

两步乳化法改善蛋白基高内相乳液稳定性

张莉丽, 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: 本研究以天然牛血清白蛋白(BSA)为蛋白模型, 针对其制备的蛋白基高内相乳液(HIPEs)稳定性差的问题, 在对蛋白不改性的基础上, 改变乳化方式即采用两步乳化法能产生显著的改善效果。先用高能均质方式(高速均质 30000 r/min、超声、微射流)制备出油相(ϕ)为 0.2, 体积平均粒径($d_{4,3}$)在 17.60~0.425 μm 范围内的初始乳液, 即微乳滴; 再用低能均质方式(高速均质 13500 r/min), 以微乳滴为类 Pickering 稳定剂制备 ϕ 为 0.8 的 HIPEs。通过改变蛋白浓度和制备初始乳液的均质能量, 制备了不同特性的 HIPEs, 并对初始乳液的界面蛋白吸附率($AP\%$)、粒径进行了表征, 同时对 HIPEs 室温存储 20 d 前后的外观、微观结构和流变特征进行了观测。最后对初始乳液进行了去除游离蛋白的对比实验和 HIPEs 的热稳定性测试。结果显示蛋白浓度在 1 wt% 最合适, 但即使低至 0.1 wt% 依然可以制备出倒置不流动的 HIPEs。当微乳滴的 $d_{4,3}$ 在 2.16 μm 及以下时可以有效提升 HIPEs 的稳定性。研究表明, 正是由于微乳滴的存在显著改善了 HIPEs 的储藏稳定性和热稳定性。

关键字: 牛血清白蛋白; 两步乳化法; 高内相乳液; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2020)11-180-187

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.11.0007

Improving the Stability of Protein-based High Internal Phase Emulsions by Two-step Emulsifying Method

ZHANG Li-li, TANG Chuan-he

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

Abstract: In this study, taking native bovine serum albumin (BSA) as the protein model, two-step emulsification was used to improve the stability of protein-based high internal phase emulsions (HIPEs) without causing protein denaturation. Firstly, an initial emulsion (micro-droplets) with ϕ as 0.2 and $d_{4,3}$ (volume-averaged diameter) in the range of 17.60~0.42 μm , was prepared by high-energy homogenization (high speed homogenization 30000 r/min, ultrasonication and microfluidization). Then, HIPEs ($\phi=0.8$) were fabricated using micro-droplets as the Pickering stabilizer through low-energy homogenization (high speed homogenization at 13500 r/min). HIPEs with different properties were prepared by changing the protein concentrations and the homogenization energy for the preparation of initial emulsions. The interfacial protein adsorption rate ($AP\%$), particle size of the initial emulsions were characterized, while their appearance, microstructure and rheological characteristics were examined before and after a 20 day storage at room temperature. Finally, a comparative experiment to remove free proteins and a thermal stability test of HIPEs were conducted. It was found that the most suitable protein concentration was 1 wt%, even at a concentration as low as 0.1 wt%, HIPEs remained stable and still after being turned upside down. The stability of HIPEs was effectively improved when the $d_{4,3}$ of micro-droplets was not higher than 2.16 μm . The results showed that the presence of micro-droplets significantly improved the storage stability and thermal stability of HIPEs.

Key words: bovine serum albumin; two-step emulsification; high internal phase emulsions; stabilization

引文格式:

张莉丽,唐传核.两步乳化法改善蛋白基高内相乳液稳定性[J].现代食品科技,2020,36(11):180-187

ZHANG Li-li, TANG Chuan-he. Improving the stability of protein-based high internal phase emulsions by two-step emulsifying method [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(11): 180-187

收稿日期: 2020-01-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21872057)

作者简介: 张莉丽 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 健康食品工程

通讯作者: 唐传核 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质化学与营养及食品胶体

乳液的存在由来已久, 早已渗透人类生活的方方面面。当乳液的内相体积分数大于等于 0.74 时即为高内相乳液(HIPEs)^[1]。由于内相体积高使其具有比普通乳液远大得多的界面面积^[2]、可控的凝胶状流变特性^[3]、低水分含量不易变质^[4]等的优越性, 在食品、化

妆品、制药和化工等领域的应用研究掀起热潮。按传统的乳化机理,乳液随着油相的提高就需要用到大量的小分子乳化剂(表面活性剂)、助表面活性剂^[5]或一些大分子乳化剂(蛋白)如 BSA、酪蛋白酸钠、乳清蛋白等,且所制备的 HIPEs 稳定性效果差,对 pH 和盐的干扰也非常敏感。而随后 Pickering 乳液的稳定机理的发现^[6]即具有两亲性颗粒能很好的稳定油水界面,不仅乳化剂用量少(颗粒浓度可低至 0.5 wt%)^[7],且具有超高的油滴聚结稳定性^[8]。因此研究人员兵分两路走,一方面则是对原有常用的材料进行各种修饰,改性;一方面是不断去挖掘寻找符合作为 Pickering 稳定剂的且尽可能天然绿色的胶体颗粒,如蛋白质、淀粉颗粒、纤维素纳米晶等。这不仅耗时且经过修饰后本身材料或引入的小分子对人体健康风险有待评估,而源自食品中的新材料能否大规模的应用也需要时间的验证。对于传统熟知的乳化性较好的牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA),来源广泛、制取简单、成本低廉且符合人们日常饮食需求或习惯,是研究最为充分的蛋白型乳化剂之一。BSA 分子量约为 66.3~69.0 ku,水合粒径约 4.22~7.10 nm,每个单体含有 1 个巯基和 17 对二硫键,是一种比较坚硬且表面疏水性较高的球蛋白,但结构脆性较高,等电点 4.7~4.9,温度稳定性在 60.4~67.5 °C^[9-11]。但是它在 HIPEs 的领域中效果却大打折扣,以正己烷为油相为例,制备成 HIPEs 所需蛋白浓度高达 10 wt%^[12]。而在一些商业用油为油相所制备的 HIPEs 储藏稳定性也很差,K.I. Al-Malah 采用电导率评估乳液的稳定性发现 0.5 wt% 最多能稳定 ϕ 为 0.43 的大豆油和葵花籽油,0.33 的玉米油^[13]。因此,本研究基于 Pickering 乳液稳定机理的启示,对 BSA 在不经改性的基础上改变均质方法,即采用两步乳化法,先制备出粒径在 0.4~2 μm 的微乳滴,再用这些微乳滴去稳定剩余的油相从而制备出 HIPEs,这样制备出的 HIPEs 储藏稳定性得到显著的提升,且可抵御一定离子强度的干扰。由于 BSA 本就在医药方面有广泛的应用,这使得它所稳定的 HIPEs 作为生物活性物质缓释载体体系在保健食品、特殊医疗食品方面有了更宽广的应用价值。亦为那些对离子强度敏感的可食用蛋白在复杂的高油食品体系中应用的局限性提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

