孙婕, 杨卓凡, 尹国友, 等. 乳清分离蛋白-大豆油体乳液递送植物甾醇体系构建及其体外模拟消化特性 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(5): 71−79. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010068

SUN Jie, YANG Zhuofan, YIN Guoyou, et al. Construction of Whey Protein Isolate-Soybean Oil Body Emulsion for Phytosterol Delivery and Its *in Vitro* Digestibility Characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(5): 71−79. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010068

· 研究与探讨 ·

乳清分离蛋白-大豆油体乳液递送植物甾醇体系构建及其体外模拟消化特性

孙　婕, 杨卓凡, 尹国友*, 刘亦菲, 张莹莹

（河南城建学院生命科学与工程学院, 河南平顶山 467036）

摘　要: 为了提高植物甾醇生物利用率，探讨大豆油体在疏水性生物活性物质递送系统中的作用，本研究以乳清分离蛋白（Whey protein isolate，WPI）和大豆油体（Soybean oil bodies，SOBs）作为界面颗粒，制备乳清分离蛋白-大豆油体乳液（Whey protein isolate-soybean oil body emulsion，WOE）递送植物甾醇。考察不同 pH 和盐离子浓度对 WOE 粒径、电位和流变特性的影响，以及 WOE 在模拟消化过程中微观结构的变化、游离脂肪酸释放率和植物甾醇生物利用率。结果表明：WOE 是由 WPI 和大豆油体吸附在油水界面形成的水包油乳液。在 pH 为 4 时，WOE 电位接近于 0，表明 WOE 的等电点接近 4，且 WOE 在碱性条件下更稳定。流变学结果表明，WOE 在不同 pH 和 NaCl 条件下，均呈现非牛顿流体性质，在频率 0.1~100 Hz 时，G'均大于 G"，WOE 具有弹性为主的凝胶性质。在体外模拟消化阶段，随着消化时间的延长，WOE 中的大脂滴数量逐渐减少。在模拟肠液消化过程中，胰酶降解乳液液滴内脂肪并释放出游离脂肪酸，WOE 的脂肪滴尺寸由 16.85 μm 逐渐减小至 7.25 μm，90 min 以内游离脂肪酸释放量达 75.45 μmol/mL，植物甾醇生物利用率持续增加至 72.23%，高于纯大豆油组游离脂肪酸释放量（38.45 μmol/mL）和植物甾醇生物利用率（48.08%），说明 WOE 具有良好的消化特性，并且提高了植物甾醇生物利用率。本研究可以为疏水性生物活性物质递送系统提供理论参考，同时为新型乳液体系在食品、膳食补充剂和药物输送中的应用提供依据。

关键词: 乳液, 大豆油体, 乳清分离蛋白, 植物甾醇, 体外消化

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)05−0071−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010068

本文网刊:

Construction of Whey Protein Isolate-Soybean Oil Body Emulsion for Phytosterol Delivery and Its *in Vitro* Digestibility Characteristics

SUN Jie, YANG Zhuofan, YIN Guoyou*, LIU Yifei, ZHANG Yingying

（College of Life Science and Engineering, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467036, China）

Abstract: To enhance the bioavailability of phytosterols and investigate the role of soybean oil bodies in hydrophobic bioactive compound delivery systems, this study utilized whey protein isolate (WPI) and soybean oil bodies (SOBs) as interfacial particles to prepare whey protein isolate-soybean oil body emulsions (WOE) for phytosterol delivery. The effects of varying pH and ionic concentrations on the particle size, Zeta potential, and rheological properties of WOE were investigated systematically, as well as the changes in microstructure, free fatty acid release rate, and phytosterol bioavailability of WOE during the simulated digestion process. The results demonstrated that WOE was an oil-in-water emulsion formed by adsorption of WPI and SOBs at the oil-water interface. At pH4, the Zeta potential of WOE approached 0, indicating that the isoelectric point of WOE was close to 4. WOE exhibited greater stability under alkaline conditions.

收稿日期: 2025−01−09

基金项目: 河南省重点研发与推广专项（科技攻关）项目（232102110087）; 平顶山市科技创新杰出人才计划项目（2017010（10.4））; 河南省高等学校重点科研项目资助计划项目（25B550022）。

作者简介: 孙婕（1976−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: jiesunvip2019@outlook.com。

*** 通信作者:** 尹国友（1976−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 30110605@huuc.edu.cn。

The rheological results showed that WOE exhibited non-Newtonian fluid properties at different pH and NaCl conditions, and G' was larger than G" at frequencies from 0.1 to 100 Hz, and WOE had an elastic-dominated gel property. During the simulated digestion phase *in vitro*, the number of large lipid droplets in the WOE gradually decreased as the digestion time increased. During the simulated intestinal fluid digestion, trypsin degraded the fat within the emulsion droplets and released free fatty acids, and the fat droplet size of WOE gradually decreased from 16.85 μm to 7.25 μm, and the release of free fatty acids reached 75.45 μmol/mL in less than 90 min, and the phytosterol bioavailability consistently increased to 72.23%, which was higher than that of free fatty acid release (38.45 μmol/mL) and phytosterol bioavailability (48.08%) in the pure soybean oil group, indicating that WOE had good digestive properties and improved phytosterol bioavailability. This study provides a theoretical reference for hydrophobic bioactivities delivery systems, as well as a basis for the application of novel emulsion systems in food, dietary supplements and drug delivery.

Key words: emulsion; soybean oil bodies (SOBs); whey protein isolate (WPI); phytosterol; *in vitro* digestion

植物甾醇(Phytosterols, PS)是一种具有多种生理功能的天然活性物质,有降低血清胆固醇水平[1]、减轻中枢神经系统紊乱[2]、抗炎[3]、抗癌[4] 和抗氧化[5]的作用。然而 PS 的水溶性差、结晶度高,容易氧化,导致其生物利用度低[6],因此,PS 在食品中的应用面临挑战。有研究表明,可通过将溶解性较差的物质封装在乳液中提高其水溶性和稳定性。如 Yang 等[7]采用三种乳化剂制备水包油型乳液稳定 PS,结果表明,高分子量乳化剂(蛋白质及其混合物)稳定的乳液中 PS 光氧化稳定性最强。水包油型乳液体系主要通过乳化剂和高速剪切、超声处理、高压均质等方法实现油相和水相的均化[8]。乳液油相可以提高疏水性活性组分的溶解度,因此可将疏水活性物质封装于乳液体系中进行递送,以此来提高活性组分的生物可及性。然而,乳液体系在加工贮藏过程中会出现分层、破乳等现象[8−9]。目前,已有研究将蛋白质、多糖、脂质等天然颗粒用于稳定乳液体系,以期提高乳液的分散稳定性。如 Münch 等[10] 使用豌豆蛋白和向日葵磷脂酰胆碱复合制备水包油乳液,与单独豌豆蛋白稳定乳液相比,复合乳液的整体氧化稳定性更高,这些研究为蛋白质-脂质复合颗粒稳定乳液体系潜在应用提供了新的研究思路。

