

【生命与健康 / Life and Health】

包载 C3G 的新型纳米纤维脂质体在酸奶中的应用

施报平, 刘晓冰, 王怀旭, 郑家荣

深圳大学高等研究院, 深圳食品产业创新发展研究院, 深圳市海洋微生物组工程重点实验室, 广东深圳 518060

摘要: 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(cyanidin-3-O-glucoside, C3G)具有较强的抗炎、抗氧化和抗癌活性, 但受到外界环境影响易降解, 导致其应用大大受限. 为增强脂质体和 C3G 的稳定性, 向脂质体配方中加入水溶性且耐消化的纤维溶胶 Fibersol-2, 然后将此配方包载的 C3G 添加到牛奶中进行发酵, 对发酵后酸奶的相关指标进行评估, 从而确定包载 C3G 对酸奶的影响. 研究发现, 将纳米纤维脂质体添加到酸奶中, 可明显促进保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的增殖, 降低酸奶的 pH 值, 并增加酸奶的酸度、持水力、双乙酰含量和抗氧化活性, 抑制酸奶蛋白氧化; 纳米纤维脂质体对酸奶的质构有正向影响, 但对酸奶的挥发性风味物质无明显影响. 研究表明, 向纳米脂质体中加入 Fibersol-2 以稳定脂质体、保护 C3G 的策略是切实可行的; 将包载 C3G 的纳米纤维脂质体应用在酸奶发酵中也可以多方面提升产品品质, 可以作为功能性酸奶的一种新研发思路.

关键词: 分子生物学; 食品科学; Fibersol-2; 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷; 纳米纤维脂质体; 包埋; 酸奶
中图分类号: Q74; TS201.4 **文献标志码:** A **doi:** 10.3724/SP.J.1249.2024.03348

Application of novel nanofiber liposomes coated with C3G in yogurt

SHI Baoping, LIU Xiaobing, WANG Huaixu, and CHENG Kawing

Institute for Advanced Study, Institute for Innovative Development of Food Industry, Shenzhen Key Laboratory of Marine Microbiome Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: Cyanidin-3-O-glucoside (C3G) is the most abundant and widely applied anthocyanin in nature, possessing potent anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer activities. However, the applications are greatly limited by its susceptibility to degradation under external environmental factors. This study aimed to enhance the stability of liposomes by incorporating Fibersol-2 (a water-soluble, digestible-resistant fiber gel) into the liposome formulation, and to evaluate the effects of adding the resulting nanofiber liposomes to milk during fermentation on the relevant properties of the resulting yogurt. The experiment reveals that adding nanofiber liposomes to yogurt results in the following outcomes: a significant promotion of the proliferation of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*; a decrease in pH and an increase in acidity of the yogurt; an increase in water-holding capacity, diacetyl content, and antioxidant activity of the yogurt, as well as inhibition of yogurt protein oxidation. Furthermore, the addition of nanofiber liposomes has the positive effect on the texture of yogurt, but has no significant impact on the volatile flavor compounds of the yogurt. In conclusion, incorporating Fibersol-2 into nanoliposomes as a strategy for stabilizing liposomes and protecting C3G is a feasible approach, and incorporating C3G-loaded nanofiber liposomes into yogurt fermentation can improve the quality of the resulting product in multiple ways, thus serving as a

Received: 2023-04-19; **Accepted:** 2023-05-05; **Online (CNKI):** 2023-07-25

Foundation: Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (2019B020212001)

Corresponding author: Professor CHENG Kawing (kwcheng@szu.edu.cn)

Citation: SHI Baoping, LIU Xiaobing, WANG Huaixu, et al. Application of novel nanofiber liposomes coated with C3G in yogurt [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2024, 41(3): 348-357. (in Chinese)



promising avenue for the development of functional yogurt.

Key words: molecular biology; food science; Fibersol-2; cyanidin-3-O-glucoside; nanofiber liposome; coating; yogurt

近年来,消费者对食品健康越来越关注,科学研究对不含人工和合成添加剂的天然生物活性成分在食品中的应用也日趋关注。但是,天然生物活性成分往往存在溶解性差、易受储存环境、处理方式影响和生物利用度低等不利于进入人体发挥作用的弊端,严重制约了其在食品领域中的应用。封装是一种以微纳米颗粒形式包载化合物的独特方法,被定义为将一种物质(活性剂)包裹在另一种物质(壁材料)中的过程。通过对化合物进行封装,可以保护生物活性成分免受外部环境因素影响和不必要的化学相互作用,直到需要释放发挥作用^[1]。

脂质体封装是食品和生物医药领域常用的一种封装形式^[2]。然而,纳米脂质体是不稳定的体系,磷脂容易被氧化、水解以及发生融合和聚集^[3],这些敏感特征可能导致核心化合物意外释放到非靶向区域,影响生物活性化合物的使用效果,如pH值和温度等外界条件不合适导致化合物尚未到达作用区域就提前释放,则化合物包封处理的意义就大大减弱。

Fibersol-2是一种抗消化麦芽糊精,本质上是一种水溶性多糖,通常在酸性条件下对玉米淀粉进行加热或酶解、水解可制得。Fibersol-2没有任何特殊的味道或气味,在水中具有很强的分散能力。文献^[4]研究发现,人体所摄入的Fibersol-2约有90%可以到达大肠,其中,50%将由结肠菌群进行发酵,其余的则与粪便一起被排出。杨月欣等^[5]研究还证实了Fibersol-2具有促进有益肠道菌群生长、抑制有害菌群生长、促进炎症性肠病患者黏膜快速恢复的作用。

花青素是一类黄酮类化合物,是植物中存在最广泛的水溶性色素。目前已知的花青素多以花色苷形式存在,其中,矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(cyanidin-3-O-glucoside, C3G)是自然界中资源最丰富且应用最为广泛的一种花青素,通常存在于蔬菜、水果中。由于具有邻酚基结构,C3G具有很强的抗氧化和抑制光氧化导致的衰老的能力^[6]。然而,C3G缺少电子,对降解反应高度敏感,很不稳定。为了稳定C3G,研究人员提出了封装、酰化和交联3种主要机制。其中,封装是对C3G最有效、最绿色的稳定机制,且具有工艺简单和无有机溶剂污染的优点^[7]。

酸奶营养丰富,有助于改善人类的健康。然而原味酸奶口感单一且益生功能弱,难以满足消费者日益增长的营养需求,向酸奶中加入包载C3G的纳米纤维脂质体可增强酸奶抗氧化和抗炎活性,同时,还有利于人体对于纤维溶胶的摄取,有效提高酸奶的功能性。

