

MgCl₂-谷氨酰胺转氨酶协同诱导糖基化大豆分离蛋白凝胶的工艺优化及其微胶囊的制备与性能评价

于江颖¹, 宋仁德², 刘晓畅¹, 张松山¹, 谢 鹏^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 玉树州动物疫病预防控制中心, 玉树 815099)

摘要: **目的** 以 MgCl₂ 和谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TG)为双交联剂协同诱导麦芽糊精糖基化大豆分离蛋白(maltodextrin glycosylated soybean isolate, MGSI)制备复合凝胶, 并以 MGSI 的凝胶颗粒为壁材, 藻油为芯材, 制备富含二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)和二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)的藻油微胶囊。**方法** 通过单因素试验探究 MGSI 质量分数、MgCl₂ 浓度、pH 和凝胶交联温度对复合凝胶硬度的影响并采用正交试验对凝胶的制备条件进行优化, 以优化后的凝胶颗粒为壁材制备藻油微胶囊, 进行耐热性、溶胀性、贮存保留率以及体外缓释性等微胶囊性能评价。**结果** MgCl₂-TG 诱导制备凝胶的工艺参数为 MgCl₂ 浓度 0.10 mol/L、pH 为 7.5、MGSI 质量分数 10%、凝胶交联温度为 40℃。制得的 MgCl₂-TG 诱导 MGSI (MgCl₂-TG induced MGSI, MTG)微胶囊壁材结构紧密, 具有良好的溶胀性和较低的侵蚀率, 耐热性良好, 贮存后 DHA、EPA 保留率分别达到 72%和 69%, 起到了良好的保护作用, 能较好地实现肠道的靶向释放。**结论** 本研究将糖基化和凝胶化结合, 为制备耐热性及溶胀性良好的藻油微胶囊提供理论依据和数据支持。

关键词: 糖基化产物; 凝胶化; 微胶囊

Process optimization of MgCl₂-glutamine aminotransferase synergistically induced glycosylated soybean isolate protein gels and preparation and performance evaluation of their microencapsulations

YU Jiang-Ying¹, SONG Ren-De², LIU Xiao-Chang¹, ZHANG Song-Shan¹, XIE Peng^{1*}

(1. Beijing Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Yushu Animal Disease Prevention and Control Center, Yushu 815099, China)

ABSTRACT: Objective To make composite gel by using MgCl₂ and transglutaminase (TG) as double cross-linker to induce maltodextrin glycosylated soybean isolate (MGSI), and MGSI gel particles as wall material and algal oil as core material. The algae oil microencapsulations are prepared using MGSI gel particles as wall material and algae oil

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0502300)、河北省重点研发计划项目(20327116D)、河北省现代农业产业技术体系肉牛产业创新团队建设项目(HBCT2018130204)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0502300), the Hebei Key Research and Development Program (20327116D), and the Modern Agricultural Industry Technology System, Hebei Meat Cattle Industry Innovation Team (HBCT2018130204)

***通信作者:** 谢鹏, 副研究员, 主要研究方向为优质畜产品质量评价与改进技术。E-mail: seulbird@163.com

***Corresponding author:** XIE Peng, Associate Professor, Beijing Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, No.2 Yuanmingyuan West Road, Haidian District, Beijing 100193, China. E-mail: seulbird@163.com

as core material and are enriched with docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). **Methods** The effects of MGSI mass fraction, MgCl_2 concentration, pH and gel cross-linking temperature on the hardness of the composite gel were investigated by single factor test and the preparation conditions of the gel were optimized by orthogonal test, the alginate microcapsules were prepared using the optimized gel particles as the wall material, the performances of the microcapsules, such as heat resistance, swelling property, storage retention rate and in vitro slow release property, were evaluated. **Results** The process parameters for the MgCl_2 -TG induced gel preparation were MgCl_2 concentration 0.10 mol/L, pH 7.5, MGSI mass fraction 10% and gel crosslinking temperature 40°C. The MgCl_2 -TG induced MGSI (MTG) microencapsulation had a compact wall structure, good swelling and low erosion rate, good heat resistance, and the retention rates of DHA and EPA after storage reached after storage, the retention rate of DHA and EPA reached 72% and 69%, respectively, providing good protection and enabling better targeted release from the intestinal tract. **Conclusion** This study combines glycosylation and gelation to provide theoretical basis and data support for the preparation of algal oil microencapsulations with good heat resistance and swelling properties.

KEY WORDS: glycosylation products; gelation; microencapsulation

0 引言

N-3 多不饱和脂肪酸(N-3 polyunsaturated fatty acids, N-3PUFAs)作为人体必需多不饱和脂肪酸,主要来源于深海藻油、鱼油^[1],能够起到健脑益智、消炎防病等多种作用。但 N-3PUFAs 作为长链多不饱和脂肪酸,在氧气、高温下极易发生氧化,存在食品安全隐患。为了防止藻油中 N-3PUFAs 氧化劣变,目前研究中通常采用微胶囊包埋的形式^[2],将藻油包埋在壁材中,隔绝空气和高温,起到保护作用。单层、水溶性的微胶囊壁材容易在高温、浸泡等环境中发生裂解,无法有效隔绝高温和氧气,导致藻油中 N-3PUFAs 损耗^[3],限制了其应用范围。

