

大豆亲脂蛋白-甲基纤维素 W/O/W 乳液稳定性研究

李 杨^{1,2} 李礼佳¹ 和铭钰¹ 杨浩冬¹ 孔 洋¹ 滕 飞¹

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 国家大豆工程技术研究中心, 哈尔滨 150030)

摘要: 采用大豆亲脂蛋白(Soybean lipophilic protein, LP)和甲基纤维素(Methyl cellulose, MC)的复合物作为亲水性乳化剂形成 W/O/W 乳液外水相,以聚蓖麻酸甘油酯(Polyglycerol polyricinoleate, PGPR)为亲脂性乳化剂,橄榄油为油相,并以维生素 B₁₂为指示剂,按两步法制备 W/O/W 型双层乳液。通过对微观结构、储藏稳定性、粒径、电位、乳液粘弹性等指标的测定,探究不同外水相比例及复合物中 LP 与 MC 的不同比例对 W/O/W 乳液稳定性的影响。实验结果表明:当 LP 与 MC 质量比为 3:1,外水相质量分数为 70% 时,W/O/W 乳液液滴间的作用力最强、粒径最小、Zeta-电位绝对值最大、对活性物质的保护作用最强,28 d 储藏稳定性指数较高,流变学性质较好。

关键词: 大豆亲脂蛋白; 甲基纤维素; W/O/W 型双层乳液; 稳定性

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2022)07-0395-09 OSID: 

Preparation and Stability Charaterization of Soybean Lipophilic Protein – Methyl Cellulose W/O/W Emulsion

LI Yang^{1,2} LI Lijia¹ HE Mingyu¹ YANG Haodong¹ KONG Yang¹ TENG Fei¹

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

2. National Soybean Engineering Technology Research Center, Harbin 150030, China)

Abstract: Soybean lipophilic protein and methyl cellulose complex were used as hydrophilic emulsifiers to form the outer phase of W/O/W emulsion. Using PGPR as lipophilic emulsifier, olive oil as oil phase and vitamin B₁₂ as indicator, W/O/W emulsion was prepared by a two-step method. The effects of the ratio of LP to MC in the complex and outer phase on the stability of W/O/W emulsion were investigated by means of laser scanning confocal microscope, optical microscope, particle size, Zeta-potential, rheological properties and stability index. The experimental results showed that when LP: MC was 3: 1 and the external water phase ratio was 70% , the force between the droplets of W/O/W emulsion was the strongest, and the particle size was the smallest, the absolute value of Zeta-potential was the largest, the protection of active substances was the strongest, and 28 d storage stability index and rheological properties were the best. The development of emulsifier for W/O/W emulsion was helpful to improve its stability. Aiming to provide a strong basis for the use of soybean lipophilic protein as emulsifier, and further explore the effect of its interaction with methylcellulose on the emulsifying properties, the research result can also provide a theoretical basis for the application of soybean lipophilic protein and methyl cellulose in W/O/W emulsion system, and provide reference for improving the stability of bioactive substance delivery system.

Key words: soybean lipophilic protein; methyl cellulose; W/O/W emulsion; stability

0 引言

双层乳液常指乳液以小液滴的形态分散在另一种乳液系统中^[1]。作为双层乳液的一种,W/O/W

型双层乳液的内水相分散在油相中,油相又均匀分散在外水相中从而形成一种两膜三相结构^[2]。这种特殊的结构使 W/O/W 乳液在医疗、化妆品、食品领域中有广泛的应用前景。食品中 W/O/W 型双重

收稿日期: 2021-08-10 修回日期: 2021-09-18

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(32001686)和黑龙江省自然科学基金项目(LH2020C028)

作者简介: 李杨(1981—),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: yangli@neau.edu.cn

通信作者: 滕飞(1986—),女,副教授,博士,主要从事生命科学研究,E-mail: tengfei@neau.edu.cn

乳液常用于低热量食物的制备,活性物质的包埋和控释以及动物脂肪替代品制备^[3-5]。然而,双层乳液在热力学上不稳定,其失稳机制常表现为内水相或油相的聚集、内外水相之间的成分迁移^[6]。有研究表明,将生物大分子作为乳化剂应用于双层乳液体系中能很好地提高其稳定性^[7]。常见的食品级生物大分子有蛋白,如乳清蛋白、牛血清蛋白、大豆分离蛋白,多糖如果胶、阿拉伯胶、羧甲基纤维素等,这些生物大分子主要靠空间阻力和静电斥力来稳定乳液^[8]。将蛋白-多糖复合物作为乳化剂可以结合蛋白的乳化性和多糖的功能性,并通过吸附在双层乳液的油水界面来影响其稳定性。

大豆亲脂蛋白(LP)是一种富含磷脂的大豆蛋白组分^[9],主要成分是油体蛋白和磷脂。近年来,LP因其良好的理化特性和营养效益在食品工业中被广泛应用^[10-11]。文献[12]研究发现,LP能降低界面张力,提高大豆分离蛋白的溶解性以及改善界面特性;文献[10]发现LP作为乳化剂有巨大的潜力。

甲基纤维素(MC)是一种长链的非离子纤维素醚,易溶于水,水溶液在常温下高度稳定。MC应用广泛,常作为乳化剂、稳定剂、增稠剂应用于食品工业中。由MC制成的膜可以有效地阻止水分、油脂的迁移。文献[13]发现MC与玉米醇溶蛋白复合形成的膜具有良好的拉伸强度以及包裹性。

本文通过将LP与MC相互作用形成的混合物作为亲水性乳化剂添加到外水相,并以维生素B₁₂为指示剂制备W/O/W双层乳液,来改善油水界面的性质并增强双层乳液的稳定性。通过对比不同比例下LP与MC、初乳与外水相制备乳液的微观结构、流变学性质、稳定性等的表征来确定双层乳液的最优工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

橄榄油,聚甘油蓖麻醇酸酯,甲基纤维素,维生素B₁₂,正己烷、甲醇、乙醇、冰醋酸、β-巯基乙醇;尼罗红、尼罗蓝,实验用大豆(东农42,含有41.2%的粗蛋白,11.7%的水分,23.6%的脂肪和4.1%的灰分),十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、考马斯亮蓝R250;所用水均为蒸馏水。

1.2 仪器与设备

电泳仪,美国BIO-RAD公司;制备型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;Mastersizer 2000型激光粒度分析仪,Nano-ZS型电位测定仪,英国Malvern公司;GLH-220型高速乳化均质机,美国

Omni公司;科研级正置显微成像系统,中国奥林巴斯有限公司;TSC SP8型激光共聚焦显微镜,德国徕卡公司;实验型高压均质机,英国安盛联合科技有限公司;HJ-3恒温磁力搅拌器,江苏金坛市中大仪器厂;紫外可见光分光光度计,日本岛津仪器有限公司;MCR302型旋转流变仪,奥地利安东帕公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆亲脂蛋白提取

