

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240612004

# 糖基化乳清分离蛋白制备共轭亚油酸 水包油乳液稳定性分析

庞慧慧<sup>1</sup>, 刘芳蓉<sup>2</sup>, 王 宇<sup>2</sup>, 牛爱凤<sup>2</sup>, 王承明<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学食品科学技术学院  
环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘 要:** **目的** 研究糖基化乳清分离蛋白(whey protein isolate, WPI)对制备的共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)乳液的物理稳定性、抗氧化能力及脂质氧化稳定性的影响。**方法** 以 CLA 为原料, 分别采用葡萄糖(glucose, Glu)和半乳糖(galactose, Gal)对 WPI 进行糖基化改性, 超声破碎法制备 CLA 水包油乳液, 研究在不同盐离子浓度、pH 和温度下 CLA 乳液平均粒径变化、抗氧化能力及贮藏过程中脂质氧化产物含量变化。**结果** 同对照组 WPI-CLA 相比, 经糖基化改性后制备的 WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液受到盐离子浓度、pH 和加热温度的影响, 其平均粒径变化较小, 且分布均匀。WPI-CLA、WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基达到 100%清除时的质量浓度分别为 10、4、4 mg/mL, 对 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS]阳离子自由基达到 100%清除时的质量浓度分别为 8、6、6 mg/mL。在贮藏过程中, WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液的氢过氧化物及次级脂质氧化产物含量均低于对照组 WPI-CLA 乳液。**结论** 经糖基化改性修饰, 增强了 CLA 乳液的物理稳定性, 提高了抗氧化能力, 有效减缓了脂质氧化产物的生成。

**关键词:** 共轭亚油酸; 糖基化; 超声破碎法; 乳液; 稳定性

## Preparation of conjugated linoleic acid oil-in-water emulsion by glycosylated whey protein isolate and its stability analysis

PANG Hui-Hui<sup>1</sup>, LIU Fang-Rong<sup>2</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, NIU Ai-Feng<sup>2</sup>, WANG Cheng-Ming<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Key Laboratory of Environmental Food Science, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**ABSTRACT: Objective** To study the effects of glycosylated whey protein isolate (WPI) on the physical stability, antioxidant capacity and lipid oxidation stability of conjugated linoleic acid (CLA) emulsion. **Methods** With CLA as raw material, glucose (Glu) and galactose (Gal) were used to modify WPI, and CLA oil-in-water emulsion was prepared by ultrasonication. The average particle size change, antioxidant capacity and lipid oxidation product content of CLA emulsion under different salt ion concentration, pH and temperature were studied. **Results** Compared with the control

基金项目: 湖北省林业科技支撑项目(HBZTH-FW-2021-7)

Fund: Supported by the Hubei Forestry Science and Technology Support Project (HBZTH-FW-2021-7)

\*通信作者: 王承明, 教授, 主要研究方向为油脂加工化学。E-mail: cmwang@mail.hzau.edu.cn

\*Corresponding author: WANG Cheng-Ming, Professor, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, No.1, Lion Hill Street, District, Wuhan 430070, China. E-mail: cmwang@mail.hzau.edu.cn

group WPI-CLA, the WPI-Glu-CLA and WPI-Gal-CLA emulsions prepared by glycosylation modification were affected by salt ion concentration, pH and heating temperature. The average particle size changes were small and evenly distributed. The mass concentrations of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging of WPI-CLA, WPI-Glu-CLA and WPI-Gal-CLA emulsions were 10, 4 and 4 mg/mL, respectively. The mass concentrations of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) radical scavenging were 8, 6 and 6 mg/mL, respectively. During storage, the content of hydroperoxides and secondary lipid oxidation products in WPI-Glu-CLA and WPI-Gal-CLA emulsions were lower than those in the control group WPI-CLA emulsion. **Conclusion** After glycosylation modification, the physical stability of CLA emulsion is enhanced, the antioxidant capacity is improved, and the formation of lipid oxidation products is effectively slowed down.

**KEY WORDS:** conjugated linoleic acid; glycosylation; ultrasonic crushing method; emulsion; stability

## 0 引言

以乳液、微胶囊、分散体和脂质体等形式可以提高对疏水生物活性成分的保护,其中水包油乳液具有生物相容性好、成本低、易于获取等优点,可作为活性成分递送的载体广泛使用<sup>[1]</sup>。然而,油水乳状液是热力学不稳定的体系,容易通过絮凝、聚结和相分离而分解<sup>[2]</sup>。为提高乳状液的稳定性,良好乳化剂的选择是关键因素。乳清分离蛋白(whey protein isolate, WPI)富含人体所需的多种氨基酸且吸收率高,具有良好的乳化性能<sup>[3]</sup>,但在加热过程中,WPI 易受温度影响发生变性使功能特性大大降低。有研究表明,当氨基(氨基酸、多肽或蛋白质)与还原糖之间发生美拉德反应改性修饰后,蛋白质的功能特性如溶解度、热稳定性、胶体稳定性均能得到一定程度改善<sup>[4]</sup>。将番茄红素包被在 WPI-低聚木糖的美拉德反应偶联物中,显著提高了番茄红素的生物利用度和乳液抗氧化能力<sup>[5]</sup>。

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是亚油酸的衍生物,它包括了共轭双键在不同位置和空间的多种异构体<sup>[6]</sup>。研究表明,CLA 不仅在抗氧化、减少机体脂肪含量和调节免疫等发挥重要作用,还对抗肿瘤、抗癌有一定成效<sup>[7-8]</sup>。但由于 CLA 以游离脂肪酸的形式存在,容易发生氧化,产生难闻的风味,降低其营养价值。

本研究以最佳工艺下由山桐子油制备的 CLA 为原料,采用常用的两种单糖—葡萄糖(glucose, Glu)和半乳糖(galactose, Gal)对 WPI 进行糖基化改性修饰后,超声破碎法获得纳米级 CLA 水包油乳液,并对乳液的物理稳定性、抗氧化稳定性和脂质氧化稳定性进行分析,为提高 CLA 在食品加工中稳定性,保护 CLA 发挥其功能特性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

