

果胶复合提升米谷蛋白界面特性及Pickering乳液的贮藏稳定性

张佳雨¹, 周际松^{1,2}, 付青璇¹, 黄桂颖³, 侯温甫¹, 彭登峰², 金伟平^{1*}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023)

(2. 中国农业科学院油料作物研究所, 农业农村部油料加工重点实验室, 湖北武汉 430062)

(3. 仲恺农业工程学院, 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东广州 510225)

摘要: 米谷蛋白 (Rice Glutelin, RG) 是一种常用食品乳化剂, 但在中性 pH 值下, RG 易聚集成疏水性大尺寸颗粒, 导致其稳定性差、界面活性弱。该研究通过果胶静电复合修饰米谷蛋白, 探究两者复合比例对颗粒的尺寸、接触角、界面吸附性能和界面膜结构的影响, 在此基础上, 以复合颗粒为界面稳定剂制备 Pickering 乳液, 考察其粒径分布、微观结构、流变学性质及储藏稳定性。结果表明, 当米谷蛋白与果胶质量比为 1:1 时, 复合颗粒平均粒径为 675.4 nm, 接触角为 64.23°, 油-水界面张力从 36.55 mN/m 降低至 13.00 mN/m, 界面膜以弹性为主, 弹性模量达 46.07 mN/m, 由此复合颗粒稳定的 Pickering 乳液具有最小的粒径 (d_{43} -31.1 μm)、最高的表观黏度和储能模量。因此, 果胶复合可以显著降低米谷蛋白的尺寸, 并赋予其合适的表面亲疏水性, 进而提升其降低界面张力和增加界面膜黏弹特性的能力, 有利于制备高稳定 Pickering 乳液, 为拓展米谷蛋白在食品乳液体系中的应用提供了新策略。

关键词: 米谷蛋白; 果胶; 静电复合; 油-水界面; Pickering 乳液

文章编号: 1673-9078(2024)08-50-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.0232

Improvement of Interfacial Properties of Rice Glutelin via Complexation with Pectin and Storage Stability of Pickering Emulsions

ZHANG Jiayu¹, ZHOU Jisong^{1,2}, FU Qingxuan¹, HUANG Guiying³, HOU Wenfu¹,
PENG Dengfeng², JIN Weiping^{1*}

(1.School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

(2.Key Laboratory of Oilseeds Processing, Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences,

Wuhan 430062, China) (3.Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Key Laboratory of Lingnan Characteristic Food Science and Technology, Guangzhou 510225, China)

引文格式:

张佳雨,周际松,付青璇,等.果胶复合提升米谷蛋白界面特性及Pickering乳液的贮藏稳定性[J].现代食品科技,2024,40(8):50-60.

ZHANG Jiayu, ZHOU Jisong, FU Qingxuan, et al. Improvement of interfacial properties of rice glutelin via complexation with pectin and storage stability of pickering emulsions [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 50-60.

收稿日期: 2024-02-28

基金项目: 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室开放课题 (2021B1212040013); 湖北省教育厅科研计划项目 (D20221613); 湖北省重点研发计划项目 (2023BBB068)

作者简介: 张佳雨 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 粮油蛋白质加工, E-mail: whjiayuzhang@163.com

通讯作者: 金伟平 (1988-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 粮油食品生物大分子, E-mail: jwpcademic@outlook.com

Abstract: Rice glutelin (RG) is a commonly used food emulsifier. However, RG easily aggregates into large hydrophobic particles at neutral pH, resulting in poor stability and weak interfacial activity. In this work, RG was modified by pectin through electrostatic complexation, and the effects of the RG-to-pectin ratio on the particle size, contact angle, interfacial adsorption property, and interfacial film structure were investigated. On this basis, these composite particles were utilized as interface stabilizers to fabricate Pickering emulsions, and their particle size distribution, microstructures, rheological properties, and storage stabilities were investigated. The results revealed that when the mass ratio of RG to pectin was 1:1, the average particle size of the composite particles was 675.4 nm and the contact angle is 64.23°. In the meantime, the oil-water interfacial tension was reduced from 36.55 mN/m to 13.00 mN/m, and the interfacial film was mostly elastic, with an elastic modulus of 46.07 mN/m. The Pickering emulsion stabilized by this composite particle had the smallest particle size ($d_{4,3}$ ~31.1 μm) and the highest apparent viscosity and storage modulus. Therefore, complexation with pectin can significantly reduce the size of RG and enhance its surface hydrophilicity, thereby improving its abilities to reduce interfacial tension and increase the viscoelastic properties of the interfacial film. These properties are conducive for preparing stable Pickering emulsions. Thus, this study provides a new strategy for expanding the application of RG in food emulsion systems.

Key words: rice glutelin; pectin; electrostatic complexation; oil-water interface; Pickering emulsion

大米蛋白的致敏性低、氨基酸组成合理，是一种高品质植物蛋白^[1]，且极易被人体消化，消化率可达 93.0%，蛋白质净利用率为 73.8。但大米蛋白中 80% 为谷蛋白，水溶性较差^[2]，限制了在食品配料领域的应用。米谷蛋白 (Rice Glutelin, RG) 为碱溶性蛋白质，由 499 个氨基酸组成，分子量约为 56.5 ku，由 30~40 ku 的 α 亚基和 19~23 ku 的 β 亚基通过二硫键连接^[2]，等电点 pH 值为 5.5^[3]。目前，提高米谷蛋白溶解度的方法主要有物理法、化学法及酶水解^[2]。物理法具有简单方便、耗时短、对蛋白质的破坏小等优点，主要通过机械作用等方式改变蛋白质的高级结构或分子间的聚集方式，但存在改性范围窄、改性效果有限的缺点^[4]；化学法虽然效果显著，但对蛋白质结构的剧烈改变会破坏其营养及生理功效，产生副反应或存在化学试剂残留亦有安全隐患^[5]；酶催化水解改性虽然反应条件温和，但存在低水解度改性效果不佳，高水解度改性产生苦味肽等问题^[5]。

添加荷电多糖等来阻止蛋白质聚集是一种绿色改性方法^[6]。荷电多糖是一种天然聚电解质，常包含羧基、硫酸酯、葡糖酸等带电荷基团，通过静电结合能调控蛋白质聚集结构，维持蛋白质活性和构象的稳定^[7]。例如，Antonov 等^[8]发现 κ -卡拉胶 / 溶菌酶在质量比 5:1 的条件下形成的静电复合物对溶菌酶热聚集有明显的抑制效应。Huang 等^[9]利用羧甲基壳聚糖与大豆蛋白形成复合物，复合颗粒稳定乳液的液滴尺寸更小，形成了高覆盖率的黏弹性

界面层，有利于 Pickering 乳液的长期稳定。对于大米蛋白而言，也有学者采用类似的方法改善其聚集和功能特性。例如，Xu 等^[10]采用海藻酸钠与米谷蛋白静电复合，在复合比例为 3:1、pH 值 5.0 时，复合体系依然保持澄清溶液，未观察到明显的聚集。Choi 等^[6]用海藻酸钠和黄原胶与大米蛋白复合，形成纳米尺寸的颗粒，复合比例为 4:1 时，制备的乳液贮存 4 周后仍然稳定。Mun 等^[11]在 pH 值 2.0 的条件下制备大米蛋白 / 果胶复合物，含 0.8 wt.% 和 1.0 wt.% 果胶的大米蛋白悬浮液仍然澄清。以复合比例为 1:2，油质量分数为 1.0% 制备的乳液在贮存一周后，稳定性较好。具体荷电多糖对 RG 聚集性质调控对稳定乳液界面结构和稳定性还是存在差异的，需在前期的基础上进一步系统性研究。

