

体外模拟消化环境中消化酶对 κ -卡拉胶/酪蛋白复合体系流变学特性及微观结构的影响

尚旭珂, 朱斯亮, 郑宝东, 郭娟娟

Effects of Digestive Enzymes on Rheological Properties and Microstructure of κ -Carrageenan/Casein Composite Systems *in vitro* Simulated Digestion Environment

SHANG Xuke, ZHU Siliang, ZHENG Baodong, and GUO Juanjuan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030008>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

慢消化椰油乳液系列体系的构建及其微流变特性和体外消化特性对比

Construction of Slow Digestion Coconut Oil Emulsion System Series and Comparison of Their Microrheological Properties and *in Vitro* Digestive Properties

食品工业科技. 2020, 41(18): 24-32 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.18.004>

抗性糊精对 κ -卡拉胶凝胶特性的影响

Gelation Properties of κ -carrageenan Influenced by Resistant Dextrin

食品工业科技. 2021, 42(9): 19-24 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070006>

薯类淀粉与卡拉胶混凝体系特性及其对肌原纤维蛋白凝胶特性的影响

Characteristics of the Mixed Systems of Tuber Starch and Carrageenan and Its Effect on the Gel Properties of Myofibrillar Protein

食品工业科技. 2020, 41(2): 1-8,15 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.001>

肉桂精油/羟丙基- β -环糊精包合物对 κ -卡拉胶质构和流变特性的影响

Influence of Cinnamon Essential Oil/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex on Texture and Rheological Properties of κ -Carrageenan

食品工业科技. 2019, 40(20): 61-65 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.010>

超高压处理对消减乳源酪蛋白抗原性影响的体外模拟研究

Imitative study on the effects of ultra high pressure treatment on the elimination of allergens from bovine casein *in vitro*

食品工业科技. 2017(09): 70-74 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.005>

大目金枪鱼皮明胶与 κ -卡拉胶复配胶凝胶特性探究

Characteristics Analysis of the Compound Gel of Big-eye Tuna Skin Gelatin and κ -Carrageenan Gel

食品工业科技. 2018, 39(19): 13-19 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.19.003>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

尚旭珂, 朱斯亮, 郑宝东, 等. 体外模拟消化环境中消化酶对 κ -卡拉胶/酪蛋白复合体系流变学特性及微观结构的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 33-41. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030008

SHANG Xuke, ZHU Siliang, ZHENG Baodong, et al. Effects of Digestive Enzymes on Rheological Properties and Microstructure of κ -Carrageenan/Casein Composite Systems *in vitro* Simulated Digestion Environment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 33-41. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030008

· 研究与探讨 ·

体外模拟消化环境中消化酶对 κ -卡拉胶/酪蛋白复合体系流变学特性及微观结构的影响

尚旭珂^{1,2}, 朱斯亮^{1,2}, 郑宝东¹, 郭娟娟^{1,2,*}

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福建福州 350000;

2. 泉州师范学院海洋与食品学院, 福建泉州 362000)

摘要: 卡拉胶与酪蛋白的结合对肠道屏障具有一定的保护作用, 为研究两者在体外消化模拟中消化酶是否是影响多糖或多糖-蛋白复合体系构象转变的主要因素, 本文以 κ -卡拉胶为研究对象, 选择酪蛋白为基质, 探究体外模拟消化环境中消化酶对 κ -卡拉胶/酪蛋白复合体系结合稳定性的影响。结果表明, 消化酶对 κ -卡拉胶与酪蛋白的结合影响不大, 但可以使体系硫酸基团暴露量显著增加, 不利于 κ -卡拉胶的构型。体系中的酪蛋白被分解为低分子量的蛋白质或肽段, 使得复合体系的特征长度增加, 相互作用减弱, 粘弹性下降, 双螺旋结构稳定性降低。本研究为 κ -卡拉胶的安全应用提供了理论依据。

关键词: κ -卡拉胶, 酪蛋白, 消化酶, 体外模拟消化, 流变学特性

中图分类号: TS201.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)04-0033-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030008



本文网刊:

Effects of Digestive Enzymes on Rheological Properties and Microstructure of κ -Carrageenan/Casein Composite Systems *in vitro* Simulated Digestion Environment

SHANG Xuke^{1,2}, ZHU Siliang^{1,2}, ZHENG Baodong¹, GUO Juanjuan^{1,2,*}

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China;

2. College of Oceanology and Food Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

Abstract: The combination of carrageenan and casein had a certain protective effect on the intestinal barrier. In order to study whether the digestive enzymes of the κ -carrageenan and casein *in vitro* digestion simulation were the main factors affecting the conformational transformation of polysaccharides or polysaccharide-protein composite systems, κ -carrageenan was used as the research object and the casein in cow's milk was selected as the target food matrix in this paper to explore the effect of digestive enzymes on the binding stability of κ -carrageenan/casein composite systems *in vitro* simulated digestion. The results showed that gastrointestinal digestive enzymes had little effect on the binding of κ -carrageenan to casein, but could significantly increase the exposure of sulfate groups in the system, which was not conducive to the configuration of κ -carrageenan. The casein in the system was decomposed into low molecular weight proteins or peptides, which increased the characteristic length of the composite system, weakened the interaction, decreased the viscoelasticity, and decreased the stability of the double helix structure. This study provides a theoretical basis for the safe application of κ -carrageenan.

Key words: κ -carrageenan; casein; digestive enzymes; *in vitro* digestion; rheological properties

收稿日期: 2023-03-01

基金项目: 国家自然科学基金 (32001625); 福建省自然科学基金 (2020J05159); 福建省教育厅中青年教师教育科研项目 (JAT190521)。

作者简介: 尚旭珂 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工技术, E-mail: sgxk795@qq.com。

* 通信作者: 郭娟娟 (1989-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 海洋红藻天然活性成分 (糖类) 分离制备及功能活性研究, E-mail: gjfst15@163.com。

卡拉胶(Carrageenan, CGN)是一种从红藻中提取得到的亲水性多糖,其结构由重复的 α -(1,3)-D-半乳糖和 β -(1-4)-3,6-内醚-D-半乳糖交替连接组成^[1-3]。根据二糖单元上硫酸盐基团的数量和位置^[4],卡拉胶有三种主要类型,分别为 κ (κ)-、 ι (ι)-和 λ (λ)-卡拉胶^[5-7],这些结构上的差异决定了不同类型卡拉胶具有不同的凝胶性质。卡拉胶是现代食品加工生产中广泛使用的增稠剂和胶凝剂,具有改善食品质构、结构和物理稳定性的作用,同时也能够改善和丰富食品的感官品质,除此之外,也可在食品生产中达到降低成本和增加价值的效果^[8]。