本研究通过用脂质在水中自组装形成脂质体对C3G进行包埋,以改善C3G物理化学稳定性差的弊端;通过向脂质体中添加Fibersol-2以稳定包载C3G的纳米脂质体,改善脂质体易受强酸和酶等影响而降低对化合物的包埋效果所导致的应用局限;通过将包载C3G的纳米脂质体应用到酸奶中以增强酸奶的功能性,满足消费者的需求。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

C3G氯化物(纯度>99%)购自成都曼思特生物科技有限公司;脂质S75(磷脂酰胆碱的大豆磷脂质量分数为70%)购自沈阳天峰生物制药有限公司;Fibersol-2(抗消化麦芽糊精,相对分子质量约为2 000 u, 1 u = 1 Da)购自上海烨熠生物技术有限公司;MRS培养基和M17培养基购自青岛海博生物技术有限公司;牛奶购自广西百菲酪乳业有限公司;酸奶发酵剂来自安琪酵母股份公司;NaOH标准溶液、酚酞、乙醇、乙醚、正己烷、双乙酰标准品、邻苯二胺、三氯乙酸和2,2'-偶氮-双-3-乙基苯并噁唑啉-6-磺酸(2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS)和2,4-二硝基苯肼(2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH)均购自上海麦克林生化科技有限公司;盐酸购自国药集团化学试剂有限公司;1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)试剂购自上海源叶生物科技有限公司;尿素、甘氨酸和三羟甲基氨基甲烷购自北京索莱宝科技有限公司;Ellman试剂来自美国Sigma-Aldrich公司。

1.2 酸奶的制备

采取巴氏灭菌法对全脂牛奶进行灭菌,待温度冷却到40~45℃时,向牛奶中添加体积分数为10%的纳米脂质体溶液。其中,对照组添加等体积的纯净水;FS-2组添加Fibersol-2与脂质S75质量比

为 2:1 的未包载 C3G 的纳米纤维脂质体; C₅ 组添加等体积的低浓度(脂质体配方中 C3G 添加量为 1 mg/mL)游离的 C3G; C₅FS-2 组添加 Fibersol-2 与脂质 S75 质量比为 2:1 的包载低浓度 C3G 的纳米纤维脂质体; C₁₀FS-2 组添加 Fibersol-2 与脂质 S75 质量比为 2:1 的包载高浓度(脂质体配方中 C3G 添加量为 2 mg/mL)C3G 的纳米纤维脂质体. 以上样品混合均匀后, 再添加质量分数为 0.1% 的发酵剂, 混合均匀, 于恒温培养箱(42 ± 1) °C 发酵 8 h, 而后转移到 4 °C 冰箱, 后熟 12 h.

1.3 酸奶中的活菌数目测定

对 ISO 7889: 2003^[8] 描述方法适当修改用以测定酸奶中嗜热链球菌及保加利亚乳杆菌数目.

1.4 酸奶 pH 值的测定

将处理后的各组酸奶样品恢复到室温并混匀后, 用 pH 计测定其 pH 值.

1.5 酸奶的可滴定酸度的测定

按照 GB 5009.239—2016《食品安全国家标准: 食品酸度的确定》^[9] 中规定的酚酞指示剂法测定各组酸奶样品酸度.

1.6 酸奶的质构分析

采用 TA. new plus 型质构仪对酸奶进行分析, 测定条件为: 探头选用 TA/36 R, 测试模式为全质构分析(texture profile analysis, TPA), 触发力为 5g, 测试前速度、测试速度和测试后速度均为 2 mm/s, 测试距离为 5 mm.

1.7 酸奶的颜色测定

采用 HunterLab 色度仪测定酸奶样品的颜色, 并以亮度、红绿度和黄蓝度表征酸奶的色度.

1.8 酸奶中双乙酰含量的测定

① 用体积分数为 16% 的三氯乙酸稀释双乙酰标准溶液至 3.0、6.0、9.0、12.0 和 15.0 μg/mL, 加入邻苯二胺溶液进行反应, 在 335 nm 波长下测定光密度(optical density, OD), 并绘制双乙酰标准曲线; ② 取适量酸奶样品, 用相同质量浓度的三氯乙酸溶液稀释 2 倍, 离心后用中速滤纸进行过滤; ③ 取一定量的滤液与 0.5 mL 体积分数为 1% 邻苯二胺溶液反应, 以 4.0 mol/L 盐酸作为反应终止试剂液, 取等量滤液作空白参比溶液作空白实验, 于 335 nm 波长下测定光密度, 代入双乙酰标准曲线, 计算酸奶中双乙酰的质量分数^[10].

1.9 酸奶的持水力的测定

参考文献[11]的方法并稍作修改以测定酸奶的

持水力. 持水力(water holding capacity, WHC) H 为

$$H = m_1/m_2 \times 100\% \quad (1)$$

其中, m_1 为酸奶上清液的质量; m_2 为酸奶的质量.

1.10 DPPH 自由基清除率测定

对发酵后酸奶以 4.5×10^3 r/min 离心 10 min 后, 取酸奶上清液 20 μL, 与 180 μL 0.2 mmol/L DPPH-乙醇溶液在室温下避光反应 30 min, 于 517 nm 处测定光密度, 记作 $D(517)$; 以超纯水与 DPPH-乙醇溶液反应作调零实验, 记作 D_{01} ; 以乙醇与酸奶上清液反应作对照实验, 其光密度记作 D_{c1} . 酸奶的 DPPH 自由基清除率 C_1 ^[12] 为

$$C_1 = \frac{D_{01} - (D(517) - D_{c1})}{D_{01}} \times 100\% \quad (2)$$

1.11 ABTS⁺ 自由基清除率测定

改进 ZHOU 等^[13] 的方法以测定酸奶清除 ABTS⁺ 自由基的能力. 将 7 mmol/L ABTS⁺ 与 2.45 mmol/L 过硫酸钾水溶液以体积比 2:1 进行混合后, 室温避光孵育 16 h, 用无水乙醇稀释至溶液在 734 nm 处的光密度为 0.70 ± 0.02 , 即得到 ABTS⁺ 工作溶液. 取酸奶上清与工作溶液混合, 室温反应 6 min, 于 734 nm 处测定光密度, 记作 $D(734)$; 以超纯水与工作溶液反应作调零实验, 其光密度记作 D_{02} ; 以无水乙醇与酸奶上清液反应作对照实验, 记作 D_{c2} . 酸奶的 ABTS⁺ 自由基清除活性 C_2 为

$$C_2 = \frac{D_{02} - (D(734) - D_{c2})}{D_{02}} \times 100\% \quad (3)$$

1.12 酸奶的蛋白浓度的测定

采用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 以牛血清白蛋白为标准品于 595 nm 处测定光密度值做蛋白浓度标准曲线.