果胶是一种天然阴离子荷电多糖，在中性 pH 值 6.0~7.0 下，其羧基可与带正电的蛋白质相互作用，改善蛋白质的结构与功能^[12]。本研究通过带负电荷的果胶与米谷蛋白静电结合，改善米谷蛋白在中性 pH 值下的聚集行为和界面特性。大米蛋白在食品配料中的最主要应用为乳化剂，聚集行为改善后的复合颗粒将成为 Pickering 乳化剂的良好选择。因此实验测定了米谷蛋白 / 果胶复合颗粒的粒径、电位、微观形貌、表面润湿性和界面特性，并考察了复合颗粒稳定乳液的结构、流变特性与储藏稳定性，旨在为米谷蛋白的绿色改性及扩展在食品领域中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料

米谷蛋白 (RG): 纯度 >90%, 经 Osborne 分级提取, 实验室自制; 果胶: 来源于柑橘, 重均分子量 1.43×10^5 u, 酯化度 55.1%, 上海 Sigma-Aldrich 公司; 金龙鱼稻米油 (食品级): 益海嘉里有限公司; 罗丹明 B: 上海阿拉丁生化科技有限公司; 其他所有化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

FiveEasy Plus pH 计, 瑞士梅特勒-托利公司; Mastersizer 3000 激光粒度仪、Zetasizer Nano ZS 纳米粒度与 Zeta 电位分析仪、Malvern Kinexus Pro + 流变仪, 英国马尔文仪器有限公司; JY-PHA 型接触角测量仪, 承德优特检测仪器制造有限公司; TRACKER 界面流变仪, 法国泰克利斯仪器公司; SU-8400 场发射扫描电子显微镜、SU8010 冷场发射扫描电子显微镜, 日本日立仪器公司; FLUKO FA25 高速剪切机, 上海右一仪器有限公司; FV.120 共聚焦激光扫描显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 RG和果胶储备液的配置

10 mg/mL RG 储备液: 参考 Zhao 等^[13]的方法并稍作修改。称取 1.0 g RG 粉末分散于 100 mL 0.005 mol/L NaCl 溶液中, 在室温下磁力搅拌 30 min 后, 用 0.5~2.0 mol/L NaOH 调节 pH 值至 12, 持续搅拌 2 h, 置于 4 °C 冰箱中过夜, 以保证充分水合。

10 mg/mL 果胶储备液: 称取 1.0 g 果胶粉末分散于 100 mL 0.005 mol/L NaCl 溶液中, 在室温下磁力搅拌 60 min 至完全溶解, 用 0.5~2.0 mol/L NaOH 调节 pH 值至 12 搅拌 1 h, 置于 4 °C 冰箱中过夜, 以保证样品充分水合。

1.3.2 RG/果胶复合物的制备

保持 RG 质量浓度为 5 mg/mL, 调节果胶储备液的加入量来控制 RG 与果胶的质量比依次为 1:1、2:1、5:1、10:1, 用 pH 值 12 的 0.005 mol/L NaCl 溶液补齐溶液至固定体积, 搅拌 30 min, 用 0.1~2.0 mol/L HCl 缓慢调节 pH 值至 7.0, 形成 RG/ 果胶复合物。

1.3.3 复合物粒径分布、电位及浊度的测定

参考 Shen 等^[14]的方法。在 25 °C 下, 利用 Mastersizer 3000 激光粒度仪对 RG 和 5:1、10:1 复

合物的粒径进行测定, 利用 Zetasizer Nano ZS 纳米粒度与 Zeta 电位分析仪对 1:1、2:1 复合物的粒径和所有样品的电位进行测定, 测定前将样品稀释至 1.0 mg/mL, 米谷蛋白和去离子水的折射率分别设置为 1.45 和 1.33。

参考 Jin 等^[15]的方法。配置好不同混合比例的米谷蛋白/多糖溶液, 用 0.1~2.0 mol/L HCl 滴定混合溶液, 调节溶液 pH 值从原始状态 12 到 7.0, 以 0.005 mol/L NaCl 为空白, 在 600 nm 下测定 pH 值 12 和 7.0 时的透光率 (T), 体系浊度为 100-T% 计算。

1.3.4 扫描电子显微镜观察复合物形貌

参考 Jin 等^[15]的方法并稍作修改。将 RG 和不同比例制备的 RG/ 果胶复合物悬浮液稀释至 0.1 mg/mL, 超声 10 min, 取 200 μ L 悬浮液滴至锡箔纸上, 室温干燥, 对复合物表面进行喷金处理, 在 2 kV 的加速电压下, 观察复合物的微观形貌。

1.3.5 复合物界面润湿性的测定

参考 Ning 等^[16]的方法并稍作修改。RG 和不同比例制备的 RG/ 果胶复合物悬浮液样品通过刮刀浇铸在载玻片上, 并于 50 °C 下烘干过夜。将 2 μ L 的去离子水滴在干燥的复合物薄膜表面, 记录水滴形状, 利用 Young-Laplace 函数计算得到接触角。

1.3.6 复合物的油-水界面特性测定

参考 Peng 等^[17]的方法并稍作修改。以稻米油作为油相, RG 和不同比例制备的 RG/ 果胶复合物悬浮液稀释至 1.0 mg/mL, 超声分散 10 min, 作为水相装在垂直针的注射器中, 针头伸入油相, 通过电机控制针头尖端产生一个表面积为 15 mm² 的梨状轴对称下悬滴。连续监测液滴形状 7 200 s, 根据 Young-Laplace 方程, 计算得到界面张力随时间的变化曲线。

样品界面吸附 2 h 后, 待界面张力变化趋于平缓时, 固定振幅为 10%, 改变震荡频率为 0.02、0.05 和 0.1 Hz, 研究界面膨胀模量随震荡频率变化规律; 固定频率为 0.1 Hz, 改变振幅为 5、10、20、30、40%, 绘制界面张力随变形量的 Lissajous 曲线。

1.3.7 复合物稳定Pickering乳液的制备

取不同质量比的 RG/ 果胶复合颗粒溶液, 加入稻米油作为油相, 固定油水比 1:1, 在 12 000 r/min 高速剪切的条件下均质 2 min 制得乳液。乳液贮藏期间加入 0.02% (m/V) 的叠氮化钠以抑制微生物生长。

1.3.8 Pickering乳液共聚焦激光扫描显微镜观察

参考 Lan 等^[18]的方法并稍作修改。在新鲜制备的 Pickering 乳液中加入罗丹明 B 染料对界面处 RG 蛋白部分进行染色, 轻轻混合 1 min 后, 采用波长为 543 nm 激光束激发, 放大 100 倍进行观察。

1.3.9 Pickering乳液冷场发射扫描电镜观察

参考 Guo 等^[19]的方法, 采用冷冻扫描电镜 (Cryo-SEM) 对乳液界面微观结构进行分析。取新鲜制备的 Pickering 乳液 10 μL , 在液氮中速冻后立刻移入低温制备室, 尖刀刺破产生自然油水界面, 水相部分在 $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下升华; 在 5 mA 下溅射银涂层 30 s 后, 在 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 观察乳液液滴和连续相的界面形貌。

