

鱼油纳米乳液运载体体系构建与稳定性研究

江连洲¹ 綦玉曼¹ 马春芳² 刘宝华¹ 王中江¹ 李 杨^{1,3}

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 山东禹王生态食业有限公司, 德州 251200;

3. 哈尔滨食品产业研究院, 哈尔滨 150028)

摘要: 以大豆蛋白-磷脂酰胆碱作为复合乳化剂, 采用高压均质技术制备鱼油纳米乳液, 研究了大豆蛋白质量分数、磷脂酰胆碱质量分数、鱼油质量分数、均质压力对鱼油纳米乳液平均粒径、PDI、 ζ -电位、浊度等性质影响, 确定了最佳制备工艺参数为: 大豆蛋白质量分数 2%, 磷脂酰胆碱质量分数 0.2%, 鱼油质量分数 1.5%, 均质压力 100 MPa, 得到鱼油纳米乳液的平均粒径为 $(245 \pm 3.1) \text{ nm}$, PDI 为 0.226 ± 0.019 , ζ -电位为 $(-30.2 \pm 0.6) \text{ mV}$, 浊度为 $(2\,413 \pm 34.7) \text{ cm}^{-1}$ 。通过超高分辨显微镜观测到鱼油被包埋于复合乳化剂中且均匀分布在乳液体系中; 通过稳定性研究发现: 大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液分别在 4℃ 和 25℃ 储存 30 d 均稳定; 对一定浓度的 Na^+ 有较好的抗性; 酸性条件不稳定, 碱性条件下稳定。

关键词: 大豆蛋白; 磷脂酰胆碱; 鱼油; 纳米乳液; 稳定性

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2018)10-0387-09

Formation and Stability of Fish Oil Enriched Biocompatible Nano-emulsion

JIANG Lianzhou¹ QI Yuman¹ MA Chunfang² LIU Baohua¹ WANG Zhongjiang¹ LI Yang^{1,3}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2. Shandong Yuwang Ecological Food Industry Co., Ltd., Dezhou 251200, China

3. Harbin Food Industry Research Institute, Harbin 150028, China)

Abstract: Soybean protein-phosphatidylcholine was used as the emulsifier to prepare fish oil nano-emulsion by high pressure homogenization technology. The effect of concentrations of soybean protein, phosphatidylcholine and fish oil, and homogenous pressure on the average particle size, PDI, ζ -potential, turbidity of fish oil nano-emulsion were studied. Results with the highest desirability (the mean droplet size was $(245 \pm 3.1) \text{ nm}$, PDI was 0.226 ± 0.019 , ζ -potential was $(-30.2 \pm 0.6) \text{ mV}$ and turbidity was $(2\,413 \pm 34.7) \text{ cm}^{-1}$ was obtained with mass ratio of soybean protein content of 2%, phosphatidylcholine content of 0.2%, fish oil content of 1.5%, and homogenization pressure of 100 MPa. Through the super high-resolution microscopy it was observed that fish oil was embedded in the composite emulsifier and evenly distributed in the emulsion system. Through the stability study of the highest desirability soybean protein-phosphatidylcholine fish oil nano-emulsion, it was found that nano-emulsion was remained stable against coalescence and phase separation for a period of 30 d (storage period) at 4℃ and 25℃, respectively. The ability of the soybean protein-phosphatidylcholine fish oil nano-emulsion was stronger than that of Tween20 fish oil nano-emulsion. The highest desirability soybean protein-phosphatidylcholine fish oil nano-emulsion had good ionic resistance ability, and the influence of Ca^{2+} on stability of nano-emulsions was greater than Na^+ . In addition, the nano-emulsion was stable under all processing conditions that encountered during food processing at pH value of 7.0 ~ 10.0. The developed fish oil nano-emulsion had potential applications in the food industry.