1.13 酸奶中羰基含量的测定

参考文献[14]方法测定羰基含量. 取 1.5 mL 酸奶稀释液(约 2 mg/mL)加入 2 mL 10 mmol/L DNPH, 在黑暗中放置 1 h, 随后加入 3.5 mL 体积分数为 10% 的三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)在冰上孵育 10 min, 并以 1×10^4 r/min 离心 3 min. 用 1 mL 的乙醇-乙酸乙酯(体积比为 1:1)洗涤沉淀, 此操作重复 3 次, 最后将沉淀溶于 3 mL 6 mol/L 的尿素溶液. 羰基含量 M_1 (单位: nmol/mg) 为

$$M_1 = \frac{D(370)}{\varepsilon_1 \rho d} \times 10^6 n \quad (4)$$

其中, $D(370)$ 为样品在波长 370 nm 处的光密度; ρ 为蛋白质的质量浓度(单位: mg/mL); d 为比色光直径(单位: cm); $\varepsilon_1 = 2.2 \times 10^4$ mmol⁻¹·mL·cm⁻¹

为摩尔吸光系数; n 为稀释倍数。

1.14 酸奶中巯基含量的测定

参考文献[15]方法并稍作修改以测定巯基含量。将0.5 mL 酸奶稀释液添加到8 mL 8 mol/L 脲缓冲液中, 加入0.02 mL Ellman 试剂后静置15 min, 在412 nm处测定光密度, 用0.5 mL 8 mol/L 尿素缓冲液代替酸奶稀释液作空白调0。巯基(—SH)含量 M_2 (单位: $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) 为

$$M_2 = TD(412)n/p \quad (5)$$

其中, $T = 73.53 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, 为摩尔消光体积转化系数; $D(412)$ 为样品在412 nm下的光密度。

1.15 酸奶的挥发性风味物质分析

为了分析挥发性化合物, 向10 mL 酸奶样品中加入内标正十二烷(正十二烷与反应混合物体积比为0.02 μL :8 mL), 然后加入10 mL 乙醚涡旋提取1 min, 提取过程重复3次。提取完成后, 用无水硫酸钠对乙醚提取物进行干燥, 而后在真空下过滤样品。用氮气吹干残留的乙醚后, 用正己烷进行脱脂, 将残渣溶解在甲醇中后过孔径为0.22 μm 的滤膜以待分析。用安捷伦7890 B-5977 B气相色谱-质谱系统进行分析, 该系统配备HP-5 MS色谱柱(30 mm $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)。通过峰面积和归一法计算各物质相对百分含量,

$$P_i = \frac{\text{目标化合物峰面积}}{\text{总峰面积}} \times 100\% \quad (6)$$

1.16 数据分析

本研究所有实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示 ($n = 3$), 由GraphPad Prism 8.1 软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 酸奶的活菌计数结果

储藏期不同组酸奶的嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)及总的活菌的数目变化情况如图1。

由图1(a)可知, 在储藏期内不同组发酵酸奶样品中嗜热链球菌数量呈现出逐渐降低的趋势, 并且 $C_{10}\text{FS-2} > C_5\text{FS-2} > C_5 > \text{FS-2} > \text{对照组}$, 表明添加Fibersol-2 和C3G可以减缓酸奶中的嗜热链球菌数量的下降。当C3G和Fibersol-2共同作用时, 该效果更加显著。

由图1(b)可见, 保加利亚乳杆菌在储藏期内呈

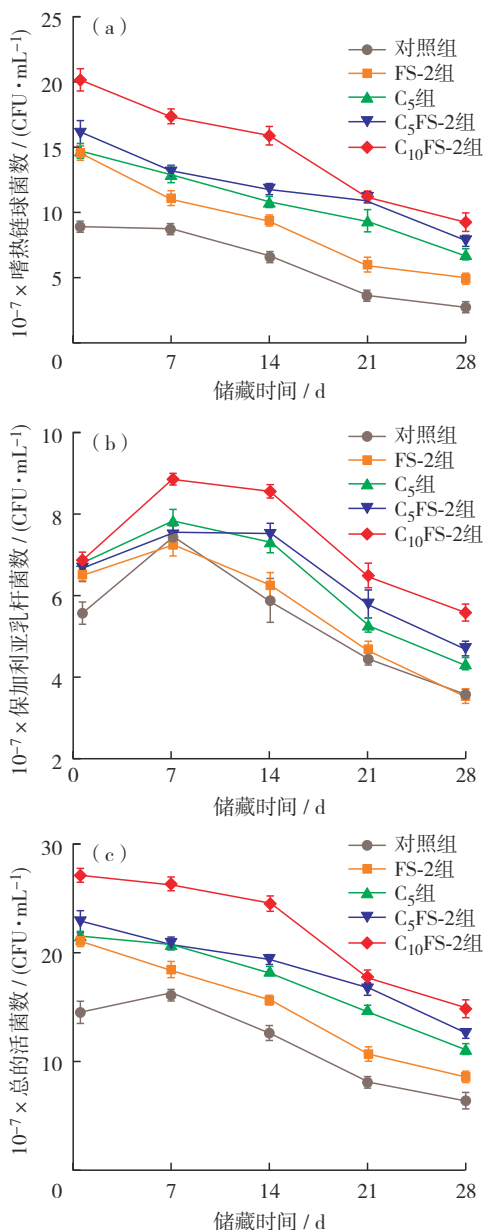


图1 不同储藏期酸奶组的(a)嗜热链球菌、(b)保加利亚乳杆菌和(c)总活菌的数目

Fig. 1 The number of bacteria in different groups of yogurt during storage. (a) *Streptococcus thermophilus*, (b) *Lactobacillus bulgaricus*, and (c) total bacteria.

