

一步法制备大豆不溶性肽-壳聚糖复合颗粒稳定的 Pickering 双重乳液及其表征

舒欣怡^{1,2}, 黄小楠^{1,2}, 赖洋杰³, 李理^{1,2}, 尹寿伟^{1,2*}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 中新国际联合研究院, 广东广州 510555)
(3. 西南科技大学应用技术学院, 四川绵阳 621000)

摘要: 该研究探讨了大豆分离蛋白 (SPI) 酶解产生的水不溶性肽聚集体 (SWIP) 经过超声处理后与壳聚糖 (CS) 进行复合, 所制备的复合胶体颗粒 (SWIP-CS) 作为乳化剂通过简单的一步均质法制备得到 W/O/W 型 Pickering 双重乳液, 进一步研究了不同壳聚糖浓度与 pH 值对乳液外观、粒径、微观结构及流变特性的影响。结果表明, 大豆水不溶性肽聚集体与壳聚糖之间通过氢键相互作用。在 pH 为 3.0、3.8、4.0 和 5.0 时, 壳聚糖浓度为 0.125%、0.25% 和 0.5% 及油相分数 50% 时均能够制备稳定的 Pickering 双重乳液。壳聚糖浓度的增加使得乳液的粒径有着显著性的降低 (30.6~23.9 μm), 且较高浓度 (0.5%) 时能够改善双重乳液的稳定性与凝胶特性。而随着 pH 从 3.0 增加到 5.0, 双重乳液液滴内部的小液滴数量逐渐减少, 其稳定性与凝胶特性也在相应的降低。本研究为制备双重乳液提供了一种简便有效的策略, 对于食品工业、化妆品与医药领域上的应用具有重要意义。

关键词: 大豆水不溶性肽聚集体; 壳聚糖; 一步均质法; Pickering 双重乳液

文章编号: 1673-9078(2021)12-169-176

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.1155

One-step Fabrication and Characterization of Pickering Double Emulsions Stabilized by Soybean Water-insoluble Peptide-chitosan Composite Particles

SHU Xinyi^{1,2}, HUANG Xiaonan^{1,2}, LAI Yangjie³, LI Li^{1,2}, YIN Shouwei^{1,2*}

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

(2. Sino-Singapore International Joint Research Institute, Guangzhou 510555, China)

(3. School of Applied Technology, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China)

Abstract: Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate (SPI) afforded water-insoluble peptide aggregates (SWIP), which were sonicated and further compounded with chitosan (CS) to prepare composite colloidal particles (SWIP-CS). These particles were used as emulsifiers to obtain W/O/W Pickering double emulsions in a simple one-step preparation process. The effects of different chitosan concentrations and pH levels on the appearance, particle size, microstructure, and rheological properties of the emulsions were also investigated. Mechanistic studies revealed that the water-insoluble aggregates interacted with chitosan by hydrogen bonding. Stable Pickering double emulsions were prepared using chitosan at concentrations of 0.125%, 0.25%, and 0.5% and an oil phase fraction of 50% at pH 3.0, 3.8, 4.0, and 5.0. The increase in chitosan concentration resulted in a significant decrease in the particle size of the emulsions (from 30.6 to 23.9 μm), and the stability and gel

引文格式:

舒欣怡, 黄小楠, 赖洋杰, 等. 一步法制备大豆不溶性肽-壳聚糖复合颗粒稳定的 Pickering 双重乳液及其表征[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12):169-176

SHU Xinyi, HUANG Xiaonan, LAI Yangjie, et al. One-step fabrication and characterization of pickering double emulsions stabilized by soybean water-insoluble peptide-chitosan composite particles [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 169-176

收稿日期: 2021-10-17

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2019BT02N112); 中新国际联合研究院项目 (201-A017003)

作者简介: 舒欣怡 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白基 Pickering 乳液, E-mail: 2364849887@qq.com

通讯作者: 尹寿伟 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白基 Pickering 乳液, E-mail: feysw@scut.edu.cn

properties of the double emulsions were improved at a relatively high chitosan concentration (0.5%). However, as the pH was increased from 3.0 to 5.0, the number of small droplets inside the double emulsion droplets gradually decreased, which in turn reduced the stability and gel properties of the droplets. Thus, this study provides a simple and effective strategy for the preparation of double emulsions, which can be applied to food, cosmetics, and pharmaceutical industries

Key words: soybean water-insoluble peptide aggregates; chitosan; one-step preparation; Pickering double emulsion

双重乳液是一种复杂的乳化体系,包括水包油包水型(W/O/W)和油包水包油型(O/W/O)^[1]。在食品工业中,双重乳液被认为是能够减少乳液基食品的含油量^[2],同时不影响其自身口感的良好手段^[3];双重乳液具有分室结构,也可用于封装与保护易受光照、温度等环境影响的亲水性与疏水性生物活性物质,如营养素、风味物质、天然色素及益生菌^[4-5]。双重乳液在化妆品、药品及材料领域也有较为广泛的应用^[6-7]。传统的两步乳化法制备双重乳液程序复杂,主要通过表面活性剂、盐离子等提高乳液的稳定性。一步乳化制备双重乳液方法简单便捷,主要有微流控法、嵌段共聚物法及 Pickering 乳液法。其中, Pickering 乳液利用胶体粒子不可逆吸附至油水界面形成的物理屏障,减少内相损失,改善双重乳液体系的稳定性,且相对其他制备方式中表面活性剂的使用更加经济、无毒、对环境友好。到目前为止,已经研究了由二氧化硅颗粒和氧化石墨烯颗粒等稳定的 Pickering 双重乳液^[8-10]。然而,由食品级胶体颗粒一步法制备双重乳液的研究鲜少报道。在单一高剪切/高压作用下,利用食品级胶体颗粒一步乳化法制备 Pickering 双重乳液,将为工业生产带来新的研究思路和应用前景^[11]。