1.3.10 Pickering乳液的流变特性分析

使用流变仪分析 RG 和不同比例制备的 RG/ 果胶复合物稳定 Pickering 乳液乳化层的流变学性质。

(1) 稳态流动曲线: 参考 Guo 等^[20]的方法并稍作修改, 使用锥板夹具 (直径 40 mm, 水平夹角 4° , 测量间隙 149 μm), 测试在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下均匀预热 5 min, 剪切速率从 $0.1\sim 100\text{ s}^{-1}$ 按对数增加, 记录黏度随剪切速率变化曲线。

(2) 频率扫描: 参考 Mu 等^[21]的方法, 使用平板夹具 (直径 40 mm), 在线性黏弹区进行测试, 固定应变为 0.5%, 温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 频率变化设定为 $0.01\sim 10\text{ Hz}$, 测定 Pickering 乳液的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 随频率变化关系。

1.3.11 Pickering乳液的粒径、电位及储藏稳定性评价

将新鲜制备 Pickering 乳液分散到 pH 值 7.0 的 0.005 mol/L NaCl 溶液中, 用 Mastersizer 3000 激光粒度仪测定液滴 $d_{4,3}$ 粒径, 以 $3\ 000\text{ r/min}$ 的速度搅拌, 达到 12% 遮光度后, 开启测定, 每个样品平行测定 3 次。乳液液滴表面电位测定前, 用 pH 值 7.0 的 0.005 mol/L NaCl 溶液稀释 10 倍, 在常温条件下测定, 每个样品平行测定 3 次。

将新鲜制备的样品在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境中贮存 30 d, 通过测量乳液液滴大小和电位的变化评估乳液的储藏稳定性。测量过程中, 设定稻米油和分散剂的折射率分别为 1.47 和 1.33。

1.3.12 数据处理与分析

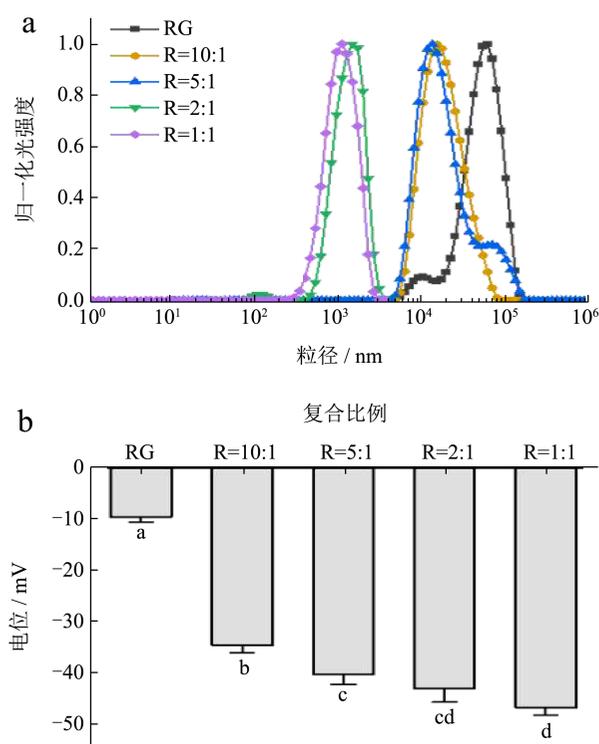
所有实验均重复三次, 实验结果均以平均值 \pm 标准偏差的形式表示, 使用 Origin 2021 软件作

图。数据显著性分析使用 SPSS 进行, 采用单因素 ANOVA 检验, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 复合物粒径分布、电位及浊度的测定

粒径分布是表征蛋白质及其复合颗粒大小和分散程度的重要指标。米谷蛋白 (RG) 和不同比例制备的 RG/ 果胶复合物在 pH 值 7.0 条件下的粒径和电位结果如图 1 所示。在此条件下, RG 形成了 $50\ \mu\text{m}$ 的大团聚体并极易沉淀, 加入果胶后, 复合物尺寸减小, 且表现出果胶的浓度依赖性。当 RG/ 果胶以 1:1 和 2:1 复合时, 溶液浊度低, 未观察到明显的沉淀 (图 1d), 此时复合颗粒的平均粒径较小, 可达到 675.4 nm 。RG 为碱溶性蛋白质, 其等电点在 pH 值 5.5 ^[3], 因此当 pH 值为 7.0 时, RG 整体上表现为负电荷 (图 1b), 但其表面部分区域仍带有正电荷, 该正电荷区域能与带负电的多糖分子结合。Li 等^[22]研究发现卵清蛋白在 pH 值 7.0 时即使蛋白质的表面电荷是负的, 但仍然存在一些正的斑块, 可与海藻酸钠发生相互作用。结合后, RG/ 果胶复合物的表面电位所带负电荷更多, 且绝对值随着果胶含量的增加而增加, 直至多糖基本覆盖蛋白质所有表面正电荷区域, 复合物表面电位的稳定于 $-45\sim -50\text{ mV}$, 颗粒之间的静电斥力抑制了进一步聚集^[23]。



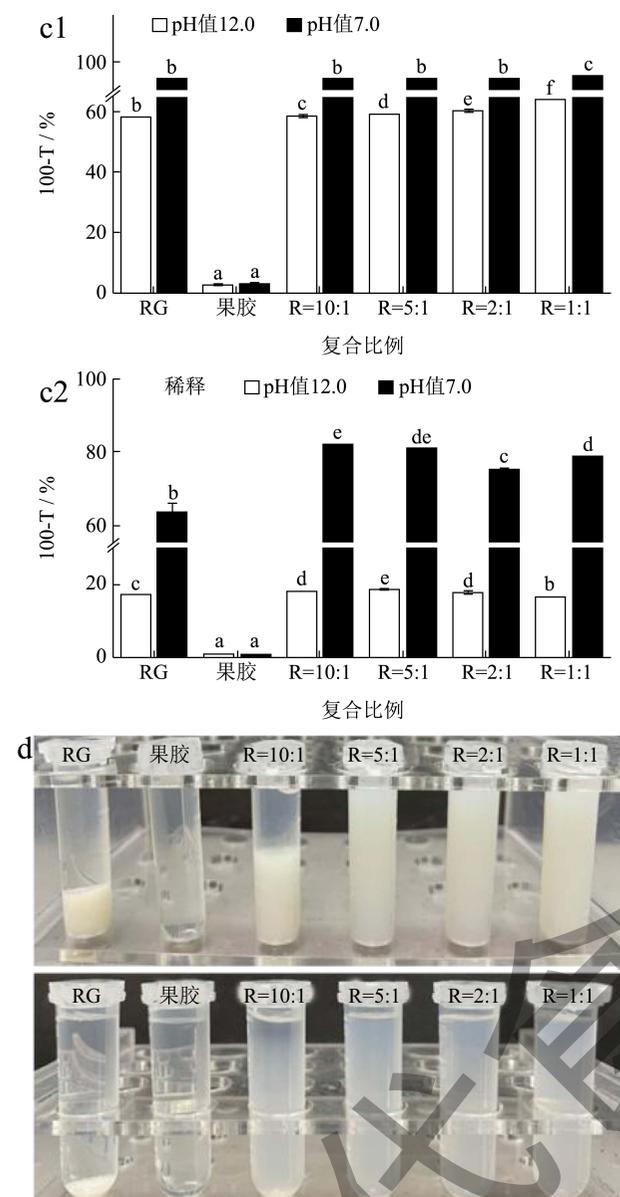


图1 不同蛋白多糖比例对复合物颗粒粒径(a)、电位(b)、浊度(c)和外观(d)的影响

Fig.1 Effect of protein/polysaccharide ratios on the particle size distribution (a), zeta potential (b), turbidity 100-T% (c) and appearance (d) of complex particles dispersion

