

# WPI和WPI-EGCG构建姜黄素 纳米乳液的体外消化差异

李艳新, 陈立莹, 李雁, 解新安, 李璐\*  
(华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 选择接枝率为3%和4%的乳清分离蛋白(whey protein isolate, WPI)-表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG)接枝物为乳化剂构建姜黄素纳米乳液, 探究纳米乳液体外模拟消化过程中游离脂肪酸(free fat acid, FFA)释放和消化特性的差异。结果表明, EGCG的结合可能导致WPI分子结构的展开; 与WPI相比, WPI-EGCG稳定乳液的界面膜厚度增加了31.6 nm。WPI-EGCG接枝物稳定的乳液的粒径分散度和平均粒径较小, 形成的纳米乳液更加稳定, 可以更好地促进脂质消化。4% WPI-EGCG稳定的纳米乳液在肠消化120 min后的最终FFA释放率达到85.13%。并且接枝还提高了系统中封装的姜黄素的生物可及性。

**关键词:** 乳清分离蛋白-表没食子儿茶素没食子酸酯接枝物; 纳米乳液; 体外消化; 游离脂肪酸释放

## Differences in *In Vitro* Digestibility of Curcumin Nanoemulsions Stabilized by Whey Protein Isolate and Whey Protein Isolate-(-)-Epigallocatechin-3-gallate

LI Yanxin, CHEN Liying, LI Yan, XIE Xin'an, LI Lu\*  
(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** In this study, the release of free fat acids (FFA) from and the digestion characteristics of curcumin nanoemulsions constructed using whey protein isolate (WPI)-(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) graft copolymers with 3% and 4% grafting degrees as emulsifiers were investigated during *in vitro* simulated digestion and compared with those of curcumin nanoemulsions stabilized by WPI. It was found that binding to EGCG might cause the unfolding of WPI, and the interfacial film thickness of the WPI-EGCG stabilized emulsion increased by 31.6 nm compared with that of the WPI stabilized emulsion. The WPI-EGCG complex stabilized emulsion had a smaller particle size dispersion and average particle size than the WPI stabilized emulsion and was therefore more stable and superior in promoting lipid digestion. After 120 minutes of intestinal digestion, the final release rate of FFA from the nanoemulsion stabilized with 4% WPI-EGCG was 85.13%. Also, the graft treatment improved the bioaccessibility of curcumin encapsulated in the system.

**Keywords:** whey protein isolate-(-)-epigallocatechin-3-gallate grafts; nanoemulsion; *in vitro* digestion; free fatty acid release

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230228-256

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)01-0001-07

引文格式:

李艳新, 陈立莹, 李雁, 等. WPI和WPI-EGCG构建姜黄素纳米乳液的体外消化差异[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 1-7.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230228-256. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yanxin, CHEN Liying, LI Yan, et al. Differences in *in vitro* digestibility of curcumin nanoemulsions stabilized by whey protein isolate and whey protein isolate-(-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. Food Science, 2024, 45(1): 1-7. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230228-256. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-02-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31501471)

第一作者简介: 李艳新(1999—)(ORCID: 0009-0008-8427-1081), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。

E-mail: 2735195618@qq.com

\*通信作者简介: 李璐(1978—)(ORCID: 0000-0003-1669-3094), 女, 副教授, 博士, 研究方向为纳米载体制备及应用。

E-mail: lulu\_lee@scau.edu.cn

乳清分离蛋白(whey protein isolate, WPI)是在乳清蛋白的基础上加工得到的高纯度蛋白质<sup>[1-2]</sup>,可作为食品的功能性成分,如乳化剂、发泡剂、增稠剂、凝胶剂等<sup>[3-6]</sup>。WPI中约含有50%的 $\beta$ -乳球蛋白, $\beta$ -乳球蛋白是一种结构紧凑且高度有序的球状蛋白<sup>[7]</sup>,具有两个二硫键和一个游离硫醇基团,会影响蛋白质不可逆的热聚集和凝胶特性<sup>[8]</sup>。此外,WPI对温度、离子浓度、酸碱性等环境条件敏感,易造成WPI溶解度和乳化稳定性降低以及出现胶凝和聚集现象<sup>[9-10]</sup>。因此可以通过物理或化学改性改变WPI的结构,赋予其新的功能特性,增加其应用价值。

自由基接枝共价修饰是一种有效修饰WPI的方法,可以提供理想的物理化学性质和功能<sup>[11-12]</sup>。Xu Haoxie等<sup>[13]</sup>通过自由基接枝将绿原酸、WPI共价偶联后,增强了WPI的溶解度、乳化活性、发泡性能和抗氧化能力。Pham等<sup>[14]</sup>研究显示亚麻籽分离蛋白-酚接枝物的热稳定性和抗氧化能力均高于亚麻籽分离蛋白。前期实验<sup>[15]</sup>通过自由基接枝制备WPI-表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG)接枝物,发现其抗氧化性和乳化性得到明显改善。然而,目前对蛋白质-多酚自由基接枝的研究主要集中在蛋白质结构的改变和功能特性的改善上,在蛋白质-多酚接枝物作为乳化剂稳定纳米乳液体系的消化行为变化方面鲜有研究。