大豆亲脂蛋白的提取参考文献[9]的方法并作一定的修改。将大豆研磨成粉并过60目筛。过筛后的大豆粉加入正己烷并进行搅拌后离心,取沉淀继续加入正己烷搅拌,重复上述步骤3次以保证最大程度脱脂。将最后一次所得沉淀在70℃下处理2 h,此时氮溶解指数降为75%。称取干热后的脱脂大豆粉50 g加入到400 mL蒸馏水中,用NaOH调pH值为8,在20℃下搅拌1 h后4℃下4 000 g离心15 min,取上清液加入10 mmol/L的Na₂SO₃并用H₂SO₄将pH值调至5.8,随后在4℃下4 000 g离心15 min,取上清液并用H₂SO₄调节pH值至5.0,并在55℃下加热15 min。然后加入50 mmol/L NaCl并用NaOH调节pH值至5.5,并在4℃下4 000 g离心15 min,收集沉淀,即为大豆亲脂蛋白,将收集后的沉淀进行冷冻干燥,20℃下保存备用。

1.3.2 LP特征测定

蛋白质含量测定参照GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法;灰分含量的测定参照GB 5009.4—2016《食品中灰分的测定》;脂肪含量测定参照GB 5009.6—2016《食品中脂肪的测定》的索氏抽提法。将LP溶于去离子水中,配制成质量浓度为2 mg/mL的溶液,取0.5 mL样品溶液并加入0.5 mL样品缓冲液(0.2 mL 10% SDS和50 μL 0.01 mol/L的β-巯基乙醇),100℃煮沸5 min后上样,上样量为20 μL。使用浓缩胶体积分数5%、分离胶体积分数12%,电压恒定为120 V。胶板用考马斯亮蓝R-250染色1 h后,用甲醇-冰醋酸溶液脱色至胶板背景清晰。

1.3.3 W/O/W型双层乳液制备

W/O/W型双层乳液的制备采用两步法。首先制备W₁/O初级乳液:向0.2%的维生素B₁₂溶液中加入0.1 mol/L NaCl制成W₁;向橄榄油中加入聚甘油蓖麻醇酸酯(PGPR)使其质量分数为5%,制成油相(O);将W₁与O以质量比1:4混合并在25℃下以剪切速率10 000 r/min均质10 min得到W₁/O初乳;W₁/O/W₂制备:将LP与MC分别按质量比3:1、1:1、1:3混合并溶于蒸馏水中制得4%的LP-MC溶液,制得W₂^[14]。另取LP加入到蒸馏水中制成质

量分数为 4% 溶液用作空白对照的 W_2 ；将 W_1/O 与 W_2 分别以质量比 3:7 和 2:8 混合,并在 25℃ 下以剪切速率 8 000 r/min 均质 10 min 制得 $W_1/O/W_2$ 粗乳。将所得粗乳在 40 MPa 下高压均质制备成最终的 W/O/W 型双层乳液,并在 4℃ 保存备用^[15]。

1.3.4 W/O/W 乳液液滴微观结构测定

(1) 光学显微镜

取一定量制备好的 W/O/W 双层乳液于载玻片上,用蒸馏水稀释后盖上盖玻片,用科研级正置显微成像系统在 40 倍和 100 倍镜下观察,并拍下双层乳液的显微图像^[16]。

(2) 激光共聚焦显微镜

参考文献[17]的方法并做一定的修改,使用激光共聚焦显微镜对双层乳液进行显微观察。蛋白质和油脂分别用 0.1% 尼罗蓝和 0.1% 尼罗红染色。将乳液用去离子水稀释 100 倍,并将 50 μ L 混合染料(尼罗蓝与尼罗红体积比为 1:1)加入到 1 mL 稀释后的乳液并在室温(20℃)下避光染色 30 min。取大约 30 μ L 样品于载玻片上并盖上盖玻片用 40 倍油镜观察。尼罗蓝的激发波长为 510 nm,检测波长为 530 ~ 590 nm 且尼罗红的激发波长为 561 nm,检测波长为 570 ~ 620 nm。每个样品至少获得 5 幅图像。光学和激光共聚焦显微镜图像使用 Adobe Illustrator 软件处理。

1.3.5 粒径测定

采用 Mastersizer 2000 型激光粒度分析仪测定乳液的粒径以及粒度分布指数。将待测乳液用蒸馏水稀释 1 000 倍,制成质量分数为 0.1% 的水溶液;其中分散相 W_1/O 的液滴折射率为 1.50,连续相水折射率为 1.33^[18]。将样品放入样品皿中,试验结果采用体积加权平均值 $D_{4,3}$ 表示,每个样品测定 3 次,取平均值。

1.3.6 Zeta-电位测定

参考 1.3.3 节,同样将 W/O/W 双层乳液用蒸馏水稀释 1 000 倍,用 Nano-ZS 型电位测定仪测定乳液液滴的 Zeta-电位,每个样品测 3 次,取平均值。

1.3.7 乳化活性与乳化稳定性测定

参考文献[19]的方法,并做一定改进。吸取制备后的双层乳液 20 μ L,将其加入到 4 mL 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS)溶液中混合均匀。测定其在 500 nm 波长下的吸光度 A_0 ,静置 30 min 后测定其吸光度 A_{30} 。乳液活性指数(EAI)和乳液稳定性指数(ESI)计算公式为

$$E_{AI} = 2 \times 2.303 \frac{A_0 N}{C \theta \times 10\,000} \tag{1}$$

$$E_{SI} = \frac{30A_0}{A_0 - A_{30}} \tag{2}$$

式中 E_{AI} ——乳化活性指数, m^2/g
 E_{SI} ——乳化稳定性指数, min
 N ——稀释倍数,取 200
 C ——双层乳液形成前外水相添加的蛋白质的质量浓度, g/mL
 θ ——双层乳液中油相的体积分数

1.3.8 乳液流变测定

采用 MCR302 型旋转流变仪测定双层乳液的流变性质。将每个样品取 2 mL 置于直径 50 mm 的平行板之间,测量间隙设置为 1 mm,温度设置为 25℃。剪切速率范围为 0.1 ~ 100 s^{-1} ,以对数变化规律扫描黏度曲线;在 0.1 ~ 100 rad/s 的频率范围内,在线性粘弹性范围内施加 1% 的应变进行动态频率扫描^[20]。

