

植物球蛋白/姜黄素纳米复合物的制备及其对 O/W 型 Pickering 乳液氧化稳定性影响

陈硕, 陈飞平, 唐传核

(华南理工大学轻工与食品学院, 蛋白质工程研究中心, 广东广州 510641)

摘要: 本论文以两类植物球蛋白: 豌豆分离蛋白(PPI)和大豆分离蛋白(SPI)为材料制备负载姜黄素蛋白纳米复合物, 并探究荷载前后蛋白所制备乳液的物理和氧化稳定性差异。结果表明: PPI 和 SPI 在 pH 3.0 和 pH 7.0 下荷载前后蛋白纳米颗粒粒径没有明显变化。pH 7.0 时两蛋白姜黄素荷载量均高于 pH 3.0, 各 pH 下 SPI 荷载量要高于 PPI。表面疏水性的显著降低与荧光淬灭现象发生表明形成两种蛋白纳米复合物的主要作用力为疏水相互作用, 同时在两 pH 下, PPI 比 SPI 荧光蓝移趋势更明显且有效淬灭常数也更大, 即更易形成复合物。与原蛋白相比, 荷载后各蛋白颗粒所制备乳液乳化活性有少许降低, 同时 pH 3.0 时各蛋白颗粒乳化活性要高于 pH 7.0。各乳液生成初级氧化产物脂质氢过氧化物浓度的变化趋势与生成次级氧化产物 TBARS 相类似, 均为荷载姜黄素后各乳液氧化水平加速, 同时 pH 3.0 时各类型乳液油滴氧化程度均高于 pH 7.0。

关键词: 豌豆分离蛋白; 大豆分离蛋白; 姜黄素; Pickering 乳液; 纳米复合物; 氧化稳定性

文章编号: 1673-9078(2015)12-197-204

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.030

Fabrication of Plant Globulin/Curcumin Nano-complexes and Their Impact on Physical and Oxidative Stability of Oil-in-water Pickering Emulsions

CHEN Shuo, CHEN Fei-ping, TANG Chuan-he

(Research & Development Center of Food Proteins, Department of Grain, Oil and Plant Protein Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Curcumin-loaded nanocomplexes were fabricated from two kinds of widely used plant globulins, pea protein isolate (PPI) and soy protein isolate (SPI). The impact of these nanocomplexes on physical and oxidative stability of corresponding nanoparticles stabilized oil-in-water emulsions was investigated. The results showed that there were no significant changes in particle size after complexation at pH 3.0 and pH 7.0. The loading amount (LA) of SPI was higher than that of PPI at each pH value, while the LA at pH 7.0 was higher than that at pH 3.0 for each protein. The changes in fluorescence quenching profiles and a notable decrease in surface hydrophobicity indicated that the main interaction between globulins and curcumin was hydrophobic forces, where PPI was more favorable to form nanocomplexes as compared to SPI. Complexation process slightly weakened the emulsifying ability of PPI and SPI particles. PPI and SPI exhibited better emulsifying ability at pH 3.0 rather than at pH 7.0. A similar trend of variation was observed for the yield of oxidative products from lipids: lipid hydroperoxides and thiobarbituric acid reactive substances. Complexation of PPI and SPI nanoparticles with curcumin accelerated the oxidation rate of globulin particles stabilized in oil droplets. The oxidation degree of emulsion droplets at pH 3.0 was much higher than that at pH 7.0. This study provides useful information regarding the regulatory properties of emulsion-based functional foods by changing stabilizer type.

Key words: pea protein isolate; soy protein isolate; curcumin; Pickering emulsions; nanocomplexes; oxidative stability

姜黄素(diferuloylmethane)主要来源于姜科姜黄属植物姜黄的根茎, 是姜黄中的主要活性成分^[1]。现

收稿日期: 2015-02-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31171632, 31471695)

作者简介: 陈硕(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物高分子材料与食品胶体工程

通讯作者: 唐传核(1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向为生物高分子材料与食品胶体工程

已证明姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗过敏、降血脂、增强纤维活性和抗阿尔茨海默病等药理作用^[2]。然而, 影响姜黄素应用在功能食品和药物缓控释系统的主要限制因素是其极低溶解性和生物可利用度^[3]。食品生物高分子, 如蛋白和多糖, 是天然且通常被认为是安全的原材料, 能被用来制备多种多样的适于包埋和保护亲脂性生物活性物质的缓控释系统, 如水凝胶、乳液、微球和微纳米颗粒等^[4]。其中植物蛋

白以其良好的营养、表面结构特性以及较低成本而在研究领域和工业界得到广泛利用^[5]。在过去的几十年中,蛋白纳米颗粒作为增强营养素的生物利用度的功能载体而被广泛应用。与此同时,各种类型的基于乳液的包埋系统被开发出来提高生物活性脂类的溶解度、稳定性及生物利用度等等^[6]。而在乳化食品中,乳液的物理稳定性减弱及乳滴中的油脂氧化是导致食品品质下降的重要原因。影响乳液物理稳定性的脱稳机制主要有乳滴间的合并、絮凝、凝结、奥氏熟化及宏观所表现出的脂肪上浮等。而乳液中油脂氧化又分为初级氧化和次级氧化,且每种氧化过程会伴随着相应产物的生成。了解乳液体系中油脂氧化的影响因素和有效的调控氧化过程对研发出高质量、高稳定性的功能食品起到重要作用^[7]。与此同时,食品级纳米颗粒稳定的 Pickering 乳液近年来引起研究者极大兴趣,其中由食品蛋白基颗粒制备的 Pickering 乳液^[8-9],尤其是天然蛋白纳米颗粒作为稳定剂,不需要任何化学修饰来提高颗粒两相润湿性,进而提高乳化性能。