随着卡拉胶在食品工业中的应用越来越广泛,其安全性和毒理学性质引起了世界各地机构的关注。近年来,虽然卡拉胶已被证明是安全的食品添加剂^[9-11],但也有大量证据指出了卡拉胶的不利影响及其可能的机制^[12-14]。大量实验表明,暴露于0.1%~5%的CGN溶液可能会导致豚鼠、小鼠、兔子、雪貂、猴子产生不同程度的肠道溃疡或肠道炎症^[15-17]。然而,Weiner在2015年的断奶仔猪模型中研究卡拉胶食用安全性时,观察到了不同的现象。实验发现,将卡拉胶添加到婴儿配方奶粉中,添加量 \leq 0.1%对断奶前小猪的体重、肠道组织、炎症因子IL-8、IL-6、TNF- α 无显著影响,也无肠道炎症效应^[18-19]。卡拉胶在水溶液和蛋白溶液中致炎效应的差异性引起了研究人员的思考并展开了大量研究。后续研究发现,酪蛋白是牛乳蛋白中与 κ -卡拉胶结合的关键蛋白^[20-22], κ -卡拉胶含带电硫酸基团^[23],它对牛乳体系的增稠稳定作用体现在 κ -卡拉胶的负电荷硫酸基团与酪蛋白(尤其是 κ -酪蛋白)携带的正电荷胺基以共价键或静电作用稳定结合^[24-26]。除此之外,研究人员还发现摄入酪蛋白溶液或酪蛋白水解液对肠道屏障均有显著的保护作用^[27-29]。

目前国内外对卡拉胶与酪蛋白相互作用的研究主要集中在卡拉胶对蛋白制品的品质改善及物理特性的研究,关于卡拉胶与酪蛋白结合后的生物活性研究尚少。 κ -卡拉胶的构象转变及其与酪蛋白的相互作用可能是引起生物活性改变的重要因素,因此,研究模拟胃肠道消化过程中环境因素对 κ -卡拉胶的构象以及二者相互作用的影响对卡拉胶在食品中的应用具有重要意义。本文以 κ -卡拉胶为研究对象,选择牛乳中的酪蛋白为目标食品基质,研究了消化酶对 κ -卡拉胶/酪蛋白复合体系(κ -Carrageenan/casein, κ -CC)流变学特性及其微观结构的影响。该工作结果不仅解析了胃肠道消化环境消化酶对 κ -CC复合体系物理化学性质的影响,还有利于进一步解析 κ -卡拉胶在不同溶剂载体中的消解行为差异,为卡拉胶在食品中的安全应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

κ -卡拉胶 纯度98%(硫酸基含量为22.15%),

北京索莱宝科技有限公司;酪蛋白酸钠 Sigma(上海)贸易有限公司;氯化钾、磷酸二氢钾、碳酸氢钠、氯化钠、六水合氯化镁、碳酸氢铵、氯化氢、二水氯化钙等 均为分析纯,国药集团试剂有限公司。

ME104E 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HJ-2A 磁力加热搅拌器 上海富雪生物科技有限公司;HH-4 型智能数显恒温水浴锅 上海富雪生物科技有限公司;T 激光纳米粒径分析仪、ADHR-2 旋转流变仪 美国TA公司;动态光散射粒径仪 英国马尔文仪器有限公司;NovaNano-SEM 230 场发射扫描电子显微镜 美国FEI公司; Nicolet iS5 傅里叶变换红外光谱仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液制备

1.2.1.1 酪蛋白溶液的制备 称取酪蛋白酸钠加入蒸馏水中,室温下以1000 r/min 搅拌4 h,加入叠氮化钠(50 mg/L)防止细菌生长,4 °C 过夜,使其充分水和,配制成3%(w/v)酪蛋白贮存液备用。

1.2.1.2 κ -卡拉胶、 κ -CC 样品的制备 分别以去离子水及3%的酪蛋白溶液为溶剂,加入 κ -卡拉胶粉末配制浓度为0.5%(w/v) κ -卡拉胶/酪蛋白混合体系,60 °C 水浴,磁力搅拌20 min。

1.2.1.3 不同消化酶处理 κ -CC 样品的制备 取制备好的 κ -CC 样品两份,每份各25 mL,依次分别加入胃蛋白酶(3200 U/mg)、胰蛋白酶(1000 U/mg) 1.25 mL,使得最终消解混合物中的胃蛋白酶酶活达到2000 U/mL,胰蛋白酶酶活达到2000 U/mL。最后置于37 °C,140 r/min 恒温摇床中,进行体外模拟消化2 h,即可得到目标样品,取出样液用于检测。

1.2.2 κ -CC 复合物 Zeta-电位的测定 利用激光纳米粒径分析仪测定 κ -CC 的电位^[30],测试温度为37 °C,取1 mL 稀释50倍样品于样品池中,折光指数设置为1.33,每个样品平行测定3次。

1.2.3 κ -CC 复合物硫酸基团含量的测定 通过比浊法测量消化酶中 κ -CC 的硫酸根含量^[31]。分别将0.4 mL 消化液与7.6 mL 三氯乙酸混合,并以8000 r/min 离心溶液10 min。向4 mL 所得上清液中,加入1 mL 氯化钡-明胶试剂,并将混合物在室温下静置15~20 min。在360 nm 处测量吸光度。采用以下公式计算 κ -CGN 和 κ -CC 消化液中的游离硫酸基团含量(C_S)。

$$C_S(\%) = \frac{m_2 \times V}{m_1} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中, m_1 : 消化液中 κ -卡拉胶粉末的总重量(mg); m_2 : 暴露于消化液中的游离硫酸基团的重量(mg); V : 消化液的总体积(mL); m_1 、 m_2 通过标准曲线($y=2.0372x-0.0016$, $R^2=0.9947$)确定。

1.2.4 κ -CC 复合物红外光谱分析 参照LI等^[32]的

方法,稍作修改。使用傅里叶红外光谱仪测定消化酶中 κ -CC 的复合物化学结构的变化。称取冷冻干燥后的样品(2 mg)彻底混合,置于研钵中,添加干燥的 KBr,以 1:100(样品:KBr)的比例混匀研磨、压片,采用傅里叶变换红外光谱仪进行测试,波长扫描范围为 4000~400 cm^{-1} 。

1.2.5 κ -CC 复合物微观结构的测定 参照 WANG 等^[33]的方法,稍作修改。将 1.2.1 中制备的样品置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜,经液氮处理后冷冻干燥,将冷冻干燥后的样品用导电胶固定在样品台上,经过喷金处理后,使用 SEM 在电压 5 kV 条件下观察样品的微观结构变化,放大 100 和 200 倍。