以实验室山桐子油亚油酸碱异构化最佳工艺下制备所得 CLA 产物为实验原料。

WPI(纯度 95%,上海源叶生物科技有限公司); D-Gal(纯度 99%)、三氯乙酸、1,1,3,3-四乙氧基丙烷、硫代巴比妥酸、邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)、 $\beta$ -巯基乙醇、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(上海麦克林生化科技有限公司); Glu、氢氧化钠、四硼酸钠、甲醇、乙醇、异辛烷、正丁醇、异丙醇、硫氰酸铵、氯化钡(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

BS 224 S 分析天平(精度 0.0001 g,赛多利斯科学仪器有限公司); WH-2 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器有限公司); 飞鸽 TDL-5-A 低速离心机(上海安亭科学仪器有限公司); HH-2 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); 纳米粒度电位分析仪(英国马尔仪器有限公司); 超声破碎仪(美国 SONICS 公司); 722 型可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); MULTISKAN Sky High 全波长酶标仪(上海赛默飞世尔科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 糖基化乳清分离蛋白的制备

参考 XZA 等<sup>[9]</sup>的方法,稍作修改。将一定质量 WPI 溶于 100 mL 去离子水中,并在室温下用磁力搅拌器保持搅拌 2 h,并将其在 4 °C 下过夜以充分溶解,标记为 WPI。将 Glu、Gal 按 WPI 与糖的质量比为 1.0:0.5、1.0:1.0、1.0:2.0、1.0:3.0 (*m:m*)加入到 WPI 溶液中。随后,用 5 mol/L NaOH 溶液调节混合溶液的 pH 至 8.0,磁力搅拌 30 min 后,在 80 °C 的水浴中加热 3 h 后,将混合物在冰浴中快速冷却以产生糖基化乳清蛋白分离物(标记为 WPI-Glu、WPI-Gal),然后在 4 °C 下储存用于进一步实验。

#### 1.3.2 糖基化程度的测定

参考 HU 等<sup>[10]</sup>的方法,稍作修改。将 40 mg OPA 溶于 1 mL 甲醇中,然后与 25 mL 的 0.1 mol/L 四硼酸钠溶液、2.5 mL 的 20% 十二烷基硫酸钠溶液和 100  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇混合后,加入蒸馏水将其定容至 50 mL。将样品稀释至质

量浓度为 2 mg/mL, 取 200  $\mu$ L 样品与 4 mL 上述溶液充分混合。35  $^{\circ}$ C 反应 2 min 后, 测量其在 340 nm 的吸光度记为  $A_t$ , 以未反应的 WPI 和糖的混合物作为对照, 将测得的吸光度记为  $A_0$ 。糖基化程度用接枝度表示, 计算如公式(1):

$$\text{接枝度}/\% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $A_t$  为接枝物溶液在波长 340 nm 处的吸光值;  $A_0$  为 WPI 与糖的混合物在相同反应条件下在波长 340 nm 处的吸光值。

### 1.3.3 褐变程度的测定

参考林泽钊等<sup>[11]</sup>的方法, 稍作修改。配制蛋白质量浓度为 1 mg/mL 和 5 mg/mL 的样品, 测定在 294 nm 和 420 nm 的吸光度值, 去离子水作为空白对照。

### 1.3.4 共轭亚油酸水包油乳液的制备

参考林泽钊等<sup>[11]</sup>的方法, 稍作修改。将由山桐子油制得的 CLA 产物与糖基化 WPI 以质量比 1:9 的比例混合形成粗乳液, 然后使用超声细胞破碎仪进行破乳, 额定功率 300 W, 超声过程将乳液置于冰浴中, 将探针置于乳液中, 超声 5 s, 间隔 5 s, 总超声时间为 15 min, 分别得到 WPI-Glu-CLA、WPI-Gal-CLA 乳液, 放置冰箱 4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。此外, 使用上述方法 WPI 负载的 CLA 乳液用作对照组, 命名为 WPI-CLA。

### 1.3.5 乳液物理稳定性的测定

参考 YI 等<sup>[12]</sup>和姚弘彬等<sup>[13]</sup>的方法, 稍作修改。

#### (1) 离子强度稳定性

将不同浓度的 NaCl 溶液加入新鲜制备的 CLA 乳液中, 使乳液中  $\text{Na}^+$  的浓度分别为 50~250 mmol/L, 室温下储存 24 h, 测量 CLA 乳液的平均粒径, 以评估离子强度对 CLA 乳液的物理稳定性的影响。

#### (2) 热稳定性

将样品在 60~100  $^{\circ}$ C 下加热时间 30 min 后, 冰水浴冷却至室温, 在室温下静置储存 24 h, 测量 CLA 乳液的平均粒径, 评估食品加工过程中灭菌单元对 CLA 乳液物理稳定性的影响。

#### (3) pH 的影响

用 0.5 mol/L NaOH 和 HCl 溶液调节 CLA 乳液的 pH 分别为 3~11, 室温下静置储存 24 h, 测量 CLA 乳液的平均粒径, 评估不同 pH 对 CLA 乳液物理稳定性的影响。

### 1.3.6 乳液抗氧化能力的测定

#### (1) DPPH 自由基清除能力的测定

参考 LIU 等<sup>[14]</sup>的方法, 并稍作修改。配制 0.1 mmol/L DPPH 标准溶液, 取 100  $\mu$ L 样品稀释液, 依次加入 100  $\mu$ L DPPH 溶液, 在黑暗中室温孵育 30 min, 在 517 nm 处测定其吸光度  $A_1$ 。按照公式(2)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_{00}}) \times 100\% \quad (2)$$