本实验以应用最为广泛且具有良好营养价值和功能特性的两种可食用植物蛋白-豌豆分离蛋白(PPI)和大豆分离蛋白(SPI)为材料制备蛋白-姜黄素纳米颗粒复合物,并探究荷载前后所制备蛋白颗粒稳定 Pickering 乳液的物理和氧化稳定性,以期通过改变乳化稳定剂类型来调整乳液食品品质。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豌豆粉和大豆粕(山东禹王有限公司);大豆色拉油(食品级,市售);牛血清白蛋白(BSA)(Fitzgerald 公司);8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)(Sigma 公司,纯度 95%);其它化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

M-110EH 高压微射流纳米均质机,美国 Microfluidics 公司;F-7000 荧光分光光度计,日本 HITACHI 公司;CR22G 高速冷冻离心机,日本日立公司;2501PC 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;NanoZS 纳米粒度仪和 Mastersizer3000 激光纳米粒度测定仪,英国 Malvern 仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 豌豆分离蛋白和大豆分离蛋白的制备

豌豆分离蛋白的制备参考 Barac^[10]的方法,稍加改动。取 100 g 豌豆粉溶于蒸馏水中[按 1:10 (m/V)的

比例],搅拌 1 h,用 2 M NaOH 溶液调分散液的 pH 值至 9.0,间歇添加 NaOH 溶液以维持溶液的 pH 值,搅拌 2 h 后离心(8000 r/min, 30 min, 4 °C),上清液过 100 目筛收集。用 2 N NaOH 调节上清液的 pH 值为 4.5,在 4 °C 下放置 2 h,搅拌后离心(5000 r/min, 20 min, 4 °C),弃其上清液,所得沉淀经两次水洗后,复溶于蒸馏水中,用 2N NaOH 溶液将 pH 值调到 7.5,再次离心取上清液,上清液在 4 °C 下透析 48 h,冷冻干燥即得 PPI。

大豆分离蛋白的提取根据 Frankel^[11]的方法稍加改动:取一定量脱脂豆粕按 1:15 (m/V)的比例溶于蒸馏水中,室温搅拌 1 h 后用 2N NaOH 调 pH 值至 8.0,继续搅拌 2 h 后离心(9000 r/min, 30 min, 4 °C)。取上清液,用 2 N HCl 调 pH 值到 4.5,搅拌 1 h 使蛋白质沉淀。再离心(5000 r/min, 20 min, 4 °C),收集沉淀,复溶于蒸馏水中水洗三次。再按上述条件离心收集沉淀。加蒸馏水溶解,用 2 N NaOH 调 pH 至 7.0,搅拌直至蛋白充分溶解。透析 2 d 后冷冻干燥,即得到 SPI 样品。

1.3.2 溶解度测定及 SDS-PAGE 分析

PPI 和 SPI 在 pH 范围 2.0-10.0 内溶解度的测定来自于 Lowry^[12]的方法;还原和非还原条件下 SDS-PAGE 对两种蛋白组成分的分析则参考 Laemmli^[13]的方法。

1.3.3 荧光淬灭实验

PPI 和 SPI 与姜黄素的复合或相互作用通过蛋白内源荧光光谱(范围 300~450 nm)来探究^[14]。在蛋白浓度为 0.5 mg/mL 时,向其中添加不同姜黄素浓度(0~60 μM)乙醇溶液,迅速涡旋振荡 20 s 以确保复合物完全形成,后以 280 nm 为激发波长测量稳态内源发射荧光。激发和发射狭缝宽均为 5 nm。

可根据 Stern-Volmer 方程①: $F_0/F=1+k_q\tau_0[Q]=1+K_{sv}[Q]$,来描述荧光淬灭。方程中 F_0 和 F 分别为不存在和存在淬灭剂时荧光强度, $[Q]$ 为淬灭剂浓度, K_{sv} 为 Stern-Volmer 淬灭常数, K_q 为生物分子淬灭速率常数, τ_0 为无淬灭剂时荧光寿命。因而,方程①被用来通过 F_0/F 与 $[Q]$ 间的线性回归确定 K_{sv} 。荧光淬灭能被进一步分为动态或静态淬灭。对于静态淬灭,淬灭数据可通过修正后 Stern-Volmer 模型来分析(方程②): $F_0/\Delta F=F_0/(F_0-F)=1/(f_a K_a [Q]+1/f_a)$ 。在此方程中, f_a 为可接收荧光分数, K_a 为生色团有效淬灭常数,可视为淬灭剂和配体间的相关结合常数。 $F_0/(F_0-F)$ 与 $1/[Q]$ 的线性回归可获得 $1/f_a K_a$ (斜率)和 $1/f_a$ (截距),因而进一步确定 K_a 。当活性小分子在蛋白上有 n 个相同且独立的结合位点时,分子之间的平衡满足下列方

程③: $\lg(F_0-F)/F = \lg K_b + n \lg [Q]$, K_b 为 BSA 与姜黄素间的表观结合常数, n 为结合位点数。将方程②计算时所用到的数据代入方程③, 测得方程截距即为 n 。