1.3.9 储藏稳定性测定

参考文献[21]等的方法并做一定的修改,通过双层乳液重力分层的情况来测定储藏稳定性。将刚制备好的双层乳液以及在 4℃ 下储藏 0、7、14、28 d 时的 W/O/W 乳液分别装入试管中,双层乳液在储藏过程中会出现分层,上层为乳液保留层,下层为透明或浑浊层。其稳定性指数计算公式为

$$S = \frac{H_0 - H_1}{H_0} \times 100\% \tag{3}$$

式中 S ——乳液稳定性指数, %
 H_0 ——乳液样品高度, cm
 H_1 ——分层后乳液下层高度, cm

1.3.10 维生素 B₁₂ 释放率测定

对制备完成的样品分别在储存 0、7、14、28 d 时测定所包裹的维生素 B₁₂ 的释放率。每个待测样品取 10 mL 装入离心管中,在 23℃、3 000 g 下离心 30 min 后收集上层清液,利用紫外分光光度计在 361 nm 测定收集液体的吸光度,计算出维生素 B₁₂ 含量^[11],并根据计算所得维生素 B₁₂ 浓度求出释放率。计算公式为

$$R = \left(1 - \frac{C_1 - C_2}{C_1}\right) \times 100\% \tag{4}$$

式中 R ——维生素 B₁₂ 释放率, %
 C_1 ——内水相初始维生素 B₁₂ 质量浓度, g/mL
 C_2 ——离心后收集清液中维生素 B₁₂ 质量浓度, g/mL

1.4 统计分析

所有实验重复 3 次,结果取平均值。利用 SPSS 18.5 软件对数据进行 ANOVA 差异显著性分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著。采用 Origin 8.5 软件进行制图。

2 结果与讨论

2.1 LP 基本特征

经实验测得,LP 中蛋白质质量分数为 76.26%,脂肪质量分数为 11.47%,灰分质量分数为 5.58%。由于 LP 含有大量磷脂,所以 LP 中的脂肪含量较高,这也与文献[9]测定的结果相似。

由图 1(图中 Marker 表示蛋白条带所对应的分子量)可知,LP 蛋白主要含有 7S 和 11S 球蛋白,与大豆分离蛋白的结构相似,这可能是 LP 疏水性大且易与磷脂类物质结合的原因^[9-10]。此外,LP 还含有分子质量为 17、18、24、34 ku 的油性蛋白,其条带模糊的原因可能是蛋白-磷脂结合物对考马斯亮蓝的敏感度低。

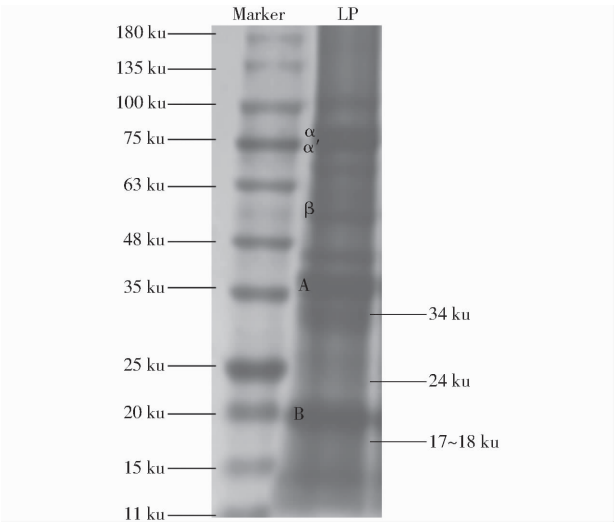


图 1 LP 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis map of LP

2.2 W/O/W 乳液微观形态表征

2.2.1 光学显微镜表征

图 2 为由 LP-MC 复合物和 LP 稳定的 W/O/W 乳液在光学显微镜下的微观结构图像。由图 2 可知,W/O/W 乳液的液滴为球型,大小均匀,且在液滴内部形成了大小不一的小液滴,符合 W/O/W 乳液“两膜三相”的结构。当连续相由 LP 与 MC 质量比为 3:1 的复合物稳定时,W/O/W 乳液的液滴大小、分布最为均匀。当外水相占比较大时,液滴更容易发生聚集,这是由于外水相中复合物含量更高,附着在液滴表面的复合物之间相互吸引导致液滴发生了桥连絮凝现象^[15,22];这种现象在复合物中 LP 与 MC 质量比为 1:3 时最明显,这是由于较高含量的 MC 增加了复合物的黏度,使其牢牢吸附在液滴表面的同时也提高了整个连续相的黏度,导致液滴之间更容易相互吸引。而由 LP 与 MC 质量比为 1:1 的复合物和 LP 稳定的 W/O/W 乳液虽然液滴大小

均匀,但液滴之间发生了奥斯特熟化作用,打破了液滴的稳定状态^[23],这可能是由于较小的液滴表面存在较大的表面张力,而附着在液滴表面的乳化剂不能很好地降低张力对液滴的影响,造成了小液滴被大液滴逐步吸收的情况^[24]。而由复合物稳定的 W/O/W 乳液中这种情况得以改善,说明将 MC 与 LP 复合对提高 W/O/W 乳液的稳定性有积极作用。

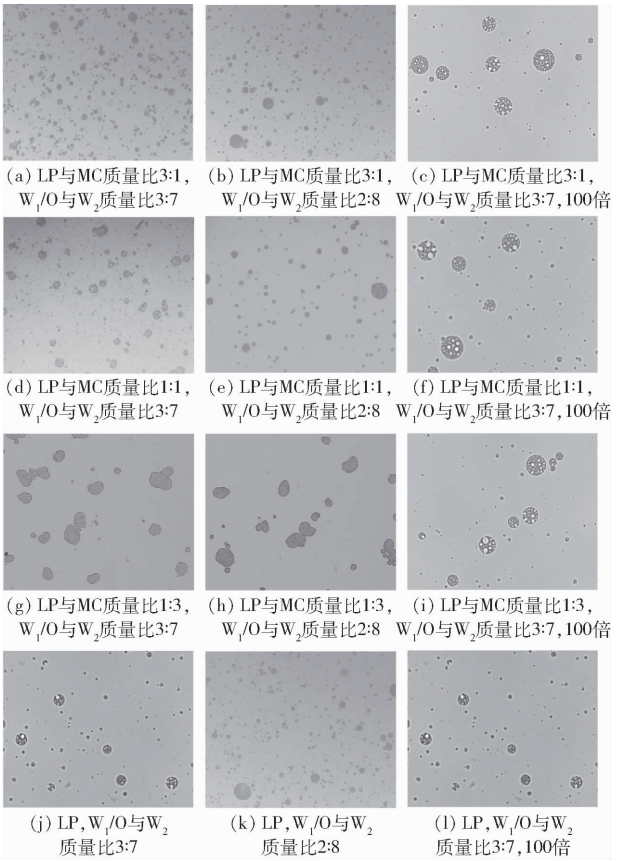


图 2 LP 和 LP-MC W/O/W 乳液光学显微镜图像

Fig. 2 Optical microscope images of LP and LP-MC W/O/W emulsions

2.2.2 激光共聚焦显微镜表征

图 3 为 W/O/W 乳液在激光共聚焦显微镜下的微观结构。在 W/O/W 乳液中,油滴呈红色球状分布,LP-MC 复合物呈绿色颗粒状分布在油滴表面和连续相中,油滴内部水相呈黑色球状分布。由图 3 可知,LP-MC 与 LP 相比具有更大的黏度和更好的吸附性,但当外水相比比例更大时,液滴更易发生聚集,这是由高含量的复合物使液滴之间发生粘连所造成的。当 LP 与 MC 质量比为 3:1 时,可以清楚地看到 LP-MC 复合物在油滴外侧形成的圆环,说明此时复合物对油滴形成了较好的包裹;当 LP 与 MC 质量比为 1:1 时,尽管液滴呈现均匀分布,但液滴尺寸出现差异,且液滴周围存在较多的蛋白,这可能是在此比例下,LP-MC 复合物不能很好地包裹住液滴,导致部分液滴一侧有更多的蛋白聚集并改

