), m_{NaOH} 为 NaOH 溶液的摩尔浓度 (mol/mL), $M_{\text{玉米油}}$ 为玉米油的平均分子量 (g/mol), $w_{\text{玉米油}}$ 为最初乳液中油的质量 (g)。

生物利用率的测定 叶黄素乳液经模拟胃和肠阶段体外消化后, 消化液在 4 °C 条件下 10 000 r/min 离心 20 min 后分 3 层: 上层为胃消化后油形成的乳化层; 中间层为消化后负载叶黄素可被吸收的胶束层; 底层为未消化的蛋白质、胆盐等沉淀物质。用注射器将胶束层取出并经 0.22 μm 滤膜过滤, 测定胶束层的叶黄素含量, 方法见“叶黄素含量的测定”。叶黄素乳液经消化后的生物利用率 (%) 计算公式:

$$\text{叶黄素生物利用率} = \frac{A_L}{A} \times 100\% \quad (5)$$

式中, A_L 代表胶束中叶黄素的含量 ($\mu\text{g/mL}$), A 代表乳液中叶黄素的总含量 ($\mu\text{g/mL}$)。

消化液粒径和电位的测定 将消化过程中的胃消化液和不同时间段的肠消化液稀释 100 倍, 利用激光粒度和 zeta 电位仪测定叶黄素乳液不同消化阶段的粒径和电位。

消化液微观结构的观察 参考 Liu 等^[22] 的方法进行测定。取 30 μL 乳液于离心管中, 分别取出 30 μL 消化过程中的胃消化液和不同时间段的肠消化液于离心管中, 同时加入 10 μL 0.1% (质量分数) 的尼罗红染液 (甲醇溶解) 和 10 μL 1.0% (质量分数) 的尼罗蓝染液 (蒸馏水溶解), 在暗处反应 15 min 后取 10 μL 混合液于载玻片上, 盖上盖玻片, 利用激光扫描共聚焦显微镜在 100 \times 油镜下观察, 拍照分辨率为 1024 \times 1024。尼罗蓝染液对蛋白质进行染色, 在激发波长为 633 nm 和检测波长为 618~710 nm 下观察呈绿色; 尼罗红染液对油相进行染色, 在激发波长为 488 nm 和检测波长为 580~620 nm 下观察呈红色。

1.10 数据分析

数据使用 Origin 9.0 软件作图, 数据间的显著性差异采用 SPSS Statistics 24.0 软件进行方差分析 (ANOVA), 通过 Duncan 氏的多范围检验测定各平均值之间的差异显著性 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 pH 和热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液粒径的影响

在 pH 7.0 时, 未经热处理的 TPI 乳液平均粒径较大 (771.37 nm), 随着贮藏时间的延长, 乳液粒径明显增大; 而当 pH 值为 3.0 和 10.0 时, 乳液的粒径减小 ($P < 0.05$), 随着贮藏时间的延长, 乳液粒径缓慢增加 (图 1)。经 70 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 30 min 后, 负载叶黄素的 TPI 乳液粒径明显减小 ($P < 0.05$), pH 3.0、7.0 和 10.0 时乳液粒径分别为 489.29、490.33 和 532.20 nm。

2.2 pH 和热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液中叶黄素含量的影响

pH 7.0 和 10.0 时, 未经热处理的 TPI 乳液中叶黄素含量分别为 (193.99 \pm 1.64) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 (191.26 \pm 7.00) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 接近添加叶黄素的理论值; 而 pH 3.0 时, 新制备的乳液中叶黄素含量明显减少, 仅剩 (175.37 \pm 3.24) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在实验条件下, 乳液经 70 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 30 min 后, 叶黄素含量未发生显著变化 ($P > 0.05$)。随着贮藏时间的增加, 经热处理的乳液中, 叶黄素的含量逐渐变化, pH 7.0 条件下乳液贮藏 7 d, 叶黄素含量明显下降 ($P < 0.05$), 而 pH 10.0 条件下, 乳液在贮藏 14 d 时, 叶黄素含量才

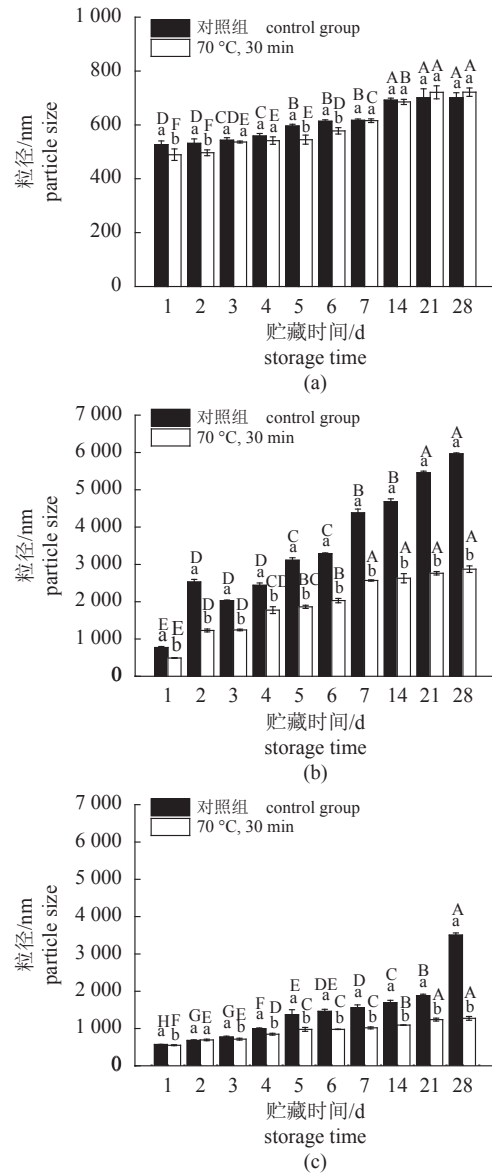


图 1 不同 pH 条件下热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液粒径的影响

(a) pH 3.0, (b) pH 7.0, (c) pH 10.0; 小写字母代表相同贮藏时间不同热处理之间有显著差异 ($P < 0.05$), 大写字母代表同种热处理不同贮藏时间之间有显著差异 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 1 Influence of heat treatment on the particle size of lutein-loaded TPI emulsion under different pH conditions

(a) pH 3.0, (b) pH 7.0, (c) pH 10.0; different lowercase letters represent significant differences between different heat treatments at the same storage time ($P < 0.05$), different capital letters represent significant differences between the same heat treatments with different storage times ($P < 0.05$), the same below.