1.3.4 蛋白颗粒粒径、表面疏水性、电位、荷载量

蛋白水合粒径 (D_h) 表征采用 DLS 方法。配制浓度为 1% 的蛋白溶液水化过夜。蛋白离心 (9000 r/min, 20 min) 后取上清液, 稀释至 0.1%, 过 0.22 μm 膜后采用 DLS 测定蛋白分子激光强度变化。Malvern 纳米激光粒度仪散射角为 173 $^\circ$, 光源是一个高稳定性的 He-Ne 激光器, 输出功率 4 mW, 波长 633 nm, 温度控制在 25 $^\circ\text{C}$ 。样品溶液的 Zeta 电位也是在 Malvern 中与粒径一起测出。样品用相同 pH 的 5 mM 磷酸缓冲液稀释, 将待测样品液加入到带有电极的特定比色皿中, 在常温下进行测量。表面疏水度 (H_0) 的测定采用 ANS 荧光探针法。将待测蛋白样品 (浓度为 1%) 溶于 5 mM 相应 pH 磷酸缓冲液中。向含 4 mL 磷酸缓冲液的塑料离心管分别添加 10、20、30、40 和 50 μL 的 1% 蛋白溶液, 在测试前添加 20 μL 8 mM ANS 储液, 振荡均匀, 在 8~15 min 内采用 F4500 荧光分光光度计检测样品的荧光强度 (FI)。激发和发射波长分别 370 nm 和 470 nm, 激发和发射狭缝宽均为 5 nm。以相对荧光强度对蛋白质浓度作图, 其初始阶段的斜率作为蛋白的表面疏水性 (H_0)。

各纳米复合物姜黄素荷载量计算为各溶液中蛋白颗粒荷载的姜黄素含量与溶液中总蛋白含量的比值 ($\%$, m/m), 所用公式为: $LA (\mu\text{g}/\text{mg}) = (\text{添加姜黄素总量} - \text{游离姜黄素含量}) / \text{总蛋白含量}$ 。本实验中添加的姜黄素总浓度为 5.2 mg/mL, 游离姜黄素含量通过复合后离心取沉淀, 加入 5 mL 乙酸乙酯并涡旋振荡 2 min 以使充分萃取, 而后于 9000 g 离心 15 min (4 $^\circ\text{C}$) 以除去不溶蛋白聚集体, 上清于 420 nm UV754N 型紫外可见光度计分析, 姜黄素浓度通过已建立标准曲线进行确定 ($R^2 > 0.998$)。

1.3.5 乳液制备与物理稳定性指标

配制浓度为 2.0% 的 PPI 和 SPI 蛋白溶液, 磁力搅拌 2 h, 加入 0.02% 的 Na_3N , 过夜水化 (4 $^\circ\text{C}$), 次日分别调 pH 至 3.0 和 7.0, 9000 r/min 离心 20 min, 取上清并用同样背景溶液稀释至 0.5%, 按照 50:1 (V/V) 比例加入姜黄素储液, 磁力搅拌 3 h, 9000 r/min 离心 20 min, 取上清并加入 20% (V/V) 大豆油, 用高速分散机 IKA T25 经 10000 r/min 粗分散 2 min, 再经微射流均质机 40 MPa 处理一次。新制备乳液可立即用于分析及室温储藏一段时间用于进一步分析。

絮凝指数 (FI)、凝结指数 (CI)、界面吸附蛋白含量

($AP\%$) 和界面蛋白浓度 $\Gamma (\text{mg}/\text{m}^2)$ 参考之前的报道^[15]。

1.3.6 初级和次级氧化产物的测定

初级氧化产物—油脂氢过氧化物的测定

新鲜乳液制备出后, 立即分装到离心管中, 并于 40 $^\circ\text{C}$ 电热恒温培养箱中培养以促进氧化反应, 并定期拿出分装小样进行氧化实验的测定。

油脂过氧化的测定参考 Shantha 和 Decker^[16] 的方法: 取 0.3 mL 乳液至小离心管, 加入 1.5 mL 异辛烷和异丙醇的混合物 (3:1, V/V), 充分振荡 10 s, 后 2000 r/min 离心 5 min, 取上层有机层 200 μL , 加入到 2.8 mL 2:1 混合的甲醇和丁醇混合物中, 然后再分别加入 15 μL 3.94 M 的 NH_4SCN 和 15 μL 二价铁离子溶液 (0.132 M BaCl_2 和 0.144 M FeSO_4 以 1:1 比例混合后过 0.22 μm 滤膜), 反应 20 min 后, 于 510 nm 波长下测定吸光值, 通过异丙苯氢过氧化物标准曲线计算样品中过氧化物浓度。

次级氧化产物-硫代巴比妥酸 (TBARS) 的测定

乳液中油脂次级氧化产物的测定由 McDonald^[17] 的方法略微改动而成。取 1 mL 乳液加入到带有螺旋塞的试管中, 之后加入 2 mL TBA 测试液 (15% 三氯乙酸和 0.375% 的硫代巴比妥酸溶于 0.25 M HCl), 沸水浴 15 min 后于流动水下冷却至室温 10 min, 然后用 1.2 μm 的微孔滤膜进行过滤, 滤液于 532 nm 下测定吸光值。乳液中硫代巴比妥酸反应物的浓度通过 1,1,3,3-四乙氧基丙烷标准曲线进行计算。

