

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2021.08.037

β -胡萝卜素乳液凝胶微球制备与理化特性研究

江连洲 廖培龙 连子腾 田甜 严仁 王欢

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: β -胡萝卜素作为重要的生物活性物质,其稳定性差、生物利用率低,极大限制了其在食品领域的应用。以大豆分离蛋白为水相,以玉米油为油相,通过添加壳聚糖、海藻酸钠制备多层乳液,与 Ca^{2+} 交联制备运载 β -胡萝卜素凝胶微球。通过粒径、 ζ -电位、乳化稳定性、界面蛋白吸附量、 β -胡萝卜素包埋率等指标和扫描电镜观察、红外光谱分析、体外释放动力学实验,研究了壳聚糖、海藻酸钠质量分数对乳液稳定特性及 β -胡萝卜素凝胶微球释放特性的影响。结果表明,当壳聚糖质量分数为 2.0% 时,形成的双层乳液稳定性最好,对 β -胡萝卜素的包埋率最高,达 $(64.82 \pm 0.31)\%$;当海藻酸钠质量分数达到 2.0% 时,形成的三层乳液对 β -胡萝卜素包埋率最高,达到 $(86.75 \pm 2.00)\%$ 。红外光谱分析表明,凝胶微球中海藻酸钠与壳聚糖发生了静电相互作用;扫描电镜观察表明,干燥的凝胶微球呈球形,且随海藻酸钠质量分数的增加,凝胶微球的结构变得更加紧密;体外释放实验证明,凝胶微球具有持续性释放的功能,乳液凝胶微球可作为 β -胡萝卜素一种良好的缓释体系。

关键词: β -胡萝卜素; 乳液; 壳聚糖; 海藻酸钠; 凝胶微球; 延缓释放

中图分类号: TS209

文献标识码: A

文章编号: 1000-1298(2021)08-0355-08

OSID:



Preparation, Characterization and Physicochemical Properties of β -carotene Emulsion Gel Microspheres

JIANG Lianzhou LIAO Peilong LIAN Ziteng TIAN Tian YAN Ren WANG Huan

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: As an important biologically active substance, β -carotene has poor stability and low bioavailability, which greatly limits its application in food. Soybean protein isolate (SPI) was used as water phase, corn oil as oil phase to form a multilayer emulsion with chitosan and sodium alginate, which was cross-linked with Ca^{2+} to prepare β -carotene microspheres. The effects of mass fractions of chitosan and sodium alginate on the stability and β -carotene release characteristics of emulsion and gel microspheres were studied by analyzing the particle size, ζ -potential, emulsification stability, interfacial protein adsorption capacity, embedding rate of β -carotene, scanning electron microscope, Fourier transform infrared spectroscopy and in vitro release. The results showed that when the mass fractions of chitosan was 2.0%, the stability of the secondary emulsion was the best, and the embedding rate of β -carotene was up to $(64.82 \pm 0.31)\%$, when the mass fractions of sodium alginate reached 2.0%, the embedding efficiency of β -carotene in the three-layer emulsion was significantly increased, with the value of $(86.75 \pm 2.00)\%$. The Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) indicated the electrostatic interaction between sodium alginate and chitosan. The dried gel microspheres were spherical and the structure of gel microspheres became more compact with the increase of sodium alginate concentration. In addition, in vitro release experiments showed that the gel microspheres had the function of continuous release. Emulsion gel microspheres can be used as a potential sustained-release system for β -carotene.

Key words: β -carotene; emulsion; chitosan; sodium alginate; gel microspheres; delayed release

收稿日期: 2021-04-18 修回日期: 2021-05-17

基金项目: 黑龙江省博士后面上项目(LBH-Z20089)、黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2019ZX08B01)和山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2019JZZY010722)

作者简介: 江连洲(1960—),男,教授,博士生导师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: jilzname@163.com

通信作者: 王欢(1987—),女,讲师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: whname@neau.edu.cn

0 引言

β -胡萝卜素是一种脂溶性的天然色素,具有较强的抗氧化活性,是维生素 A 的前体物质,在高温、光照和氧气条件下易被氧化和降解^[1],从而丧失生物活性。由于 β -胡萝卜素水溶性差、生物利用度相对较低,故在食品领域的应用受到限制。研究发现, β -胡萝卜素在人体肠道部位可被有效吸收^[2],但在多变环境(如 pH 值、离子强度、温度等)下乳液变得不稳定, β -胡萝卜素易发生氧化或降解,大大降低了它的利用率^[3]。研究者们采取了不同的方法来提高 β -胡萝卜素的利用率,如微胶囊化^[4]、乳液凝胶^[5]等。

静电层层自组装技术通过建立一个保护屏障来封装生物活性物质,被广泛应用于食品工业领域。文献[6-7]研究表明,利用静电层层自组装技术,将多糖吸附在乳液周围形成包封层,能显著增强乳液对外界多变环境的抵抗力,进一步提高对生物活性物质的保护能力。此外,离子凝胶化技术通过生物聚合物与离子交联作用形成凝胶微球运载体系,也能显著提高生物活性物质的利用率,并延缓释放。

海藻酸钠(Sodium alginate, SA)是从海藻中提取的一种酸性阴离子多糖,由(1,4)- β -D-甘露酸(M)和 α -L-古鲁酸(G)残基组成^[8]。壳聚糖(Chitosan, CS)是一种由甲壳素经脱乙酰化后形成的阳离子多糖^[9]。两种多糖都具有生物相容性、可降解性,被广泛用于食品、药品和再生药物领域。CS 与 SA 可通过静电相互作用形成聚合物,利用 SA 与二价阳离子的较强交联能力制备凝胶微球^[10]。将静电层层自组装技术与离子凝胶化技术相结合,制备凝胶微球,既可以提高对生物活性物质的包埋率,又可以提高生物活性物质的生物利用率及缓释效果。文献[11]以 SA 与 CS 为壁材、以维生素 B₂ 为模拟药物,研究了多层凝胶微球的缓释能力,结果表明,凝胶微球具有良好的缓释效果。文献[12]成功制备了延缓脂质氧化、提高脂类氧化稳定性的生物聚集颗粒。目前,关于静电层层自组装技术或离子凝胶化技术已有深入的研究,但对两种技术相结合的研究很少。