开始下降 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 pH 和热处理对负载叶黄素 TPI 乳液乳析指数的影响

负载叶黄素的 TPI 乳液乳析指数和实物图分

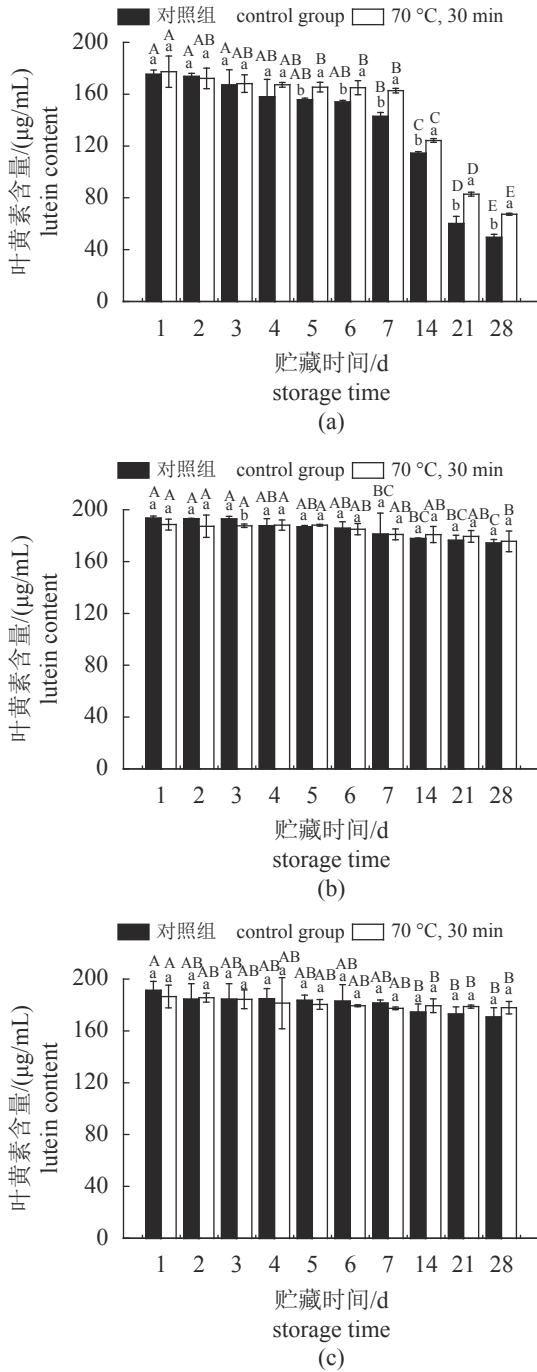


图2 不同 pH 条件下热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液中叶黄素含量的影响

Fig. 2 Effect of heat treatment on the lutein content in lutein-loaded TPI emulsion under different pH conditions

别如图 3 和图 4, 中性条件下, pH 7.0 时, 未经热处理的负载叶黄素 TPI 乳液第 3 天就开始出现底部水层析出现象, 贮藏 28 d, 乳析指数达 56.67%±1.36%。pH 10.0 时, 乳液贮藏 7 d 内, 乳析指数保持不变, 乳液没有明显分层, 而 1 周后开始出

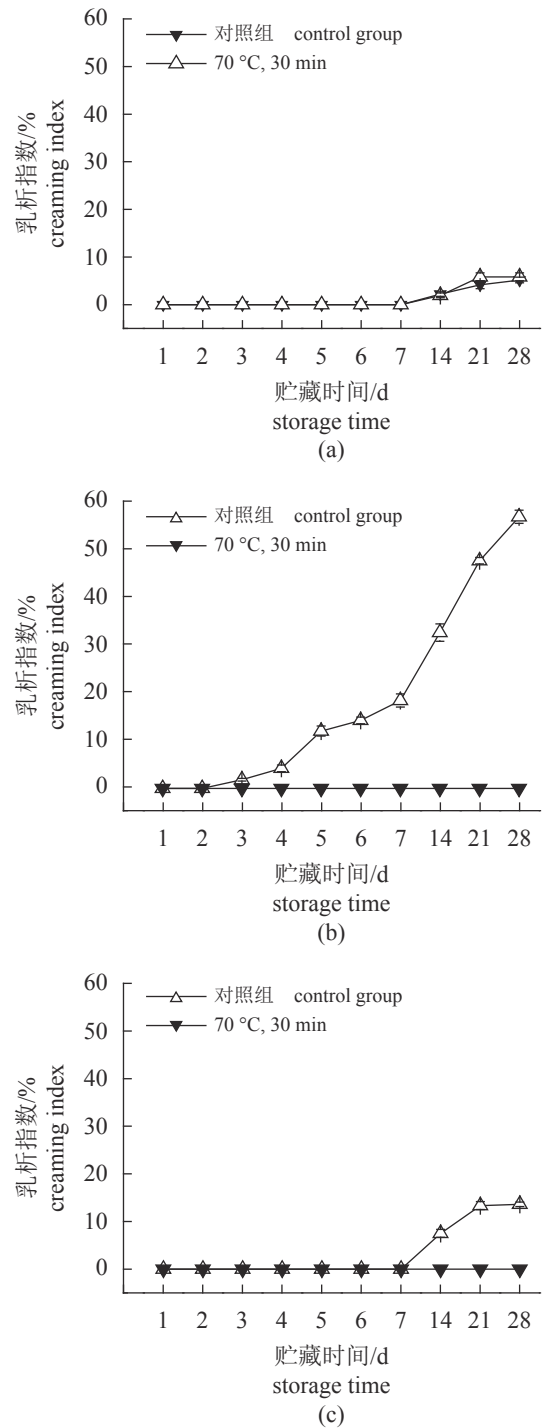


图3 不同 pH 条件下热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液乳析指数的影响

Fig. 3 Effect of heat treatment on the creaming index of lutein-loaded TPI emulsion under different pH conditions

现油相析出现象。pH 3.0 时, 负载叶黄素的 TPI 乳液出现油层上浮和色素析出, 贮藏第 7 天, 底部可以明显观察到叶黄素沉淀, 且未经热处理的叶黄素乳液底部色素沉淀更明显。经过热处理后,