1.3.7 数据分析

实验数据取三次测量值的平均值, 采用一维方差分析 (ANOVA) 比较样品平均值之间的显著性差异, 置信区间为 95 %。

2 结果与讨论

2.1 溶解度与蛋白组成分析

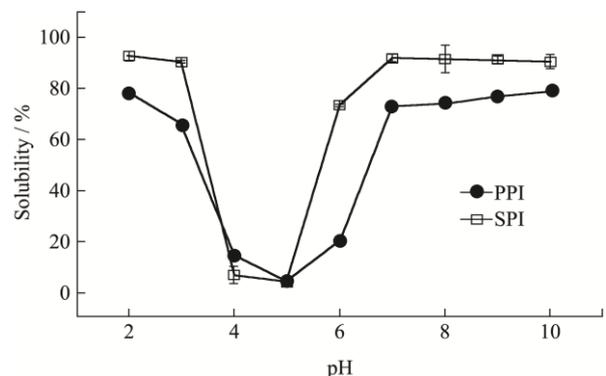


图 1 PPI 和 SPI 溶解度随 pH 的变化

Fig.1 pH-dependent solubility profiles of PPI and SPI

蛋白质的溶解度对于其功能性质 (如乳化性、起泡

性和成胶性等)具有很大的影响,而其主要受到 pH 值、离子强度、温度、溶剂类型等因素影响^[18]。由图 1 可知,两种蛋白溶解度具有明显的 pH 依赖性,在等电点附近(pH 4.0~5.0),溶解度接近于 0,而在偏离等电点时溶解度增加,这主要是因为蛋白质表面的静电荷增加导致了蛋白与水相互作用的增强,从而提高了蛋白在水相中的分散系数。整体来讲, SPI 溶解度明显优于 PPI。而在 pH 分别大于 3.0 和 7.0 时,两种蛋白溶解度曲线较为接近,分别达到约 90%和 70%,因此在本实验中选择这两种 pH。图 2 为 PPI 和 SPI 在还原和非还原条件下的电泳图谱。从对照原 PPI 的还原性图谱可以看出,其多肽组成的分子量大小从 97 到 10 kDa 分布。豌豆 11S 球蛋白和 7S 球蛋白的主要亚基条带均包含在 PPI 的条带中,表明这两者是 PPI 的主要成分;而从原 SPI 的还原性图谱可看出,在 pH 3.0 和 7.0,经离心后,沉淀和上清中均含有各个组分,且与对照原蛋白相比,各组分所占比例没有太大差异,因而可溶部分的蛋白可以代表整体蛋白的性质。

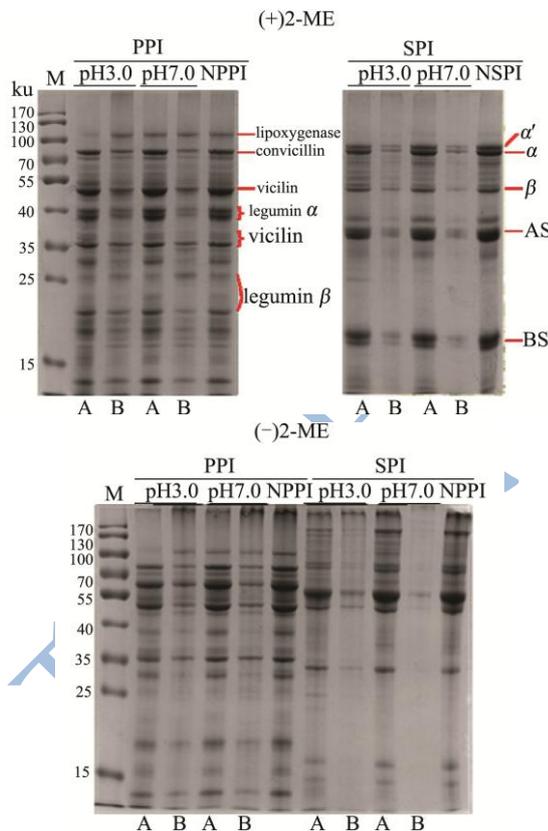


图 2 还原和非还原条件下 PPI 和 SPI 的 SDS-PAGE 电泳图
Fig.2 Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis profiles of pea proteins under reducing and nonreducing conditions