1.2.6 κ -CC 复物流变学特性的测定 参考 JIAO 等^[34]的方法,略作修改。所有的流变学测试均使用 DiscoveryDHR-2 旋转流变仪进行测试,探头型号 PP-50,平行板直径 40 mm,平行板间隙 1 mm。取适量样品放置于平板中间,让样品充满板间,吸取多余样品。样品表面覆盖一层薄薄的硅油进行密封,防止测试过程中水分蒸发。样品测试重复三次。

1.2.6.1 应变扫描 通过大振幅振动剪切试验,在给定的应变值 0.01%~1000% 范围内分析样品的线性黏弹区,样品的内部结构在线性黏弹区不发生改变。在角频率 6.28 rad/s,温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 的情况下,测定并分析 κ -CC 复合物线性黏弹区。

1.2.6.2 频率扫描 为了研究体外模拟消化环境中消化酶对 κ -CC 复合物凝胶特性及相互作用的影响,在样品的线性黏弹区内进行角频率扫描,角频率扫描范围设置为 0.01~100 s^{-1} ,温度设置为 4 $^{\circ}\text{C}$,测定不同样品的 G' 和 G'' 。

1.2.6.3 弹性活性链特征长度的计算 κ -CC 复合物网络的弹性活性链特征长度可以通过 Doi-Onuki 模型计算可得到^[35-37],Doi-Onuki 模型的表达式如下:

$$G_0 = \frac{k_B T}{L^3} \quad \text{式 (2)}$$

其中, G_0 是频率为 0.1 Hz 下的储存模量^[38]; k_B 是玻尔兹曼常数, 1.38×10^{-23} J/K; T 是绝对温度。

1.2.7 差示扫描量热分析(DSC) 参考胡颖娜^[39]的方法,稍作修改。通过 DSC 测定消化酶水解对 κ -卡拉胶构象转变的影响。称取 1.2.1.3 中样品 30~50 mg 加入样品池中,以空坩埚作为参比。样品在 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 10 min,以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温至 0 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析模拟体外胃肠道消化过程中消化酶对复合凝胶的影响^[39]。将所有样品稀释至蛋白质浓度为 10 mg/mL,取适量样品缓冲液与样品按 1:3 混匀后煮沸 5 min,将反应后的溶液以 12000 r/min 的转速离心 15 min,取 5 μL 上清液进行 SDS-PAGE 电泳。电泳条件:分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 4%,电压 110 V。电

泳结束后,采用考马斯亮蓝快速染色液染色 2~3 h。染色结束后,用去离子水进行重复洗脱,直至底色基本脱除为止。最后,用凝胶成像仪扫描成像。

1.3 数据处理

所有样品至少制备两次,所有实验一式三份进行。使用 SPSS 软件和 OriginPro V8.5 进行绘图。进行单因素方差分析以确定显著性差异($P < 0.05$),结果使用平均值 \pm 标准差的形式表示。

2 结果与分析

2.1 消化酶对 κ -CC 复合物 Zeta-电位及硫酸基团的影响

粒子表面的电荷密度决定了彼此之间的相互作用,多糖与蛋白表面的电荷密度受到多种因素的影响^[40]。林伟伟^[41]的研究表明这些因素可以通过调节粒子表面的电荷密度或屏蔽作用来影响粒子间的相互缔合。图 1A 展示了 κ -CC 复合体系在经历胃蛋白酶以及胰蛋白酶消化前后的 zeta-电位变化,由于胃蛋白酶以及胰蛋白酶在最适 pH 下才能更好地发挥其生物活性,因此在消化前先将样品 pH 分别调至 3.0、7.0。从图 1A 中可以看出, κ -CC 复合体系的 zeta-电位在蛋白酶消化前后几乎没有发生变化。已有研究表明 κ -卡拉胶与酪蛋白通过静电相互作用形成复合物,因此酪蛋白与 κ -卡拉胶表面电荷密度的变化将直接影响二者间的相互作用^[42]。在消化酶的水解过程中, κ -CC 复合体系的 zeta-电位在胃蛋白酶和胰蛋白酶消化前后没有较大变化,说明消化酶对 κ -卡拉胶与酪蛋白的结合影响不大。

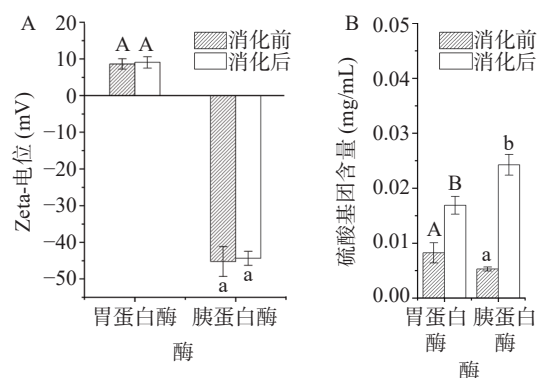


图 1 模拟胃肠道中消化酶对 κ -CC 复合物的 zeta-电位和硫酸基团暴露量的影响

Fig.1 Effect of digestive enzymes in the simulated gastrointestinal phase on the zeta-potential and free sulfate group content of κ -CC complexes

注: A: zeta-电位; B: 硫酸基团暴露量; 不同大/小写字母表示胃蛋白酶/胰蛋白酶消化前后指标变化, $P < 0.05$ 。

此外,本实验还采用了氯化钡-明胶比浊法测定了 κ -CC 复合体系的硫酸基团暴露量。 κ -卡拉胶的构象转变及其与酪蛋白的相互作用是 κ -卡拉胶在乳制品中发挥稳定增稠作用的关键,而硫酸基团作为 κ -卡拉胶的特征基团,影响着 κ -卡拉胶的构象转变。因此,研究硫酸基团的含量对 κ -卡拉胶在食品中的

应用具有重要意义。图 1B 是 κ -CC 复合体系在消化酶水解条件下的硫酸基团暴露量。从图 1B 中可以看出,经蛋白酶水解后, κ -CC 复合体系的消化液中的硫酸基团暴露量显著增加($P<0.01$),其中,胰蛋白酶水解后硫酸基团暴露量的增量更加显著($P<0.01$)。随着蛋白酶的水解,酪蛋白被分解为低分子量的蛋白质或肽段, κ -卡拉胶与酪蛋白间的相互作用减弱,且硫酸基团暴露量显著增加($P<0.01$),而硫酸基团是 κ -卡拉胶的特征基团,影响着 κ -卡拉胶构象的转变,这说明蛋白酶的存在不利于 κ -卡拉胶有序构象的形成^[43-45]。

