

不同蛋白稳定乳液的冻融稳定性

朱雪峰, 唐传核

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文以 1% *m/V* 浓度的大豆分离蛋白和乳清浓缩蛋白为材料, 对蛋白热处理形成颗粒后制备油分数为 0.4 的水包油型 Pickering 乳液, 未加热处理的蛋白和酪蛋白酸钠稳定乳液作为对照。将不同蛋白稳定的乳液在 -20 °C 冷冻 24 h 随后在 30 °C 恒温箱解冻 3 h, 如此冷冻-解冻处理循环三次, 探讨未加热处理的活性蛋白和热诱导形成的蛋白颗粒稳定乳液的冻融稳定性, 包括新鲜制备和每次冻融之后乳液的乳滴粒径分布、聚结和絮凝程度、乳液分层和脂肪上浮情况、以及乳液的光学显微结构。结果表明冷冻乳液融化时不可避免的被部分破坏, 而大豆分离蛋白热诱导聚集颗粒稳定的 Pickering 乳液具有优良的冻融稳定性, 这可能为一些水包油乳液型冷冻食品、热敏性生物活性物质和低温储存药品的制备和研发提供一条有效的技术途径。

关键词: 乳清浓缩蛋白; 大豆分离蛋白; 酪蛋白酸钠; Pickering 乳液; 冻融稳定性

文章编号: 1673-9078(2016)11-106-110

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.016

Freeze-thaw Stability of the Emulsions Stabilized by Different Proteins

ZHU Xue-feng, TANG Chuan-he

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Soy protein isolate (SPI) (1% *m/V*) and whey protein concentrate (WPC) (1% *m/V*) were used as the test materials in this study. Protein particles formed from heat treatment were used to prepare an oil-in-water Pickering emulsion with an oil volume fraction of 0.4, and native SPI, WPC, or sodium caseinate (SC)-stabilized emulsions were employed as controls. The emulsions stabilized by native proteins and protein particles were stored at -20 °C for 24 h and then thawed at 30 °C for 3 h in an incubator; this freeze-thaw cycle was repeated three times. The freeze-thaw stability of the emulsions stabilized by the native proteins and protein particles was investigated, including the droplet size distribution, degree of coalescence and flocculation, creaming index, situation of oil floating, microstructure of the fresh emulsion, and emulsions after each freeze-thaw cycle. The results showed that part of the emulsions was inevitably damaged during the thawing process, while the Pickering emulsion stabilized by the SPI particles that were produced from heat-induced aggregation had excellent freeze-thaw stability. This result may provide an effective technical approach for the study and development of some oil-in-water emulsions frozen foods, heat-sensitive bioactive substances, and medicines requiring storage at low temperature.

Key words: whey protein concentrate (WPC); soy protein isolate (SPI); sodium caseinate (SC); Pickering emulsion; freeze-thaw stability

乳液是互不相溶两相的混合物, 由于存在很大的油水界面, 这种体系是热力学不稳定的, 需要两亲性的乳化剂来维持和延长稳定性。常见的乳化剂有小分子表面活性剂、多糖和蛋白质^[1], 它们动态平衡地吸附在油水界面, 形成一层物理屏障^[2], 降低界面张力及增大空间位阻, 从而提高乳液稳定性^[3]。1903年 Ramsden 发现胶体尺寸的固体颗粒也可以稳定乳液, 随后 S.U.Pickering 首次报道了颗粒能够不可逆的吸附在油滴表面, 产生稳定的水包油型乳液^[4], 这种稳定体系被命名为 Pickering 乳液。基于之前的发现, 对大

收稿日期: 2015-12-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31471695)

作者简介: 朱雪峰 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物蛋白工程
通讯作者: 唐传核 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物蛋白质的开发与利用

豆分离蛋白热诱导聚集的纳米颗粒能够作为有效的 Pickering 稳定剂^[5,6]。乳清蛋白热变性聚集形成的微粒, 也能够被用来制备 Pickering 乳液或单独作为脂肪类似物应用^[7]。

