一步法构建大豆蛋白双重乳液及其性质研究

徐文流[1]，陈震东[2]，侯俊杰[1]，王金梅[3]

（1.广州王老吉大健康产业有限公司，广东广州 510623）（2.咀香园健康食品（中山）有限公司，广东中山 528437）

（3.华南理工大学小麦和玉米深加工国家工程实验室，广东广州 510640）

摘要：本研究发现在中性条件下可以利用酸热处理的大豆分离蛋白（SPI）并通过简单的一步均质法制备得到 W/O/W 双重乳液，进一步研究了不同酸热处理时间对 SPI 在中性条件下的溶解度及其乳液性质（如乳析率、粒度）的变化。结果表明，不同时间的酸热处理会导致 SPI 在中性条件下的溶解度出现不同程度的下降（未加热 SPI 高达 78.60%，酸热处理 SPI 为 36.02%~53.29%），可能是由于形成了不溶性的蛋白纤维聚集体，维系这些不溶聚集体的主要作用力是氢键和二硫键。酸热处理可以显著改善 SPI 稳定的乳液的乳析稳定性，且长时间的酸热处理效果更佳（如未加热 SPI，38.70%；酸热处理 2~6 h，34.90%~36.50%；酸热处理 12~20 h，17.50%~19.70%），但是酸热处理会导致乳滴粒度增大（如未加热 SPI，24.63 μm；酸热处理 SPI，28.12~33.97 μm）。增大乳液体系中的油含量也可以明显降低乳液的乳析率和粒度，随着油含量从 20%增加到 60%，乳析率从 76.20%下降到 3.30%，粒度从 28.23 μm 减小到 19.06 μm。本研究结果为制备性质可控的双重乳液提供了新方法。

关键词：大豆蛋白；一步均质法；双重乳液

文章篇号：1673-9078(2019)010-213-217 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.029

One-Step Fabrication of Double Emulsions Stabilized by Soy Protein

XU Wen-liu[1], CHEN Zhen-dong[2], HOU Jun-jie[1], WANG Jin-mei[3]

(1.Guanghzhou Wanglaoji Great Health Industry Co. Ltd, Guangzhou 510623, China) (2.Juxiangyuan Health Food (Zhongshan) Co. Ltd., Zhongshan 528437, China) (3.National Engineering Laboratory of Wheat & Corn Further Processing, College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The present work found that at neutral pH, double emulsions could be simply fabricated with SPI preheated at acidic pH by one-step method. The effects of heating time on the solubility of SPI at pH 7.0 and the properties (e.g. cream rate, particle size) of double emulsions were further studied. The results showed that the acidic heating treatment decreased the solubility of SPI at pH 7.0 (native SPI, 78.60%; preheated SPI, 36.02%~53.39%), and the behavior was dependent on the heating time. This phenomenon may be related to the formation of insoluble protein fibrillar aggregates, which are mainly sustained by hydrogen bond and disulfide bond. The acidic heating treatment obviously improved the creaming stability of emulsions, and the longer heating time resulted in better effects (native SPI, 38.70%; SPI preheated with 2~6 h, 34.90%~36.50%; SPI preheated with 12~20 h, 17.50%~19.70%). However, the droplet size of emulsions became larger (native SPI, 24.63 μm; preheated SPI, 28.12~33.97 μm). In addition, an increase in the oil content also decreased the cream rate and droplet size. With the oil content increased from 20% to 60%, the cream rate decreased from 76.20% to 3.30%, and the droplet size decreased from 28.23 μm to 19.06 μm. The present work provides a new way to fabricate double emulsions with controllable properties.

