

基于胃肠动态消化系统分析两种不同藻油剂型的 消化特性和生物可及性

陈琼¹, 郑奕锐¹, 汤新¹, 陈文荣¹, 许丹玲², 赵小淦², 李伟²

(1. 仙乐健康科技股份有限公司, 广东汕头 515000) (2. 南京农业大学食品科学技术学院, 江苏南京 210095)

摘要: 利用体外动态模拟消化系统评价了两种不同二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 藻油剂型的消化速率及其生物可及性, 以期找到消化特性更佳 DHA 藻油产品。对凝胶糖果和软胶囊两种不同剂型的 DHA 藻油样品进行体外胃肠动态消化, 并从粒径及表面电势、微观结构和 DHA 含量等方面对消化特性进行分析, 多角度探究两种剂型藻油产品对其消化行为的影响。结果表明添加胰酶组在肠消化 60 min 后, 凝胶糖果消化产物粒径极显著低于软胶囊消化产物 ($p < 0.01$); 未添加胰酶组软胶囊肠消化 30 min 至 90 min 后, 产物粒径显著大于凝胶糖果 ($p < 0.05$)。添加胰酶组中凝胶糖果肠消化产物 ζ 电位绝对值随时间增加而增大, 且均高于 30 mV。随着肠消化时间延长, 凝胶糖果游离脂肪酸 (Non esterified fatty acid, NEFA) 释放量逐步增加, 达到缓释效果, 软胶囊 NEFA 量与消化时间无明显关系。凝胶糖果消化产物在荧光图像中呈现分散均一的小液滴, 软胶囊消化产物形态大小各异, 均一性差。综上所述, 凝胶糖果的消化特性及油脂的释放与分散性能更好, 且其 DHA 释放量为软胶囊的 6.75 倍, 具有较好的生物可及性。

关键词: 仿生胃肠动态消化; 凝胶糖果; 软胶囊; DHA 藻油; 生物可及性

文章编号: 1673-9078(2021)08-127-134

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.0701

Digestive Characteristics and Bioaccessibility of Two Different Types of Algal Oil Based on an *in vitro* Dynamic Digestive System

CHEN Qiong¹, ZHENG Yi-rui¹, TANG Xin¹, CHEN Wen-rong¹, XU Dan-ling², ZHAO Xiao-gan², LI Wei²

(1. Sirio Pharma Co. Ltd., Shantou 515000, China)

(2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 250061, China)

Abstract: The digestion rate and bioaccessibility of two different types of docosahexaenoic acid (DHA) algal oil products, namely DHA gel candy and DHA softgel, were evaluated using an *in-vitro* dynamic digestive system. The two DHA algal oil products were digested *in vitro*; their particle sizes, surface potentials, microstructures, and DHA contents were determined to evaluate their digestive characteristics. The results showed that in the pancreatin supplement group, the particle size of DHA gel candy was significantly smaller than that of DHA softgel ($p < 0.01$) after 60 minutes of intestinal digestion. However, in the group without pancreatin, the particle size of softgel was significantly larger than that of gel candy ($p < 0.05$) after 30–90 minutes of intestinal digestion. In the pancreatin supplement group, the zeta potential of the products from intestinal digestion of gel candy increased with time, and they were all higher than 30 mV. There was a sustained release of non-esterified fatty acid (NEFA) by gel candy, which gradually increased with time. In contrast, there was no obvious relationship between the NEFA released by softgels and digestion time. In addition, the digestion products of gel candy were in the form of small droplets with similar shape and size and uniform dispersion in fluorescent images, whereas those of softgels varied in shapes and sizes with non-uniform distribution. In summary, compared to DHA softgels, DHA gel candy is more easily digested, its oil is gradually released and sustained, and has a better dispersion

引文格式:

陈琼, 郑奕锐, 汤新, 等. 基于胃肠动态消化系统分析两种不同藻油剂型的消化特性和生物可及性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(8): 127-134

CHEN Qiong, ZHENG Yi-rui, TANG Xin, et al. Digestive characteristics and bioaccessibility of two different types of algal oil based on an *in vitro* dynamic digestive system [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 127-134

收稿日期: 2021-04-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31871771); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20201320)

作者简介: 陈琼 (1966-), 女, 副主任药师, 研究方向: 药学; 通讯作者: 李伟 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物与生物技术

performance at all stages of digestion. Moreover, the DHA content released by gel candies was 6.75 times that of softgel, indicating better bioaccessibility of gel candy.

Key words: *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion; gel candy; softgel; docosahexaenoic acid algal oil; bioaccessibility

二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 是人体重要的一种长链多价不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid, PUFA), 属于 Omega-3 不饱和脂肪酸家族中的重要成员, 是大脑细胞膜和视网膜的重要组成部分, 对眼睛、神经系统和哺乳动物神经系统的发育至关重要^[1]。大量研究表明, DHA 还具有消炎^[2]、降低血栓的发生率和动脉硬化^[3,4]、提高机体免疫力、预防心脑血管^[5]、炎症疾病和防癌等作用^[6]。目前用于食品营养补充剂的 DHA 主要来源于鱼油和藻油。与鱼油 DHA 相比, 微藻来源的 DHA 无鱼腥味、无环境污染而得到广泛关注。藻油提取自藻类植物, 属于植物性 DHA, 因未经食物链传递, 是世界上最纯净和最安全的 DHA 来源。作为大脑中长链 PUFA 的主要类型, DHA 约占大脑总脂肪酸的 15%。由于 PUFA 的需求量很大, PUFA 的传统来源鱼油被认为是一种枯竭的资源, 因此开发新型植物性 DHA 藻油作为 PUFA 的新型替代来源具有重要意义^[7]。目前, 含有约 50% EPA 和 DHA 的藻油被开发为可持续的 Omega-3 脂肪酸来源^[8]。然而, 分子结构中的不饱和键使 DHA 容易受到氧化剂、光 and 高温的影响, 从而导致产品保质期有限^[9]。因此, 为了更好地投入功能性食品市场, DHA 需要以某种形式保护不被氧化, 通常是选用不同的辅料与优化制备工艺来提高藻油稳定性, 同时评估不同配方及制成工艺对于藻油的释放及生物可及性等的影响^[10]。目前市场上较多的 DHA 藻油产品多为 DHA 软胶囊, 本研究中的 DHA 藻油凝胶糖果优化了藻油产品的制备工艺, 采用特定乳化技术制成。