本文以大豆分离蛋白为水相、以玉米油为油相制备 β -胡萝卜素乳液,利用静电相互作用将壳聚糖、海藻酸钠逐层吸附到乳液外层,形成 β -胡萝卜素三层乳液,再通过离子凝胶化技术利用 Ca^{2+} 交联制备乳液凝胶微球。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

β -胡萝卜素(纯度 97% 以上),海藻酸钠,壳聚糖(脱乙酰度 97% 以上),氯化钙,均来自于北京源叶生物有限公司;脱脂豆粕、玉米油,黑龙江省九三集团有限责任公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

IKA T18 型分散机,德国艾卡仪器设备有限公司;SPCH-10 型超高压纳米均质机,英国安盛联合科技有限公司;Delta 320 型 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Mastersizer 3000 型粒度仪、ZS 90s 型电位分析仪,英国马尔文仪器有限公司;LSM 710 型共聚焦显微镜,德国卡尔蔡司股份公司;UV-2600 型紫外-可见分光光度计,岛津仪器(苏州)有限公司;HH-S26 型恒温水浴锅,金坛市梅香仪器有限公司;THR-16-A 型台式冷冻离心机,长沙英泰离心机有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品的制备

(1)大豆分离蛋白

将脱脂豆粕粉碎过 60 目筛,按照液料比 10 mL/g,加水混合搅拌,同时用 1 mol/L NaOH 调节混合液的 pH 值到 8.5,搅拌 2 h,然后在 9 000 g 条件下离心 20 min,取上清液,并将清液 pH 值调到 4.5,放置到 4℃ 冰箱静置 12 h,然后在 9 000 g 下离心 20 min,弃去上清液,将得到的大豆分离蛋白水洗 3 次,并将 pH 值调节到 7.0,经冷冻干燥后得到大豆分离蛋白粉末,储存备用。

(2)乳液

将大豆分离蛋白粉末溶于去离子水中(pH 值 7.0),磁力搅拌 2 h,水化 2 h,使其充分溶解,制备 2.5% 蛋白溶液作为水相; β -胡萝卜素溶于玉米油中,50℃ 加热搅拌 1 h 并且超声 2 min,使其充分溶解,制备含 β -胡萝卜素(质量分数 0.5%)玉米油作为油相,油水两相按体积比 1:9 混合,8 000 r/min 粗均质 3 min 形成粗乳液,在 60 MPa 下高压均质 3 次得到纳米乳液,放置 4℃ 冰箱储存备用。

(3) β -胡萝卜素双层乳液

将所制得的乳液与壳聚糖(质量分数为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)以料液比 2 g/mL、转速 6 000 r/min 快速混合 1 min,并用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 5.0,制备 β -胡萝卜素双层乳液。

(4) β -胡萝卜素三层乳液

将所制得的海藻酸钠(质量分数为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)与双层乳液以料液比

1 g/mL、转速 6 000 r/min 快速混合 1 min,并调节 pH 值为 5.0,形成 β -胡萝卜素三层乳液。

(5)乳液凝胶微球

将形成的 β -胡萝卜素三层乳液通过 5 mL 注射器以 10 滴/min 的速度滴加到 5% 的 CaCl_2 溶液中,滴加完成后在 CaCl_2 溶液中继续交联 30 min,用滤布过滤出凝胶微球并用蒸馏水冲洗除去多余的 Ca^{2+} 离子,室温(20℃)下干燥,4℃ 储存备用。

1.3.2 平均粒径及电位分析

(1)平均粒径测定

样品的平均粒径使用马尔文激光粒度仪测定。用蒸馏水作为分散介质,取 1 mL 样品并稀释 100 倍,设置分析条件为:颗粒(玉米油)折射率 1.472,颗粒吸收率 0.100,分散剂(水)折射率 1.33,激光遮光度 10% 左右。

(2) ζ -电位测量

取 1 mL 样品用相应 pH 值的蒸馏水稀释 100 倍后,用马尔文 ZS 90s 型电位分析仪测定 ζ -电位,测试参数为:温度 25℃,折光率 1.333,激光波长 635 nm,外部光纤角 18.9°,散射角 14.063 6°。

1.3.3 浊度测定

通过浊度测定来获取乳液吸附情况,参照文献[13]的方法并稍作修改。将制备的乳液、 β -胡萝卜素双层乳液、 β -胡萝卜素三层乳液静置 24 h 后,用 pH 值为 5.0 的蒸馏水稀释 100 倍,以蒸馏水为空白,用紫外分光光度计在 600 nm 处测量吸光度。