式中,  $A_{00}$  为 DPPH 溶液与无水乙醇的吸光度;  $A_1$  为 DPPH

溶液与样品稀释液的吸光度;  $A_2$  为无水乙醇与样品稀释液的吸光度。

#### (2) ABTS 阳离子自由基清除能力的测定

参考 WU 等<sup>[15]</sup>的方法, 并稍作修改。取等体积 7 mmol/L 的 ABTS 溶液和 4.9 mmol/L 过硫酸钾储备溶液 1:1 (V:V) 混合, 室温下避光处放置 12~16 h 后用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液将混合溶液稀释, 使该溶液在 734 nm 下的吸光度值在 0.7 $\pm$ 0.02 左右, 得到 ABTS 工作溶液(现用现配)。在 96 孔板中, 取 50  $\mu$ L 样品稀释液, 依次加入 100  $\mu$ L ABTS 溶液, 在黑暗中室温孵育 30 min, 在 734 nm 处测定其吸光度  $B_1$ , 用无水乙醇代替试液, 测定空白对照吸光度  $B_0$ 。按照公式(3)计算 ABTS 阳离子自由基清除率:

$$\text{ABTS 阳离子自由基清除率}/\% = (1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0}) \times 100\% \quad (3)$$

式中,  $B_0$  为 ABTS 溶液与无水乙醇的吸光度;  $B_1$  为 ABTS 溶液与样品稀释液的吸光度;  $B_2$  为无水乙醇与样品稀释液的吸光度。

### 1.3.7 脂质氧化稳定性的测定

参考 WANG 等<sup>[16]</sup>的方法, 稍作修改。将新鲜制备的 CLA 乳液样品放入样品瓶中, 确保瓶中有足够的氧气, 然后在 37  $^{\circ}$ C 下, 分别测定贮藏 0~12 d CLA 乳液样品的脂质氧化稳定性。

#### (1) 乳液氢过氧化物的测定

将 0.3 mL 的乳状液与 1.5 mL 异辛烷/异丙醇(3:1, V:V) 混合, 然后在 4000 r/min 的条件下离心 5 min 提取氢过氧化物。取 0.2 mL 上清液与 2.8 mL 甲醇/正丁醇(2:1, V:V) 混合。然后依次加入 15  $\mu$ L 的 3.94 mol/L 硫氰酸铵溶液和 15  $\mu$ L 的 0.072 mol/L 亚铁溶液。亚铁溶液从 25 mL 氯化钡溶液和 25 mL 0.144 mol/L 硫酸亚铁溶液的混合物上清液中获得。以甲醇/正丁醇(2:1, V:V) 为空白, 20 min 后, 使用分光光度计测量样品在 510 nm 处的吸光度。使用 30%过氧化氢溶液制备系列标准溶液(50~500  $\mu$ mol/L)绘制标准曲线, 用过氧化氢标准曲线计算乳液的过氧化值(peroxide value, POV)。

#### (2) 硫代巴比妥酸值的测定

采取硫代巴比妥酸法进行测定。将 0.375 g 硫代巴比妥酸、15 g 三氯乙酸、1.76 mL 12 mol/L 盐酸溶液、82.9 mL 去离子水均匀混合。取 0.2 g 乳液, 加入 1.8 mL 去离子水和 4 mL 硫代巴比妥酸试剂混合于试管中, 漩涡 30 s。将试管在沸水中加热 20 min 后在室温下冷却 10 min, 将上层清液用 0.22  $\mu$ m 的水系微孔滤膜进行过滤, 于 532 nm 下测定滤液的吸光度。根据 1,1,3,3-四乙氧基丙烷标准曲线计算乳液中硫代巴比妥酸反应产物(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)的浓度。

## 1.4 数据处理

每组实验进行 3 次平行, 用平均值 $\pm$ 标准偏差表示实验结果。采用 Excel 2019 和 SPSS 26.0 进行数据处理, 采

用 Origin 2021 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 糖基化程度及褐变程度测定

糖基化反应由蛋白质提供的氨基酸残基与还原糖之间发生缩合而形成,通常用接枝度来反映糖基化的程度<sup>[17]</sup>。探究 WPI 与糖的比例对糖基化反应及褐变程度的影响如图 1 所示。由图 1(a)可知,在 WPI 与糖的比例为 1.0:0.5~1.0:3.0 (*m:m*)范围内,随着 Glu 添加量的增加,糖基化反应的接枝度呈现先上升后下降的趋势,在 WPI 与 Glu 的比例为 1.0:2.0 (*m:m*)时,接枝度达到最大为 32.46%;由图 1(b)可知, WPI 与 Gal 之间的糖基化程度变化与 Glu 类似,在 WPI 与 Gal 的比例为 1.0:0.5~1.0:2.0 (*m:m*)范围内,其接枝度随着糖的用量增加由 12.40%增加至 28.77%,继续增加糖的用量后接枝度下降。原因可能是增加糖的比例,反应体系中还原端羰基的数量增加,提高了与游离氨基共价结合的可能性,促进了糖基化反应的进行;而当糖的添加量过大时,反应中固形物含量增加,溶液黏度增大,降低了分子间碰撞的可能性,同时,已经形成的蛋白质-糖接枝物使空间位阻增大而产生聚集<sup>[18]</sup>,从而导致接枝度下降。综合考虑,在后期的实验中选择 WPI 与糖的比例为 1.0:2.0 (*m:m*)时最为适宜。

糖基化反应前期会产生一些醛、酮类小分子物质,在 294 nm 处有特征吸收,而在中后期会褐变,生成棕色含氮化合物类黑精,在 420 nm 处有吸收<sup>[19]</sup>,因此,通过测定产物在 294 nm 和 420 nm 的吸光值判断反应的进度及褐变程度。由图 1 可知,随着糖的用量增加,在 294 nm 和 420 nm 的吸光值整体均呈现上升的趋势,表明当蛋白与糖的比例达到最佳时,继续添加糖的用量,会加剧褐变反应的发生,导致产生更多的有害物质类黑精。由于褐变反应会影响产物的品质,综合考虑,在后期的实验中选择 WPI 与糖的比