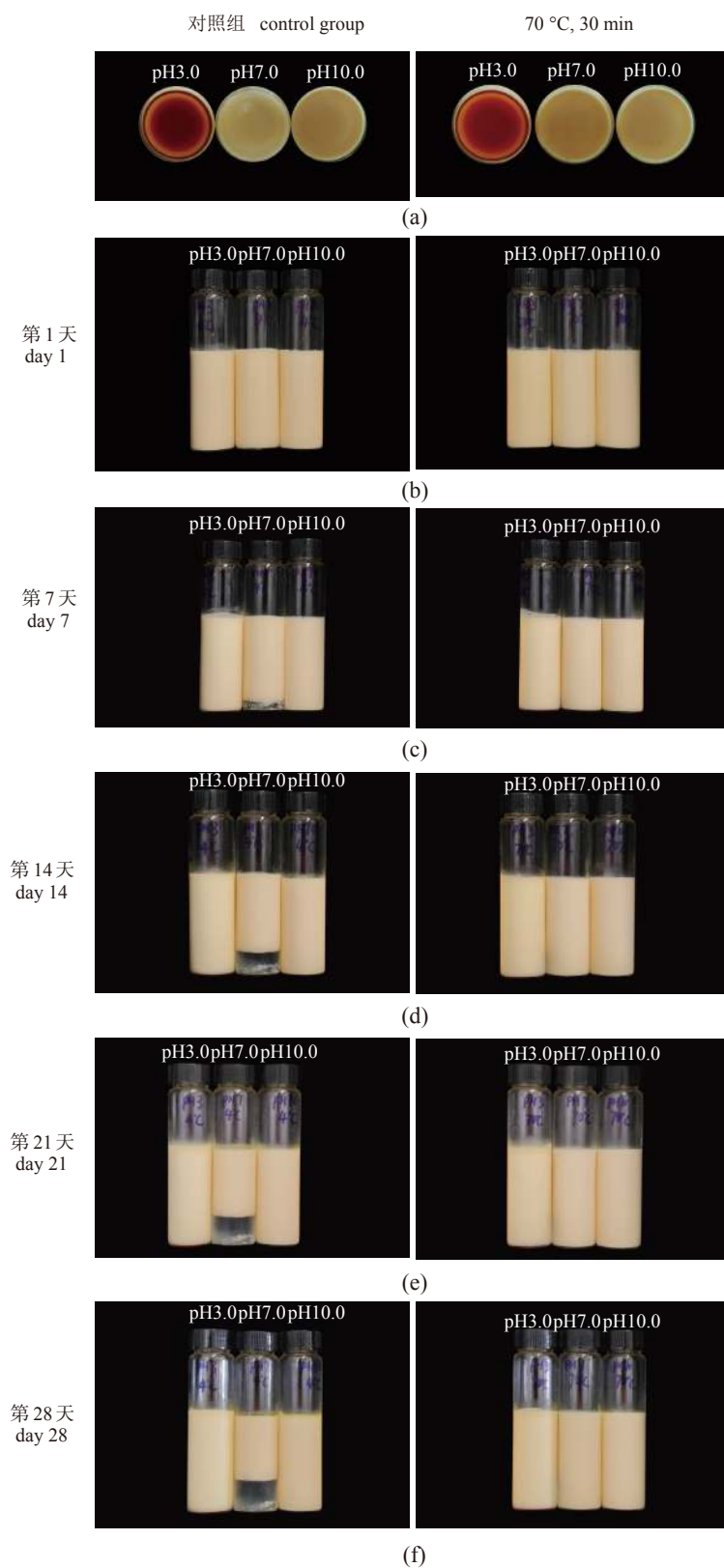


图4 负载叶黄素的TPI乳液实物图

(a) 未经热处理和加热处理的乳液第7天瓶子底部的拍照情况；(b)~(f) 分别是未经热处理和加热处理的乳液第7、14、21、28天的拍照情况。

Fig. 4 Visual image of lutein-loaded TPI emulsion

(a) pictures taken at the bottom of the bottle on day 7 of the emulsion without and with heat treatment. (b)-(f) pictures taken on days 7, 14, 21 and 28 of the emulsion without and with heat treatment, respectively.

pH 7.0 和 10.0 条件下的乳液贮藏 28 d 均未出现分层。

2.4 pH 和热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液体外抗氧化活性的影响

pH 值分别为 3.0、7.0 和 10.0 时, 未经热处理的 TPI 乳液中叶黄素的 DPPH 自由基清除率分别为 $52.18\% \pm 1.90\%$ 、 $32.31\% \pm 0.51\%$ 和 $23.88\% \pm 2.92\%$ 。在酸性 (pH 3.0) 条件下, 叶黄素乳液的 ABTS 自由基清除率最低, 热处理后, pH 3.0、7.0 和 10.0 的叶黄素乳液的 ABTS 阳离子自由基清除率显著增加 ($P < 0.05$), 分别为 $48.21\% \pm 1.06\%$ 、 $59.17\% \pm 0.66\%$ 和 $63.39\% \pm 1.64\%$ (图 5)。

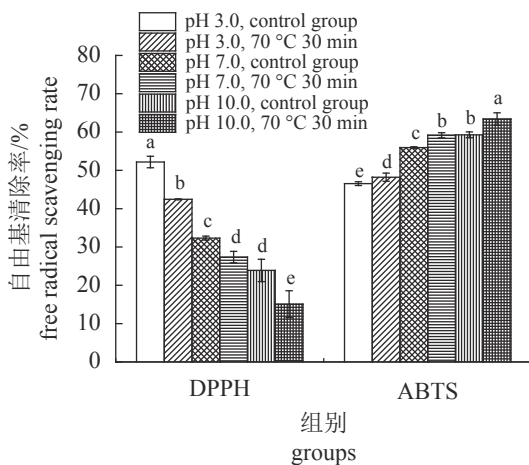


图 5 不同 pH 条件下热处理对 TPI 乳液中叶黄素的体外抗氧化活性的影响

不同小写字母代表不同 pH 和不同热处理之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Effect of heat treatment on the antioxidant activity *in vitro* of lutein-loaded in TPI emulsion under different pH conditions

Different lowercase letters represent significant differences between different pH and heat treatment groups ($P < 0.05$).