1.3.4 界面蛋白吸附量测定

参照文献[14]的测定方法并稍作改动。取 50 mL 待测样品于离心管中,室温下离心(11 000 g, 30 min),用注射器小心吸取底部清液于另一离心管中,再次离心(11 000 g, 30 min),收集下层清液,用 Bradford 法^[15]测定清液中的蛋白质量浓度 C_i ,界面蛋白吸附量计算公式为

$$C = C_0 - C_i \tag{1}$$

式中 C_0 ——初始乳液中蛋白质量浓度,mg/mL
 C ——界面蛋白吸附量,mg/mL

1.3.5 乳化活性指数和乳化稳定性指数测定

参照文献[16]方法略作修改。取 50 μL 样品加入 4 950 μL 0.1 g/L 的 SDS(十二烷基硫酸钠)稀释,在 500 nm 波长处测吸光度 A_0 ,静置 30 min 后,再次测定吸光度 A_{30} ,乳化活性指数和乳化稳定性指数计算公式为

$$E_{At} = \frac{2 \times 2.303A_0N}{1\,000\rho\varphi} \tag{2}$$

$$E_{St} = \frac{A_0}{A_0 - A_{30}} \tag{3}$$

式中 N ——稀释倍数
 ρ ——混合液形成前质量浓度,取 0.025 g/mL
 φ ——乳化液中油相体积分数,取 10%
 E_{At} ——乳化活性指数, m^2/g
 E_{St} ——乳化稳定性指数,min

1.3.6 扫描电镜观察

参照文献[17]的方法,在观察前,将 β -胡萝卜素双层乳液和凝胶微球冷冻干燥粉碎,然后表面喷金。用扫描电子显微镜观察样品的表现形貌。

1.3.7 红外光谱分析

参照文献[17]的方法,海藻酸钠、壳聚糖和冷冻干燥后的乳液凝胶微球研磨成粉末,红外光谱记录从 500 cm^{-1} 到 4 000 cm^{-1} ,每个光谱以 4 cm^{-1} 分辨率平均进行 64 次连续扫描。

1.3.8 包埋率测定

准确称取 1 mg β -胡萝卜素溶于 5 mL 正己烷,配置成 0.1 mg/mL 的 β -胡萝卜素母液,然后用正己烷分别稀释成一定浓度梯度的 β -胡萝卜素溶液,以正己烷为空白对照,于 450 nm 处测量吸光度,绘制得到标准曲线。

参照文献[18]并作修改,分别取 β -胡萝卜素双层乳液、 β -胡萝卜素三层乳液 1 mL 加入 4 mL 正己烷涡旋 1 min 后,5 000 r/min 离心 3 min,取上层液,以正己烷为空白对照,在 450 nm 处测定其吸光度 A_1 。将萃取后的脂质体悬浮液与 3 mL 乙醇混合,超声破乳 10 min 后,加入 4 mL 正己烷,5 000 r/min 离心 3 min,取上层液,以正己烷为空白对照,在 450 nm 处测定其吸光度 A_2 ,将 A_1 和 A_2 代入标准曲线分别计算游离 β -胡萝卜素含量和包埋 β -胡萝卜素含量。每个实验做 3 组平行, β -胡萝卜素包埋率计算公式为

$$E_m = \frac{B_i}{B_0 + B_i} \times 100\% \tag{4}$$

式中 B_0 ——游离 β -胡萝卜素质量浓度
 B_i ——包埋 β -胡萝卜素质量浓度

1.3.9 体外释放及释放动力学研究

参照文献[17]的方法并稍作修改。分别取 2.0 g 凝胶微球置于离心管中加入正己烷 30 mL。将离心管在 37℃ 下恒温水浴,每 30 min 对样品进行取样,每次取 0.1 mL 样品,然后将相同量正己烷立即加入离心管中,以保持总体积不变。取 0.1 mL 样品与 4.9 mL 正己烷混合,在 450 nm 处测定吸光度。

参照文献[19-20]的方法并稍作修改,零级动力学模型、一级动力学模型和基于 Fickian 扩散的 Higuchi 模型分别为

$$Q_t = Q_0 + K_0t \tag{5}$$

$$\lg Q_t = Q_0 + \frac{K_1}{2.303}$$

(6)

$$Q_t = Q_0 + K_H t^{1/2}$$

(7)

式中 Q_t ——时间 t 中释放的 β -胡萝卜素的累积量
 Q_0 ——溶液中 β -胡萝卜素的初始量
 K_0 ——零级释放常数
 K_1 ——一级释放常数
 K_H ——Higuchi 常数

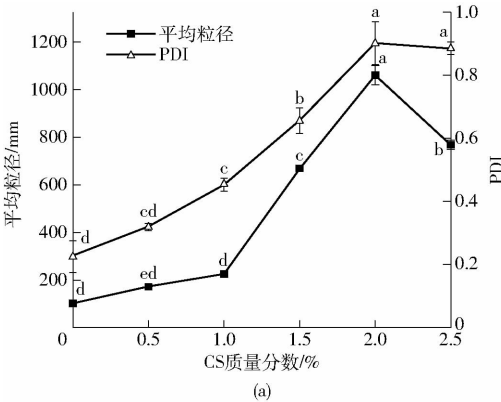
1.4 数据处理和分析

每组实验重复测定 3 次,用 Origin 2019 和 SPSS 20.0 软件进行实验数据的图表和数据分析。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖质量分数对双层乳液粒径、电位及聚集状态的影响

通过平均粒径、 ζ -电位、PDI(分散指数)及浊度表征双层乳液的聚集特征。如图 1a(图中相同图例、不



同字母表示差异显著,下同)所示,壳聚糖质量分数在 0.5%~2% 时,随着质量分数的升高,双层乳液的平均粒径及 PDI 都呈上升的趋势,且在 2.0% 时平均粒径最大,这可能是由于随着壳聚糖质量分数的增加,壳聚糖分子被吸附到多个乳液液滴表面而引起液滴聚集使粒径变大^[21-22],形成的双层乳液粒度分布不均,PDI 也变大。与此相反,壳聚糖质量分数在 2.5% 的平均粒径及 PDI 小于 2.0% 的双层乳液,结合图 1b 可知,这可能是由于壳聚糖将乳液液滴完全包裹,增加了液滴之间的空间排斥和静电排斥^[13],从而降低了双层乳液液滴的平均粒径。