例为 1.0:2.0 (*m:m*)时最为适宜。

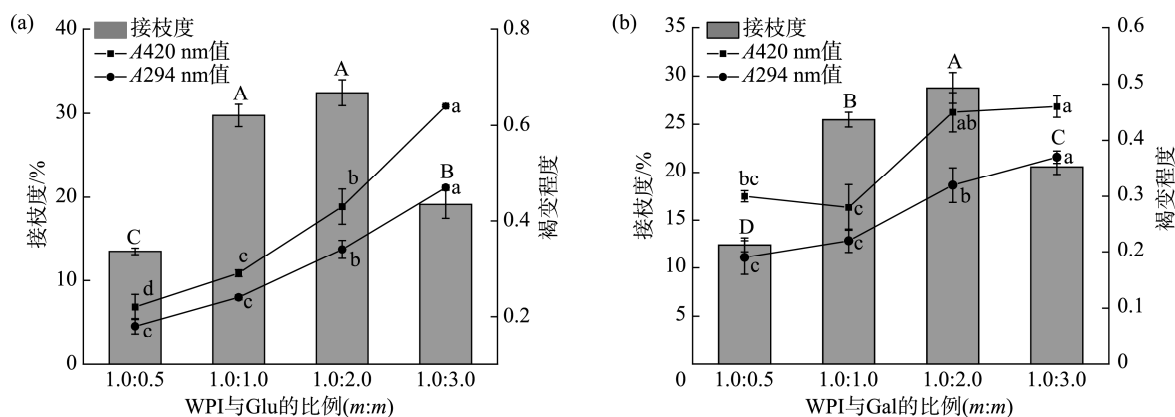
### 2.2 CLA 乳液物理稳定性分析

#### 2.2.1 离子强度对稳定性的影响

由乳液制备的食品中通常会含有一定浓度的离子,而盐离子在一定程度上会引起蛋白质发生絮凝和沉淀,因此探究离子浓度对 CLA 乳液稳定的影响具有一定意义。图 2 为 WPI-CLA 乳液、糖基化制备的 WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液稳定性受不同 NaCl 浓度的影响,在 NaCl 浓度为 50~250 mmol/L 的范围内,3 种乳液的平均粒径均在 250 nmol/L 时最大,原因可能是随着体系中盐离子浓度的增大,产生较强的静电屏蔽,降低了颗粒间的静电斥力,促使液滴发生聚集,从而导致乳液的平均粒径增大<sup>[20]</sup>。此外, WPI-CLA 乳液的稳定性受离子浓度的影响最大,其平均粒径变化程度最大由 221.00 nm 增加至 386.53 nm,而 WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液受离子浓度的影响变化较小,对盐离子具有较好的耐受性。这可能是因为糖基化反应过程中,蛋白质中游离氨基与糖的羰基共价结合增加了体系中的静电排斥和空间排斥效应<sup>[21]</sup>,防止液滴进一步聚集,因此粒径变化较小。

#### 2.2.2 温度对稳定性的影响

在食品加工过程中,加热杀菌处理是必不可少的单元操作,通过考察不同温度对 CLA 乳液稳定性的影响,可为其在食品中的应用提供参考。图 3 为 WPI-CLA、WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液在不同温度下平均粒径的变化,在 60~100 °C 范围内,随着加热温度的增加, WPI-CLA 乳液平均粒径由 283.21 nm 增加至 426.70 nm,呈现显著增大的趋势( $P<0.05$ ); WPI-Glu-CLA 乳液的平均粒径由 60 °C 时的 231.76 nm 增大到 80 °C 时的 307.50 nm,而继续增加反应温度,粒径虽略有上升,但差异性并不显著( $P>0.05$ ); WPI-Gal-CLA 乳液随着温度的增加,粒径由 223.34 nm 增加至 283.74 nm,在 60~100 °C 范围内粒径基本



注:不同大写字母或者小写字母表示组间在 $P<0.05$ 有显著差异,下同。

图1 WPI与Glu的比例(a)、WPI与Gal的比例(b)对接枝度及褐变程度的影响

Fig.1 Effects of the ratio of WPI to glucose (a) and the ratio of WPI to galactose (b) on the degree of grafting and browning

保持不变, 差异性较小( $P>0.05$ )。乳液的粒径在一定程度上随热处理而增加, 原因可能是随着加热温度上升, 油水界面形成的蛋白界面膜受损, 蛋白质发生不同程度的变性, 导致乳液稳定性降低<sup>[22]</sup>。而 WPI-Gal-CLA 乳液的平均粒径随温度变化略有增加, 但变化不显著, 可能是由于糖基化反应增大了蛋白质的空间位阻, 阻碍了分子之间发生热聚集, 提高了乳液对温度的耐受性, 使乳液具有良好的热稳定性<sup>[23]</sup>。