主要试剂:牛血清白蛋白(BSA),购于上海源叶生物有限公司;一级大豆油(福临门),购于广州当

地超市;其余所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

主要仪器:冷冻离心机 KH20R-150B,湖南凯达科学仪器;激光纳米粒度仪 Zetasizer Nano ZS、激光粒度分布仪 Mastersizer 3000,英国 Malvern Panalytical;超声细胞破碎仪 Scientz-IID,宁波新芝生物科技股份有限公司;光学显微镜 BX51,日本 Olympus;激光共聚焦显微镜 TCS SPE,德国 Leica;旋转流变仪 Discovery HR-3,美国 TA Instruments。

1.3 实验方法

1.3.1 BSA 溶液配置

将一定量的牛血清白蛋白(BSA)粉末溶于含 5 mM 的磷酸缓冲液中,使得蛋白溶液浓度为 6~0.2 wt%,并含 50 mM NaCl。室温下磁力搅拌 2 h,蛋白充分溶解后加入 0.02% (W/V)叠氮化钠(NaN_3)以抑制微生物生长,用 1 M NaOH 或 1 M HCl 把蛋白溶液调为中性($\text{pH}=7.0$),然后将其置于 4 °C 冰箱中过夜,使蛋白充分水化,在使用前恢复至室温并将 pH 复调为 7.0。

1.3.2 乳液的制备

1.3.2.1 一步乳化法

直接将不同浓度的蛋白溶液与大豆油以 1:4 的体积比经 13500 r/min 剪切均质 2 min 成油相(ϕ)为 0.8 的高内相乳液(HIPEs)。

1.3.2.2 两步乳化法

不同 BSA 浓度:第一步先低速均质成 $\phi=0.2$ 的粗乳,再用冰浴超声(570 W, 5 min)制备初始乳液;第二步取 1.25 mL 初始乳液,补充 3.75 mL 的大豆油(确保最终 $\phi=0.8$),后经 13500 r/min 剪切均质 2 min 成 HIPEs。

不同均质能量:第一步控制粗乳的蛋白浓度为 1 wt%, $\phi=0.2$,采用 3 种均质方式制备初始乳液:于 30000 r/min 高速剪切均质 3 min,记为“HS”;冰浴超声处理(超声功率分别为 57 W、570 W) 8 min,分别记为“US-57 W、US-570 W”;微射流均质一次,设两个压力值 40 MPa、80 MPa,记为 MF-40 MPa、MF-80 MPa。第二步同上制备成相应的 HIPEs。

1.3.2.3 去除游离蛋白的乳液

选用 US-570W 初始乳液,12000 r/min 离心 20 min 后去除下清液,用相同的水相溶液对上层乳液进行洗涤然后再次离心,如此循环 3 次,保证最后一次整体乳液的质量与第一次离心前一致,再用冰浴超声(570 W) 8 min 得到重分散乳液,检测其界面蛋白吸附率,

并用其制备的高内相乳液记为 re-HIPEs。

1.3.3 初始乳液的性质表征

1.3.3.1 乳滴粒径测量

采用 Mastersizer 3000 粒度分布仪测定乳液的粒径,分散剂为蒸馏水。乳液的相对折射率为 1.095,由大豆油的折光系数 1.456 与水的折光系数 1.33 的比值得到,搅拌桨转速为 2000 r/min。每个乳液样品重复测量三次,取平均值,用体积加权平均粒径 $d_{4,3}$ 和表面积加权平均粒径 $d_{3,2}$ 表示,计算公式(由仪器说明书提供)如下:

$$d_{m,n} = \left[\frac{\sum V_i d_i^{m-3}}{\sum V_i d_i^{n-3}} \right]^{\frac{1}{m-n}}$$

1.3.3.2 zeta-电势

采用 Zetasizer Nano-ZS 的动态光散射技术,测定前需将样品的蛋白浓度稀释到 0.1 wt%,每个样品分别用 0.22 μm 水系滤膜过滤过的蒸馏水和 50 mM NaCl 溶液来稀释。测量结果取三次读数的平均值。