Key words: soy protein; one-step method; double emulsion

双重乳液（double emulsion）为复杂的多相分散体系，指乳液内分散着更小的乳液系统，常见的类型有 W/O/W 型和 O/W/O 型，在食品、化妆品和农药等行业都有很大的应用潜力[1]。食品级的双重乳液主要用于亲水性或疏水性生物活性物质的输送，起到保护和控释作用。Aditya 等通过两步法制备由聚甘油蓖麻醇酯（polyglycerol polyricinoleate）和吐温 80 稳定的 W/O/W 型双重乳液，并同时荷载疏水性活性物质姜黄素和亲水性活性物质儿茶素，结果发现姜黄素和儿茶素的稳定性及生物可给性都显著提高[2]。另外，双重乳液还可以降低乳液型食品的油脂含量，同时仍然保持口腔中脂肪和口腔表面接触面积，不改变口感[3]。然而，双重乳液的制备通常需要大量的表面活性剂及复杂的多步骤生产工艺，严重阻碍了其在生产中的大量应用。因此，发展一步法制备双重乳液是亟需解决

收稿日期：2019-04-30

基金项目：中央高校基本科研业务费项目（2019MS097）

作者简介：徐文流（1963-），男，高级工程师，研究方向：临床药理

通讯作者：王金梅（1982-），女，博士，副教授，研究方向：蛋白质加工与应用

的问题。

Morais 等人的研究发现可以通过精心选择具有合适的亲水亲油平衡值（hydrophilic lipophilic balance，HLB）的表面活性剂组合来实现一步法制备双重乳液[4]。随后，Patel 等人利用不相容的生物聚合物（刺槐豆角和 λ-卡拉胶）诱导两个水相之间的相分离也成功制备得到 W/O/W 型双重乳液[5]。蛋白质是广泛应用于食品乳液的稳定剂，但是它们的结构和亲水性质通常不支持 W/O 型乳液的稳定，所以难以通过一步法制备双重乳液。

在酸热处理诱导下，蛋白的高级结构发生去折叠，多肽从生物大分子中解离出来，蛋白分子表面的高电荷导致较强的静电排斥，其与蛋白分子间的疏水相互作用力相平衡，促使分子发生自组装形成纤维状聚集体[6]。前期通过超滤手段对酸热诱导大豆分离蛋白纤维聚集体和未聚集多肽进行分离，发现未聚集多肽含有较少的疏水氨基酸和较多的负电氨基酸，在酸性 pH 条件下以无定形聚集体的形式存在，而在中性 pH 下由于电荷量较高导致聚集体解离；纤维聚集体的表面电荷和氨基酸组成与热处理蛋白相似，但在等电点和中性 pH 处溶解度降低[7]。本研究发现经过酸热处理的大豆分离蛋白 SPI 可以通过一步法制备双重乳液。鉴于蛋白质的热聚集行为通常受到加热时间等因素的影响，本研究还进一步探讨了加热时间对 SPI 在中性条件下的溶解度及其双重乳液性质的影响。

1 材料与方法

1.1 原料

低温脱脂豆粕，购于山东禹王实业有限公司。大豆分离蛋白（SPI），采用碱溶酸沉方法制备，经凯氏定氮法测得 SPI 的蛋白含量为 88.94%±0.70%（N×5.71，湿基）。

1.2 主要仪器设备

Delta 冷冻干燥机，德国 Christ 公司；UV 2300 紫外分光光度计，上海天美公司；T25 高速剪切机，德国 IKA 公司；M-110EH-30 高压微射流纳米均质机，美国 Malvern 公司；Alpha-pH 500 精密 pH 计，美国 Thermo 公司；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器，巩义市予华仪器有限公司；Leica TCS-SP2 激光共聚焦显微镜，德国 Leica 公司；MasterSizer 3000 微米粒度仪，英国 Malvern 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酸性 pH 下 SPI 的热处理

将 SPI 冻干粉溶解于去离子水中（1%，*m/V*），室温搅拌 2 h 后调节 pH 为 2.0，置于 4 ℃水化过夜。将蛋白溶液分装至带盖瓶中于 85 ℃水浴中分别加热 0、2、6、12、20 h。热处理后，样品迅速冰浴冷却备用。