为了评估 DHA 藻油凝胶糖果和 DHA 软胶囊两种不同剂型藻油产品的消化特性及生物可及性, 建立了体外动态胃肠模拟消化模型, 通过对两种剂型的藻油样品进行体外动态胃肠消化, 在模拟肠液中添加胰酶和未添加胰酶两种消化条件下, 探讨消化过程中消化产物混合体系的分散情况、粒径大小及表面电势、游离脂肪酸的释放、脂滴微观结构和 DHA 释放量以及其生物可及性等方面进行综合分析。以期找到能提高功能性油脂消化特性及生物可及性的剂型, 为丰富藻油等功能性油脂产品市场提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

胃蛋白酶 (≥ 400 u/mg, 货号 P7125-100G, CAS: 9001-75-6)、胰液素 (8 u/mg, 货号 P7545-100G, CAS: 8049-47-6)、胃膜素 (货号 M2378-100G, CAS: 84082-64-4)、胆汁盐 (货号 48305-50G-F)、尼罗蓝、尼罗红, 美国 SIGMA 公司; 游离脂肪酸 (NEFA) 测试盒, 南京建成有限公司; 脂肪酶 (100 u/mg), 上海麦克林生化科技有限公司; 甲醇钠、甲基叔丁基醚 (MTBE), 上海阿拉丁生化科技有限公司; 乙腈: 色谱纯; DHA 甲酯标准品, 上海安谱实验科技股份有限公司; 萃优酪™ DHA 藻油凝胶糖果 (批号 20201104, 萃优酪™ 商标正在注册中, 以下简称 DHA 凝胶糖果), 仙乐健康科技股份有限公司特定技术制备; DHA 藻油软胶囊 (批号 20210107, 以下简称 DHA 软胶囊), 仙乐健康科技股份有限公司制备; 氯化钾、磷酸二氢钾、碳酸氢钠、氯化钠、六水合氯化镁、碳酸铵、盐酸均属于分析纯。

1.2 主要仪器设备

动态仿生胃肠消化系统, 南通东概念有限公司; PB-20 型 pH 仪, 德国 Sartorius 公司; HH-6 型数显恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司; HYQ-2121A 型漩涡匀器, 苏州捷美电子有限公司; 722 可见分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; Waters 高效液相色谱仪, 沃特世科技 (上海) 有限公司; 荧光显微镜 (Nikon ECLIPSE 80i), 尼康光学仪器 (中国) 有限公司; 马尔文 Malvern Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度电位仪, 英国马尔文仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品处理

DHA 软胶囊样品: 取一粒 DHA 软胶囊 (单粒质量 151 mg, DHA 含量 32 mg, 主要辅料为明胶、甘油等), 以完整颗粒形式放入仿真小鼠胃中, 进行体外模拟消化。DHA 凝胶糖果样品: 取一粒 DHA 凝胶糖果 (单颗质量 1500 mg, DHA 含量 200 mg, 主要辅料为明胶、木糖醇和山梨糖醇等), 剪碎成细小碎块, 颗粒大小最大长度小于 3 mm, 称取剪碎后的样品 240 mg (DHA 含量 32 mg), 放入仿真胃中, 进行体外模拟消化。

1.3.2 体外动态仿生胃肠消化

应用本实验室前期建立的动态仿生胃肠消化系

统进行模拟体外消化^[11-13]。

1.3.2.1 胃消化液的配置

配置每 100 mL 胃消化液,称取氯化钾 51.44 mg、磷酸二氢钾 12.25 mg、碳酸氢钠 210.03 mg、氯化钠 275.84 mg、六水合氯化镁 2.03 mg、碳酸铵 7.86 mg,盐酸调节溶液至 pH 为 1.6。

1.3.2.2 肠消化液的配置

配置每 100 mL 肠消化液,称取氯化钾 50.70 mg、磷酸二氢钾 10.89 mg、碳酸氢钠 714.09 mg、氯化钠 224.41 mg、六水合氯化镁 6.71 mg,盐酸调节溶液至 pH 为 7.0。

1.3.2.3 模拟胃消化

称取 6.25 mg 胃蛋白酶与 15 mg 胃膜素,分别溶于 10 mL 胃消化液中,于 37 °C 水浴锅中水浴活化 20 min 后混合,即为模拟胃液。用注射器吸取 15 mL 模拟胃液用于胃消化。将样品填塞进入体外动态仿生胃中,加入 5 mL 纯水或口腔消化液,再加入 600 μ L 模拟胃液。安装好动态仿生胃肠消化仪器,仪器运行参数为:胃液注射泵速度为 52 μ L/min,排空注射泵速度为 70 μ L/min,胃倾斜角度为 8 °,胃挤压速度为 3 rpm/min,胃滚轮速度为 12 r/min,消化时间为 2 h。消化产物置于沸水浴 10 min 灭活酶,于 -20 °C 冰箱中保存。