如图 1b 所示,未添加壳聚糖的乳液表面呈电中性(-2.26 mV),这是由于在 pH 值为 5.0 时未加入壳聚糖的乳液接近大豆分离蛋白的等电点(pI 值为 4.5)。加入壳聚糖后,其表面带有正电荷,这可能是由于静电和疏水共同作用使壳聚糖吸附到乳液表面^[23]。双层乳液的表面电荷都呈正电荷,壳聚糖质

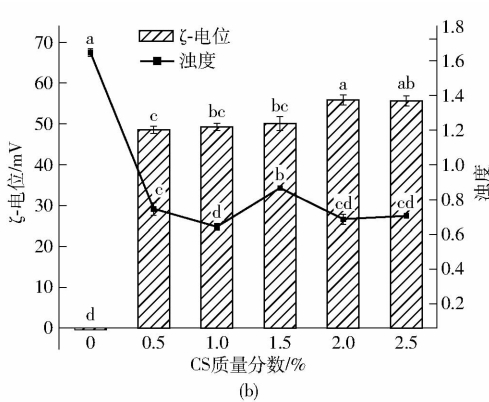


图 1 壳聚糖质量分数对双层乳液平均粒径、PDI、 ζ -电位以及浊度的影响

Fig. 1 Effect of mass fraction of chitosan on the secondary emulsion average particle size, PDI, ζ -potential and turbidity

量分数超过 2.0% 时双层乳液电位接近饱和且在 2.0% 时电位绝对值最大(56.21 mV)。双层乳液的浊度明显低于未加入壳聚糖乳液的浊度,这可能是由于 pH 值 5.0 时未添加壳聚糖的乳液为电中性,使其不稳定而导致浊度较大,加入的壳聚糖形成双层乳液,增强了液滴间的静电排斥作用,稳定性增强,使得双层乳液浊度下降^[24]。因此,在壳聚糖质量分数为 2.0% 时,乳液对壳聚糖的吸附效果最佳。

2.2 壳聚糖质量分数对双层乳液稳定性的影响

如图 2 所示,与未加壳聚糖的乳液相比,0.5%~2.0% 样品中乳化活性指数差异不显著($P>0.05$),加入壳聚糖后乳化活性指数降低,这可能是因为加入壳聚糖后促进了油滴分裂成更小的液滴,使乳化活性降低^[25]。在 2.0% 时乳化稳定性指数最大,当壳聚糖质量分数达到 2.5%,所形成的乳液出现分层现象,乳化稳定性指数最小,最不稳定。因此,在壳聚糖质量分数为 2.0% 时所形成的双层

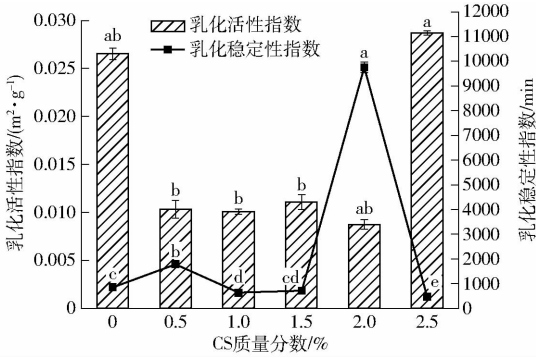


图 2 壳聚糖质量分数对乳液乳化活性及乳化稳定性的影响

Fig. 2 Effect of mass fraction of chitosan on emulsifying activity and emulsifying stability of emulsion

乳液稳定性最佳。原因可能是壳聚糖在较低质量分数时,会吸附在双层乳液液滴周围使乳化稳定性增加^[25]。随着壳聚糖质量分数增加,在乳液周围覆盖的壳聚糖分子趋于饱和^[13,26],存在于乳液体系中过

量的壳聚糖会破坏双层乳液的平衡,引起损耗絮凝,使双层乳液稳定性降低,这与文献[27]结果一致。

2.3 壳聚糖质量分数对界面蛋白吸附量及 β -胡萝卜素包埋率的影响

通过对界面蛋白吸附量和 β -胡萝卜素包埋率的测定,来表征壳聚糖对乳液的包埋情况。由图3可知,当壳聚糖质量分数低于1.5%时,双层乳液的界面蛋白吸附量随着壳聚糖质量分数的升高而增加;壳聚糖质量分数超过2.0%时,界面蛋白吸附量趋于稳定($P>0.05$)。这是由于随着壳聚糖质量分数升高,壳聚糖与乳液的静电相互作用逐渐达到饱和并趋于稳定^[28-29],壳聚糖分布在乳液周围并完全覆盖在乳液表面,因此界面蛋白吸附量先升高后平稳。

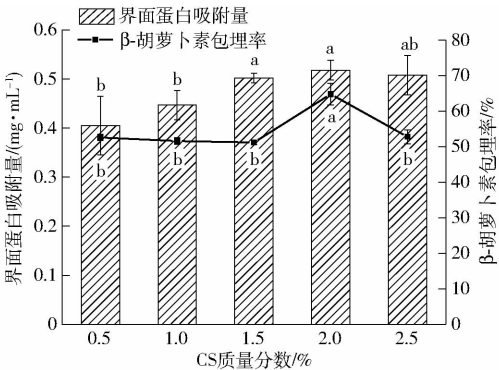
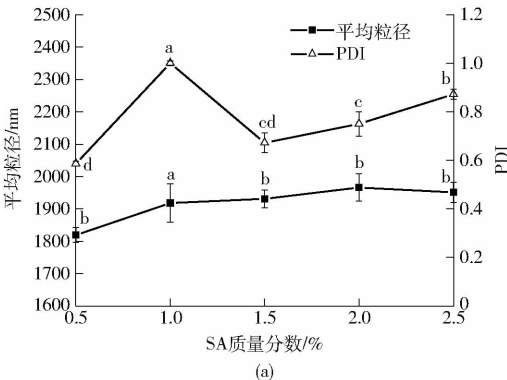