2.5 负载叶黄素的 TPI 乳液游离脂肪酸释放量和生物利用率的变化

游离脂肪酸释放量曲线如图 6 所示, 未经热处理的乳液经胃和肠模拟消化 30 min 后, 其游离脂肪酸的释放速率: pH 3.0 > pH 10.0 > pH 7.0。肠消化进行到 120 min, 叶黄素乳液游离脂肪酸释放量: pH 10.0 > pH 7.0 > pH 3.0。经 70 °C 热处理 30 min 后, TPI 乳液游离脂肪酸的释放量比未经热处理的叶黄素乳液游离脂肪酸释放量高。其中碱处理结合热处理的负载叶黄素的 TPI 乳液的游离脂肪酸释放量最高达 $95.41\% \pm 0.60\%$ 。负载叶黄素的 TPI 乳液生物利用率如表 1 所示, 未经热处理的叶黄素乳液生物利用率: pH 10.0 > pH 7.0 > pH 3.0,

经过热处理后的叶黄素乳液的生物利用率: pH 10.0 > pH 7.0 > pH 3.0, 且经 70 °C 热处理 30 min 后, pH 3.0 和 7.0 的叶黄素乳液的生物利用率比未经热处理的乳液生物利用率显著升高 ($P < 0.05$)。

2.6 模拟体外消化过程中负载叶黄素的 TPI 乳液粒径和电位的变化

在模拟体外消化的过程中, 乳液的粒径变化如图 7 所示, 胃阶段乳液的粒径相对较小, 经肠消化后乳液粒径明显增大后减小 ($P < 0.05$)。胃消化阶段, 未经热处理的酸性 (pH 3.0) 负载叶黄素的 TPI 乳液粒径比中性 (pH 7.0) 和碱性 (pH 10.0) 叶黄素乳液的粒径大。随着肠消化进行到 60 min 以上, 乳液表面净电荷不断增加 (图 8), 其中 pH 7.0 和 3.0 的叶黄素乳液电位在肠消化过程中显著增加 ($P < 0.05$), 且变化较大。pH 7.0 和 10.0 时, 经热处理后, 大部分乳液在肠消化阶段的粒径比未经热处理的粒径大。当模拟肠消化进行到 120 min 时, 乳液的粒径和电位较 60 min 时小。

2.7 模拟体外消化过程中负载叶黄素的 TPI 乳液微观形态的变化

通过激光共聚焦显微镜进一步观察负载叶黄素的 TPI 乳液体外消化过程中微观形态的变化, 油滴经染色后在显微镜下呈红色, 蛋白质经染色后在显微镜下呈绿色。在胃消化阶段, 经热处理后负载叶黄素的 TPI 乳液液滴的尺寸更小 ($P < 0.05$), 脂肪液滴在肠消化 60 min 阶段明显增大。共聚焦扫描显微图像还表明, 油滴外层绿色染色的蛋白质含量随着消化时间的进行逐渐下降。热处理后, 负载叶黄素的 TPI 乳液液滴的尺寸更小 (图版-4, 10, 16)。脂肪液滴在肠消化 60 min 阶段明显增大 (图版-5, 11, 17)。油滴外层绿色染色的蛋白质含量随着消化的进行逐渐下降 (图版-3, 6, 9, 12, 15, 18)。

3 讨论

3.1 pH 和热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液粒径的影响

乳液的粒径大小直接影响其稳定性。根据 Stockes 规律, 颗粒越小, 沉降速度越慢, 乳液越稳定^[23]。在极端酸性 (pH 3.0) 和碱性 (pH 10.0) 条件下, 蛋白质分子侧链氨基及羧基发生解离、展开和重排, 使蛋白质分子表面净电荷增大, 分子间静电斥力增强, 液滴不易发生聚集^[24], 乳液粒

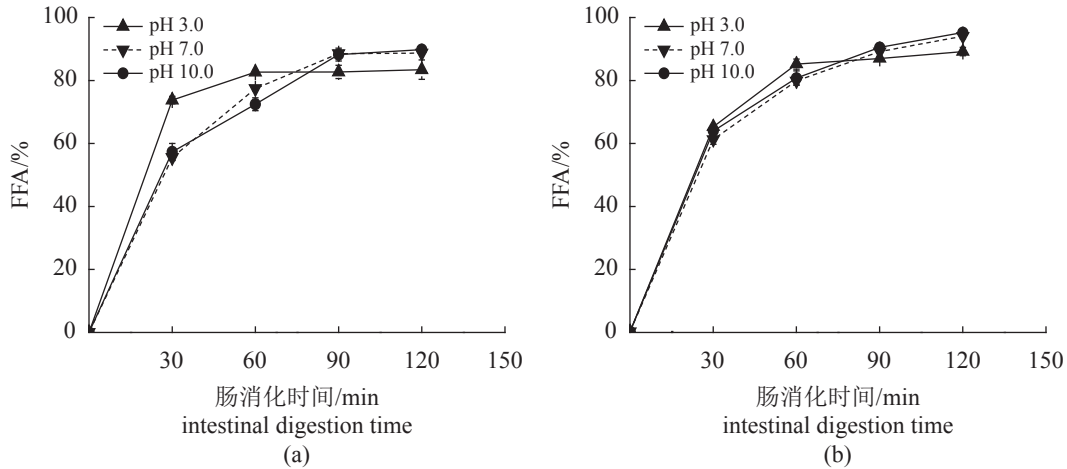


图 6 不同 pH 条件下热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液游离脂肪酸释放量的影响

(a) 和 (b) 分别代表未经热处理的乳液和加热处理的乳液, 下同。

Fig. 6 Effect of heat treatment on the release of free fatty acids (FFA) from lutein-loaded TPI emulsion under different pH conditions

(a) and (b) represent emulsion without and with heat treatment, respectively, the same below.

表 1 不同 pH 条件下热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液生物利用率的影响

Tab. 1 Effect of heat treatment on bioavailability of lutein-loaded TPI emulsion under different pH conditions

pH	对照组 control group	70 °C, 30 min
3.0	16.98±2.75 ^a	20.52±1.57 ^a
7.0	18.65±1.06 ^d	35.69±2.06 ^b
10.0	36.74±0.17 ^{ab}	39.38±2.77 ^a

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$).
Notes: Different letters mean significant difference ($P<0.05$).