注: 不同字母表示各组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

浊度是反映蛋白质/多糖复合物形成的直接指标(图1c), 粒径和电位与其呈现一定的相关性。由图1c可以看出, 果胶在碱性pH转变至中性pH 7.0的过程中, 浊度并未发生明显变化, 表明果胶在无二价阳离子存在的条件下, 并未形成颗粒结构。在未稀释的状态下, 从pH 12降低到7.0, RG浊度升高, 复合颗粒的浊度与RG非常相似, 经过静置, RG与R=10:1的样品出现了沉淀(图1d)。为了进一步观察复合物R=5:1~1:1与RG的区别,

将体系稀释5倍, 此时复合物悬浮液的浊度高于RG, 经过静置, 复合物R=5:1~1:1仍未发生沉淀, 侧面说明果胶与RG发生静电复合, 改善了RG的聚集行为, 使溶液状态保持均一。

2.2 复合物微观结构及表面浸润性

扫描电子显微镜可用于获取复合物的微观形貌^[15]。如图2所示, RG聚集体颗粒大, 连接在一起形成致密的网络状絮凝体。而果胶的复合改变了RG颗粒的形状, 所有的复合颗粒呈现独立的球形, 尺寸更小, 分布更均匀, 这表明果胶分子有效阻止了RG的聚集。当RG/果胶的比例为1:1和2:1时, 形成的颗粒更小, 在放大3000倍下观察到的大尺寸颗粒分布更零散, 颗粒也由硬质颗粒变为更柔软易变形的颗粒。

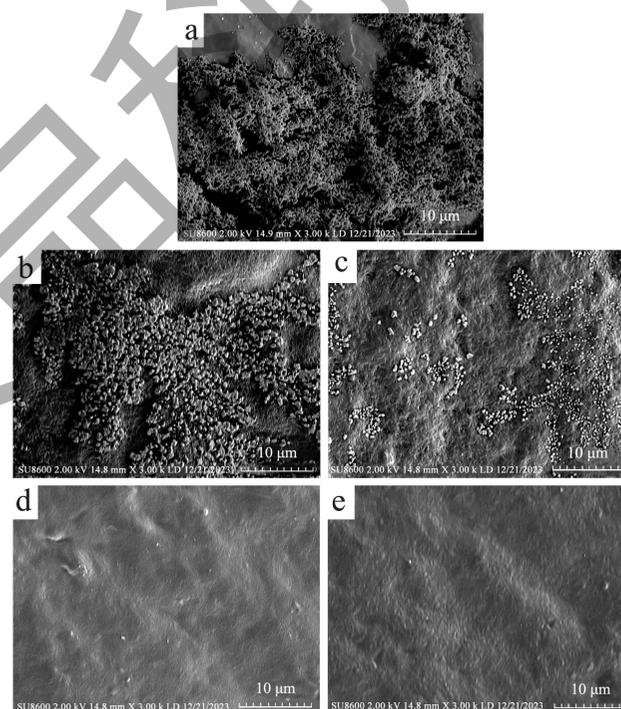


图2 不同蛋白多糖比例复合物颗粒的微观结构图($\times 3000$)

Fig.2 Microstructure of complex particles formed at different protein/polysaccharide ratios

注: (a) RG; (b) R=10:1; (c) R=5:1; (d) R=2:1; (e) R=1:1。

接触角能反映颗粒的表面润湿性, 评估蛋白质的表面疏水能力。对于气-液或油-水界面而言, 当接触角 $>90^\circ$ 时, 普遍认为颗粒表面以疏水性为主; 当接触角 $<90^\circ$ 时, 颗粒表面以亲水性主导^[24]。RG和RG/果胶复合物在pH 7.0条件下测定的接触角图片如图3所示, 随着果胶的增加, 水滴高度逐渐降低, 计算接触角平均值依次为 95.33° 、 87.10° 、

79.33°、73.03°、64.23°，具有显著性差异 ($P < 0.05$)。此结果表明 RG 与果胶复合可以明显改善其表面亲水性，也引证了表面电荷的结果，说明果胶能与 RG 表面的正电荷区域结合，在 RG 的表面引入大量果胶的亲水基团。

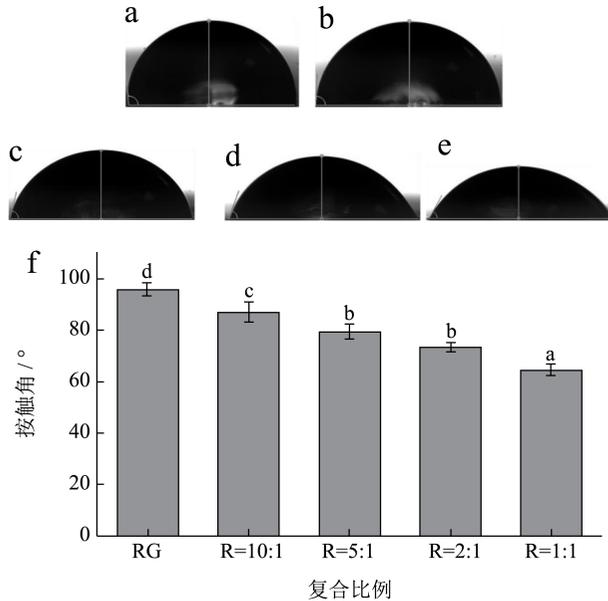


图3 不同蛋白多糖比例对复合物颗粒界面润湿性的影响
Fig.3 Effect of protein/polysaccharide ratios on the interfacial wettability of complex particles

注：(a) RG；(b) R=10:1；(c) R=5:1；(d) R=2:1；(e) R=1:1。不同字母表示各组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 复合物在油-水界面的吸附特性

界面膨胀流变仪能监测表面活性分子或颗粒在油-水界面上的吸附和变形过程，是揭示乳液的形成和稳定重要的手段之一。具有良好乳化活性的物质应具有以下基本性质之一：(i) 在界面层最初形成时，迅速降低界面张力；(ii) 在界面上吸附时，结合力强，吸附能高于解析能；(iii) 形成一定的空间位阻或较厚的界面层厚度，保护乳滴，以减少絮凝、聚集或歧化^[25]。由图4a可看出，RG和RG/果胶复合颗粒的油-水界面张力在吸附前1000s均快速降低，吸附2h后，RG的界面张力降低为16 mN/m，而复合物颗粒随着果胶比例的增加，其界面张力平衡值逐渐降低，数值递减的顺序依次为：R=1:1 > R=2:1 > R=5:1 > R=10:1 > RG。结果表明，RG/果胶复合颗粒能有效改善RG在油-水界面的吸附效率，产生更低的界面张力。吴彤等^[26]的研究结果也表明随着牛蒡多糖浓度的增加，玉米蛋白/牛蒡多糖复合颗粒在油-水界面的吸附能力更强。界面张力 $\pi-t^{1/2}$ 曲线发现在初始阶段曲线均近似直线（图4b），说明

复合颗粒在油-水界面的初始吸附由扩散主导，初始阶段的直线斜率可用于拟合吸附速率 (K_{diff})。 K_{diff} 越大表明吸附速率越快。在所有复合物中，R=1:1表现更低的界面张力平衡值， K_{diff} 最大为-1.08，表明以1:1制备RG/果胶复合颗粒具有形成稳定乳液的最佳潜质。