1.3.3.3 界面蛋白吸附率 AP%

参考 Liang 等^[14]的方法测定乳液的界面蛋白吸附率(AP%)。取 1.5 mL 初始乳液于 2.0 mL 离心管中,于 12000 r/min 离心 20 min,并用 0.22 μm 水系滤膜过滤清液一次。然后用 lowry 法分别测定乳化前连续相和离心后下清液的蛋白浓度 C_0 和 C_f , AP% 的计算公式如下:

$$AP\% = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100\%$$

1.3.4 HIPEs 的性质表征

1.3.4.1 微观结构

光学显微镜观察:采用 10、40、100 倍的物镜(Olympus DP70 camera)对新鲜制备及不同储藏时间段的 HIPEs 的微观结构进行观察对比。

激光共聚焦显微镜观察:采用 LEICA 激光共聚焦显微镜(型号 TCS SPE)进行观察。参考 Gallier.S 的方法^[15],乳液样品用染色剂(Nile Red 和 Nile Blue 各 0.1%的混合染料)进行染色。将染色后的样品置于带有凹槽的载玻片中心,盖上盖玻片,注意不要产生气泡,在盖玻片上滴一滴香柏油,然后用油镜(63 倍)进行观察。在 488 nm 和 633 nm 波长下同时激发,发散波长设置在稍大于相应的激发波长的范围内,相应的接收波长应设置在激发波长 10 nm 后的位置,调节好后在尽短的时间里采集图像,以免荧光淬灭。

1.3.4.2 稳定性测定

储藏稳定性:将在直径为 2 cm 玻璃瓶中制备好的 HIPEs,用盖子密封好,置于室温 20 d。热稳定性:

将密封好的玻璃瓶中的 HIPEs 置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中加热 15 min,后立即冰浴迅速恢复至室温。对这两种形式处理前后样品的外观和微观结构进行观察,并用流变仪测定其粘弹性的变化。

1.3.4.3 流变学特征

乳液的粘弹性可通过旋转流变仪(DHR)的频率扫描模式(Oscillation)测得的乳液的粘弹性进行表征,频率扫描范围为 0.1~10 rad/s,应变设为 0.5%,并保持室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.5 数据分析

上述实验均设置 3 次平行,所得的数据用 Excel 2016 和 origin 2017 进行整理和绘制,并对数据基于 Tukey 检验模式进行单因素方差分析和显著性分析($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 不同 BSA 浓度一步法与两步法所制备的

HIPEs 的储藏外观图

从图 1a 可知,BSA 从 6 wt%~0.2 wt%经一步法乳化制备的 HIPEs 在室温静置 1 h 后均发生了不同程度的破乳现象,12 h 后出现明显的分层。随着蛋白浓度的增加,所制备的 HIPEs 的破乳速度就越快,BSA 浓度为 2 wt%及以上的乳液打成后 5 min 内即破乳,1 wt%~0.2 wt%则是在 1 h 后能明显看到破乳现象的出现。且 0.2 wt%的样品流动性较强,无法倒置。之所以破乳速度如此快,有可能是因为盐离子的存在产生了静电屏蔽的效应(BSA 在纯水中的电势为-19.9 mV,在 50 mM NaCl 溶液中为-9.15 mV,与^[16]相符),均质后形成的乳滴由于其表面上蛋白与蛋白分子之间的因为斥力的减弱而易发生絮凝。随蛋白浓度的升高,加剧了蛋白的团聚程度,高频率的碰撞使水相中的多余未吸附到油水界面的蛋白与被吸附蛋白之间的作用力超过了界面吸附力,从而把被吸附的蛋白从界面脱离下来导致油滴变大;另一方面,蛋白分子大量团聚会掩盖蛋白表面的疏水基团从而降低蛋白的乳化性^[7]。

相比于图 1b,经两步乳化法制备的 HIPEs 即使蛋白浓度为 6 wt%时室温储藏 20 d 其外观没有明显变化,甚至稳定 HIPEs 所需的最低蛋白浓度相比一步乳化法可低至 0.1 wt%,且倒置不流动,这比起传统的用表面活性剂(5 wt%~50 wt%)才能制备稳定的 HIPEs^[17],乳化剂的用量显著降低。而当蛋白浓度低到 0.08 wt%时,无法有效的将油相全部包裹住,但仍可倒置;而其他系列浓度的样品室温放置 20 d 后均未

出现破乳和倒置流动情况,这说明两步乳化法确实能显著提升 BSA 稳定的 HIPEs 的储藏稳定性,且能有

效抵御一定离子强度的干扰 (50 mM NaCl)。针对此现象做了如下探究。

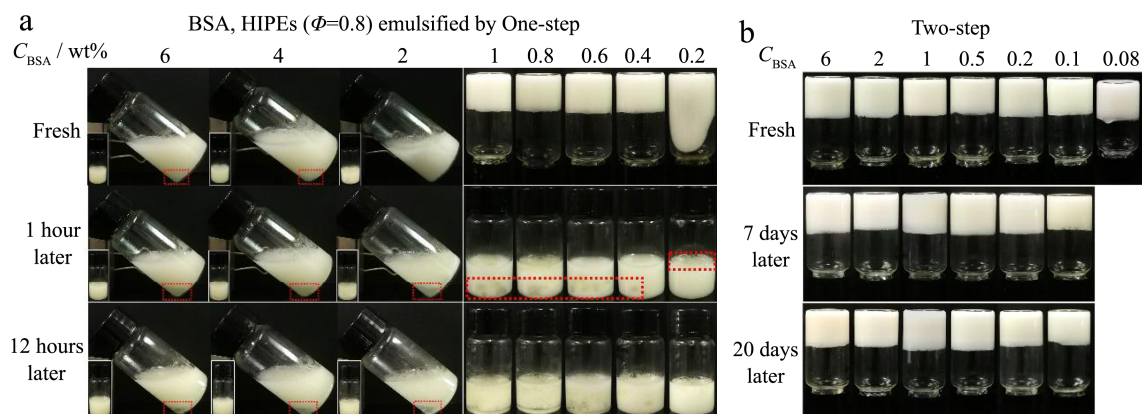


图1 不同蛋白浓度制备 ϕ 为 0.8 的 HIPEs 的储藏外观图

Fig.1 The storage appearance figures of HIPEs ($\phi=0.8$) stabilized by a series of protein concentrations