冷冻是最早和最快保存食品的方法, 相比于腌渍或干制, 冷冻能够更好的保留食品的固有色泽、风味和营养价值, 延长食品货架期^[1,8]。对于特殊的食品乳液体体系, 冷冻甚至是必备加工工序, 如冰淇淋^[9]。许多乳液的应用常需要先低温或冷冻贮藏, 使用之前再进行升温和解冻处理, 如预冷冻食品和低温储存药品^[10]。乳液冷冻涉及到一系列物理化学变化, 包括水和脂肪结晶、界面相转变和生物大分子构象改变及由此引起的连锁反应^[11], 如“冷冻浓缩”导致未冻结水量减小、离子强度和 pH 剧烈增加、冰晶迫使脂滴紧密堆积及晶体对界面膜的刺穿渗透等^[12]。由此引起包裹着

油滴的界面层被破坏,从而使食品乳液出现一系列不稳定,包括聚结、絮凝、油析和乳析^[13]。乳液展现人们所需的性质和用途的前提,依赖于乳滴均匀且稳定的分散于连续相,反之,乳液可能在宏观上分离为明显的油水两相,产生不良的食品外观和质构^[12]。

大豆分离蛋白也是一种重要的蛋白配料,因其高的营养价值和优良的功能性质,以及来源广泛、价格低廉和不含胆固醇的植物蛋白优势,一直以来受到广泛关注^[14]。目前,关于乳液体系冻融失稳的各种重要机制,仍然缺乏系统深入的了解。因此,这项工作的目的是以大豆分离蛋白和乳清浓缩蛋白为材料,探讨未加热活性蛋白和蛋白热聚集颗粒稳定乳液的冻融稳定性,酪蛋白酸钠稳定乳液作为对照。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白(Soy Protein Isolate, SPI):由实验室自制,将脱脂豆粉采用碱溶酸沉提取后冷冻干燥,蛋白含量约90%;乳清浓缩蛋白(Whey Protein Concentrate, WPC)、酪蛋白酸钠(Sodium Caseinate, SC):购于上海晶纯生化科技股份有限公司;福临门一级大豆油:购于广州当地超市;氯化钠与氢氧化钠等化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PHS-3C 酸度计(上海雷磁仪器厂);T 25 高速剪切机(德国 IKA 公司);M110EH 高压微射流纳米均质机(美国 Microfluidics 公司);BCD-228UTM 冰箱(合肥美的电冰箱有限公司);Mastersizer 3000 激光粒度仪(英国 Malvern 公司);pH 100 光学显微镜(凤凰光学集团有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 制备蛋白分散液

乳清浓缩蛋白(WPC)、大豆分离蛋白(SPI)和酪蛋白酸钠粉末(SC)分别分散于去离子水(2% m/V),磁力搅拌 2 h 调 pH 至 7.0,加入两滴叠氮化钠溶液(0.02% m/V),然后 4 °C 放置过夜使蛋白充分水化,随后 8000 r/min 离心 20 min 去除不溶杂质,加入氯化钠粉末至浓度为 300 mM,然后用含 300 mM 氯化钠的去离子水(pH=7.0)稀释至蛋白浓度 1% m/V。乳清蛋白分散液 70 °C 水浴加热 30 min,大豆蛋白分散液 95 °C 水浴加热 15 min,随后立刻在冰水浴中迅速冷却至室温。

1.3.2 制备水包油乳液

食品工业里采用两步法来加工制作水包油乳液,所有的乳液都用相同的蛋白浓度 $c=1\%$ 和油分数 $\varphi=0.4$ 。简单来说就是,36 mL 蛋白分散液加入 24 mL 大豆油,采用高速剪切乳化机 8000 r/min 均质 2 min 充分混合。预均质后的样品用高压微射流处理,每份样品 40 MPa 均质一次,均质完成后贮藏在 4 °C 冰箱,以备后续的分析和使用。

1.3.3 冷冻-解冻循环

每个乳液样品取适量至平底玻璃试管($H=100$ mm, $\Phi=15$ mm),一式三份放置于-20 °C 温度可控冰箱冷冻 24 h,然后取出贮藏在 30 °C 恒温箱 3 h,使所有的油相和水相晶体完全融化,如此冷冻-解冻循环三次。新鲜和每次冻融循环之后的乳液分别测定乳滴粒径分布、聚结和絮凝率、乳液分层和脂肪上浮情况以及光学显微结构。