1.3.2.4 模拟肠消化

取 81.7 mg 胆汁盐与 56.2 mg 胰液素溶于 20 mL 肠消化液中,于 37 °C 水浴活化 20 min,即为添加胰酶组模拟肠液;称取 81.7 mg 胆汁盐溶于 20 mL 肠消化液为未添加胰酶组的模拟肠液。用胃液注射器吸取 15 mL 模拟胃液,肠液注射器吸取 15 mL 模拟肠液。将样品填塞进入仿真小鼠胃中,加入 5 mL 纯水或口腔消化液,再加入 600 μ L 模拟胃液。安装好动态仿生胃肠消化仪器,仪器的运行参数为:胃液注射泵速度为 52 μ L/min,肠液注射泵速度为 52 μ L/min,排空注射泵速度为 100 μ L/min,胃倾斜角度为 8 °,胃挤压的速度为 3 r/min,胃滚轮速度为 12 r/min,肠滚轮速度为 12 r/min,消化时间为 2 h,每 30 min 取样,消化产物置沸水浴中 10 min 灭活酶,于 -20 °C 冰箱中保存。

1.3.3 粒径大小与表面电势

根据动态光散射技术,使用马尔文 Zetasizer Nano ZS90 型 ζ 电位与纳米粒度仪分析消化后 DHA 藻油混合体系的 ζ 电位和粒径分布,测定条件:测定温度 25 °C,吸取消化后的样品 0.5 mL 后稀释至 2 mL。每个样品测定 3 次后取平均值,得到粒径大小与体积百分比分布曲线^[14]。

1.3.4 微观结构

使用 Nikon ECLIPSE 80i 显微镜观察 DHA 凝胶糖果和 DHA 软胶囊胃肠消化产物的微观结构。配制质量分数 0.02% (m/V) 尼罗红和 0.1% (m/V) 尼罗蓝溶解于 1,2-丙二醇和水的混合溶液 (50:1, V/V) 中,混合均匀后于 4 °C 下避光保存^[15]。观测时,将 2.5 μ L 混合染料加入 50 μ L 样品中,充分混匀后取 20 μ L 制片,使用荧光显微镜观察并采集图像。激发滤光片参数:激发波长 540/25 nm,分光波长 565 nm,发射波长 605/55 nm。

1.3.5 游离脂肪酸释放量

使用游离脂肪酸 (Non esterified fatty acid, NEFA) 测试盒测定游离脂肪酸含量。将棕榈酸标准品定容至 25 mL,浓度为 800 μ mol/L。向 0.2 mL 标准品与各样品管中依次加入缓冲液、铜试剂和氯仿试剂,混匀抽提 2 min,3500 r/min 离心 10 min,吸弃上层蓝色液体及蛋白凝块,取剩余的下层有机相 2 mL 加入显色剂 0.25 mL,涡旋 10 s 后静置 2 min,于 440 nm 下测定吸光度,以氯仿为空白管调零比色。按以下公式计算样品的游离脂肪酸释放量。

$$NEFA = \frac{A - A_c}{A_s - A_c} \times C_s \times 100\%$$

注:A:样品管吸光度;A_c:空白管吸光度;A_s:标准管吸光度;C_s:标准品浓度。

1.3.6 DHA 含量

使用 HPLC 来评估不同消化阶段消化液中 DHA 的含量。通过对配制的系列浓度的对照品溶液,按照设计的色谱条件进样,以组分的峰面积为纵坐标,对应的浓度 (μ g/mL) 为横坐标作图,求得回归方程。具体操作为:10 mg DHA 甲酯标准品用乙腈定容至 10 mL,依次稀释为浓度 100 μ g/mL~0.313 μ g/mL 的标准品溶液。消化后的样品通过 12000 r/min 离心 90 min 后取胶束相溶液。DHA 甲酯化处理:向胶束相溶液中加入 0.6 mL 叔丁基甲基醚和 0.3 mL 的 0.2 M 甲醇钠的甲醇溶液。涡旋 1 min,室温静置 2 min。加入 0.5 M 硫酸 20 μ L 以中和溶液,涡旋 5 s。加入 0.6 mL 超纯水,涡旋 10 s,4000 r/min 离心 5 min。吸取上清液约 400 μ L,氮气吹干。产物用 2 mL 乙腈溶解,即为甲酯化样品^[16]。DHA 甲酯用高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 测定,可避免高温对 DHA 稳定性的影响^[17]。色谱条件: Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μ m); 二极管阵列检测器,波长为 210 nm,柱温设置为 25 °C,流速 1 mL/min,进样量 10 μ L,流动相:乙腈/水 (95/5, V/V) 等度洗脱^[18,19]。按以下公式计算消化样品的 DHA 释放倍数 (以 DHA 含量计)。

$$DHA\text{释放倍数} = \frac{S_1}{S_2}$$

注: S_1 : 凝胶糖果 DHA 释放量总峰面积; S_2 : 软胶囊 DHA 释放量总峰面积。

1.3.7 数据处理与分析

数据以平均值±标准差表示,采用 SAS 8.1 软件进行统计分析。*代表差异显著 ($p<0.05$), **代表差异极显著 ($p<0.01$)。实验数据绘图由 Origin 2018 软件完成。