1.3.2 溶解度

将经过酸热处理的蛋白样品稀释成 1 mg/mL 并调节 pH 为 7.0，10000×g 离心 20 min 后取上清液。采用 Lorry 法测定上清液的可溶性蛋白含量，以牛血清蛋白为标准蛋白制作标准曲线。溶解性为上清液蛋白含量与总蛋白含量的比值。

1.3.3 中性 pH 条件下酸热处理蛋白聚集体形成及维系的相互作用力

将经过酸热处理的蛋白样品的 pH 调至 7.0，并稀释成最终蛋白浓度为 1 mg/mL。分别加入固体 NaCl、尿素（urea）、十二万基硫酸钠（SDS）和二流苏糖醇（DTT）使其在蛋白溶液中的终浓度分别为 0.5 M、6 M、1%（*W/V*）、10 mM。不加蛋白扰动剂的酸热处理 SPI 样品设为对照（ck）。最后采用 1.3.2 方法测定溶液中的蛋白浓度。

1.3.4 乳液的制备

将回调至 pH 7.0 的酸热处理 SPI 与玉米油按一定比例混合，并加入 0.02%（*W/V*）的叠氮化钠以抑制微生物的生长。常温下，混合物经预均质后（8000 r/min，2 min）进行高压微射流均质 2 次。乳液体系中 SPI 的浓度为 1%。同时考察了热处理时间（0、2、6、12、20 h）及油含量（20%、30%、40%、50%、60%，*W/V*）对乳液的影响。

1.3.5 乳液粒度的测定

采用 MasterSizer 3000 粒度分布仪测定乳液油滴的粒径大小。参数设置：水的折射率为 1.330；玉米油的折射率为 1.520。采用 $d_{4,3}$，即体积平均直径表征油滴粒度的平均大小。

1.3.6 乳液的微观结构观察

光学显微镜：将新鲜乳液滴到载玻片上，并用盖玻片盖好后置于载物台，用 20 倍物镜观察。

激光共聚焦显微镜：首先配制含有 0.10%（*W/V*）尼罗蓝的染料。观察时，在新鲜乳液样品中加入终浓度为 1 mg/mL 的尼罗蓝。尼罗蓝的激发波长为 633 nm。

1.3.7 数据分析

用 Excel 软件对数据进行统计和分析，所有数据取三次重复的平均值；用 Origin 8.0 软件对数据进行图形处理。

2 结果与讨论

2.1 加热时间对酸热处理SPI在pH 7.0条件下的溶解度的影响

在酸热条件下，SPI 可以水解成多肽并自组装形成纤维聚集体，这个过程通常受到加热时间的影响[8]。蛋白质的纤维化是在 pH 2.0 条件下加热诱导形成，鉴于大多数食品的 pH 处于中性，本文研究了不同时间酸热处理后的 SPI 在 pH 7.0 的稳定性，结果如图 1 所示。未经酸热处理的 SPI 的溶解度高达 78.60%，而所有经过酸热处理的 SPI 的溶解度都显著降低（溶解度为 36.02%~53.39%），说明酸热处理会导致 SPI 在中性条件下溶解度的降低。陈震东等人的研究发现酸热处理 SPI 的主要组分是蛋白纤维聚集体及未自组装聚集的多肽分子，其中蛋白纤维聚集体在中性条件下主要以沉淀的形式存在，溶解的蛋白以多肽为主[9]。由此，推测酸热处理 SPI 溶解度的降低可能主要是由于不溶性蛋白纤维聚集体的存在。另外，酸热处理 SPI 的溶解度依赖于加热时间的变化：先随着加热时间的延长溶解度逐渐提高，加热至 12 h 时溶解度达到最高，随后又出现轻微下降的趋势。这结果与经过酸热处理的大豆 7S 和 11S 在中性条件的溶解度变化一致[10]，可能与溶液体系中蛋白纤维聚集体和多肽的比例有关。