1.3.4 新鲜及冻融后乳液的性质

1.3.4.1 乳滴粒径分布

新鲜制备和每次冻融之后乳液的乳滴粒径分布利用 Mastersizer 3000 粒度分布仪测定,分散剂为去离子水或 1%(m/V) SDS 溶液。最终的结果用体积平均液滴粒径($D_{4,3}$)来表示,所有数据至少重复三次取平均值。

1.3.4.2 乳液絮凝及聚结程度^[8]

新鲜制备和每次冻融循环之后乳液的絮凝程度(Flocculation degree; FD)和聚结程度(Coalescence degree; CD),分别由各乳液体积平均液滴粒径($D_{4,3}$)计算而来,即: $FD\% = (D_{4,3} - D_{4,3SDS}) / D_{4,3SDS} \times 100$,其中 $D_{4,3SDS}$ 为以 SDS(1% m/V) 作分散剂所测得的 $D_{4,3}$; $CD\% = (D_{4,3SDS,F-T} - D_{4,3SDS,I}) / D_{4,3SDS,I} \times 100$,其中 $D_{4,3SDS,I}$ 和 $D_{4,3SDS,F-T}$ 分别为新鲜制备和每次冻融之后乳液以 SDS(1% m/V) 作分散剂所测得的 $D_{4,3}$ 。

1.3.4.3 乳液分层及脂肪上浮情况

冷冻乳液解冻完成之后,手工测量每支试管下层清液的高度(H_S)和乳液的总高度(H_T),每次冻融循环之后都要测量一次,由一式三份的样品计算平均值和标准差,乳液的分层指数(Creaming index %) = $H_S / H_T \times 100$ 。

1.3.4.4 乳液的光学显微结构

新鲜制备和每次冻融循环之后的乳液样品,混合均匀后将乳液样品稀释 10 倍,取一小滴置于一块载玻片上,然后放上一块盖玻片,使乳液均匀分散没有气泡。随后采用 100 倍油镜来观察乳液的微结构,并用一台数码相机结合专用的程序记录微结构图像。

1.3.5 数据分析

所有测定的数据进行单因素方差分析(ANOVA),

以及置信区间为 95% 的显著性分析, 数据分析采用 IBM SPSS Statistics 软件处理, 显著性分析通过 Tukey 的多范围检验, 显著性水平被认为是 $p < 0.05$ 。所有图表中采用相同的字母表示在 $p < 0.05$ 水平差异不显著, 不同的字母表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 乳滴粒径分布

新鲜和每次冻融循环之后乳液样品以水和以 1% SDS 为分散剂的体积平均粒径 ($D_{4,3}$) 展示在图 1。在相等乳化剂浓度和油分数条件下, 不同乳化剂稳定乳液的粒径分布存在很大区别, 同一乳化剂加热和未加热处理稳定的乳液粒径分布也不同。新鲜乳液以水为分散剂依粒径排序为: 热处理大豆分离蛋白(HSPI) > 未热处理大豆分离蛋白(NSPI) > 未热处理乳清浓缩蛋白(NWPC) > 热处理乳清浓缩蛋白(HWPC) > 酪蛋白酸钠(SC)。