2 结果与讨论

2.1 粒径大小与粒径分布

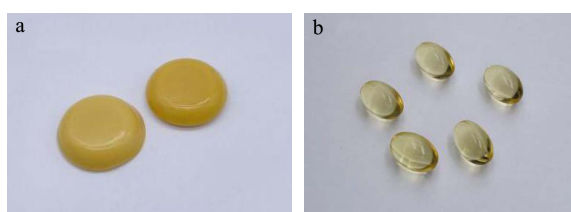


图1 两种剂型的 DHA 藻油产品的外观结构图

Fig.1 The appearance and structure of two forms of DHA alginate oil product

注: a: DHA 凝胶糖果; b: DHA 软胶囊。

在生物学领域研究中,粒子的粒径是重要的考虑因素,尤其是对于新型油脂性产品载运系统的研发。脂肪颗粒大小降低至亚微米级时,能够增强水难溶性物质的分散性^[20]。本研究中对 DHA 凝胶糖果和 DHA 软胶囊(如图 1)两种剂型的藻油样品进行体外动态消化,分析不同消化时间和消化方式中两种剂型的消化特性。a 组的模拟肠液中含有胰液素(混合酶体系)和胆盐, b 组肠液不添加胰液素,其它消化条件一致。通过添加胰酶组(a 组)反映样品水解后的胶体混合物粒径大小与分布,以未添加胰酶组(b 组)为对照,分析藻油样品被胆盐乳化过程中乳浊液的液滴粒径变化。测得消化产物的粒度大小结果如图 2。由图 2a 可知, DHA 软胶囊胃消化的粒度低于其肠消化,且其粒度范围在 1600~2200 nm 内,变化幅度平缓; DHA 凝胶糖果在肠消化 30 min 时粒度大小达到最高,说明在肠消化前期 DHA 凝胶糖果由固体形态先被消化液乳化分解成大小不同的液滴,后续消化中粒径大幅减小。在胃消化和肠消化前期, DHA 凝胶糖果与 DHA 软胶囊样品粒度无显著差异。但在肠消化 60 min 后, DHA 凝胶糖果消化产物粒径大小快速降低,极显著低于 DHA 软胶囊粒径,说明 DHA 凝胶糖果所含的油脂在肠消化中被胆盐很好地乳化成较均一的小液滴。由图 2b 可得, DHA 软胶囊组肠消化 30 min、90 min 粒度

显著大于 DHA 凝胶糖果 ($p<0.05$),胃消化与肠消化下的粒度结果无显著差异。与加胰酶(a 组)相比,未添加胰酶组(b 组)的肠消化粒度变化幅度变小。整体添加胰酶组的样品粒度结果更大。

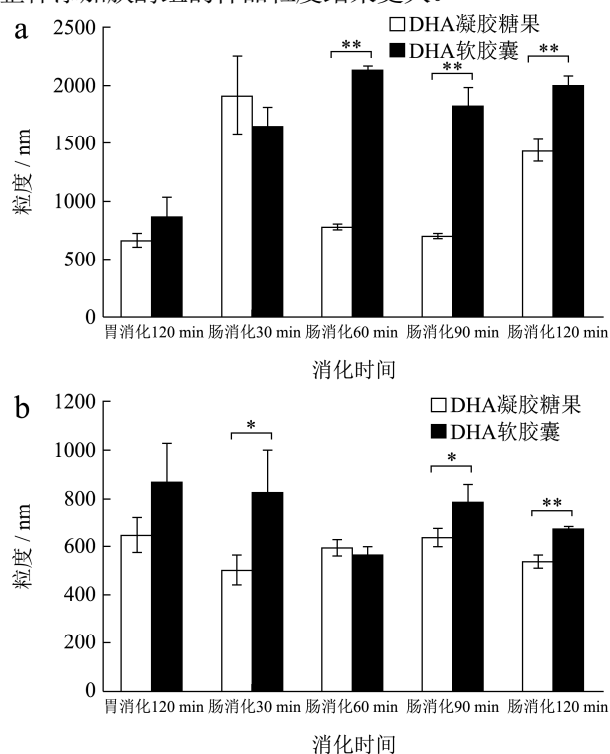


图2 不同消化阶段下 DHA 凝胶糖果和 DHA 软胶囊消化产物的粒度大小

Fig.2 The particle diameter of DHA gel candy and DHA softgel of digestive products for different digestion stage

注: a: 添加胰酶组; b: 未添加胰酶组。*代表差异显著 ($p<0.05$), **代表差异极显著 ($p<0.01$), 下同。

在脂肪消化过程中,乳液的比表面积决定了胆盐、脂肪酶在油-水界面的吸附位点,因此乳状液粒径大小对脂肪消化速率影响显著^[21]。图 3 表明了消化产物的粒度分布。DHA 软胶囊消化产物颗粒的相对体积分数峰值整体低于 DHA 凝胶糖果,分散范围较大,主要在 80~1500 nm 之间。有研究对市售藻油粉进行体外消化,其粒径分布在 1~1000 nm 之间,最高体积分数低于 10%,分布相对不集中^[22]。不同处理下的粒径分布也有差异, DHA 软胶囊胃消化的粒径在 300~600 nm 有较多分布,肠消化 30 min 时粒径集中在 250 nm 左右,肠消化 60 min 后粒径分布向两侧分化,大小接近 150 nm 和 1000 nm 的颗粒数量增加。DHA 凝胶糖果消化产物的颗粒相对体积分数的散布范围窄且对称,粒径分布较集中。不同处理下的样品颗粒大小分布范围接近,集中在 200~1000 nm 之间,结合样品较高的 ζ 电位值可说明分散系稳定均匀, DHA 凝胶糖果肠消化 120 min 的相对体积分数峰值最高。