Key words: soybean protein; phosphatidylcholine; fish oil; nano-emulsion; stability

收稿日期: 2018-04-28 修回日期: 2018-05-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31571876, 31671807)

作者简介: 江连洲(1960—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事粮食油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: jlzname@163.com

通信作者: 李杨(1981—), 男, 教授, 博士, 主要从事粮食油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: liyanghuangyu@163.com

0 引言

鱼油是一种富含亚油酸、油酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸等多种不饱和脂肪酸的功能性油脂,具有调血脂、降低血压、健脑益智等作用,在功能性食品行业具有广阔的应用前景。然而,鱼油易氧化、水溶性差、生物利用率低限制了其应用。

已有研究表明:纳米乳液可以作为一种输送鱼油到液体食品系统中的有效形式,保护鱼油不被氧化、掩盖异味并提高生物利用度^[1-5]。在纳米乳液中常用小分子表面活性剂(如吐温^[6]、司盘^[7]等)作为乳化剂,但这种化学合成表面活性剂的使用及其吸收模式,存在一定安全性隐患,因此,研究人员开始探索使用天然生物大分子作为乳化剂,其中大豆分离蛋白(Soybean protein isolated, SPI)因其高营养价值广受消费者青睐,然而天然大豆蛋白的乳化性无法满足纳米乳液制备要求,因此必须对大豆蛋白进行适当的改性^[8]。近年来有研究表明,蛋白质与磷脂复合可改善其乳化特性。李秋慧等^[9]向大豆蛋白溶液中加入磷脂,发现大豆蛋白的乳化性显著提高。XUE 等^[10]用酪蛋白酸钠和卵磷脂混合制备的透明百里香油纳米乳液有小于 100 nm 的流体动力学直径,并且比单独酪蛋白酸钠或卵磷脂制备的纳米乳液具有更小平均粒径和更窄的粒径分布。本文应用大豆蛋白与磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine, PC)复合作为乳化剂,通过高压均质技术构建鱼油纳米乳液,以吐温 20 作为乳化剂包埋的鱼油纳米乳液为参照,评估大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液在不同温度、pH 值、盐离子浓度下的稳定性,为构建安全、绿色、低成本、高稳定性的新型纳米食品技术提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白、鱼油,山东禹王有限公司;磷脂酰胆碱,索莱宝公司;吐温、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,天津市东丽区天大化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

ULTRA-TURRAX UTL2000 型乳化机,德国 IKA 仪器设备公司;试验型高压均质机,英国 Stansted Fluid Power 公司;Nano-ZS90 型粒度分析仪,英国马尔文公司;紫外分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;DeltaVision OMX SR 型超高分辨显微镜,美国通用电气公司;PHSJ-4A 型实验室 pH 计,中国上海雷磁公司;电子分析天平(精度 0.000 1 g),北

京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液制备

将大豆蛋白和磷脂酰胆碱溶于缓冲液(pH 值 7.0、0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液)中,室温(20℃)下连续搅拌 12 h,作为水相;把鱼油按比例加到水相中,用高速分散器以 20 000 r/min 均质 5 min,形成粗乳液。将粗乳液通过高压均质机进一步均质乳化即得大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液。

参照样品吐温 20 鱼油纳米乳液的制备:将 2 g 吐温 20 溶于 98 g 蒸馏水中,室温下连续搅拌 1 h,作为水相;把鱼油按比例加到水相中,用高速分散器以 20 000 r/min 均质 5 min,形成粗乳液。将粗乳液通过高压均质机进一步均质乳化即得吐温 20 鱼油纳米乳液。

1.3.2 单因素试验

以 SPI 质量分数、磷脂酰胆碱质量分数、鱼油质量分数、均质压力为考察因素进行单因素试验,通过测定鱼油纳米乳液平均粒径、多分散性指数(Polydispersity index, PDI)、 ζ -电位、浊度确定制备大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液的最优参数。