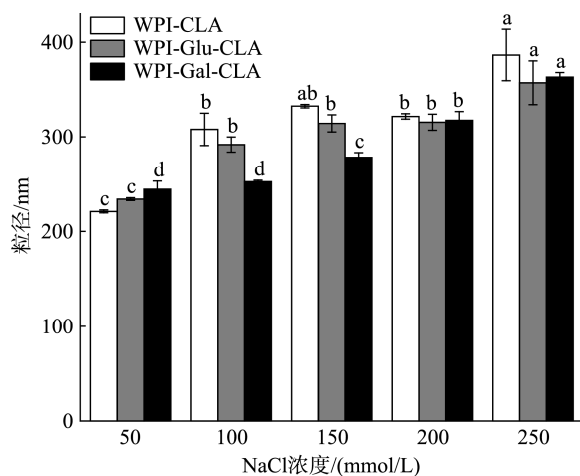


图2 NaCl浓度对CLA乳液稳定性的影响

Fig.2 Effects of NaCl concentration on the stabilities of CLA emulsion

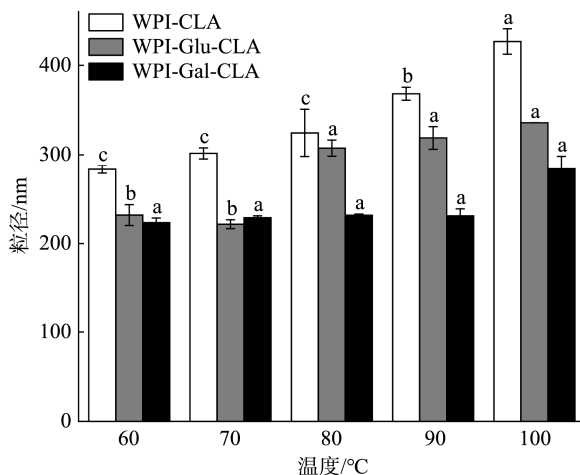


图3 加热温度对CLA乳液稳定性的影响

Fig.3 Effects of heating temperature on the stabilities of CLA emulsion

### 2.2.3 pH 对稳定性的影响

乳液产品生产过程中也要考虑酸碱条件带来的变化, 探究不同 pH 对 WPI-CLA、WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液的稳定性影响, 如图 4 所示。在 pH 为 7~11 范围内, 3 种 CLA 乳液的平均粒径差异性较小, 比较稳定, 而当 pH 由 7 降低到 5 时, WPI-CLA 的平均粒径由 226.10 nm 增加至 1424.17 nm, 扩大了约 7 倍, 发生了较明显的两相分离; 由糖基化修饰后的 WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液的

平均粒径分别增加至 1214.39 nm、863.29 nm, 可见当 pH 范围为 3~11 时, 上述 3 种乳液在 pH 为 5 时稳定性均存在显著性差异( $P<0.05$ )。这是因为 WPI 的等电点接近于 5, 正负电荷近似相等, 即乳液体系中的静电斥力几乎为零, 液滴之间极易发生絮凝沉淀, 导致粒径增加, 表现出不稳定性<sup>[24]</sup>。同 WPI-CLA 乳液相比, WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液在 pH 接近等电点时, 液滴的变化程度较小, 这种现象的发生可能是蛋白质与糖形成的配合物吸附在乳液表面形成紧密的蛋白质层, 液滴之间形成的静电斥力显著增加了乳液的稳定性<sup>[25]</sup>。

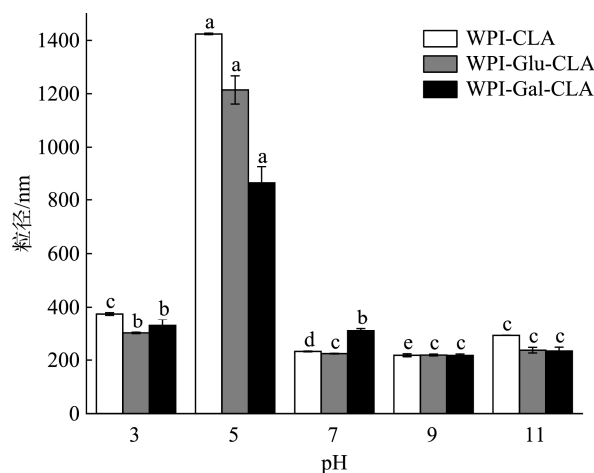


图4 pH对CLA乳液稳定性的影响

Fig.4 Effects of pH on the stabilities of CLA emulsion

## 2.3 CLA 乳液抗氧化能力分析

### 2.3.1 DPPH 自由基清除能力

评价抗氧化活性的方式多样, 基于各方法特定的测定原理及使用范围, 仅凭借一种方法衡量物质的抗氧化能力并不确切, 因此通过测定 CLA 乳液的 DPPH 自由基清除能力和 ABTS 阳离子自由基清除能力反映其抗氧化活性。不同质量浓度条件下, 油样 CLA 与 WPI-CLA、WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液对 DPPH 自由基清除能力如图 5 所示。在质量浓度为 2~10 mg/mL 范围内, CLA 随着质量浓度的增加, 其对 DPPH 自由基清除率由 26.65% 增加至 77.18%, 较 CLA 而言, WPI-CLA、WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液对 DPPH 自由基的清除能力显著增加 ( $P<0.05$ ), 表现出较强的抗氧化活性。其中, WPI-CLA 乳液在质量浓度为 2 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率为 56.83%, 是油样 CLA 的 2 倍, 在 10 mg/mL 时清除率达到最大, 这可能是因为 WPI 表面含有一定量的巯基和芳香族氨基酸, 抑制了自由基链式反应的传递<sup>[26]</sup>, 从而提高了抗氧化活性。WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液在质量浓度为 4 mg/mL 时, 对 DPPH 自由基清除能力均达到 100%, 显著提高了 CLA 乳液的抗氧化能力, 这可能与糖基化反应有一定关系,

反应过程中会产生抗氧化活性较强的物质, 包括还原性酮类、类黑素和一些挥发性杂环化合物<sup>[27]</sup>, 因此提高了对 DPPH 自由基的清除能力, 且具有较高接枝度的糖基化产物具有更强的清除和淬灭自由基的能力<sup>[28]</sup>, 这也是 WPI-Glu-CLA 乳液具有较高抗氧化性的原因。

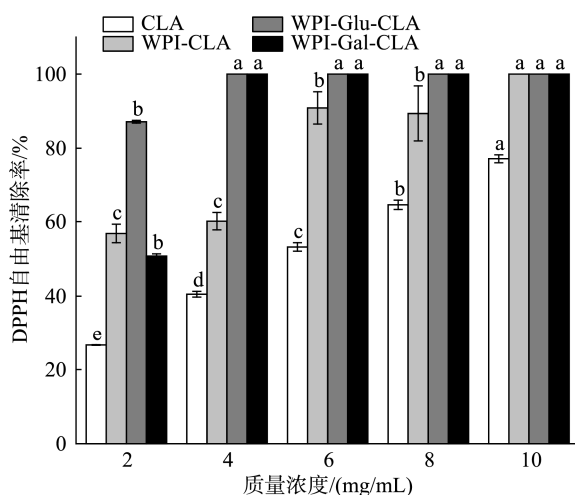


图5 CLA与CLA乳液DPPH自由基清除能力比较

Fig.5 Comparison of DPPH free radical scavenging abilities between CLA and CLA emulsion