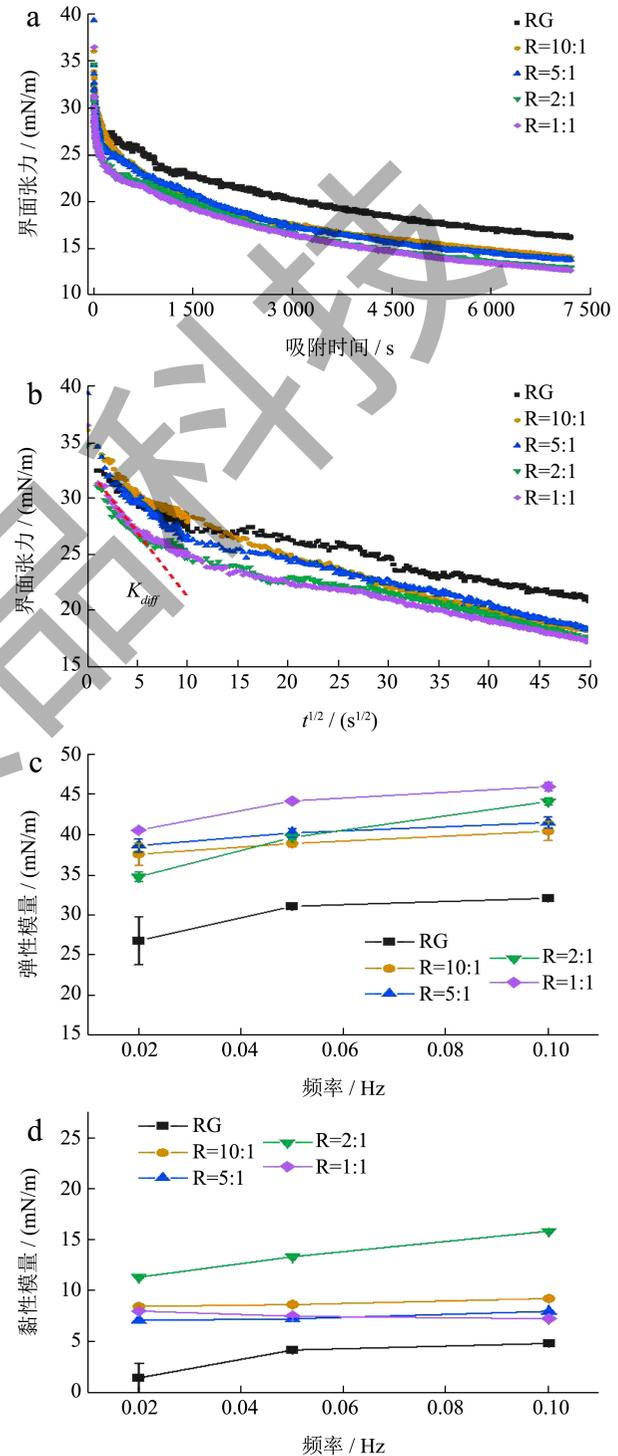


图4 不同蛋白多糖比例对复合物颗粒界面性质的影响
Fig.4 Effect of protein/polysaccharide ratios on the interfacial properties of complex particles

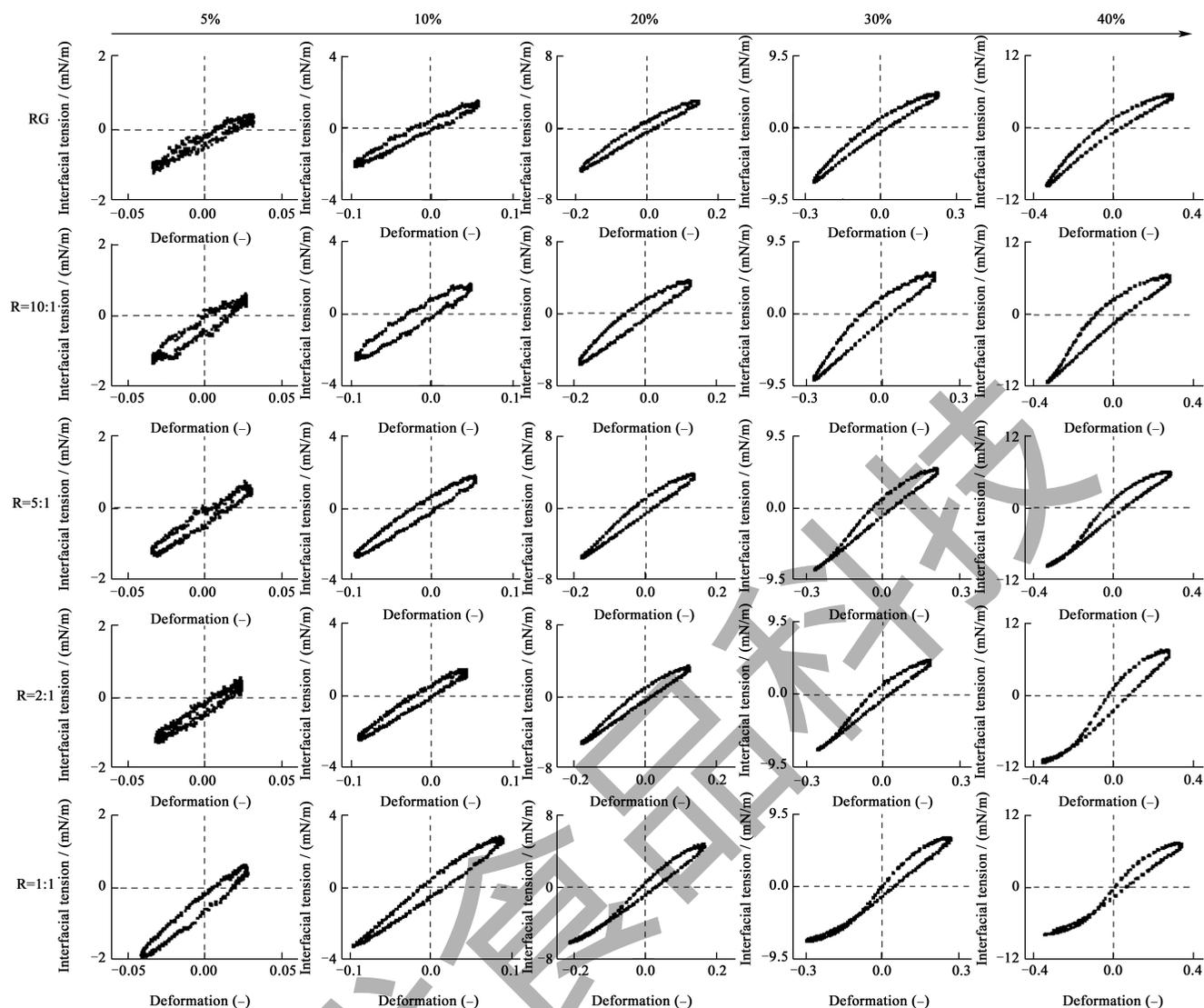


图5 不同蛋白多糖比例对复合物颗粒在不同振幅下的 Lissajous 曲线

Fig.5 Lissajous curves of complex particles with protein/polysaccharide ratios at different amplitudes

