

酪蛋白酸钠稳定的海藻油纳米乳液制备及表征

孙勤^{1,2}, 王丽娟¹

(1. 沈阳师范大学粮食学院, 辽宁沈阳 110034) (2. 安徽粮食工程职业学院, 安徽合肥 230031)

摘要: 本文研究了酪蛋白酸钠稳定的平均粒径小于 100 nm 的海藻油乳液 (O/W) 的一般性质及环境因素对其稳定性的影响。采用微射流高压均质结合溶剂 (乙酸乙酯) 辅助蒸发法制备了海藻油含量 1% 的乳液 (EAE-nano), 用微射流高压均质法制备海藻油含量 10% 的乳液 (AE-nano) 作为对照。将 AE-nano 稀释 10 倍后与 EAE-nano 对比观察, AE-nano 为乳白色, 而 EAE-nano 呈半透明状。用动态光散射技术研究了 EAE-nano 的一般性质; 以及加入 0~500 mmol/L 的 NaCl、在 3.0~7.0 的范围调节 pH 值、用沸水加热处理等环境因素对乳液物理稳定性的影响。在 pH 为 7.0 时, EAE-nano 的平均粒径为 76.8±0.5 nm, AE-nano 的平均粒径为 180.9±2.1 nm; EAE-nano 比 AE-nano 对于 NaCl、pH 值的变化、加热处理等环境压力有更好物理稳定性。用微射流高压均质结合溶剂辅助蒸发法制备的酪蛋白酸钠稳定的食品级乳液, 在饮料的生产和疏水性生物活性物质的包封等应用方面显示出很高的潜在应用价值。

关键词: 酪蛋白酸钠; 海藻油; 纳米乳液; 微射流; 溶剂蒸发

文章编号: 1673-9078(2016)6-183-187

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.029

Preparation and Characterization of Algal Oil Nanoemulsions Stabilized by Casein Sodium

SUN Qin^{1,2}, WANG Li-juan¹

(1. Shenyang Normal University College of Grain Science and Technology, Shenyang 110034, China)

(2. Anhui Vocational College of Grain Engineering, Hefei 230031, China)

Abstract: Oil-in-water algae oil nanoemulsions (EAE-nano) containing small lipid droplets ($d < 100$ nm) stabilized by sodium caseinate (SC) were fabricated via high-pressure homogenization and solvent (ethyl acetate) evaporation, while oil-in-water algae oil emulsions (AE-nano) were prepared by high-pressure homogenization as control. EAE-nano appeared to be translucent, but AE-nano was opaque at the same oil concentration (1% algae oil). The properties of EAE-nano and the effects of pH, ionic strength (0~00 mmol/L NaCl) and thermal processing on the stability of EAE-nano were examined by dynamic light scattering technique. At pH 7.0, the mean particle size of EAE-nano was 76.8±0.5 nm, AE-nano was 180.9±2.1 nm. The effects of pH, ionic strength (0~00 mmol/L NaCl), thermal treatment (boiled 15 min) on the stability of the nanoemulsions and conventional emulsions were examined. The results indicated that EAE-nano had better stability to droplet aggregation and creaming than AE-nano. These results have important consequences for the utilization of food-grade nanoemulsions in beverage industries and encapsulating lipophilic functional components.

Key words: sodium caseinate; algal oil; nanoemulsion; microfluidizer; solvent evaporation

现代食品工业对食品的保健功能的要求日益提高, 生物活性物质常用于食品中以强化其促进健康、预防疾病等、辅助治疗等功能^[1, 2]。DHA 为 ω -3 多不饱和脂肪酸, 是人脑和视网膜脂质的主要组分, 能促进儿童大脑发育, 并且能抑制血小板聚集, 降低血液

收稿日期: 2016-02-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31571785); 辽宁省教育厅一般项目 (L2015499); 沈阳师范大学博士启动基金

作者简介: 孙勤 (1964-), 女, 副教授, 主要从事油脂化学及油脂加工工艺等方面的研究工作

通讯作者: 王丽娟 (1963-) 女, 博士, 副教授, 主要从事蛋白质工程、功能性食品等方面研究工作

粘稠度, 延缓血栓形成, 改善机体的微循环功能, 对防治冠心病和心脑血管的栓塞有显著作用, 甚至能使已形成的粥样化的斑块消退^[3, 4]。海藻油含有丰富的 DHA, 因难溶于水、极易氧化, 难以在食品中应用, 制备海藻油乳液是解决这个问题的良好策略。