不同结构的蛋白乳化剂对乳脂的消化效率有不同的影响。顾璐萍<sup>[16]</sup>研究发现与蛋清蛋白相比,蛋清蛋白-儿茶素自由基接枝物稳定的乳液游离脂肪酸(free fat acid, FFA)消化率较高;然而Su Yuru等<sup>[17]</sup>研究表明,小麦胶质蛋白-葡萄籽原花青素稳定的乳液的FFA消化率低于小麦胶质蛋白。这些结果表明,以前对乳化剂特性和消化行为关系的研究仍然存在分歧。因此,有必要对不同接枝度的WPI和WPI-EGCG的FFA消化行为进行深入研究。

姜黄素因具有抗氧化、抗炎、降血脂等多种生理功效而在食品和医药领域得到广泛关注和应用。但姜黄素水溶性较差,人体难以通过口服的方式吸收,从而造成其较低的生物利用率<sup>[18-19]</sup>。本实验以姜黄素作为模型营养物质,以WPI和不同接枝率的WPI-EGCG为乳化剂构建姜黄素纳米乳液,并对其体外消化性能进行研究,为姜黄素在食品领域的功能化应用提供思路和数据基础。

因此,本实验旨在探讨WPI和不同接枝度的WPI-EGCG接枝物之间的消化差异。首先,对接枝前后WPI的结构和界面变化进行表征。然后,使用不同接枝率(3%和4%)的WPI-EGCG接枝物 and 未改性的WPI作为乳化剂制备负载姜黄素的纳米乳液。最后,构建三阶段体外消化模型,研究不同姜黄素纳米乳液体系在各阶段的消化行为,分析WPI-EGCG接枝和接枝度差异对所构建纳米乳液体系体外消化的影响及规律。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

WPI、中链甘油三酯(medium chain triglycerides, MCT)、模拟人工口腔消化液、胃蛋白酶、猪胆盐、脂肪酶 广州市齐湘生物技术有限公司; EGCG (HPLC $\geq$ 90%)、姜黄素(HPLC $\geq$ 90%) 上海源叶生物科技有限责任公司; 福林-酚蛋白定量试剂盒 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 其他化学试剂均为分析纯,所有样品均使用超纯水制备。

### 1.2 仪器与设备

UV-2500紫外分光光度计 德国Spike公司; Chriascan圆二光谱仪 英国Applied Photophysics公司; ZetasizerNano ZS90型激光粒度仪 英国Malvern公司; 780 Live型激光共聚焦显微镜 德国蔡司公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 WPI-EGCG的接枝合成

将0.5 g WPI与49 mL去离子水混合均匀后,加入1 mL 5 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液以及适量的抗坏血酸。于25 °C振荡水浴锅中2 h。加入0.05 g EGCG,继续在25 °C振荡水浴锅中24 h。然后将样品透析72 h(每6 h需更换一次去离子水,透析袋的分子截留量为12~14 kDa),将透析液放入-20 °C冰箱中冷冻5 h,放入-50 °C真空冷冻干燥机中冷冻干燥48 h<sup>[20]</sup>。

#### 1.3.2 WPI-EGCG接枝率测定

采用福林-酚法测定WPI-EGCG的接枝率。将1 mL 1 mg/mL的样品溶液和2.5 mL 0.2 mol/L福林-酚试剂在室温下磁力搅拌5 min,加入2 mL 7.5%碳酸钠溶液避光反应2 h。用UV-2500紫外分光光度计测定760 nm波长处的吸光度。用EGCG标准曲线计算接枝后样品中EGCG的含量。接枝率是接枝反应中表征产物的关键数据之一,其计算公式如下:

$$m_E = \frac{M \times m_g}{1000} \quad (1)$$

$$P_g / \% = \frac{m_E}{m_p} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $m_E$ 为接枝EGCG的质量/g;  $M$ 为接枝量/(mg/g)(以样品中EGCG计算);  $P_g$ 为接枝率/%;  $m_p$ 和 $m_g$ 分别为接枝前后WPI的质量/g。

#### 1.3.3 酪氨酸基团的测定

参考Hassan<sup>[21]</sup>的方法,取0.9 mL 1 mg/mL冷冻干燥后的样品与1 mL 16 mol/L硝酸溶液混合均匀,并在50 °C水浴中加热15 min,取出于冰水浴中冷却,加入4 mL 5 mol/L NaOH溶液和4 mL无水乙醇并混合均匀。用

紫外分光光度计测定 $A_{360\text{nm}}$ 和 $A_{430\text{nm}}$ 。酪氨酸含量的计算公式如下:

$$\text{酪氨酸含量}/(\text{ng}/\text{mg})=0.5357 \times A_{430\text{nm}}-0.3714 \times A_{360\text{nm}} \quad (3)$$

### 1.3.4 二级结构相对含量测定

将样品溶解在pH 7.0的磷酸盐缓冲液(10 mmol/L)中,于25℃使用圆二色光谱仪在持续通氮气条件下进行测定。样品池光程为1.0 mm,设置路径长度1 mm,扫描范围为190~260 nm,数据间隔为1.0 nm。频谱是10次测量的平均值。使用CD Pro软件计算样品中二级结构的相对含量。