图3 壳聚糖质量分数对界面蛋白吸附量及包埋率的影响

Fig.3 Influence of mass fraction of chitosan on adsorption capacity and embedding rate of interfacial proteins

由图3可知,壳聚糖质量分数低于1.5%时, β -胡萝卜素包埋率无显著变化($P>0.05$),壳聚糖质量分数在1.5%~2.0%时,随着壳聚糖质量分数升高, β -胡萝卜素包埋率显著升高,这可能是随着壳聚糖质量分数的增加,乳液液滴逐渐被壳聚糖包裹,吸附在外侧的壳聚糖层逐渐变得紧密,对 β -胡萝卜素的包埋作用逐渐增强;当壳聚糖质量分数过高,过量的壳聚糖存在于乳液体系中会导致壳聚糖分子间的



聚解和解吸^[30],减弱对乳液的包封效果,因此壳聚糖质量分数达到2.5%时, β -胡萝卜素的包埋率降低。当壳聚糖质量分数为2.0%时,所获得的双层乳液对 β -胡萝卜素的包埋率最高,为 $(64.82 \pm 0.31)\%$ 。

2.4 海藻酸钠质量分数对三层乳液粒径、 ζ -电位及聚集状态的影响

在确定了形成双层乳液的最佳壳聚糖质量分数为2.0%后,向其中加入阴离子多糖海藻酸钠形成三层乳液,如图4a所示,随着海藻酸钠质量分数的增加,三层乳液的平均粒径增大并趋于稳定,且当海藻酸钠质量分数超过2.0%,平均粒径的降低无显著性差异($P>0.05$),原因可能是在静电相互作用下,带负电的海藻酸钠与带正电的双层乳液产生吸附且逐渐达到饱和,三层乳液的粒径变大并趋于稳定。与图1a相比,三层乳液的整体粒径大于双层乳液,这表明加入的海藻酸钠在一定程度上吸附在双层乳液上^[21],使其粒径增大。

如图4b所示,加入海藻酸钠形成的三层乳液表面带负电荷,这表明海藻酸钠吸附在双层乳液表面,使其表面电荷由正电变为负电。随着海藻酸钠质量分数的增加,三层乳液表面电荷呈现急速增加并趋于稳定,造成这一现象的原因可能是由于静电相互吸引,海藻酸钠快速地吸附在双层乳液表面^[31],海藻酸钠质量分数越高,形成的海藻酸钠吸附层越厚,其表面电荷越强;当覆盖在双层乳液表面的海藻酸钠达到饱和后,三层乳液之间的斥力增大就会造成絮凝^[32],使海藻酸钠层厚度降低,三层乳液粒径下降。当海藻酸钠质量分数为2.0%形成的三层乳液最佳。

2.5 海藻酸钠质量分数对 β -胡萝卜素包埋率的影响

通过对 β -胡萝卜素包埋率的测定,能更好地反映出海藻酸钠对双层乳液包覆性能。随着海藻酸钠质量分数增加, β -胡萝卜素的包埋率显著提高($P<0.05$)。当海藻酸钠的质量分数大于2.0%时, β -胡

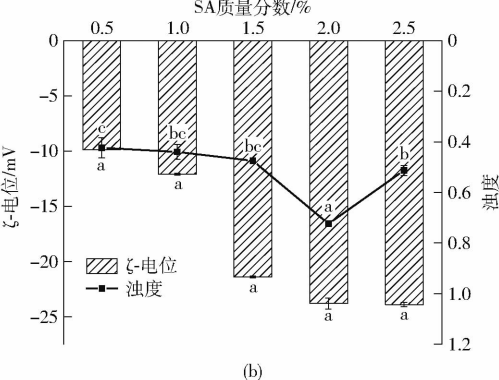


图4 海藻酸钠质量分数对三层乳液平均粒径、PDI、 ζ -电位及浊度的影响

Fig.4 Influence of mass fraction of sodium alginate on average particle size, PDI, ζ -potential and turbidity of tertiary emulsion

萝卜素的包埋率趋于稳定,且在海藻酸钠质量分数在 2.0% 时对 β -胡萝卜素的包埋率最高,为 $(86.75 \pm 2.00)\%$,这一现象表明海藻酸钠质量分数较低时,由于静电相互作用,海藻酸钠吸附在双层乳液表面,逐渐形成包覆层,三层乳液的粒径变大,且随着海藻酸钠质量分数的增加,海藻酸钠的包覆层逐渐紧密;当海藻酸钠质量分数超过一定值时,双层乳液表面电荷被海藻酸钠中和^[13],进而阻止了多余的海藻酸钠吸附在上面,因此对 β -胡萝卜素的包埋率趋于稳定。

2.6 红外光谱分析

以粒径、 ζ -电位、 β -胡萝卜素包埋率等指标筛选出海藻酸钠质量分数范围为 1.5% ~ 2.5%,并将制备的三层乳液滴入质量分数为 5.0% 的 CaCl_2 溶液形成凝胶微球,用红外光谱测定了海藻酸钠、壳聚糖及凝胶微球的吸收峰,进一步研究了海藻酸钠和壳聚糖之间的相互作用(图 5)。在海藻酸钠(SA)的红外光谱图中,3 417.56 cm^{-1} 是 O—H 键的拉伸振动,在 2 925.49 cm^{-1} 和 2 849.32 cm^{-1} 处,是脂肪族 C—H 的拉伸振动的结果^[33]。在 1 416.98 cm^{-1} 和 1 030.78 cm^{-1} 处观测到的峰分别是 COO—的对称拉伸振动、C—O 的伸缩振动^[34]。

