

共封装硒肽和VE微胶囊制备及其理化特性

蔡杰^{1,2}, 方媛¹, 贾继来¹, 张碟¹, 丛欣^{1,3}, 程水源¹

(1.武汉轻工大学硒科学与工程现代产业学院, 国家富硒农产品加工技术研发专业中心, 湖北省绿色富硒农产品精深加工技术研发工程中心, 湖北 武汉 430023; 2.武汉轻工大学 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 农产品加工与转化湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430023; 3.恩施德源硒材料工程科技有限公司, 湖北 恩施 445000)

摘要: 通过乳化-冷冻干燥联合技术构建微胶囊体系, 实现对具有不同极性的物质(亲水性硒肽和亲脂性VE)的稳态化共封装。以包埋率作为参考, 通过单因素试验考察壁材浓度、硒肽和VE含量等工艺参数对包埋效果的影响。傅里叶变换红外光谱和扫描电子显微镜图像表明微胶囊能够有效封装硒肽和VE, 并且具有较好的水分散性, 复溶后仍保持双重乳液结构。热稳定性分析和2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)阳离子自由基清除实验结果证实, 相比于硒肽粉末, 微胶囊具有更高的热稳定性和抗氧化活性。电子鼻分析结果进一步证实微胶囊体系对硒肽自身异味具有较好的遮掩效果。体外模拟消化实验表明, 微胶囊封装提高了硒肽在模拟胃液中的稳定性, 并且硒肽在模拟肠液具有更低的保留率, 能够被有效释放。相关研究结论将为富硒功能性食品营养补充剂的开发提供理论依据。

关键词: 硒肽; VE; 共封装; 乳液; 微胶囊

Preparation and Physicochemical Properties of Microcapsules Loaded with Selenium-Enriched Peptides and VE

CAI Jie^{1,2}, FANG Yuan¹, JIA Jilai¹, ZHANG Die¹, CONG Xin^{1,3}, CHENG Shuiyuan¹

(1. National R&D Center for Se-rich Agricultural Products Processing, Hubei Engineering Research Center for Deep Processing of Green Se-rich Agricultural Products, School of Modern Industry for Selenium Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil, Ministry of Education, Hubei Key Laboratory for Processing and Transformation of Agricultural Products, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 3. Enshi Se-Run Material Engineering Technology Co. Ltd., Enshi 445000, China)

Abstract: A microcapsule system for the co-encapsulation of selenium-enriched peptides, being hydrophilic, and vitamin E (VE), being lipophilic, was developed using a combination of emulsification and freeze-drying. The effects of wall material concentration, selenium-enriched peptide content, and VE content on the encapsulation efficiency was investigated by single-factor experiments. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM) showed that the selenium-enriched peptides and VE were effectively encapsulated in the microcapsules, and the microcapsules possessed good water dispersibility and maintained its double emulsion structure after reconstitution. The results of thermal stability analysis and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) cation radical scavenging assay confirmed that compared with selenium-enriched peptides, the microcapsules had higher thermal stability and antioxidant activity. Furthermore, electronic nose analysis showed that the microcapsule system possessed a good masking effect on the odor of selenium-enriched peptides. *In vitro* simulated digestion experiments showed that microencapsulation enhanced the stability of selenium-enriched peptides in simulated gastric juice and lowered the retention rate in simulated intestinal fluid; selenium-enriched peptides were effectively released from the microcapsules. This study will provide a theoretical basis for the development of selenium-enriched functional foods and nutritional supplements.

Keywords: selenium-enriched peptides; vitamin E; co-encapsulation; emulsion; microencapsulation

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230308-079

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)01-0181-10

收稿日期: 2023-03-08

基金项目: 湖北省国际科技合作项目(2021EHB029);

武汉轻工大学硒科学与工程现代产业学院-恩施德源硒材料工程科技有限公司技术储备项目(Se1-202111);

赣州市综合检验检测院开放基金课题(GZSZJYKF-202204)

第一作者简介: 蔡杰(1987—)(ORCID: 0000-0003-3065-6185), 男, 副教授, 博士, 研究方向为碳水化合物资源的开发与利用。E-mail: caijievip@whpu.edu.cn

引文格式:

蔡杰, 方媛, 贾继来, 等. 共封装硒肽和VE微胶囊制备及其理化特性[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 181-190. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230308-079. <http://www.spkx.net.cn>

CAI Jie, FANG Yuan, JIA Jilai, et al. Preparation and physicochemical properties of microcapsules loaded with selenium-enriched peptides and VE[J]. Food Science, 2024, 45(1): 181-190. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230308-079. <http://www.spkx.net.cn>

近年来, 含有两种或多种活性成分的共包封体系在提高功能性食品的营养价值方面引起了广泛关注^[1-2]。这种共包封体系不仅能够提高活性成分在输送过程中的稳定性, 而且满足了人们对营养个性化定制食品的需求^[3]。目前, 已有学者对不同种类的生物活性成分共包封体系展开研究, 如益生菌/瓜拉那提取物^[4-5], 益生菌/Omega-3脂肪酸^[6], 益生菌/益生元^[7], 蛋清衍生肽/姜黄素^[8], VB₂/VE/ β -胡萝卜素^[9]等。硒肽是一种从天然的植物或微生物分离纯化得到的富硒活性多肽, 具有抗氧化、降血压、肝脏保护和免疫调解等活性^[10]。相比于大多数活性多肽, 人体对微量元素硒的需求使其成为了一种不可或缺的营养膳食硒补充剂, 对人体生理健康具有积极作用。VE也是一种人体必需的脂溶性维生素, 作为抗氧化剂和营养剂被应用于食品加工中。随着对硒与VE的深入研究, 人们发现两者在营养作用方面具有一定的关联性, 主要在抗氧化等生理功能方面具有一定的协同作用^[11-13]。然而亲水性的硒肽和亲脂性的VE在人体消化道生理条件下表现出较低稳定性, 并且VE由于自身较差的水溶性和对氧气敏感等缺陷使其不适合直接添加到水性食品体系中。除此之外, 由于溶解性差异, 寻找合适的递送体系用于两者的共同包封成为了亟需解决的问题。

水包油包水(W₁/O/W₂)双重乳液是一种将油包水(W₁/O)初乳液分散在另一连续相水(W₂)中形成的常见乳液体系, 由于其能够同时包封不同极性(亲水性和亲脂性)的物质, 在活性成分的共包封和递送中表现巨大的应用前景^[14-15]。相比于传统的W/O乳液而言, W₁/O/W₂得益于其独特的“两膜三相”结构, 内水相(W₁)中的亲水性活性成分能够更有效地被保护并且延缓释放^[16-17], 并且使其在水溶性体系(如人体胃肠道消化)中具有更好的分散性。双重乳液的构建需要两步乳化过程完成, 并且其中包含使用具有亲脂性和亲水性乳化剂或表面活性剂稳定W₁/O/W₂乳液的两层油水界面膜, 能够降低界面张力。聚甘油蓖麻醇酸酯(polyglycerol polyricinoleate, PGPR)是一种最常见的亲脂活性剂, 能够有效地稳定W₁/O初乳液^[18-19]。而多糖或蛋白质被认为是合适的乳化剂用于稳定O/W₂乳液的界面, 由于其能够有效抑制内水相迁移扩散到外水相, 提高双