近年来纳米乳液的研究受到广泛关注, 尤其当纳米乳液粒径 100 nm 以下时, 具有以下显著优势: 呈现透明或者半透明状态、抵抗沉降和乳析的物理稳定性强; 可用于荷载、包封和保护的疏水性功能物质, 提高其水溶性, 能提高疏水性活性物质的生物利用度, 也可用于包埋药物及用于化妆品的生产^[5]。Lane 等^[6]研究了以大豆磷脂为乳化剂的海藻油纳米乳液, 以等

量的 DHA 为对照, 结果表明, DHA 在海藻油纳米乳液中有更高的生物利用度^[7]。

高压均质法是食品工业中常用的制备乳液的方法。Jo and Kwon 等^[8]研究了用微射流高压均质机以 120 MPa 的压力经 3 个循环的均质, 制备了大豆分离蛋白、乳清蛋白、酪蛋白稳定的乳液, 其中乳清蛋白乳液的粒径最小, 平均粒径为 161.2 nm, 未能达到 100 nm 以下。酪蛋白酸钠是 FDA 批准的 GRAS (一般公认为安全的) 天然的食品材料, 无不良风味, 生产工艺成熟, 易大量获得, 因而在食品行业广泛使用。蛋白质作为乳化剂, 在液滴表面形成保护层, 防止乳液聚合; 在酪蛋白酸钠稳定的溶液中, 酪蛋白酸钠在油相和水相之间形成屏障。酪蛋白酸钠能螯合过渡金属离子, 清除自由基, 具有抗氧化作用^[9]。目前, 国内外未见酪蛋白酸钠稳定的海藻油纳米乳液的研究。

本研究以酪蛋白酸钠为乳化剂, 乙酸乙酯为辅助溶剂, 利用微射流高压均质结合溶剂蒸发法制备了酪蛋白酸钠稳定的海藻油乳液 EAE-nano。以未用溶剂辅助蒸发的 AE-nano 为对照, 通过对 EAE-nano 一般性质的研究及测定不同的 pH 值、离子强度以及加热处理等不同环境下的粒径、电位等数值, 揭示 EAE-nano 的一般性质及环境因素对其物理稳定性的影响, 旨在为 EAE-nano 的工业应用提供理论参考及依据。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 原料与试剂

酪蛋白酸钠购自澳洲 MG 公司, 食品级; 海藻油购自湖南佳格生物技术有限公司, DHA 含量大于 ≥ 35%; 乙酸乙酯、无水乙醇购自国药集团, 分析纯; 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

ζ-电位及纳米粒度分析 Nano-ZS, 英国 Malvern 公司; T25 digital ULTRA-TURRAX 高速剪切机, 德国 IKA 公司; RV10 digital 旋转蒸发仪, 德国 IKA 公司; M-110EH-30 微射流高压均质机, 美国 MFIC 公司; Brion3 STAR pH 计, 美国 Thermo 公司; CR22G 高速冷冻离心机, 日本 Hitachi 公司; HSG-IB 恒温水浴锅, 上海仪表(集团)供销公司。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米乳液的构建

水相溶液的准备: 将酪蛋白酸钠溶解于 5 mmol/L 的磷酸缓冲液中形成 1% (m/V) 的溶液, 加入 0.02%

的叠氮化钠防止腐败, 在 4 °C 下贮藏过夜。乳液的制备: 取上述的酪蛋白酸钠溶液作为水相, 占乳液体积的 90% (V/V), 以海藻油与乙酸乙酯的混合物 (海藻油 10%, 乙酸乙酯 90%) 作为有机相, 占乳液的体积的 10% (V/V)。用 T25 高速剪切机以 6000 r/min 的速度预均质 2 min, 制成粗乳液, 然后经微射流高压均质机以 50 MPa 的压力均质两次制成细乳液。在预均质及均质的过程中, 均使用冰浴冷却防止乙酸乙酯挥发。均质后, 将样品在旋转蒸发仪中减压、在 45 °C 下加热 20 min, 将有机相中的乙酸乙酯除去^[10], 制成 EAE-nano。以海藻油作为有机相, 同上的条件进行预均质和微射流高压均质, 均质后也同样将样品在旋转蒸发仪中减压加热 45 °C、20 min 制成细乳液 AE-nano, 作为对照。