注: a: 一步乳化法; b: 两步乳化法。

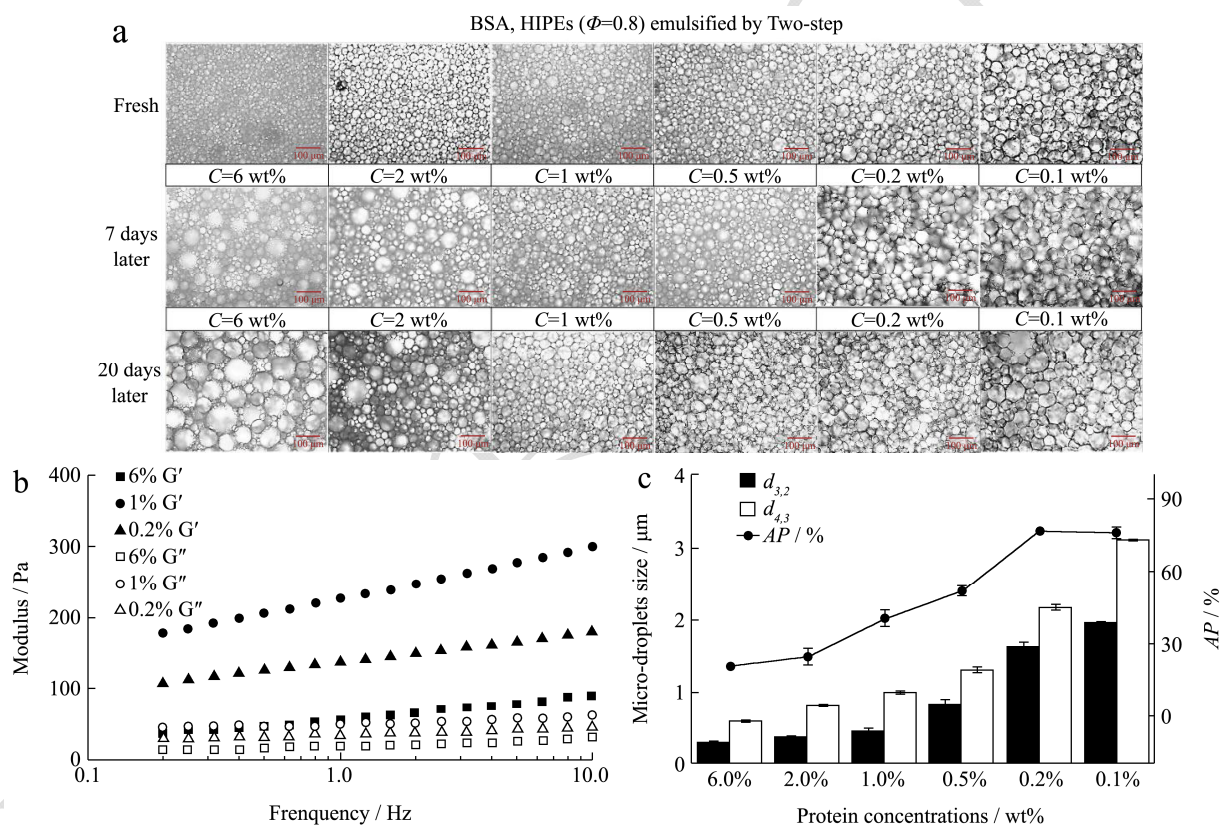


图2 a: 光学显微图; b: 流变特征图; c: 不同蛋白浓度的初始乳液的 AP% 及微乳滴粒径

Fig.2 a: optical micrographs of HIPEs prepared by two-step emulsification at 0 d, 7 d, and 20 d with different protein concentrations; b: the rheology of fresh HIPEs; c: the AP% and micro-droplets size of the initial emulsion with different protein concentrations

注: a 图标尺为 100 μm ; b 图 G' 弹性模量, G'' 粘性模量。

2.2 不同 BSA 浓度两步乳化法所制备的 HIPEs 及初始乳液的性质表征

由图 2a 可知,随着蛋白浓度的降低,HIPEs 的乳滴粒径也逐渐增大。因为一定油相中,乳化剂比例越

低,可以稳定的界面面积就越小,因此形成的乳滴粒径也会变大^[18]。虽然室温储藏 20 d 前后外观图没有明显变化,但微观图的变化却有很大的差异。不同蛋白浓度造成这种差异可对应划分为 3 个区间,在高蛋白浓度 2 wt%~6 wt% 区间,小乳滴之间会出现越来越多的大乳滴,体现了聚结不稳定性。且 6% 的比 2% 更明

显, 形成的大乳滴也更大更多; 到了中等蛋白浓度 1 wt% 时, 乳滴粒径和外形都没有太大的变化, 只是略有增大; 而低蛋白浓度区间时, 乳滴从球形逐渐被挤压成不规则的多边形, 并出现不同程度的局部破乳现象, 即使浓度为 0.5 wt% 时储藏 7 d 无明显变化但在 20 d 时也出现类似的情况。