乳清分离蛋白(Whey protein isolate, WPI)具有良好的乳化性,对乳液有较好的稳定作用[11]。此外,WPI 的营养价值高,易被人体吸收,被广泛用作食品工业中的功能性成分。然而,由于蛋白本身的环境敏感性,蛋白质颗粒易受 pH、盐离子浓度、温度等因素的影响导致乳液失稳,限制了其在食品工业中的应用[12]。已有研究表明,可以将 WPI 与多糖、蛋白质、脂质相互作用,构建复合体系,改善其功能特性[13−14]。油体是植物种子细胞中贮存脂质的细胞器,内部为疏水性甘油三酯(TAGs),表面被磷脂-蛋白质组成的生物膜覆盖[15]。当油体分散在水中,能快速扩散至气-水界面,油体蛋白、磷脂、甘油三酯迅速吸附组装,从而具有较高的界面压[16]。同时,油体形成的乳液液滴带有大量磷酸基团提供负电荷,从而增大液滴间的静电斥力,避免液滴聚集失稳。而且油体特殊的组成和结构赋予其良好的乳化特性和包埋特性,可作为乳液稳定剂和疏水性功能因子传递系统[17]。现有研究多聚焦于单一蛋白或油体稳定体系,而对乳清分离蛋白-大豆油体复合颗粒稳定乳液及负载递送 PS 的研究尚未深入,本研究利用 WPI 与大豆油体复合,通过两者等电点相近的特性构建乳液体系,以克服单一蛋白的环境敏感性缺陷,同时发挥油体天然界面活性和生物相容性优势,为 PS 的高效负载与递送提供新策略。

本研究尝试利用乳清分离蛋白和大豆油体作为复合颗粒稳定乳液体系递送植物甾醇,探讨乳清分离蛋白-大豆油体乳液(Whey protein isolate-soybean oil body emulsion, WOE)在不同 pH 和盐浓度条件下粒径、电位的变化,流变学特性,以及体外模拟消化阶段,脂肪滴的絮凝和微观结构变化,小肠内脂肪的分解和植物甾醇的生物利用率。旨在阐明复合颗粒的稳定机制及其对 PS 保护效果的影响,为开发新型功能性食品载体提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆、大豆油　平顶山德信泉超市;乳清蛋白　美国 Davisco 公司;植物甾醇(≥95%)　西安海斯夫生物科技有限公司;SDS-PAGE 试剂盒　上海生工生物工程技术服务有限公司;胃蛋白酶(3000 U/mg)、胰酶(130 U/mg)、胆盐　上海麦克林生化科技股份有限公司;尼罗蓝　西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;尼罗红　上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其他试剂均为分析纯。

DS-1 高速组织捣碎机　上海精科实业有限公司;GL-10MD 大容量高速冷冻离心机　湖南湘仪有限公司;T25 高速分散机　艾卡(广州)仪器设备有限公司;JZH50-80 高压均质机　上海锦竹机械设备有限公司;Zetasizer Nano ZS 激光纳米粒度仪　英国马尔文仪器有限公司;HAAKE-MARS 60 流变仪　德国 Thermo 公司;TCS SP8 激光共聚焦显微镜　德国 Leica 公司;Mini-PROTEAN Tetra cell 电泳仪　美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆油体的制备　根据 Wang 等[18] 的方法,

略有改动。将 20 g 大豆放入 100 mL 蒸馏水中浸泡 10~12 h。然后按照 1∶3 的比例(w/v)，将溶胀好的大豆和蒸馏水放在高速组织捣碎机中磨浆，磨浆后用三层滤布过滤进行浆渣分离。过滤后的豆浆与蔗糖按照 1∶4 的比例(v/w)放入高速冷冻离心机内，在 8500 r/min 下离心(4 ℃，30 min)。再用三层滤布过滤，即得到大豆油体。然后在 75 ℃ 条件下灭菌 30 min 后放置 4 ℃ 冰箱储存，备用。

1.2.2　乳清分离蛋白-大豆油体乳液(WOE)的制备　WOE 的制备[19] 主要包括以下步骤：

油相制备：室温下将 0.06 g 植物甾醇溶于 100 mL 大豆油(w/v)中，超声处理 30 min(100 W，50 ℃)，待植物甾醇完全溶解制得乳液油相。

水相制备：取 5 g 大豆油体分散在 100 g 蒸馏水中，高速分散机 12000 r/min 处理 5 min，制得大豆油体乳液。取 1 g WPI 分散在 100 g 蒸馏水中，搅拌 0.5 h，然后按照 1∶1 的比例(v/v)加入到大豆油体乳液中，高速分散机 12000 r/min 处理 5 min，制得乳液水相。

WOE 的制备：将上述油相与水相以 1∶1 的比例(v/v)混合，高速分散机 12000 r/min 处理 20 min 后 20 MPa 下均质 1 次制得 WOE 乳液。

1.2.3　pH 对 WOE 稳定性的影响　参考 Zhou 等[20] 的方法并稍作修改。用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 溶液调节 WOE pH 分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0。将 0.1 mL WOE 与 1 mL 去离子水混合后超声处理(100 W，10 min)，然后将分散均匀的样品放入粒度分析仪中。设置参数：温度 25 ℃，分散相为水(折射率 1.33)。测定不同 pH 条件下 WOE 粒径、Zeta 电位。

1.2.4　盐离子浓度对 WOE 稳定性的影响　用 NaCl 溶液调节 WOE 盐离子浓度分别为 0、100、200、300、400、500 mmol/L，测定不同盐离子浓度条件下 WOE 粒径、Zeta 电位。方法同 1.2.3。

1.2.5　pH、盐离子浓度对 WOE 流变特性的影响　将 1 mL WOE 置于平板(直径 35 mm)之间，平衡后保持恒温 25 ℃，剪切速率为 1~100 s^{-1}，记录黏度随剪切速率的变化。在 0.1~100 Hz 的范围内进行频率扫描，以获得储能模量(G')和损耗模量(G")。测定不同 pH 和不同盐离子浓度条件下 WOE 流变特性。

1.2.6　WOE 体外模拟胃肠道消化

1.2.6.1　模拟胃液消化体系(Simulated gastric fluid，SGF)　首先配制 10 g/L 胃蛋白酶溶液，加 0.1 mol/L HCl 溶液调节 pH 至 3.0，再加入 2.0 g NaCl 使其全溶，制得模拟胃液[21]。将 100 mL 模拟胃液以 1.1 mL/min 的速度加入到 100 mL WOE 中，振荡，胃消化过程持续 1.5 h。