先增后减的变化趋势: 在第1~7天, 各组保加利亚乳杆菌数量增加, 这可能是因为在前体系 pH 值较高, 保加利亚乳杆菌无法靠自身利用酸奶中的营养物质而增殖较慢; 而随着嗜热链球菌的生长和产酸, 一方面为耐酸的保加利亚乳杆菌的生长提供了酸性环境; 另一方面, 嗜热链球菌生长所产生的甲酸、丙酮酸和叶酸等物质也促进了保加利亚乳杆菌的生长。在第7~28天, 保加利亚乳杆菌数量逐渐下降。

根据图 1(c)总的活菌的数量变化情况可知,在储藏期内,活菌数量随储藏时间的延长而减少,这是因为随着储藏时间延长,酸奶体系中有限的营养物质不断地被消耗,菌的生长受到了抑制,但在储藏第 28 天时活菌数量依旧高于 1×10^6 CFU/mL(每毫升样品中含有的菌落形成单位(colony forming units, CFU)),符合 GB/T 19302—2010《食品安全国家标准:发酵乳》^[16]对发酵乳中活菌数量的要求。

2.2 酸奶的酸度评估结果

通过对酸奶 pH 值及可滴定酸度进行测定以评估酸奶的酸度。在储藏期内,不同组酸奶的 pH 值和可滴定酸度变化情况如图 2。由图 2(a)可见,随着储藏时间的延长,酸奶的 pH 值逐渐降低,并且 C₅、C₅FS-2 和 C₁₀FS-2 的 pH 值低于对照组。其中,FS-2 组 pH 值在储藏期由 4.79 下降到 4.33, C₅ 组的 pH 值由 4.47 降至 4.23, C₅FS-2 组的由 4.49 降至 4.21, C₁₀FS-2 组的由 4.45 降至 4.21。这与储藏期内活菌数量的变化一致:活菌数量越多,产酸能力越强,体系 pH 值越低。

由图 2(b)可见,随着储藏时间的延长,酸奶的

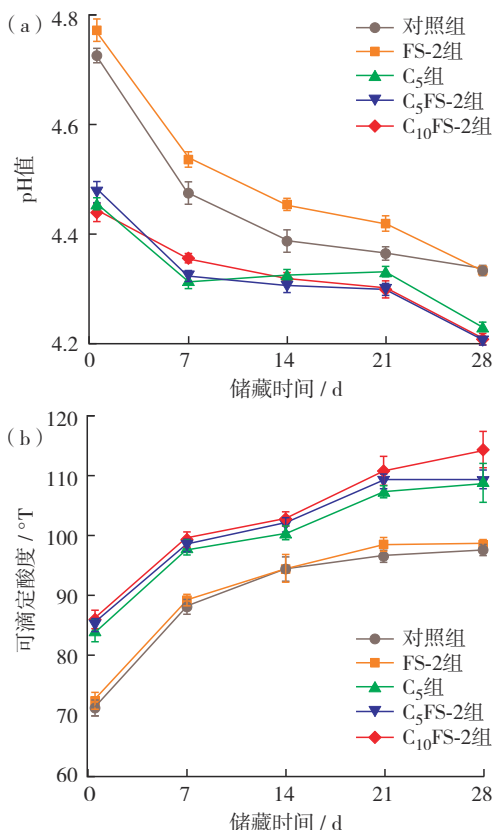


图2 储藏期不同组酸奶的(a)pH值和(b)可滴定酸度
Fig. 2 The pH and titratable acidity of yogurt in different groups during storage. (a) pH and (b) titratable acidity.

可滴定酸度逐渐增加,并且 C₅、C₅FS-2 和 C₁₀FS-2 的可滴定酸度显著高于对照组,这与储藏期内活菌数量的变化一致:活菌数量越多,产酸能力越强,可滴定酸度越高。并且在整个储藏过程中,酸奶的可滴定酸度均大于 70 °T,符合 GB/T 19302—2010《食品安全国家标准:发酵乳》^[16]对发酵酸奶酸度的要求。其中,酸奶中大部分乳酸(约 84%)来自嗜热链球菌^[17]。

从图 2 可见,各组酸奶的可滴定酸度和 pH 值变化情况略有差别,这是因为二者所反映的指标不同:可滴定酸度反映的是酸奶体系中所有能与具有强碱性的氢氧化钠标准溶液发生中和反应的酸性物质的总和,而 pH 值表示酸奶中表观 H⁺ 的浓度。

2.3 酸奶的质构分析结果

硬度是最直接反映口感的一项指标,储藏期不同酸奶的质构分析结果请扫描论文末页右下角二维码查看补充材料表 S1。通过酸奶的质构分析的结果可以观察到,在储藏期内,各组酸奶的硬度大致呈现出以下趋势:对照组和 C₅ 组酸奶的硬度(分别为 78.24 ~ 97.98 和 88.97 ~ 105.57)显著强于 FS-2、C₅FS-2 和 C₁₀FS-2 组(分别为 59.75 ~ 95.60、55.79 ~ 80.68 和 52.35 ~ 70.54)。这可能是因为纳米纤维脂质体影响了蛋白凝固。各组酸奶的硬度在储藏期间也大致呈现出一定的规律性变化:随着储藏期的延长,硬度先增后降,峰值大致出现在第 14 或 21 天,这可能是因为是在储藏前期,在乳酸菌的发酵作用下,酪蛋白颗粒的浓度增加,导致酪蛋白粒子间相互作用增强,酪蛋白链变短,孔隙尺寸减小,基质密度增加,硬度增加;后期则可能因为储存时间延长有乳清等析出而降低了酸奶的硬度。

酸奶样品在经过加压变形之后,若样品表面有黏性,则会产生负向的力量,负向力量越强,酸奶的黏性越大。黏性与酸奶的食用质量呈反比关系。根据质构分析的结果可以看出,各组酸奶样品的黏性与硬度变化情况大致相同。在储藏期内,各组酸奶的黏性大致为 C₅ 组 > 对照组 > FS-2 组 > C₅FS-2 组 > C₁₀FS-2 组,表明添加 C3G 可以增加酸奶的黏性,添加 Fibersol-2 会降低酸奶的黏性。在储藏期间各组酸奶的黏性也大致呈现一定的规律性变化:随着储藏期的延长,酸奶黏性先增后降,峰值大致出现在第 14 或 21 天,而 C3G 组酸奶在储藏期期间黏性没有显著性变化。

弹性是指变形材料在力消除后恢复到初始状态

的速率和程度。弹性受很多因素影响,如热处理、蛋白质相互作用和蛋白质的展开程度等。根据质构分析的结果可以看出,在储藏期内,各组酸奶的弹性大致为 $C_{10}FS-2$ 组 $>C_5FS-2$ 组 $>FS-2$ 组 $>$ 对照组 $>C_5$ 组,表明添加 Fibersol-2 可以增加酸奶的弹性,且 Fibersol-2 与 C3G 的添加量越多,酸奶的弹性越高。

咀嚼性是咀嚼酸奶所需要的能量。根据质构分析的结果可以看出,在储藏期内,各组酸奶的咀嚼性大致为 $FS-2$ 组 $>C_5FS-2$ 组 $>C_{10}FS-2$ 组 $>$ 对照组 $>C_5$ 组,表明添加 C3G 会降低酸奶的咀嚼性。