重乳液在贮藏过程中的稳定性^[20-22]。辛烯基琥珀酸酐(octenyl succinic anhydride, OSA)淀粉由天然来源的淀粉与辛烯基琥珀酸酐通过酯化反应合成, 具有两亲性、低成本和安全性等优点, 已被广泛用于稳定O/W乳液, 被认为是阿拉伯树胶最有前景的替代品^[23-24]。目前, 通过喷雾干燥和冷冻干燥等方法可以将液态的乳液转变为固态的微胶囊颗粒^[25], 改变产品性状, 便于运输贮藏以及满足消费者的需求。其中, 冷冻干燥作为一种非热加工技术, 能够降低加工过程中被包封物质生物活性损失而受到广泛的关注。所制备的微胶囊不仅对活性成分有着优异的包封和缓释性能, 提高其稳定性和生物利用度, 而且能够有效屏蔽被包埋物质自身令人不愉悦或刺激的风味。Yang Wen等^[26]基于W₁/O/W₂双重乳液结合冷冻干燥法制备了封装牡蛎肽的微胶囊, 电子鼻结果证实相比于相同浓度的牡蛎肽水溶液, 复溶后的微胶囊仍具有双重乳液结构, 并且表现出更低的异味。更重要的是, 双重乳液形成的微胶囊具有多层核壳结构, 油相中的亲脂性抗氧化剂能够对内水相中被递送的活性小分子起到很好的抗氧化保护作用, 避免被溶解于外水相的氧气氧化。

基于此, 本实验以硒肽水溶液作为内水相(W₁), VE油溶液作为油相, OSA淀粉溶液作为外水相(W₂), 通过两步乳化法构建W₁/O/W₂双重乳液。在此基础上, 采用冷冻干燥固化法制备共封装硒肽/VE微胶囊并评估其理化特性(图1)。具体地, 考察了两种活性物质(硒肽和VE)以及壁材OSA淀粉添加量对微胶囊包埋率的影响。结合激光粒度仪、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)仪等手段对其结构进行表征分析; 进一步通过1,1-二苯基-2,2,2'-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)和2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)阳离子自由基清除实验评估了微胶囊的抗氧化活性; 采用体外模拟胃肠道消化和电子鼻实验分别着重探究了微胶囊芯层中硒肽的缓释规律和其不愉悦气味的遮掩性能。相关的研究结果为具有两种相反极性(亲脂性和亲水性活性小分子)的共包封提供了一种新策略, 并且为富硒固态功能性产品的开发提供了一种新思路。

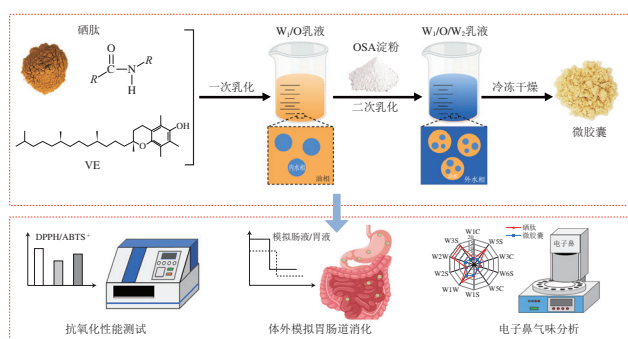


图1 共封装硒肽-VE的微胶囊构建及其性能评价示意图
Fig.1 Schematic diagram of fabrication and evaluation of microcapsules loaded with selenium-enriched peptides and VE

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

OSA淀粉 (PURITY GUM 2000) 宜瑞安食品配料有限公司; PGPR、胰酶 (其中淀粉酶和蛋白酶活力为100~350 U/mg, 脂肪酶活力为10~75 U/mg)、胰脂肪酶 (15~35 U/mg) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 植物硒肽粉 恩施德源硒材料工程科技有限公司; VE、胆盐、胃蛋白酶 (15 000 U/g) 上海麦克林生化科技有限公司; 葵花籽油 益海嘉里 (武汉) 粮油工业有限公司; 氢氧化钠、盐酸、无水乙醇 (均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 二辛可酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质浓度测定试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

T18 digital数显型分散机 德国IKA公司; SM-1800A超声波细胞破碎仪 南京舜玛仪器设备有限公司; PX124ZH微量电子天平 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; Mastersizer 3000激光粒度仪 英国Marvin公司; SU8100 SEM 日本Hitachi公司; Nicolet 6700 FTIR仪 美国Thermo Fisher科技公司; TGA 55热重力分析仪 美国TA仪器公司; D8 Advance X射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 仪 德国Bruker分析仪器公司; Alpha1-4冷冻干燥机 德国Christ公司; Enspire多功能酶标仪 珀金埃尔默企业管理 (上海) 有限公司; PEN3型便携式电子鼻 德国Airsense公司; HD-3A智能水分活度测量仪 北京图拉扬科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 共封装硒肽/VE微胶囊的制备

在构建 $W_1/O/W_2$ 双重乳液的基础上, 采用冷冻干燥技术制备共封装硒肽/VE微胶囊。首先将VE和硒肽分别溶于葵花籽油和去离子水中, 离心后取上清液, 作为油相和内水相 (W_1)。其次, 在油相中加入PGPR作为亲脂性乳化剂后混合均匀, 继续加入含有硒肽的水相 (油

水比7:3), 并在高速剪切 (14 000 r/min, 2 min) 和超声 (360 W, 开3 s停3 s) 处理后得到 W_1/O 型初乳液。之后, 将新鲜配制的OSA淀粉溶液作为外水相 (W_2) 加入到初乳液中, 依次经过高速剪切 (8 000 r/min, 2 min) 和超声 (360 W, 开3 s停3 s) 处理后得到共封装硒肽/VE的 $W_1/O/W_2$ 双重乳液。最后, 将所制备的双重乳液经冷冻干燥后得到共封装硒肽/VE微胶囊。在上述制备方法的过程中, 通过调控OSA淀粉、VE和硒肽含量改善微胶囊的物化性质。

1.3.2 共封装硒肽/VE的 $W_1/O/W_2$ 双重乳液的形貌观察

将适当稀释后的乳液样品滴加于载玻片凹槽内, 盖上盖玻片后放置于显微镜下观察, 目镜和物镜的放大倍数分别为10倍和20倍。

1.3.3 共封装硒肽/VE微胶囊的表征

1.3.3.1 粒径

采用马尔文激光粒度仪测试微胶囊的平均粒径。分散介质水和样品的折光率分别为1.33和1.46。

1.3.3.2 微观形貌

将微胶囊样品分散在导电胶表面, 喷金处理后采用SEM观察其形貌, 其中加速电压设置为1.0 kV。

1.3.3.3 FTIR

利用FTIR测定微胶囊的官能团。将样品与KBr粉末按照1:100的比例研磨粉碎后压片, 置于检测器中。具体参数设置为波数400~4 000 cm^{-1} , 扫描次数为32次, 波谱分辨率4 cm^{-1} 。