变了液滴的形状;当 LP 与 MC 质量比为 1:3 时,可以明显地观察到液滴之间的复合物使其发生了不同程度的粘连,造成液滴大小不一,这也与前面的结论一致;当外水相仅有 LP 时,分布在液滴周围的蛋白形成膜不明显,蛋白分散程度高,且较小液滴趋向聚集。以上结果也证明,LP-MC 复合物稳定的 W/O/W 乳液可以对液滴形成更好地包裹,且当 LP 与 MC 质量比为 3:1 时对液滴的包裹效果最好,液滴也更均一。

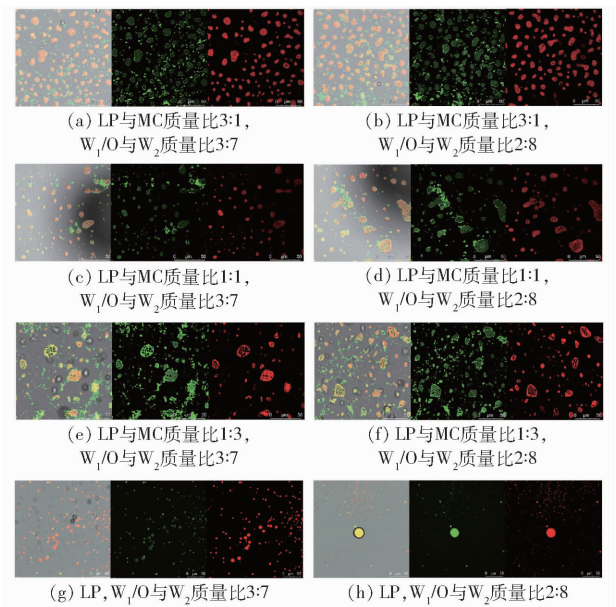


图 3 LP 和 LP-MC W/O/W 乳液激光共聚焦图像
Fig.3 Laser confocal images of LP and LP-MC W/O/W emulsions

2.3 W/O/W 乳液粒径和 Zeta-电位

乳液粒径及其分布是乳液的重要性能指标,常用于评价乳液的稳定性^[25]。表 1 为不同蛋白与多糖比例形成的复合物以及外水相下的 W/O/W 乳液的粒径和电位。由表 1 可知,在乳化剂相同的情况下,外水相大的 W/O/W 乳液具有更大的粒径,这是由于乳液外水相的生物大分子含量高,且液滴间的作用力不同导致较大液滴的形成;此外,当外水相比例相同时,LP 与 MC 质量比为 1:3 的复合物稳定的 W/O/W 乳液具有最大的粒径,这可能是由于此比例下的复合物黏度较大,高含量的 MC 同样也提高了外水相的黏度,最终导致液滴之间发生了桥连絮凝^[14];当外水相仅有 LP 时,乳液也拥有较大粒径,这可能是由于大量的蛋白吸附在水-油界面导致界面张力的变化从而打破了乳液体系的平衡,造成小液滴破裂并被较大液滴吸收,这也与显微镜观察的结果一致。

Zeta-电位一般用来评价或预测乳液的物理稳定性,其在一定程度上可以反映乳液液滴间相互作用

的大小,Zeta-电位绝对值越高,粒子间的静电斥力也就越大,物理稳定性也就越好^[26]。由表 1 可知,外水相质量分数为 80% 的乳液的电位绝对值略低于外水相质量分数为 70% 的乳液,这可能是由于高比例的外水相中液滴分散程度大,导致液滴之间的静电斥力减弱;随着 LP 含量在复合物中的提高,W/O/W 乳液的电位绝对值呈增长趋势,且在 LP 与 MC 质量比为 3:1 时达到最大,说明此时乳液液滴之间的静电斥力最强,这可以防止液滴之间发生聚集,提高乳液的稳定性^[27-28]。当 LP 与 MC 质量比为 1:3 时,乳液的电位绝对值与仅有 LP 稳定的乳液相似,这可能是由于油滴间因复合物黏性过大发生了聚集,液滴之间的斥力减弱,由于 MC 为非离子型多糖,所以过多的 MC 存在并不会增加液滴的表面电荷^[29],这也是此比例下乳液电位绝对值不高的原因。

表 1 LP 和 LP-MC W/O/W 乳液的粒径和电位
Tab.1 Particle size and potential of LP and LP-MC W/O/W emulsions

LP 与 MC 质量比	W ₁ /O 与 W ₂ 质量比	粒径/nm	Zeta-电位/mV
3:1	3:7	(815.66 ± 16.92) ^d	(-47.76 ± 2.12) ^a
	2:8	(1 130.67 ± 40.21) ^d	(-46.53 ± 2.03) ^a
1:1	3:7	(975.67 ± 40.52) ^c	(-28.71 ± 1.32) ^b
	2:8	(1 315.42 ± 57.97) ^b	(-28.43 ± 2.80) ^b
1:3	3:7	(2 824.31 ± 35.79) ^b	(-24.53 ± 1.71) ^c
	2:8	(3 031.45 ± 34.50) ^b	(-23.55 ± 1.76) ^c
LP	3:7	(3 241.37 ± 37.64) ^a	(-22.66 ± 1.01) ^d
	2:8	(3 620.66 ± 31.64) ^b	(-21.86 ± 1.11) ^d

注:同列数据不同字母表示差异显著(P<0.05),下同。

2.4 LP-MC 乳化活性和乳化稳定性

不同复合物及外水相比比例制备的 W/O/W 双层乳液对 LP-MC 复合物乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性指数(ESI)的影响如图 4(图中不同字母表示差异显著,P<0.05,下同)所示。由图 4 可知,与 LP 相比,LP-MC 复合物具有更高的 EAI,这可能由于 MC 与 LP 的复合物的形成使外水相中较分散的蛋白质分子分布更加致密从而使蛋白质分子间的静电相互作用增强^[30]。当外水相质量分数为 70% 时,LP-MC 的 EAI 较高,但当外水相质量分数为 80% 时,LP 与 MC 质量比为 1:3 的复合物具有更高的 EAI,这可能是由于较多的 MC 使外水相黏度增加,更多的复合物吸附到了乳滴的表面,导致界面张力升高,影响了 LP-MC 复合物在界面上的乳化能力^[31];仅由 LP 稳定 W/O/W 乳液时,LP 的 EAI 最低,这是由于 LP 在乳滴界面上的吸附量达到饱和,其余高度分散在外水相中的 LP 与界面上的 LP 之