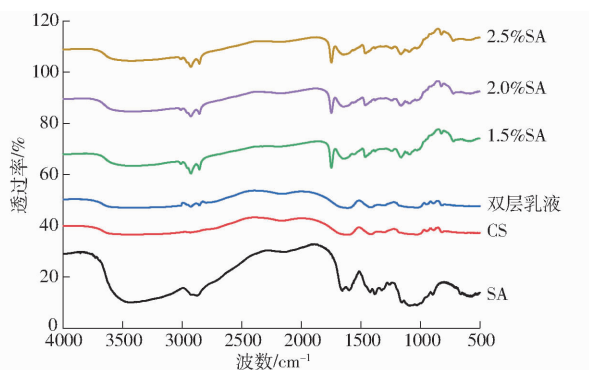


图 5 凝胶微球红外光谱图

Fig. 5 FTIR of gel microspheres

在壳聚糖(CS)红外光谱图中,3 423.42 cm^{-1} 处峰值是由于—OH 的拉伸振动。在 1 654.42 cm^{-1} 处吸收带属于二次酰胺(酰胺 I 带)的羰基(C=O)伸缩振动。在 1 597.68 cm^{-1} 处弯曲引起的吸收峰为 N—H(酰胺 II 带)渗透情况^[35]。在 1 420.37 cm^{-1} 和 1 382.16 cm^{-1} 处的峰分别表示酰胺的 N—H 伸缩振动^[34]。1 258.15 cm^{-1} 和 1 064 cm^{-1} 表示 C—O 伸缩振动,是壳聚糖中常见的结构^[36-37]。

双层乳液中具有壳聚糖常见的结构(1 258.5 cm^{-1} 和 1 064 cm^{-1})。在 2 926 cm^{-1} 和 2 855 cm^{-1} 处出现新的吸收峰是 β -胡萝卜素—CH₂ 振动引起的。这表明 β -胡萝卜素存在于双层乳液中。当乳液凝胶微球形成时,光谱中的峰变化显著,壳聚糖在

1 597.68 cm^{-1} 处的吸收峰消失,这可能是由乳液表面负电荷与壳聚糖—NH³⁺ 发生静电相互作用引起的,表明壳聚糖吸附在乳液表面。壳聚糖的 O—H 和 N—H 在 3 423.42 cm^{-1} 处的拉伸振动向 3 420.15 cm^{-1} 轻微移动,海藻酸钠的羧基峰从 1 609.02 cm^{-1} 移至 1 640.76 cm^{-1} ,变得更强,这表明海藻酸钠与壳聚糖之间发生了聚电解质络合反应^[38]。2 926 cm^{-1} 和 2 855 cm^{-1} 这两处吸收峰是 β -胡萝卜素内部疏水性基团 CH₂ 的振动引起的,两处峰未发生明显变化,这表明凝胶微球的形成并未对 β -胡萝卜素结构性质产生影响。

2.7 乳液凝胶微球表观形貌观察

如图 6 所示,干燥的凝胶微球呈球形或近球形(图 6a),在扫描电镜下观察,冻干的乳液凝胶微球皱缩(图 6b),随海藻酸钠质量分数的增加无明显的变化。对凝胶微球表面观察发现,双层乳液表面结构松散(图 6c),海藻酸钠质量分数为 1.5% 时,凝胶微球表面不平整(图 6d),随着海藻酸钠质量分数的增加,凝胶微球结构变得紧实且表面趋向平滑(图 6e,6f),这表明随着海藻酸钠质量分数的增加,凝胶微球的结构变得更加紧密,对 β -胡萝卜素能够实现更好的包封。

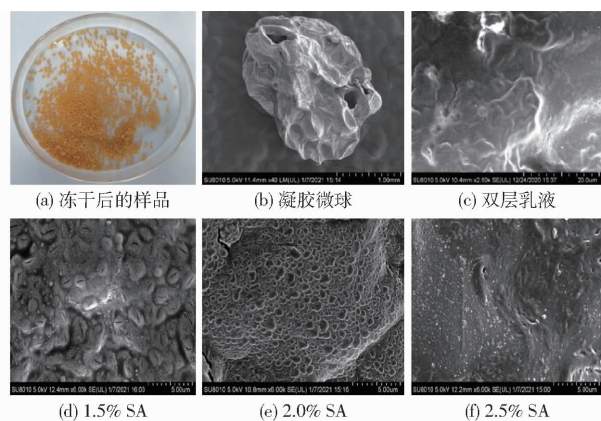


图 6 乳液及凝胶微球的形貌

Fig. 6 Images of the secondary emulsion and morphology of gel microspheres

2.8 β -胡萝卜素乳液凝胶微球的体外释放

以海藻酸钠质量分数为 1.5%、2.0%、2.5% 形成的三层乳液制备乳液凝胶微球为对象,研究其在模拟介质中的积累释放情况。由图 7 可知,在 30 ~ 60 min,不同质量分数的海藻酸钠对 β -胡萝卜素释放方面的影响并无显著性差异($P > 0.05$),在 1 ~ 2 h 内 β -胡萝卜素均呈爆发性释放,释放出 75% 左右的 β -胡萝卜素,这可能是由于凝胶微球在初始阶段开始溶胀,导致 β -胡萝卜素在初始阶段释放率较高,文献[39]的体外释放实验同样观察到凝胶微球在最初阶段呈爆炸式释放。在 3 h 后 β -胡萝卜素释

