

三种蛋白包覆纤维素纳米晶稳定皮克林乳液的构建及体外消化特性

傅亮¹, 李雪影¹, 杨涛², 刘付^{1*}

(1. 暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632) (2. 海南医学院药学院, 海南海口 571199)

摘要: 纤维素纳米晶 (CNCs) 由于其表面固有的强亲水性, 往往需要修饰改性才能应用, 如乳液稳定。该文研究了三种蛋白 (牛血清蛋白 BSA、酪蛋白酸钠 CAS 和大豆分离蛋白 SPI) 通过静电修饰 CNCs 表面性质的可行性, 并研究了其对 CNCs 乳液体外消化特性的影响。首先研究了 pH 值 3.0 时蛋白与 CNCs 的作用模式、吸附比例、颗粒结构特征, 结果发现二者可以通过静电作用结合 (Zeta 电位由 -35 mV 至 +20 mV), CNCs 表面蛋白吸附比例由 100% (蛋白浓度 0~0.1%, m/V) 逐渐降低至 40%~60% (蛋白浓度 0.5%, m/V)。静电修饰引起 CNCs 絮凝, 显著改善其两亲性 (接触角由 35° 增加至 75°~80°)。然后研究了蛋白包覆 CNCs 的乳化性质, 结果发现蛋白包覆 CNCs 形成了粒径为 3~9 μm 的絮凝乳液, 且凝聚稳定性更好, 不同蛋白之间无显著差异。体外消化结果表明, 与吐温 20 乳液 (~90%) 相比, 蛋白包覆 CNCs 稳定乳液具有更低的游离脂肪释放率 (~80%), 蛋白种类影响不显著。可见, 三种常见蛋白能够通过静电吸附方式修饰 CNCs 并将其转化为良好的 Pickering 稳定剂。该文研究结果能够极大丰富食品级皮克林稳定剂的来源, 并促进相关功能乳液食品的开发。

关键词: 皮克林乳液; 纤维素纳米晶; 蛋白质; 抗脂质消化

文章编号: 1673-9078(2024)08-39-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.1268

Construction and *in Vitro* Digestion Properties of Pickering Emulsions Stabilized by Three Protein-coated Cellulose Nanocrystals

FU Liang¹, LI Xueying¹, YANG Tao², LIU Fu^{1*}

(1. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(2. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

Abstract: Cellulose nanocrystals (CNCs) are modified for emulsion stabilization purposes due to their intrinsic strong hydrophilicity. The purpose of this study was to investigate the feasibility of using three proteins (bovine serum protein/BSA, sodium caseinate/CAS, and soy protein isolate/SPI) for modifying the surface properties of CNCs through electrostatic modification and their impacts on the *in vitro* digestion properties of CNC emulsions. The three proteins and CNCs were first investigated for their interaction profiles, protein adsorption percentages, and particle structure characteristics at pH 3.0. The

引文格式:

傅亮, 李雪影, 杨涛, 等. 三种蛋白包覆纤维素纳米晶稳定皮克林乳液的构建及体外消化特性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(8):39-49.

FU Liang, LI Xueying, YANG Tao, et al. Construction and *in vitro* digestion properties of pickering emulsions stabilized by three protein-coated cellulose nanocrystals [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 39-49.

收稿日期: 2023-10-20

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515010637)

作者简介: 傅亮 (1968-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程, E-mail: fuliang@188.com

通讯作者: 刘付 (1984-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品胶体及功能食品, E-mail: liu_fu@jnu.edu.cn

electrostatic interaction was found to be able to combine them (zeta potential between -35 and $+20$ mV). Meanwhile, the adsorption of proteins on CNC surfaces was gradually reduced from 100% (protein concentration at $0\sim 0.1\%$ m/V) to 40%~60% (protein concentration at 0.5% m/V). Electrostatic modification caused CNCs to flocculate and become significantly more amphiphilic (contact angle increased from 35° to $75^\circ\sim 80^\circ$). It was found that protein-coated CNCs formed flocculated emulsions with particle sizes of $3\sim 9\ \mu\text{m}$ and had better coalescence stability, with no significant differences between the three proteins. The simulated *in vitro* digestion results show that protein-coated CNC-stabilized emulsions released less free fatty acid ($\sim 80\%$) than the Tween 20 emulsion (90%), with no significant difference between different protein coatings. It can be seen that the common three proteins can be used to modify CNCs by electrostatic adsorption and transform them into good Pickering stabilizers. The findings in this paper can greatly enrich the source of food-grade Pickering stabilizers and promote the development of related functional emulsions for the food industry.

Key words: Pickering emulsion; cellulose nanocrystals; protein; lipid digestion inhibition

肥胖已经成为世界范围内的一个公共健康问题, 它会增加包括糖尿病、心血管病及癌症在内的各种疾病风险^[1-4]。高脂饮食是肥胖流行病的主要驱动因素之一^[1,3]。目前控制肥胖的方式主要有服用药物和增强运动, 前者有一定的副作用, 后者有一定的实现难度^[5]。食品工业也在为抑制肥胖做出努力, 如寻找能够抑制消化酶(特别是脂肪酶)的天然成分及设计食品结构控制脂肪消化吸收。食品结构设计主要是基于“回肠刹车”机制^[6], 即营养物质到达回肠可激活胃肠道的反馈, 抑制饥饿感产生, 进而减少主动摄入食物。因此, 通过抑制或减缓脂质消化, 诱导回肠刹车机制, 减少食欲和促进饱腹感^[6,7], 是干预肥胖的一种新策略。脂质消化是一个界面过程, 受消化酶、胆汁盐等影响^[7,8]。乳液的结构和稳定性可以在脂质消化和吸收中发挥重要作用^[9]。因此, 许多研究人员致力于构建稳定的乳液, 并设计乳液的界面结构以延迟或抑制脂质消化^[10-13]。

纤维素纳米晶(CNCs)具有来源广泛、生物相容性、可生物降解^[14,15]等优点而应用空间广阔^[16-20]。CNCs不能被人体酶消化及具有高纵横比特征, 能在油水界面处提供较高的空间位阻和机械强度, 在调节脂质消化方面可以带来优于球形颗粒的优势^[8]。然而, 由于CNCs表面过强的亲水性, 往往需要改性后使用, 如稳定皮克林乳液^[21]。常见的CNCs改性包括化学改性和物理改性, 前者主要涉及表面羟基的共价化学(例如, 酯化、醚化、聚合物接枝等)^[22,23], 而后者涉及表面活性剂或聚合物的吸附。这些方法不符合“清洁标签”要求, 在食品行业应用受限。

食物蛋白不仅具有很高的营养价值, 还具有良好的功能性质^[24]。例如食物蛋白具有良好的两

亲性而常用于稳定乳液^[25,26], 也可以吸附于其他颗粒表面并赋予其两亲性进而稳定乳液^[16,27,28]。我们前期研究发现, 少量牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)修饰的CNCs可以稳定Pickering高内相乳液^[29]。乳铁蛋白在pH值3.0和7.0通过静电作用吸附于CNCs表面改善其稳定乳液性质^[30]。然而, 由于食物蛋白种类繁多, 且结构和性质差异大, 因此有必要研究不同蛋白对颗粒包覆修饰的差别。

本研究旨在利用三种蛋白对CNCs进行包覆修饰, 探究食物蛋白修饰CNCs的通用性及修饰颗粒性质差异。我们基于动植物来源和蛋白结构特性选取牛血清蛋白(BSA, 动物性球状蛋白)、大豆分离蛋白(SPI, 植物性球状蛋白)和酪蛋白酸钠(CAS, 动物性非球状蛋白)作为CNCs的修饰剂。首先研究在pH值为3.0下三种蛋白(BSA、SPI和CAS)对CNCs包覆修饰, 并研究包覆修饰颗粒的基本性质。然后研究了蛋白包覆的CNCs的乳化性质。最后研究了蛋白包覆的CNCs稳定乳液的体外消化特性。本研究结果不仅可以极大的拓宽食品级颗粒乳化剂的来源范畴, 还为新型功能性食品开发提供帮助。