1.3.3.4 热重分析 (thermogravimetric analysis, TGA)

将微胶囊粉末 (约5 mg) 加入氧化铝坩埚中, 之后置于仪器炉膛内进行测试, 具体测试条件为: 温度范围30~700 $^{\circ}C$, 升温速率10 $^{\circ}C/min$, 氮气流速20 mL/min。记录在不同温度下的质量损失率。

1.3.3.5 XRD

分别将空白微胶囊和微胶囊进行压片, 用XRD仪进行结构分析。测试条件: 扫描范围 $2\theta=5^{\circ}\sim70^{\circ}$, 扫描速率 $2^{\circ}/min$ 。

1.3.3.6 水分活度

将微胶囊样品放入传感器内, 待读数稳定后, 记录下微胶囊的水活度值。

1.3.3.7 电子鼻分析

将微胶囊粉末密封于样品瓶中, 2 h后采用电子鼻进行测定。具体检测条件为: 传感器清洗时间180 s, 样品检测时间60 s, 调零时间10 s, 流量300 mL/min, 进样流量300 mL/min。电子鼻所测得的数据进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)。

1.3.4 微胶囊中两种活性物质包埋率测定

1.3.4.1 硒肽包埋率测定

取两份相同质量的微胶囊分别复溶于水, 前者涡

旋10 s, 之后在10 000 r/min条件下离心至上清液澄清, 所得到的上清液用0.45 μm滤膜过滤后得到微胶囊表面硒肽的溶液; 而后者经超声破碎(360 W, 5 min)后在10 000 r/min条件下离心至上清液澄清, 吸取上清液, 用0.45 μm滤膜过滤得到微胶囊中硒肽的溶液。之后采用BCA蛋白试剂盒测定两种溶液中硒肽的含量。微胶囊中硒肽的包埋率测定公式如下:

$$\text{硒肽包埋率}/\% = \left(1 - \frac{\text{微胶囊表面硒肽含量}}{\text{微胶囊中硒肽含量}}\right) \times 100 \quad (1)$$

1.3.4.2 VE包埋率测定

4 mg VE标准品于5 mL棕色容量瓶中, 用无水乙醇定容, 移取0、5、10、20、40、60、80、100 μL VE-无水乙醇溶液加入96孔板的标准孔中, 再加入无水乙醇定容至200 μL, 得到一系列不同质量浓度的标准溶液。以无水乙醇为空白对照, 采用酶标仪测定溶液在285 nm处的吸光度, 通过线性拟合得到VE含量的标准曲线。

微胶囊表面VE提取: 取适量的微胶囊分散到乙醇中, 涡旋10 s, 在10 000 r/min条件下离心至上清液澄清, 吸取上清液用0.45 μm滤膜过滤后在285 nm波长处测定吸光度。微胶囊中VE提取: 取适量微胶囊分散到乙醇中, 超声破碎(360 W, 5 min)后吸取1 mL溶液, 在10 000 r/min条件下离心至上清液澄清, 吸取上清液用0.45 μm滤膜过滤后在285 nm波长处测定吸光度。VE包埋率计算公式如下:

$$\text{VE包埋率}/\% = \left(1 - \frac{m}{m_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中: m 为微胶囊表面VE质量; m_0 为微胶囊中VE质量。

1.3.5 共封装硒肽/VE微胶囊热稳定性评价

分别称取0.5 g的硒肽和微胶囊粉末分散于10 mL去离子水中, 置于60 °C和100 °C条件下持续搅拌, 搅拌速率为100 r/min。分别在第15、30、60、90、120分钟时取出反应液, 超声破碎处理(360 W、10 min)后, 高速离心(1 200 r/min、10 min), 取上清液, 参考1.3.4.1节方法测定硒肽的含量, 计算损失率, 并以损失率对时间关系作曲线。

1.3.6 共封装硒肽/VE微胶囊抗氧化活性评价

1.3.6.1 DPPH自由基清除能力测定

在Shen Dongyu等^[27]研究的基础上稍作修改, 对待测样品的DPPH自由基清除能力进行测定。将100 μL待测样品溶液和100 μL 0.1 mmol/L DPPH乙醇溶液混合均匀, 避光反应30 min后在517 nm波长处测定吸光度。通过下式计算样品的DPPH自由基清除能力:

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中: A_1 为待测样品溶液与DPPH自由基乙醇混合溶液的吸光度; A_2 为待测样品溶液与无水乙醇混合溶液的

吸光度; A_0 为DPPH自由基乙醇溶液与待测样品溶剂混合液的吸光度。

1.3.6.2 ABTS阳离子自由基清除能力测定

参考贾蕾^[28]方法对待测样品的ABTS阳离子自由基清除能力进行测定。将7 mmol/L ABTS溶液与2.45 mmol/L $K_2S_2O_8$ 溶液等体积混合, 避光静置16 h后得到ABTS阳离子自由基工作液。在测定前, 先用0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)将ABTS阳离子自由基工作液稀释20倍, 然后将20 μL待测样品溶液和200 μL ABTS阳离子自由基稀释液混合均匀, 避光反应6 min后, 测定其在734 nm波长处的吸光度。通过下式计算样品的ABTS阳离子自由基清除能力:

$$\text{ABTS阳离子自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

式中: A_1 为待测样品溶液与ABTS阳离子自由基稀释液混合后的吸光度; A_0 为ABTS阳离子自由基稀释液的吸光度。

1.3.7 微胶囊的体外模拟胃肠道消化特性研究

参考Wang Qiang等^[29]的方法, 通过模拟人体消化过程探究微胶囊中硒肽的缓释规律及对其稳定性的影响。模拟胃液配制: 准确称取0.32 g胃蛋白酶和0.2 g氯化钠溶于100 mL去离子水中, 胃蛋白酶质量浓度为3.2 g/L, 并将溶液pH值至1.2。模拟肠液配制: 称取1.64 g NaCl、0.21 g $CaCl_2$ 、0.30 g脂肪酶、0.30 g胰酶和0.95 g胆盐溶于50 mL PBS, 然后用氢氧化钠溶液将pH值调至7.4。在模拟胃肠道消化过程中, 首先分别称取适量的硒肽、双重乳液和微胶囊置于20 mL模拟胃消化液中, 然后置于37 °C恒温水浴中, 在120 r/min条件下振荡2 h。之后, 取10 mL模拟胃消化产物, 加入到13 mL模拟肠液中, 在37 °C条件下振荡(120 r/min, 2 h), 在第0、15、30、60、120分钟取5 mL反应液并补充5 mL缓冲液。最后, 将最终消化溶液超声处理后, 在12 000 r/min离心10 min, 取上清液, 参考1.3.4.1节方法测定硒肽含量, 并采用pH-stat法测定小肠阶段中样品游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)释放情况^[30], 在模拟肠液消化过程中持续加入氢氧化钠溶液, 维持溶液体系pH 7.0, 通过消耗氢氧化钠的量计算FFA释放率, 公式如下:

$$\text{FFA释放率}/\% = \frac{V_t \times c \times M}{m} \times 100 \quad (5)$$

式中: V_t 为 t 时间下中和反应消耗氢氧化钠的体积/L; c 为氢氧化钠溶液的浓度/(mol/L); M 为葵花籽油的平均分子量/(g/mol); m 为消化样品中油相的质量/g。