径比中性 (pH 7.0) 条件下的粒径小, 且随着贮藏时间的增加, 乳液的粒径增加速率减小。热处理破坏蛋白质聚集体内部的二硫键, 将原来被掩盖的一些非极性基团暴露在界面, 增强界面蛋白的柔韧性和表面净电荷, 分子间斥力增强, 液滴尺寸减小且不易聚集^[25]。在贮藏过程中, 加热处理后的乳液粒径增加趋势较为缓慢, 乳液的稳定性有所提高, 这是因为热处理使叶黄素油滴与蛋白质之间的结合作用加强, 分子间和分子内相互作用增强, 增强了乳液抗流动性, 阻止贮藏过程中油滴上浮和聚集^[26]。因此, 从粒径反映的乳液物理稳定性角度分析, pH 调节和热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液稳定性有利。

3.2 pH 和热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液中叶黄素含量的影响

添加含 0.2% (质量分数) 叶黄素的玉米油于

TPI 溶液中, 油水体积比 1 : 9, 高压均质制备负载叶黄素的 TPI 乳液, 乳液中叶黄素的理论含量为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。叶黄素在酸性条件下不稳定, 制备过程中发生了明显降解。已有的研究表明, 类胡萝卜素在酸性环境中, 共轭链中的碳原子易质子化, 从而导致其加速降解和异构化^[27]。在实验条件下, 乳液经 70 °C 热处理 30 min 后, 叶黄素含量未发生显著变化 ($P>0.05$), 表明乳液对叶黄素有一定的保护效果。热处理导致蛋白质结构展开后在界面上构象重排, 界面强度增加^[28], 乳液具有一定的热抵抗能力。TPI 乳液体系能作为界面屏障阻碍叶黄素与外界环境直接接触, 避免叶黄素在 70 °C 下发生降解。研究结果与负载叶黄素的酪蛋白乳液稳定性类似, 经 60 和 80 °C 热处理 30 min, 叶黄素含量没有明显变化^[8]。因此, 乳化作用对叶黄素具有一定的保护作用, 且碱性下热处理可以有效延缓叶黄素的降解, 增加叶黄素的热稳定性。

3.3 pH 和热处理对负载叶黄素 TPI 乳液乳析指数的影响

重力分离是食品乳液中最常见的不稳定形式之一, 较大颗粒在重力等因素的影响下, 移动更快而更易发生相互碰撞^[13]。研究结果表明, 酸性条件下乳液的粒径和乳析指数等物理稳定性参数改善, 但是色素没能成功被包裹或叶黄素结构发生变化和降解而析出。类胡萝卜素在贮藏过程中可能通过各种机制降解, 如氧化和异构化, 这取

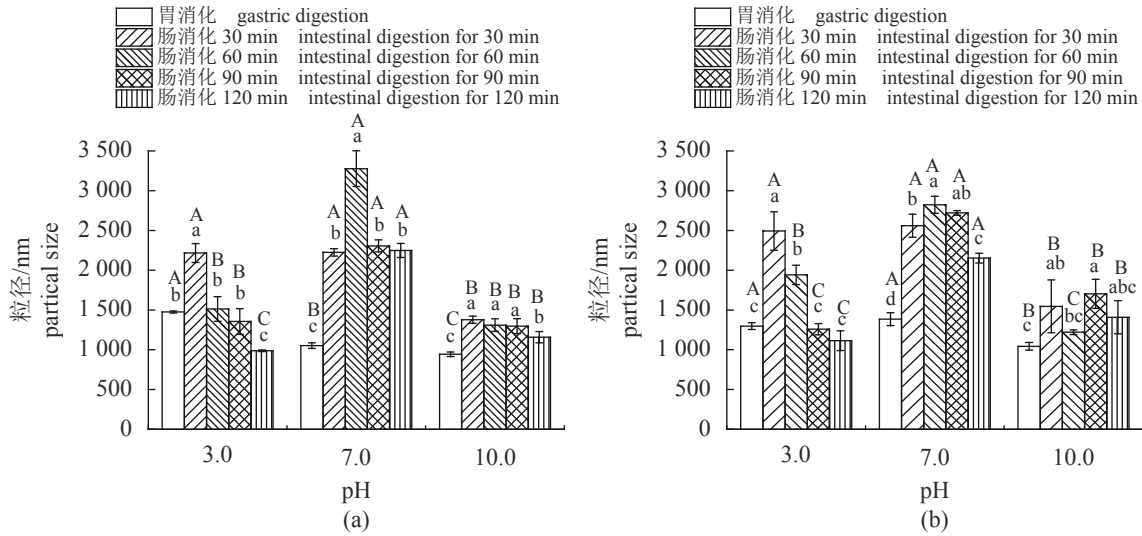


图 7 负载叶黄素的 TPI 乳液在体外模拟胃肠消化过程中粒径的变化

不同大写字母表示相同消化阶段不同 pH 之间差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示同一 pH 不同消化阶段之间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 7 Changes in particle size of TPI emulsion loaded with lutein during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion

Different capital letters indicate significant differences between different pH values at the same digestion stage ($P < 0.05$); different lowercase letters indicate significant differences between different digestive stages at the same pH ($P < 0.05$), the same below.

