

超声处理制备小麦醇溶蛋白胶体颗粒 Pickering 乳液及其表征

吴滋灵¹, 周福珍¹, 尹艳², 尹寿伟¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院食物蛋白工程研究中心, 广东广州 510640)

(2. 惠州学院生命科学学院, 广东惠州 516007)

摘要: 胶体颗粒的润湿性决定 Pickering 乳液的形成及稳定性。小麦醇溶蛋白胶体颗粒在酸性(\sim pH 3.0)条件下具有较强的亲水性, 制约稳定的 Pickering 乳液形成。本研究采用超声乳化制备得到稳定的小麦醇溶蛋白稳定的无表面活性剂(surfactant-free)的食品级 Pickering 乳液。实验结果表明, 剪切乳化的 Pickering 乳液只能稳定 3 d, 超声处理的 Pickering 乳液稳定性明显增强, 当超声功率超过 40%时, Pickering 乳液的平均粒径小于 5 μm , 形成具有强粘弹性的乳液凝胶, 能够稳定 5 个月以上。利用激光共聚焦显微镜(CLSM)研究了乳液的界面结构、蛋白胶体颗粒分布及乳滴的聚集行为, 明确了超声处理乳液的稳定机理。本研究制备得到的蛋白基 Pickering 乳液(surfactant-free), 在新型营养物质输送等方面极具应用价值。

关键词: 小麦醇溶蛋白胶体颗粒; 皮克林乳液; 超声; 稳定性; 微结构

文章编号: 1673-9078(2018)07-123-127

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.018

Fabrication and Characterization of Stable Gliadin Colloid Particles Stabilized Pickering Emulsion by Ultrasound

WU Zi-ling¹, ZHOU Fu-zhen¹, YIN Yan², YIN Shou-wei¹

(1. Research and Development Center of Food Proteins, School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)(2. School of Life Science, Huizhou University, Huizhou 516007, China)

Abstract: The wettability of colloid particles play a key role in the formation and stability of Pickering emulsions. Gliadin colloid particles (GCPs) possessed strong hydrophilicity at acidic condition (\sim pH 3.0) due to the high positive charge, thus tended to partition within the continuous phase, resulting in unstable emulsions. In this study, gliadin colloid particles (GCPs) was used as an effective particulate stabilizer to prepare stable oil-in-water Pickering emulsions via ultrasonic approach. Oil leaking occurred for the control Pickering emulsions produced by shearing after three days of storage, while the sonication treatment significantly enhanced its stability especially when ultrasonic power high than 40%. Viscoelastic and gel-like Pickering emulsion with good stability for more than five months were successfully prepared in our work. The mean droplet size was $< 5 \mu\text{m}$ for the emulsions fresh and after 2 months of storage. The interfacial structure of emulsion, the partition of gliadin colloid particles and the aggregation behavior of the droplets were investigated to relate them with the stability of the emulsions, and the stability mechanism of the related Pickering emulsions was clarified. The food-grade surfactant-free Pickering emulsion stabilized by GCPs shows promising application prospects in the nutrients delivery.

Key words: gliadin colloidal particles; pickering emulsions; ultrasound; stability; microstructure

Pickering 乳液是一类由固体颗粒稳定的无皂 (surfactant-free) 乳液, 其最大的优势是耐受聚并

收稿日期: 2018-05-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471628); 广州市珠江科技新星专项 (201506010063); 惠州市科技计划 (2017ZX045)

作者简介: 吴滋灵 (1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品级 Pickering 乳液研究

通讯作者: 尹寿伟 (1980-), 男, 副教授, 主要从事食品级 Pickering 乳液研究

(coalescence)^[1]。英国 Hull 大学的 Binks 教授对 Pickering 乳液的研究在理论上做出较大的贡献, 建立了 Pickering 乳液的界面解吸能(ΔE)与三相接触角(θ)、颗粒半径(r)和界面张力(γ)之间的关系^[2]。通常尺寸大于 10 nm 的胶体粒子的解吸能比热运动能($\sim kBT$)大 3 个数量级以上, 其界面吸附可认为是不可逆的^[3]。无机颗粒稳定的 Pickering 最为传统, 其形成机理、性能及微观结构研究最为深入。最近, 胶体科学家开始探索新型 Pickering 乳液, 如环境响应 Pickering 乳液、