当复合颗粒吸附于界面后, 颗粒与颗粒会发生相互作用形成界面膜, 该界面膜的黏弹特性与乳滴的稳定性密切相关。为了获得 RG 及不同比例制备的 RG/果胶颗粒的界面膜相关信息, 采用界面膨胀流变仪进行了黏弹模量的测定。图 4c、4d 显示了黏弹模量与频率的函数曲线, 对于所有样品而言, 界面膜的弹性模量 (E_d) 远大于黏性模量 (E_v), 表明颗粒稳定的界面属于弹性膜, 膜的高弹性有利于保护液滴之间不易发生聚结和奥氏熟化^[27]。RG/果胶复合颗粒的界面膜模量随频率的增加而增加, 表现出频率依赖性。随着复合颗粒中果胶比例的增加, 在 0.02 Hz 时弹性模量数值也从 27 mN/m 增加至 41 mN/m。结果表明, 蛋白质与多糖的组装可有效提高界面层的弹性, 有助于制备稳定的 Pickering 乳液。

为了研究大振幅振荡周期中的非线性行为, 通过绘制界面压力与应变的 Lissajous 图, 来评估颗

粒对界面膜的影响^[17]。一般来说, 纯弹性响应呈线性, 而纯黏性响应呈圆形。椭圆形表示线性黏弹性响应, 而不对称形状则表示非线性黏弹性响应^[28]。如图 5 所示, 在低振幅 (5%) 时, 颗粒控制稳定界面的 Lissajous 图近似轴对称, 表现出线性黏弹性响应。当振幅从 20% 增加到 40% 时, 复合颗粒稳定界面的图形形状变得越来越不对称, 这意味着非线性行为。对于复合颗粒稳定的界面, 在相同振幅下, Lissajous 图的不对称性逐步增加, 说明界面膜机械性能变化的不同。RG 在膨胀阶段呈现应力软化响应, 在压缩阶段呈现应力硬化行为, 随着果胶量的增加, 界面膜机械响应变化显著, 尤其是 R=1:1 时, 呈现出狭窄的形状, 界面膜弹性特征突出。复合颗粒的 Lissajous 图与 RG 的 Lissajous 图有明显差异, 说明果胶可以有效调控 RG 颗粒的界面机械性能响应。Li 等^[29]通过大振幅振荡测量, 同样也发现乳清

蛋白 / 低甲氧基果胶双层的界面弹性明显高于乳清蛋白层, 在低甲氧基果胶吸附后, 界面膜机械性能响应变化显著。

2.4 Pickering乳液结构的观察

图 6a 为新鲜制备的乳液外观图, RG 稳定乳液的外观呈现黄色, RG 无法有效包裹住油滴; 而复合颗粒均能稳定住油滴。因此相比 RG 稳定乳液, RG 与果胶复合改善了乳液稳定性。为确定颗粒在油滴表面的吸附情况, 将蛋白质的部分用罗丹明 B 染色, 该染料与蛋白质结合后发出强烈红色荧光, 再采用共聚焦激光扫描显微镜观察 RG 和不同比例制备的 RG/ 果胶复合物稳定 Pickering 乳液液滴的分布及界面层。由于 RG 的高疏水性及过大的颗粒尺寸, 使其不能有效稳定油水界面, 形成的乳液液滴分布不均匀, 尺寸不规整, 液滴边缘和水相中均存在粒径较大的蛋白质聚集体。而 RG/ 果胶复合颗粒稳定的乳液液滴粒径小且分布均匀, 在液滴周围观察到了亮红色环形结构, 表明复合物有效吸附在油水界面, 同时, 水相中的蛋白质聚集体较少。这些结果表明, RG 与果胶复合改善了蛋白质颗粒稳定乳液的微观结构和液滴分布。Huang 等^[9]的研究结果表明随着羧甲基壳聚糖的加入, 与大豆蛋白形成的复合物稳定乳液液滴尺寸逐渐减小, 乳化作用增强。

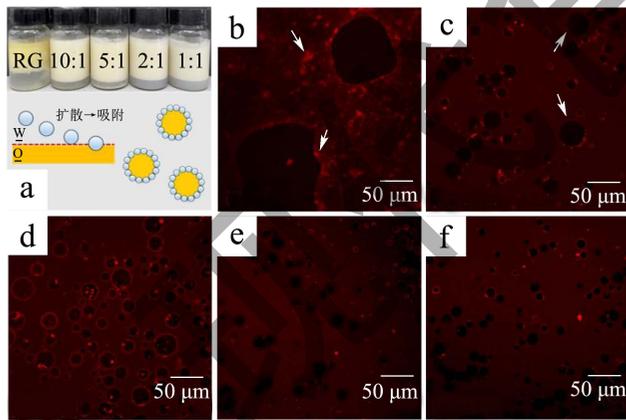


图 6 不同蛋白多糖比例对复合物颗粒稳定乳液的共聚焦激光扫描显微镜图

Fig.6 Confocal laser scanning microscopic images of complex particles stabilized Pickering emulsions

注: (b) RG ; (c) R=10:1 ; (d) R=5:1 ; (e) R=2:1 ; (f) R=1:1.

共聚焦激光扫描显微镜有助于明确蛋白质聚集颗粒在油水界面处的定位, 但光学显微镜的分辨率不足, 结合冷冻扫描电镜能实现 Pickering 乳液界面

微观结构的进一步可视化, 并提供颗粒锚定在油-水界面的详细排布方式。如图 7 所示, RG 聚集成大而疏水的颗粒, 稳定液滴能力差, 制备的乳液不稳定, 其在冷冻过程中油水分离, 只留下蛋白质的聚集体网络。RG/ 果胶复合物稳定的乳液均能看到球形的立体液滴, 且随着果胶比例的增加, 液滴尺寸分布越来越均匀。复合物稳定的油相液滴表面有少量凸起或凹陷, 表明有颗粒附着吸附在油水界面处。随着复合物中果胶比例的增加, 观察到乳液液滴表面出现了一些网络丝状结构, 这可能是由于过多的果胶桥接絮凝, 这种更密集的网络结构有助于减少液滴的流动, 提高乳液的稳定性^[30]。

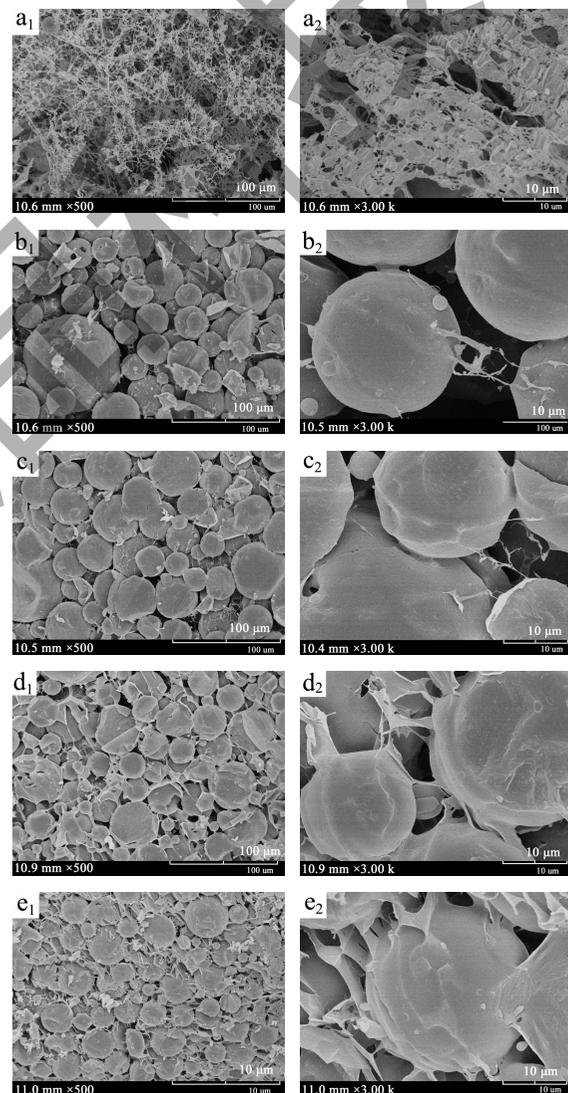


图 7 不同蛋白多糖比例对复合物颗粒稳定乳液的低温扫描电镜图像

Fig.7 Cryo-SEM images of complex particle stabilized Pickering emulsions with different protein/polysaccharide ratios