研究表明,相较于以单一的大豆分离蛋白(soya protein, SPI)或麦芽糊精(maltodextrin, MD)为壁材的微胶囊,以麦芽糊精糖基化大豆分离蛋白(maltodextrin glycosylated soybean isolate, MGSI)为壁材可以有效提高微胶囊的稳定性和抗氧化性^[4]。但是 SPI 和 MD 经过干法和湿法糖基化反应后接枝效果均不理想^[5],对于微胶囊的改善有限。为进一步优化以糖基化蛋白为壁材的微胶囊,研究发现借助谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TG)、盐离子等诱导剂进一步促进糖基化蛋白之间的交联,形成三维网状结构的凝胶^[6],并以该凝胶的颗粒为壁材制备微胶囊具有良好的稳定性。ZHANG 等^[7]发现 TG 能够催化蛋白交联,将酶肽链上谷氨酰胺残基的 γ -酰基,与赖氨酸上的 ϵ -氨基、伯氨基和水交联,从而改善其蛋白凝胶的结构稳定性,提高凝胶的致密度和溶胀性^[8]。同样的,在形成凝胶的过程中添加 Mg^{2+} 等二价阳离子可以在蛋白凝胶内部帮助形成盐桥^[9-10],促进结构的稳定。研究表明,在蛋白凝胶的形成过程中采用 TG 和二价金属离子协同诱导可以提高凝胶的结构稳定性、交联程度和持水性等理化性质^[11]。目前国内外采用 MgCl_2 -TG 双交联剂协同诱导进行糖基化蛋白凝胶

的制备和优化及其在藻油微胶囊中应用的研究未见报道。本研究通过 MgCl_2 -TG 协同诱导 MGSI 制备复合凝胶,通过单因素及正交试验优化凝胶制备的方式,并对其微胶囊进行性能评价,以期为性能良好的藻油微胶囊的开发及应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

SPI、MD、TG(食品级)、NaOH、人工胃液、人工肠液(分析纯,索莱宝试剂公司);盐酸[分析纯,重庆川东化工(集团)有限公司];正己烷、无水硫酸钠(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);甲醇、硫酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);冰醋酸(食品级,济南金永硕化工有限公司);藻油[二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)含量为 52.00%,二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)含量为 0.04%,反式脂肪酸为 0.08%,水分为 0.03%,生产批次 WH202013280,嘉必优生物技术(武汉)股份有限公司]。

HH-4 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造股份有限公司);TA.XT-Plus 物理质构仪(英国 Stable Micro Systems 公司);TD2002C 电子天平(精度 0.01 g,天津天马衡基仪器有限公司);Trace MS 气相色谱质谱联用仪(美国 Finnigan 质谱公司);DSC8000 差示扫描量热仪[珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司];85-2 数显恒温磁力搅拌器(常州润华电器有限公司);CP-WAX 52 CB 毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.5 μm)(美国 VARIAN 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 MGSI 及 MgCl_2 -TG 协同诱导凝胶的制备

MGSI 制备参考 ZHANG 等^[4]的方法,略作修改。质量比为 1:2 的 SPI 和 MD 分散于 0.2 mol/L pH 为 7.0 的磷酸

盐缓冲溶液中,用 NaOH 调节 pH 为 9.0,于 85℃水浴条件下进行 1.5 h 反应即得到 MGSI,冷却至室温,放入截留分子量为 3500 的透析袋中,透析 48 h,后于 4℃冰箱保存。

MgCl_2 -TG 协同诱导凝胶(MgCl_2 -TGase co-induction gel, MTG 凝胶)的制备参考王逢秋等^[11]的方法,略作修改。一定质量分数的 MGSI 溶液用 NaOH 调节 pH,加入一定量 TG 和 MgCl_2 ,水浴加热进行反应。反应结束后,将样品取出后 80℃水浴 5 min 灭酶,迅速冷却至室温。后将样品放入透析袋(透析袋截留分子量为 3500)中在室温条件下透析 48 h,4℃储存。

1.2.2 MTG 凝胶制备的单因素试验及正交设计

以 MGSI 质量分数(5%、10%、15%、20%、25%)、 MgCl_2 浓度(0.01、0.05、0.10、0.50、1.00 mol/L)、pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、凝胶交联温度(40、45、50、55、60℃)为自变量,以蛋白凝胶硬度为考察指标,研究各变量对 MTG 凝胶硬度的影响,每组试验各重复 3 次。

根据单因素试验结果,进行四因素三水平正交试验优化 MTG 凝胶制备条件。

1.2.3 蛋白凝胶硬度的测定

使用质构剖面分析(texture profile analysis, TPA)模式,TA10 探头,测试速率 0.08 mm/s,目标深度 15 mm,测试速度 3.0 mm/s,每个样品平均测定 3 次,取平均值。

1.2.4 MgCl_2 -TG 诱导 MGSI 微胶囊及未诱导 MGSI 微胶囊的制备

MgCl_2 -TG 诱导 MGSI (MgCl_2 -TG induced MGSI, MTG)微胶囊的制备方法参考 ZHANG 等^[4]的方法,略作修改:将上述 MTG 凝胶打碎为凝胶颗粒,溶解为 8.5%的溶液,加入藻油芯材使芯壁比为 1:2。以恒温磁力搅拌器 50℃、1000 r/min 搅拌,加入 1% (*m*:*V*)冰醋酸,调节 pH 至 3,反应 30 min。冰水浴至 10℃,加入 1% (*m*:*V*) NaOH,调节 pH 至 8。冰水浴中固化 4 h,4℃平衡 24 h。抽滤,洗涤,30℃烘干,4℃保存。