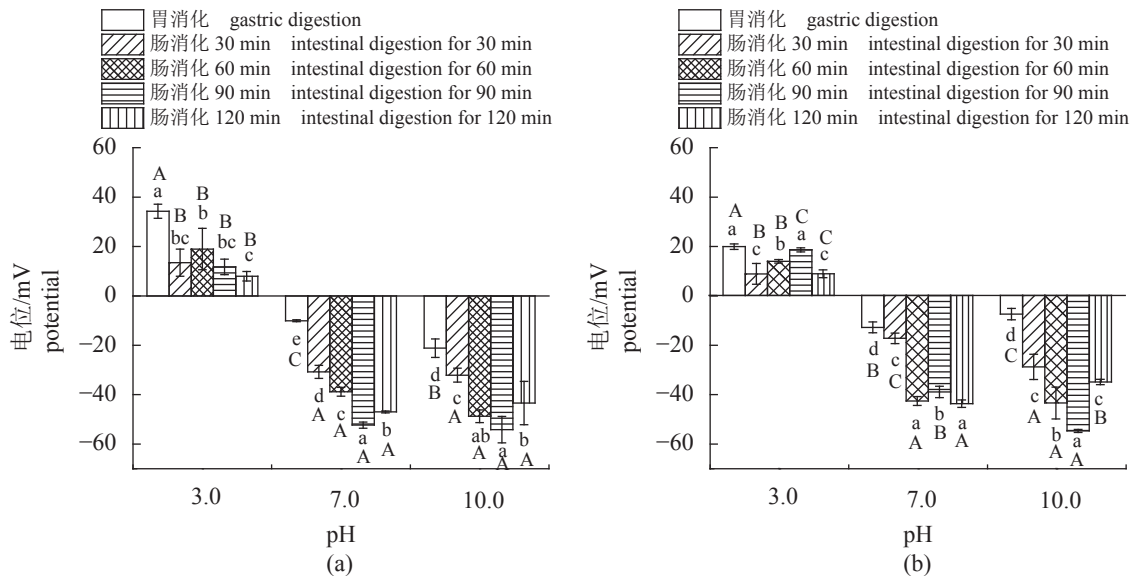


图 8 负载叶黄素的 TPI 乳液在体外模拟胃肠消化过程中电位的变化

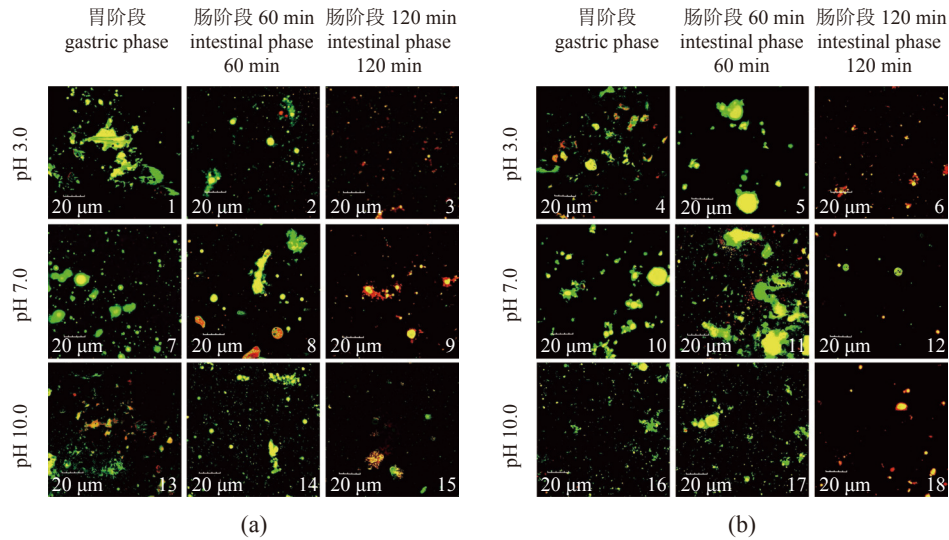
Fig. 8 Changes in zeta potential of TPI emulsion loaded with lutein during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion

决于它们的组成和储存条件。酸性条件下容易发生降解和异构化, 主要通过和氢离子形成离子对, 并裂解成碳正离子^[26]。经过热处理后, pH 7.0 和 10.0 条件下的乳液稳定性好, 可能与液滴表面同种电荷数量增加、液滴之间的静电斥力增加、减少相互聚集等有关。因此, 热处理能够改善负载叶黄素的 TPI 乳液的稳定性, 延长乳液的贮藏期, 但酸性条件不利于乳液体系包裹叶黄素, 无法对叶黄素起到保护作用。

3.4 pH 和热处理对负载叶黄素的 TPI 乳液体外抗氧化活性的影响

乳液体系中存在 H^+ 会对乳液体系的抗氧化剂清除 DPPH 自由基的作用造成一定影响。pH 的变化可对 DPPH 自由基清除能力的测定造成干扰, 具体的干扰机制有待进一步探究。

在酸性条件下叶黄素发生降解, 导致乳液的 ABTS 自由基清除率最低。随着 pH 值增大, 抗氧



图版 负载叶黄素的 TPI 乳液体外模拟胃肠消化过程中的形貌图

(a) 未经热处理的乳液, (b) 加热处理的乳液。

Plate Morphology of TPI emulsion loaded with lutein during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion

(a) the emulsion without heating treatment, (b) the emulsion with heating treatment.

化剂给电子能力增加, 加速叶黄素乳液 ABTS 阳离子自由基清除反应^[6]。在乳液体系的保护下, 叶黄素的热稳定性增强, 热处理之后叶黄素含量变化不显著, 且乳液的稳定性提高, 有利于罗非鱼分离蛋白和叶黄素同时发挥抗氧化作用。因此, 碱性条件结合热处理有利于提高叶黄素乳液的 ABTS 阳离子自由基清除能力。

3.5 负载叶黄素的 TPI 乳液游离脂肪酸释放量和生物利用率的变化

乳液在肠道阶段, 油滴界面被脂肪酶酶解, 生成甘油二酸酯和甘油一酸酯等, 在胆盐和离子(如 Ca^{2+}) 的作用下进一步被消化吸收^[29]。游离脂肪酸释放量曲线可用于比较脂质的消化速率和消化程度。液滴的比表面积会影响脂肪的消化速率, pH 3.0 时乳液粒径小, 脂肪消化速率快。McClements 等^[30]研究了 β -乳球蛋白稳定中链脂肪酸的乳液消化吸收特性, 结果表明脂肪酸的释放率随乳液粒径的减小而增大。pH 3.0 时负载叶黄素的油相和游离的叶黄素更易于暴露, 在胃阶段易被消化, 因此游离脂肪酸的释放量低。经 70 °C 热处理 30 min 后, 乳液界面蛋白结构展开, 易被解离为肽, 具有更高的水解性且易与胆盐结合^[17], 游离脂肪酸释放量提高。此外, 热处理能够改变界面蛋白质的结构, 进而影响脂肪酶与界面吸附层的相互作用, 提高油脂的释放量^[31]。因此, 可以通过单独热处理或者碱条件结合热处理来提高