注: (a) RG ; (b) R=10:1 ; (c) R=5:1 ; (d) R=2:1 ; (e) R=1:1. 下标 1 为 $\times 500$, 下标 2 为 $\times 3000$ 。

2.5 Pickering乳液的流变特性

乳液的流变学测试能评估其流动特性和稳定性。表观黏度能表征液滴间的相互作用，进而反映乳液的稳定性^[31]。如图 8a 所示，当剪切速率从 0.1 增加到 100 s⁻¹，乳液的表观黏度随剪切速率的增加而降低，表现为假塑性流体^[32]。RG 稳定的乳液液滴之间相互作用较弱，而复合颗粒稳定的乳液呈现先增加后减小的趋势，可能是液滴之间的相互作用及液滴的堆积导致的。表观黏度随复合物中果胶比例的增加而增加，这可归因于复合物颗粒形成了致密堆积的界面层和牢固的网络结构^[32]。RG 和复合颗粒稳定的 Pickering 乳液在 0.01~10 Hz 频率下的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 变化如图 8b 所示。颗粒稳定的乳液的 G' 值高于整个频率范围内的 G'' 值，表明乳液为弹性凝胶状结构。乳液的 G' 越高，变形越难，凝胶结构越强，乳液稳定性越高^[33]。 G' 和 G'' 的交点为凝胶-溶胶转变点，随着频率的增加，RG 稳定的乳液 G'' 与 G' 相交，表明液滴之间弱相互作用导致液滴重新排列与流动。

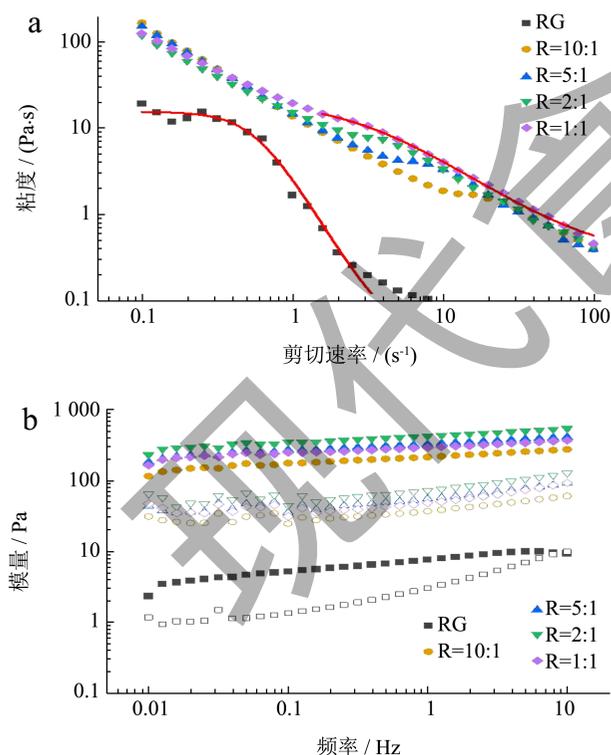


图 8 不同蛋白多糖比例复合物颗粒稳定乳液的流变特性
Fig.8 Rheological properties of Pickering emulsions stabilized by complex particles formed with different protein/polysaccharide ratios

注：(a) 表观黏度和 (b) 储能模量 (G' , 实心) 和损耗模量 (G'' , 空心)。

2.6 Pickering乳液的粒径、电位及稳定性

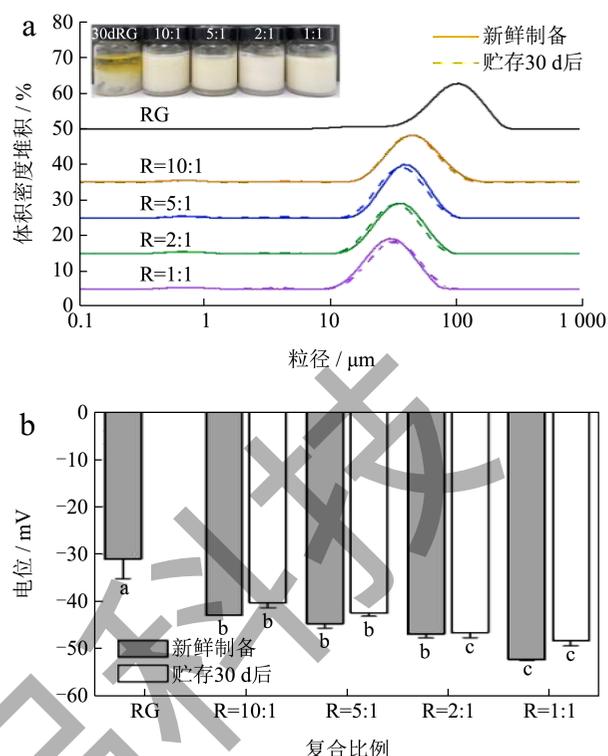


图 9 不同蛋白多糖比例复合物颗粒稳定 Pickering 乳液粒径 (a) 及电位 (b)

Fig.9 Droplet size (a) and ζ -potential (b) of Pickering emulsions stabilized by complex particles with different protein/polysaccharide ratios

注：不同字母表示各组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

粒径分布可以反映 Pickering 乳液的均匀程度，粒径分布范围越集中，表明 Pickering 乳液的稳定性越高^[34]。图 9a 为 RG 和不同复合比例的 RG/果胶复合颗粒对 Pickering 乳液液滴分布的影响。RG 稳定的乳液液滴 $d_{4.3}$ 尺寸为 97.9 μm ，由于 RG 蛋白颗粒尺寸大、表面疏水性过强，无法有效吸附与包裹油滴，乳化性差。复合颗粒稳定的乳液粒径范围为 31.1~48.7 μm ，且随着复合颗粒中多糖比例的增加，液滴尺寸减小。当 RG 与果胶的质量比为 1:1 时，Pickering 乳液粒径最小、表面电位的绝对值最大，表明该复合颗粒形成的 Pickering 乳液液滴最均匀，这是由于颗粒在油水界面处充分吸附，其界面张力平衡值最低且 K_{diff} 最大，形成了弹性界面层，有效防止了乳液液滴的聚集^[35]。在储存长达 30 d 的过程中，RG 稳定的乳液已经完全失稳，分层，上层黄色为油相，无法测定粒径分布与液滴表面电位。当复合比例较低 (R=10:1) 时，液滴仍然稳定，没有聚集，这表明复合颗粒是出色的乳化剂。所有乳液

的 Zeta 电位值略有降低, 但无显著性差异, 表现出优异的长期稳定性。Artiga 等^[36]也研究发现在形成精油纳米乳液方面, 蛋白质 / 果胶复合物比单独的生物聚合物更有效, 在 30 d 内油滴大小可保持稳定。