(1) SPI 质量分数

分别将质量分数为 1%、2%、3%、4%、5% 的 SPI 和 0.2% 的磷脂酰胆碱溶于缓冲液(0.05 mol/L、pH 值 7.0 磷酸盐缓冲溶液)中,室温下连续搅拌 12 h,缓慢加入 1.5% 的鱼油,制备粗乳液。设置高压均质机均质压力为 100 MPa,均质次数为 3 次,测定制备的鱼油纳米乳液平均粒径、PDI、 ζ -电位和浊度。

(2) 磷脂酰胆碱质量分数

分别将质量分数为 2% 的 SPI 和 0.2%、0.4%、0.6%、1% 的磷脂酰胆碱溶于缓冲液(0.05 mol/L、pH 值 7.0 磷酸盐缓冲溶液)中,室温下连续搅拌 12 h,缓慢加入 1.5% 的鱼油,制备粗乳液。设置高压均质机均质压力为 100 MPa,均质次数为 3 次,测定制备的鱼油纳米乳液平均粒径、PDI、 ζ -电位和浊度。

(3) 鱼油质量分数

将质量分数为 2% 的 SPI 和 0.2% 的磷脂酰胆碱溶于缓冲液(0.05 mol/L、pH 值 7.0 磷酸盐缓冲溶液)中,室温下连续搅拌 12 h,缓慢加入 0.5%、1%、1.5%、2%、3% 的鱼油,制备粗乳液。设置高压均质机均质压力为 100 MPa,均质次数为 3 次,测定制备的鱼油纳米乳液平均粒径、PDI、 ζ -电位、浊度。

(4) 均质压力

将质量分数为 2% 的 SPI 和 0.2% 的磷脂酰胆碱溶于缓冲液(0.05 mol/L、pH 值 7.0 磷酸盐缓冲溶液)中,室温下连续搅拌 12 h,缓慢加入 1.5% 的

鱼油,制备粗乳液。设置均质压力分别为 60、80、100、120、140 MPa,均质 3 次,测定制备的鱼油纳米乳液平均粒径、PDI、 ζ -电位和浊度。

1.3.3 鱼油纳米乳液平均粒径、PDI 及 ζ -电位测定

用 Zetasizer Nano-ZS 90 型光散射粒度分析仪分别测定上述鱼油纳米乳液平均粒径、粒径分布及 ζ -电位变化,鱼油油滴的折射率设置为 1.45,水相溶液折射率设置为 1.33。为降低多重光散射效应,分析前用 pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液稀释鱼油乳液 1 000 倍测平均粒径及 PDI,稀释 100 倍测 ζ -电位。

1.3.4 鱼油纳米乳液浊度测定

将鱼油纳米乳液用磷酸盐缓冲液溶液稀释 40 倍,以磷酸盐缓冲液为空白对照,用紫外分光光度计测定 600 nm 处的吸光度,浊度计算公式为

$$T = 1.3024V/I$$

式中 A ——稀释乳液在 600 nm 处的吸光度

V ——稀释倍数

I ——光程差,取 1 cm

1.3.5 微观观测

鱼油纳米乳液超高分辨显微镜的检测参照 PUPPO 等^[11]的方法。大豆蛋白经尼罗蓝染液染色后呈现红色荧光,鱼油经脂溶性荧光探针尼罗红染色后呈现绿色荧光。分别将 0.001 g/mL 尼罗红和 0.01 g/mL 尼罗蓝溶解在异丙醇中,漩涡混合 30 s 后对鱼油纳米乳液染色 30 min。染色结束后取 5 μ L 乳液于载玻片上,采用超高分辨显微镜观测鱼油纳米乳液的显微结构。

1.3.6 乳液稳定性

(1) 储藏稳定性

将最优条件制备的大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液和吐温 20 鱼油纳米乳液分别于 4、25、50℃ 密封储藏 30 d,每隔 5 d 取样,测乳液的平均粒径、 ζ -电位。