可逆的 Pickering 乳液。食品级 Pickering 乳液是食品胶体研究领域的热点和挑战,兼具活性物输送、低热量(calorie reduction)和质地改良(texture modification)的功能^[4,5]。2013年,英国 Leeds 大学的 Dickinson 教授撰文指出探寻合适食品级 Pickering 乳化剂是食品胶体领域的挑战^[6]。英国 Leeds 大学的 Murray 教授在食品级 Pickering 乳液构建方面开展重要的探索工作,利用辛基琥珀酸淀粉颗粒构建了微米级的水包油型 Pickering 乳液,此类乳液能稳定数月^[7]。比较而言,以食物蛋白颗粒制备的 Pickering 乳液的更具优势,也更具挑战。多数食物蛋白不能直接作为 Pickering 乳化剂,如大豆蛋白等通过界面吸附、展开和重排形成传统的乳液。针对这类蛋白质,可以通过热聚集、酶或化学交联合成蛋白胶体颗粒,以制备 Pickering 乳液。华南理工大学唐传核教授在大豆蛋白胶体颗粒稳定的 Pickering 乳液研究方面较为突出^[8]。以自组装醇溶蛋白颗粒为乳化剂制备 Pickering 乳液是食品胶体领域的前沿。我们研究小组利用 zein 胶体颗粒构建了稳定的食品级 Pickering 乳液,并通过界面输送制备出抗氧化的 Pickering 乳液^[9]。

小麦醇溶蛋白(gliadin)是一类两亲性的疏水蛋白,溶剂极性改变会引发由两亲性驱动的 gliadin 分子自组装形成纳/微米尺度的胶体颗粒。因此,小麦醇溶蛋白颗粒在构建食品级的 Pickering 乳液方面,具有广阔的前景。前期研究表明,不经过修饰的小麦醇溶蛋白颗粒制备的 Pickering 乳液只能稳定数天,通过静屏蔽途径调控 gliadin 胶体颗粒表面润湿性,制备出稳定的 Pickering 乳液,并揭示了相关构效机理^[10,11]。本研究利用超声的乳化以制备稳定 Pickering 乳液,系统研究了不同超声功率对 Pickering 乳液形成、稳定性、微观结构的影响,探讨了乳液微结构、流变学特性与乳液稳定性间的关系,为食品级 Pickering 乳液在新型营养物质输送载体及食品结构修饰基料应用提供了新的方法和思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 材料

小麦谷朊粉、玉米油,市购;无水乙醇,购自南京试剂化学有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器

超声乳化机,美国 OMNI 公司;高速剪切机(T10)、旋转蒸发仪磁力搅拌器,德国 IKA 公司;冷冻干燥机,德国 Christ 公司;Zeta 电位及纳米粒度仪 Nano-ZS,

英国 Malvern 公司;粒径分布仪(Mastersizer 3000),英国 Malvern 公司;激光共聚焦显微镜,德国 Leica 公司;HAKKE RS600 流变仪,德国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小麦醇溶蛋白胶体颗粒的制备

小麦醇溶蛋白的提取参考 Duclair 等报道的方法^[12],稍加改动。以市购谷朊粉为原料,经 70%的乙醇提纯冷冻干燥后,得到小麦醇溶蛋白。采用经典的反溶剂纳米沉淀法制备小麦醇溶蛋白胶体颗粒^[13]。将小麦醇溶蛋白溶解在 70%(V/V)的乙醇中,得到 2.5%(m/V)的溶液。在反溶剂过程,水/醇相体积比为 2.5:1。将小麦醇溶蛋白溶液缓缓倒入 1%冰乙酸的水溶液中,边倒边均质(6000 r/min 4 min)。所得悬浮液在 40℃水浴下旋蒸以除去乙醇和部分水,最后得到 2.0%(m/V)小麦醇溶蛋白胶体颗粒(GCPs)溶液。置于 4℃冰箱冷藏,备用。

1.2.2 小麦醇溶蛋白胶体颗粒(GCPs)的粒度和 Zeta-电位的测定

采用 Zetasizer Nano ZS 测定胶体颗粒的粒度及电位。测量温度为 25℃,颗粒分散系数为 1.45,分散剂为水,水的分散系数(dispersant RI)为 1.330。样品浓度为 0.1~0.2%。