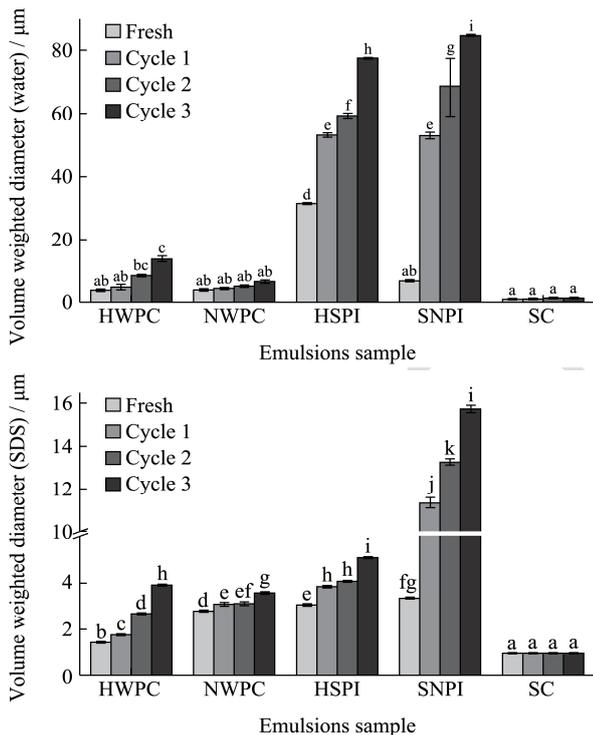


图 1 新鲜制备和冻融循环之后乳液在水和 1% m/V SDS 里的体积平均粒径 ($D_{4,3}$)

Fig.1 Volume weighted diameter ($D_{4,3}$) of the fresh emulsions and emulsions after freeze-thaw cycle treatment in water ($D_{4,3}$), or 1% m/V SDS ($D_{4,3SDS}$)

三次冻融循环处理前后, 以水为分散介质时, 热处理的乳清蛋白、热处理和未热处理的大豆蛋白稳定乳液的 $D_{4,3}$ 均显著增大 ($p < 0.05$), 未热处理的乳清蛋白和酪蛋白酸钠稳定乳液变化不显著 ($p > 0.05$)。以 1%

m/V SDS 为分散介质时, 除酪蛋白酸钠稳定乳液无明显变化 ($p > 0.05$), 其余乳液乳滴粒径都随冻融次数增加显著增大 ($p < 0.05$), 表明冻融循环导致乳液发生聚结。尤其是未加热处理大豆蛋白和加热处理的乳清蛋白稳定乳液乳滴粒径增大最多这与两乳液最终的分层稳定性最低相一致(图 3)。另外, 相比于以水为分散介质时, 每个乳液样品以 SDS 为分散剂时的 $D_{4,3}$ 都有所减小, 表明它们均发生不同程度的絮凝; 其中热处理的大豆蛋白稳定乳液减小得最为明显, 这与其絮凝程度最大相一致(图 2)。

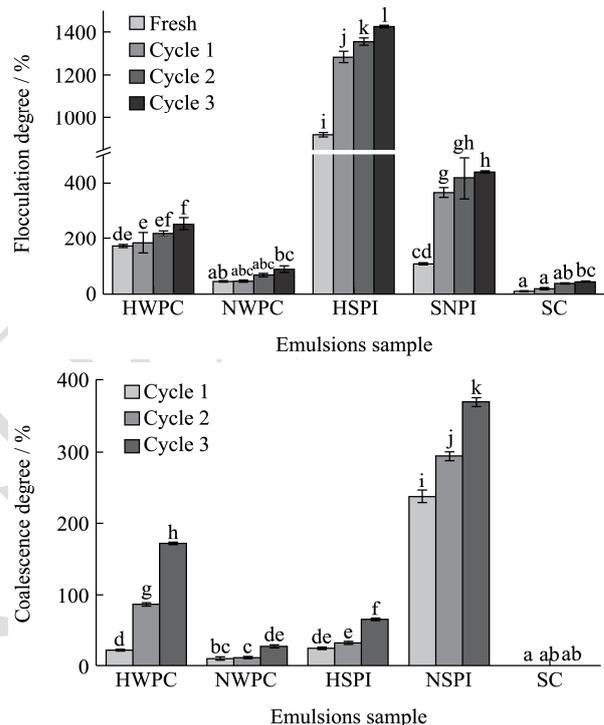


图 2 新鲜制备和冻融循环之后乳液的絮凝程度 (FD%) 和聚结程度 (CD%)

Fig.2 Degree of flocculation and coalescence (FD% and CD%) of the fresh emulsions and emulsions after freeze-thaw cycle