1.2.2 乳液粒度和电位的测定

将乳液适当稀释, 用 0.1、1.0 mmol/L 的 HCl 或 NaOH 准确调节至 pH 7.0, 观察乳液的形态, 用 Nano-ZS 动态光散射纳米粒度仪在 25 °C 条件下测定样品的粒度和 ζ-电位。

1.2.3 离子强度对乳液的影响

用去离子水、20 mmol/L、200 mmol/L 和 500 mmol/L 的 NaCl 溶液稀释乳液, 然后测定乳液的粒度、电位。

1.2.4 pH 值对乳液的影响

将乳液适当稀释后用 0.1、1.0 mmol/L 的 HCl 或 NaOH 准确调节 pH 值至 (pH 3.0~7.0), 放置 4 h 后测定粒度及电位。

1.2.5 加热处理对乳液的影响

将乳液在沸水浴中加热 15 min, 取出后立即冷却至室温, 用去离子水稀释, 在 pH 值为 7.0 时测定乳液的粒度。

1.2.6 统计性分析

每个实验结果均测定三次, 取平均值。采用 SPSS 18.1 系统进行数据的显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 乳液的一般性质

乙酸乙酯是 GB 2760-96 规定的允许使用的食用香料, 分别以海藻油、海藻油与乙酸乙酯混合物作为油相, 1% 的酪蛋白酸钠溶液作为水相, 采用 50 MPa 的压力, 两次均质。微射流高压均质机产生的剪切力及湍流作用, 将油相分散在水相中, 在此过程中, 酪蛋白酸钠吸附到油、水界面, 降低油水两相的界面张力。均质后, 为了防止加热处理对乳液测定的影响,

将两种乳液都经过旋转蒸发仪 45 °C 减压加热 20 min。经测定酪蛋白酸钠稳定的 AE-nano，平均粒径为 180.9±2.1 nm，与 Jo and Kwon 等^[7]的研究结果相似。Jo and Kwon 等用微射流技术制备了酪蛋白酸钠稳定的β-胡萝卜素己烷乳液，用 120 MPa 的压力均质三次，得到的酪蛋白酸钠稳定的乳液的平均粒径为 171.4±2.7 nm。用 10% 的 Tween 20 作乳化剂时，乳液的平均粒径为 97.2±2.2 nm，然而这种乳液不能用于食品体系^[7]。因作为油相的海藻油与乙酸乙酯混合物（乙酸乙酯占 90%）与水相的界面张力远小于海藻油与水相的界面张力，在均质的过程中有利于乳液液滴的减小。尤其是经减压加热处理，乙酸乙酯蒸发导致乳液液滴收缩，经测定 EAE-nano 的平均粒径为 76.8±0.5 nm。将 AE-nano 稀释 10 倍后，与未经稀释的 EAE-nano 同样含 1% 的油相，但从图 1 中的乳液的照片看到，两种乳液的外观形貌显著不同，EAE-nano 的粒径远小于可见光的波长，光散射较弱，因此显示出透光性，呈半透明状，适合作为食品配料应用于透明饮料中，而 AE-nano 是乳白色^[10]。两种乳液的粒度分布见图 1，

AE-nano 粒径分布为单峰，最大峰位于 158.1 nm 处，单分散性好，粒径分布从 56.8 nm 至 615.1nm。EAE-nano 粒径分布为单峰，最大峰高位于 58.8 nm 附近，单分散性好，粒径分布从 18.2 nm 至 342.0 nm。