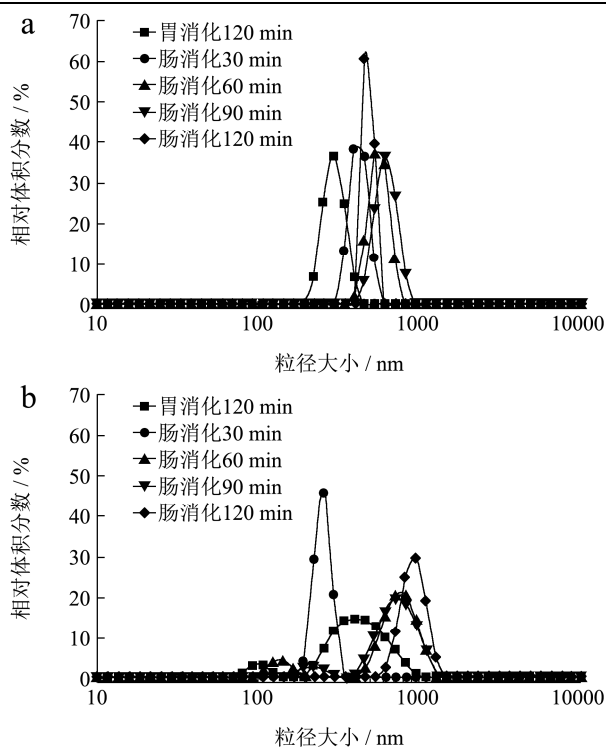


图3 不同消化阶段下添加胰酶组的消化产物的粒度分布
Fig.3 The range of the particle diameter of digestive products for different digestion stage

注: a: DHA 凝胶糖果; b: DHA 软胶囊。

2.2 ζ 电位绝对值

乳状液的稳定性与 ζ 电位绝对值有关, ζ 电位绝对值越大, 乳液越趋于稳定^[23]。胃消化 ζ 电位为正, 数值较小; 肠消化 ζ 电位为负, 且绝对值较大。添加胰酶组 (a 组) 的 ζ 电位可表征消化后辅料与 DHA 胶体混合体系的电位, 未添加胰酶组 (b 组) 的结果为样品崩解后辅料与藻油液滴乳浊液的电位。由图 4 可知, 添加胰酶组 (a 组) 和不添加胰酶组两种剂型的样品在不同消化阶段的 ζ 电位绝对值差异极显著 ($p < 0.01$)。添加胰酶组 (a 组) 中, DHA 凝胶糖果肠消化产物 ζ 电位绝对值随消化时间增加而增大, 且均高于 30 mV, 说明颗粒的分散体系稳定程度高 (图 4a)。DHA 软胶囊肠消化产物也有较好的颗粒稳定性, 但其 ζ 电位变化与消化时间没有明显关系。除肠消化 30 min 以外, 其他消化情况下的 DHA 凝胶糖果 ζ 电位绝对值均显著高于软胶囊 ($p < 0.01$), 表明 DHA 凝胶糖果在胃肠消化中具有更好的分散体系稳定性。未添加胰酶组 (B 组), DHA 软胶囊 ζ 电位绝对值均极显著大于 DHA 凝胶糖果 ($p < 0.01$), 不同消化处理无显著效应差异 (图 4b)。可知未添加胰酶组 (b 组) 的情况下, DHA 凝胶糖果肠消化电位绝对值降低, 接近胃消化电位绝对值。Han 等^[24]在模拟消化后含长链甘油三

酯 (LCT) 和中链甘油三酯 (MCT) 的乳液中发现胃阶段有大量油滴积聚, 尤其在 LCT 乳液中, 模拟胃消化 ζ 电位降低。在小肠阶段油滴出现积聚, 但 MCT 乳液也含有一些相对较大的颗粒。这与我们两种藻油剂型的 ζ 电位在胃肠阶段变化一致。

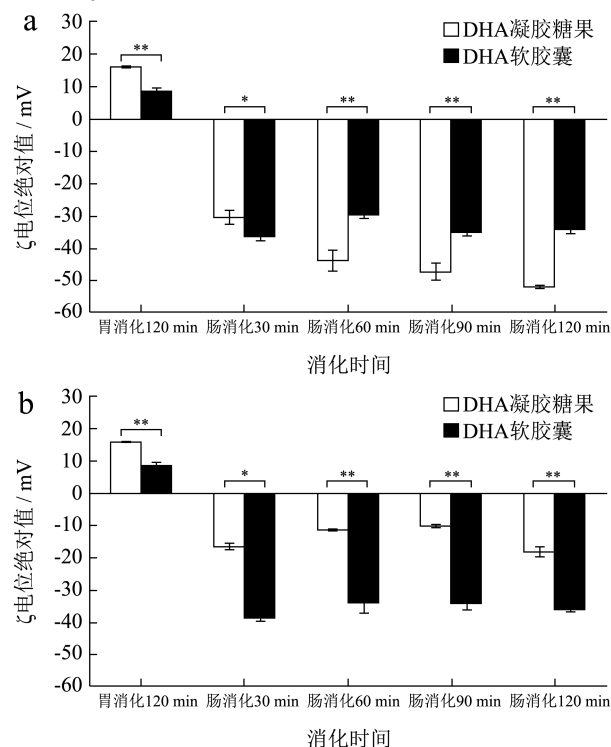


图4 不同消化阶段下的 DHA 凝胶糖果和 DHA 软胶囊消化产物的 ζ 电位绝对值

Fig.4 The zeta-potential of DHA gel candy and DHA softgel of digestive products for different digestion stage