2.2 消化酶对 κ -CC 复合物特征基团的影响

图 2 是 κ -CC 复合体系在模拟胃肠道蛋白酶消化条件下的红外光谱图。位于 3423.51 cm^{-1} 附近的宽吸收峰为 O-H 伸缩振动引起的氢键特征峰^[42,46],在 1234.78 、 929.67 、 846.36 cm^{-1} 附近的吸收峰分别为硫酸酯基团(O=S=O)、 α -D-3,6-内醚半乳糖和 β -D-4-硫酸基-半乳糖的伸缩振动^[47]。从图 2 中可以看出, κ -CC 复合体系的特征峰强度的变化主要发生在

胰蛋白酶水解后,体系的特征峰强度显著增强。位于 3398.64 cm^{-1} 的 O-H 以及蛋白的酰胺 I 带、酰胺 II 带的伸缩振动明显增强,说明分子间氢键作用在被胰蛋白酶水解后显著增强。在图 2 中可以看到,位于 1235.67 cm^{-1} 处的硫酸酯基团伸缩振动明显增强,说明 κ -卡拉胶的硫酸基团暴露量经胰蛋白酶水解后呈现增加的趋势,这与我们测定的硫酸基团暴露量的结果一致。蛋白酶的水解作用将蛋白质分解为小分子蛋白或肽段,减弱了酪蛋白与 κ -卡拉胶之间的相互作用,从而导致 κ -卡拉胶的硫酸基团暴露量增加。与胰蛋白酶相比, κ -CC 复合体系在胃蛋白酶水解后的红外光谱几乎没有发生变化,说明胃蛋白酶对酪蛋白的水解作用较弱。

2.3 消化酶对 κ -CC 复合物微观结构的影响

在本研究中,SEM 被用于探究模拟胃肠道消化过程中蛋白酶的水解作用对 κ -CC 复合物微观结构的影响。图 3 显示了 κ -CC 复合体系在胃蛋白酶和胰蛋白酶水解前后的微观结构的变化。我们分别在 pH3.0 和 pH7.0 条件下研究了 κ -CC 复合体系在蛋

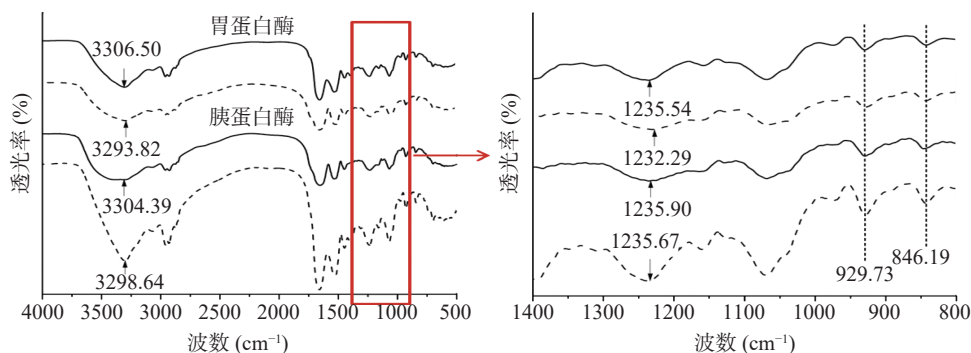


图 2 模拟胃肠道中消化酶水解前后 κ -CC 复合物的红外光谱图

Fig.2 FT-IR spectra of κ -CC complexes before and after the hydrolysis of digestive enzymes in the simulated gastrointestinal phase
注:实线代表蛋白酶水解前,虚线代表蛋白酶水解后。

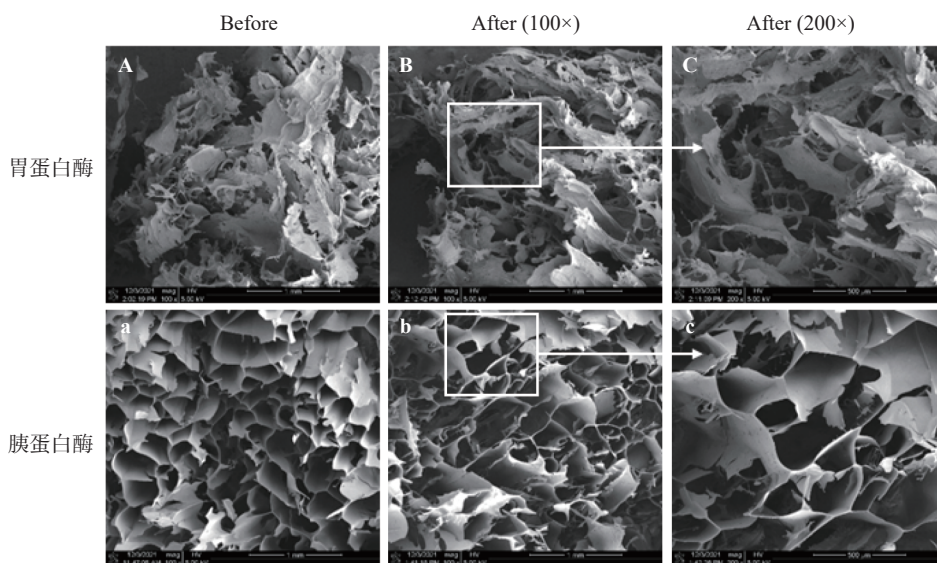


图 3 模拟胃肠道中消化酶的水解对 κ -CC 复合物微观结构的影响

Fig.3 Effects of the hydrolysis of digestive enzymes in the simulated gastrointestinal phase on the microstructure of κ -CC complexes
注:图 A、图 B、图 C 为胃蛋白酶;图 a、图 b、图 c 为胰蛋白酶。

白酶水解后的微观结构的变化, 图 3A~图 3C 为 κ -CC 复合体系在胃蛋白酶水解前后的微观结构。从图中可以看出, κ -CC 复合体系在胃蛋白酶消化前由于环境为酸性 pH 的原因, 呈现为较大的凝块结构, 在经过胃蛋白酶消化 2 h 后, 凝块依然存在, 但相比消化前, 凝块的结构稍显松散, 可能是消化过程中胃蛋白酶的水解作用引起的。图 3a~图 3c 为胰蛋白酶水解前后的微观结构图, 从图中可以清楚地看到 κ -CC 复合体系的网络结构在胰蛋白酶消化 2 h 后局部遭到破坏, 孔洞的均一程度下降, 说明胰蛋白酶的水解作用使得 κ -CC 复合体系的无序程度升高, 网络结构的稳定性下降。凝胶网络结构的紧密程度能够侧面反映高分子聚合物相互作用的程度。在蛋白酶的消解作用下, κ -CC 复合物的构象发生变化, 具体表现为水解之后网络结构孔洞大小不一, 分布不均匀, 很难形成有序的网络结构。