1 材料与方法

1.1 原料

CNCs(含量8 wt.%)购于桂林奇宏科技有限公司; BSA(含量>98%)西格玛奥德里奇贸易有限公司; CAS(含量>80%)购于麦克林生物化学有限公司; SPI(含量>98%)实验室采取经典的“碱溶酸沉”原理提取并经透析、冻干得到^[31]; 大豆油购于当地(广州)超市。胃蛋白酶、胆汁提取物、

胰酶、脂肪酶、尼罗红、钙氟白荧光染料等购于西格玛奥德里奇贸易有限公司；所有其他化学品均为分析级。

1.2 主要仪器设备

Biosafer 超声波破碎仪, 中国赛飞有限公司; 5810R 冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Infinite 200pro 光栅型多功能微孔板检测仪, 瑞士 Tecan 公司; Zetasizer Nano ZS 激光纳米粒度仪, 英国 Malvern 公司; Nanoscope IIIa 原子力显微镜, Bruker AXS 有限公司; SCIENTZ-10N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Vector 70 傅里叶变换红外光谱、D8 ADVANCE X-射线衍射仪, 美国布鲁克科技有限公司; OCA 20 AMP 视频光学接触角测量仪, 德国 Dataphysics 公司; T25 高速剪切机, 德国 IKA 公司; BMC-500 光学显微镜, 江西凤凰光学股份有限公司; SALD-2300 粒度仪, 日本岛津公司; 自动电位滴定仪, 瑞士万通中国有限公司; Zeiss LSM880 Airyscan 激光共聚焦显微镜, 卡尔蔡司股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白包覆-CNCs颗粒的制备

将 CNCs 用去离子水稀释至 1% (*m/V*), 随后将 CNCs 分散液的 pH 值调至 3.0。分别称取 BSA、CAS、SPI 溶于去离子水中 (1%, *m/V*), 调节 pH 值至 3.0, 搅拌 2 h, 并 4 °C 过夜放置使其水合完全。次日将蛋白溶液恢复至室温, 并稀释至 0.02%~1% (*m/V*), 然后与 1% (*m/V*) CNCs (pH 值 3.0) 等体积混合并充分搅拌 30 min。最终得到 (0.01%~0.5%, *m/V*) 蛋白-0.5% (*m/V*) CNCs 颗粒的分散液, 这里用 (0.01%~0.5%, *m/V*) B-CNCs、(0.01%~0.5%, *m/V*) C-CNCs、(0.01%~0.5%, *m/V*) S-CNCs, 分别标记 0.5% (*m/V*) CNCs 经过不同浓度的 BSA、CAS、SPI 改性得到的颗粒。同时以 0.5% (*m/V*) 的 CNCs、BSA、CAS 和 SPI 作为对照。将部分颗粒分散液冻干用作后续表征。

1.3.2 蛋白包覆-CNCs颗粒的表征

1.3.2.1 蛋白吸附率及分散液外观

蛋白对 CNCs 的吸附通过吸附率表征, 测定方法参考 Liu 等^[32]并略有修改。简单来说, 将新鲜混合的蛋白-CNCs 悬浮液在 8 050 g 的条件下离心 20 min, 沉淀为蛋白-CNCs 混合物, 上清液为游

离 (未吸附) 的蛋白。用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定上清液和初始蛋白溶液中的蛋白浓度, 根据以下公式 (1) 可计算出吸附百分比 (AP, %):

$$A = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A ——蛋白吸附率 (AP), %;

C_0 ——与 CNCs 混合前的初始蛋白浓度, % (*m/V*);

C_f ——与 CNCs 混合后离心上清液中蛋白浓度, % (*m/V*)。

取各悬浮液 5 mL 装入透明玻璃瓶中, 于常温下存储 30 d。储存期间通过肉眼观察及拍照评估分散液储藏期间的物理稳定性。

1.3.2.2 Zeta电位

使用激光纳米粒度仪测定蛋白-CNCs 分散液的 Zeta 电位, 测量前将分散液用 pH 值 3 的去离子水稀释 10 倍。测试温度为 25 °C, 平衡时间为 1 min, 所有样品测定三次取平均值。

1.3.2.3 X射线衍射分析

CNCs 经蛋白包覆修饰后的结晶度可通过 X 射线衍射分析 (X-ray Diffraction, XRD) 表征。测定条件为: 电压 40 kV, 电流 40 mA, 扫描角度 2θ 为 5°~30°, 扫描步长 0.02°, 测试温度为 25 °C。

1.3.2.4 傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR)

CNCs 经蛋白包覆修饰前后的表面基团变化可以通过傅里叶变换红外光谱仪 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) 表征。称取 1~2 mg 样品, 按 1:100 质量比加入 KBr 粉末, 混合均匀并充分研磨, 用压片机将混合粉末压成薄片。利用 Vector 70 型 FT-IR 仪器进行测定, 测定条件为: 波长 400~4 000 cm^{-1} , 分辨率 2 cm^{-1} , 温度 25 °C。

1.3.2.5 原子力显微镜 (AFM)

0.5% (*m/V*) CNCs 经 0.05% (*m/V*) 蛋白包覆修饰前后的微观形貌可通过原子力显微镜 (Atomic Force Microscopy, AFM) 观察。将样品分散液用 pH 值 3 去离子水稀释至 5 $\mu\text{g/mL}$ (以 CNCs 计), 取 5 μL 稀释样品滴在新鲜剥开的云母片表面, 常温下自然风干。利用 Nanoscope IIIa 多模式扫描探针显微镜成像, 成像条件为: 频率 150 kHz, 扫描速率 1.0 Hz。

1.3.2.6 接触角测定

经蛋白修饰前后的 CNCs 表面性质可通过测定接触角进行表征, 测定方法参考 Chen 等^[33]并略有修改。首先, 将冻干的样品粉末压成直径为

13 mm, 厚度为 2 mm 的圆片。随后将圆片放进装有 大豆油的玻璃透光皿中, 用高精度注射器将 5 μL 去离子水滴加到样品表面。水滴在圆片表面的湿润情况由高速摄影机记录, 经过 OCA 20 AMP 软件分析可得到改性 CNCs 颗粒的接触角。所有样品重复测定三次。

1.3.3 蛋白-CNCs 颗粒稳定皮克林乳液的制备及表征

1.3.3.1 乳液制备

使用两步法制备乳液, 方法参考文献并略作修改^[29,34]。将前述得到的蛋白-CNCs 分散液与大豆油以 8:2 的体积比混合, 先使用高速剪切机 (ika T25) 在 13 000 r/min 的剪切速度下, 乳化 1 min。接着再经过超声波破碎仪在功率 40%、超声间隙时间: 3 s 开/3 s 关的条件下, 超声总用时为 1 min, 并辅以冰水浴防止过热。最终得到蛋白-CNCs 稳定的皮克林乳液。对照组乳液 (包括未改性 CNCs、纯蛋白及吐温 20) 均按本方法制备, 浓度均为 0.5% (m/V), 油水比例为 5:5。

1.3.3.2 乳液的外观及乳析指数

通过观察乳液在储藏过程中的界面 (乳液层与水层) 位置变化情况, 表征乳液的乳析稳定性。将新鲜制备的乳液注入样品瓶中, 室温下储存 30 d, 通过拍摄照片记录乳液外观的变化。同时持续测量乳液层或下水层高度, 通过以下公式 (2) 计算乳析指数 (CI, %)^[35]:

$$B = \frac{H_S}{H_E} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

B ——乳析指数 (CI), %;

H_E ——玻璃管内乳液的总高度, cm;

H_S ——玻璃管中下部透明水层或浑浊层的高度, cm。

1.3.3.3 乳液的微观结构

乳液的微观结构使用光学显微镜观察。先将各乳液样品适当稀释, 然后取一滴稀释乳液滴在载玻片上, 缓慢盖上盖玻片, 防止产生气泡, 使用 BMC-500 凤凰光学显微镜观察, 并拍照记录。