1.2.6.2　模拟肠液消化体系(Simulated intestinal fluid，SIF)　取 6.8 g KH_2PO_4，加入 500 mL 蒸馏水，调节 pH 至 6.8；另取胰酶 10 g，加水溶解，将两液混合后，加水稀释至 1000 mL，充分溶解后，制得模拟肠液。取 250 mg 猪胆盐，加入 40 mL 蒸馏水，室温搅拌至溶解制得胆盐溶液。用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节上述胃消化 1.5 h 后乳液的 pH 至 6.8。取 160 mL 模拟肠液和 40 mL 胆盐溶液混合后加入到上述胃消化 1.5 h 后的 WOE 中，肠消化过程持续 1.5 h[22]。

1.2.7　消化过程中 WOE 的 SDS-PAGE 分析　参考 Nikiforidis 等[23] 的方法。取 1.25 mL 1 mol/L Tris-HCl、0.5 g SDS、25 mg 溴酚蓝、2.5 mL 甘油，去离子水溶解后定容至 5 mL，加入 25 μL β-巯基乙醇，搅拌均匀，制得上样缓冲液。取各消化阶段 WOE 与 Tris 缓冲液以 1∶5 的比例(v/v)混合，室温孵育 1 h，混合溶液再与上样缓冲液以 1∶1 比例(v/v)充分混匀，100 ℃ 水浴加热 5 min 后冷却，−20 ℃ 冻融处理 30 min，室温解冻，重复冻融操作 1 次，然后离心(12000 r/min，5 min)回收含有蛋白质的部分，上样。电泳条件：浓缩胶浓度为 5%，分离胶浓度为 12%，上样量为 20 μL。采用考马斯亮蓝 G-250 染色 30 min，脱色，凝胶成像仪对蛋白条带拍照。

1.2.8　消化过程中 WOE 的微观形态观察　使用激光共聚焦显微镜观察乳液液滴的界面微观结构。将 1 mg 尼罗红和 1 mg 尼罗蓝染料溶于 1 mL 纯丙酮溶液中，取 1 mL 各消化阶段 WOE 和 20 μL 混合染料在涡旋振荡器上充分混合后黑暗中保存 10 min，然后将样品置于载玻片上，盖上盖玻片，设置激发波长为 488 nm 和 638 nm。

1.2.9　消化过程中 WOE 的粒径和电位测定　取 0.1 mL WOE 消化液与 1 mL 去离子水混合后超声处理(100 W，10 min)，测定 WOE 消化液粒径和 Zeta 电位。方法同 1.2.3。

1.2.10　消化过程中植物甾醇的生物利用率　参考 Yang 等[24] 的方法。将新制备的 WOE 用无水乙醇稀释 10 倍后与磷硫铁显色剂反应 15 min，然后在 520 nm 波长下测定植物甾醇的含量，记为 C_0。取不同消化阶段的消化液，离心 30 min(15000 r/min，4 ℃)，上层为消化液的上清液，中间层为胶束部分，下层为乳液消化残留物。取 10 mL 中间层胶束部分离心 15 min(15000 r/min，4 ℃)，得到胶束部分的上清液。取胶束部分上清液用无水乙醇稀释 10 倍后与磷硫铁显色剂反应 15 min，然后在 520 nm 波长下测定植物甾醇的含量，记为 $C_{micelle}$。植物甾醇的生物利用率计算公式如式(1)所示：

$$生物利用率(\%) = \frac{C_{micelle}}{C_0} \times 100 \qquad 式（1）$$

1.2.11　消化过程中游离脂肪酸的释放率　在肠道消化期间采用 pH-stat 法，肠道消化混合物(Intestinal digestion mixture，IDM)的 pH 保持在 7.5，连续滴加 0.25 mol/L NaOH 溶液 1.5 h。根据式(2)计算每毫升 IDM 释放的游离脂肪酸(Free fatty acids，FFA)浓

度，计算时需考虑 NaOH 溶液的消耗量。

$$FFA(\mu mol/mL)=\frac{V_{NaOH}(t)\times C_{NaOH}}{V_{IDM}} \quad 式（2）$$

式中，$V_{NaOH}(t)$和 V_{IDM} 分别表示消化时间 t 时 NaOH 溶液的消耗量和 IDM 的体积；C_{NaOH} 表示 NaOH 溶液的摩尔浓度。

1.3 数据处理

实验数据以平均值±标准差表示，每个实验重复三次。采用 SPSS 27.0 进行数据处理，ANOVA 分析数据差异显著性（P<0.05），Origin2021 软件绘图，Image J v1.8.0 计算显微图片中乳滴的尺寸。

2 结果与分析

2.1 pH、盐离子强度对 WOE 稳定性的影响

WOE 所处水相的 pH 对乳液的稳定性十分重要。当水相 pH 逐渐接近 WOE 乳液的等电点（Isoelectric point, PI），WPI 和大豆油体颗粒之间的静电排斥作用减弱，通过疏水相互作用形成更大的聚集颗粒，乳液更容易发生絮凝[25]。如图 1A 所示，随着 pH 的增加，WOE 平均粒径呈现先增加后降低的趋势。当 WOE pH 为 4 时，表面电荷几乎为 0，接近 WPI 与大豆油体等电点，因此 WOE 等电点接近 4，此时电荷排斥力小，乳液液滴聚集，WOE 的粒径显著增加，乳液不稳定[26]。当 WOE 所处的水相 pH 为 2 和 6~10 时，远离 WOE 的 pI，液滴表面重新带有电荷，静电斥力增强，乳液粒径显著降低（P<0.05）。且当 pH 为 6 时，WOE 的粒度结果显示为单峰（图 1C），此时电荷分布适中，存在一定的静电斥力防止聚集，且不会因电荷过多导致体系不稳定。蛋白质表面电位受其氨基酸所带电荷正负性和电荷量的影响，进而影响 WOE 的 Zeta 电位[27]。同时，静电斥力对蛋白质颗粒与脂质颗粒之间的作用力起到关键作用。如图 1A 所示，当 WOE 所在的水相 pH 为 4 和 6 时，WOE 的 Zeta 电位可达到+4.5 mV 和−25.5 mV，变化显著（P<0.05），pH 大于 6 时，乳液带负电性且表面电位绝对值是随着 pH 的增加而增加[28]。整体来说，pH 在 6~10 的条件下，WOE 的稳定性较好。因此，可以选择在碱性条件下制备 WOE。