1.2.3 Pickering 乳液的制备

以 2%(m/V)小麦醇溶蛋白胶体颗粒(GCPs)作为乳液剂制备 Pickering 乳液。玉米油以油相,油水比为 1:1(V/V),用高速分散机 IKAT10 经 20000 r/min 均质 2 min 制备得到粗乳液。之后采用超声处理进行二次乳化,功率大小分别为 0(对照)、20、40、60、80%和 100。脉冲 70%,超声时间 6 min。

1.2.4 乳液的储藏稳定性

通过观察放置时间中乳析层的变化来评价乳液的稳定性。若乳析层不变,则说明乳液稳定性好;若乳析层不断改变,并伴随漏油破乳等现象,则说明乳液稳定性不好。使用 Canon DIGITAL IXUS 110 IS 照相机对乳液进行拍照。

1.2.5 乳液的粒径分布测定

采用 Mastersizer 3000 粒度分布仪测定乳液的粒径及分布。以水为分散剂,颗粒折射率和吸收率分别为 1.470 和 0.001,分散剂折射率:1.330。采用体积平均直径(D4,3)来表征乳液的粒度及分布。

1.2.6 乳液的微观结构:激光共聚焦显微镜(CLSM)观察

采用激光共聚焦显微镜(CLSM)研究乳液的微结构。样品染色方法是:1 mL 样品中用 40 μL 尼罗红和

尼罗蓝混合荧光染料染色；分别在 488 nm 激发尼罗红，在 633 nm 激发尼罗蓝；扫描频率 100 Hz，扫描密度为 1024×1024。使用 LAS AF Lite 软件进行图像处理。

1.2.7 乳液的流变学特性

流变学特性通过 HAAKE RS600 流变仪测定。乳液样品在测试过程中保持恒温 25 °C，使用直径为 27.83 mm 的平板，其间隙为 1 mm。

应力扫描：设置应力范围为 0.1 Pa~1000 Pa，固定频率为 1 Hz。

频率扫描：根据应力扫描结果，选择在线性粘弹区域进行频率扫描。本实验中应力为 1 Pa，频率范围为 0.1 Hz~10 Hz。

1.2.8 数据统计与分析

所得结果均是取 3 次测量的平均值，且结果采用 SPSS 13.0 系统进行数据的显著性分析，显著性差异采用 95%的置信区间进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 小麦醇溶蛋白胶体颗粒 (GCPs) 的 Zeta-电位、粒度及外观

表 1 小麦醇溶蛋白胶体颗粒 (GCPs) 的粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta-电位

Table 1 Size and zeta potentials of gliadin colloid particles (GCPs)

pH	Particle size/nm	PDI	Zeta potential /mV
2.9	120.1±2.3	0.755±0.113	24.25±1.55



图 1 新制(a)和 1 h 后(b)小麦醇溶蛋白胶体颗粒 (GCPs) 的外观

Fig.1 Appearance photographs of the GCPs dispersions: (a) freshly prepared and (b) after one hour

表 1 给出了 GCPs 的粒径、多分散指数 (PDI)、Zeta-电位的大小，图 1 给出了 GCPs 的外观。可以看到，GCPs 粒子的 PDI 较大 (0.755±0.113)，呈多分散性分布；粒径为 120.1±2.3 nm，Zeta-电位为 24.25±1.55 mV。放置 1 h 后，小麦醇溶蛋白胶体颗粒仍呈半透明

状态。分散液中胶体颗粒的稳定性主要是由整体核电荷决定的，在酸性环境(~pH 3.0)GCPs 颗粒间的静电排斥力非常高，足以能够保证分散液的稳定。但是稳定的 Pickering 乳液的形成有赖于颗粒间的相互作用力，构建较为完整的界面结构。

2.2 Pickering 乳液的储藏稳定性



图 2 不同超声功率的 Pickering 乳液的外观

Fig.2 Appearance photographs of the Pickering emulsions as a function of ultrasonic power