而图 2b 展示了新鲜制备的高、中、低蛋白浓度对应 HIPEs 的流变特征。1 wt% 的弹性模量显著高于 0.2 wt%, 而 6 wt% 的弹性最弱。一般具有高弹性模量 (G') 的 HIPEs 的稳定性较高, 因为越高的 G' 意味着形成的凝胶弹性网络结构越强, 乳液内部的乳滴间不易滑动, 抗聚结稳定性就越高, 因此这个流变图与图 2a 相符。再来看图 2c, 初始乳液的 AP% 随着蛋白浓度的下降而上升, 在 2 wt% 及以上时 AP% 低于 30%; 但蛋白浓度在 1 wt% 及以下时, AP% 分别为 40.34%、51.96%、77.18%、75.97%。这说明在高蛋白浓度区间的初始乳液中还剩有大量的游离蛋白, 即第二步均质剩余的油相主要是靠游离的蛋白来稳定。这时的 HIPEs 属于浓缩型乳液, 微乳滴起不到 Pickering 效应, 因此易于因为聚集而不稳定。加上盐离子的静电屏蔽作用极大的

降低了乳滴间的静电斥力更加剧了乳滴的聚结不稳定性, 不稳定程度也随蛋白浓度的增大而加剧。蛋白浓度除了影响初始乳液的 AP%, 还影响其乳滴粒径, 新鲜制备的初始乳液粒径无论是 $d_{3,2}$ (0.293~1.95 μm) 还是 $d_{4,3}$ (0.593~3.11 μm), 都随着蛋白浓度的减小而增大。

因此, 通过上述实验发现 BSA 在 1 wt% 时用两步乳化法制备的 HIPEs 具有最佳的储藏稳定性。在中等蛋白浓度时, 初始乳液的粒径和数量适宜, 一般而言乳滴粒径越小乳液稳定性越高^[18]。微乳滴界面上蛋白排列充分, 而游离的蛋白占比也相对较低, 这时 HIPEs 体系中微乳滴和游离的蛋白会共同吸附到大油滴界面上, 对稳定起到协同作用, 微乳滴起到了一定的 Pickering 效应, 而游离的蛋白在油滴之间的空隙处起到降低界面张力的作用, 形成网络结构非常稳定的体系。

2.3 验证初始乳液的微乳滴对稳定 HIPEs 是否起主导作用

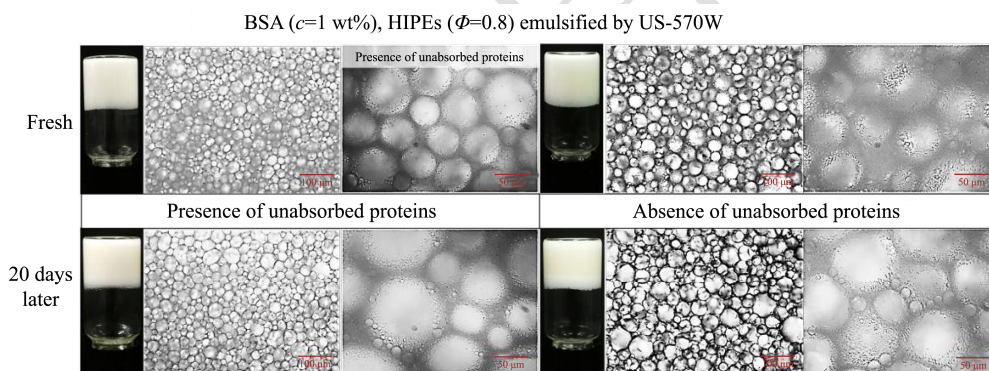


图 3 去除游离蛋白与否的初始乳液制备 HIPEs 的储藏外观及光学显微图 (左标尺 100 μm ; 右标尺 50 μm)

Fig.3 Storage appearances and optical micrographs of HIPEs stabilized by initial emulsions with or without unabsorbed proteins before and after 20 days at room temperature (scale bar: left 100 μm , right 50 μm)

为了排除游离蛋白的干扰, 验证初始乳液中的微乳滴是否对稳定 HIPEs 起主导作用。以 US-570W 新鲜制备的蛋白浓度 1 wt% 初始乳液为例对其进行去除游离蛋白的处理, 再将其通过同等条件重新分散得到几乎不含游离蛋白的初始乳液 (记为 re-Initial emulsions, 测得游离的蛋白浓度约为 0.035 wt%)。然后再用于制备高内相乳液 (记为 re-HIPEs), 并与未去除游离蛋白的 HIPEs 室温储藏 20 d 前后的外观图和微观图进行了对比, 如图 3。新鲜制备的 re-HIPEs 的乳滴粒径要偏大, 是因为初始乳液中大部分的游离蛋白已除去, 总体的蛋白浓度约 0.4 wt%, 且大部分的蛋白已吸附在微乳滴上。在进一步放大的微观图 (40 倍) 中, 发现大乳滴间都填充着大量的初始乳液中的微乳

滴, 而新鲜制备的 re-HIPEs 的微乳滴明显要更多且略大一些。在放置 20 d 后, 两者的大乳滴粒径和形貌变化不大, 外观也未出现破乳漏油现象, 且 40 倍的微观图中两者更加相近。这说明初始乳液中的微乳滴对稳定 HIPEs 是可以起到主导作用。

2.4 对采用不同均质方式所制备的初始乳液及对应 HIPEs 的性质表征

经过上述实验探究可知 BSA 在 1 wt% 时用两步乳化法制备的 HIPEs 的储藏稳定性最佳。而它所对应的初始乳液的微乳滴粒径约为 $d_{3,2}=0.467 \mu\text{m}$, $d_{4,3}=0.982 \mu\text{m}$ 。鉴于 Pickering 乳液稳定剂的尺寸效应也是一个