(2) 盐离子浓度稳定性

参照陈冬等^[12]的方法配置 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液和 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mol/L 的 CaCl₂ 溶液。用不同浓度的 NaCl 溶液和 CaCl₂ 溶液将最优条件制备的大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液和吐温 20 鱼油纳米乳液稀释为原体积的 2 倍,静置 2 h 后,测定乳液平均粒径和 ζ -电位。

(3) pH 值稳定性

参照陈冬等^[12]的方法用 0.1 mol/L 的 HCl 和 0.1 mol/L 的 NaOH 调节最优条件制备的大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液和吐温 20 鱼油纳米乳液 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,静置 2 h 后,测定乳液的平均粒径和 ζ -电位。

1.3.7 数据统计

数据均平行测定 3 次取平均值,用 SPSS Statistics 22 对数据进行 ANOVA 差异显著性分析, $p < 0.05$ 为显著性差异,用 Origin 9.0 制图。

2 结果与分析

在高压均质、超声、微射流等高能法制备纳米乳液的过程中,纳米乳液的性质主要受乳化剂浓度、油相浓度以及投入的机械能强度和持续时间的影响^[13]。因此,本研究主要讨论 SPI 质量分数、磷脂酰胆碱质量分数、鱼油质量分数及均质压力对鱼油纳米乳液性质的影响。

2.1 SPI 质量分数

纳米乳液是指含有平均粒径小于 500 nm 的小油滴胶态分散体,平均粒径是衡量乳液是否为纳米乳液的关键指标,PDI 表征分散体系中粒径分布情况,PDI 值越小,说明乳液体系中粒径分布范围越小,液滴分散性越好,体系越稳定^[14]。由图 1a(图中不同小写字母表示差异显著,下同)可知,随着 SPI 质量分数从 1% 增加到 2%,平均粒径和 PDI 显著下降($p < 0.05$),粒径分布图从多峰变成单峰。这可能是因为 1% 的 SPI 不足以覆盖油滴表面,未被乳化剂包被的油滴发生聚集产生大粒径的液滴。随着 SPI 质量分数的增加实现了对油滴表面的更大覆盖,从而防止聚集^[15],在 SPI 质量分数为 2% 时平均粒径最小。当 SPI 质量分数继续增加,纳米乳液的平均粒径增加,PDI 值变化不显著($p > 0.05$),根据排斥絮凝理论,当 SPI 质量分数过大时,连续相中未被吸附的蛋白分子因渗透聚集作用造成液滴絮凝,导致蛋白分子链随絮凝乳滴排斥^[16]。HEBISHY 等^[17]研究了乳清蛋白浓度对其稳定的纳米乳液粒径的影响与本研究结果相似。

水包油型乳状液的稳定性与 ζ -电位绝对值有关, ζ -电位绝对值越大,乳液越趋于稳定^[18]。SPI 和磷脂酰胆碱在 pH 值为 7.0 时表面均带负电荷,因此乳液表面 ζ -电位为负值。SPI 质量分数对鱼油纳米乳液 ζ -电位影响不显著($p > 0.05$)。乳液的浊度也可以表现乳液的稳定性,随着 SPI 质量分数从 1% 增加到 2%,浊度降低,有研究表明当油相体积分数固定,乳液粒径是影响浊度的主要因素,二者呈正相关,乳滴平均粒径越大,体系浊度越高,浊度与粒径变化结果保持一致^[19]。当 SPI 质量分数超过 2%,浊度随 SPI 质量分数的增加而增加,可能由油滴界面蛋白达到饱和,连续相中未被吸附蛋白含量增加所导致的。