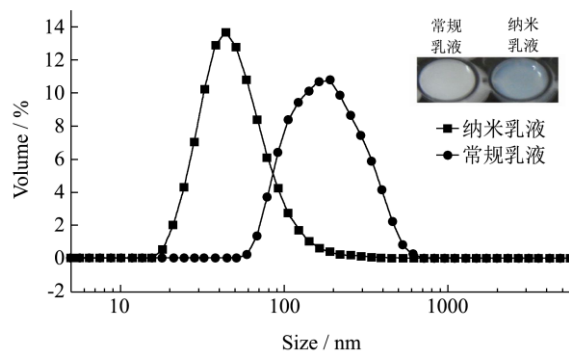


图 1 pH 值为 7 时 EAE-nano 和 AE-nano 的粒度分布及外观形貌
Fig.1 Particle Size Distributions of EAE-nano and AE-nano at pH 7.0

2.2 离子强度的乳液稳定性的影响

表 1 EAE-nano 和 AE-nano 在不同离子强度下的平均粒径、ζ-电位和分散指数

Table 1 Mean Droplet Size, ζ-potential and PDI of Nanoemulsion and Conventional Emulsions at different ionic strength at pH 7.0

	离子强度/(NaCl mmol/L)	粒度/nm	PDI	电位/mV
EAE-nano	0	76.8±0.5 ^a	0.22±0.01 ^a	-44.9±0.4 ^c
	20.0	75.2±1.2 ^a	0.21±0.01 ^a	-36.8±0.5 ^b
	200.0	78.2±1.6 ^a	0.22±0.01 ^a	-12.7±0.6 ^a
	500.0	78.8±1.8 ^a	0.21±0.01 ^a	-10.1±0.6 ^a
AE-nano	0	180.9±2.1 ^b	0.22±0.05 ^a	-59.5±1.6 ^c
	20.0	195.9±1.3 ^b	0.25±0.06 ^a	-49.5±0.4 ^b
	200.0	842.1±64.2 ^a	0.31±0.06 ^a	-12.7±0.6 ^a
	500.0	-	-	-10.7±0.4 ^a

注：字母 a-c 代表显著性差异 ($p < 0.05$)。

食品配方中存在盐离子，离子强度直接影响乳液类食品的物理稳定性，因此我们考察了离子强度对 EAE-nano 的影响。在 pH 7.0、25 °C 的环境温度下，在乳液中加入 0~500 mmol/L 的 NaCl，放置 4 h，用动态光散射技术对乳液样品进行分析，结果如表 1 所示。当离子强度为 0~500 mmol/L，EAE-nano 的粒径在 75.2±1.2 nm 至 78.8±1.8 nm 间，无显著变化。当离子强度为 200 mmol/L 时，AE-nano 的粒径从 195.9±1.3 nm 变成 842.1±64.2 nm。当离子强度为 500 mmol/L 时，AE-nano 乳液样品出现絮状物，粒径测定结果失真，因此未列出。从表 1 中看出，随着 NaCl 的增加，EAE-nano 和 AE-nano 的 ζ-电位都显著降低。这是由于水相中的 Na⁺ 与蛋白质中的带负电的基团结合，将蛋白表面的电荷屏蔽的结果。对于 AE-nano 来说，由

于液滴表面的电荷减少，液滴之间的斥力减小到不足以克服液滴之间的引力作用，出现絮凝和聚集。在 EAE-nano 制备过程中，减压加热使油相中的溶剂挥发，乳液的粒径缩小，EAE-nano 乳液的界面层增厚，液滴间的空间位阻增大。在加 NaCl 前、后，EAE-nano 的电位都低于 AE-nano 的电位。我们推测，可能是由于 EAE-nano 的液滴表面的多层堆积的蛋白的空间位阻作用对乳液的稳定性有更大的贡献。

2.3 pH 值变化对乳液稳定性的影响

将 EAE-nano 和 AE-nano 分别用去离子水稀释 5 倍及 50 倍，并精确调节 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0 及 7.0，放置 4 h 后测定粒度及 ζ-电位，AE-nano 和 EAE-nano 的平均粒径及多分散指数见表 2。当 pH 值