放率降低且三者都进入缓慢和持续性释放阶段;结果表明,运载 β -胡萝卜素凝胶微球具有良好的缓释效果。

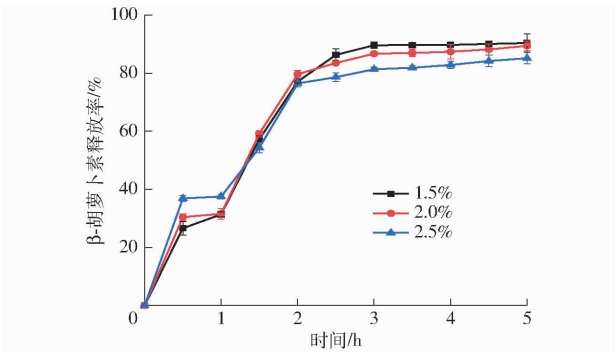


图 7 海藻酸钠质量分数对 β -胡萝卜素体外释放率的影响
Fig. 7 Effect of mass fraction of sodium alginate on release of β -carotene in vitro

表 1 从零级、一级和 Higuchi 动力学模型^[19-20]中确定 β -胡萝卜素的释放动力学参数。基于 Fickian 扩散机制的 Higuchi 模型是最合适来表示 β -

表 1 释放动力学模型
Tab. 1 Release kinetics model

海藻酸钠质 量分数/%	零级动力学模型		一级动力学模型		Higuchi 模型	
	R^2	K_0	R^2	K_1	R^2	K_H
1.5	0.790	17.432	0.503	0.575	0.914	46.095
2.0	0.772	16.517	0.480	0.557	0.911	44.081
2.5	0.764	14.751	0.441	0.524	0.924	39.866

胡萝卜素从凝胶微球的释放行为的模型,该模型的决
定系数 R^2 高于其他动力学模型,结果表明 β -胡萝
卜素在凝胶微球中的释放主要受自身扩散行为的影响。

3 结论

(1)加入壳聚糖形成的双层乳液的平均粒径显
著增大,电位变为正值,壳聚糖与乳液相互吸附。当
壳聚糖质量分数为 2.0% 时,双层乳液的乳化活性
及乳化稳定性最佳, β -胡萝卜素的包埋率最高,为
(64.82 $\pm$ 0.31)% ;加入海藻酸钠形成的三层乳液
平均粒径明显增大,表面电位变为负值,当海藻酸钠
质量分数为 2.0% 形成的三层乳液对 β -胡萝卜素的
包埋率显著提高,为(86.75 $\pm$ 2.00)% 。

(2)制备得到的 β -胡萝卜素凝胶微球组间存在
静电相互作用。随着海藻酸钠质量分数的增大,
凝胶微球变得致密,体外释放实验表明, β -胡萝卜
素从凝胶微球释放行为遵循 Fickian 扩散机制的
Higuchi 模型,在 3 h 后进入缓慢和持续性释放阶
段, β -胡萝卜素凝胶微球运载体系具有很好的包封
和缓释效果。

(3)由壳聚糖、海藻酸钠、乳液构建的凝胶微球
可实现对 β -胡萝卜素更好的包埋及缓释。凝胶微
球在生物活性物质运载及缓释领域具有广阔的应用
前景。

参 考 文 献

[1] JIANG Y, YUE L, FANG Z, et al. The physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35(3): 19-27.

[2] JULIAN M C D, PRESS C. Nanoparticle- and microparticle-based delivery systems: encapsulation, protection and release of active compounds [J]. Journal of Alloys & Compounds, 2014, 261(Supp. 1-2): 54-61.

[3] YOUN S H, WHA M T, JUN C S. Storage stability of β -carotene in model beverage emulsions: implication of interfacial thickness [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2018, 120(9): 1800127.

[4] GÓMEZ-MASCARAQUE L G, PEREZ-MASIÁ R, GONZÁLEZ-BARRIO R, et al. Potential of microencapsulation through emulsion-electrospraying to improve the bioaccessibility of β -carotene [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 73(8): 1-12.

[5] YAN C, MCCLEMENTS D J, ZOU L, et al. A stable high internal phase emulsion fabricated with OSA-modified starch: an improvement in β -carotene stability and bioaccessibility [J]. Food & Function, 2019, 10(9): 5446-5460.

[6] WANG D, LV P, ZHANG L, et al. Enhanced physicochemical stability of β -carotene emulsions stabilized by β -lactoglobulin-ferulic acid-chitosan ternary conjugate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(31): 8404-8412.

[7] WEI Z, GAO Y. Physicochemical properties of β -carotene emulsions stabilized by chitosan-chlorogenic acid complexes [J]. LWT—Food Science and Technology, 2016, 71(2): 295-301.

[8] KOMOTO D, FURUIKE T, TAMURA H, et al. Preparation of polyelectrolyte complex gel of sodium alginate with chitosan using basic solution of chitosan [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126(1): 54-59.

[9] XIAO C, SUN F. Fabrication of distilled water-soluble chitosan/alginate functional multilayer composite microspheres [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(2): 1366-1370.

[10] LIU H, LIU F, MA Y, et al. Versatile preparation of spherically and mechanically controllable liquid-core-shell alginate-based bead through interfacial gelation [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 236: 115980.

[11] BAJPAI S K, TANKHIWALE R. Investigation of dynamic release of vitamin B2 from calcium alginate/chitosan multilayered beads: part II [J]. Reactive & Functional Polymers, 2006, 66(12): 1565-1574.

[12] MA D, HUANG Q, WU Y, et al. Encapsulation of emulsions by a novel delivery system of fluid core-hard shell biopolymer particles to retard lipid oxidation[J]. Food & Function, 2020, 11(7): 5788-5798.

[13] 郭增旺, 郭亚男, 李柏良, 等. 高压均质条件下大豆蛋白热聚集体结构和乳化特性研究 [J/OL]. 农业机械学报, 2021, 52(4): 351-358,374.