注: A: 上清蛋白; B: 沉淀蛋白; M: 蛋白 Marker。

2.2 荧光淬灭

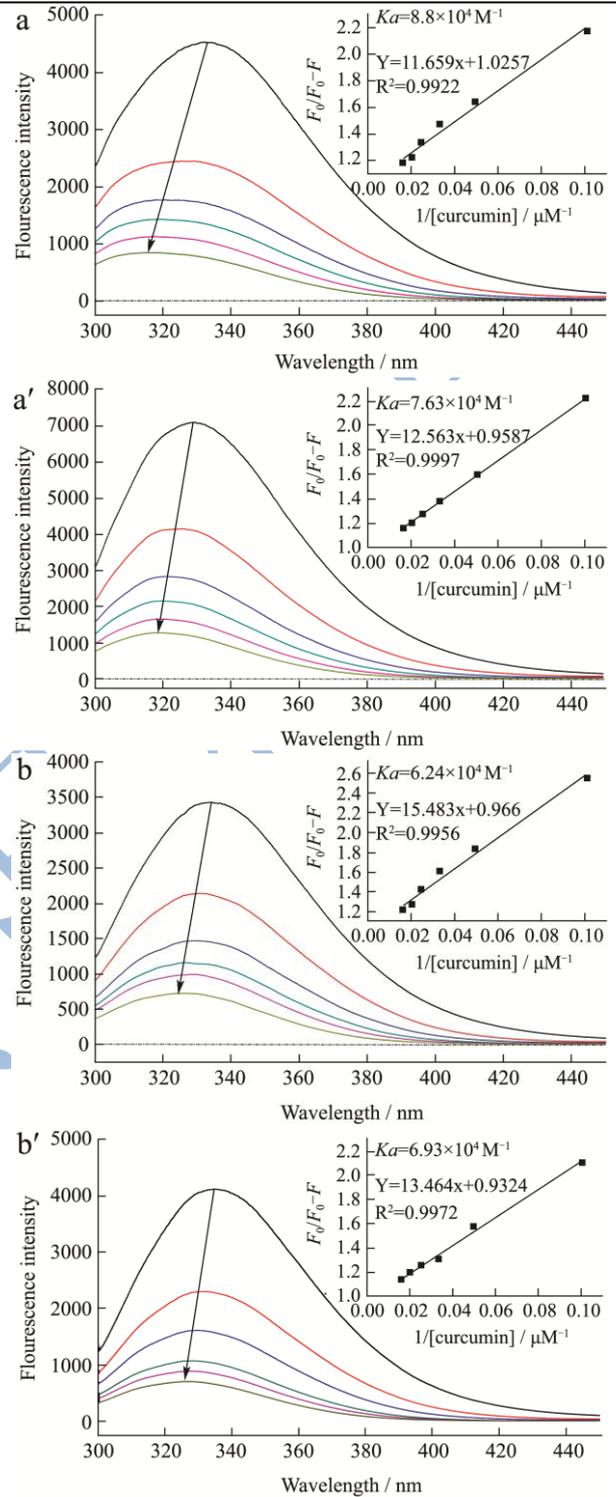


图 3 不同姜黄素浓度下 PPI 和 SPI 的荧光光谱数据
Fig.3 Fluorescence spectra of PPI (a: pH 3.0, a': pH 7.0) and SPI (b: pH 3.0, b': pH 7.0) with various amounts of curcumin (0~50 μM). Insets: modified Stern-Volmer plots

注: a: pH 3.0, a': pH 7.0; b: pH 3.0, b': pH 7.0; 蛋白浓度 0.5 mg/mL, 沿着虚线箭头方向各曲线所代表的姜黄素浓度由 0~50 μM 逐渐增大;内插图为修正后 Stern-Volmer 方程。

蛋白质和姜黄素均含有内源荧光特性。蛋白的内源荧光光谱对疏水残基发色团(如色氨酸和酪氨酸)环

境的极性变化非常敏感,姜黄素与蛋白的结合会导致蛋白内源荧光的淬灭,甚至最大发射波长的偏移^[19]。在 280 nm 的激发波长下,蛋白的内源荧光发射主要来自于色氨酸,尽管酪氨酸也会贡献一部分。图 3 显示,在未加姜黄素时,不同 pH 值溶液下 PPI 和 SPI 在 330 至 334 之间有强的荧光发射峰,而随着姜黄素的加入及浓度增大,荧光强度均逐渐减弱并伴随着最大荧光强度的明显蓝移,预示着姜黄素和 PPI 及 SPI 间存在着明显的相互作用,而且 PPI(PPI3.0:332.4~313.6, PPI7.0:330.2~318.8)的淬灭效应要强于 SPI(SPI3.0:334.4~324.8, SPI7.0:333.6~325.4)。荧光淬灭数据通过 Stern-Volmer 方程①进行分析。PPI 和 SPI 在两 pH 下的分子淬灭速率常数 K_q 通过 Stern-Volmer 淬灭常数 K_{sv} 换算得到,其值在 $8.0\sim 11.0\times 10^{12} M^{-1}S^{-1}$ 之间,远远大于生物分子最大速率扩散常数($2.0\times 10^{10} M^{-1}S^{-1}$),这也就意味着 PPI 和 SPI 与姜黄素间的淬灭过程主要为形成复合物的静态淬灭。SPI 的淬灭结果

与 Tapal^[19]报道的相一致,而对于 PPI 则是第一次报道。此外,有效淬灭常数 K_a 可进一步通过修正后 Stern-Volmer 方程②计算得到,相应值在图 3 内插图中。可以看到,在两种 pH 条件下,PPI 的 K_a 值均要大于 SPI,表明 PPI 与姜黄素更易于形成复合物,而这也与最大荧光蓝移程度相一致。除此之外,各条件下蛋白结合位点数在 1.0 左右,表明姜黄素和 PPI 及 SPI 有一个结合位点。

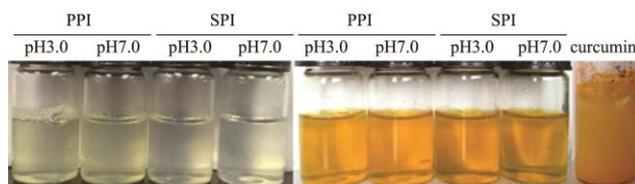


图 4 姜黄素水溶液与荷载姜黄素前后两种蛋白水溶液外观图。

Fig.4 Visual observations of free curcumin and curcumin-loaded proteins

表 1 两种蛋白和姜黄素复合的 Stern-Volmer 淬灭常数 K_{sv} ; 生物分子淬灭速率常数 K_q ; 有效淬灭常数 K_a ; 结合位点数 n 。

Table 1 Stern-Volmer quenching constant (K_{sv}), bimolecular quenching rate constant (K_q), and effective quenching constant (K_a) values for samples at pH 3 and 7

Sample	$K_{sv}(\times 10^4 M^{-1})$	$K_q(\times 10^{12} M^{-1} S^{-1})$	$K_a(\times 10^4 M^{-1})$	R^2	n
PPI-pH 3.0	8.76	8.76	8.8	0.9922	0.93
PPI-pH 7.0	10.13	10.13	7.63	0.9997	1.18
SPI-pH 3.0	8.07	8.07	6.24	0.9956	1.21
SPI-pH 7.0	10.91	10.91	6.93	0.9972	1.27

表 2 各蛋白荷载量、复合前后粒径与表面疏水性 H_0

Table 2 Loading amount (LA), particle size, and surface hydrophobicity (H_0) of proteins before and after the complexation