作为对照组,未诱导 MGSI (uninduced MGSI, UG)微胶囊的制备参考 ZHANG 等^[4]的方法,略作修改:MGSI 溶解为 8.5%的溶液,加入藻油芯材,使芯壁比为 1:2。以恒温磁力搅拌器 50℃,1000 r/min 搅拌,加入 1% (*m*:*V*)冰醋酸,调节 pH 至 3,反应 30 min。冰水浴至 10℃,加入 1% (*m*:*V*) NaOH,调节 pH 至 8。冰水浴中固化 4 h,4℃平衡 24 h。抽滤,洗涤,30℃烘干,4℃保存。

1.2.5 差式扫描热分析

称取约 5 mg 的微胶囊样品加到样品盒中,由 20℃/min 自 20℃升温至 200℃,绘制热曲线。

1.2.6 溶胀性

将一定量的微胶囊(W_0)放在适量的蒸馏水中,磁力搅拌器设为转速为 50 r/min,搅拌 3 h,温度设为 30℃。将溶胀的微胶囊取出,滤纸擦干,称重量(W_t)。溶胀性(microencapsulation swelling rate, MSR)为微胶囊的溶胀率,

见公式(1)。

$$\text{MSR}/\%=(W_t-W_0)/W_0\times 100\% \quad (1)$$

1.2.7 侵蚀率

将一定量的微胶囊(W_0)放在适量的蒸馏水中,磁力搅拌器设为转速为 50 r/min,搅拌 3 h,温度设为 30℃。将溶胀 3 h 后的微胶囊在烘箱适宜温度下干燥,直至干燥,称重(W_d),恒重为止,侵蚀率(microencapsulation erosion rate, MER)计算见公式(2)。

$$\text{MER}/\%=(W_0-W_d)/W_0\times 100\% \quad (2)$$

1.2.8 不同微胶囊二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸的贮存保留率

试验方法参考项惠丹^[12]的方法。将微胶囊在 45℃条件下避光保存 25 d,采用气相色谱法(gas chromatography, GC)测定产品芯材中二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)和二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)在贮存前后含量的变化,以此反映产品对多不饱和脂肪酸的保护能力。

气相色谱条件为进样温度:250℃;检测温度:250℃;程序升温:120℃ (2 min)→190℃ (0.1 min, 10℃/min)→220℃ (20 min, 3℃/min);进样量:1 μL ;分流比:1:30;载气:氮气;载气流量:3 mL/min;氢气流量(燃气):47 L/min;空气流量(助燃气):400 mL/min。

1.2.9 体外消化试验

试验方法参考田先卉^[13]的研究,并稍作修改:

(1)分别向离心管中加入人工胃液 10 mL 和微胶囊 0.10 g 混合。于 37℃、150 r/min 摇床进行消化模拟。约反应 4 h 时将离心管取出,调节 pH 至 6.8~7.0 并加入 10 mL 人工肠液,继续放入摇床消化(8 h);

(2)将离心管内容物离心,分离出上清,正己烷萃取上清液中的脂肪酸,旋转蒸干;

(3)用硫酸-甲醇溶液将旋蒸瓶中的游离脂肪酸转移到具塞试管中,于 75℃水浴反应 1 h;反应结束后向试管中加入 2 mL 生理盐水,加入正己烷,振荡,静置分层后取正己烷相,经过 3 次萃取,直至静置分层后正己烷相为无色透明;

(4)将正己烷相合并,并向其中加无水硫酸钠,离心后取上清,进行氮吹和浓缩,定容至 1 mL,之后于-20℃棕色样品瓶保存;

(5)对样品进行气相色谱分析,得到微胶囊在体外消化中的释放情况。

1.2.10 数据处理

数据结果通过 Origin 2017 进行绘图分析。

2 结果与分析

2.1 不同因素对于 MTG 凝胶硬度的影响

2.1.1 MGSI 质量分数对 MTG 凝胶硬度的影响

以不同 MGSI 质量分数(5%、10%、15%、20%、25%)处理凝胶化过程,pH 为 7.0、反应时间 40 min、凝胶交联温度 50℃、 MgCl_2 浓度 0.05 mol/L 制备 MTG 凝胶并测定

相应硬度。

MGSI 蛋白作为凝胶骨架结构,其含量的多少影响凝胶的黏度、结构特性和稳定性。随着 MGSI 质量分数增加,凝胶硬度呈现先升高后降低的趋势,当 MGSI 质量分数为 15%时,凝胶硬度达到最大值 $0.86\text{ N}\pm0.02\text{ N}$ 。当 MGSI 质量分数为 15%时,在凝胶形成的过程中 TG 作用于 MGSI 分子之间的二硫键、疏水基团等,使官能团暴露,在 MgCl_2 的作用下形成交联网状结构。当 MGSI 质量分数超过 15%时,由于蛋白比例过高,形成空间位阻,降低了 TG 的水解能力,不利于肽链的增加和酶的修饰作用,导致蛋白交联不完全^[13],此时凝胶的黏度、溶胀性过高,不利于凝胶结构的形成,导致凝胶硬度降低。因此,选择 MGSI 质量分数 15%作为制备 MTG 凝胶的适宜条件。