1.4 数据处理

每组实验至少重复3次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用SPSS Statistics 24.0软件对其进行单因素方差分析, 并采用Origin 2021软件对数据或结果进行可视化作图处理。

2 结果与分析

2.1 OSA淀粉、硒肽和VE添加量对W/O/W乳液及其微胶囊的影响

OSA淀粉和两种活性物质含量对乳液的粒径和电位的影响结果如图2A~C所示。液滴表面均为负电荷，这可能与含有羧基的OSA淀粉有关，并且Zeta电位绝对值随着其含量增加而表现出降低的趋势。少量的OSA淀粉（10%和15%）无法完全包裹油滴，可能会引起并聚等不稳定现象发生，从而导致油滴粒径增大。进一步增加OSA淀粉含量时，乳液的粒径并未发生显著的变化，这可能是由于油滴表面包裹的OSA淀粉达到饱和^[31]。硒肽和VE的加入对乳液表面的电位影响较小，Zeta电位在-8~-18 mV区间内变化。当硒肽的添加量从5%增加到30%时，乳液粒径略微从3.62 μm增加到6.86 μm。硒肽添加量增加提高了初乳液的黏度，导致在剪切和超声过程液滴难以被破坏，提高了液滴粒径。相似地，Zhu Qiaomei等^[32]的研究结果也表明提高内水相中明胶的浓度，有助于W/O/W乳液的粒径增大。油相中VE添加量的增加（0.5%~2%）对乳液粒径没有明显影响，但过多的VE（4%）导致乳液粒径反而略有上升。进一步评估3种物质添加量对冷冻干燥后的微胶囊粒径和水分活度影响，结果如图2D~F所示。OSA淀粉和硒肽添加量对微胶囊水分活度的影响相似，水分活度值随其添加量增加整体在0.30~0.45区间内逐渐降低。然而，当OSA淀粉添加量为30%时，水分活度反而增加，这可能是由于乳液在冷冻干燥过程中不稳定，液滴粒径增大，单位面积需要更多的OSA淀粉含量，从而导致壁材对水的结合能力增强。壁材在高浓度下有利于微胶囊壁更为紧凑，防止了水分进入内部，从而使微胶囊水分活度降低。

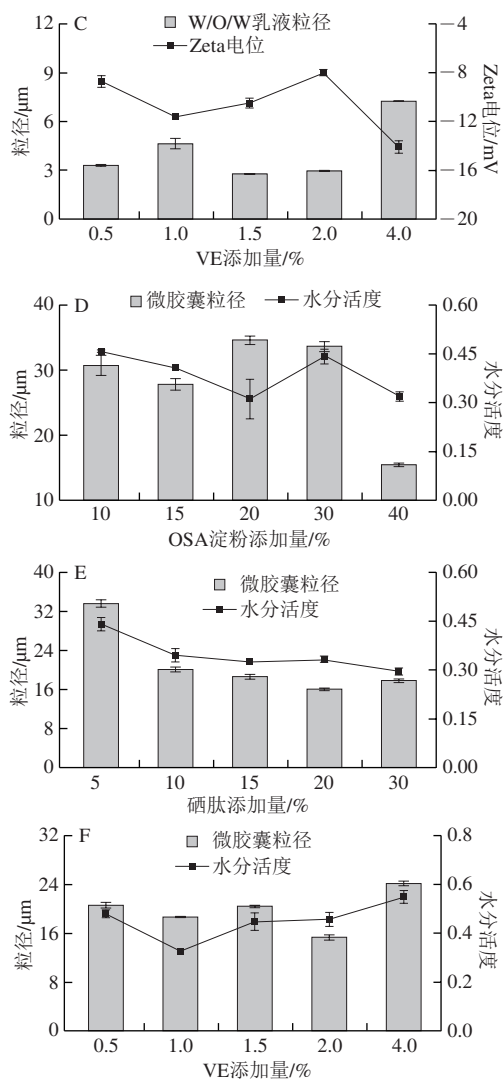
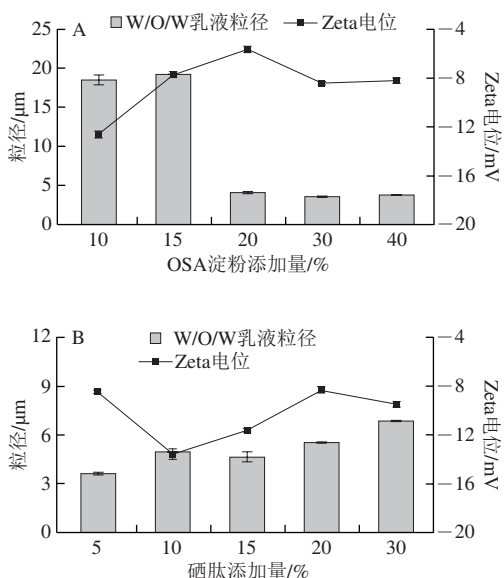


图2 OSA淀粉、硒肽和VE添加量分别对W/O/W乳液(A~C)和微胶囊(D~F)理化性质的影响

Fig. 2 Effects of OSA starch, selenium-enriched peptides, and VE concentration on the physicochemical properties of W/O/W emulsion (A~C) and microcapsules (D~F)

2.2 添加不同量OSA淀粉、硒肽和VE的微胶囊包埋率

如图3所示，OSA淀粉作为水溶性壁材，其含量对油相中的VE的包埋率几乎没有明显的影响，保持在50%左右，而硒肽的包埋率随着OSA淀粉添加量的增加表现出先增加后保持不变的趋势。OSA淀粉作为外水相和油相的界面乳化剂，在浓度较低时所形成的界面膜较薄，这使得内水相容易与外水相接触后逃逸，造成多重乳液体系中内水相中的硒肽含量降低，以及所得到的微胶囊中硒肽的包埋率较低。相反，OSA淀粉添加量增加提高了界面膜的厚度，在内水相起到了物理阻隔作用，限制了内水相的逃逸从而有利于硒肽的包封。然而，过多的OSA淀粉游离于外水相中，在高能量的机械搅拌和超声条件下可能与硒肽小分子形成复合物，从而导致内水相