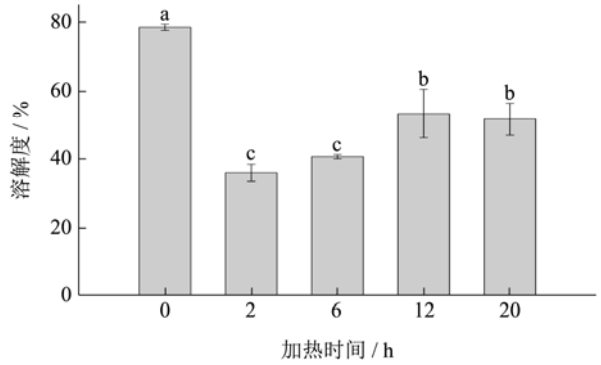


图 1 加热时间对酸热处理 SPI 在 pH 7.0 条件下的溶解度的影响

Fig.1 The effect of heating time at acidic pH on the solubility of SPI at pH 7.0

注：柱状图上标不同小写字母表示差异显著（p<0.05），下同。

2.2 酸热处理SPI在pH 7.0条件下的不溶聚集体形成及维系的相互作用力分析

为了明确酸热处理 SPI 在 pH 7.0 条件下不溶聚集体的内部作用力，我们研究了不同的蛋白扰动剂如 0.5 M NaCl、10 mM DTT、1% SDS 和 6 M 尿素单独或同时存在时酸热处理 SPI 溶解度的变化，结果如图 2 所示。从图中可以看出，DTT 和尿素单独或同时存在都导致酸热处理 SPI 溶解度显著提高。相反，NaCl 和 SDS 单独存在时，酸热处理 SPI 溶解度显著下降，尤其是 SDS 导致的下降程度更大。类似的溶解度降低现象在尿素和 SDS 同时存在时也可以观察到，但是下降的程度较低，可能是由于尿素在一定程度上提高了酸热处理 SPI 的溶解度。当尿素、DTT 和 SDS 三者同时存在时，酸热处理 SPI 的溶解度基本不变，可能是由于尿素和 DTT 对酸热处理 SPI 溶解度的促进作用与 SDS 的抑制作用相当。通常情况下，NaCl、DTT、SDS 和尿素分别是用来破坏静电作用、二硫键、疏水作用和氢键[11,12]。因此，上述结果表明，在 pH 7.0 条件下维持酸热处理 SPI 不溶聚集体的主要作用力是氢键和二硫键，并且二者共同起作用。

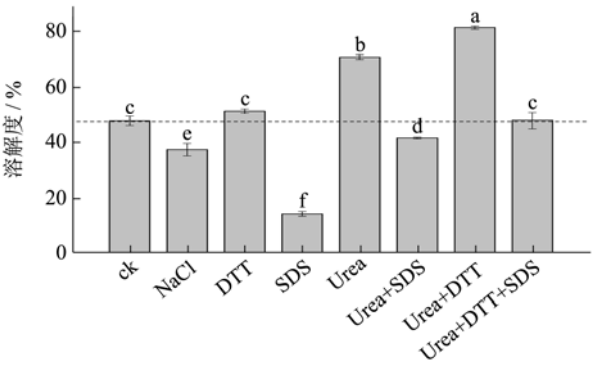


图 2 不同的蛋白扰动剂对酸热处理 SPI 在 pH 7.0 条件下溶解度的影响

Fig.2 The effect of various protein-perturbing solvents on the solubility of preheated SPI at pH 7.0

2.3 酸热处理SPI在pH 7.0条件下制备双重乳液

2.3.1 不同加热时间对双重乳液微结构、乳析率及粒度的影响

图 3 和 4 为经过不同时间酸热处理的 SPI 在 pH 7.0 条件下制备的乳液的微观结构图。从光学显微镜图和 CLSM 图都可以清晰地看到，酸热处理 SPI 稳定的乳液中 O/W 乳滴内包含有大量的 W/O 小乳滴，表明经过酸热处理的 SPI 可以通过简单的一步法均质形成 W/O/W 双重乳液。未经酸热处理的 SPI 稳定的乳液虽然也有少量的双重乳液出现，但是 O/W 乳滴内的 W/O 小乳滴数量极少。在 pH 7.0 条件下，酸热处理 SPI 中的纤维聚集体主要以不溶的沉淀颗粒形式存在，且其