2.1.2 MgCl_2 浓度对于 MTG 凝胶硬度的影响

以不同 MgCl_2 浓度(0.01、0.05、0.10、0.50、1.00 mol/L)处理凝胶化过程, MGSI 配制 15%质量分数的溶液、pH 7.0、凝胶交联温度 50°C 、反应时间 40 min,制备 MTG 凝胶并测定相应硬度。

随着 MgCl_2 浓度增大, MTG 凝胶硬度呈现先上升后下降的趋势, MgCl_2 浓度为 0.10 mol/L 时 MTG 凝胶硬度达到最大值 $0.86\text{ N}\pm0.04\text{ N}$ 。当离子浓度超过 0.10 mol/L 时, MTG 凝胶硬度变差,后续在整个变温过程中不易凝胶或不发生凝胶,可能是高浓度离子破坏了凝胶稳定的网状结构,此结果与 KARAYANNAKIDIS 等^[14]研究成果一致。这一结果主要因为低浓度(浓度小于 0.10 mol/L)的 Mg^{2+} 对凝胶形成起到促进作用,形成离子盐桥,通过增强凝胶的水合作用,屏蔽蛋白质所带电荷,平衡蛋白质分子间的静电斥力,从而提高凝胶硬度。因此,选择 MgCl_2 浓度 0.10 mol/L 作为制备 MTG 凝胶的适宜条件。

2.1.3 pH 对于 MTG 凝胶硬度的影响

以不同 pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)处理凝胶化过程, MGSI 配制 15%质量分数的溶液、 MgCl_2 浓度为 0.10 mol/L、凝胶交联温度 50°C 、反应时间 40 min,制备 MTG 凝胶并测定相应硬度。

随着 pH 的升高,凝胶硬度出现先缓慢上升后下降的变化趋势,当 pH 在 7.5 左右时, MTG 凝胶硬度出现最大值 $1.17\text{ N}\pm0.06\text{ N}$ 。当溶液内 pH 为 6.0 时接近 MGSI 等电点,此时反应产物难以与酶或金属离子发生充分的反应^[15],其凝胶结构较弱。随着 pH 的逐渐提高,凝胶硬度逐渐变大,在 7.5 达到最大值,此时离子和酶的协同作用达到最佳效果。pH 超过 7.5 后,凝胶硬度逐渐下降,这可能是由于此时酶受到 pH 的影响,活性降低。也可能是由于 pH 的升高,溶液中同种电荷过高,导致分子斥力增大^[16],导致凝胶硬度下降。ACOSTA 等^[17]认为 pH 可以通过调整蛋白质之间引力和斥力的平衡来影响蛋白质的凝胶化。WU 等^[18]研究表明,带有阳离子多糖壳聚糖或羧甲基纤维素可以和大豆蛋白分离物可以形成稳定的凝胶,该凝胶的硬度与多糖无关,

而与 pH 相关,并且可以在蛋白等电点附近形成储能模量最佳的凝胶。因此,选择 pH 7.5 作为制备 MTG 凝胶的适宜条件。

2.1.4 凝胶交联温度对于 MTG 凝胶硬度的影响

以不同凝胶交联温度(40°C 、 45°C 、 50°C 、 55°C 、 60°C)处理凝胶化过程, MGSI 配制 15%质量分数的溶液、pH 7.5、反应时间 40 min、 MgCl_2 浓度为 0.10 mol/L,制备 MTG 凝胶并测定相应硬度。

随着凝胶交联温度的增高, MTG 凝胶硬度整体呈现先上升后逐渐下降的趋势,在 45°C 达到最大凝胶硬度 $1.23\text{ N}\pm0.03\text{ N}$ 。说明此时 TG 和离子的动能处于平衡的最佳状态^[19],分子之间的空间位阻增大。反应超过一定温度的时候, TG 逐渐失活钝化,从而反应接枝度降低,凝胶难以通过共价键交联。由于蛋白展开不充分^[20],此时金属离子难以结合蛋白质形成离子键。超过 50°C 后,过高的温度会破坏已经充分交联的的凝胶的氢键和二硫键^[21],不利于凝胶结构稳定。因此,选择凝胶交联温度 45°C 作为制备 MTG 凝胶的适宜条件。

2.2 正交试验

综上所述, MGSI 质量分数、 MgCl_2 浓度、pH 及凝胶交联温度对 MTG 凝胶硬度一定影响,采用正交试验考察四者对 MTG 凝胶硬度的综合影响,其方案如表 1。

表 1 影响凝胶硬度的正交试验因素水平表
Table 1 Levels of orthogonal test factors affecting gel hardness

水平	因素			
	MGSI 质量 分数/%	MgCl_2 浓度 /(mol/L)	pH	凝胶交联 温度/ $^\circ\text{C}$
1	10	0.01	7.0	40
2	15	0.10	7.5	45
3	20	0.50	8.0	50