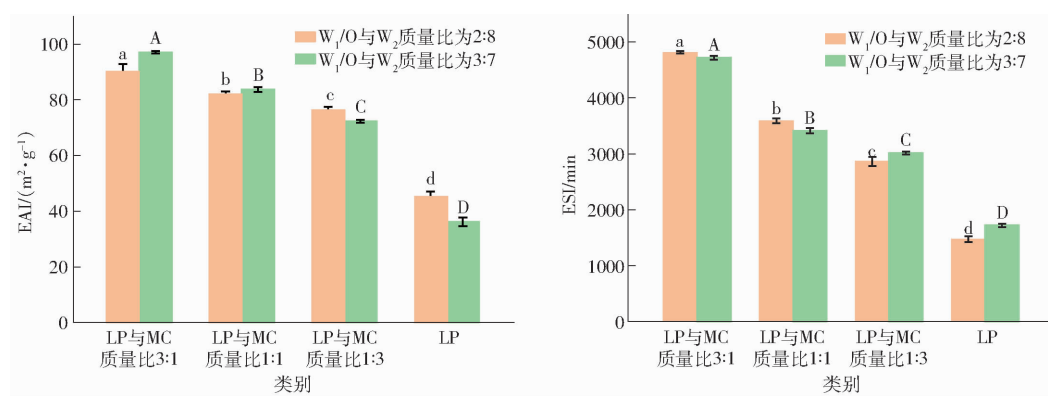


图 4 不同比例下的 LP-MC 的 EAI 和 ESI

Fig. 4 EAI and ESI of LP-MC in different proportions

间的相互作用导致了乳液体系的紊乱,从而影响了其乳化能力。

由图 4 可知,在 LP-MC 复合物稳定的 W/O/W 乳液中,随着 MC 比例的增加,LP-MC 复合物的乳化稳定性逐渐下降,这可能是由于较高含量的 MC 会使复合物及外水相黏性增加,更多的复合物吸附到了乳滴的表面,界面上较高含量的复合物不仅与添加的亲脂性乳化剂 PGPR 产生竞争,同时也会使液滴之间相互吸附造成液滴的聚集或破乳从而导致 LP-MC 复合物乳化稳定性下降,这也与 2.1 节中结论一致;而由 LP 稳定的乳液中,LP 的乳化稳定性最低,这可能是由于外水相中游离的蛋白质之间的吸附力较大,从而加速了蛋白质和液滴的聚集,造成了 LP 乳化稳定性下降^[32]。

2.5 W/O/W 乳液流变学性质

2.5.1 W/O/W 乳液黏度

流变学是研究物质在外力作用下变形和流动的科学,研究对象主要是流体。乳液的流变特性与其内部体系密切相关,反映乳液的微观结构。食品中的乳液体系,大部分都有剪切变性的行为^[33],包括剪切变稀和剪切增稠。图 5 是 W/O/W 乳液在剪切速率 0.1~100 s⁻¹ 下的黏度变化曲线。由图 5 可

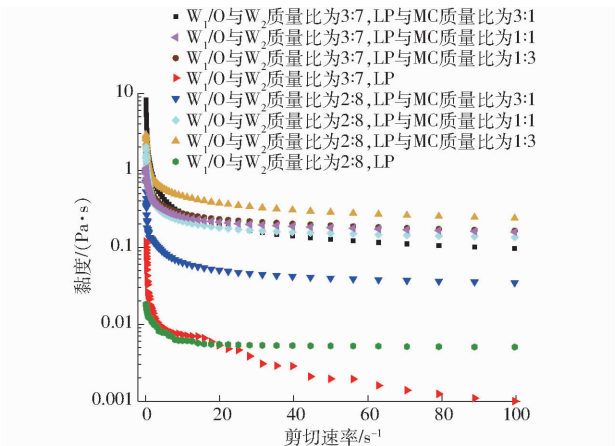


图 5 LP 和 LP-MC W/O/W 乳液黏度

Fig. 5 Viscosity of LP and LP-MC W/O/W emulsions

知,随着剪切速率的增加乳液的黏度不断降低,表现出剪切稀释现象。随着 LP-MC 复合物的添加,乳液的黏度有了明显提高,当 LP 与 MC 质量比为 1:3 且外水相占比更大时,W/O/W 乳液的黏度最大,这也与之前的结论一致;随着剪切速率的提高,外水相占比 80% 的 W/O/W 乳液黏度下降速率逐渐大于占比 70% 的 W/O/W 乳液,这可能是由于剪切的过程中液滴间网络的断裂,且外水相占比大的 W/O/W 乳液液滴分散程度大,断裂后的液滴间网络重组速度小于网络断裂速度,导致分子间作用力降低,进而使黏度降低^[34]。当外水相仅有 LP 时,W/O/W 乳液在剪切区间表现出较低的黏度,这可能是在剪切过程中油滴表面吸附的蛋白与油滴发生分离,乳液的流动性变大,最终导致乳液的黏度最小。

2.5.2 W/O/W 乳液储能模量和损耗模量

乳液的粘弹性可以用储能模量 G' 和损耗模量 G'' 来表征,LP-MC 复合物稳定的 W/O/W 乳液 G' 和 G'' 随频率变化的关系如图 6 所示。由图 6 可知,W/O/W 乳液的 G' 及 G'' 在剪切频率范围内表现出很强的频率依赖性,随频率增加而明显增加,这可能是由于 LP-MC 复合物的添加使乳液的粘弹性增加;另外,剪切一方面促进分子网络结构的形成,增大弹性模量,一方面又使乳液体系剪切变稀,增大了流动性。在测试区间,LP-MC 复合物稳定的 W/O/W 乳液 G' 明显大于 G'' ,并且 G' 和 G'' 之间没有交叉,表现出较好的弹性行为,也说明了 W/O/W 液滴间形成了以弹性为主的网络结构^[14]。当 LP 与 MC 质量比为 1:3 时,外水相占比大的 W/O/W 乳液表现出更好的弹性形变,这可能是由于外水相高含量的复合物提高了连续相的黏度,这也与激光共聚焦的观察结果一致。而由 LP 稳定的 W/O/W 乳液 G'' 高于 G' ,乳液在剪切时主要发生黏性形变,乳液呈液态,这也说明仅由 LP 稳定的 W/O/W 乳液黏性较低。以上结果说明将 LP-MC 复合物添加到 W/O/W 乳