根据 SPI 质量分数对鱼油纳米乳液的平均粒

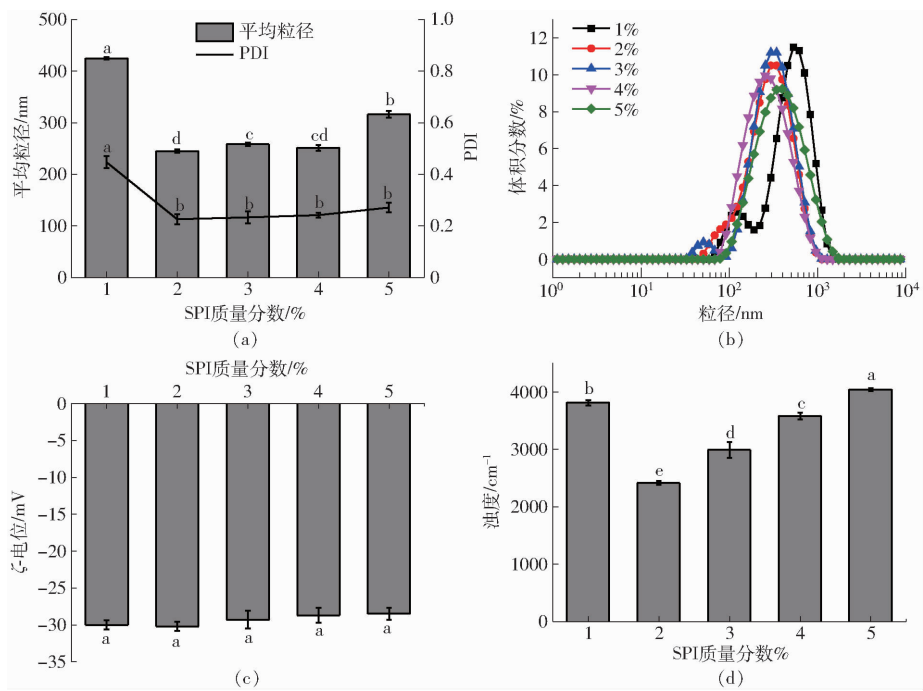


图 1 SPI 质量分数对鱼油纳米乳液平均粒径、PDI、粒径分布、 ζ -电位和浊度的影响

Fig.1 Effects of SPI concentrations on mean particle size and PDI, size distribution, ζ -potential and turbidity of fish oil nano-emulsions

径、PDI、粒径分布、 ζ -电位和浊度的影响可以得出，构建大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液最适 SPI 质量分数为 2%。

2.2 磷脂酰胆碱质量分数

小分子表面活性剂和蛋白质可以通过分子间相互作用在 O/W 界面共存，改变油滴表面吸附层的结构和保护膜的厚度。表面活性剂的添加不仅可以

降低界面张力，还可以防止聚结，从而提高蛋白质稳定的 O/W 乳液的稳定性^[20]。由图 2a、2b 可以看出，磷脂酰胆碱的加入显著降低了大豆蛋白纳米乳液的平均粒径，粒径分布的峰向粒径小的方向移动，呈“高瘦”峰型，这是由于磷脂酰胆碱的亲水基团——甘油磷酸酯基朝向水面排列，降低了油水界面的张力。继续增加磷脂酰胆碱的含量，纳米乳液