由表 2 可知:影响形成 MTG 凝胶性能因素的主次关系为 MgCl_2 浓度>pH>MGSI 质量分数>凝胶交联温度。MTG 凝胶的最佳处理条件为 $A_1B_2C_2D_1$ 。根据正交试验得出的最佳条件进行验证试验,重复 3 次,最终得到 MTG 凝胶硬度的平均值为 1.48 N。表明当 MgCl_2 浓度 0.10 mol/L、pH 为 7.5、MGSI 质量分数为 10%、凝胶交联温度为 40°C 时, MTG 凝胶硬度最好,为最优配方。

2.3 不同微胶囊溶胀性和侵蚀率

通常情况下,溶胀率越大,侵蚀率越小,表明凝胶持水性和稳定性越好^[22],越有利于提高其微胶囊的包埋效果。相反,如果凝胶侵蚀率高而溶胀率低,则表明凝胶吸水扩散、膨胀的能力较差,在使用过程中容易损耗。侵蚀率和溶胀率的大小与蛋白分子链的柔韧性有关^[23]。两种微胶囊的溶胀率和侵蚀率的结果如图 1 所示。UG 藻油微胶

囊的溶胀率增长较慢, 约在 30 min 左右达到最大溶胀率 570%; MTG 藻油微胶囊在 1 h 左右达到最大溶胀率 680%, 具有较高的溶胀率。经过 3 h 溶胀 UG 藻油微胶囊的侵蚀率约为 55%; MTG 藻油微胶囊在 3 h 左右达到侵蚀率 33%, 具有较低的侵蚀率。结果表明, 通过酶和盐离子的诱导, 该凝胶呈现多层致密的孔径, 可以有效保留水分, 具有良好溶胀性。这是由于凝胶在盐桥和共价键的作用下形成稳定的凝胶交联, 在遇水、高温等环境下不易出现壁材破裂松散^[11], 从而对芯材起到良好的保护作用。而 UG 藻油微胶囊在溶液环境下易溶解或裂解, 使芯材暴露形成乳浊液, 失去保护效果, 包埋效果较差。

表 2 MTG 凝胶正交表					
Table 2 MTG gel orthogonal table					
试验	MGSI 质量 分数/%	MgCl_2 浓度 (mol/L)	pH	凝胶交 联温度/ $^{\circ}\text{C}$	凝胶 硬度/N
1	1	1	1	1	0.93
2	1	2	2	2	1.42
3	1	3	3	3	0.87
4	2	1	2	3	1.05
5	2	2	3	1	1.22
6	2	3	1	2	0.62
7	3	1	3	2	0.89
8	3	2	1	3	0.95
9	3	3	2	1	0.79
k_1	1.073	0.957	0.833	0.980	
k_2	0.963	1.197	1.087	0.977	
k_3	0.877	0.760	0.993	0.957	
R	0.196	0.437	0.254	0.023	

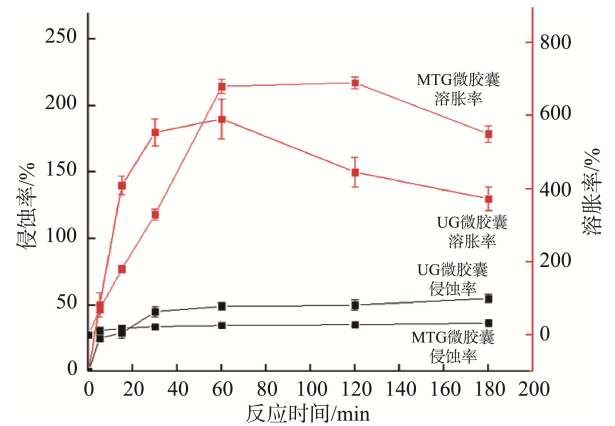


图 1 不同微胶囊的侵蚀率及溶胀率($n=3$)
Fig.1 Erosion rates and swelling rates of different microcapsules ($n=3$)

2.4 不同微胶囊的差示扫描量热分析

通过差式扫描热分析模拟高温环境可以评价微胶囊的耐热性。由图 2 可知, UG 微胶囊自加热开始就逐渐裂解, 在 180 $^{\circ}\text{C}$ 左右大多数 UG 微胶囊均发生裂解, 说明 UG 微胶囊在高温、烹饪环境中无法有效保护内部芯材。由图 2 可知, MTG 微胶囊自升温开始裂解较为缓慢, 自 140 $^{\circ}\text{C}$ 裂解加快, 在 200 $^{\circ}\text{C}$ 左右绝大部分微胶囊裂解, 其耐热性优于 UG 微胶囊。证明了由 TG 和盐离子诱导的 MGSI 交联更充分, 形成的壁材更稳定, 空间构象更加坚固, 耐热性提高, 热缓释性最佳。该结果许英一等^[24]相一致。

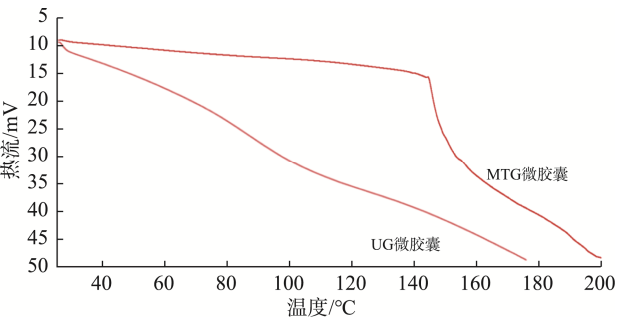


图 2 不同微胶囊差示扫描量热分析
Fig.2 Differential scanning calorimetry analysis of different microcapsules