重要影响因素（多数颗粒直径约 $0.2\sim 1\ \mu\text{m}$ ^[19,20]）。因此接下来固定蛋白浓度为 $1\ \text{wt}\%$ ，采用不同均质方式以调控所输入的均质能量来改变微乳滴粒径，一定范围内均质能量越高乳液的乳滴粒径会越小^[21]。虽然改变初始乳液的 ϕ 也能调控微乳滴粒径的大小，但是在稳定第二步的剩余油相的体积就会不同，引入两个同时变化的因素使得结果难以归因。因此仍保持初始乳液的 ϕ 为 0.2 ，只是改变输入的均质能量来调控微乳滴粒径，以此来探究第二步所稳定的 HIPEs 的稳定性。

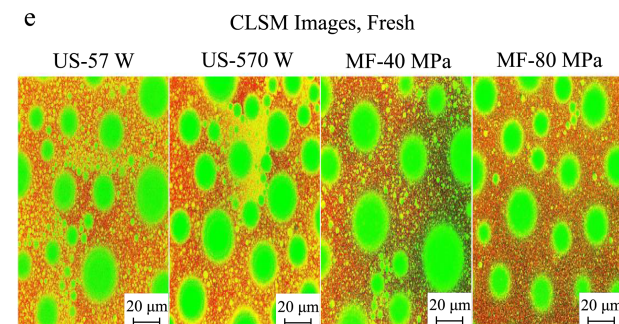
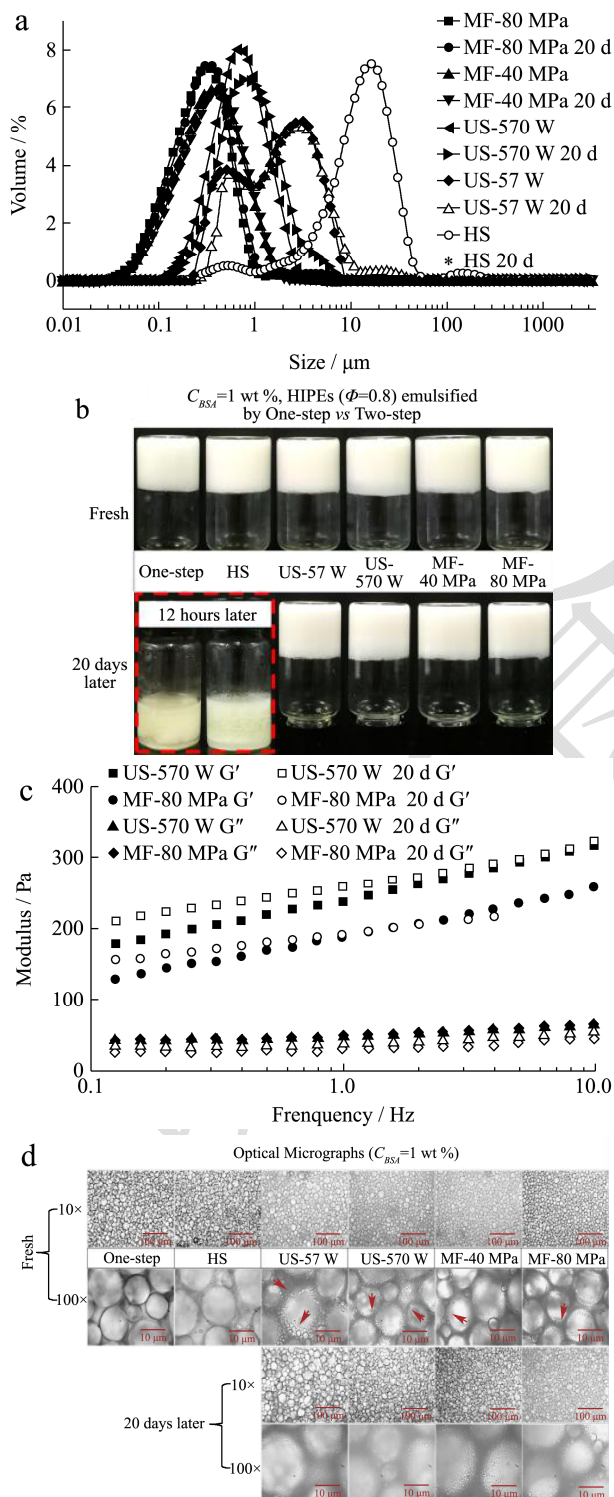


图 4 a: 不同均质方式所制备的初始乳液放置 20 d 前后的微乳滴粒径分布图; b: 一步乳化法与不同均质方式所制备的初始乳液对应的 HIPEs 室温储藏 20 d 前后的外观图; c: 对应 HIPEs 的流变特征; d: 对应 HIPEs 的光学显微图; e: 对应 HIPEs 的激光共聚焦显微图

Fig.4 a: The micro-droplets size distribution of the initial emulsions prepared by different homogenization methods before and after 20 d; b: The appearances of HIPEs emulsified by one-step or two-step with initial emulsions prepared by different homogenization methods before and after 20 d at room temperature; c: The rheology of HIPEs; d: The optical micrographs of HIPEs; e: The confocal laser scanning microscope images of HIPEs

注: 图 a 中 * 表示未测量数据, 该样品出现明显的油水分层, 不符合仪器使用条件; 图 c 中 G' 弹性模量, G'' 粘性模量; 图 d 中 $10\times$ 标尺 $100\ \mu\text{m}$, $100\times$ 标尺 $10\ \mu\text{m}$; 图 e 中红色代表蛋白, 绿色代表油滴, 标尺 $20\ \mu\text{m}$ 。