大豆蛋白广泛应用于食品工业中,酶解制备的蛋白肽具有人体有益的保健功能,酶解过程形成的疏水肽团聚沉淀造成优质氨基酸资源浪费。张远红^[12]研究了 SPI 酶解过程中产生的不溶性聚集体,发现其具有与大豆蛋白相当的氨基酸均衡组分,且其自身具备优异的荷载能力,能够作为一种潜在的功能性食品配料。因此,利用大豆蛋白酶解副产物—水不溶性聚集体作为基料稳定 Pickering 乳液能够进一步提高大豆蛋白酶解副产物的绿色可持续化应用。壳聚糖 CS 是一种碱性阳离子多糖,由甲壳素通过碱性脱乙酰作用得到。其来源丰富,具有良好的生物相容性、生物可降解性、抑菌性等特点被广泛应用在各个领域。本研究将大豆蛋白酶解产生的水不溶性聚集体 SWIA 与壳聚糖 CS 通过静电相互作用制备结构稳定的复合胶体颗粒,通过一步法构建稳定的 Pickering 双重乳液,系统研究了不同壳聚糖比、pH 值对 Pickering 双重乳液的形成、稳定性、微观结构的影响,进一步探讨乳液微结构、流变特性与乳液稳定性之间的关系,为制备多重乳液

提供一种简便有效的手段。

1 材料与方法

1.1 原料

SPI、玉米油,市购;低分子量壳聚糖,购于 Sigma-Aldrich 公司; Protamex, 购于诺维信酶制剂公司。

1.2 主要仪器设备

ALPHA1-4 冷冻干燥机,德国 Christ 公司; T10 高速剪切机,德国 IKA 公司; Zeta 电位及纳米粒度仪 Nano-ZS, 英国 Malvern 公司; MasterSizer3000 粒径分布仪,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。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆水不溶性肽聚集体的制备

大豆水不溶性聚集体的制备参考张远红^[12]报道的方法,稍加改动。以市售 SPI 为原料,准确称取一定量的 SPI 溶于去离子水中,配成 4% (m/V) 的 SPI 溶液,室温 (25 °C) 下搅拌 2 h。Protamex 的酶解条件: pH 7.0, 温度 50 °C, 加酶量 1% (酶/底物, V/m)。蛋白和酶混合均匀后放入 50 °C 恒温振荡器中水浴酶解 24 h, 酶解过程中用 1 mol/L NaOH 维持 pH 恒定。酶解后取酶解液在 8000 ×g, 25 °C 下离心 20 min, 取沉淀水洗 3 次, 冷冻干燥备用, 所得粉末即为大豆水不溶性肽聚集体, 记为 SWIP。采用 OPA 法测定水解度, 参照 Nielsen 等^[13]的方法。本研究所制备 SWIA 是 SPI 的水解度为 12% 时所得, 不溶性聚集体的得率为 16.66%。

1.3.2 大豆水不溶性肽-壳聚糖复合胶体颗粒的制备

准确称取 0.5 g 的 SWIP 分散于 100 mL 去离子水中, 室温下磁力搅拌 2 h 后于 4 °C 下放置过夜使其充分水化, 并用 0.1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 7.0, 配置成 0.5% (m/V) 的分散液。将分散液在 190 W (20%) 超声处理, 采用冰浴控制样品的温度在 25 °C 以下。加

入几滴 0.02%叠氮钠后,大豆水不溶性肽聚集分散液在 4℃保存备用。称取不同质量的壳聚糖(CS)溶于 1%的乙酸溶液中,搅拌过夜并离心去除少量不溶性物质,配置不同浓度的壳聚糖溶液(0.25%、0.5%、1%)。将壳聚糖溶液与超声处理的大豆水不溶性肽聚集分散液等体积混合搅拌 2 h,从而得到 SWIP:CS 的质量比分别为 2:1、1:1 与 1:2 的复合胶体颗粒,大豆水不溶性肽聚集体的最终浓度固定为 0.25%。

1.3.3 大豆水不溶性肽-壳聚糖复合胶体颗粒的粒径和 Zeta-电位的测定

采用 Zetasizer Nano-ZS 测定胶体颗粒的粒径及分布、多分散系数(PDI)和 Zeta-电势。测定在 25℃进行,溶质为蛋白,其分散系数设置为 1.45;分散相为水,其分散系数设置为 1.330。每个样品至少测定三次,并取其平均值。

1.3.4 复合胶体颗粒的傅里叶红外(FT-IR)分析

将复合胶体颗粒溶液冻干获得待测样品粉末,取样品放置在玛瑙钵中,加入 KBr 粉末(与待测样品质量比为 1:100),均匀研磨后压片,进行波长扫描,扫描频率为 500~4000 cm^{-1} 。