### 2.3.2 ABTS 阳离子自由基清除能力

探究不同质量浓度条件下, 油样 CLA 与 WPI-CLA、WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液对 ABTS 阳离子自由基清除能力如图 6 所示。质量浓度在 2~10 mg/mL 时, 样品 CLA 与 3 种 CLA 乳液对 ABTS 阳离子自由基的清除率均与质量浓度呈现正相关, 在质量浓度为 4 mg/mL 时, CLA 对于 ABTS 阳离子自由基清除率为 66.30%, WPI-CLA、WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液分别为 85.98%、96.18%、88.68%, 同 CLA 相比, 对 ABTS 阳离子自由基清除率显著增加( $P<0.05$ )。继续增加样品质量浓度, CLA 在 10 mg/mL 时 ABTS 阳离子自由基清除率达到最大为 97.96%, WPI-CLA 乳液在 8 mg/mL 时对 ABTS 阳离子自由基达到 100%清除, 而经糖基化稳定的 WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液在 6 mg/mL 达到最大清除率。这表明, CLA 经乳液形式稳定后, 抗氧化能力显著提升, 且经糖基化制备的 CLA 乳液的抗氧化活性进一步增加, 这与 DPPH 自由基清除能力变化相似。

## 2.4 CLA 乳液脂质氧化稳定性分析

### 2.4.1 乳液氢过氧化物的测定

脂质乳液产品发生变质通常是由氧化引起, 同时伴随着活性成分的氧化分解, 并产生异味和有毒有害物质, 极大地降低了产品的贮藏稳定性<sup>[29]</sup>。脂质氧化初始阶段产生氢过氧化物, 以 POV 衡量其含量变化, 评估乳液氧化的反应速率。图 7 反映了在贮藏过程中 3 种 CLA 乳液 POV

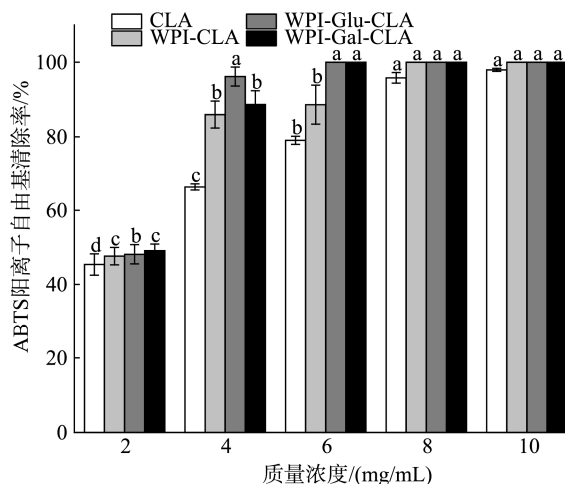


图6 CLA与CLA乳液ABTS阳离子自由基清除能力比较

Fig.6 Comparison of ABTS positive ion free radical scavenging abilities between CLA and CLA emulsions

值的变化情况, 在 0 d 时新鲜制备的 WPI-CLA、WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液的 POV 值分别为 0.06、0.04、0.05 mmol/L, 在 2~12 d 时, 随着贮藏时间的增加, 3 种 CLA 乳液的 POV 值整体呈现先增加后下降的趋势, 其中, 对照组 WPI-CLA 乳液由储藏 4 d 开始 POV 值显著增加, 在第 8 d 时达到最大为 0.30 mmol/L; WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液的 POV 变化程度较小, 分别在第 8 d 和第 6 d 达到最大值为 0.15 mmol/L、0.17 mmol/L, 显著低于对照组 WPI-CLA ( $P<0.05$ )。这种现象可能的原因是糖基化反应使糖类物质与蛋白质形成紧密的物理屏障, 增加油水界面层厚度, 有效地降低了氧化因子或自由基与乳状液油滴接触的可能性, 从而抑制了脂质氧化的发生<sup>[30]</sup>。而随着贮藏时间的延长, POV 值下降, 原因可能是脂质氧化速率由于氧气浓度的降低而减缓, 氢过氧化物的不稳定性使其进一步氧化成次级产物, 分解速度大于生成速度, 因此 POV 值明显减少。