适量盐离子强度对 WOE 的粒径、储藏稳定性有一定影响。水相中的盐离子强度会使蛋白颗粒与脂质颗粒间发生排斥与吸引的转变，影响固体颗粒在油水界面上的吸附，从而影响乳液的性能和稳定性。如图 1B 所示，随着 NaCl 浓度的增加，粒径呈现先增大后减小的趋势。当 NaCl 浓度为 100 mmol/L 时，WOE 粒径显著增大为 48.12 μm（P<0.05）。当 NaCl 浓度为 0~500 mmol/L 时，粒度都呈现为多峰状态（图 1D），表现出 WOE 受 NaCl 的影响而不稳定。然而，随着所处环境盐离子强度的增加，WOE 表面电位绝对值逐渐变小且变化显著，最终达到−16.8 mV（图 1B）。这可能是因为增强离子强度会产生静电屏蔽效应，削弱 WPI 和大豆油体间的静电排斥[29]，从而使 WOE 的 Zeta 电位降低。但是即使在高浓度的 NaCl 环境下，WOE 的表面所带电荷也一直保持带负电，未转化为正电荷，这与大豆油体表面电荷对 NaCl 的不敏感有关[30]。

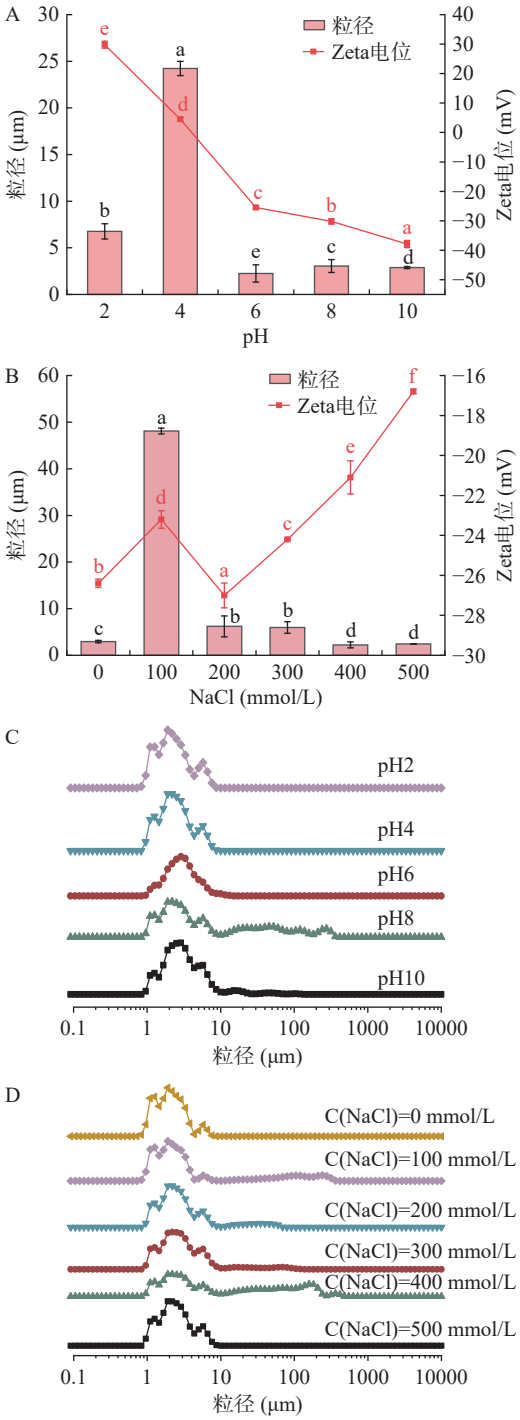


图 1 pH 和 NaCl 浓度对 WOE 粒径以及电位的影响

Fig.1 Effect of pH and NaCl concentration on the particle size and potential of WOE

注：不同小写字母表示样本间差异显著，P<0.05，图 5 同。

2.2 pH、盐离子浓度对 WOE 流变特性的影响

pH 和 NaCl 浓度对 WOE 流变学性质的影响如图 2 所示。随着剪切速率的增加（1~100 s^{-1}），WOE 表观黏度逐渐变小，具有剪切稀化现象，呈现非牛顿流体行为[31]，说明 pH、NaCl 浓度不会改变乳液的

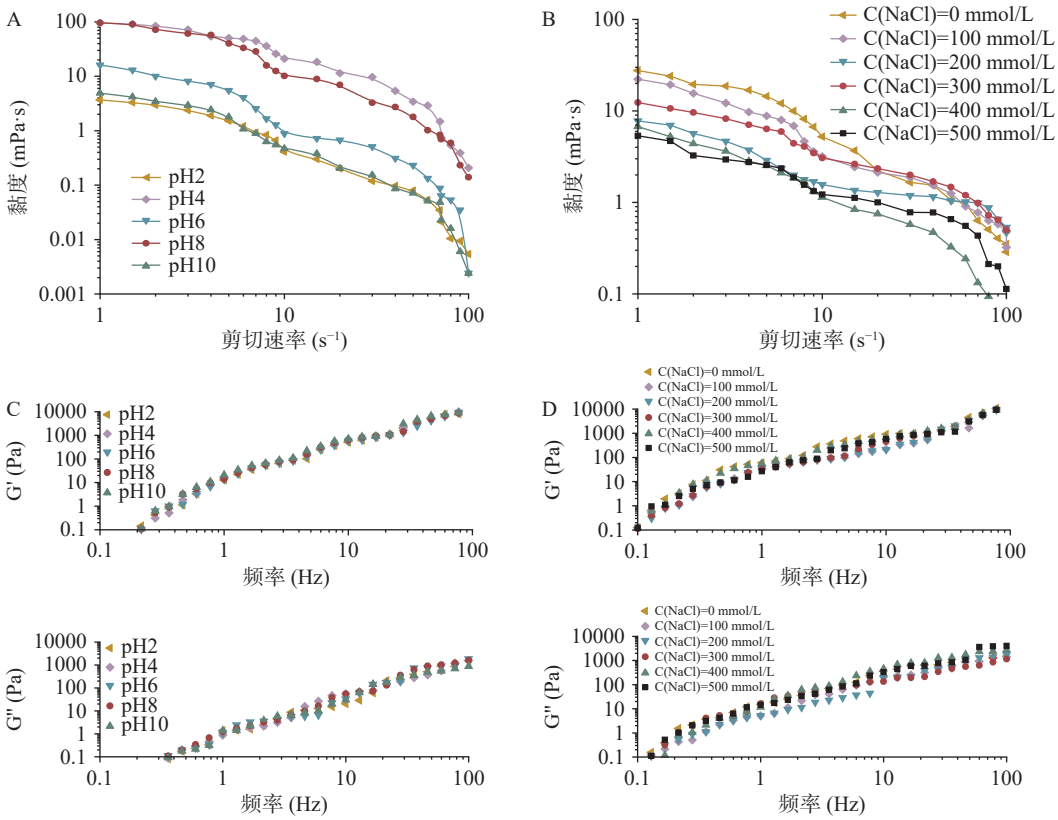


图 2　pH 和 NaCl 浓度对 WOE 流变学性质的影响

Fig.2　Effect of pH and NaCl concentration on the rheological properties of WOE

非牛顿流体行为，但是会影响乳液的表观黏度。如图 2A、2B 所示，所有样品均显示出剪切稀化（假塑性）行为，这是由于高速的剪切使乳液网络破裂[32]。当 pH 为 4 时，WOE 表观黏度最大，这可能是因为此时 pH 接近 WOE 的等电点，WPI 和大豆油体间的静电排斥作用较弱，形成更大的聚集颗粒[33]，乳液粒径较大，从而增加乳液的黏度，但可能降低 WOE 稳定性。而当 pH 为 2、6、8、10 时，表观黏度较小，这是因为远离 WOE 等电点，颗粒间静电斥力较大，乳液粒径小。乳液的表观黏度随 NaCl 浓度的升高而逐渐降低，这是因为溶液中的钠离子和氯离子屏蔽蛋白质表面的电荷，蛋白质发生离子交联，降低了乳液的黏度[29]。整体来说，不同 NaCl 浓度条件下，WOE 表观黏度均较低，乳液流动性较强。