注：a：新制，b：2 个月。

储藏稳定性是一个乳状液非常关键的品质参数。乳析是乳液聚集或聚并的先兆，储藏稳定性主要是通过乳析指数来评定。图 2 显示了不同超声功率下 GCPs 稳定的 Pickering 乳液的外观性质。新鲜制备的乳液 (图 2a) 是均匀的，没有出现乳析或分层现象。在储藏过程中由于重力的作用，乳液中的水层在下方，富含油脂的乳液在上方。超声功率为 0、20%的乳液在储藏 3 d 后便出现黄色小油滴，说明乳滴开始破裂，变得不稳定而漏油。而超声功率为 40%、60%、80%、100%的乳液 (图 2b) 只是析出了少部分水 (乳析指数在 20%左右)，乳液没有出现漏油现象，也就是说乳液仍保持稳定。而且超声功率为 40%~100%的乳液在储藏高达 5 个月之久后，仍保持稳定，而且可以实现倒置 (图 3)。这表明该乳液可能具有一定的粘弹性和凝胶特性，形成的乳液较为稳定。



图 3 放置 5 个月后的 Pickering 乳液外观 (功率为 40%)

Fig.3 Appearance photographs of the Pickering emulsions of 40% ultrasonic power after 5 months

2.3 Pickering 乳液的粒径

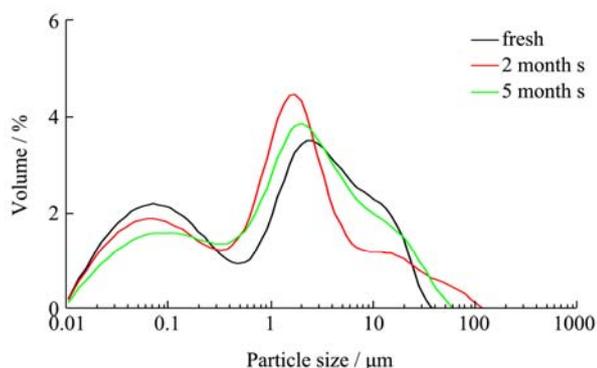


图4 超声功率40%的GCPs稳定的Pickering乳液的粒径分布
Fig.4 Size distribution of GCPs stabilized Pickering emulsions fabricated by 40% ultrasonic power as a function of time

从表2可以看出，新制乳液经过超声处理后平均粒径随着超声功率的增大而减小。超声功率在20%的乳液比不经过超声的乳液粒径减少了超过50%以上（从10.7 μm减小到4.7 μm）。新制乳液超声功率为60%以上的乳液平均粒径在2 μm以内。

乳液在放置了两个月后，超声功率为0%和20%的乳液破乳（破乳无法检测粒径），这之前乳液稳定性试验结果是一致的。而超声功率在40%以上的乳液粒径比新制乳液粒径稍微变大，但增大的幅度很小（大概增加了1 μm），乳液粒径保持在5 μm尺度内，一般低内相乳液的粒径在10 μm左右，且乳液的粒径越小，则表明乳液越稳定，所以本实验制备的超声乳液具有较强的储藏稳定性。图4是超声功率40%的乳液不同时间放置后的粒径分布图。从图中，我们可以明显地观察到，随着时间的增加，功率40%的乳液的粒径大小仍一致，且分布较均匀，这表明超声处理的乳液没有破坏乳液的结构，乳液在经过长时间的保存后，其结构具有较高的稳定性。

表2 不同超声功率下Pickering乳液的粒径大小

Table 2 Droplet size of GCPs stabilized Pickering emulsions as a function of ultrasonic power

超声功率/%	Fresh	2 months
	D _{4,3} /μm	D _{4,3} /μm
0	10.7±0.10	
20	4.73±0.11	
40	3.68±0.11	4.66±0.15
60	1.45±0.50	3.42±0.21
80	1.46±0.03	2.66±0.41
100	1.29±0.03	1.91±0.42

2.4 Pickering 乳液的微观结构

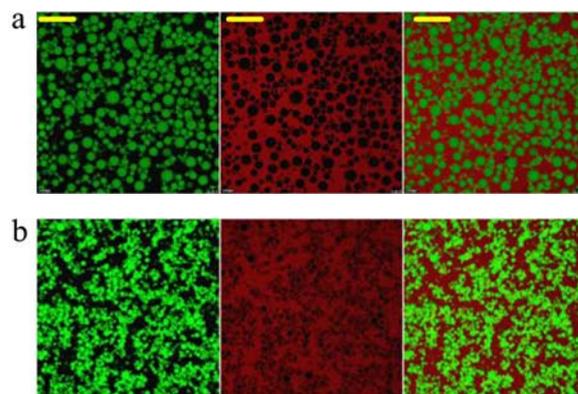


图5 Pickering乳液的CLSM图(标尺: 10 μm)