为 6.0 及 7.0 时, EAE-nano 的平均粒径为 73.5 ± 0.4 nm 及 74.4 ± 1.8 nm; 当 pH 值为 3 及 5 时, EAE-nano 的粒径增大至 94.2 ± 6.8 nm 及 96.1 ± 1.2 nm; 即使当 pH 值为 4 时, 乳液的粒径 209.3 ± 2.9 nm, 在考察的 pH 值范围内, EAE-nano 的平均粒径都较小, 对 pH 值的变化有很好的稳定性。AE-nano 受 pH 值影响很大, 当 pH 值为 5 时, 粒径显著增至 937.5 ± 26.4 nm, 当 pH 值为 4.0 时, AE-nano 发生聚集, 出现大的絮凝物, 造成取样不均匀, 测定结果失真因此未列出。从图 2 中, 可以看出, ζ -电位随 pH 值变化。当 pH 值为 4.0 时临近酪蛋白酸钠的等电点^[12], 乳液表面的净电荷很少, 静电斥力不足以克服乳液液滴之间的相互吸引, 乳液凝聚, 乳液中出现明显观察到的絮状物, 如图中白色箭头所示。结果表明 EAE-nano 有更好的 pH 值稳定性。原因是在 AE-nano 液滴表明是聚集着单层的蛋白质, 在 EAE-nano 的情形是由于乙酸乙酯的挥发, 液滴收缩, 蛋白质在液滴的表层为多层排布, 乳液液滴包裹了相对较厚的蛋白层, 空间位阻作用使得 EAE-nano 具有很好物理的稳定性。结果如图所示, pH 值相同时, EAE-nano 的 ζ -电位低于 AE-nano 的电位, 乳液液滴收缩, 蛋白层的比表面积减小, 表面电荷量减少, 因此 EAE-nano 的电位降低。由于乳液收缩, 酪蛋白酸钠在乳液表面的堆积厚度增大, 空间位阻作用加强, 因此有利于乳液的稳定性提高, 可以想象 EAE-nano 的空间位阻作用在乳液的稳定性中占主导地位。

表 2 EAE-nano 和 AE-nano 在不同 pH 值的平均粒径和多分散指数

Table 2 Mean Droplet Size and PDI of Nanoemulsion and Conventional Emulsions at different ionic strength at pH 7.0			
	pH值	粒度/nm	PDI
EAE-nano	3.0	94.2 ± 6.8^b	0.25 ± 0.11^a
	4.0	209.3 ± 2.9^a	0.28 ± 0.08^a
	5.0	96.1 ± 1.2^b	0.22 ± 0.01^a
	6.0	73.5 ± 0.4^c	0.22 ± 0.01^a
	7.0	74.4 ± 1.8^c	0.21 ± 0.01^a
AE-nano	3.0	179.4 ± 1.7^b	0.19 ± 0.01^b
	4.0	-	-
	5.0	937.5 ± 26.4^a	0.43 ± 0.05^a
	6.0	221.1 ± 2.7^b	0.28 ± 0.06^{ab}
	7.0	183.9 ± 2.8^b	0.21 ± 0.03^b

注: 字母a~c代表显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.4 加热对乳液稳定性的影响

乳液类食品在制备和灭菌环节都要经历加热过

程, 因此我们考察了加热处理对乳液稳定性的影响。将 EAE-nano 及 AE-nano 样品在沸水浴 15 min, 迅速冷却至室温, 观察样品的形态, 并且适当稀释, 测定乳液的粒度。经煮沸加热后, EAE-nano 仍是半透明状, 粒径分布无明显改变。而 AE-nano 比未加热前更显浑浊, 粒度分布从原来的单峰变成双峰, 粒度分布在 2305 nm 出现最大峰。我们分析由于剧烈加热导致蛋白质的结构展开, 疏水基团暴露, 乳液液滴之间的疏水相互作用加强, 导致了乳液液滴发生了絮凝、聚集。由于 EAE-nano 的液滴表面的多层的蛋白质的堆积, EAE-nano 的空间位阻稳定作用比 AE-nano 的强, EAE-nano 比 AE-nano 的有更强的热稳定性^[13]。