在频率扫描中，频率在不停地变化（0.1~100 Hz），而应变恒定，整个扫描过程处于动态[34]。由图 2C、2D 可知，随着扫描频率的增加，WOE 的 G'均大于 G''，G'和 G''之间没有交叉点，具有较高的弹性模量，说明在此振幅范围下，WPI 和大豆油体吸附在油水界面，通过分子间作用力相互交联，促使网络结构稳定[35]，形成刚性界面膜，乳液均表现出以弹性为主的流变性[36]。且 G'和 G''随频率增大呈上升趋势，具有频率依赖性，说明蛋白质通过分子相互作用增强了乳液的黏弹性，形成稳定的三维网状结构，乳液呈弱凝胶态[37]。pH 对乳液模量影响不大，而盐离子会削弱 WPI 和大豆油体的界面作用，界面结构弱化，导致乳液模量降低。

2.3　消化过程中 WOE 的 SDS-PAGE 和微观结构分析

在模拟胃液消化阶段，0~30 min 内，胃液的酸性

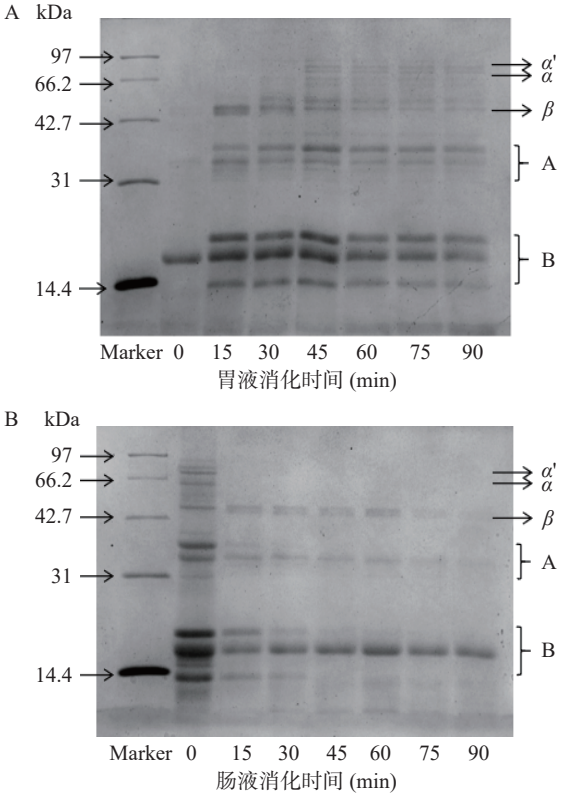


图 3　WOE 在模拟胃液消化阶段（A）和模拟肠液消化阶段（B）表面蛋白的 SDS-PAGE

Fig.3　SDS-PAGE of WOE surface protein during simulated gastric (A) and intestinal (B) digestion phases

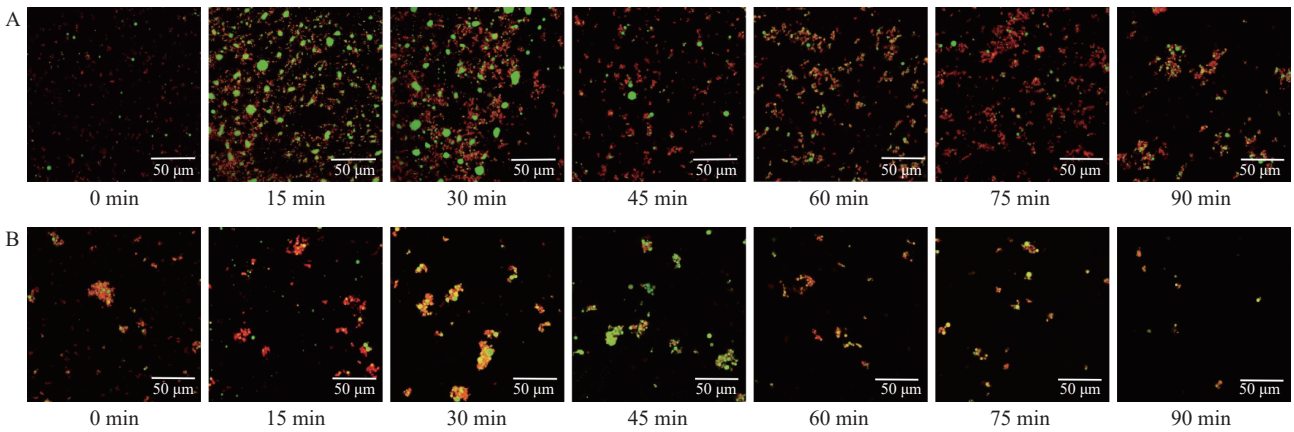


图 4 在模拟胃液消化阶段(A)和模拟肠液消化阶段(B)WOE 的激光共聚焦显微镜图像

Fig.4 CLSM images of WOE during simulated gastric (A) and intestinal (B) digestion phases

注: 所有图像中的比例尺为 50 μm。

环境达到 WOE 的等电点, 大豆油体表面蛋白质及 WPI 絮凝形成大分子聚集物[25]。此外, WOE 中蛋白的水解也可能影响某些脂肪滴在消化前期的聚集。蛋白条带在 15~45 min 时整体致密, 此后随着消化时间的延长而逐渐变弱(图 3A)。这一结果归因于胃消化过程中 pH 先降低后上升的趋势, 静电斥力和位阻的减少对液滴聚集起着至关重要的作用[38]。在模拟胃消化 60~90 min 期间, 脂肪滴逐渐减小; 模拟胃液消化前 30 min 内形成的聚集物在消化 45~90 min 逐渐分散(图 4A)。这是由于随着消化时间的增加, 乳液 Zeta 电位值增加, 从而增强了 WPI 和大豆油体间静电斥力和空间位阻, 减小了脂肪液滴尺寸[39−40]。激光共聚焦扫描显微镜图像与 WOE 中表面蛋白的 SGS-PAGE 结果相一致, 即随着消化时间的增加, 染绿色的蛋白质在 0~30 min 内先形成较大颗粒, 而后含量减少。进入肠液消化阶段, 消化酶在胆盐的作用下快速吸附在界面。在 pH 为 6.8 的条件下, WOE 稳定性较好, 液滴尺寸显著减小(图 3B 和图 4B)。随着消化时间的延长, WOE 中的大脂滴数量逐渐减少。平均液滴大小减小的原因可能有两个, 即蛋白质聚集体在 SIF 中被蛋白酶水解, 或者脂肪液滴界面上吸附了某些小分子物质, 如 FFAs、胆汁盐和肽, 它们会增强静电斥力和位阻, 减小平均液滴尺寸[21]。