Items	3		7		3		7	
	PPI	PPI-curcumin	PPI	PPI-curcumin	SPI	SPI-curcumin	SPI	SPI-curcumin
LA/($\mu g/mg$)	-	5.368 \pm 0.161	-	5.633 \pm 0.095	-	6.238 \pm 0.107	-	8.582 \pm 0.595
Particle Size/nm	118.7	128.75	71.14	84.46	84.54	96.2	54.17	60.3
H_0	5672 \pm 107	1710 \pm 28	2864 \pm 19	893 \pm 43	5038 \pm 91	1501 \pm 88	2755 \pm 14	672 \pm 46

2.3 蛋白纳米颗粒表征

由图 4 可知,在水中姜黄素溶解性极低,这可从其水溶液的浑浊程度看出,而荷载前各蛋白溶液均呈透明状态,荷载后蛋白溶液呈澄清透明的鲜黄色,可预测姜黄素的溶解度有了及其明显的提升。用 NanoZS 纳米粒度仪通过动态光散射技术测得四种样品荷载前后的粒径大小可知,荷载后粒径均没有太大变化,均以纳米颗粒形式存在(表 2)。在同一 pH, SPI 粒径要小于 PPI,而同一种蛋白时, pH 7.0 粒径要小于 pH 3.0。同样无明显差异的是电位值,仅有微量增加。对于荷载量(LA), SPI 荷载量整体高于 PPI,而同一种蛋白下, pH 7.0 要优于 pH 3.0。各蛋白 pH 3.0 时 H_0

是 7.0 时的近一倍(表 2),一方面可能是 ANS 自身所带的负电荷与酸性条件下蛋白表面正电荷通过静电吸引作用增强了吸附,另一方面是酸性条件下蛋白内部的非极性氨基酸暴露出来,增大 H_0 。变化最为明显的是蛋白的表面疏水性 H_0 荷载后的急剧减小,从而表明蛋白颗粒纳米复合物的形成主要是通过疏水相互作用来完成的。

2.4 乳液物理稳定性指标

在 pH 3.0 和 pH 7.0 下,通过 Mastersizer3000 微米粒度仪所测得的荷载前后 PPI 和 SPI 所形成乳液的粒径分布见图 5(分散剂分别为 1%SDS 和蒸馏水,测试前调至相应 pH)。可以看到不同各样品在水和 SDS

中均呈明显的双峰分布,说明乳液粒径主要分布在两个范围内,但大多数均小于 10 μm,加入 1% SDS 后粒径有小幅回收,说明乳液有较小的絮凝程度(见表 3)。放置 7 d 后,各乳液乳滴粒径与新制备乳液相比粒径未有显著变化,表明本实验蛋白纳米颗粒所稳定 Pickering 乳液具有良好的抗合并稳定性,这与颗粒稳定 Pickering 乳液典型特征相一致。未荷载姜黄素时,两种蛋白所制备乳液 $d_{4,3}$ 在 1.0 至 1.8 之间,且 pH 在 7.0 时乳液粒径大于 pH 3.0,乳化活性指数(EAI)大小则相反,表明对于 PPI 和 SPI, pH 3.0 时蛋白乳化性优于 pH 7.0,可能是由于离心处理制备蛋白水溶液时,两种 pH 下所溶解的蛋白表面疏水性的变化,致使乳化性能差异。相比之下,复合姜黄素后,各蛋白所制备新鲜乳液粒径($d_{4,3}$)有微弱增加以及 EAI 的减小(表 3),因疏水基团的暴露利于蛋白更好的吸附在油滴界面,从而增强蛋白乳化能力,表明此处乳化性的略微减弱应为 H_0 的降低所造成。在这里原蛋白颗粒 H_0 是急剧下降,而制备乳化性确略微降低,原因可能是由于两种蛋白纳米颗粒所制备乳液的 Pickering 效应所致,在这里蛋白颗粒所稳定的乳液和平常蛋白分子不同的是其极高的乳化合并稳定性,故在此处乳化性并没有较大降低。从界面蛋白的角度分析,界面蛋白含量(AP%)大都分布于 30%至 50%间,表明仍有很多未吸附蛋白存在于原蛋白颗粒溶液中。界面蛋白浓度 Γ 和界面蛋白含量以及 EAI 有良好的一致性,表明界面蛋白浓度和界面蛋白含量的增大可减小乳液乳

滴粒径,进而增大乳液浊度,从而表现出较高的乳化活性。

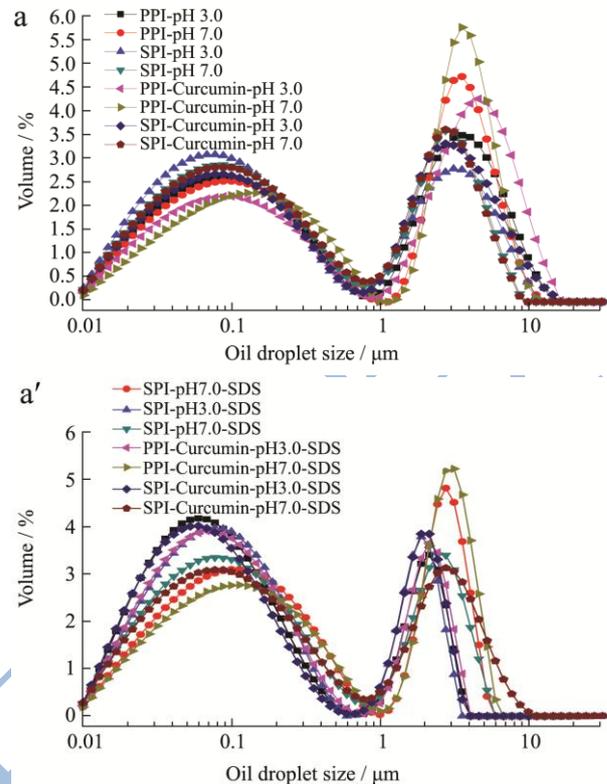


图 5 在 pH 3.0 和 pH 7.0 下两种蛋白颗粒复合姜黄素前后所制备乳液的乳滴粒径分布图

Fig.5 Typical size distributions of droplets in emulsions stabilized by PPI and SPI (before and after the complexation)