### 1.3.5 接枝蛋白的吸附膜厚度测定

参考Liu Yan等<sup>[22]</sup>的方法稍作修改,采用单分散聚苯乙烯乳胶颗粒作为油滴模型,测定WPI、WPI-EGCG为乳化剂制备的乳液在界面处的吸附膜厚度。用pH 7.0磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L)分别配制蛋白质质量分数为1.0%的WPI和WPI-EGCG蛋白溶液和0.1%的聚苯乙烯溶液,将蛋白溶液和0.1%聚苯乙烯以9:1的比例混合,在室温下静置60 min,使其均匀分散。使用激光粒度仪在常温平衡2 min后测定单分散聚苯乙烯的粒径和蛋白溶液与聚苯乙烯混合溶液的粒径,根据聚苯乙烯粒径与具有蛋白质吸附层的聚苯乙烯的粒径差异计算吸附膜厚度。计算公式如下:

$$\text{界面吸附膜厚度}/\text{nm}=\frac{d_1-d_2}{2} \quad (4)$$

式中: $d_1$ 为WPI、WPI-EGCG与聚苯乙烯混合物的平均粒径/nm; $d_2$ 为聚苯乙烯的平均粒径/nm。

### 1.3.6 姜黄素纳米乳液的制备

将质量浓度为1 g/100 mL的WPI-EGCG接枝物和WPI溶解于磷酸盐缓冲溶液(0.01 mol/L, pH 7.0),并在25℃、100 r/min磁力搅拌4 h后,置于4℃冰箱储存过夜,得到乳液的连续相。将MCT加热至60℃,加入质量浓度为0.1 g/100 mL的姜黄素,磁力搅拌10 min后得到分散相。然后将连续相与分散相按9:1的比例混合,磁力搅拌均匀后在高速分散机上以10 000 r/min分散5 min制得粗乳液,制得的粗乳液通过高压均质机在110 MPa条件下循环均质3次以形成水包油(O/W)纳米乳液。

### 1.3.7 体外模拟消化道的构建

根据人体和动物消化道的构造,构建一个三阶段模拟消化道,包括模拟口腔、模拟胃和模拟肠阶段,胃肠消化液参考洪泽翰<sup>[23]</sup>、Salvia-Trujillo<sup>[24]</sup>的方法进行配制。

#### 1.3.7.1 模拟口腔消化阶段

将新鲜制备的乳液和人工唾液预热37℃后按照1:1(V/V)混合于烧杯中,用NaOH溶液将混合液调节至pH 6.8,以恒定速率(100 r/min)振荡反应3 min,以模拟口腔中食物的咀嚼环境。

#### 1.3.7.2 模拟胃消化阶段

在37℃条件下,取20 mL口腔消化液,与20 mL含有3.2 mg/mL胃蛋白酶的胃液(2 g NaCl和7 mL HCl溶于1 L去离子水中)混合,立即用NaOH调节pH值至2.5,在摇床上振荡2 h(100 r/min)。胃消化结束之后,取一部分消化后样品将其pH值调节至7.0,从而终止胃蛋白酶的消化过程。

#### 1.3.7.3 模拟肠消化阶段

在37℃条件下,取30 mL胃消化液,用NaOH或HCl调节pH值至7.0。然后加入1.5 mL小肠液(5.5 g CaCl<sub>2</sub>和32.87 g NaCl溶于150 mL去离子水中)和3.5 mL胆盐(53.57 mg/mL),精准调节pH值至7.0,立即加入2.5 mL脂肪酶悬浮液(24 mg/mL),在37℃条件下以恒定速率(100 r/min)振荡反应2 h。在消化过程中,通过不断滴定0.25 mol/L的NaOH溶液,使消化液pH值始终保持在7.0。

#### 1.3.8 消化过程中姜黄素乳液的粒径和Zeta电位测定

采用激光粒度仪测定姜黄素纳米乳液在消化过程中的平均粒径和粒径分布。将纳米乳液用去离子水稀释200倍后加入石英比色皿中(约为比色皿的2/3处),设置水的折射率为1.33,油的折射率为1.45,每个样品平行测定3次取平均值。

采用激光粒度仪测定姜黄素纳米乳液在消化过程中的Zeta电位。将纳米乳液用去离子水稀释200倍后加入比色皿中,设置水的折射率为1.33,油的折射率为1.45,每个样品平行测定3次取平均值。

#### 1.3.9 消化过程中姜黄素乳液的微观形态观察

采用激光共聚焦显微镜对纳米乳液的微观形态进行观察。其中采用尼罗红染油相,采用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)染水相。分析前,移取3个消化阶段的样品于试管中,然后分别加入1 mg/mL的尼罗红溶液和1 mg/mL的FITC(样品和染液的比例为20:1)。将样品放置于激光共聚焦显微镜载物台上,尼罗红的激发和发射波长分别为543 nm和605 nm, FITC的激发和发射波长分别为488 nm和515 nm。根据观察到的视图对油镜和目镜进行调整,记录最清晰的目镜和物镜倍数,拍下纳米乳液的显微镜视图。