2.4 消化过程中 WOE 的粒径和电位变化

在模拟胃液消化阶段, 乳液样品的理化性质可能因所处环境的不同而变化。如图 5A 所示, 在消化时间 30 min 左右, 粒径达到最大值(27.66 μm)。此时粒径增大主要是由于胃液的酸性环境达到了 WOE 的表面蛋白的等电点, 蛋白质与蛋白质共价结合的过程中蛋白质的二级结构发生改变, 使得 WOE 结构展开, 暴露其内部疏水性氨基酸, WPI 和大豆油体疏水相互作用增强, 从而提高 WOE 的表面活性[41], 此外, 在胃消化阶段, 乳液的电荷特性发生明显的改变。胃液消化 30 min 时 Zeta 电位绝对值明显低于其他消化时间(图 5A)。样品乳液的粒径和电

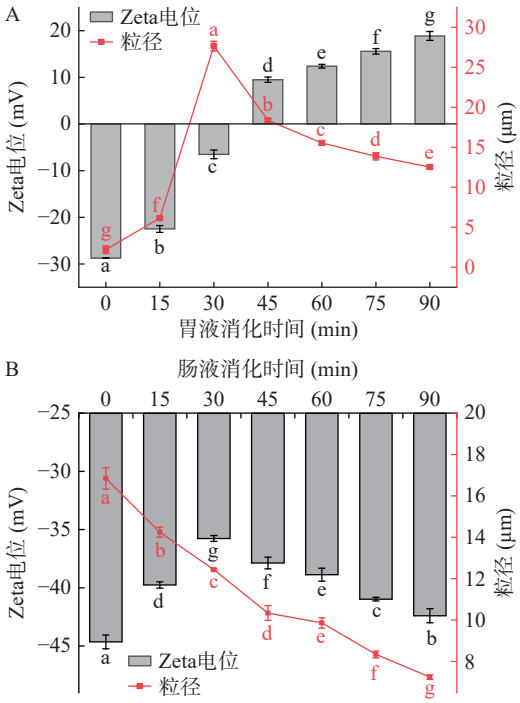


图 5 WOE 在模拟胃液消化阶段(A)和模拟肠液消化阶段(B)的粒径和电位

Fig.5 Particle size and potential of WOE during simulated gastric (A) and intestinal (B) digestion phases

位变化主要是受到胃部环境的影响。胃部的强酸性环境导致乳液液滴的电位绝对值下降, 而随着消化时间的延长, WPI 和大豆油体中的蛋白质被胃蛋白酶水解, 蛋白质结构展开, 暴露出更多的带电基团, 而且蛋白质水解产物可能吸附在油滴表面, 增加整体电荷密度。因此乳液电位绝对值呈上升趋势。另一方面, 在胃蛋白酶的作用下, 蛋白质分子降解, 乳液成为较小的乳糜微粒[42], 因此随着胃液消化时间的延长, 乳液粒径降低。从胃部进入小肠后, 肠液中的碳酸氢盐等碱性物质中和胃酸, pH 上升, WPI 和大豆油体间的分子相互作用改变引起聚集, 粒径增加。此外, 胰蛋白酶、羧肽酶将蛋白质进一步水解, 游离氨基、羧基增多, 这些带电基团附着在颗粒表面, 提升颗粒电

荷密度，电位绝对值上升。随着小肠消化时间延长，样品粒径减小，消化中后期负电位值的绝对值不断增加（图 5B）。因为小肠消化 pH 持续维持在 7，高于大豆油体表面蛋白等电点，并且模拟肠液中的胰酶降解乳液液滴内脂肪并释放出游离脂肪酸致使负电位的绝对值值持续增大。小肠消化后期，消化活力降低，粒径、电位变化趋势减缓。

2.5　消化过程中游离脂肪酸释放分析

WOE 在模拟肠液消化 90 min 内以较快的速度释放出游离脂肪酸，释放率达 75.45 μmol/mL，而纯大豆油组游离脂肪酸释放速率较为缓慢，90 min 时，释放率仅为 38.45 μmol/mL（图 6A）。对于乳液体系而言，脂滴界面特性及粒径大小是影响其肠道水解速率和程度的重要因素。肠道消化过程中，脂肪酶在胆盐作用下附着在油相液滴表面，快速水解甘油三酯[43]。WOE 的蛋白质-蛋白质共价结合形成固相界面，随着消化时间的延长，胆盐渗透到界面层，进一步水解蛋白质，与油相发生了脂肪分解反应。在胆盐和胰酶的共同作用下，大豆油体内部甘油三酯被分解为 FFA 而释放。且 WOE 在肠道消化过程中，平均粒径逐渐减小，油滴比表面积增大，更有利于脂肪酶的水解和 FFA 释放[44]。纯大豆油组脂解速率较慢，这可能与大豆油体和大豆油甘油三酯结构不同有关，大豆油中长链甘油三酯水解后聚集在油滴表面，抑制脂肪酶水解油滴。

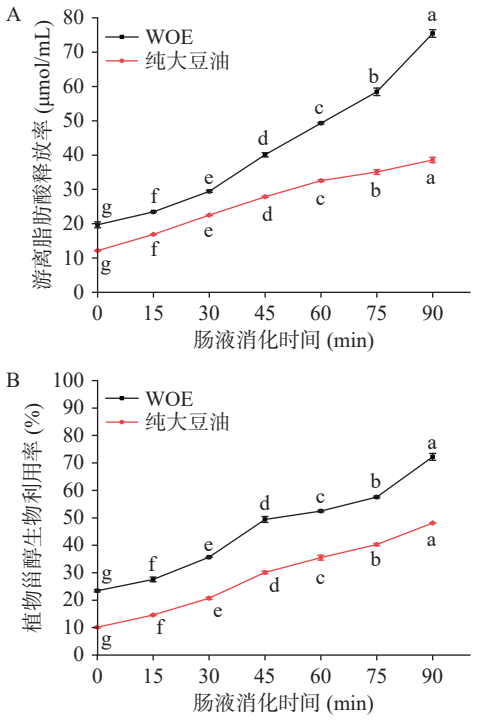


图 6　WOE 在模拟肠液消化阶段的游离脂肪酸释放率（A）和植物甾醇生物利用率（B）

Fig.6　Release rate of free fatty acids (A) and phytosterol bioavailability (B) of WOE during simulated intestinal digestion phase