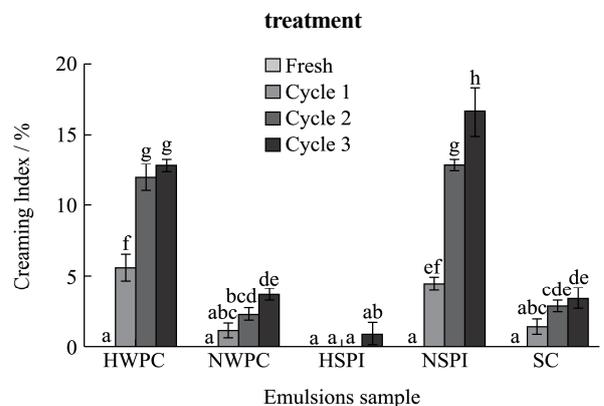


图 3 冻融循环之后乳液的分层指数 (CI%)

Fig.3 Creaming index of the fresh emulsions and emulsions after freeze-thaw cycle treatment (CI%)

2.2 乳液絮凝及聚结程度

新鲜制备和每次冻融循环之后乳液的乳液絮凝及聚结程度展现在图 2。乳液在高压均质制备过程中已经发生部分絮凝，而且相比于未加热处理蛋白，加热处理的蛋白稳定乳液絮凝程度更加明显，如热处理前后乳清蛋白絮凝度增大 3 倍以及大豆蛋白絮凝率增大 9 倍。随冻融循环次数的增加，乳液絮凝和聚结程度逐渐增强，三次冻融循环之后未加热的乳清蛋白和酪蛋白酸钠稳定乳液絮凝程度变化不显著($p>0.05$)，其余乳液均显著增大($p<0.05$)。而且热处理的乳清蛋白稳定乳液在冻融循环过程中发生明显的聚结($p<0.05$)，这是由于乳清蛋白的热敏性，低浓度的分散液在乳化之前热处理，导致其稳定乳液在冻融循环过程中趋向不稳定状态。

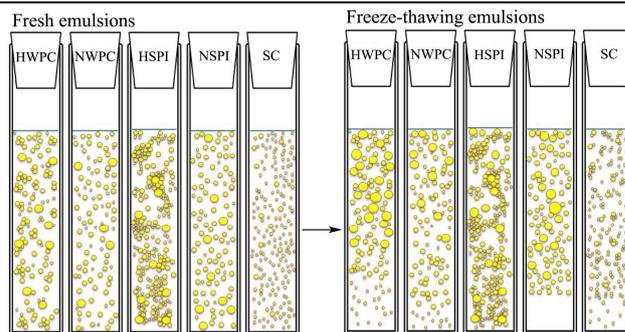


图 4 出现分层不稳定乳液内部乳滴(黄色)垂直分布示意图
Fig.4 Schematic representation of the vertical distribution of droplets (yellow) in the emulsions that were unstable to creaming. Left samples are fresh emulsions and right samples are the emulsions after freeze-thaw cycles