部分乳液 (模拟消化后的乳液) 的微观结构使用激光共聚焦显微镜 (CLSM) 观察, 根据参考文献方法对乳液染色^[36]。取 500 μL 样品与 10 μL 尼罗红 (染大豆油)、100 μL 钙氟白 (染 CNCs) 混合, 激发波长分别为 545 nm、405 nm。使用

CLSM 获得乳液微观结构的图像, 并用 ZEN 2.3 软件分析图像。

1.3.3.4 乳液的粒径

乳液的液滴尺寸由 SALD-2300 粒度仪测定。测量前样品先经去离子水稀释 10 倍, 在搅拌模式、折射率为 1.45-0.5i 的条件下测量, 每个样品测 3 次取平均值。

1.3.3.5 体外消化实验

体外胃肠道消化模型的构建参考文献的方法并稍作修改^[9,37,38], 研究乳液在不同消化阶段的稳定情况以及脂质消化率。首先, 用 pH 值 3 的去离子水将乳液的油相浓度稀释到 (4 wt.%) 并预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ ^[9]。

模拟胃消化: 事先配制好模拟胃液 (SGF), 取 2 g 氯化钠 (NaCl) 和 7 mL 盐酸 (HCl) 溶解到去离子水中, 定容至 1 L。取 15 mL 稀释乳液与 15 mL 含有胃蛋白酶的 SGF (3.2 mg/mL) 混合, 调节 pH 值至 2.5, 然后在 100 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下孵育 2 h。

模拟小肠消化: 对于小肠阶段, 将胃消化阶段的混合物 (30 mL) 放入自动滴定装置的容器中, 然后加入 1 mL 盐溶液 (110 mg CaCl_2 溶于 PBS, pH 值 7)、4 mL 胆汁提取物溶液 (187.5 mg 胆汁提取物溶于 PBS, pH 值 7.0), 并将 pH 值调回 7.0。随后加入 2.5 mL 新鲜酶溶液 (60 mg 脂肪酶和 20 mg 胰酶溶于 PBS, pH 值 7.0), 反应过程用 0.1 mol/L 的 NaOH 将 pH 值维持在 7.0, 时间为 120 min。根据反应过程中 NaOH 消耗体积计算最终游离脂肪酸 (Free Fatty Acids, FFA) 释放率, 公式 (3) 如下^[39]:

$$D = \frac{V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} \times M_{\text{lipid}}}{2W_{\text{lipid}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

D ——游离脂肪酸释放率 (FFA), 100%;

V_{NaOH} ——消耗的 NaOH 溶液的体积, mL;

C_{NaOH} ——NaOH 溶液的摩尔浓度, mol/L;

M_{lipid} ——大豆油的分子量, 800 g/mol;

W_{lipid} ——反应中最初存在的大豆油的质量, 0.6 g。

消化过程中乳液粒径及微观结构表征同 1.3.3.2 和 1.3.3.4。

1.3.4 数据处理分析

实验数据均以“平均值 \pm 标准差”的形式表

示, 使用 SPSS 26.0 软件对数据进行独立样品 *t* 检验或单方差分析 (ANOVA), 并采用 Duncan 法作为事后多重比较, 置信区间为 95%。

2 结果与讨论

2.1 食物蛋白对CNCs的包覆修饰及表征

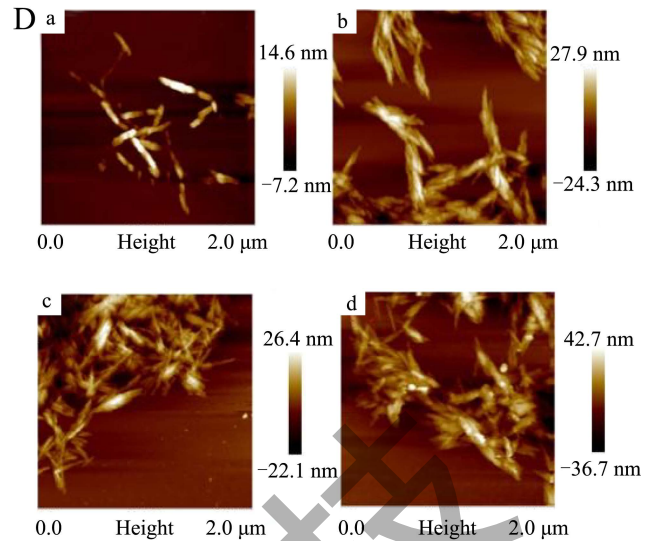
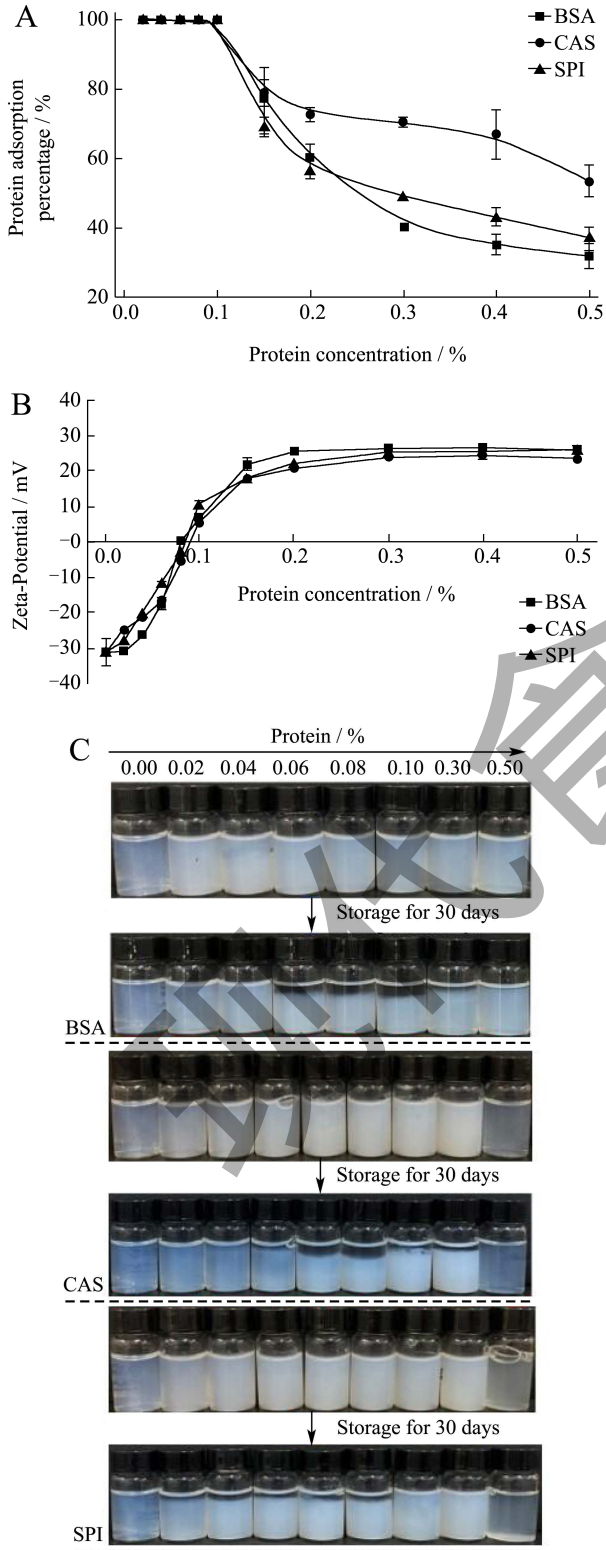


图 1 0.5% (*m/V*) CNCs 与不同蛋白 (BSA、CAS、SPI, 浓度 0~0.5%, *m/V*) 在溶液 (pH 值 3.0) 中的相互作用
Fig.1 Interaction of 0.5% (*m/V*) CNCs with different proteins (BSA, CAS, SPI, with concentration of 0~0.5%, *m/V*) in solution (pH value 3.0)