胶着性是将半固体食物分解成碎片直到准备吞咽所需的能量,用于描述半固体食品的口感。对于酸奶来说,较低的胶着性更利于酸奶整体的质构。在储藏期内, C_5FS-2 和 $C_{10}FS-2$ 两组酸奶的胶着性略低于其他3组,但在储藏期所有组的胶着性之间并无显著性差异,表明酸奶在28 d储藏期内胶着性比较稳定,是否添加 Fibersol-2 和 C3G 对酸奶的胶着性并无显著影响。

内聚性被定义为内部结合键的力,它使酸奶结构保持完美,表示为能导致酸奶在发生破碎之前的力的大小。内聚性较佳的样品,探头也比较容易保持干净。在质构分析中,凝聚力通常为较次要参数。根据补充材料表S1质构分析的结果可以看出,在储藏期内,各组酸奶的内聚性大致为 $C_{10}FS-2$ 组 $>C_5FS-2$ 组 $>FS-2$ 组 $>$ 对照组 $>C_5$ 组,添加包载 C3G 的纳米纤维脂质体可以提高酸奶的内聚性,其内聚性强于只添加游离 C3G 的酸奶,表明用纳米纤维脂质体对 C3G 进行包埋可以帮助酸奶保持更完美的形状。在整个储藏期内,各组酸奶的内聚性也大致呈现出一定的规律性变化:随着储藏时间的延长,酸奶的内聚性逐渐降低,这可能是由于酸奶的凝胶结构逐渐减弱所造成的。

回复性对酸奶的质构影响很小,从质构分析结果可以看出,各组酸奶样品间的回复性无显著差异,且储藏期内各组酸奶的回复性均无显著变化,表明添加 C3G 或纳米纤维脂质体及储藏时间对酸奶的回复性的影响均不大。

2.4 酸奶的颜色测定结果

储藏期酸奶色度测定结果请扫描论文末页右下角二维码查看补充材料图S1。在整个储藏过程中,对照组和 $FS-2$ 组的酸奶亮度没有明显变化,而 C_5 、 C_5FS-2 和 $C_{10}FS-2$ 组酸奶的亮度低于对照组和 $FS-2$

组,这可能是因为 C3G 的添加导致了酸奶的亮度降低;并且 C_5 、 C_5FS-2 和 $C_{10}FS-2$ 组酸奶的亮度呈现出逐步增加的趋势,这可能是因为随着酸奶储藏时间的延长,牛奶中的大分子成分逐渐被降解,使得这3组酸奶外观变得更亮。

在整个储藏过程中,对照组和 $FS-2$ 组的酸奶红绿值为负值,且没有明显变化,而 C_5 、 C_5FS-2 和 $C_{10}FS-2$ 组酸奶的红绿值为正值,这与花青素在酸性条件下显红色,而在中性或近中性条件下显无色有关,由于酸奶的pH值为4~5,C3G显红色,随着储藏时间的延长,乳酸菌不断产酸使得酸奶体系的pH值降低,C3G颜色更红。因此,在储藏过程中, C_5 、 C_5FS-2 和 $C_{10}FS-2$ 组酸奶的红绿值为正值,且随储藏时间延长,红绿值逐渐增加。

在整个储藏过程中,所有配方的酸奶黄蓝度均大于0,表明所有酸奶颜色都偏黄。其中,对照组和 $FS-2$ 组的酸奶的黄度随着储藏时间的延长逐渐下降,这可能是因为酸奶中一些营养成分发生了降解,使得酸奶失去了固有的黄色;而 C_5 、 C_5FS-2 和 $C_{10}FS-2$ 组酸奶在储藏初期时黄度低于对照组和 $FS-2$ 组的酸奶黄度,而随着储藏时间的延长,出现黄度上升的情况,这可能与花青素的有色离子的转化有关,曾有研究发现富含花青素的蓝莓酸奶黄蓝度在储藏过程中发生了显著增加^[18]。

2.5 酸奶中双乙酰含量的测定结果

双乙酰是酸奶中一种主要的芳香类化合物,呈奶油似气味,主要在酸奶后熟阶段由乳酸菌代谢产生^[19]。储藏期内双乙酰含量测定结果如图3。由图3可见,在储藏期内,实验组及对照组的双乙酰含量大致呈现随时间延长不断降低的趋势。其中,

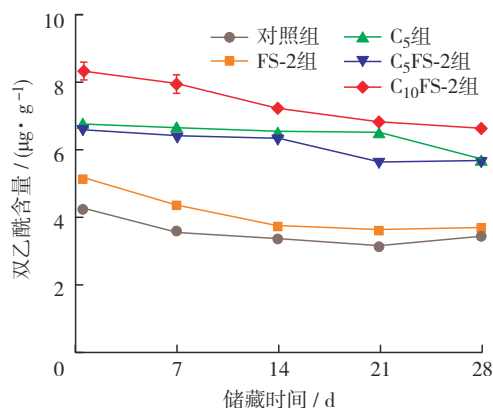


图3 不同储藏期酸奶组的双乙酰质量分数

Fig. 3 Diacetyl contents in different groups of yogurt during storage.

C₁₀FS-2 组双乙酰含量最高, 其次为 C₅ 组、C₅FS-2 组, 对照组的双乙酰含量最低, 表明添加 C3G 及 Fibersol-2 有利于酸奶中双乙酰含量的增加, 这可能与 C3G 及 Fibersol-2 的添加增加了活菌数量从而使双乙酰含量增加有关。

2.6 酸奶的持水力的测定结果

储藏期内不同组酸奶持水力测定结果如图 4。由图 4 可见, 在储藏过程中, 酸奶的持水力逐渐下降, 持水力的变化趋势可能与酸奶的凝胶结构逐渐不稳定以及发酵剂和原料的组成有关。