2.5 不同微胶囊 DHA、EPA 保留率

在贮存过程中, 氧气容易通过壁材缝隙进入微胶囊或因壁材裂解导致微胶囊内部藻油 DHA、EPA 发生氧化变质^[25], 微胶囊的营养价值和感官品质降低。本研究模拟正常储存条件(45 $^{\circ}\text{C}$ 、25 d), 通过 DHA、EPA 的贮存保留率评价微胶囊在贮存期间的保护效果。由图 3 可知, 45 $^{\circ}\text{C}$ 、25 d 的贮存结束后, 藻油原油中的 DHA、EPA 损耗较大, 其 DHA 保留率为 31%, EPA 保留率为 29%, 说明其暴露在空气中时氧化速度较快; UG 微胶囊中 DHA、EPA 保留率有所提高, 分别达到了 60%、55%, 这是由于壁材物理隔绝了空气接触内部芯材, 降低了氧化速率, 提高了内部 DHA、EPA 的保留率; MTG 微胶囊的 DHA、EPA 保护效果较好, 分别达到了 72%、69%。这可能是由于其 MTG 凝胶壁材交联更为致密, 且糖基化产物具有一定的抗氧化性, 有效地抑制了 DHA、EPA 氧化的发生, 结果与陈敬鑫等^[26]研究一致。因此, 与 UG 微胶囊相比, MTG 微胶囊对于 DHA、EPA 的保护呈现出更好的效果, 大大延长了储存时间。

2.6 体外消化试验

多不饱和脂肪酸主要在肠道中吸收, 因此微胶囊只有通过胃部进入肠道并有效释放才能达到人体有效吸收的目的。胃液中富含矿物质离子、蛋白质分解酶、脂肪分解酶、条件具有高酸性(pH 为 1~3)、高离子强度(0~150 mmol/L)的特点^[27], 会对微胶囊的壁材进行腐蚀。此时微胶囊裂解会

导致 DHA、EPA 在胃液中分解,无法进入肠道被有效吸收^[28],造成营养流失。如图 4 所示,UG 微胶囊在胃液中的释放率达到 58%,仅有少部分微胶囊进入肠道,造成了营养的流失。这是由于其壁材的低分子量肽不能在油滴周围形成内聚膜,难以提供足够的立体效应或静电排斥作用^[29],导致其通过胃时极易被分解。与之相比,MTG 微胶囊在胃中第 4 h 释放率为 23%,绝大多数微胶囊可以进入肠道进行释放,实现了营养物质的有效递送。这可能是因为 MTG 微胶囊具有更佳的凝聚力和更厚的界面层可以抑制胃蛋白酶与乳化液滴的相互作用,在胃消化过程中具有更高的液滴絮凝和凝聚的稳定性^[30],可以通过立体排斥作用抑制酶对微胶囊壁材的分解。

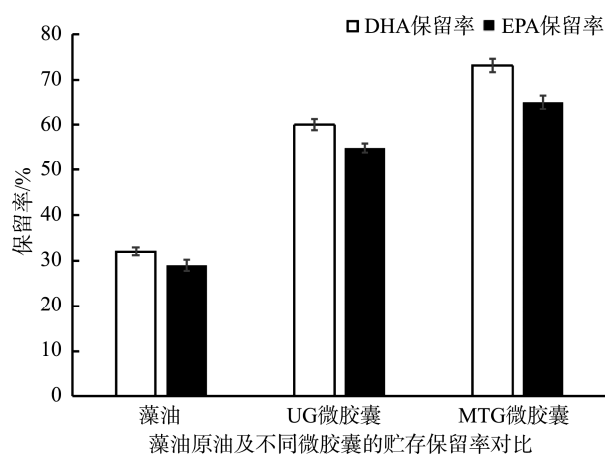


图 3 藻油及不同微胶囊的贮存保留率(n=3)

Fig.3 Storage retention of algal oil and different microencapsulations (n=3)

尚未消化的微胶囊离开胃部进入小肠。小肠内含大量的磷脂、表面活性胆汁盐、碳酸氢盐和其他无机盐、消化酶和辅酶(蛋白酶、磷脂酶、淀粉酶、胰脂肪酶和辅脂酶)等^[31],会对微胶囊的壁材进行腐蚀,使内部芯材在肠道暴露和吸收。如图 4 所示,UG 微胶囊在第 4 h 后进入肠液,在胃蛋白酶和胰蛋白酶的作用下释放加快,在 12 h 基本释放完全,达到 83%的释放率;MTG 微胶囊,在进入肠液后释放加快,在 12 h 达到 80%的释放率。证明 MTG 微胶囊相较于 UG 微胶囊,能够在胃部起到良好的保护作用,从而实现在肠道的有效释放,有利于营养物质的递送和吸收。