1.3.5 Pickering 双重乳液的制备

采用均质乳化技术制备 Pickering 双重乳液。首先,制备两组大豆水不溶性肽聚集分散液,一组中分为三份加入不同浓度的壳聚糖溶液,SWIP:CS 质量比分别为 2:1、1:1 与 1:2,大豆水不溶性肽的终浓度固定为 0.25% (m/V),考察不同壳聚糖比例对 Pickering 双重乳液形成及性能的影响。另外一组,加入壳聚糖溶液并固定 SWIP:CS 质量比为 1:1,测得其原始 pH 为 3.8,缓慢滴加 1 mol/L NaOH 溶液分布调整其 pH 为 3.0、4.0、5.0 和 6.0,研究在不同 pH 值下 Pickering 双重乳液的形成与性能。其中,油相采用玉米油(占比 50%),放置于血清瓶中,利用高速分散剂 IKA T10 进行均质(15000 r/min, 2 min)得到 Pickering 双重乳液。

1.3.6 Pickering 双重乳液的稳定性分析

观察乳析层随时间的变化来评价乳液的储藏稳定性。如果乳液的乳析层固定不变,也就意味着该乳液具备着良好的稳定性;但如果乳液的乳析层在不断的改变,而且在放置的时间内出现漏油破乳等现象,也就意味着乳液的稳定性不好。

1.3.7 Pickering 双重乳液的粒径分布测定

采用 MasterSizer 3000 粒度分布仪测量乳状液的粒径。颗粒吸收率:0.001,颗粒折射率:1.470,分散剂折射率:1.330,分散剂是水。采用面积平均粒径 $d_{3,2}$

及体积平均粒径 $d_{4,3}$ 来表示乳液粒径,设置样品测试三次。

1.3.8 Pickering 双重乳液的微观结构观察

采用光学显微镜观察 Pickering 双重乳液的微观结构,将最新制备的乳液滴在载玻片上,盖上盖玻片调节适合的焦距进行观察。

利用激光共聚焦显微镜(CLSM)对乳液的分散状态进行观察。采用尼罗红染对油相染色,具体方法:用 1,2-丙二醇溶解尼罗红(0.1%),取 40 μL 混合染料加入到 1 mL 乳液样品中,轻轻振荡,即完成染色。取少量染色的样品放置于载玻片凹槽并盖上盖玻片,用 40 倍物镜观察。仪器参数设置如下:在 488 nm 处激发,频率扫描的密度为 1024×1024,频率为 100 Hz。

1.3.9 Pickering 双重乳液的流变学特性

采用 HAAKE RS600 流变仪器测定乳液的流变学特性。测试温度为 25℃,使用直径 27.83 mm 的平板,其间隙为 1 mm。应力扫描:0.1 Pa 到 1000 Pa,固定频率为 1 Hz。频率扫描:0.1 Hz 到 10 Hz,应力为 1 Pa。粘度:在剪切速率为 0.1 s^{-1} 到 100 s^{-1} 记录粘度变化。

1.3.10 数据统计与分析

将每个实验所得的数据重复三次,实验结果以平均值±标准偏差的表示,并运用 SPSS 25.0 软件进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 大豆水不溶性肽-壳聚糖复合胶体颗粒构建及表征

2.1.1 复合胶体颗粒的粒径、电位及外观分析

表 1 不同壳聚糖比例颗粒的粒径和 Zeta 电位值

Table 1 Particle size and Zeta potential of complex particles

SWIP:CS	Particle size/nm	PDI	Zeta potential/mV
0	124.60±5.80 ^a	0.26±0.06	14.60±0.82 ^a
2:1	229.80±9.90 ^b	0.30±0.01	49.50±1.77 ^b
1:1	336.70±4.25 ^c	0.31±0.01	52.40±1.63 ^c
1:2	501.50±8.35 ^d	0.40±0.04	54.70±0.90 ^d

注:同一列中不同字母表示具有显著的差异,下同($p<0.05$)。

在 Zhang 等^[4,15]的研究表明 SPI 经酶解释放出来的疏水性氨基酸通过疏水相互作用形成了水不溶性的肽聚集体。本研究借助于高强度的超声,使得疏水肽之间、肽与蛋白之间的非共价键被打断,实现不溶性肽聚集体的解聚、分散,获得可分散性胶体粒子。如图 1a 所示,在聚集分散液底部有明显可见的沉淀

物, 经过超声处理之后, 聚集体在水中的分散性有着显著的增强且分布均匀。在放置一段时间后, 颗粒发生聚集产生沉淀析出。从表 1 中能够看出, 经过超声处理后的水分散胶体颗粒的粒径为 124.60 nm, 电位为 14.60 mV, 将其与壳聚糖进行复合后, 新制备的复合胶体颗粒呈现出更为稳定均匀的胶体分散状态。如图 1b 所示, 复合颗粒的粒径介于 229 nm 和 501 nm 之间, zeta 电位从 14.60 mV 到 49.50~54.7 mV, 颗粒的放置稳定性增强, 在储存过程中未见明显沉淀。因此, 随着阳离子多糖壳聚糖的加入, 复合胶体颗粒表面正电荷增强, 在大豆不溶性肽聚集体颗粒粒子表面构筑多糖亲水层使疏水相互作用变弱而氢键增强, 同时, 壳聚糖链的空间位阻效应以及复合颗粒表面增强的静电斥力使得通过超声分散的聚集体粒子能够稳定的分散在水溶液中。

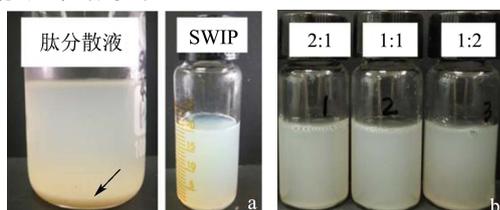


图 1 a: 超声处理聚大豆不溶性肽团簇物; b: 不同壳聚糖/肽比颗粒的外观图

Fig.1 a: The stable SWIP dispersions by ultrasonic processing of aggregates; b: The appearance of chitosan/peptide complex particles