氨基酸组成和天然 SPI 相近。酸热处理 SPI 多肽分子在 pH 7.0 的粒径分布主要集中在 0.4~2 nm，其疏水性氨基酸和不带电氨基酸分别比热处理 SPI 纤维聚集体少 3.71%和 1.54%，表明酸热处理 SPI 多肽的亲水性比纤维聚集体强[9]。王金梅的研究表明酸热处理后 SPI 的纤维转率低于 20%，大部分为未转化成纤维的多肽[10]。由此推测双重乳液形成过程中，内部的 W/O 乳滴界面可能主要是由纤维聚集体沉淀颗粒稳定，而外部的 O/W 乳滴界面主要由未转化成纤维的多肽稳定。

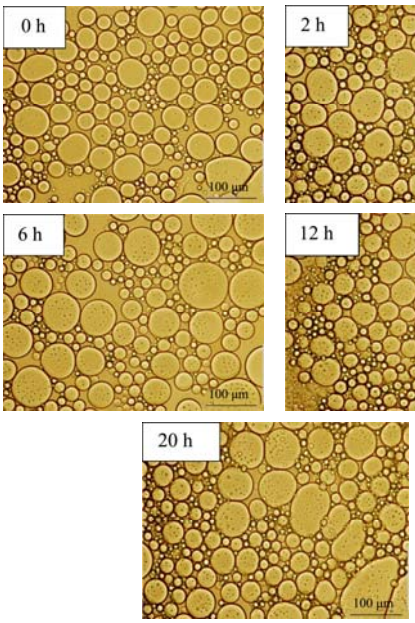


图 3 经过不同时间酸热处理的 SPI 稳定的双重乳液光学显微镜微结构

Fig.3 The optical microstructure of double emulsions stabilized by SPI preheated at acidic pH with various heating time

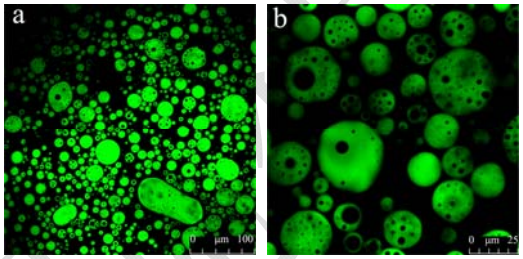


图 4 经过 20 h 酸热处理的 SPI 稳定的双重乳液激光共聚焦显微镜微结构

Fig.4 The CLSM microstructure of double emulsions stabilized by SPI preheated at acidic pH for 20 h

注：绿色代表油相。

图 5a 和 5b 分别为不同加热时间对酸热处理 SPI 稳定的双重乳液的乳析率和粒度分布的影响。从图 5a 的乳液外观图可以看出所有乳液样品经过 0.5 h 贮藏后都出现了明显的乳析现象。经过不同时间酸热处理的 SPI 稳定的双重乳液的乳析率在短时间贮藏后都迅速增长，到贮藏 24 h 后基本趋于稳定，其中未经酸热处理的 SPI 稳定的乳液的乳析率最高，说明酸热处理可以显著改善 SPI 稳定的乳液的乳析稳定性。另外，酸热处理 SPI 稳定的乳液的乳析稳定性也依赖于加热时间，表现为 12 h>20 h>2 h>6 h，说明长时间酸热处理可以更好地提高乳液的乳析稳定性。不同时间酸热处理的 SPI 稳定的乳液的粒径分布图都只呈现一个窄峰（结果未提供），且经过酸热处理的 SPI 稳定的乳液粒径增大（图 5b）。可能是因为在 pH 7.0 条件下，经过酸热处理后的 SPI 纤维聚集体形成沉淀，粒径变大，且 SPI 多肽的亲水性变强，从而导致酸热处理 SPI 上界面的速率降低。陈震东的研究也发现在 pH 7.0 条件下由酸热处理的 SPI 纤维聚集体和甜菜果胶复合物稳定的乳液粒度随着 SPI 加热时间的增大而轻微增大[7]。