中硒肽的包埋率略有降低。随着硒肽和VE的添加量逐渐增加, VE的包埋率几乎保持不变($\sim 50\%$), 而硒肽的包埋率逐渐降低。这可能是由于硒肽作为蛋白质水解物, 具有两亲性, 过量的硒肽被吸附到油相和内水相界面, 中性环境中带正电荷的硒肽与壁材带负电荷的OSA淀粉通过静电相互作用力接触, 之后逃逸整个W/O/W乳液体系, 导致包埋率降低。

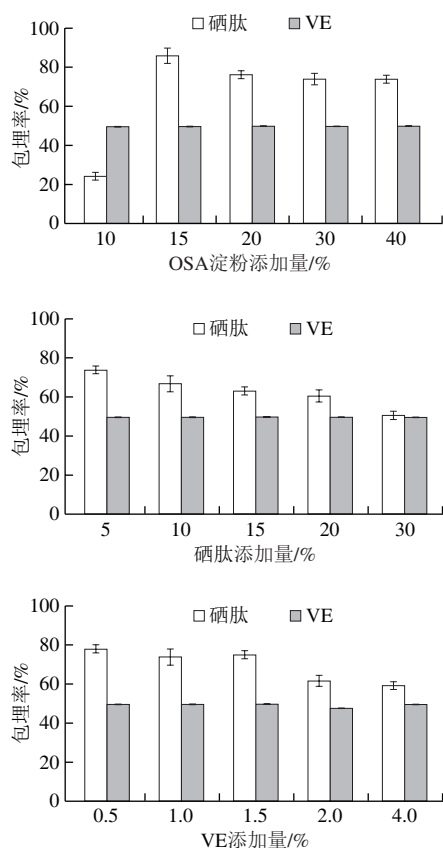


图3 OSA淀粉、硒肽和VE添加量对包埋率的影响

Fig. 3 Effects of OSA starch, selenium-enriched peptides, and VE concentration on the encapsulation rate

2.3 乳液和微胶囊的微观结构

采用光学显微镜和SEM分别观察硒肽/VE共封装的W/O/W乳液和微胶囊的微观形态。图4A、B分别为W/O/W乳液和微胶囊水分散液的光学显微镜图像。部分小液滴位于大液滴内部, 参考Florence等^[33]分类方法, 表明该乳液是典型的B型W/O/W乳液, 并且冷冻干燥制备的微胶囊重新分散后表现出相似的现象, 液滴粒径约为 $(13.94 \pm 6.58) \mu\text{m}$ 。图4C、D为微胶囊的SEM图。冷冻干燥处理后, 得到的微胶囊表面粗糙, 囊壁由于冷冻干燥导致部分塌陷, 形成了褶皱, 但结构紧凑, 能够有效减少外界因素(如水分等)进入内部, 从而有效降低水分活度(图2), 并且对内部两种活性物质具有较好的保护屏障作用。

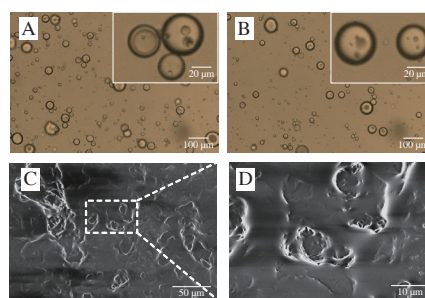


图4 W/O/W乳液(A)和微胶囊分散液(B)的光学显微镜图像和微胶囊放大500(C)、2000倍(D)的SEM图

Fig. 4 Optical microscopic images of W/O/W emulsion (A) and microcapsule dispersion (B), and SEM images of microcapsules (C $\times 500$, and D $\times 2000$)

2.4 微胶囊的结构表征

如图5A所示, 未封装两种活性物质的空白微胶囊FTIR图表现出多糖类壁材(OSA淀粉)典型的特征吸收峰: O—H的伸缩振动宽谱带(3300 cm^{-1})和葡萄糖环骨架中C—O的伸缩振动峰(1147 cm^{-1} 和 993 cm^{-1}), 而在 1743 cm^{-1} 处尖峰可能归因于葵花籽油中甘油三酯的C=O伸缩振动^[34]。对于硒肽和VE单独的红外光谱图, 1578 cm^{-1} 和 $2800 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别对应中酰胺II带和脂肪族长碳链中C—H的伸缩振动, 而封装后的微胶囊并未出现新的吸收峰。结合包埋率的测定结果可以证实两种活性物质被成功地包埋在微胶囊内部。图5B中空白微胶囊具有两个无定形的宽峰($2\theta=9.2^\circ$ 和 20.0°), 表现出典型的V型单螺旋结构^[35], 而两种活性成分的掺入对其晶体结构无明显影响。

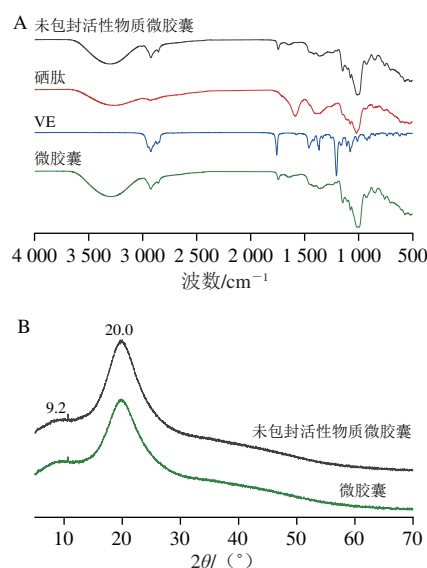


图5 微胶囊结构的FTIR(A)和XRD(B)图

Fig. 5 FTIR spectra (A) and XRD patterns (B) of microcapsules

2.5 微胶囊热稳定性分析

硒肽的热降解过程主要分为3个阶段: 1) 第1阶段

为25~150 ℃, 热损失主要是由于吸附的自由水和结合水挥发; 2) 第2阶段为150~400 ℃, 微胶囊热损失速率快速下降, 归因于氨基酸分子链的脱水裂解、脱羧等反应; 3) 由于脱羧反应的进一步发生, 质量损失随着温度升高进一步下降, 但相对于第2阶段更为平缓。如图6A所示, 微胶囊化后, 在277 ℃左右的降解趋势更为平缓, 主要是硒肽的氨基酸链裂解, 这表明微胶囊能够提高芯材硒肽的热稳定性, 而在400 ℃左右的热损失主要归因于多糖壁材葡糖链的断裂。如图6B、C所示, 在60 ℃水体系中, 微胶囊化前后的硒肽损失率均随着时间的延长(从0~120 min)而升高, 但微胶囊化后的硒肽损失率显著低于未封装的硒肽, 因此延缓了硒肽热损失速率, 起到了一定的保护作用, 在120 min后两者损失率几乎相同, 约为15%, 这可能是由于微胶囊多糖壁材在水溶液中逐渐被溶解, 微胶囊结构逐步被破坏。而在100 ℃空气体系条件下, 硒肽的损失率随着时间延长而增加, 在120 min后损失率达(32.8±0.5)%, 而微胶囊化后硒肽随着时间延长表现出先增加后几乎保持不变的趋势, 在120 min后损失率仅为(15.0±4.2)%, 显著低于未封装的硒肽。且硒肽在开始的60 min内损失可能是由于未封装或微胶囊表面少量的硒肽损失所导致, 而芯层部分的硒肽几乎不受温度影响。综上, 微胶囊对硒肽起到了较好的保护作用, 延缓了其在高温下的损失, 提高了硒肽的热稳定性。