#### 1.3.10 FFA释放率的测定

在肠消化中,脂肪酶将乳液体系的油滴不断分解成FFA,导致体系pH值下降。因此利用NaOH溶液中和产生的FFA,以维持体系pH值的稳定。根据消耗的NaOH的体积,按照下式计算姜黄素纳米乳液体系中FFA释放率:

$$\text{FFA释放率}/\%=\frac{V_{\text{NaOH}} \times c_{\text{NaOH}} \times M_{\text{lipid}}}{2m_{\text{lipid}}} \times 100 \quad (5)$$

式中: $V_{\text{NaOH}}$ 为产生FFA所消耗的NaOH溶液的体积/mL; $c_{\text{NaOH}}$ 为NaOH溶液的浓度/(mol/L); $M_{\text{lipid}}$ 为MCT油脂的平均摩尔质量/(g/mol); $m_{\text{lipid}}$ 为最初存于纳米乳液中MCT的质量/g。

### 1.3.11 乳液中姜黄素生物可及性的测定

将小肠消化液在4 °C、4 000×g离心40 min, 收集上清液, 置于紫外分光光度计下测定姜黄素的吸光度, 测定波长为425 nm。根据标准曲线计算姜黄素的质量浓度。按下式计算姜黄素生物可及性:

$$\text{姜黄素生物可及性}/\% = \frac{\rho_2}{\rho_1} \times 100 \quad (6)$$

式中:  $\rho_1$ 为纳米乳液中姜黄素的质量浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  $\rho_2$ 为胶束中姜黄素的质量浓度/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

### 1.4 统计分析

所有实验均进行3组平行实验, 使用Origin 2018软件计算标准差并作图, 使用SPSS 10.0软件对数据进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 WPI接枝前后的结构变化

#### 2.1.1 二级结构和酪氨酸含量的变化

用圆二光谱仪和紫外分光光度计分别研究接枝前后WPI的二级结构和酪氨酸含量的变化, 结果见表1。与未修饰的WPI相比, 接枝后WPI-EGCG的 $\alpha$ -螺旋相对含量下降到19.9%,  $\beta$ -片状相对含量上升到42.6%, 说明与EGCG的结合可能导致WPI分子结构的部分扩展<sup>[25-26]</sup>。酪氨酸含量的减少是由于多酚与蛋白质中的酪氨酸有更强的相互作用, 与更多的疏水氨基酸结合, 表明更多的疏水残基暴露在外界环境中或在EGCG的作用下转移到亲水环境<sup>[27]</sup>。

表1 WPI接枝前后二级结构和酪氨酸含量的变化

Table 1 Changes in secondary structure and tyrosine content of WPI before and after grafting with EGCG

样品	相对含量/%				酪氨酸含量/(ng/mg)
	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -片状	$\beta$ -转角	无规卷曲	
WPI	23.6	40.2	22.5	13.7	31.27±0.81 <sup>b</sup>
WPI-EGCG	19.9	42.6	25.5	12.0	25.65±0.31 <sup>a</sup>

注: 同列小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.1.2 界面蛋白吸附量的变化

蛋白质具有两亲性, 当蛋白质吸附在油滴表面时, 可以降低界面张力, 形成高强度具有黏弹性的膜, 从而防止油滴结块或絮凝<sup>[28-29]</sup>。蛋白质的界面吸附量越高, 界面膜越厚, 说明蛋白质对油水界面的吸附能力越强, 作为乳化剂构建乳液体系时可以形成更稳定的界面结构。如图1A所示, WPI-EGCG的界面吸附膜厚度为127.6 nm, 明显大于WPI的界面吸附膜厚度(96.0 nm), 增加了31.6 nm。这可能是由于EGCG改变了蛋白质的二级结构, 使其向无序方向展开, 从而使分子在油水界面迅速吸附, 并紧密地相互作用, 形成较厚的乳化层。图1B是WPI和WPI-EGCG乳化剂吸附在油水界面上形成的界面层的示意图。

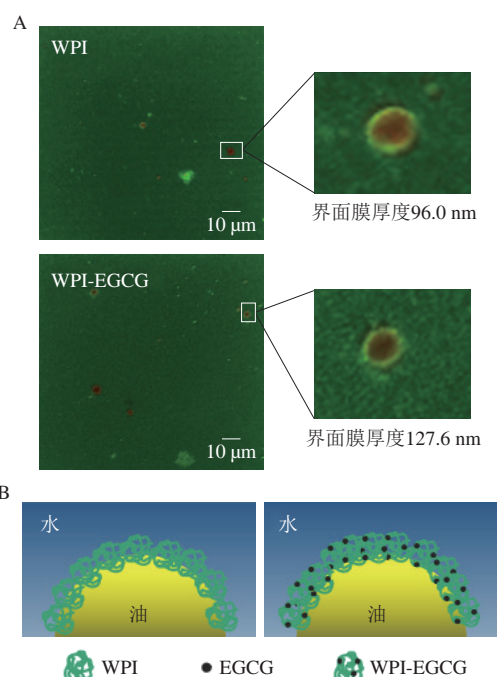


图1 WPI和WPI-EGCG作为乳化剂制备乳液的激光共聚焦显微镜图(A)和界面示意图(B)