2.1.2 复合胶体颗粒的傅里叶红外分析

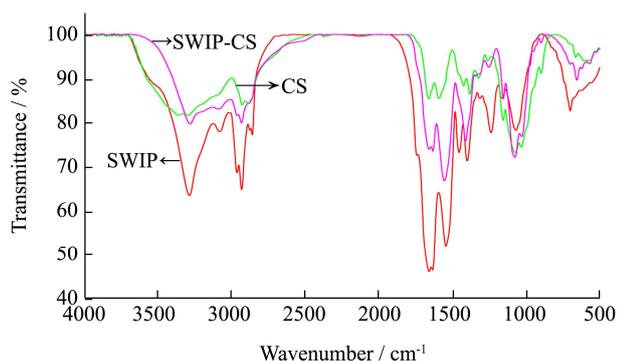


图 2 复合胶体颗粒的 FT-IR 图

Fig.2 FTIR profiles of composite colloidal particles with CS and SWIP as the control

图 2 是大豆不溶性肽聚集体、壳聚糖与 SWIP:CS 质量比为 1:1 的复合胶体颗粒的红外吸收光谱图 (FT-IR)。从图中我们可以看出, 大豆水不溶性肽在 1680 cm^{-1} 处表现了强烈的伸缩振动峰, 这是典型的蛋白质红外谱带—酰胺 I 带, 也就是 C=O 伸缩振动, 能够反映蛋白质的二级结构^[16]。还有在 1540 cm^{-1} 处的酰胺 II 代 (N-H 弯曲振动), 以及处于 1230-1350 cm^{-1}

区域内的酰胺 III 带, 大多数为 C-N 键的伸缩振动^[17,18]。除此之外, 壳聚糖在 3300 cm^{-1} 也出现了碳水化合物本身特有的伸缩振动峰-氢键, 且其在 1740 cm^{-1} 以及 1660 cm^{-1} 也都出现了特征峰, 分别是处于 C=O 键和 COO-键的伸缩振动区域。与之相对应的, 所形成的复合胶体颗粒 (SWIP-CS) 红外光谱中, 壳聚糖的氢键特征峰轻微地向低波数移动, 这也就表明胶体颗粒里分子间氢键的存在。

2.2 Pickering 双重乳液的制备

2.2.1 不同壳聚糖比例对 Pickering 双重乳液粒径、稳定性及微观结构的影响

表 2 不同壳聚糖浓度条件下的 SWIP-CS 稳定的 Pickering 双重乳液粒径

Table 2 The size of Pickering double emulsions stabilized by SWIP-CS complex particles

SWIP:CS	$d_{3,2}/\mu\text{m}$	$d_{4,3}/\mu\text{m}$
2:1	30.6±3.55 ^a	32.4±3.88 ^a
1:1	25.9±0.66 ^b	27.5±0.95 ^b
1:2	23.9±0.92 ^c	25.4±1.16 ^c

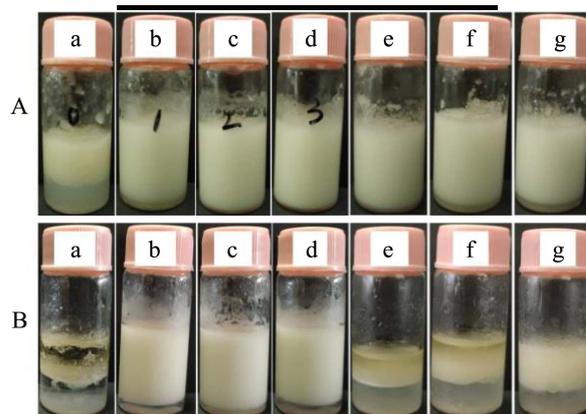


图 3 Pickering 双重乳液外观

Fig.3 Appearance of Pickering double emulsions

注: A: 新制乳液; B: 室温放置一个月; a: 大豆水不溶性肽稳定的乳液; b~d: SWIP:CS 比分别为 2:1、1:1、1:2; e~g: 对应壳聚糖浓度稳定的乳液。

从图中可以看出, 单纯由大豆不溶性聚集体制备的 Pickering 乳液 (a) 很不稳定, 在放置一个月后已全部破乳, 这可能是疏水性驱动大豆不溶性聚集体颗粒聚结形成不溶性团簇体, 影响胶体颗粒的界面吸附及界面覆盖率。因此, 表面覆盖率低的分散油滴容易聚结, 最终导致相分离。同时, 由 0.125%、0.25% 与 0.5% 壳聚糖制备的乳液 (e、f、g) 在放置一个月后也出现明显的漏油现象, 说明仅壳聚糖不能形成稳定的乳液。利用复合胶体颗粒新制备的乳液 (b、c、d) 均匀、细腻, 呈乳白状, 未乳析和分层。在放置了一个

月后，随着壳聚糖比的增加，Pickering 乳液的乳析指数呈现不同的变化，但都维持在 10%之内，大豆水不溶性肽/壳聚糖比例为 1:1 的复合胶体颗粒制备的 Pickering 乳液乳析指数最低，低于 5%。大豆水不溶性肽-壳聚糖复合颗粒构建的 Pickering 乳液有着稳固的界面层屏障，有效的防止液滴聚结。由此可见，通过复合胶体颗粒制备的 Pickering 乳液具有更高的稳定性。