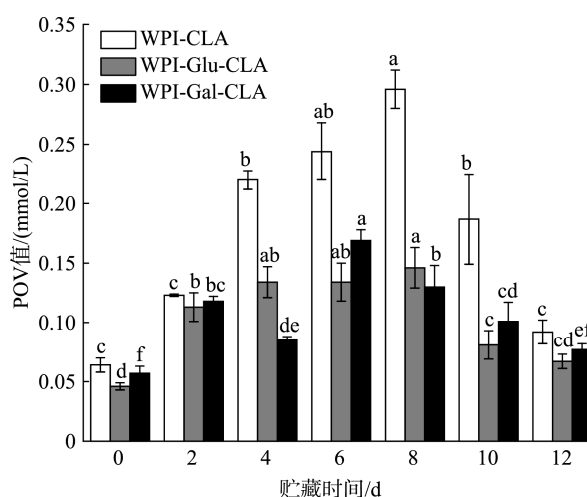


图7 CLA乳液贮藏过程中POV值的变化

Fig.7 Changes of POV value of CLA emulsion during storage

### 2.4.2 硫代巴比妥酸反应产物的测定

TBARS 通常反映脂质发生进一步氧化的过程, 用于衡量次级氧化产物丙二醛的含量。图 8 为 3 种 CLA 乳液在贮藏过程中 TBARS 的变化情况, 由 WPI、WPI-Glu 和 WPI-Gal 制备的 CLA 乳液在第 0 d 时的 TBARS 值分别为 14.33、6.15、12.62  $\mu\text{mol/kg}$ , 在贮藏的初期, 3 种乳液的 TBARS 值增加较为缓慢, 同第 6 d 相比, 在第 8 d 时显著增加 ( $P < 0.05$ ), 第 12 d 时, WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液 TBARS 值达到最大, 分别为 26.32  $\mu\text{mol/kg}$ 、29.55  $\mu\text{mol/kg}$ , 对照组 WPI-CLA 乳液在第 10 d 时 TBARS 值最大为 32.60  $\mu\text{mol/kg}$ , 与 12 d 时无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 说明 3 种乳液在贮藏过程中均发生不同程度的脂质氧化, 随着时间的延长, 次级氧化产物丙二醛含量不断积累, 这是因为在油水界面处, 氧化因子与液滴表面的氢过氧化物接触, 使其进一步氧化分解, 从而导致脂质稳定性下降。同对照组 WPI-CLA 相比, 由糖基化反应稳定的 CLA 乳液的 TBARS 减少, 这可能是由于糖蛋白颗粒在液滴周围分布, 形成稳定界面层, 增加了空间位阻和静电斥力, 从而减少了促氧化因子和氧化底物之间的接触<sup>[31]</sup>, 且 Glu 的糖基化程度高于 Gal, 这可能也是其 TBARS 较低的原因。

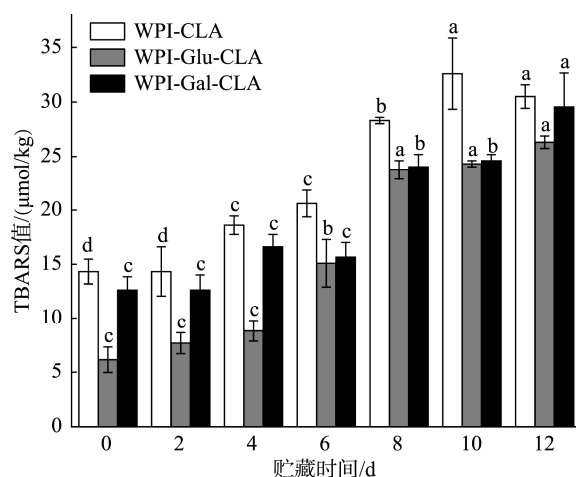


图8 CLA乳液贮藏过程中TBARS值的变化

Fig.8 Changes of TBARS value of CLA emulsion during storage

## 3 讨论与结论

本研究在 Glu、Gal 分别与 WPI 发生糖基化反应的基础上制备 CLA 乳液。结果表明, 当 WPI 与糖的比例增加, Glu 和 Gal 糖基化反应的接枝度均在 1.0:2.0 ( $m:m$ ) 时达到最大, 分别为 32.46%、28.77%, 且在 294 nm 和 420 nm 的吸光值均持续上升, 表明反应过程中发生不同程度的褐变。同对照组 WPI-CLA 相比, 经糖基化改性后制备的 WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液受到盐离子浓度、pH 和加热温度的影响, 其平均粒径变化程度较小, 且分布均

匀。WPI-CLA、WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液对 DPPH 自由基达到 100%清除时的质量浓度分别为 10、4、4 mg/mL, 对 ABTS 阳离子自由基达到 100%清除时的质量浓度分别为 8、6、6 mg/mL, 表明 WPI 糖基化改性显著提升了 CLA 乳液的抗氧化能力。在贮藏过程中, WPI-Glu-CLA 和 WPI-Gal-CLA 乳液的氢过氧化物及次级脂质氧化产物含量均低于对照组 WPI-CLA 乳液, 表明经糖基化改性, CLA 乳液稳定性增强, 有效减缓了 CLA 的氧化。对改善 CLA 的稳定性和提升山桐子油及 CLA 产品的综合开发利用具有实际参考价值。

## 参考文献

- [1] SHI A, WANG J, GUO R, *et al.* Improving resveratrol bioavailability using water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion: Physicochemical stability, *in vitro* digestion resistivity and transport properties [J]. J Funct Food, 2021, 87: 104717.
- [2] LI X, LI K, SHEN Y, *et al.* Influence of pure gum on the physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions [J]. Colloid Surface A, 2016, 504: 442–448.
- [3] LIVNEY YD. Milk proteins as vehicles for bioactives [J]. Curr Opin Colloid In, 2010, 15(1-2): 73–83.
- [4] KIM DY, SHIN WS. Functional improvements in bovine serum albumin-fucoidan conjugate through the Maillard reaction [J]. Food Chem, 2016, 190: 974–981.
- [5] JIA C, CAO D, JI S, *et al.* Whey protein isolate conjugated with xylo-oligosaccharides via Maillard reaction: Characterization, antioxidant capacity, and application for lycopene microencapsulation [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 118: 108837.
- [6] MEI Y, CHEN H, YANG B, *et al.* Research progress on conjugated linoleic acid bio-conversion in *Bifidobacterium* [J]. Int J Food Microbiol, 2022, 369: 109593.
- [7] SLOWIKOWSKI BK, DRZEWIECKA H, MALESZA M, *et al.* The influence of conjugated linoleic acid on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and selected apoptotic genes in non-small cell lung cancer [J]. Mol Cell Biochem, 2020, 466(1-2): 65–82.
- [8] HUANG YS, LIN ZD, RONG H, *et al.* Effects of conjugated linoleic acid on growth, body composition, antioxidant status, lipid metabolism and immunity parameters of juvenile Chu's croaker, *Nibea coibor* [J]. Aquac Res, 2018, 49(1): 546–556.
- [9] XZA B, XLA B, LLA B, *et al.* Covalent conjugation of whey protein isolate hydrolysates and galactose through Maillard reaction to improve the functional properties and antioxidant activity [J]. Int Dairy J, 2020, 102: 104584.
- [10] HU B, WANG K, HAN L, *et al.* Pomegranate seed oil stabilized with ovalbumin glycated by inulin: Physicochemical stability and oxidative stability [J]. Food Hydrocolloid, 2020, 102: 105602.
- [11] 林泽钊, 白卫东, 刘巧瑜, 等. 微波-超声辅助乳清分离蛋白糖基化工艺优化[J]. 中国调味品, 2023, 48(10): 98–104, 121.  
LIN ZQ, BAI WD, LIU QY, *et al.* Optimization of microwave-ultrasound assisted glycosylation process of whey protein isolate [J]. China Cond, 2023, 48(10): 98–104, 121.
- [12] YI J, PENG G, ZHENG S, *et al.* Fabrication of whey protein