注: (A) 0.5% (*m/V*) CNCs 对不同蛋白的吸附率, (B) 0.5% (*m/V*) CNCs 与不同蛋白混合后的 Zeta 电位, (C) 0.5% (*m/V*) CNCs 与不同蛋白混合后的溶液储藏 30 d 后的外观图, (D) 原始 CNCs 与蛋白包覆修饰 CNCs 的原子力显微镜图 (a 为原始 CNCs, b 为 BSA-CNCs, c 为 CAS-CNCs, d 为 SPI-CNCs)。

首先研究了溶液中 CNCs 与食物蛋白相互作用情况, 结果如图 1。电位结果 (图 1B) 表明, pH 值 3.0 时, 食物蛋白带正电 (Zeta 电位分别为 +25.7 (BSA)、+25.8 (SPI)、+23.5 mV (CAS)), CNCs 带负电 (Zeta 电位为 -31.3 mV), 二者可以通过静电作用结合^[28,40]。当固定 CNCs 浓度为 0.5% (*m/V*) 时, 增加蛋白的浓度 (由 0% (*m/V*) 至 0.1% (*m/V*)), 体系的电位值 (负电荷) 逐渐减小, 在 0.1% (*m/V*) 左右接近 0 mV; 进一步增加蛋白浓度 (0.1% (*m/V*) 至 0.5% (*m/V*)), 体系电位转正并保持在 20 mV 左右。由图 1A 可以看出, CNCs 对蛋白的吸附率与蛋白浓度紧密相关。当 CNCs 浓度固定在 0.5% 时, 增加蛋白浓度至 0.1%, 蛋白吸附率为 100%, 表明 CNCs 和蛋白几乎完全结合^[29]。而进一步增加蛋白浓度, 蛋白吸附率急剧下降, 表明蛋白相对 CNCs 过量, 更多的蛋白没有与 CNCs 作用。不同蛋白之间呈现出一定差异, 其中 CAS 对 CNCs 的吸附率下降的比较慢一些, 其次是 SPI, 最后是 BSA, 0.5% (*m/V*) 蛋白浓度时的蛋白吸附率分别为 55% (CAS)、38%

(SPI)、35% (BSA)。上述结果表明,在蛋白浓度 0.1% (m/V) 以下时,蛋白在 CNCs 表面可能以单层形式吸附,而在蛋白浓度 0.1% (m/V) 以上可能形成多层结构。Liu 等^[29]也发现 BSA 在 0.08% (m/V) 以下全部吸附到 CNCs 表面而高于 0.08% (m/V) 则吸附率很快下降。Li 等^[30]利用乳铁蛋白也发现了类似的结果。

静电作用可能导致聚集甚至沉淀。蛋白与 CNCs 作用后的外观 (0 d 及 30 d) 如图 1D,从图中可以看出,蛋白加入后,溶液变得明显浑浊,储藏 30 d 后部分出现分层,出现分层最明显样品是蛋白浓度在 0.08% (m/V) 附近的样品。这些结果与前述电位数据及蛋白吸附率数据吻合,即在电位值最低,吸附率最高,分层最明显。尽管储藏后出现分层,但轻轻摇匀后仍然可以恢复到刚制备时情况,表明二者作用后形成的絮凝或沉淀为松散结构^[29]。从原子力显微镜 (图 1D) 可以进一步观察到 CNCs 与蛋白作用后的结构变化。原始 CNCs 呈现分散的针状结构 (见图 1D-a),尺寸为 100~200 nm (长) 和 10 nm (直径),与经典的 CNCs 尺寸相吻合^[36]。在与蛋白复合后,CNCs 发生明显的絮凝或聚集现象,但不同蛋白之间差异不大。这种絮凝现象也有文献报道的 BSA 修饰 CNCs 和乳铁蛋白 (LF) 修饰 CNCs 场合^[29,30]。

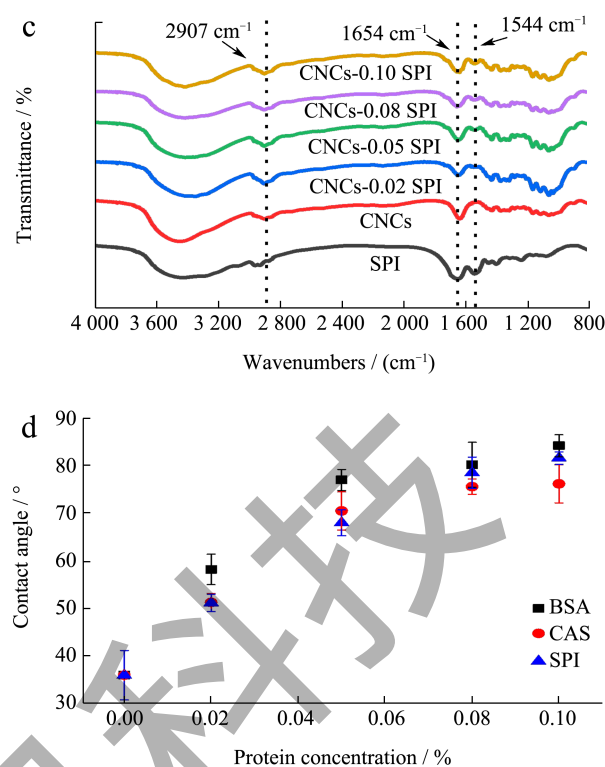
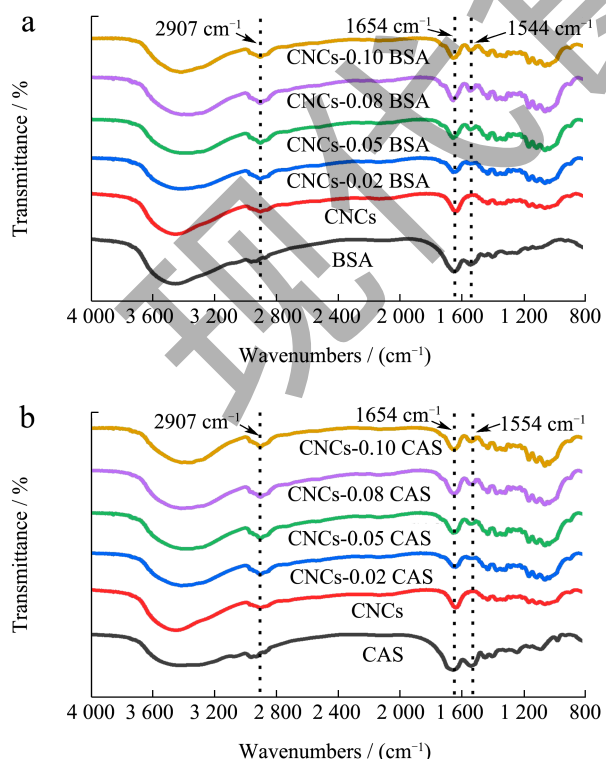


图 2 不同蛋白 (a~c) 包覆修饰 CNCs 的 FT-IR 图 (a~c) 和接触角 (d)

Fig.2 FT-IR (a~c) and contact angles (d) of CNCs modified with different protein

注: a 为 BSA, b 为 CAS, c 为 SPI。FT-IR 图中虚线分别表示波数 2907、1655、1535 cm^{-1} 的位置。

为了进一步确认蛋白与 CNCs 之间的相互作用,对 CNCs、蛋白及蛋白 -CNCs 做了傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) (图 2a~2c)。如图所示,可以清楚的看到 CNCs 典型的特征峰: 3 350 cm^{-1} 附近的 O-H 拉伸, 2 900 cm^{-1} 附近的 -C-H 拉伸, 1 640 cm^{-1} 附近的吸附水的 O-H 弯曲, 1 500~700 cm^{-1} 的典型纤维素特征峰^[41]。纯蛋白的 FT-IR 与之前文献报道的基本一致^[29]。3 000 至 3 600 cm^{-1} 范围内的宽峰分别对应于水分子和肽键 (酰胺) 的 OH 和 NH 振动伸展^[117]。2 958 cm^{-1} 处的峰对应 C-H 伸展。这里两条酰胺带 (酰胺 I 和 II) 与蛋白质肽键振动有关, 分别位于 1 664 和 1 555 cm^{-1} 区域^[18,19]。此外, 在 1 242 cm^{-1} 处还出现了一个小的酰胺 III 带。1 400 cm^{-1} 附近的带归因于 CH_2 的对称弯曲。1 079 cm^{-1} 处的峰值对应于 CO 拉伸振动。与纯 CNCs 相比, 蛋白修饰后的 CNCs 显示出 CNCs 和蛋白的特征峰, 包括 O-H 振动 / N-H₂ 拉伸 (3 300 cm^{-1}), C-H 拉伸 (2 900 cm^{-1}), 吸附水分子 (1 640 cm^{-1}), 蛋白的酰胺 I 和 II (1 664 cm^{-1})