3 结论

本研究利用果胶静电复合修饰米谷蛋白 RG 的方法, 制备了粒径小、表面亲水、能稳定悬浮的 RG/ 果胶复合颗粒, 改善了米谷蛋白在中性 pH 值下的聚集行为和界面特性, 其降低界面张力的能力强, 吸附速率快且形成了高弹性的界面层。米谷蛋白与果胶复合后的颗粒均能有效稳定 Pickering 乳液, 并在室温下表现出长期的稳定性。研究表明, 通过静电复合得到的具有稳定乳液性能的 RG/ 果胶颗粒, 对于拓展米谷蛋白在乳液方面的应用具有积极意义。

参考文献

- [1] GHANGHAS N, MUKILAN M T, SHARMA S, et al. Classification, composition, extraction, functional modification and application of rice (*Oryza sativa*) seed protein: A comprehensive review [J]. Food Reviews International, 2022, 38(4): 354-383.
- [2] YANG J, MENG D, WU Z, et al. Modification and solubility enhancement of rice protein and its application in food processing: A review [J]. Molecules, 2023, 28(10): 4078.
- [3] 李辉, 苏罡, 康东华. 超声波辅助提取大米蛋白工艺的研究[J]. 农业机械, 2012, 33: 67-70.
- [4] 李佳笑, 石爱民, 刘红芝, 等. 植物蛋白酸性条件下溶解性提高的改性方法及应用研究进展 [J]. 中国油脂, 2019, 44(9): 59-65.
- [5] 程云辉, 赵红清, 张丽娟. 3种物理改性方法对大米蛋白质功能性质的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(12): 6.
- [6] CHOI Y, LEE H, SONG J Y, et al. Development of polysaccharide-complexed nano-sized rice protein dispersion [J]. Food Science and Biotechnology, 2024, 33(2): 431-439.
- [7] LIN D, LU W, KELLY A L, et al. Interactions of vegetable proteins with other polymers: Structure-function relationships and applications in the food industry [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 68: 130-144.
- [8] ANTONOV Y A, ZHURAVLEVA I L, CARDINAELS R, et al. Specific effect of the linear charge density of the acid polysaccharide on thermal aggregation/disaggregation processes in complex carrageenan/lysozyme systems [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70: 8-13.
- [9] HUANG G, LIU G, XU Z, et al. Stability, rheological behavior and microstructure of Pickering emulsions co-stabilized by soy protein and carboxymethyl chitosan [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 142: 108773.
- [10] XU X, LUO L, LIU C, et al. Influence of electrostatic interactions on behavior of mixed rice glutelin and alginate systems: pH and ionic strength effects [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 301-308.
- [11] MUN S, SURH J, SHIN M. Methods to improve rice protein dispersal at moderate pH [J]. Food Science and Biotechnology, 2020, 29(10): 1401-1406.
- [12] JIANG Y, ZHU Y, LI F, et al. Gliadin/amidated pectin core-shell nanoparticles for stabilisation of Pickering emulsion [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(10): 3278-3288.
- [13] ZHAO M, XIONG W, CHEN B, et al. Enhancing the solubility and foam ability of rice glutelin by heat treatment at pH value 12: insight into protein structure [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 103: 105626.
- [14] SHEN C, CHEN W, LI C, et al. Pickering emulsion stabilized by gliadin/soybean polysaccharide composite colloidal nanoparticle: Physicochemical properties and its application on washing of fresh-cut cabbage [J]. Food Research International, 2022, 161: 111886.
- [15] JIN W, WANG Z, PENG D, et al. Effect of linear charge density of polysaccharides on interactions with α -amylase: Self-Assembling behavior and application in enzyme immobilization [J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127320.
- [16] NING F, GE Z, QIU L, et al. Double-induced se-enriched peanut protein nanoparticles preparation, characterization and stabilized food-grade pickering emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 99: 105308.
- [17] PENG D, JIN W, ARTS M, et al. Effect of CMC degree of substitution and gliadin/CMC ratio on surface rheology and foaming behavior of gliadin/CMC nanoparticles [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 107: 105955.
- [18] LAN Y, OHM J B, CHEN B, et al. Phase behavior, thermodynamic and microstructure of concentrated pea protein isolate-pectin mixture: Effect of pH, biopolymer ratio and pectin charge density [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101: 105556.
- [19] GUO Y, WU C, DU M, et al. In-situ dispersion of casein to form nanoparticles for Pickering high internal phase emulsions [J]. LWT, 2021, 139: 110538.
- [20] GUO Z, ZENG S, ZHANG Y, et al. The effects of ultra-high pressure on the structural, rheological and retrogradation properties of lotus seed starch [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 44: 285-291.
- [21] MU X, AGOSTINACCHIO F, XIANG N, et al. Recent advances in 3D printing with protein-based inks [J].

- Progress in Polymer Science, 2021, 115: 101375.
- [22] LI J, JIN W, XU W, et al. Effect of charge density of polysaccharide on self-assembly behaviors of ovalbumin and sodium alginate [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 1245-1254.
- [23] DAI L, LI R, WEI Y, et al. Fabrication of zein and rhamnolipid complex nanoparticles to enhance the stability and *in vitro* release of curcumin [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 617-628.
- [24] JIN W, ZHU J, JIANG Y, et al. Gelatin-Based nanocomplex-stabilized Pickering emulsions: Regulating droplet size and wettability through assembly with glucomannan [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(7): 1401-1409.
- [25] DICKINSON E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(6): 1473-1482.
- [26] 吴彤,冯进,黄午阳,等.牛蒡果胶多糖/玉米醇溶蛋白复合颗粒稳定的Pickering乳液构建及对姜黄素的递送功效[J].食品科学, 2023,44(14):37-46.
- [27] DICKINSON E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions [J]. Trends in Food Science & Technology, 2012, 24(1): 4-12.
- [28] SAGIS L M C, SCHOLTEN E. Complex interfaces in food: Structure and mechanical properties [J]. Trends in Food Science & Technology, 2014, 37(1): 59-71.
- [29] LI H, PAUL V D M. Sequential adsorption of whey proteins and low methoxy pectin at the oil-water interface: An interfacial rheology study [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 128: 107570.
- [30] FENG X, DAI H, MA L, et al. Properties of pickering emulsion stabilized by food-grade gelatin nanoparticles: influence of the nanoparticles concentration [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 196: 111294.
- [31] ZHU Y, GAO H, LIU W, et al. A review of the rheological properties of dilute and concentrated food emulsions [J]. Journal of Texture Studies, 2020, 51(1): 45-55.
- [32] DAI L, YANG S, WEI Y, et al. Development of stable high internal phase emulsions by pickering stabilization: Utilization of zein-propylene glycol alginate-rhamnolipid complex particles as colloidal emulsifiers [J]. Food Chemistry, 2019, 275: 246-254.
- [33] ZHANG X, LEI Y, LUO X, et al. Impact of pH on the interaction between soybean protein isolate and oxidized bacterial cellulose at oil-water interface: Dilatational rheological and emulsifying properties [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 115: 106609.
- [34] GENG X, CUI B, LI Y, et al. Preparation and characterization of ovalbumin and carboxymethyl cellulose conjugates via glycosylation [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 37: 86-92.
- [35] MENG R, WU Z, XIE Q, et al. Zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles stabilized pickering emulsions as delivery vehicles: Effect of interfacial composition on lipid oxidation and *in vitro* digestion [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106020.
- [36] ARTIGA A M, DE A M H H, ZEEB B, et al. Antimicrobial kinetics of nanoemulsions stabilized with protein: Pectin electrostatic complexes [J]. Food and Bioprocess Technology, 2020, 13: 1893-1907.