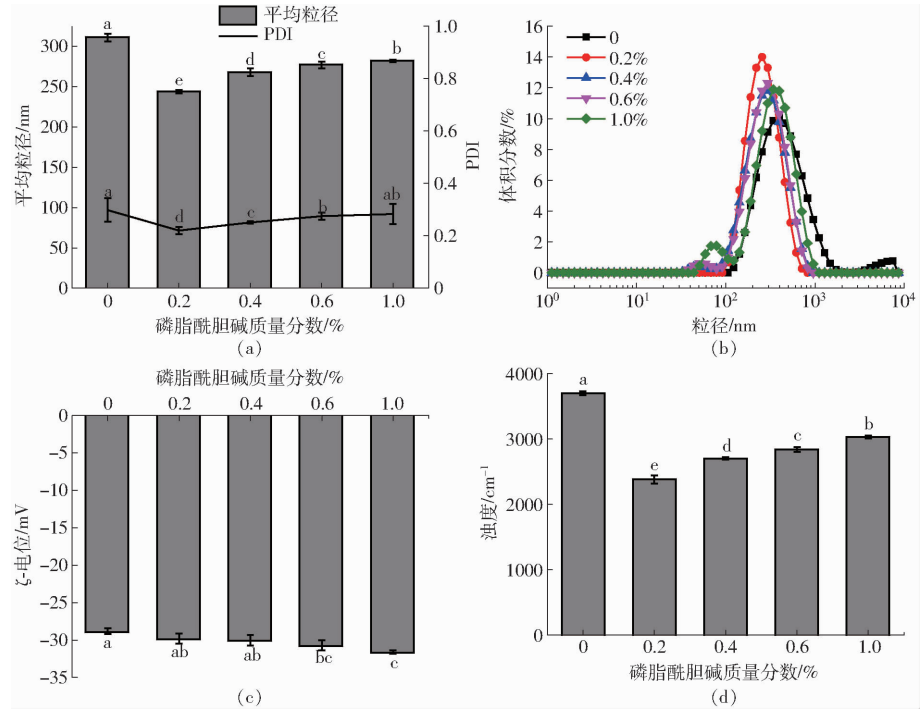


图 2 磷脂酰胆碱质量分数对鱼油纳米乳液平均粒径、PDI、粒径分布、 ζ -电位和浊度的影响

Fig.2 Effects of phosphatidylcholine concentrations on mean particle size and PDI, size distributions, ζ -potential and turbidity of fish oil nano-emulsions

平均粒径、PDI 值增加,粒径分布图呈“双峰”峰型,说明磷脂酰胆碱加入过量,形成部分小粒径纳米乳滴,不利于乳液的稳定。浊度结果与粒径结果一致。随着磷脂酰胆碱质量分数的增加,纳米乳液 ζ -电位绝对值逐渐增加,部分研究指出这可能是由于磷脂酰胆碱与蛋白的交互作用改变了蛋白表面的电荷分布。GARCÍA MORENO 等^[21]报道了酪蛋白酸钠-大豆磷脂复合物的形成产生有利的界面层结构,从而改善了乳液的物理稳定性。然而,当蛋白质稳定的乳液中存在高浓度的表面活性剂时,表面活性剂分子凭借其较强乳化能力在油滴表面迅速展开,并部分渗入蛋白质网络,通过在 O/W 界面处的竞争性吸附逐渐取代蛋白质,从而导致蛋白质组成的乳化层瓦解,乳液稳定性降低^[20,22]。综上,构建大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液所需最适磷脂酰胆碱质量分数为 0.2%。