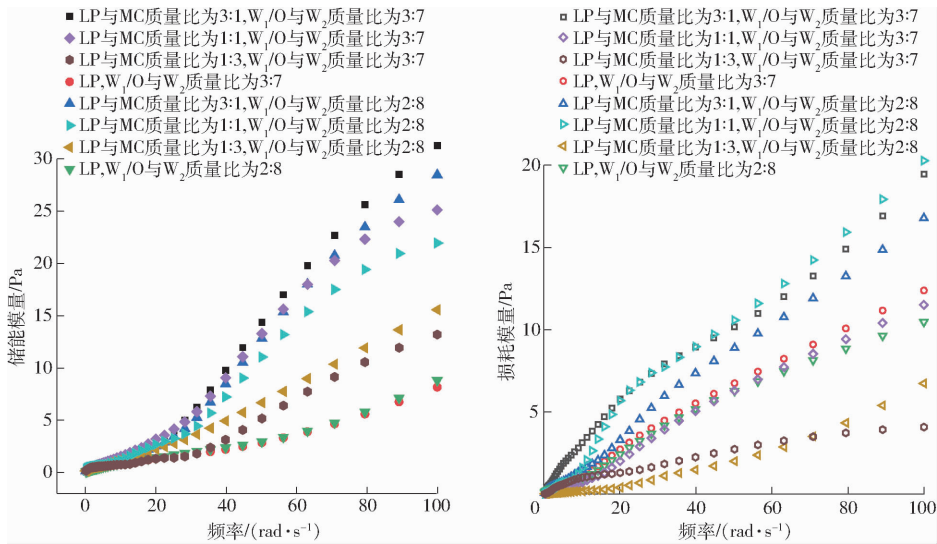


图 6 LP 和 LP - MC W/O/W 乳液的储能模量和损耗模量
Fig. 6 Storage modulus and loss modulus of LP and LP - MC W/O/W emulsions

液连续相中可以提高乳液的抗形变能力^[24],且 MC 的引入更加利于液滴间凝胶网络的形成^[35]。

2.6 W/O/W 乳液储藏稳定性

W/O/W 乳液的储藏稳定性与其产品的货架期密切相关,不同条件制备乳液的稳定性如图 7 所示。由图 7 可知,随着储藏时间的增加,W/O/W 乳液的稳定性都出现了一定的下降,这可能是由于双层乳液在储藏过程中发生了一定程度的相分离或聚

合^[2]。经过 28 d 的存储,由 LP - MC 复合物稳定的 W/O/W 乳液稳定性指数保持在 60% 以上,但外水相为 80% 的 W/O/W 乳液稳定性略低于外水相为 70% 的乳液,这可能是由于高外水相的乳液中液滴分散程度不均一旦复合物含量较高导致液滴间相互作用力不同,造成了乳液的稳定性降低。当 LP 与 MC 质量比为 1:3 时液稳定性下降趋势较大,这可能是由于外水相中过量的多糖可能会产生絮凝现象使

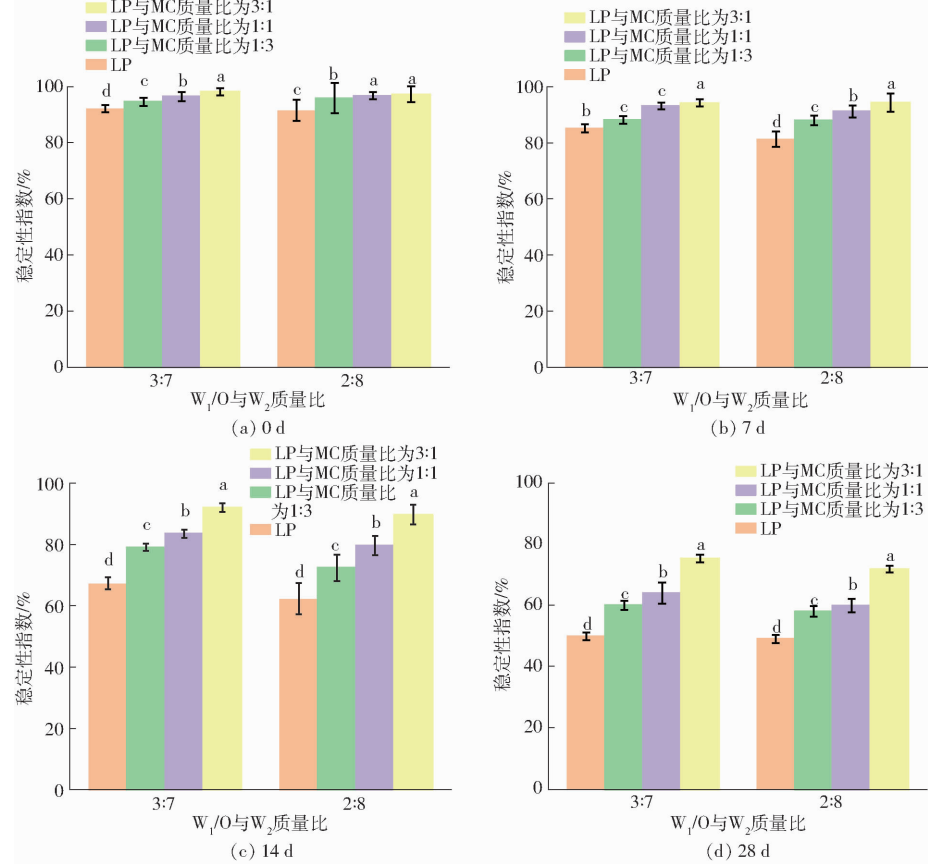


图 7 LP 和 LP - MC W/O/W 乳液的储藏稳定性
Fig. 7 Storage stability of LP and LP - MC W/O/W emulsions

乳液的稳定性下降^[27,36],由 LP 稳定的 W/O/W 乳液稳定性下降趋势与其相同,这可能是由于过多的蛋白颗粒会使液滴表面张力增加从而产生交联,最终导致破乳^[24]。

图 8 为 W/O/W 乳液储藏期间的图像记录。由图 8 可知,所有新制备的 W/O/W 乳液均为粉白色,且乳液没有油脂析出,流动性良好。随着储藏时间的延长,W/O/W 乳液发生了不同程度的分层,主要表现为乳脂层上浮和水相的析出,析出的水相逐渐由浑浊变为清澈,这是由于经过长时间的储藏,乳液的液滴发生了聚集,部分液滴裂解,而油相又受疏水作用影响重新聚集;由复合物形成的界面膜在储藏过程中也可能变得不稳定,并从油滴上脱落,这也是造成水相浑浊的原因之一。与由 LP 稳定的 W/O/W 乳液相比,LP-MC 复合物可以有效地抑制液滴

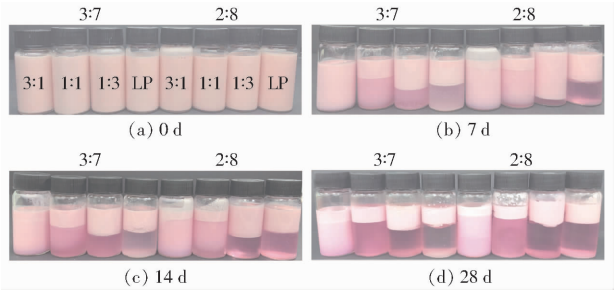
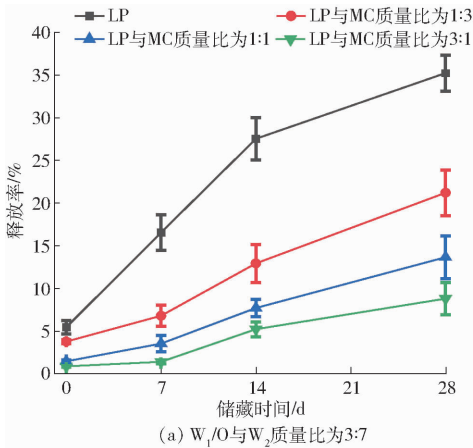