2.4 消化酶对 κ -CC 复合物动态流变学特性的影响

2.4.1 应变扫描分析 对于高分子流体来说, 在其流动过程中会伴随着较为强烈的弹性形变, 因此研究 κ -卡拉胶以及 κ -卡拉胶-酪蛋白体系的动态流变行为很有必要。动态测试有两个独立参数, 弹性模量 G' 和粘性模量 G'' , 在 κ -卡拉胶以及 κ -卡拉胶-酪蛋白复合物形成凝胶的过程中分别反应高分子流体的弹性性质和粘性性质。一般来说, 物质在线性黏弹区内能保证自身内部结构的完整性, 因此在线性黏弹区进行流变测定能够为复杂流体的微观结构提供有意义的信息。从图中可以看出 κ -卡拉胶溶液以及 κ -卡拉胶-酪蛋白复合物 G' 和 G'' 在较小的应变下保持稳定。当应变增加时, G' 和 G'' 在屈服前达到最大值, 随后模量急剧下降, 这是由于大剪切作用导致聚合物内部的网络结构和化学键被破坏, 这个点即为样品线性黏弹区和非线性黏弹区的临界点, 聚合物的空间结构在线性黏弹区内处于破坏与恢复的动态平衡中。模拟胃肠道中的蛋白酶水解条件下 κ -CC 复合体系的应变扫描如图 4 所示, 从图中可得, κ -CC 复合体系的线性黏弹区应变范围为 0.01%~1%, 为保证在聚合物

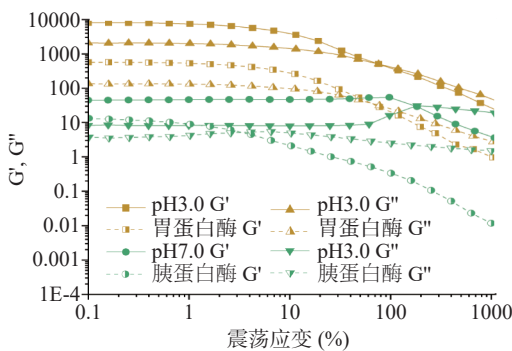


图 4 模拟胃肠道中消化酶对 κ -CC 复合体系应变扫描的影响

Fig.4 Effects of the digestive enzymes in the simulated gastrointestinal phase on the strain sweeps of κ -CC complexes

结构的相对完整, 故选择 0.1% 应变值进行频率扫描。

2.4.2 频率扫描分析 稳态剪切粘度测量使我们对微观结构和宏观性质之间的联系了解有限, 动态流变学测定可用于更好地研究 κ -卡拉胶和 κ -CC 复合体系的内部结构和粘弹性行为之间的关系。如图 5 所示, G' 和 G'' 的值与频率呈正相关, 表现出强烈的频率依赖性。两种模量的频率依赖性表明 κ -卡拉胶和 κ -CC 复合体系存在强大的分子间网络, 主要由非共价物理交联组成。角频率扫描能反映样品不同时期的性能, 低频数据表示长期性能而高频数据表示短期性能。通常储存模量 (G') 和耗能模量 (G'') 分别代表样品的弹性性能和粘性性能。图 5 显示了 κ -CC 复合体系经胃蛋白酶和胰蛋白酶消化 2 h 后粘弹性的变化。从图中可以看出, κ -CC 复合体系在蛋白酶水解前后始终保持 $G' > G''$, 说明 κ -CC 复合体系在这过程中保持弱凝胶的特性, 在经历蛋白酶水解 2 h 后, 体系的弹性和粘性显著下降, 说明蛋白酶的水解破坏了体系内部的网络结构, 导致粘弹性降低, 稳定性下降。

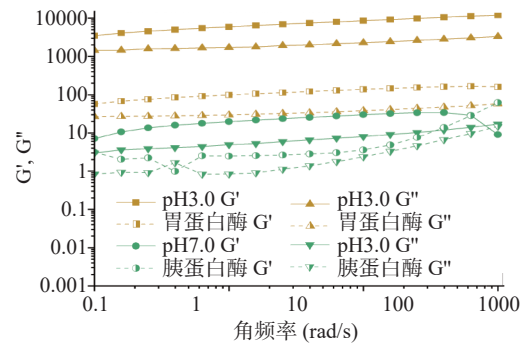


图 5 模拟胃肠道中消化酶对 κ -CC 复合体系频率扫描的影响

Fig.5 Effects of the digestive enzymes in the simulated gastrointestinal phase on the frequency sweeps of κ -CC complexes

2.4.3 弹性活性特征长度计算 特征长度可以很好地反映蛋白质和多糖相互作用力的强弱, 特征长度越小, 相互作用力越强烈, 结构越紧密。反之, 相互作用力越弱, 结构越松散。模拟胃肠道中消化酶水解条件下 κ -卡拉胶溶液与 κ -CC 复合体系的弹性活性特征长度, κ -卡拉胶初始样品的弹性活性特征长度为 288.1 ± 20.3 nm, 而 κ -CC 复合体系的弹性活性特征长度为 31.3 ± 0.8 nm, 说明 κ -卡拉胶与酪蛋白的复合大大缩短了分子链间的距离。多糖的分子链不稳定, 当外界环境条件发生变化时, 其弹性活性特征长度也随之变化, 同时也反映了其分子链的动态变化。我们还计算了 κ -CC 复合体系在胃蛋白酶和胰蛋白酶水解后的特征长度, 分别为 28.2 ± 9.2 nm、 96.7 ± 16.1 nm, 消化酶的水解作用使得分子链间距离增大, 其中胰蛋白酶的作用更加显著。

2.5 消化酶对 κ -CC 复合体系中 κ -卡拉胶构象转变的影响

研究了模拟胃肠道消化体系消化酶对 κ -CC 复合体系中 κ -卡拉胶构象转变的影响。图 6 及表 1 显示了 κ -卡拉胶溶液及 κ -CC 复合体系中 κ -卡拉胶在降温过程中的热流密度随温度的变化、构象转变温度和热焓值。

表 1 κ -卡拉胶及 κ -CC 在模拟胃肠道中消化酶条件下的构象转变温度(T_{s-g})及焓值

Table 1 Conformational transition temperature (T_{s-g}) and enthalpy of the κ -CGN and κ -CC complexes at the digestive enzymes in the simulated gastrointestinal phase