注: a: 分散剂为水; a': 分散剂为 1% SDS。

表 3 各条件下蛋白乳液的体积平均粒径大小 ($d_{4,3}$), zeta-电位 (ζ -potential)、絮凝指数和凝结指数 (FI 和 CI)、界面吸附蛋白含量和浓度 ($AP\%$ 和 Γ)

Table 3 Emulsion characteristics including mean size droplet ($d_{4,3}$), flocculation and coalescence indexes (FI and CI), interfacial protein percentage ($AP\%$) and concentration (Γ) for the samples at pH 3 and 7

Sample	pH	$d_{4,3}/\mu\text{m}$				ζ -potential /mV	FI /%	CI /%	$EAI/(\text{m}^2/\text{g})$		Interfacial Protein	
		0 h		7 Days					0 h	24 h	$AP\%$	$\Gamma/(\text{mg}/\text{m}^2)$
		Water	1% SDS	water	1% SDS							
PPI	3	1.24	0.59±0.062	1.83	0.664±0.007	35.8±0.42	109	112	343.4±1.8	333.2±1.04	41.90±0.68	0.137
	7	1.49	0.91±0.032	1.91	1.050±0.089	-23.4±0.147	64.6	116	269.5±0.52	257.4±0.90	34.23±0.59	0.118
SPI	3	1.09	0.63±0.006	1.4	0.662±0.051	31.45±0.032	73.3	105	371.9±1.02	366.6±0.76	53.40±0.27	0.17
	7	1.21	0.84±0.015	1.38	0.868±0.031	-32.2±0.039	43.7	103.1	289.5±1.55	289.0±3.23	43.13±0.29	0.143
PPI-Curcumin	3	1.8	0.60±0.021	2.47	0.864±0.091	36.15±0.582	199.5	143.7	337.6±3.89	332.3±1.87	42.23±0.93	0.139
SPI-Curcumin	7	1.75	1.08±0.017	2.44	1.120±0.038	-24.7±0.104	61.6	103.4	251.9±0.85	247.8±0.22	30.57±0.11	0.1
PPI-Curcumin	3	1.13	0.66±0.040	1.8	0.687±0.041	31.0±0.366	72.3	104.7	369.9±0.55	355.4±3.43	45.90±0.21	0.15
SPI-Curcumin	7	1.32	0.88±0.019	1.49	0.869±0.052	-32.35±0.061	50.7	99.2	283.5±6.74	277.1±1.01	31.23±0.46	0.103

2.5 乳液氧化稳定性

油脂氧化是导致乳液制品品质下降的重要原因。对于蛋白乳液,乳液中的蛋白覆盖在油滴表面形成一

层具有一定厚度的粘弹性膜,此膜具有清除自由基及螯合金属离子的作用,从而可以抑制油脂氧化^[20]。如图 6 为荷载前后,不同 pH 下 PPI 和 SPI 所制备乳液在储存 15 d 内(40 °C 恒温培养)油脂初级氧化产物(脂

质氢过氧化物, LH)的生成情况。

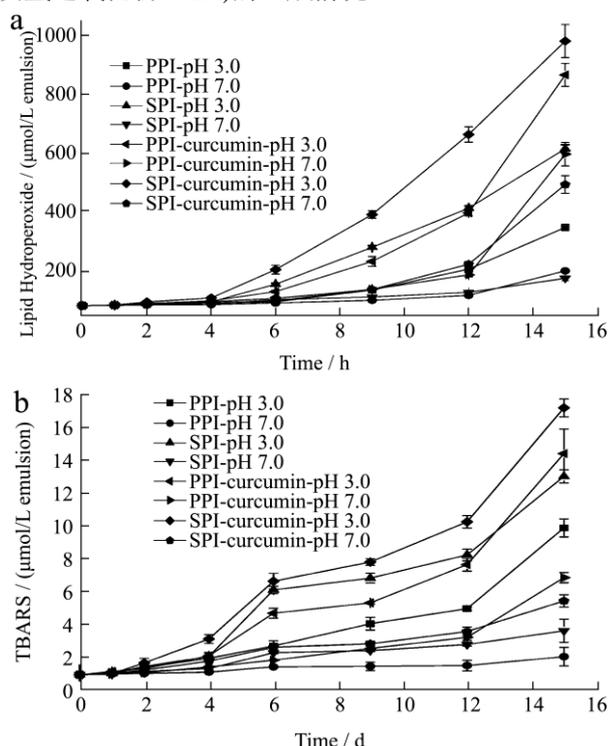


图6 两种蛋白及其姜黄素纳米复合物稳定乳液在15天内油脂氢过氧化物和TBARS的生成情况

Fig.6 Evolution of lipid hydroperoxides (A) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)(B) in protein nanoparticles or their curcumin-nanocomplex-stabilized emulsions upon accelerated storage up to 15 days