负载叶黄素的 TPI 乳液的游离脂肪酸释放量。

经胃肠消化后, 将消化液离心并分为 3 层: 底部沉积层、中间胶束层(溶解叶黄素)和上层油层。生物利用率是指从食物中实际释放出的叶黄素渗入混合胶束相的数量, 这部分的叶黄素可被胃肠道吸收^[31]。叶黄素分子在酸性条件下可能发生异构化、质子化或其他降解反应^[27], 导致酸性条件下叶黄素的稳定性差, 生物利用率低。热处理能够改变界面蛋白质的结构, 进而影响脂肪酶与界面吸附层的相互作用, 加快油脂的释放速率。此外, 游离脂肪酸的释放率与生物利用率成正比, Nuntarat 等^[32]的研究也表明, 游离脂肪酸的释放程度和虾青素的生物利用率结果一致。因此, 碱性和热处理有利于提高叶黄素的生物利用率。

3.6 模拟体外消化过程中负载叶黄素的 TPI 乳液粒径、电位和微观结构的变化

肠阶段乳液界面蛋白质被胃蛋白酶水解, 油滴周围的界面层的组成、结构和性质会发生变化, 导致油滴在肠阶段聚结稳定性下降^[33]。酸性条件下, 乳液的界面蛋白质层疏松不紧密, 易与胃蛋白酶结合, 油滴暴露并聚集导致粒径增大, 因此 pH 3.0 时叶黄素乳液游离脂肪酸释放速率快, 但释放量低, 进一步解释了图 4 中 pH 3.0 时乳液的叶黄素沉积在瓶底。随着肠消化进行到 60 min 以上, 静电斥力和空间位阻增强, 脂肪液滴的尺寸减小^[6], 说明液滴内部油相被消化, 三酰甘油在

脂肪酶的作用下产生游离脂肪酸和单酰甘油^[34], 乳液表面净电荷不断增加。pH 7.0 和 10.0 时, 经热处理后负载叶黄素的 TPI 乳液在肠消化阶段的粒径比未经热处理的粒径大, 说明热处理更加有利于游离脂肪酸的释放和叶黄素的消化, 这与叶黄素乳液的生物利用率增大的结果一致。当模拟肠消化进行到 120 min 时, 乳液的粒径和电位反而减小, 说明乳液的界面层已经被消化酶消化, 油滴被进一步消化, 油滴颗粒变小。

在胃消化阶段, 经热处理后, 负载叶黄素的 TPI 乳液絮凝程度更低, 絮凝液滴的尺寸更小 ($P < 0.05$), 较小的絮凝物有利于肠阶段的消化, 因此热处理后乳液游离脂肪酸释放速率加快。脂肪液滴在肠消化 60 min 阶段明显聚结。共聚焦扫描显微图像还表明, 油滴外层绿色染色的蛋白质含量随着消化时间的进行而逐渐减少, 说明蛋白质被酶解, 导致叶黄素和内部油相被释放。

综上所述, 在中性和碱性条件下, 热处理可以提高 TPI 乳液负载叶黄素的稳定性、ATBS 自由基清除能力, 增加生物利用率, 研究结果为 TPI 乳液输送疏水活性成分提供了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Saini R K, Keum Y S. Carotenoid extraction methods: a review of recent developments[J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 90-103.
- [2] Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease[J]. *Nutrients*, 2014, 6(2): 466-488.
- [3] Juturu V, Bowman J P, Deshpande J. Overall skin tone and skin-lightening-improving effects with oral supplementation of lutein and zeaxanthin isomers: a double-blind, placebo-controlled clinical trial[J]. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2016, 9: 325-332.
- [4] Steiner B M, McClements D J, Davidov-Pardo G. Encapsulation systems for lutein: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 82: 71-81.
- [5] Maiani G, Caston M J P, Catasta G, *et al.* Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, 53(S2): S194-S218.
- [6] McClements D J, Saliva-Trujillo L, Zhang R J, *et al.* Boosting the bioavailability of hydrophobic nutrients, vitamins, and nutraceuticals in natural products using excipient emulsions[J]. *Food Research International*, 2016, 88: 140-152.
- [7] 卢筠梦, 赵雪, 徐幸莲. 蛋白界面膜及其评价方法研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(1): 285-292.
Lu J M, Zhao X, Xu X L. Recent progress in protein interfacial film and its evaluation methods[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(1): 285-292 (in Chinese).
- [8] 李季楠, 胡浩, 吴雪娇, 等. 环境因素对叶黄素纳米乳液稳定性及其抗氧化活性的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(19): 32-39.
Li J N, Hu H, Wu X J, *et al.* Effect of environmental conditions on the stability and free radical scavenging capacity of lutein-enriched nanoemulsion[J]. *Food Science*, 2019, 40(19): 32-39 (in Chinese).
- [9] Feng H M, Li C, Tan C P, *et al.* Physicochemical properties and *in vitro* bioaccessibility of lutein loaded emulsions stabilized by corn fiber gums[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(61): 38243-38250.
- [10] 周春霞, 刘诗长, 王瑛, 等. 酸/碱溶解-等电点沉淀法回收罗非鱼蛋白的工艺优化及蛋白组成分析[J]. *海南师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 28(4): 390-395.
Zhou C X, Liu S C, Wang Y, *et al.* Optimizing recovery and composition analysis of tilapia protein by acid/alkaline solubilization-isoelectric precipitation[J]. *Journal of Hainan Normal University (Natural Science Edition)*, 2015, 28(4): 390-395 (in Chinese).
- [11] 陈艾霖, 刘曼曼, 周春霞, 等. pH 值对罗非鱼蛋白-大豆蛋白混合热凝胶特性及体外消化性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(5): 38-45.
Chen A L, Liu M M, Zhou C X, *et al.* Effect of pH value on gelling properties and *in vitro* digestibility of heat-induced gel from tilapia protein-soy protein mixtures[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(5): 38-45 (in Chinese).
- [12] Chalamaiah M, Kumar B D, Hemalatha R, *et al.* Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(4): 3020-3038.
- [13] Damodaran S, Parkin K L. *Fennema's food chemistry*[M]. 5th ed. Boca Raton: CRC Press, 2017.
- [14] 吕沛峰, 王迪, 高彦祥, 等. 食品功能因子传递系统——双层乳液研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(21): 285-292.
Lü P F, Wang D, Gao Y X, *et al.* Progress in bilayer