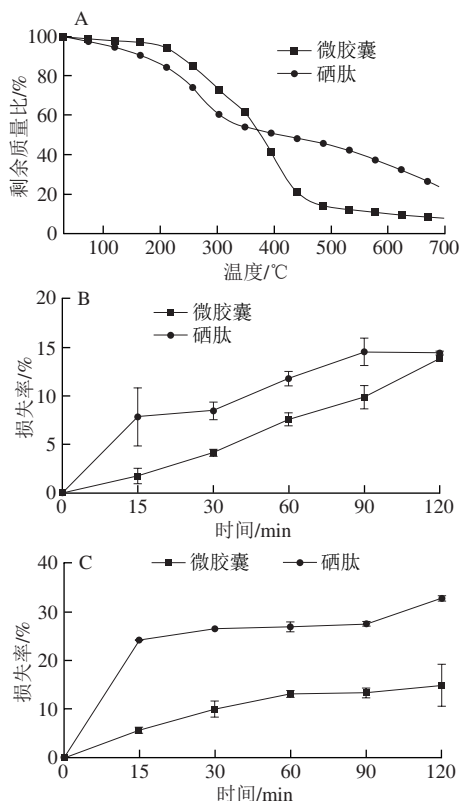


图6 微胶囊前后硒肽的TGA曲线(A)以及其在60 ℃水(B)和100 ℃空气(C)体系中的损失率变化

Fig. 6 TGA curves (A) of free and encapsulated selenium-enriched peptides and its mass loss rates in water at 60 ℃ (B) and air at 100 ℃ (C)

2.6 封装前后微胶囊的抗氧化活性

硒肽和VE两种功能性成分已被证实具有较高的抗氧化活性。比较共封装硒肽和VE的微胶囊和两种功能性成分对DPPH自由基和ABTS阳离子自由基清除能力, 用以评估其抗氧化活性(图7)。如图7A所示, 硒肽和VE对DPPH自由基清除率分别为93%和31.2%, 将其封装于微胶囊后, DPPH自由基清除率为45.50%。微胶囊对DPPH自由基清除能力介于两种活性成分中间。ABTS阳离子自由基清除实验也表现出相似的结果(图7B), 三者对ABTS阳离子自由基清除率大小顺序为: VE>微胶囊>硒肽。微胶囊化后, 两种活性物质仍赋予了体系较高的抗氧化活性。

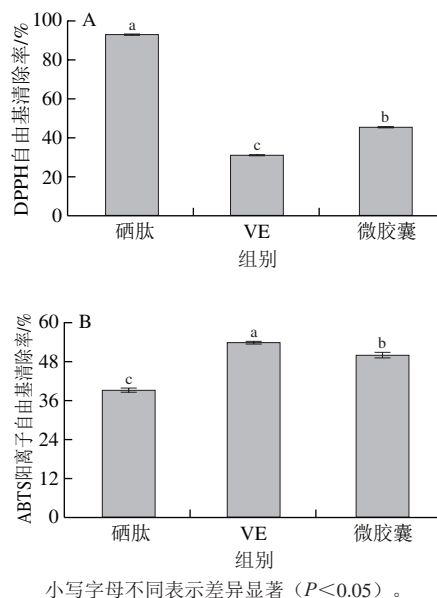


图7 DPPH自由基(A)和ABTS阳离子自由基(B)清除测试评估微胶囊的抗氧化活性

Fig. 7 Antioxidant activity of microcapsules evaluated by DPPH radical (A) and ABTS cation (B) radical-scavenging assays

2.7 模拟体外消化实验结果

图8A为不同体系(游离、乳液和微胶囊)下硒肽在模拟胃液中的保留率变化。游离的硒肽在120 min消化后保留率仅为31.92%, 显著低于在乳液和微胶囊包封状态下的保留率, 分别为70.21%和72.14%。封装状态下的硒肽在前15 min内损失率较高, 但30 min后硒肽的损失率基本保持不变, 可能是由于少量未被封装的硒肽释放到模拟胃液中所导致, 这与微胶囊在60 ℃水体系下热稳定性测试结果一致。酸性条件下, OSA淀粉发生质子化, 表面电荷降低, 结构更为紧凑, 对硒肽的释放起到了屏障作用。而在模拟肠液中(图8B), 前30 min内, 微胶囊的硒肽损失率迅速升高, 而30 min后保留率逐渐趋于平缓。游离的硒肽在120 min内的保留率仅为8%, 同样显著

低于被封装的硒肽。相比于相同时间内模拟胃液消化阶段,模拟肠液消化阶段微胶囊中的硒肽保留率更低,这表明硒肽被更多的释放到肠液中,有利于人体的吸收。一方面可能是由于在中性环境下带有羧基的OSA淀粉发生去质子化,表面电荷增加;另一方面归因于脂肪酶解油相,从而导致内水相中的硒肽被释放。因此,进一步评估了模拟肠液消化过程中FFA释放率,结果如图8C所示。在脂肪酶的作用下,油相会分解为甘油和FFA,微胶囊和W/O/W乳液的FFA释放速率随着消化的过程均呈现先增加后趋于平缓趋势。在消化时间为120 min后,W/O/W乳液的FFA释放率为27.6%,低于微胶囊中FFA释放率(40.3%)。微胶囊重新分散在水溶液体系中,多糖壁材逐渐被溶解,由于没有高能摄入,无法重新吸附在油相和外水相界面,因此相比于W/O/W乳液,微胶囊的油相与脂肪酶接触面积更大,导致更高的脂肪酸释放率。此外,内水相中的硒肽仍然被油相包裹,这与乳液中油相包裹内水相的结构相似,因此微胶囊和乳液体系中的硒肽保留率变化趋势几乎一致。