结合图 4a 和表 1 可知, 微乳滴的粒径逐渐减小同时对应处理的 $AP\%$ 随之增大, 故认为制备初始乳液的均质能量是不同的。图 4a 显示 HS、US-57 W 初始乳液粒径呈多峰分布, 其他 3 种则是单峰分布, 放置 20 d 后, 乳液粒径有略微增大, 其中超声制备的样品曲线右移较明显, 而 HS 的样品则是因为 20 d 出现油水分层现象, 不符合仪器测量条件。由图 4b 可知, HS 的样品是用 $30000\ \text{r/min}$ 高速均质制备出的初始乳液 (油滴粒径 $d_{3,2}=5.59\ \mu\text{m}$, $d_{4,3}=17.60\ \mu\text{m}$), 并不能有效提升 HIPEs 的储藏稳定性。而只有采用超声或高压微射流后所制备的初始乳液, 即微乳滴在 $d_{3,2}=1.06\ \mu\text{m}$, $d_{4,3}=2.16\ \mu\text{m}$ 以下时, 才能有效提升 HIPEs 的储藏稳定性。图 4c 是选取了两个比较代表性的 HIPEs 即 US-570 W、MF-80 MPa 室温储藏 20 d 前后的流变特征, 发现后者的 G' 比前者要低些。放置 20 d 后, 两者的 G' 对频率变化的依赖程度减小, 即以弹性为主的凝胶网络结构有所增强。再由图 4d、e 分析可得, 超声和微射流处理的 HIPEs 的大乳滴的间隙中填充和附着着密密麻麻的微乳滴 (红色箭头指示), 而一步乳化法和 HS 的则没有。再来看表 1, zeta 电位值在没

有静电屏蔽的条件下,主要呈现出随乳液粒径的减小而增大的趋势,但在 50 mM 的 NaCl 溶液中电位值显著下降且下降后的电位值的差异没有显著性。因此结合图 3 说明这些粒径小到一定程度的微乳滴的存在是提升 HIPEs 稳定性的重要原因。

表 1 不同均质方式所制备的初始乳液的电位值和 AP% 值

Table 1 The Zeta-potential and AP% of the initial emulsions prepared by different homogenization methods

初始乳液	ζ/mV		AP%
	去离子水	50 mM NaCl	
HS	-27.9±1.25 ^{ef}	-16.27±1.29 ^{ag}	2.68±0.43 ^d
US-57W	-31.17±1.04 ^{df}	-16.37±0.71 ^{ag}	17.53±1.46 ^c
US-570W	-38.23±0.50 ^{bf}	-17.13±0.64 ^{ag}	40.34±3.56 ^b
MF-40MPa	-35.27±0.90 ^{cf}	-16.40±1.15 ^{ag}	46.78±0.79 ^a
MF-80MPa	-43.33±0.87 ^{af}	-16.47±1.53 ^{ag}	48.28±0.33 ^a

注: a~e 为纵向显著性对比, f~g 为横向显著性对比。

2.5 热稳定测试

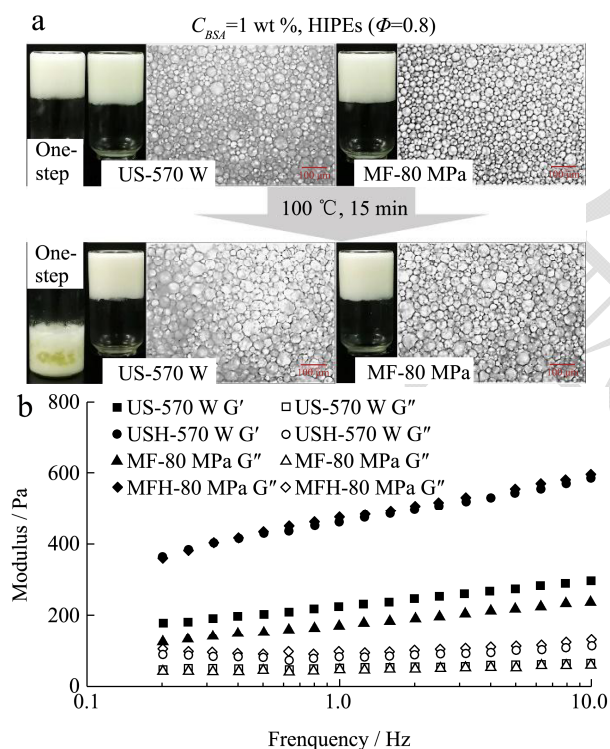


图 5 a: 一步乳化法与两步乳化法所制备的 HIPEs 100 °C 加热 15 min 前后外观及光学显微图; b: 两步乳化法所制备的 HIPEs 100 °C 加热 15 min 前后的流变图

Fig.5 a: The appearances and optical micrographs of HIPEs emulsified by one-step or two-step before and after heating at 100 °C for 15 min; b: The rheology of HIPEs emulsified by the two-step before and after heating

注: a 图标尺为 100 μm ; b 图 G' 弹性模量, G'' 粘性模量。两步乳化法除了显著提升了 HIPEs 的储藏稳定性

外,还赋予了其较佳的热稳定性。图 5a 表明一步乳化法制备的 HIPEs 加热后出现破乳,而两步乳化法制备的并未因高温处理而出现失稳现象且光学显微图显示微观结构依然完整,只是乳滴粒径有所增大。此外,加热后 G' 显著上升,是因为高温使 BSA 结构被破坏,更多的非共价或共价(二硫键)结合位点暴露出来,这使得无论是否吸附在油水界面上的 BSA 分子之间发生更大程度的物理或化学交联,从而使凝胶网络结构更坚实,类似的结果见于卵清蛋白制备 HIPEs 的研究报道中^[1]。