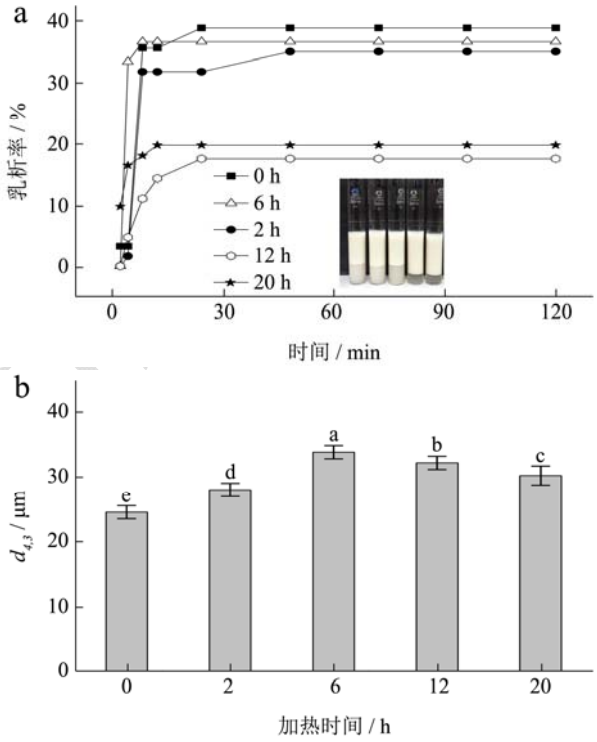


图 5 不同加热时间对酸热处理 SPI 稳定的双重乳液的乳析率（图 a）和粒度（图 b）的影响

Fig.5 The effect of heating time on the cream rate (a) and particle size (b) of double emulsions stabilized by preheated SPI

注：a 图内的图片为放置 0.5 h 后的双重乳液，从左至右分别为 0、2、6、12、20 h。

2.3.2 不同油含量对双重乳液乳析率及粒度的影响

图 6a、b 分别为不同油含量对经过 20 h 酸热处理的 SPI 稳定的双重乳液的乳析率和粒度的影响。从图 6a 能看出当油含量为 20%~50%时，双重乳液的乳析率都是随着贮藏时间的延长而增大，贮藏 12 h 以后基本保持不变，而且乳析率随油含量的增加而减小；当油含量增加到 60%时，双重乳液几乎不出现乳析现象。

这些结果表明油含量的增加可以提高乳析稳定性，主要是由于油含量的增加使乳液体系中的乳滴含量增加，促进乳滴网络的形成，从而抑制了乳析行为。不同油含量的酸热处理 SPI 稳定的乳液粒径分布图都只呈现一个窄峰(结果未提供)，且随着油含量的增大，乳液粒径逐渐变小（图 6b）。类似的结果在麦醇溶蛋白/壳聚糖复合胶体颗粒稳定的乳液[13]和大豆分离蛋白热聚集体颗粒稳定的乳液[14]中也有观察到。