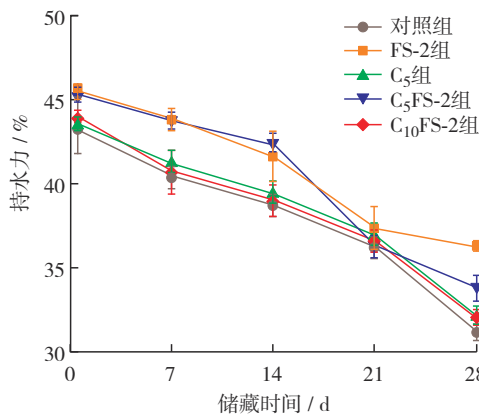


图 4 不同储藏期酸奶组的持水力

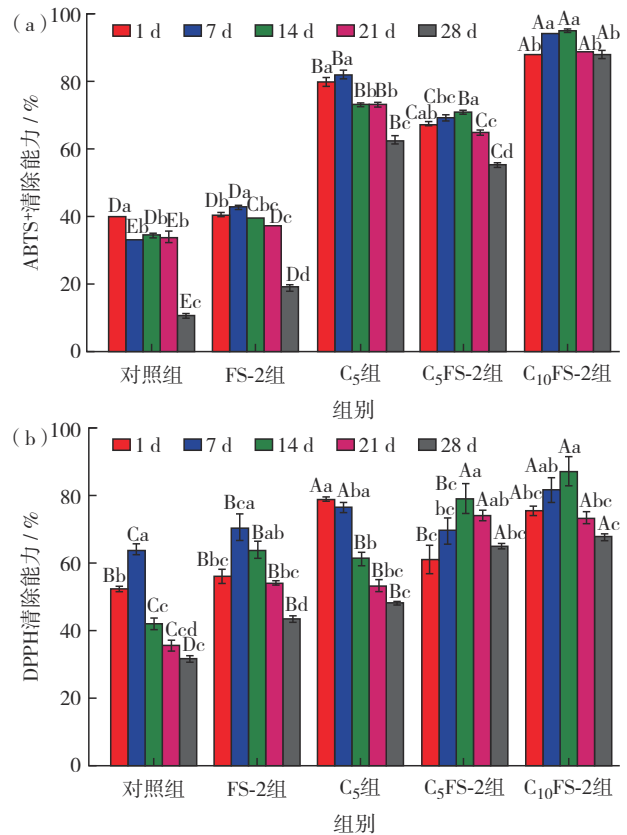
Fig. 4 Water retention of yogurt in different groups during storage.

储藏期内不同配方酸奶的持水力结果显示, 添加空白纤维脂质体、C3G 和不同纤维脂质体的酸奶持水力高于对照组, 这可能是因为实验组的活菌数量较对照组多, 分泌出了更多的胞外多糖, 胞外多糖的存在可能会增加酸奶的持水能力^[20]。此外, 包载 C3G 的纳米纤维脂质体可能与酸奶蛋白发生相互作用, 使酸奶凝胶基质增强, 得以保持更多乳清。向酸奶中添加纳米纤维脂质体后酸奶持水力增强, 有利于纳米纤维脂质体潜在的工业应用。

2.7 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率测定结果

储藏期内不同组酸奶 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除能力测定结果如图 5。由图 5 可见, 在储藏过程中, 随储藏时间延长, 酸奶的 ABTS⁺自由基清除能力呈现逐渐降低(对照组)或先增加后降低(实验组)的趋势。在储藏期间, FS-2 组酸奶的 ABTS⁺自由基清除能力均略高于对照组, 表明酸奶本身含有一定的具有 ABTS⁺自由基清除能力的成分, 结合储藏期活菌数变化情况及 ABTS⁺自由基清除能力变化情况, 推测可能是酸奶中的活菌在生长代谢过程中产生了具有 ABTS⁺自由基清除能力的物质, 如正丁

酸、油酸和乳酸。添加 C3G 的各组酸奶的 ABTS⁺自由基清除能力均高于未添加 C3G 的 FS-2 组和对照组, 表明添加 C3G 可以增强酸奶的 ABTS⁺自由基清除能力, 而 C₅FS-2 组酸奶的 ABTS⁺自由基清除能力略低于 C₅ 组, 这可能是因为经过脂质体包埋的 C3G 与酸奶中的蛋白质等物质发生相互作用, 未能游离到乳清中, 无法发挥自由基清除活性。



大写字母表示同 1 天不同组的显著性差异 ($P < 0.05$), 小写字母表示同组在储藏期内的显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 5 不同储藏期酸奶组对 (a) ABTS⁺ 和 (b) DPPH 自由基清除能力

Fig. 5 (a) ABTS⁺ and (b) DPPH free radical scavenging ability of yogurt in different groups during storage period.

从图 5 ABTS⁺和 DPPH 抗氧化性实验结果来看, 二者结果相似, 对照组酸奶对 ABTS⁺和 DPPH 都有一定的清除能力, 并且含活菌数量更高的 FS-2 组的抗氧化能力较对照组略高, 表明酸奶中本身就含有具有抗氧化活性的物质。一般来说, 益生菌酸奶产品的抗氧化活性主要是由于在酸奶的发酵过程中, 蛋白质被部分水解成具有抗氧化性的多肽和游离氨基酸^[21]。

2.8 酸奶中羰基、巯基含量的测定结果

在储藏过程中, 牛奶发生氧化会导致异味和营

养损失. 羰基化是一种非酶促并且不可逆的修饰, 牛奶被氧化产生的自由基会产生羰基化的氨基酸残基. 因此, 蛋白质羰基水平代表乳制品中蛋白质氧化程度. 储藏期内酸奶的羰基和巯基含量测定结果如图6.

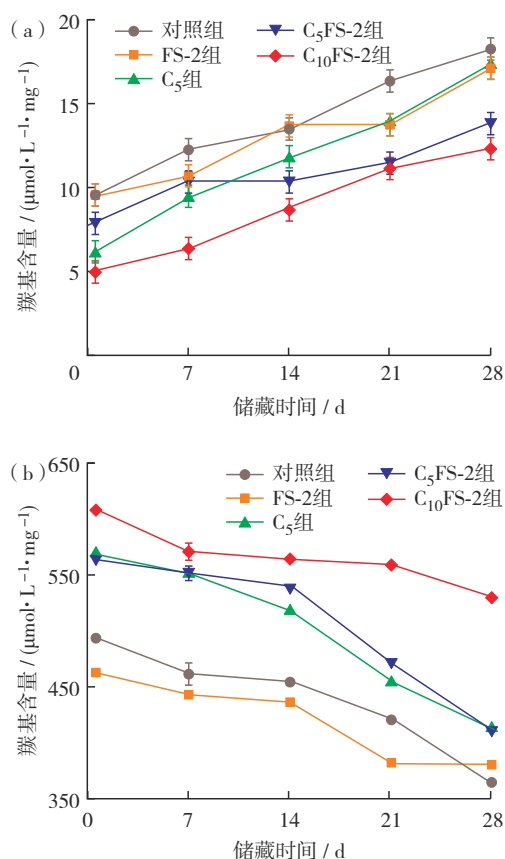


图6 不同储藏期酸奶组的(a)羰基和(b)巯基含量

Fig. 6 (a) Carbonyl and (b) sulfhydryl in different groups of yogurt during storage.