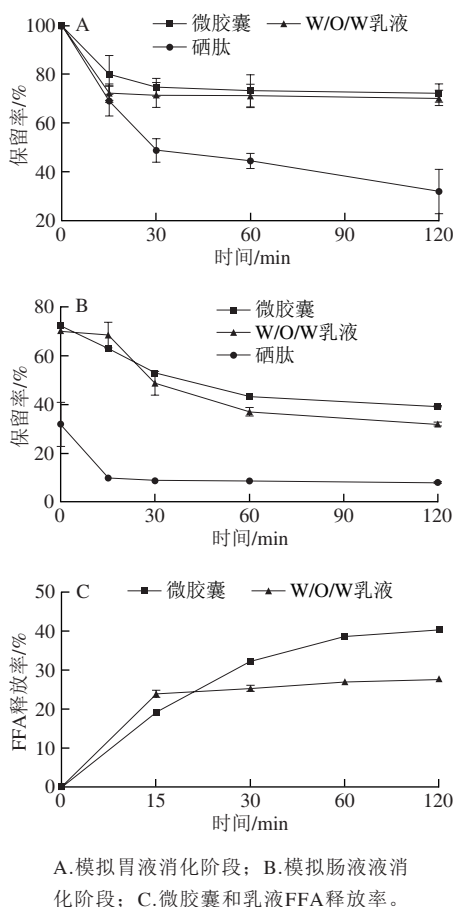


图8 体外模拟胃肠道消化过程中硒肽的保留率
Fig. 8 Retention rate of selenium-enriched peptides during *in vitro* simulated digestion

2.8 电子鼻测定结果

电子鼻是一种模拟动物嗅觉的气味识别仪器,能够通过特定的传感器获取丰富的气味指纹信息,如W1C(芳香成分和苯)、W5S(氮化合物)、W3C(芳香组分和氨类物质)、W5C(氢化合物)、W1S(甲基类物质)、W1W(硫化物)、W2S(醇、醛和酮)、W2W(芳香组分和有机硫化物)和W3S(含长链烷烃物质)。植物中提取的天然硒肽存在令人不愉悦的气味,这使得其在富硒功能食品开发及实际应用中具有局限性。因此,进一步采用电子鼻评估微胶囊化对硒肽气味的遮掩能力,相应的气味信息如图9A所示。硒肽样品的气味主要来源于烷烃类物质(W3S)、芳香成分和有机硫化物(W2W)、氮化合物(W5S)、硫化物(W1W)。其中,令人不愉悦的气味主要来源于氮化合物(W5S)和硫化物(W1W)^[26]。而微胶囊化硒肽样品的氮化合物(W5S)和硫化物(W1W)的响应值显著降低,表明其令人不愉悦的异味降低,这与人自身嗅觉的感官结果一致。进一步对微胶囊化前后硒肽的挥发性成分进行PCA(图9B)。硒肽样品的PC1与PC2的累计贡献率达到83.1%,表明其能够有效反映样品的主要信息。硒肽样品的气味区域分布较为集中,而微胶囊化后硒肽的气味区域分布较为分散,并且两区域无重叠,横坐标距离较大,这表面微胶囊化前后硒肽的挥发性气味具有显著性变化。上述结果证实了微胶囊化能够对硒肽令人不愉悦的气味进行有效遮掩,提高人们对硒肽气味的接受程度。

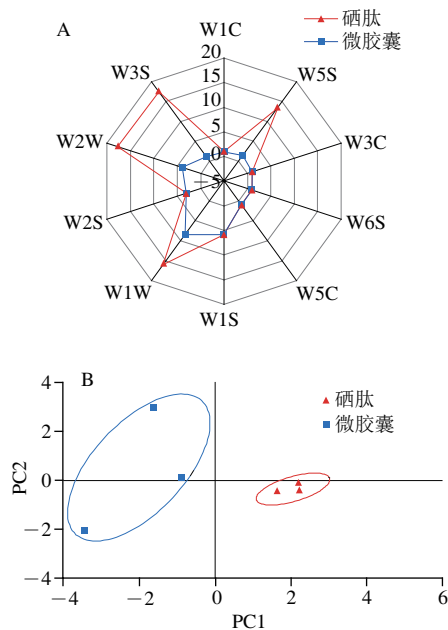


图9 硒肽与微胶囊的电子鼻测试雷达图(A)和PCA图(B)
Fig. 9 Radar (A) and PCA plots (B) of electronic nose analysis of selenium-enriched peptides and microcapsules

3 结论

本研究通过乳化-干燥法构建了具有不同极性的两种活性物质(亲水性硒肽和亲脂性VE)的共封装微胶囊体系。单因素试验结果表明:当OSA淀粉、硒肽和VE添加量分别为15%、5%和0.5%时,所制备的微胶囊的硒肽和VE的包埋率都达到最高。微胶囊在水溶液中具有较好的分散性,并且保留了双重乳液的结构,具有较好的水复溶性。TGA和热稳定性分析结果表明硒肽在微胶囊体系中具有更高的热稳定性,能够抵抗胃阶段的消化,保持乳液的状态并使其耐受低pH值和胃蛋白酶的作用,保持超过70%的硒肽保留率。消化主要发生在模拟肠道阶段,在消化酶作用下,乳液结构被破坏,FFA释放率增加,硒肽保留率逐渐降低,在小肠中逐渐缓释。电子鼻测试结果也证实微胶囊化可以对硒肽自身的异味起到良好的遮掩作用。上述相关研究结论可为硒肽作为硒营养强化剂以及其在多功能食品和特殊膳食品开发提供指导,为强化人们日常膳食中硒元素的供应,满足人们的营养健康需求提供途径。

参考文献:

- [1] LIU K, CHEN Y Y, PAN L H, et al. Co-encapsulation systems for delivery of bioactive ingredients[J]. Food Research International, 2022, 155: 111073. DOI:10.1016/j.foodres.2022.111073.
- [2] MISRA S, PANDEY P, MISHRA H N. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109: 340-351. DOI:10.1016/j.tifs.2021.01.039.
- [3] MCCLEMENTS D J. Nano-enabled personalized nutrition: developing multicomponent-bioactive colloidal delivery systems[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2020, 282: 102211. DOI:10.1016/j.cis.2020.102211.
- [4] SILVA M P, FARSONI E G, GOBATO C F, et al. Simultaneous encapsulation of probiotic and guaran acute accent a peel extract for development of functional peanut butter[J]. Food Control, 2022, 138: 109050. DOI:10.1016/j.foodcont.2022.109050.
- [5] SILVA M P, MARTELLI-TOSI M, MASSARIOLI A P, et al. Co-encapsulation of guaran acute accent a extracts and probiotics increases probiotic survivability and simultaneously delivers bioactive compounds in simulated gastrointestinal fluids[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 161: 113351. DOI:10.1016/j.lwt.2022.113351.
- [6] SULTANA M, CHAN E S, PUSHPAMALAR J, et al. Advances in extrusion-dripping encapsulation of probiotics and omega-3 rich oils[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 123: 69-86. DOI:10.1016/j.tifs.2022.03.006.
- [7] RASHIDINEJAD A, BAHRAMI A, REHMAN A, et al. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(9): 2470-2494. DOI:10.1080/10408398.2020.1854169.
- [8] YANG M, LIU J B, LI Y J, et al. Co-encapsulation of egg-white-derived peptides (EWDP) and curcumin within the polysaccharide-based amphiphilic nanoparticles for promising oral bioavailability enhancement: role of EWDP[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(16): 5126-5136. DOI:10.1021/acs.jafc.1c08186.
- [9] SUN Y, TANG W T, PU C F, et al. Improved stability of liposome-stabilized emulsions as a co-encapsulation delivery system for vitamin B₂, vitamin E and beta-carotene[J]. Food & Function, 2022, 13(5): 2966-2984. DOI:10.1039/d1fo03617c.
- [10] 贾蕾, 向极轩, 殷红清, 等. 生物活性硒肽的研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(15): 346-355. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200428-368.
- [11] HAMZA R Z, AL-HARBI M S, EL-SHENAWY N S. Ameliorative effect of vitamin E and selenium against oxidative stress induced by sodium azide in liver, kidney, testis and heart of male mice[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 91: 602-610. DOI:10.1016/j.biopha.2017.04.122.
- [12] ABD EL-HACK M E, MAHROSE K, ARIF M, et al. Alleviating the environmental heat burden on laying hens by feeding on diets enriched with certain antioxidants (vitamin E and selenium) individually or combined[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(11): 10708-10717. DOI:10.1007/s11356-017-8690-5.
- [13] YAO Z, ZHANG Y L, LI H Y, et al. Synergistic effect of Selenomethylselenocysteine and vitamin E in ameliorating the acute ethanol-induced oxidative damage in rat[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2015, 29: 182-187. DOI:10.1016/j.jtemb.2014.08.004.
- [14] ADITYA N P, ADITYA S, YANG H, et al. Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion[J]. Food Chemistry, 2015, 173: 7-13. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.09.131.
- [15] HUANG H, BELWAL T, AALIM H, et al. Protein-polysaccharide complex coated W/O/W emulsion as secondary microcapsule for hydrophilic arbutin and hydrophobic coumaric acid[J]. Food Chemistry, 2019, 300: 125171. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125171.
- [16] SHEN Y X, ZHANG N, TIAN J L, et al. Advanced approaches for improving bioavailability and controlled release of anthocyanins[J]. Journal of Controlled Release, 2022, 341: 285-299. DOI:10.1016/j.jconrel.2021.11.031.
- [17] KAIMAINEN M, MARZE S, JARVENPAA E, et al. Encapsulation of betalain into W/O/W double emulsion and release during *in vitro* intestinal lipid digestion[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(2): 899-904. DOI:10.1016/j.lwt.2014.10.016.
- [18] ANDRADE J, CORREDIG M. Vitamin D₃ and phytosterols affect the properties of polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and protein interfaces[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 54: 278-283. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.10.001.
- [19] VELDERRAIN-RODRIGUEZ G R, ACEVEDO-FANI A, GONZALEZ-AGUILAR G A, et al. Encapsulation and stability of a phenolic-rich extract from mango peel within water-in-oil-in-water emulsions[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 56: 65-73. DOI:10.1016/j.jff.2019.02.045.
- [20] YU H J, WANG H T, SU W T, et al. Co-delivery of hydrophobic astaxanthin and hydrophilic phycocyanin by a pH-sensitive water-in-oil-in-water double emulsion-filled gellan gum hydrogel[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 131: 107810. DOI:10.1016/j.foodhyd.2022.107810.
- [21] QIN X S, LUO Z G, LI X L. An enhanced pH-sensitive carrier based on alginate-Ca-EDTA in a set-type W-1/O/W-2 double emulsion model stabilized with WPI-EGCG covalent conjugates for probiotics

- colon-targeted release[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 113: 106460. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.106460.
- [22] TANG X Y, WANG Z M, MENG H C, et al. Robust W/O/W emulsion stabilized by genipin-cross-linked sugar beet pectin-bovine serum albumin nanoparticles: co-encapsulation of betanin and curcumin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(4): 1318-1328. DOI:10.1021/acs.jafc.0c05212.
- [23] JIN Q W, LI X B, CAI Z X, et al. A comparison of corn fiber gum, hydrophobically modified starch, gum arabic and soybean soluble polysaccharide: interfacial dynamics, viscoelastic response at oil/water interfaces and emulsion stabilization mechanisms[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70: 329-344. DOI:10.1016/j.foodhyd.2017.03.005.
- [24] YAN C, MCCLEMENTS D J, ZHU Y, et al. Fabrication of osa starch/chitosan polysaccharide-based high internal phase emulsion via altering interfacial behaviors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(39): 10937-10946. DOI:10.1021/acs.jafc.9b04009.
- [25] REZVANKHAH A, EMAM-DJOMEH Z, ASKARI G. Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: a review[J]. Drying Technology, 2020, 38(1/2): 235-258. DOI:10.1080/07373937.2019.1653906.
- [26] YANG W, LI J Z, REN D D, et al. Construction of a water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsion system based on oyster peptides and characterisation of freeze-dried products[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2021, 56(12): 6635-6648. DOI:10.1111/ijfs.15354.
- [27] SHEN D Y, BEGUM N, SONG H L, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity and umami taste of peptides (< 1 kDa) from porcine bone protein extract[J]. Food Bioscience, 2021, 40: 100901. DOI:10.1016/j.foodres.2021.100901.
- [28] 贾蕾. 碎米莽晒肽的抗氧化活性及对肠道菌群的影响研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [29] WANG Q, WEI H H, DENG C F, et al. Improving stability and accessibility of quercetin in olive oil-in-soy protein isolate/pectin stabilized O/W emulsion[J]. Foods, 2020, 9(2): 123. DOI:10.3390/foods9020123.
- [30] 应欣. 大豆低聚肽降压功能、结构解析及其双重乳液苦味掩蔽技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [31] ZHAO S J, TIAN G F, ZHAO C Y, et al. Emulsifying stability properties of octenyl succinic anhydride (OSA) modified waxy starches with different molecular structures[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 85: 248-256. DOI:10.1016/j.foodhyd.2018.07.029.
- [32] ZHU Q M, QIU S, ZHANG H W, et al. Physical stability, microstructure and micro-rheological properties of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions stabilized by porcine gelatin[J]. Food Chemistry, 2018, 253: 63-70. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.01.119.
- [33] FLORENCE A T, WHITEHILL D. The formulation and stability of multiple emulsions[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1982, 11(4): 277-308. DOI:10.1016/0378-5173(82)90080-1.
- [34] MU H Y, SONG Z X, WANG X, et al. Microencapsulation of algae oil by complex coacervation of chitosan and modified starch: characterization and oxidative stability[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 194: 66-73. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.11.168.
- [35] LI X X, ZHANG P F, CHEN L, et al. Structure and colon-targeted releasing property of resistant octenyl succinate starch[J]. Food Research International, 2012, 47(2): 246-252. DOI:10.1016/j.foodres.2011.06.031.