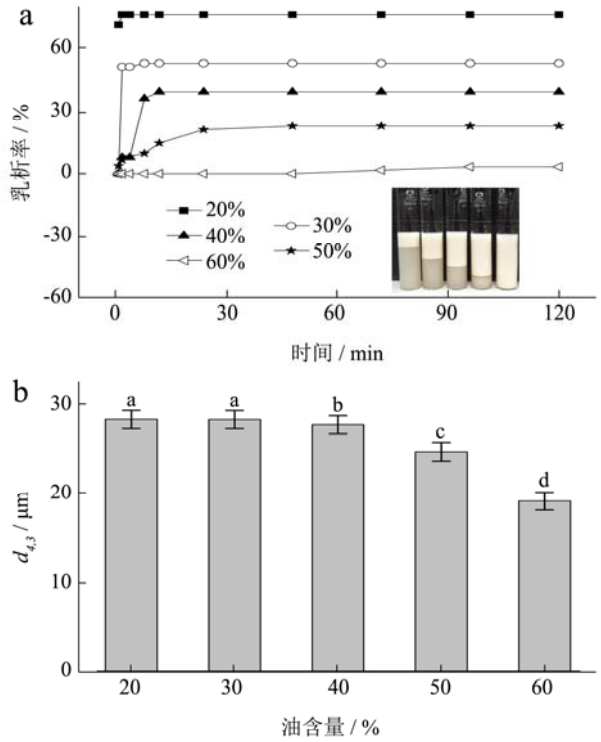


图 6 不同油含量对经过 20 h 酸热处理的 SPI 稳定的双重乳液的乳析率（图 a）和粒度（图 b）的影响

Fig.6 The effect of oil content on the cream rate (a) and particle size (b) of double emulsions stabilized by SPI heated with 20 h

注：a 图内的图片为放置 0.5 h 后的双重乳液，从左至右分别为 20%、30%、40%、50%、60%。

3 结论

本文在中性条件下利用酸热处理的 SPI 并通过简单的一步均质法制备得到 W/O/W 型双重乳液，并研究了不同酸热处理时间对 SPI 在中性条件下的溶解度及其双重乳液性质的影响。结果表明，不同时间的酸热处理会导致 SPI 在中性条件下的溶解度出现不同程度的下降，推测是由于形成了不溶性蛋白纤维聚集体。进一步分析发现，维系这些不溶聚集体的主要作用力是氢键和二硫键。酸热处理可以明显改善 SPI 稳定的乳液的乳析稳定性，且长时间的酸热处理效果更佳，但是会导致乳滴粒径增大。另外，增大乳液体系中的油含量可以明显降低乳液的乳析率和粒度。

参考文献

[1] Muschiolik G, Multiple emulsions for food use [J]. Current Opinion In Colloid & Interface Science, 2007, 12: 213-220

[2] Aditya N P, Sheetal A, Hanjoo Y, et al. Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 7-13

[3] Silva W, Torres-Gatica M F, Oyarzun-Ampuero F, et al. Double emulsions as potential fat replacers with gallic acid and quercetin nanoemulsions in the aqueous phases [J]. Food Chemistry, 2018, 253: 71-78

[4] Morais J M , Santos O D H, Nunes J R L, et al. W/O/W multiple emulsions obtained by one-step emulsification method and evaluation of the involved variables [J]. Journal of Dispersion Science & Technology, 2008, 29: 63-69

[5] Patel A R, Dumlu P, Vermeir L, et al. Rheological characterization of gel-in-oil-in-gel type structured emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 46: 84-92

[6] Linden E V D, Venema P. Self-assembly and aggregation of proteins [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2007, 12: 158-165

[7] 陈震东.大豆蛋白纤维聚集体与甜菜果胶复合物的制备及其乳化性质研究 [D].广州:华南理工大学,2015
CHEN Zhen-dong. Study of preparation and emulsifying properties of soy protein isolate fibrils-sugar beet pectin complexes [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015

[8] Akkermans C, Van Der Goot A J, Venema P, et al. Micrometer-sized fibrillar protein aggregates from soy glycinin and soy protein isolate [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55: 9877

[9] 陈震东,陈嘉琦,王金梅,等.热诱导大豆蛋白纤维聚集体的分离及性质研究[J].现代食品科技,2015,31:172-177
CHEN Zhen-dong, CHEN Jia-qi, WANG Jin-mei, et al. Properties of isolated, thermally induced soy protein fibrillar aggregates [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31: 172-177

[10] 王金梅.大豆蛋白热聚集行为及界面、乳化性质研究[D].广州:华南理工大学,2012
WANG Jing-mei. Thermally aggregation behaviors, interfacial and emulsifying properties of soy protein [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012

（下转第 188 页）