- isolate-sodium alginate nanocomplex for curcumin solubilization and stabilization in a model fat-free beverage [J]. *Food Chem*, 2021, 348: 129102.
- [13] 姚弘彬, 伍文彬, 陈涛, 等. 3 种水包油型  $\beta$ -胡萝卜素乳液的稳定性和消化特性[J]. *中国油脂*, 2023, 48(6): 39–46.
- YAO HB, WU WB, CHEN T, *et al*. Stability and digestive characteristics of three  $\beta$ -carotene oil-in-water emulsions [J]. *China Oils Fats*, 2023, 48(6): 39–46.
- [14] LIU YT, HU XP, BAI Y, *et al*. Preparation and antioxidative stability of the potato protease inhibitors (PPIs) from potato starch waste-water [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 134: 109963.
- [15] WU SQ, LI R, JIANG ZT, *et al*. Evaluation of antioxidant active ingredients of spikenard essential oil by ultra-fast gas chromatography electronic nose and radical scavenging mechanism [J]. *Ind Crop Pro*, 2020, 151: 112489.
- [16] WANG J, ZHANG L, TAN C, *et al*. Pickering emulsions by regulating the molecular interactions between gelatin and catechin for improving the interfacial and antioxidant properties [J]. *Food Hydrocolloid*, 2022, 126: 107425.
- [17] 王丹, 李河, 张志军, 等. 紫苏籽粕蛋白糖基化产物结构及功能特性[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2023, 49(4): 557–565.
- WANG D, LI H, ZHANG ZJ, *et al*. Structural and functional properties of the glycosylated products of perilla seed meal proteins [J]. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci)*, 2023, 49(4): 557–565.
- [18] LI R, HETTIARACHCHY N, RAYAPROLU S, *et al*. Improved functional properties of glycosylated soy protein isolate using *D*-glucose and xanthan gum [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(9): 6067–6072.
- [19] PIRESTANI S, NASIRPOUR A, KERAMAT J, *et al*. Preparation of chemically modified canola protein isolate with gum Arabic by means of Maillard reaction under wet-heating conditions [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 155: 201–207.
- [20] 刘香玲, 李真, 王金鼎, 等. 大豆分离蛋白颗粒稳定的鲢鱼油 Pickering 乳液的制备及其性能表征[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(18): 1–10.
- LIU XL, LI Z, WANG JX, *et al*. Preparation and performance characterization of silver carp oil pickering emulsion stabilized with soybean protein isolate particles [J]. *Food Res Dev*, 2023, 44(18): 1–10.
- [21] LI Q, SHI J, DU X, *et al*. Polysaccharide conjugates from Chin brick tea (*Camellia sinensis*) improve the physicochemical stability and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene in oil-in-water nanoemulsions [J]. *Food Chem*, 2021, 357: 129714.
- [22] LIU G, WANG Q, HU Z, *et al*. Maillard-reacted whey protein isolates and epigallocatechin gallate complex enhance the thermal stability of the pickering emulsion delivery of curcumin [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(18): 5212–5220.
- [23] SETIOWATI AD, WIJAYA W, MEEREN P. Whey protein-polysaccharide conjugates obtained via dry heat treatment to improve the heat stability of whey protein stabilized emulsions [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 98: 150–161.
- [24] HE S, GU C, WANG D, *et al*. The stability and *in vitro* digestion of curcumin emulsions containing konjac glucomannan [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 117: 108672.
- [25] YAN X, MA C, CUI F, *et al*. Protein-stabilized Pickering emulsions: Formation, stability, properties, and applications in foods [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 103: 293–303.
- [26] MOHAMMADIAN M, MADADLOU A. Technological functionality and biological properties of food protein nanofibrils formed by heating at acidic condition [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2018, 75: 115–128.
- [27] PAN Y, WU Z, XIE QT, *et al*. Insight into the stabilization mechanism of emulsions stabilized by Maillard conjugates: Protein hydrolysates-dextrin with different degree of polymerization [J]. *Food Hydrocolloid*, 2020, 99: 105347.
- [28] 徐雪晗, 张慧君, 李萍, 等. 玉米醇溶蛋白糖基化产物对 DHA 微胶囊氧化稳定性的影响 [J/OL]. *食品科学*, 1–18. [2024-06-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20240124.1624.002.html>
- XU XH, ZHANG HJ, LI P, *et al*. Effect of zein glycosylation products on oxidation stability of DHA microcapsules [J/OL]. *Food Sci*, 1–18, [2024-06-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20240124.1624.002.html>
- [29] BAO Y, PIGNITTER M. Mechanisms of lipid oxidation in water-in-oil emulsions and oxidomics-guided discovery of targeted protective approaches [J]. *Compr Rev Food Sci*, 2023, 22(4): 2678–2705.
- [30] XIE Y, JIANG S, LI M, *et al*. Evaluation on the formation of lipid free radicals in the oxidation process of peanut oil [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2019, 104: 24–29.
- [31] LI S, CHEN H, ZENG Z, *et al*. Arabinoxylan hydrolysates improved physical and oxidative stability of oil-in-water emulsions [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 258: 128798.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)

## 作者简介

庞慧慧, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。  
E-mail: 2548494040@qq.com

王承明, 教授, 主要研究方向为油脂加工化学。  
E-mail: cmwang@mail.hzau.edu.cn