和 $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$) 以及纤维素特征峰 ($1\ 500\sim 700\ \text{cm}^{-1}$)。其中 $1\ 540\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰属于蛋白的酰胺 -I 带, 其强度随蛋白含量增加而增加, 表明蛋白与 CNCs 发生了相互作用。经蛋白修饰后 $3\ 350\ \text{cm}^{-1}$ 附近特征峰变得更宽, 表明氢键的强化^[42]。红外结果表明, 蛋白与 CNCs 之间除了静电作用外, 还有氢键参与。一些研究也报道了壳聚糖与 CNCs、BSA 与 CNCs 之间存在静电和氢键作用^[42,43]。不同蛋白修饰的 CNCs 的 FT-IR 图比较相似, 没有明显的差异。

三相接触角常用来衡量材料或颗粒表面的润湿性或亲疏水情况, 与其乳化性质密切相关。较小的接触角 (小于 90°) 一般表示表面是高度润湿的或亲水的; 较高的接触角 (大于 90°) 一般表示润湿性差或疏水的。从图 2d 中可以看出, 未修饰 CNCs 的接触角为 36° , 表明其亲水性较强。CNCs 接触角结果与文献基本一致^[44], 主要是因为表面含有大量的羟基。蛋白修饰后, CNCs 的接触角明显提高。Feng 等^[27]利用酪蛋白酸钠修饰玉米醇溶蛋白颗粒也得到了相似的结果。CNCs 接触角的提高跟蛋白种类和浓度相关, 其中蛋白浓度关联更大。具体地, 当蛋白浓度增加至 $0.02\% (m/V)$, CNCs 接触角增加至 $51^\circ\sim 58^\circ$ 。进一步提高蛋白浓度至 $0.1\% (m/V)$, CNCs 接触角也随之增加至 $76^\circ\sim 85^\circ$ 。当蛋白浓度为 $0.1\% (m/V)$ 时, 不同蛋白修饰 CNCs 的接触角分别为 84.2° (BSA)、 76.2° (CAS) 和 81.6° (SPI)。CNCs 经过蛋白的修饰得到了较好的两亲性, 且 θ 接近 90° , 具有稳定水包油皮克林乳液的潜力。酪蛋白酸钠修饰玉米醇溶蛋白颗粒可以将其接触角从 $\sim 30^\circ$ 提高至 $\sim 80^\circ$, 显著改善颗粒润湿性^[27]。

2.2 蛋白包覆 CNCs 稳定乳液

蛋白修饰 CNCs 稳定乳液情况如图 3 和图 4。如图 3 所示, 超声乳化后, 原始 CNCs 能暂时形成粒径为 $2.2\ \mu\text{m}$ 的乳液 (见图 3a 和 3b)。各蛋白修饰 CNCs 能形成乳液平均粒径在 $3\sim 9\ \mu\text{m}$, 均大于原始 CNCs 乳液。在 BSA 和 CAS 修饰 -CNCs 稳定的乳液中, 乳液粒径大体随蛋白浓度增加而增加, 最大粒径出现在蛋白浓度为 $0.08\%\sim 0.1\% (m/V)$ 处 ($7\sim 9\ \mu\text{m}$); 而在 SPI 修饰 CNCs 稳定乳液中, 乳液粒径先随蛋白浓度增加而先增加 (至 $6\ \mu\text{m}$) 再略微减小。通过乳液显微镜图 (图 3a) 可以看出, 原始 CNCs 乳液的乳滴呈现分散状态, 而蛋白修饰 CNCs 稳定乳液均有较大程度的絮凝发生。因此, 上述蛋白修饰 CNCs 稳定乳液场合中, 乳液粒径反映的是

絮凝乳滴而非单个液滴。由前述颗粒表征结果可知, 蛋白包覆 CNCs 主要依靠静电作用, 修饰后 CNCs 所带电荷密度下降 (最小值在 $0.08\%\sim 0.1\% (m/V)$ 附近), 因此, 蛋白修饰 CNCs 稳定乳液的絮凝情况可归因于 CNCs 颗粒带电性质差异。我们前期的一项研究也已证实 BSA- 修饰的 CNCs 具有优异的乳化性, 在剪切均质下能够形成絮凝的皮克林乳液, 但没有本文絮凝情况严重。由于 CNCs 的晶体结构以及蛋白质在 CNCs 表面的完全吸附, 我们推测高能量的超声乳化主要是强化了乳液的絮凝程度^[29,30]。

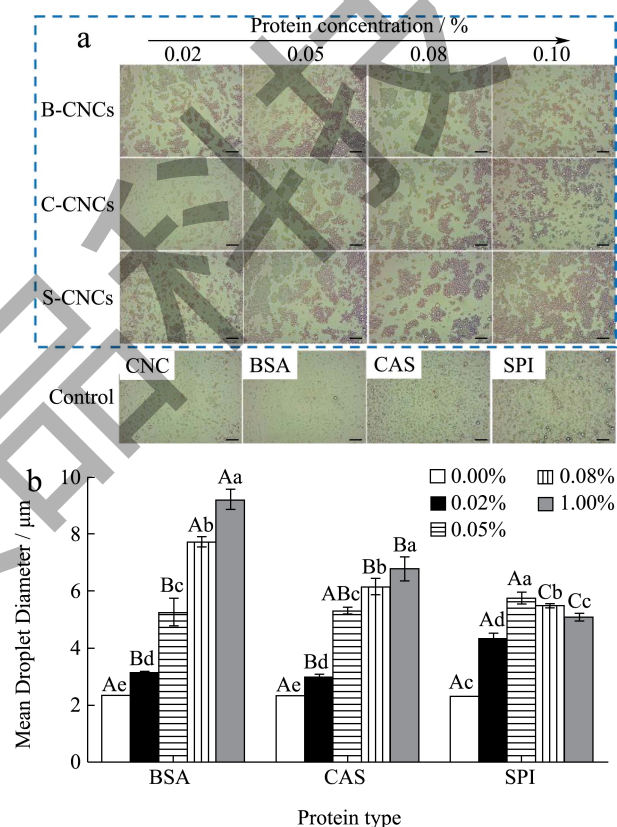


图 3 不同蛋白包覆 CNCs 稳定乳液的显微镜图和平均粒径

Fig.3 Microscope images and average particle size of emulsions stabilized by CNCs coated with different proteins

注: 其中蛋白分别为 BSA、CAS 和 SPI, 蛋白浓度为 0% 、 0.02% 、 0.05% 、 0.08% 和 0.1% , m/V 。显微镜图比例尺为 $20\ \mu\text{m}$ 。

乳液的储藏稳定性结果如图 4a 和 4b 所示。从图 4a 中可以看出, 乳液在储藏过程中均发生了脂肪上浮现象。脂肪上浮可以通过乳析指数 (CI%) 来衡量, 见图 4b。从图中可以看出, 各乳液的 CI 随储藏时间的延长先快速提高而后缓慢增加甚至保持不变, 说明脂肪上浮在乳液制备后短时间内即达到一个平衡。在储藏 30 d 后, 各乳液 CI 大小