由图6(a)可见, 在储藏期内, 实验组及对照组的羰基含量随时间延长大致呈现升高趋势, 这酸奶中蛋白质的氧化不断加剧有关. 由实验结果可知, 在每个取样时间点, C₁₀FS-2组的羰基含量均低于其他组, 对照组及FS-2组的羰基含量较高, 而在第1天和第7天, C₅组羰基含量略低于C₅FS-2组羰基含量, 这可能是因为第1天和第7天, 游离的C3G抑制了蛋白质氧化, 而14 d后, 随着储藏时间的继续延长, 纳米纤维脂质体逐渐被酸奶中的乳酸菌分解, 部分C3G释放到酸奶体系中, 抑制了蛋白质的氧化. 而储藏过程中, FS-2组的羰基含量略低于对照组, 可能是因为在酸奶发酵过程中, 与对照组相比, FS-2组酸奶中产生了更多的具有抗氧化活性的代谢产物, 这也与储藏期内酸奶的ABTS⁺和

DPPH清除能力变化情况相符.

—SH是影响蛋白质功能特性的最活跃的官能团之一. 蛋白质氧化的最早现象之一是一SH转化为其他含硫的氧化物质, 而—SH基团的丧失成为蛋白质氧化的化学表现之一. 实验结果显示, 在储藏期内, 实验组及对照组的一SH含量大致呈现随储藏时间延长不断降低的趋势, 这酸奶中蛋白质会不断地被氧化有关. 根据实验结果可知, 在每个取样时间点, C₁₀FS-2组的一SH含量均高于其他组, 对照组及FS-2组一SH含量较低, 而C₅组及C₅FS-2组一SH含量中等, 且差异不大, 这可能是因为C3G抑制了蛋白质氧化. 而储藏过程中, FS-2组一SH含量略低于对照组, 可能是因为在酸奶发酵过程中, 与FS-2组相比, 对照组酸奶中产生了更多的不利于—SH形成的代谢产物. 此外, 有研究证明, 酸性环境利于蛋白质的构象变化和展开, 导致蛋白质内部的一SH暴露及S—S键断裂, 这也可能是C₁₀FS-2和C₅FS-2等组的pH值较低而—SH含量较高的原因^[22].

2.9 酸奶的挥发性风味物质分析结果

以乙醚作提取溶剂, 通过气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)定性分析, 研究添加不同配方纳米脂质体的酸奶(含对照组), 在储藏期第1、7、14、21和28天时的挥发性风味物质变化情况, 结果请扫描论文末页右下角二维码查看补充材料表S2. 经过乙醚提取后, 酸奶中的主要风味物质为酮类、醛类、醇类、酯类、酸类和烃类物质, 在储藏期第1、7、14、21和28天时的酸奶中分别有2、4、6、17、7和1种挥发性风味化合物.

酸奶中酮类物质大多是由不饱和脂肪酸氧化、降解或微生物代谢所产生的^[23]. 本研究检测出的酮类物质主要为麦芽醇和乙偶姻, 麦芽醇具有焦糖香, 在稀溶液中有草莓香, 乙偶姻具有令人愉快的奶油香味. 对照组在第1、7和14天未检测出酮类物质, 在第21天和第28天均检测出以乙偶姻为主的酮类物质. FS-2组、C₅FS-2组和C₁₀FS-2组酸奶中酮类物质含量随储藏时间延长逐渐增加. C₅组酸奶中酮类物质的含量随储藏时间延长先增后降, 在第14天达到最高.

本研究检测出的醛类物质有4种, 在储藏过程中, 各组酸奶中醛类物质检出含量大致呈下降趋势, 其中, FS-2组酸奶醛类物质含量最高, 对照组

含量最低,且 FS-2 组酸奶中所检出的醛类物质种类也最多,包括有强烈的鸡香和鸡油味的反式-2,4-癸二烯醛、有脂肪和肉类香气以及有黄瓜和鸡肉香味的反-2-辛烯醛和具有杏仁味的 3,4-二甲苯甲醛。

醇类物质赋予了酸奶浓厚的醇香,使得酸奶整体风味更佳。实验检测出的醇类物质主要有羟基香茅醇、己基卡必醇、环戊醇、糠醇、L-香芹醇和 2-庚醇。在储藏期间, C3G 组酸奶中未检测出醇类物质;对照组酸奶在第 14 天检测出了 2-庚醇,其气味特征为鲜柠檬似香气和青草-草药气味; FS-2 组酸奶在储藏期间的醇类物质含量大致呈现下降趋势; C₅FS-2 组和 C₁₀FS-2 组酸奶中酮类物质含量均呈现随储藏时间延长先增加后减少的趋势,在第 7 天达到最大值。

酯类化合物主要是由脂肪酸水解和微生物代谢产生的,对酸奶风味具有影响力的酯类物质主要是一些分子量较低的化合物^[23]。在此次实验中,酯类物质是检测出的种类最多的风味化合物。在储藏过程中,对照组和 C3G 组酯类物质含量呈现先增加后降低的趋势,其中,对照组在第 21 天达到最高,而 C3G 组在第 7 天达到最高。其余 3 组酸奶中酯类风味物质含量随储藏时间延长逐渐降低,检出的最高含量均出现在储藏期第 1 天。

酸类化合物被认为是造成酸奶酸味的主要成分。在储藏过程中,各组酸奶的酸类物质含量均呈现逐渐增加的趋势,这与储藏过程中,各组酸奶可滴定酸度均随储藏时间延长而增加的结果相符。

实验共检测出 1 种烃类物质即 p-伞花烃,且各组酸奶在不同时间的 p-伞花烃含量都很低,几乎均小于 1%,具体结果请扫描论文末页查看补充材料表 S2。

总的来说,从对酸奶中经乙醚提取的挥发性风味物质的分析结果来看,添加包载 C3G 的纳米纤维脂质体对酸奶中挥发性风味物质的含量没有显著影响。

结 语

将包载 C3G 的纳米纤维脂质体应用于酸奶,并对储藏期 28 d 内的一些酸奶理化指标进行测定。测定结果显示,添加包载 C3G 的纳米纤维脂质体可以促进益生菌增殖,增加酸奶的酸度。酸奶的色度因