注：左边表示新鲜乳液；右边表示三次冻融循环之后乳液。

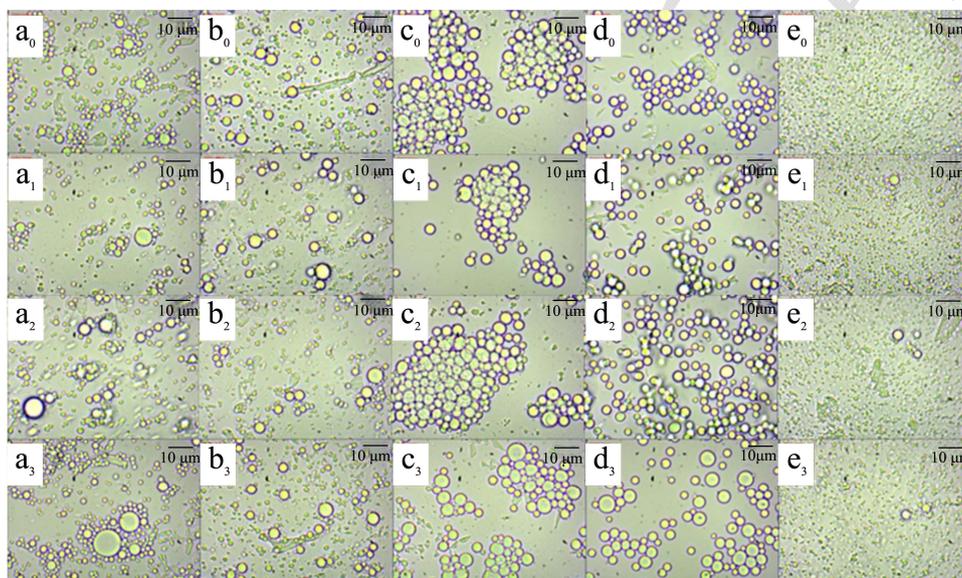


图 5 新鲜和冻融循环之后乳液的光学显微结构

Fig.5 Optical micrographs of the fresh emulsion and emulsions after freeze-thaw cycles

注：a, HWPC; b, NWPC; c, HSPI; d, NSPI; e, SC; 下标为冻融循环次数。

2.3 乳液分层及脂肪上浮情况

在食品乳液里发生液滴乳析或颗粒沉淀，这依赖于它们相对于水相的密度，如油滴上浮（乳析）和香精香料的下沉（沉淀），这些通常都是不期望的，因为它们都将给予产品一个不良的外观。由斯托克斯沉降定律（Stokes law）可知，油滴的上浮速率：

$$v=2r^2(\Delta\rho)g/9\eta_0$$

其中 r 为油滴半径、 $\Delta\rho$ 为油滴与水相密度差、 g 为重力加速度常数、 η_0 为乳液介质的黏度。

因此当乳滴由于絮凝或聚结粒径变大时，在分散相所受的浮力增加，乳液往往会发生分层现象。

由于不同蛋白具有不同的乳化能力、同种蛋白不

同处理（预先加热）具有不同的乳液结构，因此各乳液展现出显著不同的冻融稳定性。三次冻融循环之后，乳液样品的分层稳定性顺序为：HSPI>SC>NWPC>HWPC>NSPI，这与新鲜乳液的结构以及乳液在冻融循环过程中的絮凝和聚结情况紧密相关。

相对于乳清浓缩蛋白(WPC)和大豆分离蛋白(SPI)，酪蛋白酸钠(SC)具有更强的乳化能力，因此酪蛋白酸钠稳定乳液的乳滴最小。三次冻融循环之后，热处理的乳清蛋白(HWPC)稳定乳液发生接触聚结(图 2)，大的乳滴由于浮力作用上升而导致乳液分层，下层残留部分小液滴形成不透明状态，因此在外观上明显分层($p<0.05$)。未加热的乳清蛋白(NWPC)稳定乳液分散均匀，在冻融循环过程中发生很低程度的絮

凝和聚结,因此也明显分层但分层指数较小($p<0.05$)。未加热处理的大豆蛋白(NSPI)稳定乳液在冻融循环过程中出现最大程度的聚结,大的乳滴发生上浮以及小的乳滴由于絮凝而上浮,从而引起乳液分层显著($p<0.05$)且下层为透明清液。酪蛋白酸钠(SC)稳定乳液在冻融过程中具有良好的抗聚结稳定性,但乳液出现一定程度的絮凝,导致在宏观上出现轻微分层($p<0.05$)。热处理的大豆分离蛋白(HSPI)稳定的 Pickering 乳液由于液滴之间颗粒桥连作用具有大量的絮凝团块(图 5),乳液表现黏度最大宏观上呈现弱的凝胶样状态,由于乳液内部颗粒桥连絮凝形成三维网络结构,乳滴被限制在一个很小的范围内,从而具有优良的冻融稳定性,因此在外观上无明显的分层现象($p>0.05$)。

2.4 乳液的光学显微结构

由显微结构图明显能够看到,酪蛋白酸钠稳定乳液粒径最小;相对于未加热处理蛋白稳定乳液,热处理蛋白稳定乳液具有明显的絮凝团块结构;随冻融次数的增加,乳液粒径都趋于增大而且出现絮凝和聚结现象。热处理的乳清蛋白(HWPC)和未加热处理的大豆蛋白(NSPI)稳定乳液的乳滴粒径均明显增大($p<0.05$),这与各乳液样品的乳状液分层指数相一致(图 3)。