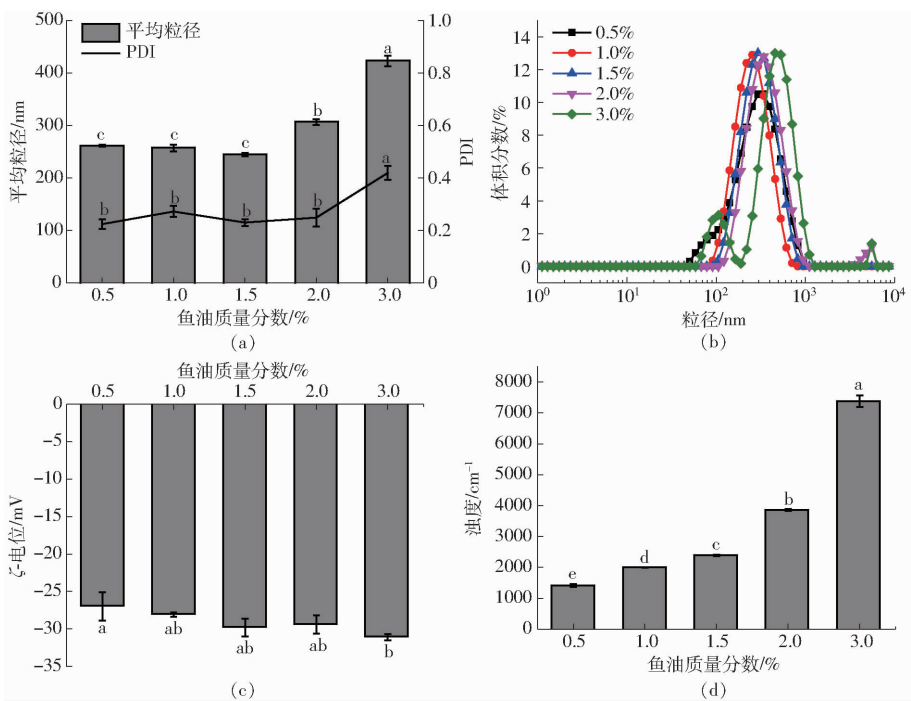


图 3 鱼油质量分数对鱼油纳米乳液平均粒径、PDI、粒径分布、 ζ -电位和浊度的影响

Fig. 3 Effects of fish oil concentrations on mean particle size and PDI, size distribution, ζ -potential and turbidity of fish oil nano-emulsions

加显著增加($p < 0.05$)。在确保纳米乳液稳定性的条件下,选择鱼油质量分数为 1.5%。

2.4 均质压力

图 4a、4b 显示了均质压力对纳米乳液粒径的影响。将压力从 0 MPa 增加到 100 MPa,乳液平均粒径显著降低($p < 0.05$)。在未高压均质的条件下,乳液的平均粒径大于 1 000 nm,未能形成纳米乳液。在 60 ~ 140 MPa 的压力下,乳液平均粒径小于 500 nm。因此,经过高压均质处理后,大豆蛋白-磷脂酰胆碱复合乳化剂可用于制备纳米乳液。纳

2.3 鱼油质量分数

鱼油质量分数对大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液平均粒径和粒径分布的影响如图 3a、3b 所示。当鱼油质量分数从 1% 增加到 1.5% 时,纳米乳液的平均粒径、PDI 值减小。然而,将鱼油质量分数从 1.5% 增加到 3% 导致平均粒径和 PDI 值的显著增加($p < 0.05$),粒径分布范围增大。纳米乳液粒径的减小可归因于未吸附的蛋白质含量降低,随后鱼油质量分数增加,导致液滴聚集减少。由于在鱼油浓度增加时可用于覆盖油滴的蛋白质分子量不足,导致纳米乳液的粒径可能增加,鱼油粘附在乳液液滴表面,导致液滴黏连,增强了液滴聚集。由图 3c 可知 ζ -电位随鱼油质量分数的增加变化不显著,无统计学意义,这一结果与 MA 等^[23]的研究相似,认为姜黄素纳米乳液的 ζ -电位与油相浓度没有很好的相关性。纳米乳液的浊度随鱼油质量分数增

米乳液的粒径随着压力从 60 MPa 增加到 100 MPa 而下降。泰勒公式可以解释粒径随着均质压力增加而减小的情况,该公式表明随着与压力相关的剪切速率的增加,粒度减小,压力越高,剪切速率越大,这将最终导致粒度的减小^[24]。随着压力进一步增加至 140 MPa,纳米乳液的平均粒径变化不显著,但是通过粒径分布(图 4b)可以看到在大于 1 000 nm 处有粒径新峰出现,可能是因为均质压力过大导致蛋白变性,乳液不稳定发生聚集,这一结果与 FERNANDEZ-AVILA 等^[25]研究的均质压力

对大豆分离蛋白稳定乳液粒径的影响类似。 ζ -电位绝对值变化不显著,浊度随均质压力的增加先显著降低后变化不显著,与粒径结果一致。综上,为

减少生产消耗并保证纳米乳液质量,选择 100 MPa 作为制备大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液的均质压力。