注：不同小写字母表示不同消化时间下样本间差异显著，$P<0.05$。

2.6　消化过程中植物甾醇生物利用率

通过测定消化过程中胶束相中植物甾醇含量，评价植物甾醇生物利用率。WOE 在胰蛋白酶消化 90 min 时的植物甾醇生物利用率为 72.23%，纯大豆油组植物甾醇生物利用率仅为 48.08%（图 6B）。这与肠液消化过程中游离脂肪酸释放量结果趋势相同，这是因为 WPI 和大豆油体通过共价结合形成了界面膜，且大豆油体独特的疏水核心对植物甾醇具有良好的运输特性[15]，有效保护植物甾醇。FFA 释放量越高，植物甾醇的生物利用率也越高[45]。这是因为随着脂肪酶的水解，植物甾醇被释放，并与脂肪消化产物形成胶束，通过小肠上皮细胞被吸收利用[36]。因此，应用大豆油体和 WPI 制备的 WOE 可以有效递送植物甾醇，并从乳液中持续释放。

3　结论

本研究制备乳清分离蛋白-大豆油体复合颗粒稳定乳液，分析 pH 和盐离子浓度对 WOE 稳定性和流变特性的影响，通过体外模拟消化，探讨 WOE 在消化过程中的粒径、电位变化，以及微观结构、游离脂肪酸释放、植物甾醇生物利用率在不同消化阶段的变化。研究发现，WPI 和大豆油体具有良好的界面稳定作用，WOE 在远离等电点（pH6~10）和低盐条件下稳定性好，在等电点和高盐下易聚集。流变学结果表明，乳液表现出典型的剪切变稀行为，且乳液形成了弹性为主的凝胶网络结构。在体外模拟消化阶段，SDS-PAGE 结果和共聚焦扫描显微镜图像结果相对应，蛋白质被胃蛋白酶和胰酶作用而消化降解。在模拟肠液消化阶段，WOE 的脂肪滴尺寸逐渐减小，脂肪酶和胆盐水解释放游离脂肪酸，植物甾醇生物利用率持续增加（72.23%）。本研究为蛋白-脂质复合颗粒稳定乳液体系并进行疏水性生物活性物质递送提供了一定的参考，有关乳液长期稳定性、界面特性及应用研究还有待进一步探讨。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] ZIO S, TARNAGDA B, TAPSOBA F, et al. Health interest of cholesterol and phytosterols and their contribution to one health approach: Review[J]. Heliyon, 2024, 10(21): e40132.

[2] SHARMA N, TAN M A, AN S S A. Phytosterols: Potential metabolic modulators in neurodegenerative diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(22): 12255.

[3] MISZCZUK E, BAJGUZ A, KIRAGA Ł, et al. Phytosterols and the digestive system: A review study from insights into their potential health benefits and safety[J]. Pharmaceuticals, 2024, 17(5): 557.

[4] AGRAWAL M, MITRA M P. Development and validation of a high-performance thin-layer chromatography-densitometric method and mass spectroscopy profiling for the determination of bioactive phytosterol from *Manilkara zapota* L. P. Royen leaves and correlat-

ing its antioxidant and antiinflammatorypotential[J]. JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC, 2024, 37(1): 21−37.
[5] SUNDAR S, SINGH B, KAUR A. Dry-air pretreatments effects on physiochemical properties, stability, antioxidants, phytosterol and tocopherol profiles of hemp oil[J]. Food and Humanity, 2024, 2: 100289.
[6] LIU Gaodan, SUN Peilong, YAN Jiadan, et al. Regulation of nanoliposome rigidity and bioavailability of oligomeric proanthocyanidin with phytosterols containing different C3 branches[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2023, 15(37): 43414−43430.
[7] YANG Bowen, JI Shengyang, ZHAO Tian, et al. Phytosterols photooxidation in O/W emulsion: Influence of emulsifier composition and interfacial properties[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 142: 108698.
[8] 朱巧梅, 于晓雯, 陈海涛, 等. 玉米纤维胶-乳清分离蛋白 Maillard 共聚物对姜黄素乳液稳定性和消化特性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(15): 10−18. [ZHU Qiaomei, YU Xiaowen, CHEN Haitao, et al. Effect of corn fiber gum-whey protein isolate Maillard conjugates on the stability and *in vitro* digestibility of curcumin-loaded emulsions[J]. Food Science, 2021, 42(15): 10−18.]
[9] YANG Bowen, CHEN Cheng, HUANG Weisu, et al. Encapsulation of antioxidants with colloidal lipid particles for enhancing the photooxidation stability of phytosterol in Pickering emulsions [J]. Food Chemistry, 2024, 452: 139474.
[10] MÜNCH K, TAKEUCHI M, TUINIER R, et al. Mixed interfaces comprising pea proteins and phosphatidylcholine: A route to modulate lipid oxidation in emulsions?[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 153: 109962.
[11] ZHAO Runan, FU Weiting, CHEN Yijie, et al. Structural modification of whey protein isolate by cinnamaldehyde and stabilization effect on *β*-carotene-loaded emulsions and emulsion gels[J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130602.
[12] ZHANG Rui, ZHANG Junwei, ZOU Bowen, et al. Mild alkalinity preheating treatment regulates the heat and ionic strength cotolerance of whey protein aggregates[J]. Food Research International, 2024, 193: 114845.
[13] 李宛蓉, 刘佩, 余静怡, 等. 乳清分离蛋白与单宁酸相互作用提高稻米油 Pickering 乳液的稳定性[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 1−7. [LI Wanrong, LIU Pei, YU Jingyi, et al. The interaction of whey protein isolate with tannic acid improves the stability of rice bran oil Pickering emulsion[J]. Food Science, 2020, 41(18): 1−7.]
[14] PASCUAL-SILVA C, GÓMEZ-GUILLÉN M C, ALEMÁN A, et al. Use of residual lipid fractions and protein hydrolysates from salmon skin cleaning processing for liposome production and their application in Pickering emulsions[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2024, 95: 103704.
[15] YU Dianyu, WANG Ning, YU Yingjie, et al. Effects of electrochemical treatment and epigallocatechin-3-gallate on emulsification, rheological and oxidation stability of soybean oil body[J]. Journal of Food Engineering, 2024, 366: 111832.
[16] WASCHATKO G, JUNGHANS A, VILGIS T A. Soy milk oleosome behaviour at the air-water interface[J]. Faraday Discussions, 2012, 158: 157−169.
[17] 王广婕, 赵焕宇, 苏成成, 等. 油脂体的组成、结构及氧化稳定性研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(21): 293−302. [WANG Guangjie, ZHAO Huanyu, SU Chengcheng, et al. Research progress on composition, structure and oxidative stability of oil bodies[J]. Food Science, 2023, 44(21): 293−302.]
[18] WANG Wan, HU Chuanbing, SUN Hong, et al. Low-cholesterol-low-fat mayonnaise prepared from soybean oil body as a substitute for egg yolk: The effect of substitution ratio on physicochemical properties and sensory evaluation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 167: 113867.
[19] HE Shenghua, GU Cheng, WANG Deguo, et al. The stability and *in vitro* digestion of curcumin emulsions containing Konjac glucomannan[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 117: 108672.
[20] ZHOU Xuan, SUN Rongbo, ZHAO Jiale, et al. Enzymatic activity and stability of soybean oil body emulsions recovered under neutral and alkaline conditions: Impacts of thermal treatments[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153: 112545.
[21] GENG Mengjie, WU Xixi, TAN Xiangyun, et al. Co-encapsulation of vitamins C and E in SPI-polysaccharide stabilized double emulsion prepared by ultrasound: Fabrication, stability, and *in vitro* digestion[J]. Food Bioscience, 2024, 59: 104113.
[22] WANG Qi, LI Wanrong, LIU Pei, et al. A glycated whey protein isolate-epigallocatechin gallate nano complex enhances the stability of emulsion delivery of *β*-carotene during simulated digestion[J]. Food & Function, 2019, 10(10): 6829−6839.
[23] NIKIFORIDIS C V, DONSOUZI S, KIOSSEOGLOU V. The interplay between diverse oil body extracts and exogenous biopolymers or surfactants[J]. Food Research International, 2016, 83: 14−24.
[24] YANG F M, OYEYINKA S A, XU W L, et al. *In vitro* bioaccessibility and physicochemical properties of phytosterol linoleic ester synthesized from soybean sterol and linoleic acid[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 92: 265−271.
[25] SUN Aidi, DONG Wenming, LI Siyu, et al. Preparation and characterization of Pickering emulsion gel stabilized by WPI/SPI composite particles and encapsulation of milk-derived peptide FDRPFL[J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 199: 116093.
[26] HUSSAIN B I, WANG Z Y, CHEN Q, et al. Ultrasonic enhancement of structural and emulsifying properties of heat-treated soy protein isolate nanoparticles to fabricate flaxseed-derived diglyceride-based Pickering emulsions[J]. Food Chemistry, 2024, 442: 138469.
[27] BENAVIDES C L, MARTINEZ Y. The concentration and type of emulsifier rules the oil/water and water/oil/water emulsion size distribution[J]. Chemical Engineering Communications, 2023, 210(11): 2064−2071.
[28] MA Qin, BU Xianpan, NIE Chunling, et al. Impact of interactions between peanut protein isolate and cellulose nanocrystals on the properties of Pickering emulsions: Rheological properties and physical stabilities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 233: 123527.
[29] DICKINSON E. Food emulsions and foams: Stabilization by particles[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2010, 15(1-2): 40−49.
[30] ZIELBAUER B I, JACKSON A J, MAURER S, et al. Soybean oleosomes studied by small angle neutron scattering (SANS)[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2018, 529: 197−204.
[31] WANG Xu, LI Xin, XU Duoxia, et al. Comparision of heteroaggregation, layer-by-layer and directly mixing techniques on the physical properties and *in vitro* digestion of emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 228−237.
[32] FALSAFI S R, ROSTAMABADI H, NISHINARI K, et al. The role of emulsification strategy on the electrospinning of *β*-