Fig. 1 Laser confocal microscopy images (A) and schematic diagrams of the interface (B) of WPI and WPI-EGCG stabilized emulsion

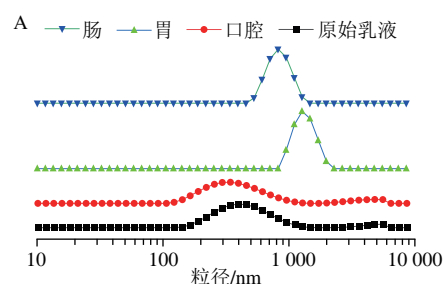
### 2.2 体外消化实验结果

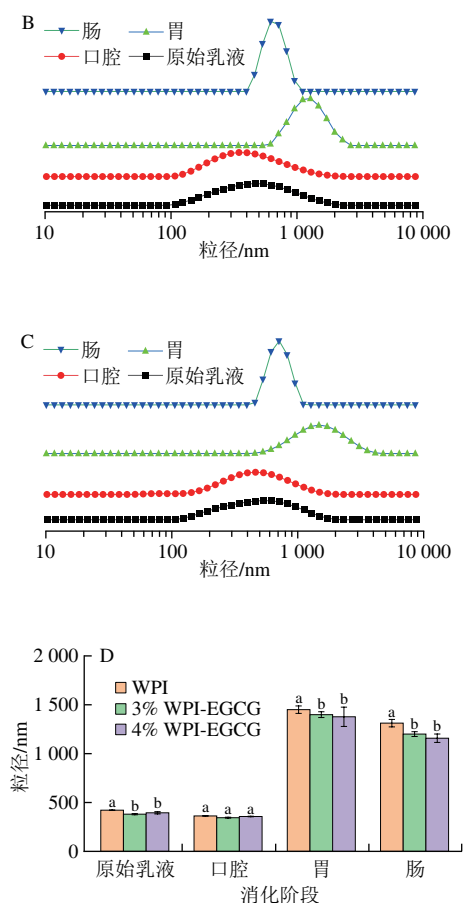
上述结果表明, WPI接枝EGCG后的分子结构和界面性质发生了变化, 这可能会影响以WPI-EGCG为乳化剂的纳米乳液的消化率。因此通过构建体外模拟消化模型, 探讨乳剂在不同消化阶段的粒径、势能、微观结构和脂肪酸释放情况。

#### 2.2.1 消化阶段纳米乳液粒径变化

从图2A~C可以看出, 在初始阶段, 3% WPI-EGCG和4% WPI-EGCG乳液的粒径呈单峰分布(多分散指数分别为0.034和0.040), 而WPI乳液在5 000 nm处还有1个小峰(多分散指数为0.23), 说明WPI稳定乳液的粒径分散较大。表明自由基接枝物能发挥较好的乳化活性, 能够快速吸附至油水界面并形成稳定的乳液。

图2D显示, 在不同的消化阶段, WPI-EGCG稳定的纳米乳液液滴尺寸更小, 可能原因是EGCG与WPI的共价结合破坏蛋白质二级结构, 导致WPI去折叠和内部疏水氨基酸的暴露, 提高了表面活性, 从而有利于WPI快速吸附至油水界面<sup>[30]</sup>。





A. WPI; B. 3% WPI-EGCG; C. 4% WPI-EGCG; 图D不同字母表示相同消化阶段不同组别差异显著, 图3同。

图2 3种乳化剂稳定的纳米乳液在不同消化阶段的粒径分布(A~C)和平均粒径(D)

Fig. 2 Particle size distribution (A~C) and average particle size (D) of nanoemulsions stabilized with three emulsifiers at different stages of digestion

### 2.2.2 消化阶段纳米乳液Zeta电位变化

图3显示, WPI以及WPI-EGCG纳米乳液在消化前的Zeta电位绝对值均大于30 mV, 因此这3种纳米乳剂都具有抗絮凝能力<sup>[31]</sup>。由于WPI或WPI-EGCG接枝物在油水界面的吸附, 乳液液滴之间发生了强烈的静电排斥现象, 从而使纳米乳剂具有良好的物理稳定性<sup>[23]</sup>。然而, 由两种接枝物稳定的纳米乳液比单独由WPI稳定的纳米乳液具有更高的负电位 ( $P < 0.05$ ), 原因可能是接枝物在液滴表面形成更厚的蛋白吸附层, 进一步增加了乳液液滴之间的静电排斥, 从而抑制液滴之间的聚集, 提高乳液的物理稳定性。此外, Zeta电位随着WPI-EGCG接枝率的增加而降低, 这是因为具有较大接枝率的WPI能够形成更加坚硬和致密的表面结构, 减缓胃蛋白酶对乳化剂的消化<sup>[32]</sup>。

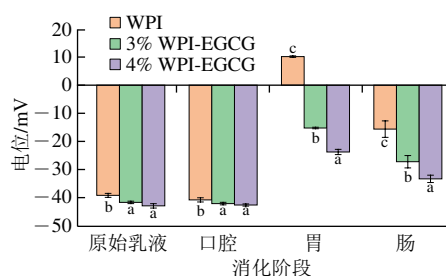


图3 WPI、3% WPI-EGCG和4% WPI-EGCG纳米乳液在不同模拟消化阶段的Zeta电位变化

Fig. 3 Changes in zeta potential of WPI, 3% WPI-EGCG and 4% WPI-EGCG stabilized nanoemulsions at different stages of simulated digestion