顺序为：原始 CNCs (81%) > 0.02% 蛋白 -CNCs (38%~47%) > 0.05% 蛋白 -CNCs (23%~30%) > 0.08% 蛋白 -CNCs (22%~26%) ≈ 0.1% 蛋白 -CNCs (23%)。结合前面乳液微观结构和粒径可知，蛋白修饰 CNCs 乳液发生分层主要归因于絮凝程度的不同。而原始 CNCs 没有发生明显絮凝，反而乳析指数最大，且储藏 30 d 后表面有油析出，表明原始 CNCs 乳液主要发生了凝聚，乳化稳定性最差，与许多文献报道一致。这些结果表明，原始 CNCs 由于亲水性强，不能很好的稳定乳液，而经过蛋白静电修饰后可以显著提升 CNCs 的乳化性和乳液稳定性（主要是凝聚稳定性）。一些文献也报道过类似的吸附蛋白或多糖进而改善颗粒乳化性，包括疏水蛋白修饰的无机硅颗粒^[45]、酪蛋白酸钠修饰玉米醇溶蛋白颗粒^[27]、壳聚糖修饰 CNCs^[42]、乳铁蛋白修饰 CNCs^[30]、酪蛋白酸钠修饰 CNCs^[46]。接下来进一步探究蛋白修饰 CNCs 位于油水界面以及絮凝结构如何影响乳液的脂肪消化特性。

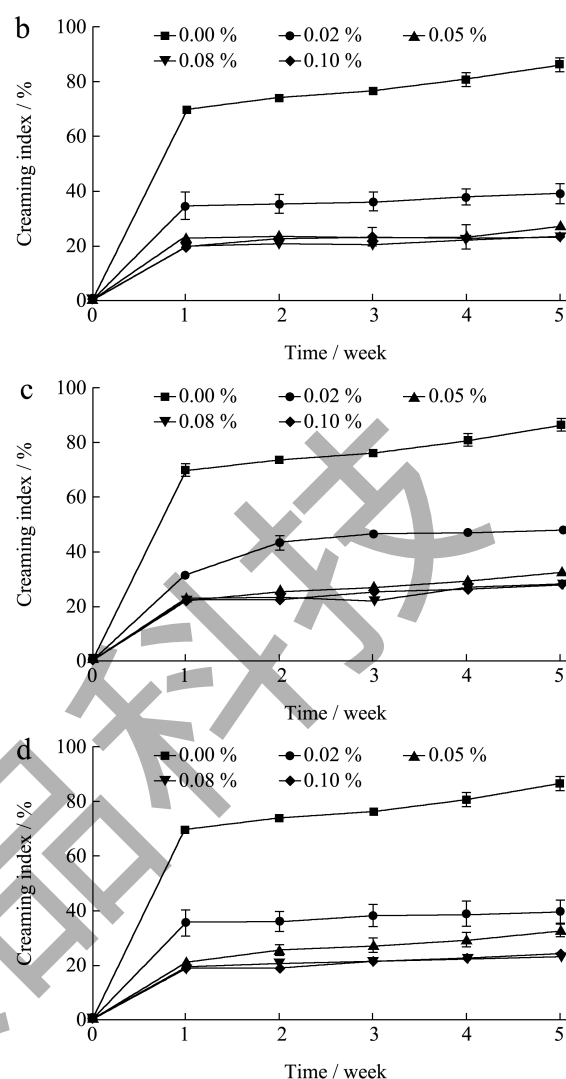
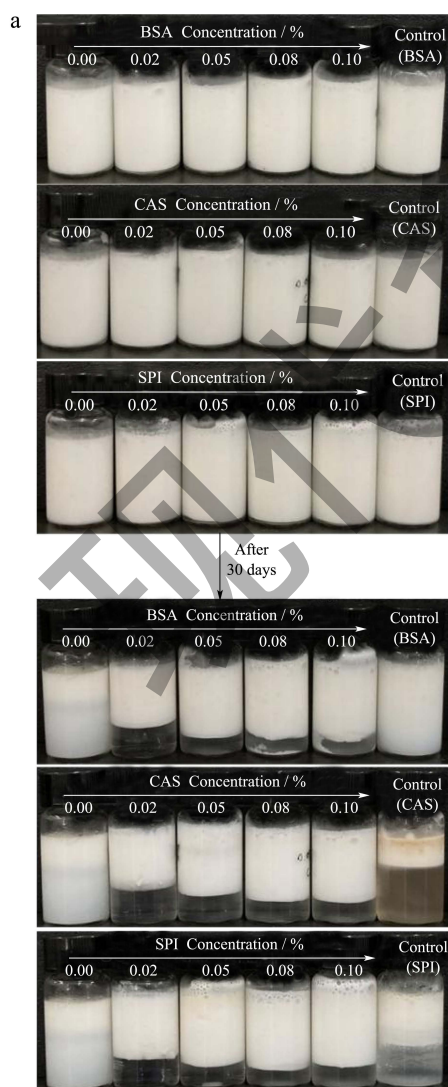


图 4 不同蛋白包覆 CNCs 稳定乳液的外观 (a) 及乳析指数 CI (b~d)

Fig.4 Visual photos (a) and CI (b~d) of emulsions prepared with different types and concentrations of protein-CNCs

注：其中蛋白种类为 (b) BSA、(c) CAS 和 (d) SPI，蛋白浓度为 0%、0.02%、0.05%、0.08% 和 0.1%，m/V。

2.3 蛋白包覆CNCs稳定乳液的体外消化特性

利用两段胃肠消化模型评价蛋白修饰 CNCs 对其稳定乳液脂肪消化的影响，结果见图 5。由图 5a 可以看出，游离脂肪酸 (FFA) 释放率曲线呈现典型的先快后慢模式，在模拟小肠消化 30 min 即能达到 70%~85% 的脂肪释放率，而后消化时间内缓慢增加直至终点。与对照吐温 20 乳液相比，蛋白修饰 CNCs 稳定乳液的脂肪消化率总体偏低。在消化终点，对照吐温 20 乳液的脂肪消化率为 89%，而 0.05%(m/V)B-CNCs 为 83.5%，0.05%(m/V)C-CNCs 为 81.2%，0.05% (m/V) S-CNCs 为 81.3%。由图 5c 可以看出，消化前，对照吐温 20 乳液呈现均匀单分

散状态，而蛋白修饰 CNCs 乳液呈现明显絮凝结构，与前述乳液光学显微镜结果一致。在经过模拟胃部消化后，乳液中絮凝结构明显减少，但仍然可见絮凝结构。经过模拟小肠消化后，对照吐温 20 乳液仅剩少量未消化油脂，而蛋白修饰 CNCs 乳液可见剩下大块油滴（红色），主要是未消化油脂部分。絮凝结构对乳液脂肪消化的影响也见于乳铁蛋白 -CNCs 乳液^[30]。