注: a: 添加胰酶组; b: 未添加胰酶组。

2.3 游离脂肪酸释放量

有研究表明疏水性生物活性化合物的生物可及性和生物利用度可以通过将它们与游离脂肪酸的结合形成混合胶束来提高^[25]。通过游离脂肪酸 (NEFA) 试剂盒分析评估不同藻油类型样品脂质消化程度的影响。在小肠阶段测定消化产物中胶束释放的游离脂肪酸量 (图 5)。胃消化几乎不产生 NEFA。DHA 凝胶糖果在各消化阶段的 NEFA 浓度均有极显著性差异 ($p < 0.01$), 且随着肠消化时间变长, NEFA 释放量显著增加, 在肠消化 120 min 达到最高浓度。DHA 软胶囊在肠消化中 NEFA 含量始终保持在 1.75~2.25 mmol/L 范围内, 与消化时间无明显关系。通过比较发现, 胃消化产物 NEFA 含量差异不显著, 而肠消化均有极显著差异 ($p < 0.01$)。在肠消化 30 min 时, DHA 凝胶糖果 NEFA 浓度低于 DHA 软胶囊, 在接下来的消化过程中浓度逐步增加。表明 DHA 凝胶糖果基质

体系在肠消化 90 min 时仍未被完全破坏, 对 DHA 藻油有较好的保护作用, 达到了明显的缓释效果。

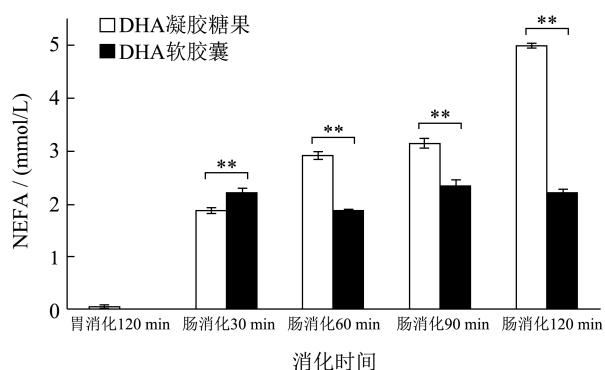


图5 不同消化阶段下 DHA 凝胶糖果和 DHA 软胶囊消化产物的 NEFA 释放量

Fig.5 The NEFA content of DHA gel candy and DHA softgel of digestive products for different digestion stage

2.4 DHA 含量

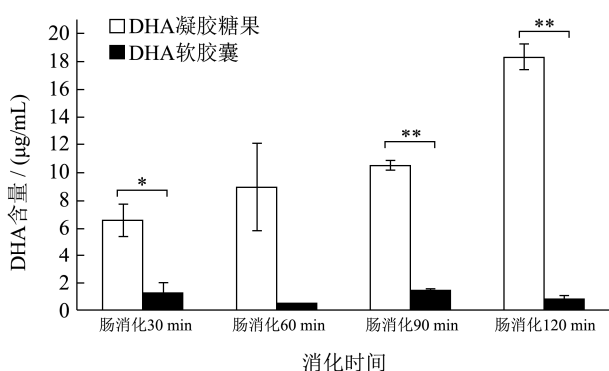


图6 不同消化阶段下 DHA 凝胶糖果和 DHA 软胶囊消化产物 DHA 含量变化

Fig.6 The DHA contents of DHA gel candy and DHA softgel of digestive products for different digestion stage

进行消化前的样品 DHA 含量一致, 但随着消化时间的不同, 消化产物释放的 DHA 含量不同。由标准曲线求得 DHA 甲酯标准品回归方程: $y=2.4 \times 10^7 x + 4.3 \times 10^4$ ($R^2=0.9997$)。对两种样品消化产物胶束相进行甲酯化并进行 DHA 释放量分析, 结果如图 6 所示。DHA 凝胶糖果肠消化的 DHA 释放量随着消化时间的增加而增加, 但 DHA 软胶囊消化后释放的 DHA 含量变化不具有时间依赖性, 与游离脂肪酸结果对比, 凝胶糖果肠消化随着时间的增加 NEFA 的浓度增加, DHA 软胶囊的 NEFA 与时间不呈依赖性, 二者变化趋势一致 (图 5)。肠消化 120 min 测得的 DHA 含量显示凝胶糖果 DHA 含量极显著高于软胶囊含量 ($p<0.01$), 肠消化 30 min 凝胶糖果与胶囊 DHA 含量具有显著性差异 ($p<0.05$)。DHA 凝胶糖果的总 DHA 释放比例为 63%, DHA 软胶囊的总 DHA 释放比例为

4.77%。进一步分析两种样品的 DHA 释放倍数 (按 1.3.6 中公式计算), 结果显示 DHA 凝胶糖果 DHA 释放量为 DHA 软胶囊的 6.75 倍。

2.5 微观结构

有研究指出食品或者营养补充剂的微观结构的破坏可能会影响消化道中某些营养物质的释放、转化和随后的吸收, 因此评价加工过程或食物摄入过程中与基质-营养素相互作用相关的微结构变化类型对其生物利用度具有重要指导作用^[26]。尼罗红可与油脂特异性结合产生强烈荧光, 而胰酶消化后的游离脂肪酸无法被染色观察, 因此使用不添加胰酶组的样品分析产物在消化过程中的微观形态变化。观察消化样品微观结构结果如图 7 所示。