图 8 LP 和 LP-MC W/O/W 乳液储藏稳定性图像
Fig. 8 Storage stability images of LP and LP-MC W/O/W emulsions



的聚集以保持乳液的稳定。以上结果也说明了 LP-MC 在维持乳液稳定性上明显优于 LP。

2.7 W/O/W 乳液释放率

通过对离心后样品水相中维生素 B₁₂ 浓度的测定与计算,得到了如图 9 所示的 W/O/W 乳液释放率。从图 9 以及图 8 可知,随着储藏时间的延长,所有样品中的维生素 B₁₂ 都发生了一定程度的迁移,主要由内水相迁移到了外水相^[24],这可能是由于内水相与油界面发生了聚合导致部分内水相进入到外水相。当外水相比比例更大时,W/O/W 乳液的释放率更高,这是由于外水相生物大分子含量高,导致内外水相出现了渗透压差,引起了内水相的膨胀导致油膜破裂进而导致包埋维生素 B₁₂ 的泄漏^[5];当 LP 与 MC 质量比为 1:3 时维生素 B₁₂ 的释放率高于其他两组复合物稳定的 W/O/W 乳液,这可能是由于 W/O/W 乳液外水相黏性较大,液滴发生了聚集,液滴体积增大,比表面积降低,较大的液滴表面无法被 LP-MC 复合物完全覆盖^[37]。当 LP 与 MC 质量比为 3:1 时,维生素 B₁₂ 释放率提高得缓慢,这可能是由于此时 LP-MC 复合物形成的膜更致密且能最大程度地覆盖在油滴的表面,对内水相起到了更好的封装作用。与 LP 相比,随着储藏时间的增加,由 LP-MC 复合物稳定的 W/O/W 乳液维生素 B₁₂ 释放率更低,说明 LP-MC 提高了双层乳液的稳定性与封装效果,这也与前面的分析一致。

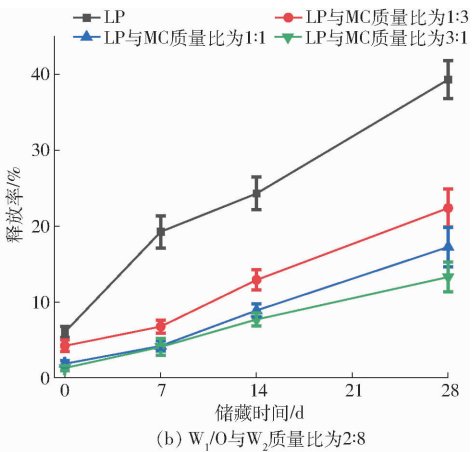


图 9 LP 和 LP-MC W/O/W 乳液的释放率曲线
Fig. 9 Release rates of LP and LP-MC W/O/W emulsions

3 结束语

本文研究了在不同外水相比例下,LP-MC 复合物和 LP 分别作为 W/O/W 乳液的外水相乳化剂对乳液稳定性的影响。结果表明,当外水相比比例较高时,复合物之间的作用力不均匀,有聚集或破乳现象的发生,且复合物的存在提高了外水相的黏度,容易

造成液滴间的桥连絮凝;LP-MC 复合物对 W/O/W 乳液稳定性提高有着明显影响,当复合物中 LP 比例逐渐增加时,LP-MC 在液滴界面上的稳定性不断提高,液滴间的作用力也不断增强;随着储藏时间的增加,LP-MC 复合物对复合物稳定性的提高比 LP 更强;当 LP 与 MC 质量比为 3:1 时,W/O/W 乳液的粒径较小,Zeta-电位绝对值较大,对包埋物质

的保护性更强,储能模量及稳定性最高。本研究也说明生物大分子复合物在食品级乳液中有较大潜力,并为大豆亲脂蛋白和甲基纤维素在 W/O/W 乳液中的进一步开发和应用提供参考,为提高生物活性物质的递送体系的稳定性提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] 汪国秀, 苏琳, 陈素芬, 等. 大直径 $W_1/O/W_2$ 乳粒的稳定性[J]. 强激光与粒子束, 2012, 24(2):389–393.
WANG Guoxiu, SU Lin, CHEN Sufen, et al. Stability of large diameter $W_1/O/W_2$ emulsion particles[J]. High Power Laser and Particle Beams, 2012, 24(2):389–393. (in Chinese)
- [2] IQBAL S, BALOCH M K, HAMEED G, et al. Controlling W/O/W multiple emulsion microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation[J]. Food Research International, 2013, 54(2):1613–1620.
- [3] COFRADES S, ANTOUNI I, SOLAS M T, et al. Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems[J]. Food Chemistry, 2013, 141(1):338–346.
- [4] FECHNER A, KNOTH A, SCHERZE I, et al. Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(5–6):943–952.
- [5] 付冬文, 朱雨晴, 成策, 等. 食品级 W/O/W 双重乳液的稳定性及应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019(11):323–333.
FU Dongwen, ZHU Yuqing, CHENG Ce, et al. Research progress on stability and application of food grade W/O/W double emulsion[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019(11):323–333. (in Chinese)
- [6] FLORENCE A T, WHITEHILL D. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 1981, 79(1):243–256.
- [7] DICKINSON E. Double emulsions stabilized by food biopolymers[J]. Food Biophysics, 2011, 6(1):1–11.
- [8] DICKINSON E. Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions[J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2010, 81(1):130–140.
- [9] SAMOTO M, MAEBUCHI M, MIYAZAKI C, et al. Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate[J]. Food Chemistry, 2007, 102(1):317–322.
- [10] GAO Z M, WANG J M, WU N N, et al. Formation of complex interface and stability of oil-in-water (O/W) emulsion prepared by soy lipophilic protein nanoparticles[J]. J. Agric. Food. Chem., 2013, 61(32):7838–7847.
- [11] MATSUMURA Y, SIRISON J, ISHI T, et al. Soybean lipophilic proteins: origin and functional properties as affected by interaction with storage proteins[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2018, 28(2):120–128.
- [12] SIRISON J, ISHII T, MATSUMIYA K, et al. Comparison of surface and foaming properties of soy lipophilic protein with those of glycinin and β -conglycinin[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112(2):106345.
- [13] ZHOU L, WANG Y. Physical and antimicrobial properties of zein and methyl cellulose composite films with plasticizers of oleic acid and polyethylene glycol[J]. LWT—Food Science and Technology, 2020, 140(5):110811.
- [14] HUANG H, BELWAL T, AALIM H, et al. Protein-polysaccharide complex coated W/O/W emulsion as secondary microcapsule for hydrophilic arbutin and hydrophobic coumaric acid[J]. Food Chemistry, 2019, 300(28):125171.
- [15] IVETA K, YANA T, ŠTĚTINA J. Influence of carrageenan on the preparation and stability of w/o/w double milk emulsions[J]. International Dairy Journal, 2018, 87:54–59.
- [16] NAJME K, HASHEM H, GHOLAM-HOSSEINI Y, et al. Encapsulation of vitamin C in a rebaudioside-sweetened model beverage using water in oil in water double emulsions[J]. LWT, 2018, 96(7):419–425.
- [17] LU W, ZHENG B, MIAO S. Improved emulsion stability and modified nutrient release by structuring O/W emulsions using konjac glucomannan[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 81(4):120–128.
- [18] CHEN L, CHEN J, REN J, et al. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(6):2600.
- [19] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. J. Agric. Food Chem., 1978, 26(3):716–723.
- [20] WU C, LI Y, DU Y, et al. Preparation and characterization of konjac glucomannan-based bionanocomposite film for active food packaging[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89(3):682–690.
- [21] 李春, 赵裕才, 陈晓倩, 等. 外水相中天然大分子对 W/O/W 型多重乳状液性质的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12):81–88.
LI Chun, ZHAO Yucai, CHEN Xiaoqian, et al. Effect of natural macromolecules of external aqueous phase on the properties of W/O/W type multiple emulsions[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(12):81–88. (in Chinese)
- [22] 盛布雷. pH 响应型 β -胡萝卜素双层乳液的制备及其性能研究[D]. 广州:华南理工大学, 2019.
SHENG Bulei. Preparation and properties of pH responsive β -carotene bilayer emulsion[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019. (in Chinese)
- [23] FURTADO G F, PICONE C, CUELLAR M C, et al. Physical chemistry of highly concentrated emulsions[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2015, 220:78–91.
- [24] 金银霜. 大豆分离蛋白稳定高内相乳液的制备、特性及应用[D]. 广州:华南理工大学, 2019.
JIN Yinsuang. Preparation, characteristics and applications of a high internal phase emulsion stabilized by soy protein isolate[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019. (in Chinese)
- [25] LIU F, TANG C H. Emulsifying properties of soy protein nanoparticles: influence of the protein concentration and/or emulsification process[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(12):2644.