牛奶大分子被分解及 C3G 在不同 pH 值条件下显色不同而发生变化。由于酸奶的凝胶结构随时间延长而逐渐松散,储藏期内酸奶持水力出现逐渐降低的情况,而添加了纳米纤维脂质体的实验组可能促进了活菌增殖,导致体系内含有更多的活菌代谢产生的胞外多糖,相对增加了酸奶的持水能力。配方中含有 C3G 的几组酸奶中检测到的双乙酰含量均远高于对照组。蛋白氧化程度评估结果显示,经过纳米纤维脂质体包埋的 C3G 对酸奶的蛋白氧化的抑制效果更好。在储藏期内,各组酸奶均具有一定的自由基清除能力,且添加 C3G 的几组酸奶的自由基清除能力更强,这与 C3G 具有抗氧化活性及酸奶中本就含有一定的具有抗氧化活性的物质有关。此外,添加包载 C3G 的纳米纤维脂质体会影响酸奶的质构,但对于酸奶中经乙醚提取的挥发性风味物质变化没有明显的影响。

因此,向酸奶中添加包载 C3G 的纳米纤维脂质体对酸奶的整体品质都有较为明显的提升。包载 C3G 的纳米纤维脂质体在酸奶中的应用也可以多方面提升酸奶品质,可以作为功能性酸奶的一种研发思路。

基金项目:广东省重点研究计划资助项目(2019B020212001)

作者简介:施报平(shibaoping2019@email.szu.edu.cn),深圳大学本科生。研究方向:食品科学。

引 文:施报平,刘晓冰,王怀旭,等.包载 C3G 的新型纳米纤维脂质体在酸奶中的应用[J].深圳大学学报理工版,2024,41(3):348-357.

参考文献 / References:

- [1] GHORBANZADE T, JAFARI S M, AKHAVAN S, et al. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt [J]. Food Chemistry, 2017, 216: 146-152.
- [2] MO Yilin, CHEN Weizhao, HUANG Lijuan, et al. Preparation of ShRNA-LDH nanoparticle and its application in biological control of Mikania micrantha [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2023, 40 (2): 163-170.
- [3] SHISHIR M R I, SUO Hao, LIU Xiaobing, et al. Development and evaluation of a novel nanofibersolosome for enhancing the stability, in vitro bioaccessibility, and colonic delivery of cyanidin-3-O-glucoside [J]. Food Research International, 2021, 149: 110712.
- [4] OHKUMA K, WAKABAYASHI S. Fibersol-2: a soluble, non-digestible, starch-derived dietary fibre [M]// MCCLEARY B V, PROSKY L. Advanced Dietary Fibre Technology. Hoboken, USA: [s. n.], 2000: 509-523.

- [5] 杨月欣, VONK R, STELLAARD F. 三种类型玉米淀粉在小肠中消化吸收的研究[J]. 营养学报, 1999, 21(3): 284-287.
- YANG Yuexin, VONK R, STELLAARD F. Digestion and absorption of three types of corn starch in small intestine [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1999, 21(3): 284-287. (in Chinese)
- [6] WANG Yong, ZHANG Di, LIU Yixiang, et al. The protective effects of berry-derived anthocyanins against visible light-induced damage in human retinal pigment epithelial cells [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(5): 936-944.
- [7] RABELO C A S, TAARJI N, KHALID N, et al. Formulation and characterization of water-in-oil nanoemulsions loaded with açai berry anthocyanins: insights of degradation kinetics and stability evaluation of anthocyanins and nanoemulsions [J]. *Food Research International*, 2018, 106: 542-548.
- [8] International Organization of Standardization. Yogurt: Enumeration of characteristic microorganisms: colony-count technique at 37 °C: ISO 7889: 2003 [S]. [S. 1.]: British Standards Institution, 2003.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准: 食品酸度的测定: GB 5009.239—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard determination of acidity in foods: GB 5009.239—2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016. (in Chinese)
- [10] 吕嘉彬, 李成涛. 酸奶中双乙酰含量的测定方法初探 [J]. 中国乳品工业, 2006, 34(1): 21-22, 31.
- LV Jiali, LI Chengtao. Discussion on the determination of diacetyl in yogurt [J]. *China Dairy Industry*, 2006, 34(1): 21-22, 31. (in Chinese)
- [11] RIENER J, NOCI F, CRONIN D A, et al. The effect of thermosonication of milk on selected physicochemical and microstructural properties of yoghurt gels during fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(3): 905-911.
- [12] TANG Peiling, CHAM X Y, HOU Xiaotao, et al. Potential use of waste cinnamon leaves in stirred yogurt fortification [J]. *Food Bioscience*, 2022, 48: 101838.
- [13] ZHOU Siduo, XU Xiao, LIN Yanfei, et al. On-line screening and identification of free radical scavenging compounds in *Angelica dahurica* fermented with *Eurotium cristatum* using an HPLC-PDA-Triple-TOF-MS/MS-ABTS system [J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 670-678.
- [14] CITTA A, FOLDA A, SCALCON V, et al. Oxidative changes in lipids, proteins, and antioxidants in yogurt during the shelf life [J]. *Food Science & Nutrition*, 2017, 5(6): 1079-1087.
- [15] BEVERIDGE T, TOMA S J, NAKAI S. Determination of SH-and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent [J]. *Journal of Food Science*, 1974, 39: 49-51.
- [16] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准: 发酵乳: GB 19302—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standard fermented milk: GB 19302—2010 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2010. (in Chinese)
- [17] BATISTA A L D, SILVA R, CAPPATO L P, et al. Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 38, 242-250.
- [18] ŚCIBISZ I, ZIARNO M, MITEK M, et al. Effect of probiotic cultures on the stability of anthocyanins in blueberry yoghurts [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2012, 49(2): 208-212.
- [19] KRISTENSEN D, SKIBSTED L H. Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(8): 3099-3104.
- [20] PRASANNA P H P, GRANDISON A S, CHARALAMPOPOULOS D. Microbiological, chemical and rheological properties of low fat set yoghurt produced with exopolysaccharide (EPS) producing *Bifidobacterium* strains [J]. *Food Research International*, 2013, 51(1): 15-22.
- [21] GERMANI A, LUNEIA R, NIGRO F, et al. The yogurt amino acid profile's variation during the shelf-life [J]. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunita*, 2014, 26(3): 205-212.
- [22] SUN Yizhou, CHEN Haiming, CHEN Wenxue, et al. Effect of ultrasound on pH-shift to improve thermal stability of coconut milk by modifying physicochemical properties of coconut milk protein [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2022, 167: 113861.
- [23] GÜLER Z. Changes in salted yoghurt during storage [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2007, 42(2): 235-245.

【中文责编: 晨兮; 英文责编: 艾琳】



补充材料