GUO Zengwang, GUO Ya'nan, LI Bailiang, et al. Effects of high-pressure homogenization on structural and emulsifying properties of soybean protein thermal aggregates [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,

- 2021, 52(4): 351–358, 374. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20210438&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2021.04.038. (in Chinese)
- [14] 李超. 紫苏蛋白 O/W 乳状液的物化特性及稳定性研究 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2018: 25
LI Chao. Physicochemical properties and stability of perilla protein O/W emulsion [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2018: 25. (in Chinese)
- [15] KRUGER N J. The Bradford method for protein quantitation [M]//WALKER T M. The protein protocols handbook. Totowa: Humana Press, 2009: 15–21.
- [16] HANG Q T, TU Z C, XIAO H, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate [J]. Food & Bioproducts Processing, 2014, 92(1): 30–37.
- [17] JI M, SUN X, GUO X, et al. Green synthesis, characterization and in vitro release of cinnamaldehyde/ sodium alginate/ chitosan nanoparticles [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90(9): 515–522.
- [18] 刘欣, 罗志刚, 李小林. 海藻酸钠-壳聚糖表面修饰维生素 C/ β -胡萝卜素复合脂质体的制备 [J]. 现代食品科技, 2020, 36(11): 163–169.
LIU Xin, LUO Zhigang, LI Xiaolin. Preparation of vitamin C/ β -carotene composite liposomes with their surfaces modified by sodium alginate–chitosan [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(11): 163–169. (in Chinese)
- [19] AKYUZ L, SARGIN I, KAYA M, et al. A new pollen-derived microcarrier for pantoprazole delivery [J]. Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications, 2017, 71: 937–942.
- [20] ANSARIFAR E, MOHEBBI M, SHAHI D F, et al. Novel multilayer microcapsules based on soy protein isolate fibrils and high methoxyl pectin: production, characterization and release modeling [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 97: 761–769.
- [21] OGAWA S, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(11): 3595–3600.
- [22] PINOTTI A, BEVILACQUA A, ZARITZKY N. Treatment of anionic emulsion systems using chitosan, polyacrylamide, and aluminum sulfate [J]. Scanning, 1999, 21(5): 354–358.
- [23] 崔健, 酆金龙, 刘欢, 等. 乳清分离蛋白-多糖乳状液制备与乳化稳定性研究 [J]. 农业机械学报, 2011, 42(9): 133–137.
CUI Jian, LI Jinlong, LIU Huan, et al. Effects of anthocyanins on the secondary structure of soybean protein isolate by multiplex spectroscopy [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011, 42(9): 133–137. (in Chinese)
- [24] ROY J C, SALAÜN F, GIRAUD S, et al. Surface behavior and bulk properties of aqueous chitosan and type-B gelatin solutions for effective emulsion formulation [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 173(13): 202–214.
- [25] KLINKESORN U. The role of chitosan in emulsion formation and stabilization [J]. Food Reviews International, 2013, 29(4): 371–393.
- [26] NPA B, MC C, UK A. Utilization of multilayer-technology to enhance encapsulation efficiency and osmotic gradient tolerance of iron-loaded W1/O/W2 emulsions: saponin-chitosan coatings [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 112: 106334.
- [27] 李进伟, 林传舟, 刘元法. 制备亚麻籽油多层乳液及其稳定性研究 [J]. 食品科学, 2016, 37(11): 1–6.
LI Jinwei, LIN Chuazhou, LIU Yuanfa. Preparation and stability of multilayer emulsions of linseed oil by electrostatic layer-by-layer deposition [J]. Food Science, 2016, 37(11): 1–6. (in Chinese)
- [28] CHUAH A M, KUROIWA T, KOBAYASHI I, et al. Effect of chitosan on the stability and properties of modified lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(3): 600–610.
- [29] HU M, LI Y, DECKER E A, et al. Influence of tripolyphosphate cross-linking on the physical stability and lipase digestibility of chitosan-coated lipid droplets [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(2): 1283–1289.
- [30] 柳艳梅. 基于 OSA 变性淀粉-壳聚糖双层乳液制备及在 β -胡萝卜素微胶囊中应用 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2017.
LIU Yanmei. Based on OSA modified starch and chitosan conjugates and its application in the formation of β -carotene microcapsule [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2017. (in Chinese)
- [31] ZHANG Z, ZHANG R, ZOU L, et al. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 58(2): 308–315.
- [32] GUZEY D, MCCLEMENTS D J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry-science direct [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2006, 128: 227–248.
- [33] DAEMI H, BARIKANI M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles [J]. Scientia Iranica, 2012, 19(6): 2023–2028.
- [34] ATARIAN M, RAJAEI A, TABATABAEI M, et al. Formulation of pickering sunflower oil-in-water emulsion stabilized by chitosan-stearic acid nanogel and studying its oxidative stability [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 210(9): 47–55.
- [35] LI P, DAI Y N, ZHANG J P, et al. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine [J]. International Journal of Biomedical Science, 2008, 4(3): 221–228.
- [36] GUO P, ANDERSON J D, BOZELL J J, et al. The effect of solvent composition on grafting gallic acid onto chitosan via carbodiimide [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 140: 171–180.
- [37] PENG H, XIONG H, LI J, et al. Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol [J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 23–28.
- [38] RAHAIEE S, SHOJAOSADATI S A, HASHEMI M, et al. Improvement of crocin stability by biodegradable nanoparticles of chitosan-alginate [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 423–432.
- [39] KHAJURIA D K, VASIREDDI R, PRIYDARSHI M K, et al. Ionic diffusion and drug release behavior of coreshell-functionalized alginatchitosan-based hydrogel [J]. ACS Omega, 2019, 5(1): 758–765.