表 2 是不同壳聚糖比例下的复合胶体颗粒 (SWIP-CS) 所稳定的 Pickering 乳液粒径。Pickering 乳液的粒径随着壳聚糖比例的增加呈现缓慢下降的趋势，结合双重乳液的外观图来看，不同比例下复合颗粒形成的乳液均较稳定，在粒度上的差异也并不显著。当大豆水不溶性肽-壳聚糖比例为 1:2 时，乳液的粒径最小 (23.9 μm)，可能是此时颗粒上到油水界面的能力相对较强，具备更好的表面性能，从而能够形成更小尺度的乳液。

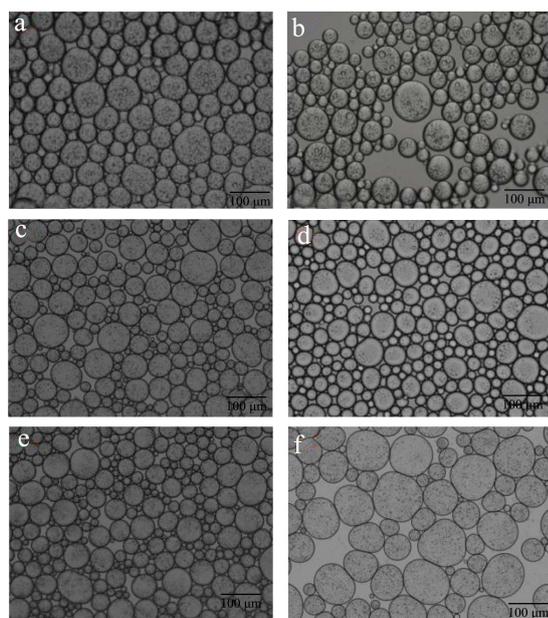


图 4 Pickering 双重乳液光学显微镜图 (pH 3.8)

Fig.4 Microscopy images of Pickering double emulsions by composite colloidal particles (pH 3.8)

注：放大倍数 10×，标尺 100 μm。a、c、e 分别是 SWIP-CS 比例为 2:1、1:1、1:2；b、d、f 为分别放置 15 d 样品的显微图。

图 4 为不同壳聚糖浓度下复合胶体颗粒新制 (a、c、e) 与放置 15 d (b、d、f) 的 Pickering 乳液的光学显微镜图。从中能够清晰地看到，不同壳聚糖比例的复合胶体颗粒都能够通过一步法制备出稳定的 Pickering 双重乳液，在水包油乳液内部包含大量的油包水小乳滴，并且在放置半个月的时间后，内部的小乳滴数量并没有明显的减少，进一步证实了该 Pickering 双重乳液具有优越的储藏稳定性。图 5 是

SWIP-CS 比例为 2:1、1:1 时的复合胶体颗粒新制的 Pickering 双重乳液激光共聚焦显微镜图，其中，使用尼罗红对玉米油进行染色。从图中能够清晰地看到，乳液液滴内部较多小液滴的存在，进一步证实了 Pickering 双重乳液的形成。这可能是因为 SPI 在进行酶解之后产生大量的疏水性氨基酸残基，其与壳聚糖进行复合之后使得形成的复合颗粒有着不同的表面润湿性分布，其中，一部分较为亲水，一部分较为疏水；其次，壳聚糖在连续相形成的三维网络结构，可以有效的防止内水相的聚结，并且，在 Diam 等^[19]的研究中发现，壳聚糖参与的两步乳化法制备双重乳液的过程中，其在内相与外相中的存在提高了 W/O/W 双重乳液的物理稳定性。综合这些原因，才能够实现一步法得到稳定的 Pickering 双重乳液。

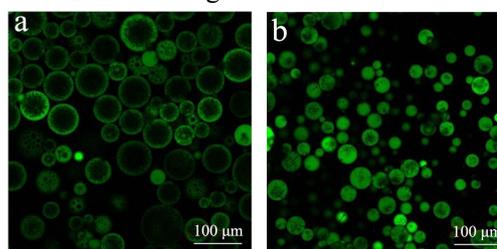


图 5 Pickering 双重乳液的激光共聚焦显图 (pH3.8)

Fig.5 CLSM images of Pickering double emulsions by composite particles (pH 3.8)

注：a、b 分别是 SWIP-CS 比 2:1、1:1。

2.2.2 不同 pH 值对 Pickering 双重乳液粒径、稳定性及微观结构的影响

表 3 不同 pH 值下的 SWIP-CS 稳定的 Pickering 双重乳液粒径

Table 3 Droplet size of Pickering double emulsions stabilized by composite particles (SWIP-CS) at different pH conditions

pH	d _{3,2} /μm	d _{4,3} /μm
3.0	26.9±0.58 ^a	28.8±0.66 ^a
3.8	25.9±0.66 ^a	27.5±0.95 ^a
4.0	25.0±0.99 ^a	26.4±0.88 ^a
5.0	26.2±1.52 ^a	27.6±1.68 ^a

从图中可以明显的看出，新制的乳液较为均匀一，在 pH 从 3.0 到 5.0 之间，血清瓶中的乳液都没有出现漏油破乳的现象，但在 pH 为 6.0 的乳液表面出现稍微漏油的情况。在放置的过程中，乳液也开始出现乳析；不同 pH 的乳液的乳析指数也有着一定程度的差异。在放置两天后，所有乳液的乳析指数逐渐稳定并保持不变。从图中乳液放置两个月的时间图中，能够看出随着 pH 的增加，乳析指数也有着相应的上涨，但基本都维持在 10%以内。