3 结 论

本研究在 $MgCl_2$ 和 TG 的协同诱导下,以 MGSI 为底物制备 MTG 凝胶,探究了 MGSI 质量分数、 $MgCl_2$ 浓度、pH 和凝胶交联温度对 MTG 凝胶硬度的影响。采用单因素、正交试验得出 MTG 凝胶的制备工艺为: $MgCl_2$ 浓度 0.10 mol/L、pH 为 7.5、MGSI 质量分数为 10%、凝胶交联温度为 40℃。

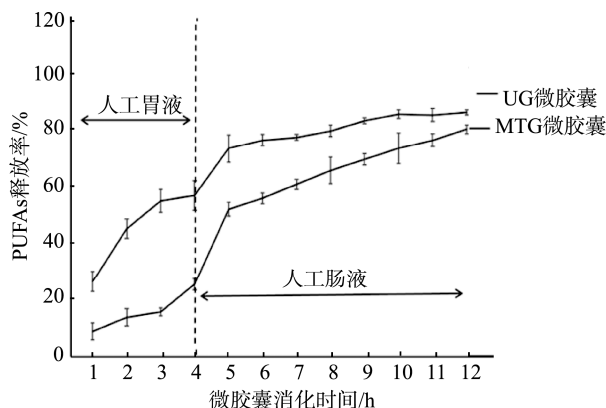


图 4 不同微胶囊体外缓释率的对比(n=3)

Fig.4 Comparison of *in vitro* sustained release rates of different microencapsulations (n=3)

以 MGSI 为壁材的 UG 微胶囊为对照组,MTG 凝胶颗粒为壁材制备的 MTG 微胶囊具有较高的溶胀率和较低的侵蚀率,140~160℃高温条件下表现出良好的耐热性,不易裂解;贮存(45℃、25 d)后微胶囊中 DHA、EPA 的保留率较高,达到 70%左右;体外缓释性良好,胃液中释放率为 33%,剩余微胶囊进入肠道后释放率达到 80%,具有良好的稳定性。

综上,本研究中以蛋白-多糖复合凝胶为壁材的微胶囊可有效提高藻油在贮藏期间的稳定性并实现其在胃肠道的控制释放,为改善微胶囊的保护效果提供理论依据。

参考文献

- [1] BERGER M, TAYLOR S, HARRISS L, *et al.* Cross-sectional association of seafood consumption, polyunsaturated fatty acids and depressive symptoms in two Torres Strait communities [J]. *Nutr Neurosci*, 2020, 23(5): 353–362.
- [2] RYCKEBOSCH E, BRUNEEL C, TERMOTE-VERHALLE R, *et al.* Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil [J]. *Food Chem*, 2014, 160: 393–400.
- [3] JIMÉNEZ-MARTÍN E, GHARSALLAOUI A, PÉREZ-PALACIOS T, *et al.* Suitability of using monolayered and multilayered emulsions for microencapsulation of ω -3 fatty acids by spray drying: effect of storage at different temperatures [J]. *Food Bioprocess Technol*, 2015, 8(1): 100–111.
- [4] ZHANG Y, TAN C, ABBAS S, *et al.* Modified SPI improves the emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules [J]. *Food Hydrocolloid*, 2015, 51: 108–117.
- [5] DU Y, HUANG G, WANG H, *et al.* Effect of high coacervation temperature on the physicochemical properties of resultant microcapsules through induction of Maillard reaction between soybean protein isolate and chitosan [J]. *J Food Eng*, 2018, 234: 91–97.
- [6] 黄萍, 黄晨, 王然, 等. 食品微凝胶的特性与应用研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(1): 337–344.
- [7] HUANG P, HUANG C, WANG R, *et al.* Research progress on the properties and applications of food microgels [J]. *Food Sci*, 2022, 43(1): 337–344.
- [7] ZHANG A, CUI Q, ZHOU M, *et al.* Improving freeze-thaw stability of soy protein isolate-glucosamine emulsion by transglutaminase glycosylation [J].