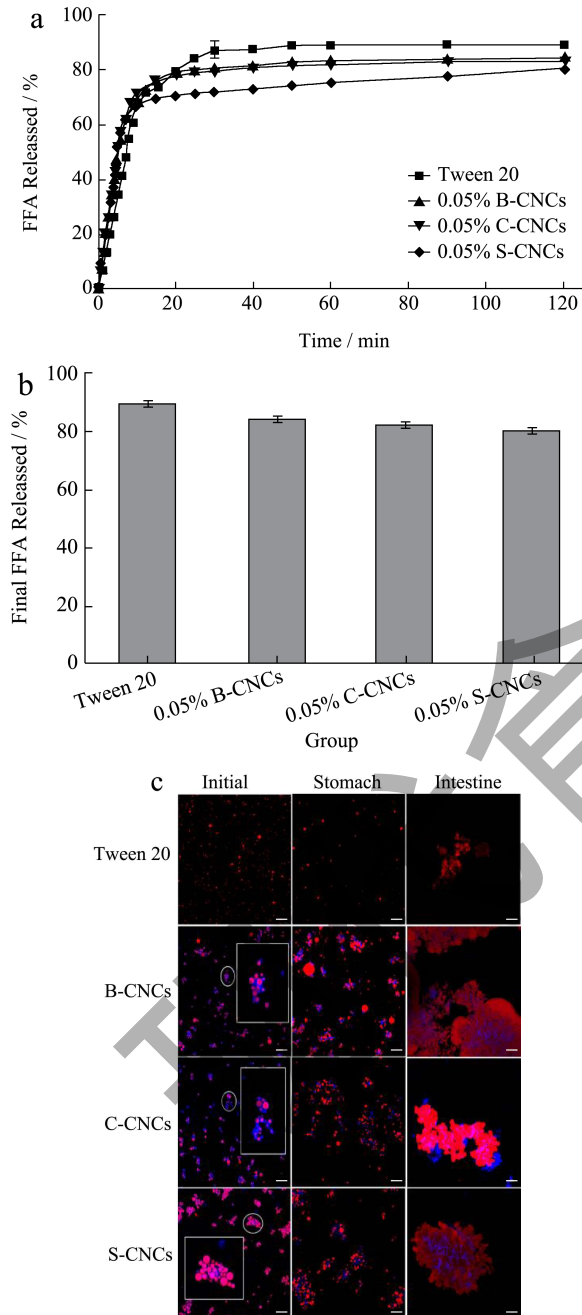


图 5 蛋白包覆 CNCs 乳液在模拟消化中的 FFA 释放曲线 (a)、最终 FFA 释放率 (b) 及激光共聚焦图片 (c)
Fig.5 FFA release curve (a), final FFA release (b) and CLSM images (c) of emulsions stabilized by protein-coated CNCs
 注：图中标尺为 20 μm (大豆油被染成红色，CNC 被染成蓝色)。

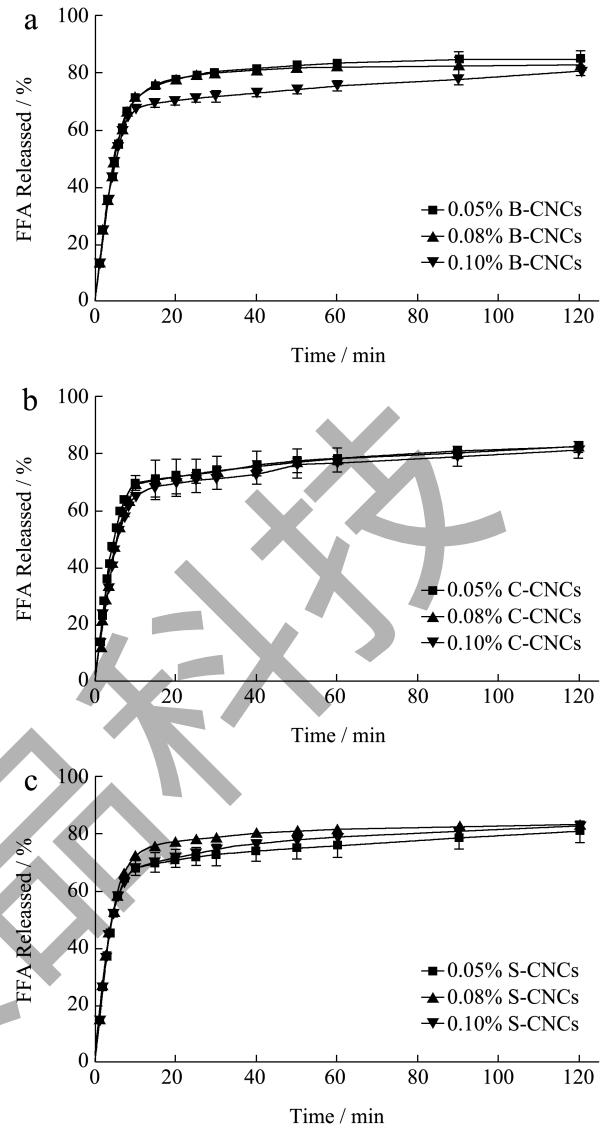


图 6 各浓度、各种类的蛋白 -CNCs 乳液在模拟消化中的 FFA 释放率

Fig.6 FFA release rates from protein-CNCs emulsions at various concentrations and classes in simulated digestion

注：修饰 CNCs 的蛋白分别为 (a) BSA、(b) CAS、(c) SPI。

表面蛋白覆盖程度 (蛋白 /CNCs 比例) 对其稳定乳液游离脂肪释放率的影响，结果见图 6。如图 6 所示，不同蛋白 /CNCs 比例对乳液脂肪模拟消化仍然呈现典型的先快后慢的趋势，不同种类蛋白之间略有不同。在 B-CNCs 中，消化过程中 0.1%(m/V) B-CNCs 总体上消化程度明显要小一些；在 C-CNCs 中，不同蛋白浓度修饰的 CNCs 没有明显差异；在 S-CNCs 中，0.08% (m/V) 或 0.1% (m/V) S-CNCs 乳液的脂肪消化程度比 0.05% (m/V) S-CNCs 要高一些。尽管不同蛋白浓度对消化过程中 FFA 有一定的影响，但不影响最终的脂肪消化程度 (~80%)。上

述结果表明,食物蛋白通过静电作用修饰 CNCs 颗粒,形成絮凝乳液,该结构对模拟消化中乳液脂肪消化有一定的抑制作用,但效果有限(机理示意图见图7)。

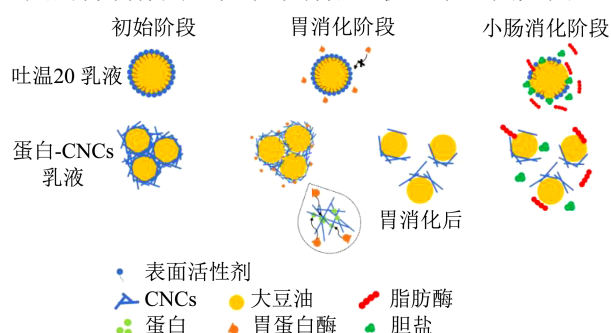


图7 不同类型乳液模拟消化过程的示意图

Fig.7 Schematic diagram of the simulated digestion process for different types of emulsions

3 结论

本文验证了食物蛋白静电修饰能够改善带电亲水性颗粒(CNCs)表面疏水性进而改善其乳化性质的可行性。蛋白静电修饰 CNCs 与浓度紧密相关,在低蛋白浓度下($<0.1\%$, m/V)蛋白完全吸附到 CNCs 表面。蛋白修饰后的 CNCs 更容易发生絮凝,絮凝程度与修饰蛋白用量紧密关联,蛋白/CNCs 比例为 $\sim 1:5$ 时絮凝程度最大。蛋白静电修饰显著提高了 CNCs 表面的疏水性,且随修饰蛋白用量增加疏水性进一步增加(接触角接近 90°)。蛋白修饰后的 CNCs 稳定的乳液虽然出现絮凝现象,但凝聚稳定性很好。与传统表面活性剂 Tween 20 相比,蛋白-CNCs 乳液的脂质消化率下降了10%左右,主要归因于乳液絮凝结构限制了酶与底物脂质的接触。同时,不同蛋白种类仅对蛋白-CNCs 颗粒乳液脂肪消化速率有一定影响,对最终的消化程度(FFA为 $\sim 80\%$)没有显著影响。因此,本文结果表明食物蛋白静电修饰是一条绿色改性带电亲水性颗粒(乳化性质)的通用性方法。本研究为拓宽纳米纤维素在食品工业中的应用(如抗消化功能食品)提供了新的思路。

参考文献

[1] CHOOI Y C, DING C, MAGKOS F. The epidemiology of obesity [J]. *Metabolism*, 2019, 92: 6-10.
 [2] AFSHIN A, FOROUZANFAR M H, REITSMA M B, et al. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years [J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377: 13-27.
 [3] BLÜHER M. Obesity: Global epidemiology and pathogenesis [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019,