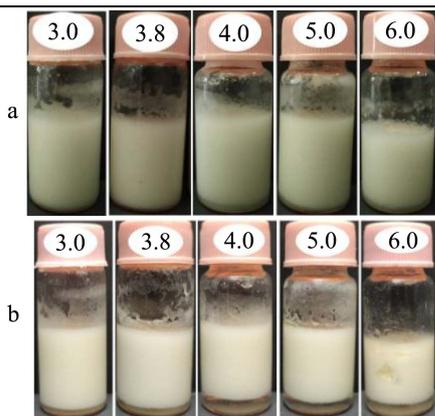


图6 不同 pH 条件下的 Pickering 双重乳液图

Fig.6 Appearance of Pickering double emulsions at different pH conditions

注: a: 新制; b: 室温放置两个月。

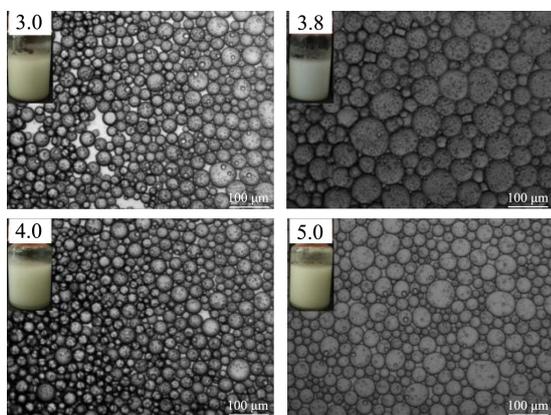


图7 Pickering 双重乳液光学显微镜图

Fig.7 Microscopy images of Pickering double emulsions stabilized complex particles

注: 标尺 100 μm, SWIP-CS 比 1:1。

表 3 是不同 pH 值的复合胶体颗粒 (SWIP-CS) 稳定的 Pickering 双重乳液的粒径。由于上文中 pH 6.0 条件下制备的乳液不能够保持均匀统一的状态, 容易破乳漏油, 因此并没有对该 pH 条件下所制备的乳液进行相应的研究。表中数据指出, 随着 pH 的增加, 乳液的粒径并没有明显的改变。图 7 为不同 pH 条件下的复合胶体颗粒制备的 Pickering 双重乳液光学显微镜图片, 从图中能够清晰的看到, 液滴内部全部都存在被包裹的小液滴, 且在低 pH 条件下, 所稳定的乳液中液滴内部包含的小液滴数量最多, 当 pH 为 5.0 时, 液滴内部包含小液滴数量有着显著的减少。由此可见, 稳定 Pickering 双重乳液的形成与复合胶体颗粒的 pH 有着密切的关系, 可以对其进行调控从而制备稳定的 Pickering 双重乳液。

2.3 Pickering 双重乳液的流变学特性

2.3.1 Pickering 双重乳液的频率、应力分析

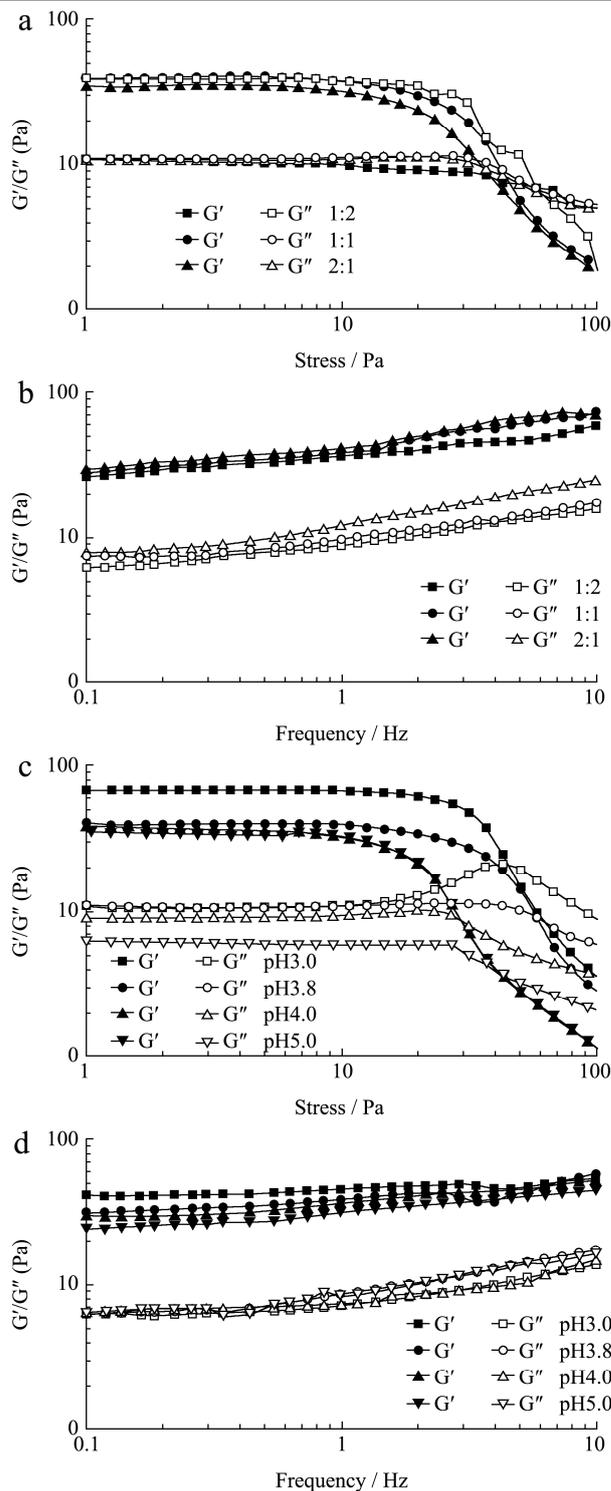


图8 Pickering 双重乳液的应力、频率扫描图

Fig.8 The stress and frequency scan of Pickering double emulsions

注: a, b: 不同 SWIP:CS 比的 Pickering 双重乳液的应力、频率扫描图; c, d: SWIP-CS 比例为 1:1 时, 在 pH 为 3.0, 3.8, 4.0, 5.0 下制备的 Pickering 双重乳液的应力、频率扫描图。