样本	κ -CGN		κ -CC	
	T_{s-g} (°C)	焓值(J/g)	T_{s-g} (°C)	焓值(J/g)
空白对照	22.08	19.59	23.63	32.42
胃蛋白酶	-	-	-	-
胰蛋白酶	-	-	20.20	13.57

如图 6A 所示, κ -卡拉胶溶液的 DSC 曲线在降温过程中均出现放热峰, 峰值位置对应溶胶-凝胶转

变点, 表明 κ -卡拉胶溶液在降温过程中形成了凝胶网络结构。从图中可以看出, κ -卡拉胶的放热峰出现在 22.08 °C, 这与 ZHAO 等^[48]的研究结果接近。与单独的 κ -卡拉胶溶液相比, κ -CC 复合体系中 κ -卡拉胶在降温过程中的放热峰的位置出现在 23.63 °C (图 6B~图 6D), 向高温方向偏移了 1.55 °C, 说明酪蛋白与 κ -卡拉胶间的静电相互作用提高了 κ -卡拉胶的溶胶-凝胶转变点。 κ -CC 复合体系在经胰蛋白酶水解后, 构象转变温度向低温方向移动, 说明体系的凝胶稳定性降低。

2.6 消化酶对 κ -卡拉胶与酪蛋白之间相互作用的影响

为了研究消化过程中蛋白质的水解是否会影响到 κ -卡拉胶与酪蛋白之间的相互作用, 本实验使用 SDS-PAGE 电泳来分析酪蛋白(CA)和 κ -CC 复合体系经消化酶水解不同时间后的蛋白质组成, 如图 7 所示。

图 7A 为经胃蛋白酶水解的消化物, 从图中可以看到, 未经消化的酪蛋白条带的分子量分布在 25~35 kDa, 随着消化时间的延长, 没有观察到低分子量条带的产生, 说明胃蛋白酶对酪蛋白没有消解作用,

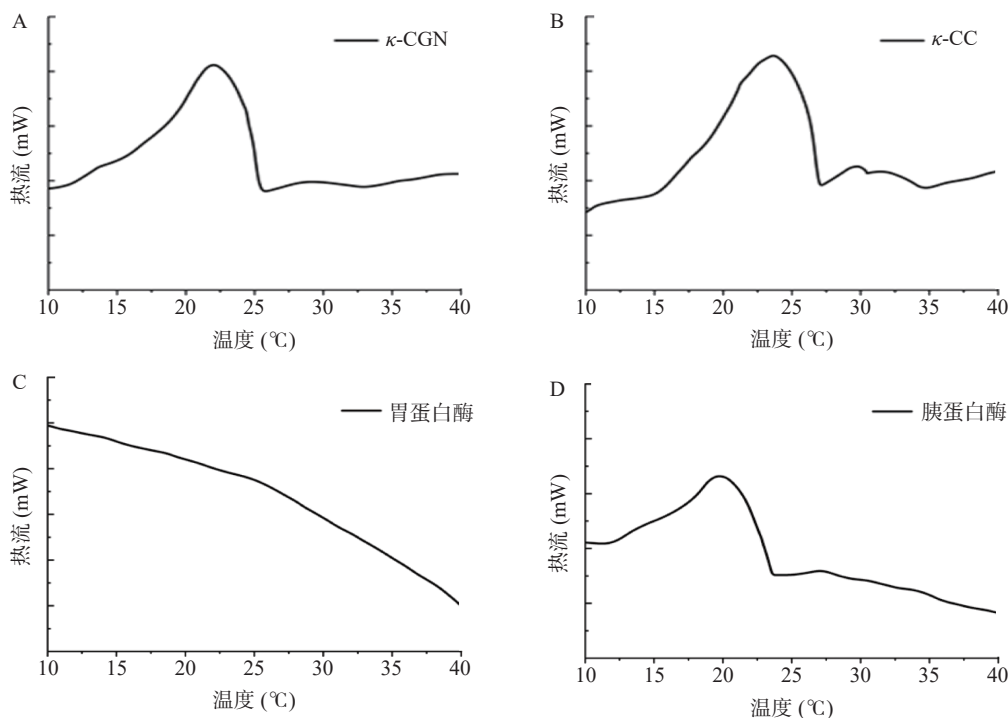
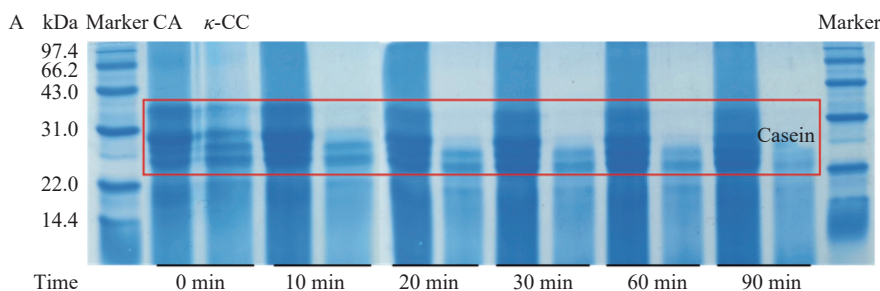
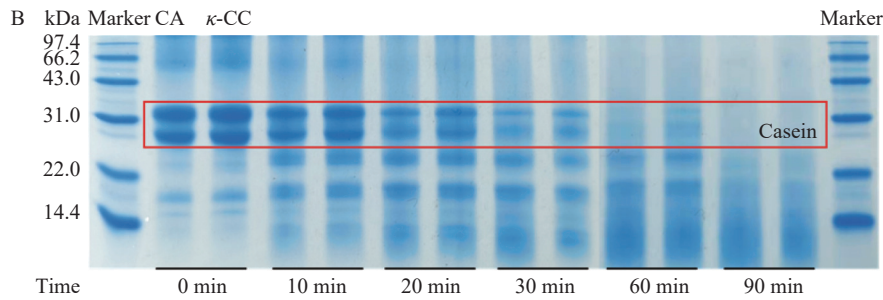


图 6 降温过程中模拟胃肠道在消化酶条件下 κ -CGN 溶液及 κ -CC 复合体系的热流密度随温度的变化趋势
Fig.6 Heat flows of κ -CGN and κ -CC complexes at digestive enzymes in the simulated gastrointestinal phase upon cooling
注: A: κ -CGN 溶液; B、C、D: κ -CC 复合体系。



图 7 酪蛋白及 κ -CC 复合体系体外模拟消化不同时间的 SDS-PAGE 图Fig.7 SDS-PAGE of digesta from casein and κ -CC samples in the different residence times