### 2.2.3 消化过程中纳米乳液微观结构分析

如图4所示, 在消化前不同纳米乳液样品的液滴呈现均匀分布, 未观察到乳液聚集现象, 说明姜黄素可以有效地包裹在3种纳米乳液中。进入口腔消化后, 大多数油滴在口腔条件下仍然保持稳定。经过胃液消化后, 所有样品的微观结构都有明显的变化, 3种纳米乳液中小油滴消失, 出现许多由大油滴形成的絮状物。此外, 3%、4% WPI-EGCG接枝物稳定纳米乳液中的絮凝相对小于WPI稳定纳米乳液, 且分布较均匀, 证实了粒径分布结果, 表明接枝物制备的纳米乳液更加稳定。Quan等<sup>[33]</sup>研究结果也表明鸭蛋白水解物-EGCG共轭物有效地生成了尺寸较小的乳液或阻止了液滴的聚结。图4显示, 大部分乳滴在小肠阶段已被消化, 还有一些个别粒径较大的乳滴, 这可能是由于脂肪酶消化油相, 并将脂质消化产物并入混合胶束和囊泡中, 从而产生较大的油滴。

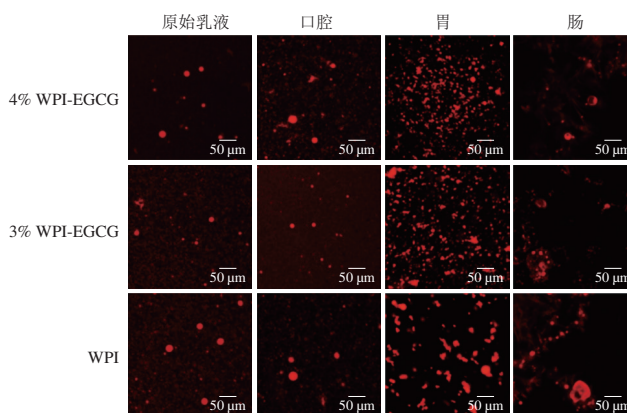


图4 WPI、3% WPI-EGCG和4% WPI-EGCG纳米乳液模拟消化时的激光共聚焦显微镜图像

Fig. 4 CLSM images of WPI, 3% WPI-EGCG and 4% WPI-EGCG stabilized nanoemulsion at different stages of simulated digestion

### 2.2.4 纳米乳液中脂肪释放分析

如图5所示, WPI、3% WPI-EGCG和4% WPI-EGCG制备的纳米乳液体系遵循相似的脂肪消化规律, 在前20 min FFA的释放率快速增加, 20 min后, 释放趋于平缓直达到相对恒定的最终值。出现这种情况主要是

因为, 脂肪酶在消化的前20 min水解三酰基甘油, 三酰基甘油几乎被水解后, FFA释放变得缓慢<sup>[34]</sup>。比较3种乳化剂制备的姜黄素纳米乳剂的FFA释放量, WPI-EGCG接枝物稳定的纳米乳液中脂肪消化速率稍快一些, 这是因为脂肪消化速率与乳液的粒径大小密切相关。经WPI-EGCG接枝物稳定的纳米乳液, 由于平均粒径较小, 在胃液中油滴簇也较小, 油滴的比表面积较大, 更有利于脂肪酶的分解<sup>[35]</sup>。此外, 3% WPI-EGCG和4% WPI-EGCG制备的纳米乳液在消化120 min后, 最终的FFA释放率分别为80.68%和85.13%, 表明自由基接枝的程度越高, 越能更好地促进脂质消化。

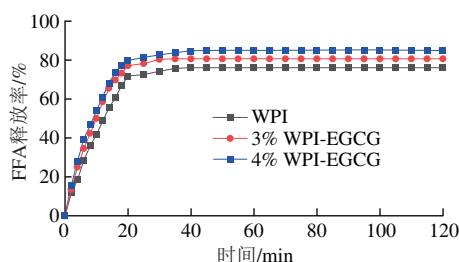
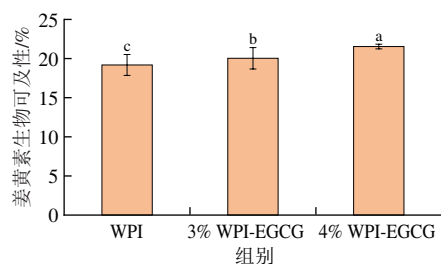


图5 不同纳米乳液在模拟肠消化过程FFA释放率

Fig. 5 Release rates of FFA from different nanoemulsions during simulated intestinal digestion