通过小幅振荡测量, 能够更为清楚地揭示微观结构与乳液流动性之间的关系^[20]。图 8a 是不同壳聚糖比例的复合胶体颗粒稳定的 Pickering 双重乳液的应

力扫描图,能够得出在线性粘弹区域内,不同壳聚糖比例的 Pickering 双重乳液的储存模量 (G') 均明显要高于其损失模量 (G''),这也就意味着该 Pickering 双重乳液具备类弹性固体的凝胶性质,是凝胶状乳液。随着应力的不断增加,储存模量 (G') 与损失模量 (G'') 相交于一点,也即是屈服点(临界应力),该点的出现也就意味着 Pickering 双重乳液自身的结构发生了改变,从最初的凝胶状逐渐转化为溶胶状,这也是线性相应向非线性相应之间的转化。另外,随着壳聚糖比例的增加,双重乳液的起始 G' 相对更大一些,其线性粘弹区域也较广,包括屈服点所出现的时间也逐渐变慢,表明其临界应力逐渐增大。在固定应力为 1 Pa 的条件下,不同壳聚糖比例的 Pickering 双重乳液随着频率的增加而逐渐增大,表明当壳聚糖比例较高时,双重乳液的凝胶特性也更强一些,这也与应力扫描的结果相一致。由此可见,通过控制复合胶体颗粒中壳聚糖的比例,能够对双重乳液的凝胶性质进行一定程度的改善。

图 8c、8d 是 SWIP-CS 比例为 1:1 时的复合胶体颗粒在 pH 分别为 3.0、3.8、4.0、5.0 下制备的 Pickering 双重乳液应力扫描与频率扫描图,从应力扫描图(c)中可知,不同 pH 条件下所制备的 Pickering 双重乳液都具备凝胶特性,其储存模量 (G') 明显要高于其损失模量 (G''),同时在应力的不断增加下也出现了相应的屈服点。图中结果表明,随着 pH 的增加,储存模量的起始点逐渐减小,其对应的屈服点也出现的越早,意味着临界压力也越少,由此可得出该 Pickering 双重乳液随着 pH 的增加,其自身的凝胶性能以及稳定性都在降低。在频率扫描图(d)中也出现了同样的实验结果,不同的 pH 条件下 G' 都呈现出了较弱的频率依赖性,同时,随着 pH 的上升,起始 G' 逐渐减小,也就是说 pH 能够影响双重乳液的凝胶特性,可以通过调控颗粒的 pH 进而改善双重乳液的凝胶特性和稳定性。

2.3.2 Pickering 双重乳液的流动性分析

当评估双重乳液在食品中的应用时,粘度是个至关重要的参数,粘度也与乳液的稳定性密切相关。当剪切速率足够增加以克服布朗运动时,乳化液液滴沿着流场变得更加有序,并且提供较少的流动阻力,从而降低粘度。乳液的剪切稀化行为与油滴的絮凝有关,这种情况通常是乳液有着微弱絮凝或者是添加了增稠剂。絮凝增加了分散相体积,导致非球形聚集体的形成,这两个因素都有助于提高乳液的稠度^[21]。

通过对乳液剪切稀化行为进行相应的研究,能够进一步探索该乳液的应用范围。从图 9 中能够看出,

当剪切速率在不断增加的时候,通过不同壳聚糖比例的复合胶体颗粒制备的 W/O/W Pickering 双重乳液的表观粘度在逐渐减小,呈现出剪切稀化的现象,这也就进一步表明该乳液中絮凝结构的存在,属于牛顿流体的范畴。同时,随着壳聚糖比例的增加,所对应的 W/O/W Pickering 双重乳液在表观粘度上也呈现逐渐增大的趋势,其流动性相应的减弱。结合上面的乳液微观结构图可得出,增大壳聚糖比例时乳液中水相粘度不断增加,同时能够防止内部液滴的聚结,从而能够对双重乳液的微观结构(即内水相与初级乳液滴的粒径)进行改善。

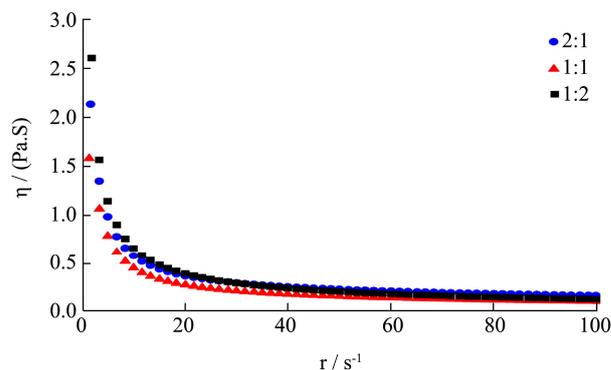


图9 不同壳聚糖浓度复合胶体颗粒制备的 Pickering 双重乳液的粘度图

Fig.9 The viscosity of Pickering double emulsion prepared by complex colloidal particles with different chitosan concentrations