注: A: 胃蛋白酶; B: 胰蛋白酶。

酪蛋白在模拟胃环境中酸性 pH 下形成了较大的凝块,不利于蛋白质的水解^[49]。图 7B 展示了酪蛋白和 κ -CC 复合体系经胰蛋白酶水解的消化物,从图中可以看出,随着胰蛋白酶消化时间的延长,酪蛋白的条带逐渐模糊,而低分子量段 17 kDa 左右的条带颜色逐渐加深,说明酪蛋白逐渐被分解为小分子量的蛋白或肽段^[45]。通过对比酪蛋白与 κ -CC 复合体系的消化情况,可以看到酪蛋白在胰蛋白酶消化 60 min 后几乎完全水解,而 κ -CC 复合体系的完全水解大约发生在消化 90 min 后,由此可见, κ -卡拉胶的加入延长了蛋白质的水解时间。

3 结论

有研究指出带电多糖和蛋白质被人体摄入之后其网络结构容易受到胃肠道消化过程中酶的水解的影响。本文探讨了消化酶(包括胃蛋白酶和胰蛋白酶)对 κ -CC 复合体系的影响,发现 κ -CC 复合体系的 zeta-电位在两种蛋白酶酶解前后并无明显变化,说明消化酶对 κ -卡拉胶与酪蛋白的结合影响不大。从硫酸基团暴露量和红外光谱结果来看,胃蛋白酶对 κ -CC 复合体系的水解程度较小,而胰蛋白酶水解同样时间后,体系硫酸基团暴露量由原来的 0.00529 ± 0.00037 mg/mL 显著增加到 0.02425 ± 0.00188 mg/mL ($P < 0.01$),硫酸基团暴露量的增加不利于 κ -卡拉胶的构型。此外,在电镜和流变仪的观察下发现,酶解后 κ -CC 复合体系微观形貌和流变学特性上的变化主要体现为粘弹性明显下降,无序程度升高,网络结构孔洞大小不一,分布不均匀,稳定性下降,网络结构遭到破坏。根据本文研究结果,考虑在应用卡拉胶这一食品添加剂时,可以利用卡拉胶的蛋白反应性及消化酶对卡拉胶构象的作用来提高卡拉胶在食品工业应用中的安全性,为卡拉胶在机体胃肠道中的毒理学研究提供理论研究基础,对指导和拓展卡拉胶的安全应用具有重要意义。

参考文献

[1] CAMPO V L, KAWANO D F, SILVA D B D, et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis-A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(2): 167-180.
[2] NECAS J, BARTOSIKOVA L. Carrageenan: A review[J].

Veterinrn Medicina, 2013, 58(4): 187-205.

[3] YUGUCHI Y, THUY T T T, URAKAWA H, et al. Structural characteristics of carrageenan gels: Temperature and concentration dependence[J]. *Food Hydrocolloids*, 2002, 16(6): 515-522.
[4] 郭娟娟. κ -卡拉胶寡糖酶法制备及其免疫防御调节机制的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2018. [GUO J J. Enzymatic hydrolysis preparation of κ -carrageenan oligosaccharides and its mechanism in immunologic defense[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2018.]
[5] 侯丽丽. 刺麒麟菜(*Eucheuma spinosum*)提取 ι -卡拉胶的新工艺及流变学特性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014. [HOU L L. The new extraction of iota-carrageenan from *Eucheuma spinosum* and studies of rheological properties[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.]
[6] TANG M X, ZHU Y D, LI D, et al. Rheological, thermal and microstructural properties of casein/ κ -carrageenan mixed systems[J]. *LWT*, 2019, 113: 108296.
[7] FONTES-CANDIA C, STRÖM A, LOPEZ-SANCHEZ P, et al. Rheological and structural characterization of carrageenan emulsion gels[J]. *Algal Research*, 2020, 47: 101873.
[8] BŁASZAK B, GOZDECKA G, SHYICHUK A. Carrageenan as a functional additive in the production of cheese and cheese-like products[J]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2018, 17(2): 107-116.
[9] TOBACMAN J K, BHATTACHARYYA S, BORTHAKUR A, et al. The carrageenan diet: not recommended[J]. *Science*, 2008, 321(5892): 1040-1041.
[10] 张慧, 杨瑞利, 刘芳, 等. 食品级 κ -卡拉胶对肥胖小鼠致结肠炎风险及脂质蓄积的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(15): 121-128. [ZHANG H, YANG R L, LIU F, et al. Effect of food-grade κ -carrageenan on risk of colitis and accumulation of body fat in obese mice[J]. *Food Science*, 2021, 42(15): 121-128.]
[11] 张慧, 刘芳, 杨瑞利, 等. 食品级 κ -卡拉胶对机体致结肠炎风险的探讨[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(2): 28-35. [ZHANG H, LIU F, YANG R L, et al. Discussion on the risk of body colitis caused by food-grade κ -carrageenan[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(2): 28-35.]
[12] LIU F, HOU P F, ZHANG H, et al. Food-grade carrageenans and their implications in health and disease[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(4): 3918-3936.
[13] BHATTACHARYYA S, SHUMARD T, XIE H, et al. A randomized trial of the effects of the no-carrageenan diet on ulcerative colitis disease activity[J]. *Nutrition and Healthy Aging*, 2017, 4(2): 181-192.
[14] DAVID S, SHANI L C, FAHOUM L, et al. Revisiting the