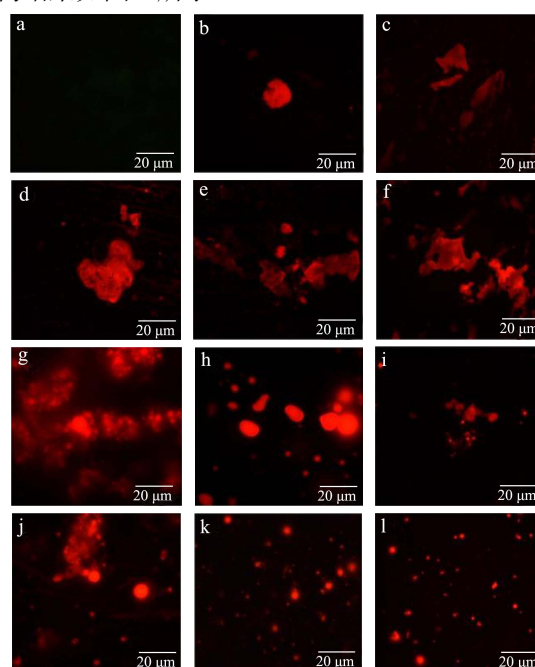


图7 消化产物微观形态结构

Fig.7 Microstructure of digestive products

注: 图 a-f: DHA 软胶囊初始状态, 胃消化 2 h, 肠消化 0.5 h, 肠消化 1.0 h, 肠消化 1.5 h, 肠消化 2 h; 图 g-l: DHA 凝胶糖果初始状态, DHA 胃消化 2 h, 肠消化 0.5 h, 肠消化 1.0 h, 肠消化 1.5 h, 肠消化 2 h。

首先对 DHA 凝胶糖果样品未消化前进行微观结构分析, DHA 凝胶糖果在水中可形成较稳定的乳浊液 (静置 2 h 未分层), 而 DHA 软胶囊未消化无法在水中形成稳定的乳浊液, 无法进行荧光拍摄 (图 7a)。荧光图 7g 显示 DHA 凝胶糖果初始时基质与油滴相互连接, 不同大小的油滴聚集成团, 形成有空间结构的复合体。上述电位图中表明 DHA 凝胶糖果消化产物有较高的 ζ 电位 (图 4a), 肠消化初期虽然脂滴大小有差异, 但相比于 DHA 软胶囊样品轮廓清晰, 较少

聚集, 对应图 7 中不同处理下 DHA 凝胶糖果样品均有较好的颗粒分散性。DHA 软胶囊 ζ 电位总体低于凝胶糖果, 荧光染色显示其颗粒更易相互吸引聚集, 镜检观察分布不均匀。DHA 凝胶糖果肠消化 30 min 有较大的颗粒, 而在后续消化中逐渐变小, DHA 凝胶糖果基质的崩解使 DHA 藻油缓慢释放, 有利于脂滴乳化, 不易连接成片或聚集成团, 肠消化 2 h 后的粒径呈均匀分布状态 (图 7I), 多数粒径在 1~2 μm 左右。DHA 软胶囊在肠消化 30 min 时分离出的脂滴较少 (图 7b), 后续数量逐渐增加, 易形成较大的颗粒, 乳化效果不如 DHA 凝胶糖果。结合 DHA 凝胶糖果样品较高的 ζ 电位值可说明 DHA 凝胶糖果肠消化后分散系稳定均匀 (图 4a), 符合荧光图像中出现的大量形态大小相似且分散均一的小液滴。DHA 软胶囊脂滴的形态大小各异, 总体分布不如凝胶糖果消化均一。梁丽^[27]对不同油脂乳液消化后的微观结构进行观察, 其中藻油在口腔和胃消化的显微图像中分布较少, 在肠消化后脂滴数量增加, 且脂滴存在一定程度的聚结情况, 与图 7F 结果相符。

3 结论

通过体外动态模拟胃肠消化模型, 我们得出 DHA 藻油凝胶糖果在消化各个阶段消化特性及油脂的释放与分散性能较 DHA 藻油软胶囊表现更为良好。DHA 凝胶糖果消化产物粒径分布较集中, ζ 电位值较高, 分散系稳定均匀, 经过消化后体系分散均一, 更利于被吸收; 且 DHA 凝胶糖果释放的游离脂肪酸在消化初期浓度较低, 后续消化过程中逐步增加, 具有缓释效果, 消化结束后释放的 DHA 含量较高。DHA 软胶囊消化后产物粒径较分散, 形成的颗粒较大, 乳化效果不如 DHA 凝胶糖果。综上所述, 基于现有的制备工艺和条件, DHA 软胶囊和 DHA 凝胶糖果两种使用不同辅料及制备工艺的产品对于藻油的释放和生物可及性具有不同的影响, DHA 藻油凝胶糖果具有较好的生物可及性, 其生物可及性为 DHA 藻油软胶囊的 6.75 倍 (以 DHA 含量计)。

参考文献

- [1] 孔欣欣, 郭楠楠. DHA 藻油生产技术及其在食品中的应用进展[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(4): 84-87, 91
- [2] KONG Xin-xin, GUO Nan-nan. Progress of production technology and application in food on DHA algal oil [J]. Food and Fermentation Technology, 2015, 51(4): 84-87, 91
- [2] 姜剑锋, 赵丽芹, 陈涛, 等. DHA 的来源及寇氏隐甲藻生产 DHA 的研究[J]. 内蒙古农业科技, 2011, 1: 109-112