### 2.2.5 姜黄素的生物可及性

通过测量消化结束产生的胶束相中姜黄素含量, 可得到姜黄素的生物可及性。由图6可知, WPI、3% WPI-EGCG和4% WPI-EGCG制备的姜黄素纳米乳液的生物可及性分别为19.18%、20.04%和21.53%, 该结果与乳液在模拟肠消化阶段FFA的最终释放量有相同的趋势。这表明WPI与EGCG共价结合提高姜黄素的生物可及性, 且随接枝率的增加而增加。这可能是因为WPI-EGCG作为乳化剂被吸附在油水界面上, 形成较厚的界面蛋白膜, 有效地保护了姜黄素。FFA释放量越高, 姜黄素的生物可及性也越高, 是因为随着脂肪酶水解增加, 更多脂肪消化产物形成胶束, 姜黄素从油滴中释放出来, 从而提高了姜黄素在胶束相中的溶解度。之前研究也表明, 乳液中营养素的生物可及性与脂肪分解程度呈正相关<sup>[36]</sup>。



不同字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图6 不同纳米乳液的姜黄素生物可及性

Fig. 6 Bioaccessibility of curcumin in different nanoemulsion samples

## 3 结论

研究发现, 乳化剂的结构和类型与消化率有一定的相关性。EGCG的结合展开了WPI的二级结构, 增加了所制备乳液的界面膜厚度, 导致接枝后的WPI具有较小的液滴尺寸和较高的负电位, 从而抑制液滴之间的聚集, 提高乳液的物理稳定性。相比WPI制备的纳米乳液, 采用自由基接枝物制备的纳米乳液有效改善了油脂的消化, 提高了体系所包埋的姜黄素生物可及性, 且以接枝率为4%的WPI-EGCG接枝物为乳化剂构建的纳米乳液中, 姜黄素营养物的生物可及性高于接枝率为3%的乳液体系。因此, WPI-EGCG可作为乳化剂用于调节脂肪消化和脂肪释放, 以及促进姜黄素的稳定性和生物可及性。

## 参考文献:

- [1] CINELLI P, SCHMID M, BUGNICOURT E, et al. Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2014, 108: 151-157. DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2014.07.007.
- [2] MADUREIRA A R, PEREIRA C I, GOMES A M P, et al. Bovine whey proteins-overview on their main biological properties[J]. *Food Research International*, 2007, 40(10): 1197-1211. DOI:10.1016/j.foodres.2007.07.005.
- [3] HOMER S, WILLIAMS R, WILLIAMS A, et al. WPI gel microstructure and mechanical behaviour and their influence on the rate of *in vitro* digestion[J]. *Foods*, 2021, 10(5): 1066. DOI:10.3390/foods10051066.
- [4] LI N, GIRARD A L. Impact of pH and temperature on whey protein-proanthocyanidin interactions and foaming properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 134: 108100. DOI:10.1016/j.foodhyd.2022.108100.
- [5] XI C Y, KANG N X, ZHAO C H, et al. Effects of pH and different sugars on the structures and emulsification properties of whey protein isolate-sugar conjugates[J]. *Food Bioscience*, 2020, 33: 100507. DOI:10.1016/j.fbio.2019.100507.
- [6] GOMES A, COSTA A L R, CUNHA R L. Impact of oil type and WPI/Tween 80 ratio at the oil-water interface: adsorption, interfacial rheology and emulsion features[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 164: 272-280. DOI:10.1016/j.colsurfb.2018.01.032.
- [7] 蒋方. 乳清分离蛋白纳米纤维的组装及其稳定Pickering乳液的制备、表征及稳定性研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2019. DOI:10.27776/d.cnki.gwhgy.2019.000284.
- [8] 康乃馨. 基于乳清分离蛋白结构与功能特性的糖基化影响因素研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020. DOI:10.27162/d.cnki.gjlin.2020.006588.
- [9] 林佳宜, 郑佳纯, 李雁, 等. 自由基接枝改性对乳清分离蛋白乳化稳定性的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(14): 94-100. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110006.
- [10] NGUYEN B T, CHASSENIEUX C, NICOLAI T, et al. Effect of the pH and NaCl on the microstructure and rheology of mixtures of whey protein isolate and casein micelles upon heating[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 70: 114-122. DOI:10.1016/j.foodhyd.2017.03.013.