由图6可知,各样品乳液初始LH浓度很小,基本上可忽略不计,且在前4d内,LH生成量均很少。而超过5天,各乳液LH生成量逐渐增大。对于未荷载蛋白,pH 3.0时各乳液油脂生成LH含量均要高于pH 7.0,这可能是由于pH 3.0时较小粒径乳液具有较大比表面积,因而乳滴内油脂接触外部环境几率较大,造成氧化加快。而荷载后各乳液LH产量均有不同程度的增长,可能在40℃下的较长时间放置,姜黄素发生了降解并由本身抗氧化剂转变成为促氧化剂,加速了油脂氧化速率。Hatcher^[21]等指出姜黄素螯合金属离子后形成的金属复合物可参与氧化还原循环,起到促氧化作用,而与此同时,本实验中螯合物同时可在油滴界面迁移至油相内,加速油脂氧化进程。Sandur^[22]等指出在一定条件下,姜黄素在体内由抗氧化作用至促氧化间相互转变的双向作用可由浓度进行调控。图6b为不同乳液在相同处理下的油脂次级氧化产物(硫代巴比妥酸,TBARS)的生成情况。由图可见,荷载后各乳液油脂TBARS生成量均有不同程度的增加,且pH 3.0时荷载前后两种蛋白乳液油脂氧化产率均大于pH 7.0,这表明高乳化活性时的较小乳滴粒径具有

较大的比表面积,进而液滴油脂接受氧化的面积也相应增加。各类型乳液生成次级氧化产物TBARS浓度的变化趋势与初级氧化产物的变化趋势相类似,均为荷载姜黄素后各乳液氧化水平加速,同时pH 3.0时各类型乳液氧化程度均高于pH 7.0。

3 结论

3.1 在pH 3.0和7.0处PPI和SPI溶解度较高,且溶解离心后,不溶部分组成和原蛋白无明显差异。

3.2 荷载前后PPI和SPI蛋白纳米颗粒粒径无明显变化,表面疏水性急剧下降。荧光淬灭实验表明两种蛋白淬灭过程主要通过形成复合物的静态淬灭方式,疏水相互作用为复合物形成的主要作用力,同时PPI比SPI更易形成复合物。

3.3 放置7d前后各乳液样品乳滴粒径 $d_{4,3}$ 的微弱变化和较小的凝结指数CI,以及荷载姜黄素后,各蛋白所制备Pickering乳液乳化活性只有微小减弱可能是蛋白样品颗粒所稳定乳液的Pickering效应的存在。荷载姜黄素后,pH 3.0时各蛋白乳化活性要高于pH 7.0,各颗粒稳定乳液的界面蛋白含量及浓度与乳化性能指标相一致,即界面蛋白含量和浓度越大,乳化活性相应越高。

3.4 荷载前后蛋白所制备乳液乳滴油脂的初级和次级氧化产物含量均有所增大,可能原因是所测试温度下姜黄素螯合金属离子失稳并可由界面迁移至油相,转变为促氧化剂加速油脂氧化过程。

参考文献

- [1] Mansoore Esmaili, Mahmood Ghaffari, Zeinab Moosavi-Movahedi, et al. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry and application [J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44: 2166-2172
- [2] Kang Pan, Qixin Zhong, Seung Joon Baek. Enhanced dispersibility and bioactivity of curcumin by encapsulation in casein nanocapsules [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61: 6036-6043
- [3] David Julian McClements, Yan Li. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2010, 159: 213-228
- [4] Alison Matalanis, Owen Griffith Jones, David Julian McClements. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25: 1865-1886

- [5] Lingyun Chen, Gabriel E. Remondetto, Muriel Subirade. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems [J]. Trends in Food Science and Technology, 2006, 17: 272-283
- [6] D J McClements, E A Decker, J Weiss. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components [J]. Journal of Food Science, 2007, 72: 109-124
- [7] D J McClements, E A Decker. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems [J]. Journal of Food Science, 2000, 65: 1270-1282
- [8] F Liu, C H Tang. Emulsifying properties of soy protein nanoparticles: Influence of protein concentration and/or emulsification process [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62: 2644-2654
- [9] H N Liang, C H Tang. Pea protein exhibits a novel Pickering stabilization for oil-in-water emulsions at pH 3.0 [J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 58: 463-469
- [10] Mirosljub Barac, Slavica Cabrilo, Profile and Functional Properties of Seed Proteins from Six Pea (*Pisum sativum*) Genotypes [J]. International Journal of Molecular Science, 2010, 11: 4973-4990
- [11] Frankel E, Huang S, Kanner J, et al. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42: 1054-1059
- [12] Lowry O H, Rosebroug, H J, Lewis A, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 19: 265-275
- [13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 681-685
- [14] Hailong Yu, Qingrong Huang. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch [J]. Food Chemistry, 2010, 119: 669-674
- [15] L Shen, C H Tang. Emulsifying properties of vicilins: Dependence on the protein type and concentration [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 36: 278-286
- [16] Shantha N C, Decker E A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determinations of peroxide values of food lipids [J]. Journal of AOAC International, 1994, 77(2): 421-424
- [17] McDonald R E, Hultin H O. Some characteristics of the enzymatic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle [J]. Journal of Food Science, 1987, 52(1): 15-21
- [18] H N Liang, C H Tang. pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] Proteins [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 33: 309-319
- [19] Tapal A, Tiku P K. Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin [J]. Food Chemistry, 2012, 130: 960-965
- [20] Maryam Kargar, Fotios Spyropoulos, Lan T. Norton. The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2011, 357: 527-533
- [21] Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials [J]. Cell. Mol. Life Sci., 2008, 65: 1631-1652
- [22] Sandur S K, Pandey M K, Sung B, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism [J]. Carcinogenesis, 2007, 28: 1765-1773