carotene-loaded emulsions stabilized by gum Arabic and whey protein isolate[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131826.
[33] WU Fan, SHI Xiaojie, ZOU Henan, et al. Effects of high-pressure homogenization on physicochemical, rheological and emulsifying properties of myofibrillar protein[J]. Journal of Food Engineering, 2019, 263: 272−279.
[34] ABBASIAN C Z, FOUDAZI R. Rheological study of nanoemulsions with repulsive and attractive interdroplet interactions [J]. Soft Matter, 2023, 19(43): 8337−8348.
[35] 李艳新, 陈立莹, 李雁, 等. WPI 和 WPI-EGCG 构建姜黄素纳米乳液的体外消化差异[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 1−7. [LI Yanxin, CHEN Liying, LI Yan, et al. Differences in *in vitro* digestibility of curcumin nanoemulsions stabilized by whey protein isolate and whey protein isolate-(-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. Food Science, 2024, 45(1): 1−7.]
[36] JIANG Fangcheng, PAN Yijun, PENG Dengfeng, et al. Tunable self-assemblies of whey protein isolate fibrils for Pickering emulsions structure regulation[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107264.
[37] 胡方洋, 陈金玉, 郭晋廷, 等. 豌豆抗性淀粉对磷酸化肌原纤维蛋白基乳液体外消化率及凝胶特性的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(10): 108−117. [HU Fangyang, CHEN Jinyu, GUO Jinting, et al. Effects of pea resistant starch on *in vitro* digestibility and gel properties of phosphorylated myofibrillar protein-based emulsion[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(10): 108−117.]
[38] LUZ A B S, de MEDEIROS A F, de MEDEIROS G C B S, et al. Experimental protocols used to mimic gastrointestinal protein digestion: A systematic review[J]. Nutrients, 2024, 16(15): 2398.
[39] LI Qi, HE Shenghua, XU Weili, et al. Formation, stability and *in vitro* digestion of *β*-carotene in oil-in-water milk fat globule membrane protein emulsions[J]. Food Biophysics, 2018, 13(2): 198−207.
[40] CHEN L, YOKOYAMA W, LIANG R, et al. Enzymatic degradation and bioaccessibility of protein encapsulated *β*-carotene nano-emulsions during *in vitro* gastro-intestinal digestion[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105177.
[41] YAO Xiaolin, CHEN Yu, SHU Meng, et al. Stability and digestibility of one- or bi-layered medium-chain triglyceride emulsions with gum Arabic and whey protein isolates by pancreatic lipase *in vitro*[J]. Food & Function, 2018, 9(2): 1017−1027.
[42] 陈美妙, 王浩楠, 邱哲瀚, 等. 乳液基递送体系对植源活性物健康效应的影响研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(13): 351−360. [CHEN Meimiao, WANG Haonan, QIU Zhehan, et al. Progress in research on the enhanced health effects of phytochemicals by emulsion-based delivery systems[J]. Food Science, 2022, 43(13): 351−360.]
[43] LI Yan, HU Min, McCLEMENTS D J. Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method[J]. Food Chemistry, 2011, 126(2): 498−505.
[44] FITRI I A, MITBUMRUNG W, AKANITKUL P, et al. Encapsulation of *β*-carotene in oil-in-water emulsions containing nanocellulose: Impact on emulsion properties, *in vitro* digestion, and bioaccessibility[J]. Polymers, 2022, 14(7): 1414.
[45] YI Jiang, LI Yue, ZHONG Fang, et al. The physicochemical stability and *in vitro* bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 19−27.