- carrageenan controversy: Do we really understand the digestive fate and safety of carrageenan in our foods?[J]. *Food & Function*, 2018, 9(3): 1344–1352.
- [15] FAHOUM L, MOSCOVICI A, DAVID S, et al. Digestive fate of dietary carrageenan: Evidence of interference with digestive proteolysis and disruption of gut epithelial function[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(3).
- [16] TOBACMAN J K. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments[J]. *Environ Health Perspect*, 2001, 109(10): 983–994.
- [17] MARTINO J V, VAN LIMBERGEN J, CAHILL L E. The role of carrageenan and carboxymethylcellulose in the development of intestinal inflammation[J]. *Frontiers in Pediatrics*, 2017, 5(96): 96.
- [18] 章璐. 卡拉胶诱导结肠上皮细胞免疫响应的信号机制研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2012. [ZHANG L. Study on immune response and mechanism of carrageenan on human colonic epithelial cells[D]. Ningbo: Ningbo University, 2012.]
- [19] WEINER M L, FERGUSON H E, THORSRUD B A, et al. An infant formula toxicity and toxicokinetic feeding study on carrageenan in preweaning piglets with special attention to the immune system and gastrointestinal tract[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 77: 120–131.
- [20] SPAGNUOLO P, DALGLEISH D, GOFF H, et al. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers[J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 19(3): 371–377.
- [21] 王芳. 卡拉胶对酪蛋白胶束结构及低脂干酪品质的影响机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2014. [WANG F. Effect of carrageenan on the structure of casein micelle and the quality of low fat cheese and the mechanism[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.]
- [22] 胡静. 蛋白质聚集状态影响蛋白质/多糖静电复合及其食品功能特性研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2019. [HU J. Effects of protein assemblies on protein/polysaccharide electrostatic complexation and its functional properties[D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2019.]
- [23] YE A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications-A review[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2008, 43(3): 406–415.
- [24] BAEZA R I, CARP D J, PÉREZ O E, et al. κ -carrageenan-protein interactions: Effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2002, 35(8): 741–747.
- [25] CHENG J, MA Y, LI X, et al. Effects of milk protein-polysaccharide interactions on the stability of ice cream mix model systems[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 45: 327–336.
- [26] BLAKEMORE W R, DAVIS S R, HRONCICH M M, et al. Carrageenan analysis Part I: Characterisation of the carrageenan test material and stability in swine-adapted infant formula[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2014, 31(10): 1661–1669.
- [27] BESSETTE C, BENOIT B, SEKKAL S, et al. Protective effects of β -casofensin, a bioactive peptide from bovine β -casein, against indomethacin-induced intestinal lesions in rats[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 60(4): 823–833.
- [28] BESSETTE C, HENRY G, SEKKAL S, et al. Oral administration of a casein matrix containing β -casofensin protects the intestinal barrier in two preclinical models of gut diseases[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 27: 223–235.
- [29] FERNÁNDEZ-TOMÉ S, MARTÍNEZ-MAQUEDA D, TABERNERO M, et al. Effect of the long-term intake of a casein hydrolysate on mucin secretion and gene expression in the rat intestine[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 33: 176–180.
- [30] 王露. 卡拉胶/明胶混合体系的相行为研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2015. [WANG L. Study on the phase behavior of carrageenan/gelatin mixture[D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2015.]
- [31] SONG S, WU S F, AI C Q, et al. Compositional analysis of sulfated polysaccharides from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) released by autolysis reaction[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 420–425.
- [32] LI R, WANG X B, LIU J N, et al. Relationship between molecular flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate-glucose conjugates[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(14): 4089–4097.
- [33] WANG W J, SHEN M Y, JIANG L, et al. Influence of *Mesona blumes* polysaccharide on the gel properties and microstructure of acid-induced soy protein isolate gels[J]. *Food Chemistry*, 2020, 313: 126125.
- [34] JIAO B, SHI A M, LIU H Z, et al. Effect of electrostatically charged and neutral polysaccharides on the rheological characteristics of peanut protein isolate after high-pressure homogenization[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 77: 329–335.
- [35] DOI M, ONUKI A. Dynamic coupling between stress and composition in polymer solutions and blends[J]. *Journal de Physique II*, 1992, 2(8): 1631–1656.
- [36] ONUKI A, TANIGUCHI T. Viscoelastic effects in early stage phase separation in polymeric[J]. *Journal of Chemical Physics*, 1997, 106(13): 5761–5770.
- [37] QAZVINI N T, BOLISSETTY S, ADAMCIK J, et al. Self-healing fish gelatin sodium montmorillonite biohybrid coacervates structural and rheological characterization[J]. *Biomacromolecules*, 2012, 12(7): 2136–2147.
- [38] BOHIDAR H, DUBIN P L, MAJHI P R, et al. Effects of protein-polyelectrolyte affinity and polyelectrolyte[J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 1573–1585.
- [39] 胡颖娜. 酪蛋白与卡拉胶凝胶作用机理的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2015. [HU Y N. Research on the gelling mechanisms of casein and carrageenan[D]. Tianjing: Tianjin University of Science and Technology, 2015.]
- [40] WANG S N, YANG J J, SHAO G Q, et al. pH-induced conformational changes and interfacial dilatational rheology of soy protein isolated/soy hull polysaccharide complex and its effects on emulsion stabilization[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 109: 106579.
- [41] 林伟伟. pH和盐浓度对秘鲁鱿鱼肌原纤维蛋白聚集过程的影响[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015. [LIN W W. Effect of pH and salt concentration on myofibrillar protein (*Dosidicus gigas*) aggregation process[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2015.]
- [42] 杨晋杰. pH诱导大豆多糖/蛋白结构影响界面稳定机制[D]. 锦州: 渤海大学, 2020. [YANG J J. Effect of soy polysaccharide/protein structures induced by pH on the interfacial stabilization mechanism[D]. Jinzhou: Bohai University, 2020.]
- [43] 张爽, 张兰成, 韩雪. 乳酸菌蛋白酶与发酵乳制品质量相关性研究进展[J]. *微生物学报*, 2015, 55(12): 1530–1536. [ZHANG S, ZHANG L W, HAN X. Research progress on the correlation between lactic acid bacteria protease and the quality of fermented dai-

- ry products[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(12): 1530–1536.]
- [44] 魏衍尚, 宁利敏, 姚忠, 等. 卡拉胶多糖的分子修饰: 卡拉胶酶和硫酸化酶的研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(10): 17–36. [WEI Y S, NING L M, YAO Z, et al. Molecular modification of carrageenan polysaccharides: Research progress of carrageenases and sulfatase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2022, 41(10): 17–36.]
- [45] 黄子珍, 黄丽, 杨攀, 等. κ -酪蛋白多态性对水牛乳酪蛋白体外消化性及消化产物生物活性的影响[J]. *饲料研究*, 2020, 43(12): 1–6. [HUANG Z Z, HUANG L, YANG P, et al. Effect of κ -casein polymorphism on *in vitro* digestibility and bioactivities of buffalo milk casein in simulated gastrointestinal digestion[J]. *Feed Research*, 2020, 43(12): 1–6.]
- [46] 曲丹妮. pH 诱导大豆种皮多糖油/水界面吸附行为演变机制[D]. 锦州: 渤海大学, 2021. [QU D N. The evolution mechanism of pH-induced soy hull polysaccharides O/W interface adsorption behavior[D]. Jinzhou: Bohai University, 2021.]
- [47] PEREIRA L, SOUSA A, COELHO H, et al. Use of FTIR, FT-Raman and ^{13}C -NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids[J]. *Biomolecular Engineering*, 2003, 20(4–6): 223–228.
- [48] ZHAO J K, SUN C, LI H Y, et al. Studies on the physicochemical properties, gelling behavior and drug release performance of agar/kappa-carrageenan mixed hydrogels[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 878–887.
- [49] YE A Q, CUI J, CARPENTER E, et al. Dynamic *in vitro* gastric digestion of infant formulae made with goat milk and cow milk: Influence of protein composition[J]. *International Dairy Journal*, 2019, 97: 76–85.