3 结论

3.1 冷冻是食品工业里的一个常见工序,用于某些特殊产品的加工或延长产品货架期,然而食品乳液在冻融过程中严重不稳定。对大豆分离蛋白简单的热处理,诱导大豆分离蛋白聚集成纳米颗粒能够作为一种有效的 Pickering 稳定剂,相比于化学改性或酶法改性安全性更高、操作更简单,同时热处理是食品工业生产中常用工序,如均质之前熔化固体脂肪、贮藏前热杀菌等。由此蛋白颗粒通过高压微射流制备的水包油型 Pickering 乳液,具有独特的冷凝胶样甚至膏状乳液的性质,由于乳液内部颗粒桥连絮凝形成三维网络结构,油滴被限制在紧密的凝胶网络结构里,其贮藏稳定性和冻融稳定性都有明显的改善。在相同乳化剂浓度和油分数条件下,依据乳液三次冻融循环之后的分层指数,乳液冻融稳定性的效果为: $HSPI > SC > NWPC > HWPC > NSPI$ 。这是因为酪蛋白酸钠乳化能力很强;HSPI 稳定乳液絮凝程度很大、形成凝胶样网络结构,从而增大乳液的冻融稳定性;而 HWPC 稳定乳液絮凝程度较小,不足以形成三维网络结构,反而由于絮凝引起乳滴所受浮力增加、促进乳滴上浮,导致乳液的

冻融稳定性下降;冻融循环导致 NSPI 和 HWPC 稳定乳液出现很大程度的聚结,也引起乳液的冻融稳定性降低。

3.2 本文对大豆分离蛋白做简单的加热处理(95 °C, 15 min),能够显著改善乳液冻融稳定性,从而为一些水包油乳液型冷冻食品、热敏性生物活性物质和低温储存药品的制备和研发提供一条有效的技术途径。相对于乳清浓缩蛋白和酪蛋白酸钠,大豆蛋白同样具有较高的营养价值,而且具有来源广泛和价格低廉的优势,在食品工业能显著的降低原料成本、提高经济效益。

参考文献

- [1] Degner B M, Chung C, Schlegel V, et al. Factors influencing the freeze-thaw stability of emulsion-based foods [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(2): 98-113
- [2] Cornacchia L, Roos Y H. Lipid and water crystallization in protein-stabilised oil-in-water emulsions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(7): 1726-1736
- [3] Marefati A, Rayner M, Tingren A, et al. Freezing and freeze-drying of Pickering emulsions stabilized by starch granules [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013, 436(35): 512-520
- [4] Chevalier Y, Bolzinger M A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions [J]. *Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects*, 2013, 439(2): 23-34
- [5] Liu F, Tang C H. Soy protein nanoparticle aggregates as pickering stabilizers for oil-in-water emulsions [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(37): 8888-98
- [6] Tang C-H, Liu F. Cold, gel-like soy protein emulsions by microfluidization: Emulsion characteristics, rheological and microstructural properties, and gelling mechanism [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30(1): 61-72
- [7] Liu F, Tang C H. Cold, gel-like whey protein emulsions by microfluidisation emulsification: Rheological properties and microstructures [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(4): 1641-1647
- [8] Palazolo G G, Sobral P A, Wagner J R. Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally-denatured soybean isolates [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(25): 398-409
- [9] Ghosh S, Coupland J N. Factors affecting the freeze-thaw stability of emulsions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22(1):

- 105-111
- [10] Cortés-Muñoz M, Chevalier-Lucia D, Dumay E. Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(3): 640-654
- [11] Fioramonti S A, Arzeni C, Pilosof A M R. et al. Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions [J]. *Journal of Food Engineering*, 2015, 156, 31-38
- [12] Ariyaprakai S, Tananuwong K. Freeze-thaw stability of edible oil-in-water emulsions stabilized by sucrose esters and Tweens [J]. *Journal of Food Engineering*, 2015, 152, 57-64
- [13] Ghosh S, Cramp G L, Coupland J N. Effect of aqueous composition on the freeze-thaw stability of emulsions [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, 272(1): 82-88
- [14] Nishinari K, Fang Y, Guo S, et al. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 39(2): 301-318