Fig.5 Selected CLSM images (Scale bar: 10 μm) of GCPEs as a function of ultrasonic power

注：(a)新制，未超声；(b)新制，超声功率为40%。

研究乳液的微观结构（如界面结构、颗粒分布、连续相网络结构等）有助于理解乳液的形成及乳液的稳定性。激光共聚焦显微技术（CLSM）能够清楚地观察到以上微观结构。图5显示出部分典型的超声处理后的GCPEs图像。绿色表示的是用尼罗红染色玉米油，红色表示的是用尼罗蓝染色小麦醇溶蛋白胶体颗粒（GCPs）。从图a我们可以观察到，不经过超声的乳液滴一颗一颗均匀分布，连续相中红色（蛋白质）明显，这表明上到油滴表面的蛋白质较少；而图b是超声功率为40%的乳液CLSM图，从图中可知，乳液油滴更小，而且呈现絮凝聚结状，这可能是因为经过超声处理后，超声过程输入的能量有助于更多的蛋白固体颗粒吸附到油水界面，从而稳定更多更小的油滴，而且乳液滴絮凝聚结明显但不合并，呈现如图所示的结构，表明该结构是稳定的。

2.5 Pickering 乳液的流变学特性

由固体颗粒稳定的乳液通常情况下具有较好的流变学特性，对乳液的稳定性有重要的影响。本实验通过频率扫描和应力扫描表征乳液的流变学特性，其中，G'和G''分别表示弹性模量和粘性模量，两者的交点表示其临界应力（乳液在该作用下发生凝胶-溶胶的结构转化）。图6是超声功率为80%乳液的应力扫描(a)和频率扫描(b)图。从图a中可看到，在线性粘弹区域内，G'（4000 Pa）明显高于G''（640 Pa），这表明该乳液具有类似于固体的粘弹性能，继续加大压力到超过100 Pa，才出现临界交点，这表明乳液的粘弹性较强。从图中可知，该超声乳液的G'在3500-4000 Pa范围内，而以往的研究表明，具有较好凝胶特性的高内相Pickering乳液的G'在1000 Pa左右，这表明经过超声的乳液具有优异的稳定性，具有高内相乳液的粘

弹性能和凝胶性。图 b 是超声功率为 80% 的乳液频率扫描图, 从图中可知, G' 明显高于 G'' , G' 表现出较弱的频率依赖性, 且频率扫描的 G' 在 2500~3000 Pa 之间, 表现了乳液较强的凝胶特性, 其频率扫描结果与其应力扫描结果一致。

从前面该乳液的激光共聚焦乳液结构分析中我们知道, 油滴经过超声后被剪切为粒径更小的液滴, 更多的蛋白颗粒吸附到油水界面上, 而且由于蛋白颗粒对油滴的稳定作用, 使得邻近的乳液滴絮凝粘结而不合并, 油滴与油滴之间通过固体蛋白颗粒被固定下来, 蛋白形成稳定的网络结构, 而且由于油滴的固定使乳液失去流动性, 因此在流变学特性实验中表现类固体的粘弹性和凝胶特性, 使得乳液滴可以稳定很长时间。