- [11] MASSOUNGA BORA A F, LI X, LIU L, et al. Enhanced *in vitro* functionality and food application of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated in a whey protein isolate and (-)-epigallocatechin-3-gallate conjugate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(37): 11074-11084. DOI:10.1021/acs.jafc.1c02158.
- [12] CHEN W J, ZHU J Y, WANG W J, et al. Characterization of whey protein isolate-(-)-epigallocatechin-3-gallate conjugates prepared by non-enzymatic and enzymatic methods and their application in stabilizing  $\beta$ -carotene emulsion[J]. Food Chemistry, 2023, 399: 133727. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133727.
- [13] XU H X, ZHANG T T, LU Y Q, et al. Effect of chlorogenic acid covalent conjugation on the allergenicity, digestibility and functional properties of whey protein[J]. Food Chemistry, 2019, 298: 125024. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125024.
- [14] PHAM L B, WANG B, ZISU B, et al. Covalent modification of flaxseed protein isolate by phenolic compounds and the structure and functional properties of the adducts[J]. Food Chemistry, 2019, 293: 463-471. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.04.123.
- [15] ZHENG J C, XIAO N, LI Y, et al. Free radical grafting of whey protein isolate with tea polyphenol: synthesis and changes in structural and functional properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153: 112438. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112438.
- [16] 顾璐萍. 儿茶素-蛋清蛋白抗氧化性载体材料的制备、表征及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [17] SU Y R, TSAI Y, HSU C, et al. Effect of grape seed proanthocyanidin-gelatin colloidal complexes on stability and *in vitro* digestion of fish oil emulsions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(46): 10200-10208. DOI:10.1021/acs.jafc.5b04814.
- [18] PÉREZ SALAS J L, MEDINA TORRES L, ROCHA GUZMÁN N E, et al. A water in oil gelled emulsion as a topical release vehicle for curcumin[J]. Starch-Stärke, 2022, 74(7/8): 2200006. DOI:10.1002/star.202200006.
- [19] FENG T, HU Z S, WANG K, et al. Emulsion-based delivery systems for curcumin: encapsulation and interaction mechanism between debranched starch and curcumin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161: 746-754. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.088.
- [20] SPIZZIRRI U G, IEMMA F, PUOCI F, et al. Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin[J]. Biomacromolecules, 2009, 10(7): 1923-1930. DOI:10.1021/bm900325t.
- [21] HASSAN S S. New spectrophotometric method for simultaneous determination of tryptophan and tyrosine[J]. Analytical Chemistry, 1975, 47(8): 1429. DOI:10.1021/ac60358a012.
- [22] LIU Y, YADAV M P, YIN L. Enzymatic catalyzed corn fiber gum-bovine serum albumin conjugates: their interfacial adsorption behaviors in oil-in-water emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 986-994. DOI:10.1016/j.foodhyd.2017.11.048.
- [23] 洪泽翰, 吴婉仪, 李璐, 等. 不同大分子乳化剂构建番茄红素纳米乳液的体外消化规律比较[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 1-7. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180619-369.
- [24] SALVIA-TRUJILLO L, QIAN C, MARTÍN-BELLOSO O, et al. Influence of particle size on lipid digestion and  $\beta$ -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 1472-1480. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.03.050.
- [25] YI J, FAN Y T, ZHANG Y Z, et al. Characterization of catechin- $\alpha$ -lactalbumin conjugates and the improvement in  $\beta$ -carotene retention in an oil-in-water nanoemulsion[J]. Food Chemistry, 2016, 205: 73-80. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.03.005.
- [26] WU X L, LU Y Q, XU H X, et al. Reducing the allergenic capacity of  $\beta$ -lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols[J]. Food Chemistry, 2018, 256: 427-434. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.02.158.
- [27] WANG J B, ZHENG H Y, ZHANG S Y, et al. Improvement of protein emulsion stability through glycosylated black bean protein covalent interaction with (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. RSC Advances, 2021, 11(4): 2546-2555. DOI:10.1039/d0ra08756d.
- [28] XIONG T, YE X D, SU Y T, et al. Identification and quantification of proteins at adsorption layer of emulsion stabilized by pea protein isolates[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018, 171: 1-9. DOI:10.1016/j.colsurfb.2018.05.068.
- [29] CHEN J X, FENG Y Y, KONG B H, et al. An eco-friendly extraction method for adsorbed proteins from emulsions stabilized by whey protein isolate by using Tween 20[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2020, 604: 125332. DOI:10.1016/j.colsurfa.2020.125332.
- [30] FAN Y T, LIU Y X, GAO L Y, et al. Oxidative stability and *in vitro* digestion of menhaden oil emulsions with whey protein: effects of EGCG conjugation and interfacial cross-linking[J]. Food Chemistry, 2018, 265: 200-207. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.05.098.
- [31] LIU X J, SONG Q B, LI X, et al. Effects of different dietary polyphenols on conformational changes and functional properties of protein-polyphenol covalent complexes[J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130071. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130071.
- [32] LIN Q H, LIANG R, ZHONG F L, et al. Effect of degree of octenyl succinic anhydride (OSA) substitution on the digestion of emulsions and the bioaccessibility of  $\beta$ -carotene in OSA-modified-starch-stabilized-emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84: 303-312. DOI:10.1016/j.foodhyd.2018.05.056.
- [33] QUAN T H, BENJAKUL S. Duck egg albumen hydrolysate-epigallocatechin gallate conjugates: antioxidant, emulsifying properties and their use in fish oil emulsion[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2019, 579: 123711. DOI:10.1016/j.colsurfa.2019.123711.
- [34] GE S T, JIA R, LIU W, et al. Lipid oxidation and *in vitro* digestion of pickering emulsion based on zein-adzuki bean seed coat polyphenol covalent crosslinking nanoparticles[J]. Food Chemistry, 2022, 386: 132513. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.132513.
- [35] FITRI I A, MITBUMRUNG W, AKANITKUL P, et al. Encapsulation of  $\beta$ -carotene in oil-in-water emulsions containing nanocellulose: impact on emulsion properties, *in vitro* digestion, and bioaccessibility[J]. Polymers, 2022, 14(7): 1414. DOI:10.3390/polym14071414.
- [36] YI J, LI Y, ZHONG F, et al. The physicochemical stability and *in vitro* bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 19-27. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.05.005.