- JIANG Jian-feng, ZHAO Li-qin, CHEN Tao, et al. The research development of docosahexaenoic acid production by *Cryptocodinium cohnii* [J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2011, 1: 109-112
- [3] Arab-Tehrany E, Jacquot M, Gaiani C, et al. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids [J]. Trends in Food Science & Technology, 2012, 25(1): 24-33
- [4] Schram L B, Nielsen C J, Porsgaard T, et al. Food matrices affect the bioaccessibility of (n3) polyunsaturated fatty acids in a single meal study in humans [J]. Food Research International, 2007, 40(8): 1062-1068
- [5] Mickleborough T D. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids on the inflammatory response in asthma [J]. Agro Food Industry Hi Tech, 2009, 20(4): 10-12
- [6] Xu Z, Tang H, Huang F, et al. Algal oil rich in n-3 PUFA alleviates DSS-induced colitis via regulation of gut microbiota and restoration of intestinal barrier [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 615404
- [7] Lin X, Wang Q, Li W, et al. Emulsification of algal oil with soy lecithin improved DHA bioaccessibility but did not change overall *in vitro* digestibility [J]. Food & Function, 2014, 5(11): 2913-2921
- [8] Vuorinen A, Bailey-Hall E, Karagiannis A, et al. Safety of algal oil containing EPA and DHA in cats during gestation, lactation and growth [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2020, 104(5): 1509-1523
- [9] Shao W, Pan X, Liu X, et al. Microencapsulation of algal oil using spray drying technology [J]. Food Technology and Biotechnology, 2018, 56(1): 65-70
- [10] 付冬文. Pickering 型和传统剂型 DHA 藻油乳液体系的构建及产品开[D]. 南昌: 南昌大学, 2020
- FU Dong-wen. Construction of Pickering and traditional DHA algal oil emulsion systems and its product development [D]. Nanchang: Nanchang University, 2020
- [11] Qing S, Zhang Q, Li W, et al. Effects of different satiety levels on the fate of soymilk protein in gastrointestinal digestion and antigenicity assessed by an *in vitro* dynamic gastrointestinal model [J]. Food & Function, 2019, 10(12): 7855-7864
- [12] Huang J, Liu Z, Rui X, et al. Assessment of the effect of lactic acid fermentation on the gastroduodenal digestibility and immunoglobulin binding capacity of soy proteins via an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion model [J]. Food & Function, 2020, 11(12): 10467-10479

- [13] Rui X, Xing G, Zhang Q, et al. Protein bioaccessibility of soymilk and soymilk curd prepared with two *Lactobacillus plantarum* strains as assessed by *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 38: 155-159
- [14] 田少君,张贝贝,王蕾,等.亚麻籽油前体脂质体稳定性及释放性能研究[J].中国粮油学报,2019,34(4):92-99,106
TIAN Shao-jun, ZHANG Bei-bei, WANG Lei, et al. The stabilities and release behaviors of flaxseed oil pro-liposomes [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2019, 34(4): 92-99, 106
- [15] 杨小斌,周爱梅,王爽,等.蓝圆鲹鱼油微胶囊的结构表征与体外消化特性[J].食品科学,2019,40(1):117-122
YANG Xiao-bin, ZHOU Ai-mei, WANG Shuang, et al. Structure characterization and *in vitro* digestibility of microencapsulated *Decapterus maruadsi* fish oil [J]. Food Science, 2019, 40(1): 117-122
- [16] Khor Y P, Hew K S, Abas F, et al. Oxidation and polymerization of triacylglycerols: in-depth investigations towards the impact of heating profiles [J]. Foods, 2019, 8(10): 475
- [17] 谢枫才,张宾,孙继鹏.藻油中DHA-EE的HPLC快速定量方法的建立[J].集美大学学报(自然科学版),2018,23(3):187-194
XIE Feng-cai, ZHANG bin, SUN Ji-peng. HPLC method for rapid determination of DHA-EE in algae oil [J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2018, 23(3): 187-194
- [18] 张凌云,杨莹,邓世明.HPLC法测定海鲈鱼鱼油中EPA和DHA的含量[J].食品工业,2019,40(4):327-330
ZHANG Ling-yun, YANG Ying, DENG Shi-ming. Determination of DHA and EPA in sea bass by HPLC method [J]. Food Industry, 2019, 40(4): 327-330
- [19] 彭宏伟,张博,杨小川,等.HPLC法测定鲑鱼鱼油中二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸的含量[J].中国药房,2010,21(13):1228-1230
PENG Hong-wei, ZHANG Bo, YANG Xiao-chuan, et al. Determination of EPA and DHA in ray oil by HPLC [J]. China Pharmacy, 2010, 21(13): 1228-1230
- [20] Bernaerts T, Verstreken H, Dejonghe C, et al. Cell disruption of *Nannochloropsis* sp. improves *in vitro* bioaccessibility of carotenoids and ω 3-LC-PUFA [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 65: 103770
- [21] 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
- [22] 张毓瑜.婴儿配方奶粉DHA藻油微胶囊化制备与母乳化脂肪功能评价[D].北京:中国农业科学院,2020
ZHANG Yu-yu. Preparation of DHA alga oil microencapsulation and evaluation of breast-milk fat function infant formula [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020
- [23] 江连洲,綦玉曼,马春芳,等.鱼油纳米乳液运载体系构建与稳定性研究[J].农业机械学报,2018,49(10):387-395
JIANG Lian-zhou, QI Yu-man, MA Chun-fang, et al. Formation and stability of fish oil enriched biocompatible nano-emulsion [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(10): 387-395
- [24] Han J R, Gu L P, Zhang R J, et al. Bioaccessibility and cellular uptake of β -carotene in emulsion-based delivery systems using scallop (*Patinopecten yessoensis*) gonad protein isolates: effects of carrier oil [J]. Food & Function, 2019, 10(1): 49-60
- [25] Yang Y, Xiao H, Mc Clements D J. Impact of lipid phase on the bioaccessibility of vitamin E in emulsion-based delivery systems: relative importance of bioaccessibility, absorption, and transformation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(19): 3946-3955
- [26] Parada J, Aguilera J M. Food microstructure affects the bioaccessibility of several nutrients [J]. Journal of Food Science, 2007, 72(2): 21-32
- [27] 梁丽.乳脂肪球的体外消化特性及其影响因素研究[D].无锡:江南大学,2019
LIANG Li. Study on milk fat globules digestion characteristics *in vitro* and its influence factors [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019