- emulsions as a delivery system for functional food components[J]. *Food Science*, 2018, 39(21): 285-292 (in Chinese).
- [15] Lin Q Q, Liang R, Zhong F, *et al.* Effect of degree of octenyl succinic anhydride (OSA) substitution on the digestion of emulsions and the bioaccessibility of β -carotene in OSA-modified-starch-stabilized-emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 84: 303-312.
- [16] Wang X, Lin Q Q, Ye A Q, *et al.* Flocculation of oil-in-water emulsions stabilised by milk protein ingredients under gastric conditions: impact on *in vitro* intestinal lipid digestion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 88: 272-282.
- [17] Ye A Q, Wang X, Lin Q Q, *et al.* Dynamic gastric stability and *in vitro* lipid digestion of whey-protein-stabilised emulsions: effect of heat treatment[J]. *Food Chemistry*, 2020, 318: 126463.
- [18] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.5—2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. GB 5009.5-2016 National standard for food safety determination of protein in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [19] Surh J, Decker E A, McClements D J. Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(5): 607-618.
- [20] Guan Y G, Wu J, Zhong Q X. Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene[J]. *Food Chemistry*, 2016, 194: 787-796.
- [21] Gasa-Falcon A, Arranz E, Odriozola-Serrano I, *et al.* Delivery Of β -carotene to the *in vitro* intestinal barrier using nanoemulsions with lecithin or sodium caseinate as emulsifiers[J]. *LWT*, 2021, 135: 110059.
- [22] 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.
- [23] McClements D J. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2010, 1: 241-269.
- [24] Li Q, Wang Z G, Dai C X, *et al.* Physical stability and microstructure of rapeseed protein isolate/gum arabic stabilized emulsions at alkaline pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 88: 50-57.
- [25] Zhao M, Xiong W F, Chen B X, *et al.* Enhancing the solubility and foam ability of rice glutelin by heat treatment at pH12: insight into protein structure[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 103: 105626.
- [26] 丁俭, 张巧智, 韩天翔, 等. 热处理对大豆油脂体乳液特性的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(19): 8-14.
Ding J, Zhnag Q Z, Han T X, *et al.* Effects of heat treatment on properties of soybean oil body emulsion[J]. *Food Science*, 2016, 37(19): 8-14 (in Chinese).
- [27] Mortensen A, Skibsted L H. Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(2): 279-286.
- [28] Shi T, Liu H, Song T, *et al.* Use of *L*-arginine-assisted ultrasonic treatment to change the molecular and interfacial characteristics of fish myosin and enhance the physical stability of the emulsion[J]. *Food Chemistry*, 2021, 342: 128314.
- [29] 姚晓琳, 聂珂, 陈玉, 等. 复合界面对食品乳液中脂肪消化的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(2): 1-7.
Yao X L, Nie K, Chen Y, *et al.* Effect of complex interface on lipid digestion in food emulsion[J]. *Food Science*, 2018, 39(2): 1-7 (in Chinese).
- [30] McClements D J, Li Y. Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2010, 159(2): 213-228.
- [31] McClements D J, Li F, Xiao H. The nutraceutical bioavailability classification scheme: classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2015, 6: 299-327.
- [32] Nuntarat B, Smriti S, Muhammad B S, *et al.* Influence of whey protein-xanthan gum stabilized emulsion on stability and *in vitro* digestibility of encapsulated astaxanthin [J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 272: 109859.
- [33] Qian C, Decker E A, Xiao H, *et al.* Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1440-1447.
- [34] Qiu C Y, Zhao M M, Decker E A, *et al.* Influence of anionic dietary fibers (xanthan gum and pectin) on oxidative stability and lipid digestibility of wheat protein-stabilized fish oil-in-water emulsion[J]. *Food Research International*, 2015, 74: 131-139.

Effect of pH value and heat treatment on storage stability and *in vitro* digestion of lutein-loaded tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein isolate emulsion

CHEN Ailin¹, LIN Qiongni¹, ZHANG Ruolan¹, HONG Pengzhi^{1,2}, ZHOU Chunxia^{1,2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety,
Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Food,

College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Lutein is a highly effective antioxidant, but its application is limited because its stability is easily affected by the environment. Tilapia protein isolate (TPI) is a high-quality animal protein with balanced amino acid ratio and high digestibility. However, due to the limitation of low solubility in water, its emulsifying activity and emulsifying stability are poor, and the application of TPI as emulsifier is limited. The pH value is the most obvious external factor that affects the functional properties of protein, and heat treatment is an essential operation in food processing. In order to improve the stability and bioavailability of lutein, tilapia protein isolate (TPI) was used as emulsifier, and TPI emulsions containing 200 µg/mL lutein were prepared by high pressure homogenization to explore the effects of heat treatment (70 °C, 30 min) on emulsion particle size, creaming index, lutein content, *in vitro* antioxidant activity and *in vitro* digestion at three pH values (3.0, 7.0 and 10.0). The results showed that after heat treatment, the particle size of TPI emulsion with lutein decreased, the emulsion droplets were evenly distributed, and the storage stability was enhanced. At pH 3.0, the stability of TPI emulsion loaded lutein was poor with lutein degradation, and the color of emulsion changed obviously. However, at pH 7.0 and 10.0, heat treatment of 70 °C significantly improved the stability of the emulsion without causing the degradation of lutein, and there was no delamination when stored at 4 °C for 28 days. After simulated gastrointestinal digestion *in vitro*, the release rate of free fatty acids was accelerated. After heat treatment, the bioavailability of lutein increased from 18.65%±1.06% to 35.69%±2.06% at pH 7.0. At pH 7.0, the free fatty acid release was 94.22%±0.60%, the bioavailability was 35.69%±2.06%, and the ATBS free radical scavenging ability was 59.17%±0.66%. The results showed that combined heat treatment under neutral and alkaline conditions can enhance the stability and bioavailability of lutein loaded TPI emulsion and protect the antioxidant activity of lutein, which provides a basis for the development and application of lutein-loaded TPI emulsion.

Key words: *Oreochromis niloticus*; protein isolate; emulsion; lutein; pH; heat treatment; stability; *in vitro* digestion

Corresponding author: ZHOU Chunxia. E-mail: zhoucx@gdou.edu.cn

Funding projects: Science and Technology Project of Guangdong Province (2017A020208067); Innovation Team Construction Project of Modern Agricultural Industrial Technology System of Guangdong Province (2019KJ150)