15: 288-298.
 [4] CHEN K, SHEN Z, GU W, et al. Prevalence of obesity and associated complications in china: A nationwide, cross-sectional, observational, real-world study in 15.8 million adults [J]. *Cross-Sectional, Observational, Real-World Study in*, 2023, 15.
 [5] DANESCHVAR H L, ARONSON M D, SMETANA G W. Fda-approved anti-obesity drugs in the united states [J]. *The American Journal of Medicine*, 2016, 129: e1-e6.
 [6] MALJAARS P W J, PETERS H P F, MELA D J, et al. Ileal brake: A sensible food target for appetite control. A review [J]. *Physiology & Behavior*, 2008, 95: 271-281.
 [7] WILDE P J, CHU B S. Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011, 165: 14-22.
 [8] SARKAR A, ZHANG S, HOLMES M, et al. Colloidal aspects of digestion of pickering emulsions: Experiments and theoretical models of lipid digestion kinetics [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2019, 263: 195-211.
 [9] TZOUMAKI M V, MOSCHAKIS T, SCHOLTEN E, et al. *In vitro* lipid digestion of chitin nanocrystal stabilized O/W emulsions [J]. *Food & Function*, 2013, 4: 121-129.
 [10] SARKAR A, YE A, SINGH H. On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 60: 77-84.
 [11] SINGH H, SARKAR A. Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011, 165: 47-57.
 [12] SARKAR A, MURRAY B, HOLMES M, et al. *In vitro* digestion of pickering emulsions stabilized by soft whey protein microgel particles: Influence of thermal treatment [J]. *Soft Matter*, 2016, 12: 3358-3369.
 [13] LI X M, LI X, WU Z, et al. Chitosan hydrochloride/carboxymethyl starch complex nanogels stabilized pickering emulsions for oral delivery of β -carotene: Protection effect and *in vitro* digestion study [J]. *Food Chemistry*, 2020, 315: 126288.
 [14] JULKAPLI N. M, BAGHERI S. Progress on nanocrystalline cellulose biocomposites [J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2017, 112: 9-21.
 [15] NSOR-ATINDANA J, CHEN M, GOFF H D, et al. Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 172: 159-174.
 [16] REGER M, SEKINE T, OKAMOTO T, et al. Pickering emulsions stabilized by novel clay-hydrophobin synergism [J]. *Soft Matter*, 2011, 7: 11021.
 [17] ZAMAN M, XIAO H, CHIBANTE F, et al. Synthesis and characterization of cationically modified nanocrystalline cellulose [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89: 163-170.
 [18] LUO Y, TENG Z, WANG Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin d3 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 836-843.
 [19] ZHAO S, WANG Z, KANG H, et al. Construction of

- bioinspired organic-inorganic hybrid composite by cellulose-induced interfacial gelation assisted with pickering emulsion template [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 359: 275-284.
- [20] ABRAHAM E, KAM D, NEVO Y, et al. Highly modified cellulose nanocrystals and formation of epoxy-nanocrystalline cellulose (cnc) nanocomposites [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8: 28086-28095.
- [21] WINUPRASITH T, KHOMEIN P, MITBUMRUNG W, et al. Encapsulation of vitamin d3 in pickering emulsions stabilized by nanofibrillated mangosteen cellulose: Impact on *in vitro* digestion and bioaccessibility [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83: 153-164.
- [22] ZOPPE J O, VENDITTI R A, ROJAS O J. Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals grafted with thermo-responsive polymer brushes [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 369: 202-209.
- [23] TANG C, SPINNEY S, SHI Z, et al. Amphiphilic cellulose nanocrystals for enhanced pickering emulsion stabilization [J]. *Langmuir*, 2018, 34: 12897-12905.
- [24] CHEN L, REMONDETTO G. E, SUBIRADE M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17: 272-283.
- [25] DE FOLTER J W J, VAN RUIJVEN M W M, VELIKOV K P. Oil-in-water pickering emulsions stabilized by colloidal particles from the water-insoluble protein zein [J]. *Soft Matter*, 2012, 8: 6807-6815.
- [26] LIU F, TANG C H. Soy protein nanoparticle aggregates as pickering stabilizers for oil-in-water emulsions [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61: 8888-8898.
- [27] FENG Y, LEE Y. Surface modification of zein colloidal particles with sodium caseinate to stabilize oil-in-water pickering emulsion [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 56: 292-302.
- [28] GENG S, JIANG Z, MA H, et al. Fabrication and characterization of novel edible pickering emulsion gels stabilized by dihydromyricetin [J]. *Food Chemistry*, 2021, 343: 128486.
- [29] LIU F, ZHENG J, HUANG C H, et al. Pickering high internal phase emulsions stabilized by protein-covered cellulose nanocrystals [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 82: 96-105.
- [30] LI X, SUN P, FU L, et al. Surface modification of cellulose nanocrystals by physically adsorbing lactoferrin as pickering stabilizers: Emulsion stabilization and *in vitro* lipid digestion [J]. *Food Structure*, 2023, 37: 100331.
- [31] TANG C H, CHEN L, FOEGEDING E. A. Mechanical and water-holding properties and microstructures of soy protein isolate emulsion gels induced by cacl2, glucono- δ -lactone (gdl), and transglutaminase: Influence of thermal treatments before and/or after emulsification [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 4071-4077.
- [32] LIU F, TANG C H. Emulsifying properties of soy protein nanoparticles: Influence of the protein concentration and/or emulsification process [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62: 2644-2654.
- [33] CHEN Q H, ZHENG J, XU Y T, et al. Surface modification improves fabrication of pickering high internal phase emulsions stabilized by cellulose nanocrystals [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 75: 125-130.
- [34] NI Y, GU Q, LI J, et al. Modulating *in vitro* gastrointestinal digestion of nanocellulose-stabilized pickering emulsions by altering cellulose lengths [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118: 106738.
- [35] KEOWMANEECHAI E, MCCLEMENTS D. J. Influence of edta and citrate on physicochemical properties of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions containing cacl2 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 7145-7153.
- [36] KALASHNIKOVA I, BIZOT H, BERTONCINI P, et al. Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water pickering emulsions [J]. *Soft Matter*, 2013, 9: 952-959.
- [37] ZHOU H, TAN Y, LV S, et al. Nanochitin-stabilized pickering emulsions: Influence of nanochitin on lipid digestibility and vitamin bioaccessibility [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 106: 105878.
- [38] HU M, LI Y, DECKER E A, et al. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model [J]. *Food Hydrocolloids*, 2010, 24: 719-725.
- [39] LI Y, MCCLEMENTS D J. New mathematical model for interpreting ph-stat digestion profiles: Impact of lipid droplet characteristics on *in vitro* digestibility [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58: 8085-8092.
- [40] SUN G, LIU X, MCCLEMENTS D J, et al. Chitin nanofibers improve the stability and functional performance of pickering emulsions formed from colloidal zein [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021, 589: 388-400.
- [41] SMIRNOV M A, SOKOLOVA M P, TOLMACHEV D A, et al. Green method for preparation of cellulose nanocrystals using deep eutectic solvent [J]. *Cellulose*, 2020, 27: 4305-4317.
- [42] LUO Y, WANG J, LV T, et al. Chitosan particles modulate the properties of cellulose nanocrystals through interparticle interactions: Effect of concentration [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 240: 124500.
- [43] LOMBARDO S, EYLEY S, SCHUTZ C, et al. Thermodynamic study of the interaction of bovine serum albumin and amino acids with cellulose nanocrystals [J]. *Langmuir*, 2017, 33: 5473-5481.
- [44] GUNATHILAKE T M S U, CHING Y C, UYAMA H, et al. Investigations on the interactions of proteins with nanocellulose produced via sulphuric acid hydrolysis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 193: 1522-1531.
- [45] BJÖRKEGREN S, NORDSTIERNA L, TÖRNCRONA A, et al. Hydrophilic and hydrophobic modifications of colloidal silica particles for pickering emulsions [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017, 487: 250-257.
- [46] PINĎÁKOVÁ L, KAŠPÁRKOVÁ V, BORDES R. Role of protein-cellulose nanocrystal interactions in the stabilization of emulsion [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019, 557: 196-206.