3 结论

本文将 SPI 酶解产生的水不溶性聚集体进行超声处理,并与壳聚糖进行复合,制备得到的稳定分散的复合胶体颗粒,利用该复合胶体颗粒通过简单的一步均质法制备稳定的 W/O/W 型 Pickering 双重乳液,并研究了不同壳聚糖比例与 pH 值对乳液性质的影响。结果表明,在 pH 为 3.0、3.8、4.0 和 5.0 时,壳聚糖浓度为 0.125%、0.25% 和 0.5% 及油相分数为 50% 均能够制备稳定的 Pickering 双重乳液,且具备较好的储藏稳定性与凝胶特性。此外,壳聚糖比例的增加使得乳液的粒径有着显著性的降低 (30.6~23.9 μm),且较高比例(浓度为 0.5%)时能够改善双重乳液的稳定性与凝胶特性。而随着 pH 从 3.0 增加到 5.0,双重乳液液滴内部的小液滴数量逐渐减少,其稳定性与凝胶结构特性也在相应的降低。总的来说,通过调节复合胶体颗粒的 pH 与壳聚糖比例能够对双重乳液的稳定性与内部结构及凝胶特性进行相应的调控。本研究为制备双重乳液提供了一种简便有效的策略,对于食品工业、化妆品与医药领域上的应用具有重要意义。

参考文献

- [1] Esfanjani A F, Jafari S M, Assadpoor E, et al. Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate [J]. *Journal of Food Engineering*, 2015, 165: 149-155
- [2] Cofrades S, Antoniou I, Solas M T, et al. Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(1): 338-346
- [3] Tekin E, Sahin S, Sumnu G. Physicochemical, rheological, and sensory properties of low-fat ice cream designed by double emulsions [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2017, 119(9): 1600505
- [4] Santos M G, Carpinteiro D A, Thomazini M, et al. Coencapsulation of xylitol and menthol by double emulsion followed by complex coacervation and microcapsule application in chewing gum [J]. *Food Research International*, 2014, 66: 454-462
- [5] Jiménez-Martín E, Gharsallaoui A, Pérez-Palacios T, et al. Volatile compounds and physicochemical characteristics during storage of microcapsules from different fish oil emulsions [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2015, 96: 52-64
- [6] Silva B F B, Rodríguez-Abreu C, Vilanova N. Recent advances in multiple emulsions and their application as templates [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2016, 25: 98-108
- [7] Qi X, Wang L, Zhu J. Water-in-oil-in-water double emulsions: an excellent delivery system for improving the oral bioavailability of pidotimod in rats [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 100(6): 2203-2211
- [8] Fujii S, Read E S, Binks B P, et al. Stimulus-responsive emulsifiers based on nanocomposite microgel particles [J]. *Advanced Materials*, 2005, 17(8): 1014-1018
- [9] He Y, Wu F, Sun X, et al. Factors that affect pickering emulsions stabilized by graphene oxide [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013, 5(11): 4843-4855
- [10] Ding S, Serra C A, Vandamme T F, et al. Double emulsions prepared by two-step emulsification: history, state-of-the-art and perspective [J]. *J Control Release*, 2019, 295: 31-49
- [11] Clegg P S, Tavecchi J W, Wilde P J. One-step production of multiple emulsions: microfluidic, polymer-stabilized and particle-stabilized approaches [J]. *Soft Matter*, 2016, 12(4): 918-998
- [12] 张远红.大豆肽基纳米颗粒的制备、界面行为及功能性输送的研究[D].广州:华南理工大学,2018
ZHANG Yuanhong. Fabrication, interfacial behaviors and functional delivery of soy peptide-based nanoparticles [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018
- [13] Nielsen P M, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(5): 642-646
- [14] Zhang Y, Zhou F, Zhao M, et al. Soy peptide aggregates formed during hydrolysis reduced protein extraction without decreasing their nutritional value [J]. *Food Function*, 2017, 8(12): 4384-4395
- [15] Zhang Y, Zhou, F, Zhao, et al. Soy peptide nanoparticles by ultrasound-induced self-assembly of large peptide aggregates and their role on emulsion stability [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 74: 62-71
- [16] Jackson M, Mantsch H H. The use and misuse of FT-IR spectroscopy in the determination of protein structure [J]. *Crc Critical Reviews in Biochemistry*, 1995, 30(2): 95-120
- [17] Zheng L, Zhao Y, Xiao C, et al. Mechanism of the discrepancy in the enzymatic hydrolysis efficiency between defatted peanut flour and peanut protein isolate by flavorzyme [J]. *Food Chemistry*, 2015, 168: 100-106
- [18] Haris P I, Severcan F. FT-IR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media [J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 1999, 7(1-4): 207-221
- [19] Dima C, Dima S. Water-in-oil-in-water double emulsions loaded with chlorogenic acid: release mechanisms and oxidative stability [J]. *J Microencapsul*, 2018, 35(6): 584-599
- [20] Tripathi S, Bhattacharya A, Singh R, et al. Rheological behavior of high internal phase water-in-oil emulsions: effects of droplet size, phase mass fractions, salt concentration and aging [J]. *Chemical Engineering Science*, 2017, 174(17): 290-301
- [21] Er Elebi E A, Lu E I. Rheological properties of whey protein isolate stabilized emulsions with pectin and guar gum [J]. *European Food Research & Technology*, 2009, 229(2): 281-286