3 结论

本研究以天然的 BSA 为蛋白模型,结合 Pickering 乳液稳定机理,以高能均质方式制备的微乳滴为类 Pickering 稳定剂,通过两步乳化法显著提高了蛋白基 HIPEs 的稳定性。以 ϕ 为 0.2 的初始乳液为例,改变不同蛋白浓度和均质能量,通过表征其特性,发现蛋白浓度在 1 wt% 最合适。微乳滴的体积平均粒径在 2.16 μm 及以下时可以有效提升 HIPEs 的稳定性,但若小于 0.425 μm 时 HIPEs 的弹性反而会下降。这是因为同体积初始乳液的粒径越小则微乳滴数量越多,从而超过 HIPEs 桥联絮凝的颗粒浓度阈值,使其转变成流动性更强的空缺絮凝状态。结合微观结构表征及去除游离蛋白的对比实验结果,表明初始乳液中的微乳滴的存在是提升 HIPEs 稳定性的主导原因。这种两步乳化法,除了蛋白乳化剂外,也适用于一些小分子乳化剂^[22]。综上,本文提升了由 BSA 制备的 HIPEs 在保健食品、特殊医疗食品方面的应用潜力,亦为其他类型乳化剂稳定 HIPEs 带来一些启示。

参考文献

- [1] XU Yan-teng, TANG Chua-he, LIU Tong-xun, et al. Ovalbumin as an outstanding Pickering nano-stabilizer for high internal phase emulsions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(33): 8795-8804
- [2] Silverstein S M. PolyHIPEs: Recent advances in emulsion-templated porous polymers [J]. Progress in Polymer Science, 2013, 39(1): 199-234
- [3] Cohen-Addad S, H Hler R. Rheology of foams and highly concentrated emulsions [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2014, 19(6): 536-548
- [4] YANG Tao, ZHENG Jie, ZHENG Bi-sheng, et al. High internal phase emulsions stabilized by starch nanocrystals [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 82: 230-238
- [5] Williams, M J. High internal phase water-in-oil emulsions:

- influence of surfactants and cosurfactants on emulsion stability and foam quality [J]. *Langmuir*, 1991, 7(7): 1370-1377
- [6] Levine S, Bowen B D, Partridge S J. Stabilization of emulsions by fine particles I. Partitioning of particles between continuous phase and oil/water interface [J]. *Colloids & Surfaces*, 1989, 38(2): 325-343
- [7] TAN Huan, SUN Guan-qing, LIN Wei, et al. Gelatin particle-stabilized high internal phase emulsions as nutraceutical containers [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(16): 13977
- [8] Aveyard R, Binks B P, Clint J H. Emulsions stabilised solely by colloidal particles [J]. *Advances in Colloid & Interface Science*, 2003, 100-102: 503-546
- [9] McTigue W C B, Perry S L. Design rules for encapsulating proteins into complex coacervates [J]. *Soft Matter*, 2019, 15(15): 3089-3103
- [10] Barbosa L R S, Ortore M G, Spinozzi F, et al. The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-ray scattering study [J]. *Biophysical Journal*, 2010, 98(1): 147-157
- [11] Deep S, Ahluwalia J C. Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2001, 3(20): 4583-4591
- [12] LI Zi-fu, XIAO Man-da, WANG Jian-fang, et al. Pure protein scaffolds from Pickering high internal phase emulsion template [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2013, 34(2): 169-174
- [13] Al-Malah K I, Azzam M O J, Omari R M. Emulsifying properties of BSA in different vegetable oil emulsions using conductivity technique [J]. *Food Hydrocolloids*, 2000, 14(5): 485-490
- [14] LIANG Han-ning, TANG Cuan-he. Pea protein exhibits a novel Pickering stabilization for oil-in-water emulsions at pH 3.0 [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2014, 58(2): 463-469
- [15] Gallier S, Gragson D, Jime Nez-Flores R, et al. Using confocal laser scanning microscopy to probe the milk fat globule membrane and associated proteins [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(7): 4250-4257
- [16] Salis A, Bostro M M, Medda L, et al. Measurements and theoretical interpretation of points of zero charge/potential of BSA protein [J]. *Langmuir*, 2011, 27(18): 11597-11604
- [17] JIAO Bo, SHI Ai-ming, WANG Qiang, et al. High internal phase pickering emulsions stabilized solely by peanut protein microgel particles with multiple potential applications [J]. *Angewandte Chemie-international Edition*, 2018, 57(30): 9274-9278
- [18] LIU Fu, TANG Chuan-he. Emulsifying properties of soy protein nanoparticles: Influence of the protein concentration and/or emulsification process [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(12): 2644-2654
- [19] CHEN Qiu-hong, ZHENG Jie, XU Yan-teng, et al. Surface modification improves fabrication of pickering high internal phase emulsions stabilized by cellulose nanocrystals [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 75: 125-130
- [20] Kim K H, Kim S, Ryu J, et al. Processable high internal phase Pickering emulsions using depletion attraction [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14305
- [21] Jafari S M, HE Ying-he, Bhandari B. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization [J]. *European Food Research & Technology*, 2007, 225(5-6): 733-741
- [22] CHEN Xiao-wei, WANG Jin-mei, GUO Jian, et al. Hierarchical high internal phase emulsions and transparent oleogels stabilized by quillaja saponin-coated nanodroplets for color performance [J]. *Food & Function*, 2017, 8(2): 823-831

(上接第 146 页)

- [28] Besada C, Salvador A, Sdiri S, et al. A combination of physiological and chemometrics analyses reveals the main associations between quality and ripening traits and volatiles in two loquat cultivars [J]. *Metabolomics*, 2013, 9(2): 324-336
- [29] Besada C, Sanchezb G, Gila R, et al. Volatile metabolite profiling reveals the changes in the volatile compounds of new spontaneously generated loquat cultivars [J]. *Food Research International*, 2017, 100: 234-243