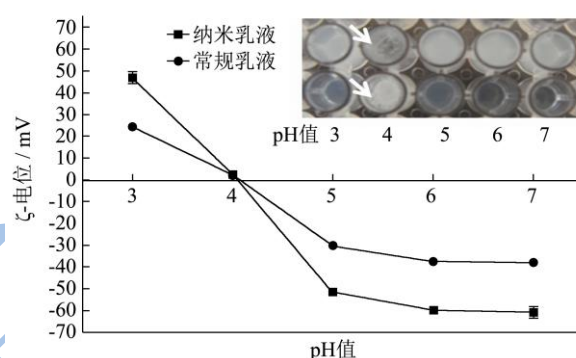


图 2 pH 值对 EAE-nano 和 AE-nano ζ -电位的影响

Fig.2 Effect of pH on ζ -potential of nanoemulsions and conventional emulsions

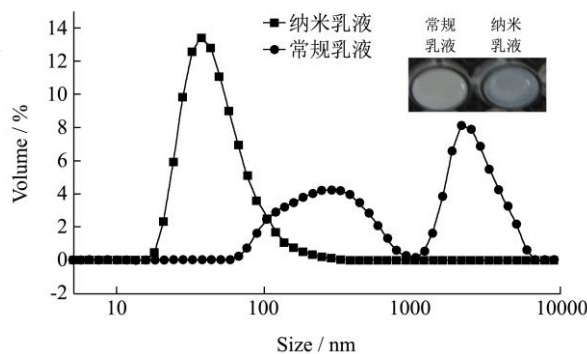


图 3 加热处理对乳液粒径分布的影响

Fig.3 Effect of Heating Processing on Particle size distributions of nanoemulsions and conventional emulsions

3 结论

用酪蛋白酸钠作为乳化剂及稳定剂, 用微射流高压均质并结合溶剂辅助蒸发法成功制备了 100 nm 以下的酪蛋白酸钠稳定的海藻油乳液 EAE-nano, 以只用微射流高压均质而未用溶剂辅助蒸发的方法制备的酪蛋白酸钠稳定的海藻油乳液 AE-nano 为对照。研究结果表明, EAE-nano 的平均粒径仅为 76.8 ± 0.5 nm, 呈半透明状。对于离子强度、pH 值变化、加热处理等环

境因素, EAE-nano 有更好的物理稳定性。本研究表明微射流高压均质并结合溶剂辅助蒸发法能够制有效降低乳液的粒径, 此技术在食品、药物、化妆品生产等领域将会有广泛的应用空间。

参考文献

- [1] Huang Q, Yu H, Ru Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology [J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(1): R50-R57
- [2] Rong L, Shoemaker C F, Xiaoqing Y, et al. Stability and bioaccessibility of beta-carotene in nanoemulsions stabilized by modified starches [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2013, 61(6) :1249-1257
- [3] Hooper L, Harrison R A, Summerbell C D, et al. Omega 3 fatty acids for prevention and treatment of cardiovascular disease.[J]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2004(4): CD003177-CD003177
- [4] Gogus U, Smith C. n-3 Omega fatty acids: A review of current knowledge [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 45(3): 417-436
- [5] 张阳德. 纳米药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [6] Lane K E, Li W, Smith C, et al. The bioavailability of an omega-3-rich algal oil is improved by nanoemulsion technology using yogurt as a food vehicle [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 49(5): 1264-1271
- [7] Acosta E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009, 14(1): 3-15
- [8] Jo Y J, Kwon Y J. Characterization of β -carotene nanoemulsions prepared by microfluidization technique [J]. *Food Science & Biotechnology*, 2013, 23(1): 107-113
- [9] Dwyer S P O, Beirne D O, Eidsness D N, et al. Effects of sodium caseinate concentration and storage conditions on the oxidative stability of oil-in-water emulsions [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(s 2-3): 1145-1152
- [10] Shah B, Ikeda S, Davidson P M, et al. Nanodispersing thymol in whey protein isolate-maltodextrin conjugate capsules produced using the emulsion-evaporation technique [J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 113(1): 79-86
- [11] Li-Juan W, Ye-Chong Y, Shou-Wei Y, et al. Development of novel zein-sodium caseinate nanoparticle (zp)-stabilized emulsion films for improved water barrier properties via emulsion/solvent evaporation [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2013, 61(46): 11089-11097
- [12] Ma H, Forsell P, Partanen R. Sodium caseinates with an altered isoelectric point as emulsifiers in oil/water systems [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2009, 57(9): 3800-3807
- [13] Monahan F J, McClements D J, German J B. Disulfide-mediated polymerization reactions and physical properties of heated wpi stabilized emulsions [J]. *Journal of Food Science*, 1996, 61(3): 504-509