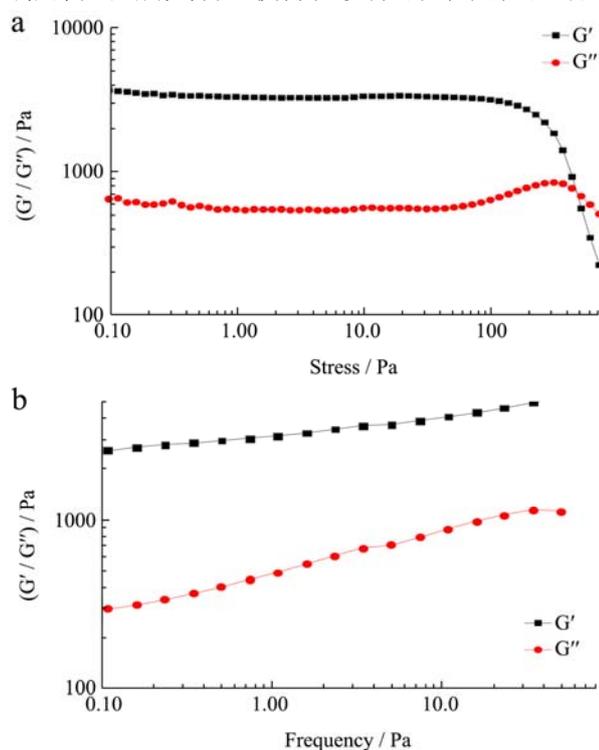


图 6 Pickering 乳液 (超声功率 80%) 的 G' 、 G'' 随扫描频率和应力的变化

Fig.6 Variations of storage (G') and loss (G'') moduli with the stress (a) and frequency (b) for the Pickering emulsions produced with 80% ultrasonic power

注: (a)应力扫描; (b)频率扫描。

3 结论

3.1 本文利用反溶剂纳米沉淀技术制备出纳米尺度的小麦醇溶蛋白胶体颗粒(GCPs), 采用简单低成本的超声乳化制备出小麦醇溶蛋白稳定的 Pickering 乳液, 放置 5 个月以上仍旧保持稳定。

3.2 本文初步探讨不同超声功率对乳液稳定性的影响, 结果表明超声功率为 40% 以上的乳液具有小的粒

径以及更好的稳定性; 通过激光共聚焦 (CLSM) 研究蛋白颗粒、油滴在界面、体相的分布情况以及乳液的微观结构, 结果表明经过超声处理, 油滴被剪切为更小的液滴, 超声过程中输入的能量有助于蛋白颗粒的吸附, 更多的蛋白颗粒吸附到油水界面从而稳定界面, 且蛋白形成稳定的三维网络结构, 油滴絮凝聚结而不合并, 赋予了乳液更优异的稳定性、流变学的性能。

参考文献

- [1] Berton-Carabin C C, Schroën K. Pickering emulsions for food applications: Background, trends, and challenges [J]. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2015, 6(6): 263-297
- [2] Binks B P. Particles as surfactants-similarities and differences [J]. *Curr. Opin. Colloid In.*, 2002, 7(s1-2): 21-41
- [3] Aveyard R, Binks B P, Clint J H. Emulsions stabilised solely by colloidal particles [J]. *Adv. Colloid Interfac.*, 2003, 100-102(2): 503-546
- [4] Rousseau D. Trends in structuring edible emulsions with Pickering fat crystals [J]. *Curr. Opin. Colloid In.*, 2013, 18(4): 283-291
- [5] Dickinson E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions [J]. *Trends Food Sci. Tech.*, 2012, 24: 4-12
- [6] Dickinson E. Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients [J]. *J. Sci. Food Agric.*, 2013, 93(4): 710-721
- [7] Yusoff A, Murray B S. Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25: 42-55
- [8] Liu F, Tang C H. Soy protein nanoparticle aggregates as Pickering stabilizers for oil-in-water emulsions [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61(37): 8888-8898
- [9] Wang L J, Hu Y Q, Yin S W, et al. Fabrication and characterization of antioxidant Pickering emulsions stabilized by zein/chitosan complex particles (ZCPs) [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63(9): 2514-2524
- [10] Hu Y Q, Yin S W, Zhu J H, et al. Fabrication and characterization of novel Pickering emulsions and Pickering high internal emulsions stabilized by gliadin colloidal particles [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61: 300-310
- [11] Yuan D B, Hu Y Q, Tao Z, et al. Development of stable Pickering emulsions/oil powders and Pickering HPIEs stabilized by gliadin/chitosan complex particles [J]. *Food & Function*, 2017, 8: 2220-2230

- [12] Duclairoir C, Irache J M, Nakache E, et al. Gliadin nanoparticles: formation, all- trans-retinoic acid entrapment and release, size optimization [J]. Polym. Int., 1999, 48(4): 327-333
- [13] Li K K, Yin S W, Yin Y C, et al. Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization [J]. J. Food Eng., 2013, 119(2): 343-352

现代食品科技