- Food Bioprod Process, 2021, 128: 77–83.
- [8] HRYNETS Y, NDAGIJIMANA M, BETTI M. Transglutaminase-catalyzed glycosylation of natural actomyosin (NAM) using glucosamine as amine donor: Functionality and gel microstructure [J]. Food Hydrocolloid, 2014, 36: 26–36.
 - [9] ZHANG C, XU W, JIN W, *et al.* Influence of anionic alginate and cationic chitosan on physicochemical stability and carotenoids bioaccessibility of soy protein isolate-stabilized emulsions [J]. Food Res Int, 2015, 77: 419–425.
 - [10] JIANG S, ZHAO X. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation in soybean protein isolates and its impacts on some functional properties of the products [J]. Eur Food Res Technol, 2010, 231(5): 679–689.
 - [11] 王逢秋节, 杨鑫鑫, 谷雪莲, 等. 转谷氨酰胺酶-氯化镁协同诱导对冷榨豆粉凝胶的影响[J/OL]. 食品科学: 1-12. [2022-06-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20210927.2302.022.html>
WANG FQJ, YANG XX, GU XL, *et al.* Effect of transglutaminase-magnesium chloride synergistic induction on cold-pressed soybean flour gel [J/OL]. Food Sci: 1-12. [2022-06-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20210927.2302.022.html>
 - [12] 项惠丹. 抗氧化微胶囊壁材的制备及其在微胶囊化鱼油中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
XIANG HD. Preparation of antioxidant microcapsule wall materials and their application in microencapsulated fish oil [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.
 - [13] 田先卉. ω -3 多不饱和脂肪酸的稳态化研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2015.
TIAN XH. Study on the stabilization of ω -3 polyunsaturated fatty acids [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015.
 - [14] KARAYANNAKIDIS PD, ZOTOS A. Physicochemical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin and its modification by the addition of various coenhancers [J]. J Food Process Pres, 2015, 39(5): 530–538.
 - [15] 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.
 - [16] 牛祥臣, 王洪彩, 马军, 等. 食盐浓度和热处理条件对大豆蛋白凝胶特性影响的研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(6): 19–22.
NIU XC, WANG HC, MA J, *et al.* Study on the effects of salt concentration and heat treatment conditions on the gel characteristics of soy protein [J]. Food Res Dev, 2018, 39(6): 19–22.
 - [17] ACOSTA S, POOCZA L, QUINTANILLA-SIERRA L, *et al.* Charge density as a molecular modulator of nanostructuration in intrinsically disordered protein polymers [J]. Biomacromolecules, 2021, 22(1): 158–170.
 - [18] WU CL, CHEN QH, LI XY, *et al.* Formation and characterisation of food protein-polysaccharide thermal complex particles: Effects of pH, temperature and polysaccharide type [J]. Int J Food Sci Technol, 2020, 55(3): 1368–1374.
 - [19] KATO A. Industrial applications of maillard-type protein-polysaccharide conjugates [J]. Food Sci Technol Res, 2002, 8(3): 193–199.
 - [20] BELDARRAIN-IZNAGA T, VILLALOBOS-CARVAJAL R, LEIVA-VEGA J, *et al.* Influence of multilayer microencapsulation on the viability of *Lactobacillus casei* using a combined double emulsion and ionic gelation approach [J]. Food Bioprod Process, 2020, 124: 57–71.
 - [21] YANG C, WANG Y, VASANTHAN T, *et al.* Impacts of pH and heating temperature on formation mechanisms and properties of thermally induced canola protein gels [J]. Food Hydrocolloid, 2014, 40: 225–236.
 - [22] ZHANG C, XU W, JIN W, *et al.* Influence of anionic alginate and cationic chitosan on physicochemical stability and carotenoids bioaccessibility of soy protein isolate-stabilized emulsions [J]. Food Res Int, 2015, 77: 419–425.
 - [23] 王静宇, 胡新, 刘晓艳, 等. 肌原纤维蛋白热诱导凝胶特性及化学作用力研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 300–306.
WANG JY, HU X, LIU XY, *et al.* Advances in the study of thermally induced gel properties and chemical forces of myogenic fibronectin [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(8): 300–306.
 - [24] 许英一, 马鑫蕊, 王宇, 等. 热处理及转谷氨酰胺酶对糖基化燕麦蛋白凝胶性质的影响[J/OL]. 食品科学: 1-13. [2022-06-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220126.1523.012.html>
XU YY, MA XR, WANG Y, *et al.* Effect of heat treatment and transglutaminase on the properties of glycosylated oat protein gels [J/OL]. Food Sci: 1-13. [2022-06-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220126.1523.012.html>
 - [25] 韩丹, 熊华, 白春清, 等. 微藻油微胶囊贮藏稳定性的初步研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 123–126.
HAN D, XIONG H, BAI CQ, *et al.* Preliminary study on the storage stability of microalgae oil microcapsules [J]. Food Sci, 2009, 30(17): 123–126.
 - [26] 陈敬鑫, 姜琦, 米红波, 等. 多层鱼油微胶囊的层层自组工艺优化及贮藏稳定性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 190–195.
CHEN JX, JIANG Q, MI HB, *et al.* Optimization of layer self-assembly process and storage stability of multilayer fish oil microcapsules [J]. Food Mach, 2020, 36(4): 190–195.
 - [27] GUDIPATI V, SANDRA S, MCCLEMENTS DJ, *et al.* Oxidative stability and *in vitro* digestibility of fish oil-in-water emulsions containing multilayered membranes [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(13): 8093–8099.
 - [28] 阙金涛, 王媛媛, 宋菲, 等. 椰子油纳米微胶囊粉末的性质表征与体外缓释研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(12): 148–154.
KAN JT, WANG YY, SONG F, *et al.* Characterization and *in vitro* sustained release of coconut oil nano-microcapsule powder [J]. China Food Addit, 2021, 32(12): 148–154.
 - [29] SINGH H. Aspects of milk-protein-stabilised emulsions [J]. Food Hydrocolloid, 2011, 25(8): 1938–1944.
 - [30] GUMUS CE, DAVIDOV-PARDO G, MCCLEMENTS DJ. Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Impact of Maillard conjugation on physicochemical stability and gastrointestinal fate [J]. Food Hydrocolloid, 2016, 60: 38–49.
 - [31] ERATTE D, DOWLING K, BARROW CJ, *et al.* *In-vitro* digestion of probiotic bacteria and omega-3 oil co-microencapsulated in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates [J]. Food Chem, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.080

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



于江颖, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。

E-mail: yujiangying2019@163.com



谢 鹏, 副研究员, 主要研究方向为优质畜产品质量评价与改进技术。

E-mail: seulbird@163.com