Manufacturing Systems,2004(12):146-148. (in Chinese)

[22] 沈惠平,王达,李菊,等. 1T2R 并联机构拓扑降耦设计与运动性能分析[J]. 农业机械学报,2021,52(5):370-377,426.
SHEN Huiping, WANG Da, LI Ju, et al. Topological coupling-reducing design and kinematic performance analysis for 1T2R parallel mechanism[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021, 52(5): 370-377,426. (in Chinese)

[23] 沈惠平,顾晓阳,李菊,等. 基于拓扑降耦的 3T1R 并联机构设计与运动学特性分析[J]. 农业机械学报,2021,52(8):406-415.
SHEN Huiping, GU Xiaoyang, LI Ju, et al. Topological coupling-reducing based design of 3T1R parallel mechanism and kinematics performances analysis[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021, 52(8): 406-415. (in Chinese)

[24] 畅博彦,李晓宁,金国光,等. 具有整周回转能力的 3T1R 并联机构运动学分析[J]. 农业机械学报,2019,50(7):406-416.
CHANG Boyan, LI Xiaoning, JIN Guoguang, et al. Kinematics analysis of novel 3T1R parallel manipulator with full rotational capability[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2019, 50(7): 406-416. (in Chinese)

[25] 李亮,李思凡,王海芳,等. Delta 分拣机器人工作空间及灵巧度分析[J]. 包装与食品机械,2020,38(2):32-37.
LI Liang, LI Sifan, WANG Haifang, et al. Workspace and dexterity analysis of Delta sorting robot[J]. Packaging and Food Machinery, 2020, 38(2): 32-37. (in Chinese)

[26] YOSHIKAWA T. Dynamic manipulability of robot manipulators[J]. The Society of Instrument and Control Engineers, 1985, 2(1):113-124.

[27] ANGELES J. The design of isotropic manipulator architectures in the presence of redundancies[J]. The International Journal of Robotics Research, 1992, 11(3):196-201.

~~~~~

(上接第 403 页)

[26] BOUYER E, MEKHOLOUFI G, ROSILIO V, et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions; alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2012, 436(1-2):359-378.

[27] SHAMSARA O, JAFARI S M, MUHIDINOV Z K. Fabrication, characterization and stability of oil in water nano-emulsions produced by apricot gum-pectin complexes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103:1285-1293.

[28] SILVA M, BUI T, DHARMADANA D, et al. Ultrasound-assisted formation of double emulsions stabilized by casein-whey protein mixtures[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 109:106143.

[29] HASANIN M, LABEEB A M. Dielectric properties of nicotinic acid/methyl cellulose composite via “green” method for anti-static charge applications[J]. Materials Science and Engineering B, 2021, 263:114797.

[30] ZHANG J, JIAA G, ZHAO W, et al. Nanoencapsulation of zeaxanthin extracted from *Lycium barbarum* L. by complex coacervation with gelatin and CMC[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112:106280.

[31] 李秋慧,王中江,李佳妮,等. 大豆蛋白-溶血磷脂 O/W 型复合乳液的乳化特性[J]. 食品科学,2017,38(3):20-25.  
LI Qiuhui, WANG Zhongjiang, LI Jiani, et al. Emulsifying properties of soybean protein - lysophosphatide oil-in-water (O/W) emulsion[J]. Food Science, 2017, 38(3):20-25. (in Chinese)

[32] 程金菊,颜廷胜,DUDU O E,等. 蛋白/蔗糖酯界面作用对冰淇淋脂肪球低温失稳的影响[J]. 农业机械学报,2021,52(1):367-374.  
CHENG Jinju, YAN Tingsheng, DUDU O E, et al. Effect of protein and sucrose ester interfacial interaction on destabilization of fat globules at low temperatures in ice cream emulsions[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021, 52(1):367-374. (in Chinese)

[33] PAL R. Rheology of simple and multiple emulsions[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2011, 16(1):41-60.

[34] BONNET M, CANSELL M, BERKAOUI A, et al. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(1):92-101.

[35] KUMAR R, SINHA V R. Preparation and optimization of voriconazole microemulsion for ocular delivery[J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2014, 117:82-88.

[36] MURILLO-MARTÍNEZ M M, PEDROZA-ISLAS R, LOBATO-CALLEROS C, et al. Designing W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: rheological, mechanical and water vapour properties [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(4):577-585.

[37] ZAIDUL I S, FAHIM T K, SAHENA F, et al. Dataset on applying HPMC polymer to improve encapsulation efficiency and stability of the fish oil: in vitro evaluation[J]. Data in Brief, 2020, 32:106111.