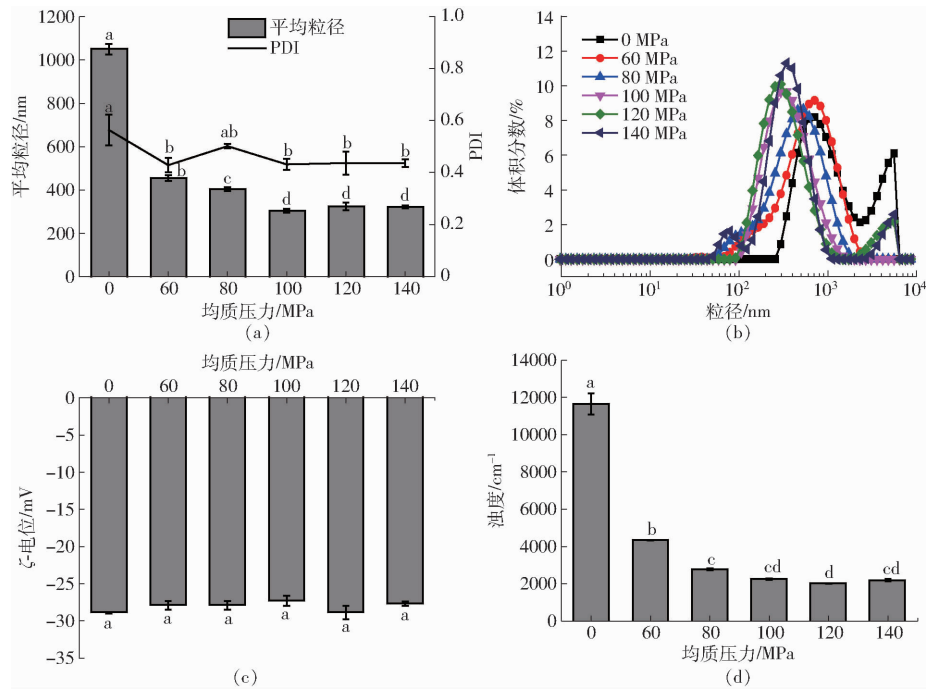


图 4 均质压力对鱼油纳米乳液平均粒径、PDI、粒径分布、 ζ -电位和浊度的影响
Fig.4 Effects of homogenizing pressures on mean particle size and PDI, size distribution, ζ -potential and turbidity of fish oil nano-emulsions

基于上述单因素试验的结果,确定了制备大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液的最优参数:大豆 SPI 质量分数 2%,磷脂酰胆碱质量分数 0.2%,鱼油质量分数 1.5%,均质压力 100 MPa,在此条件下制备的纳米乳液的平均粒径为 $(245 \pm 3.1) \text{ nm}$,PDI 为 0.226 ± 0.019 , ζ -电位为 $(-30.2 \pm 0.6) \text{ mV}$,浊度为 $(2413 \pm 34.7) \text{ cm}^{-1}$,接下来对其进行微观观测和稳定性研究。

2.5 鱼油纳米乳液的微观观测

超高分辨显微镜用于观测大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液的乳滴分布及微观结构情况。由图 5 可清晰看到,油滴呈球形均匀分散在连续相中,大豆蛋白沿着油滴周围的油-水界面排列形成薄膜,虽然有的只能看到绿色的油滴可能是因为蛋白形成的界面膜太薄,蛋白信号弱被油滴信号

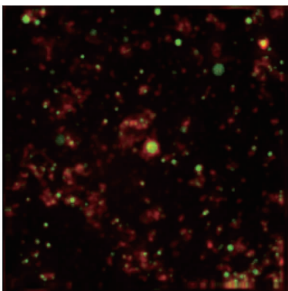


图 5 鱼油纳米乳液的微观结构

Fig.5 Microstructures of fish oil nano-emulsions

掩盖了。

2.6 鱼油纳米乳液的稳定性

大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液在生产应用过程中难免会受外界环境的影响,因此研究了储存温度、pH 值、盐离子浓度对大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液稳定性的影响。

2.6.1 储存温度

吐温鱼油纳米乳液在 25℃ 及以上温度储存 20 d 后乳液平均粒径显著增加 ($p < 0.05$),这种效应可归因于在油-水界面处单层吐温 20 的亲水基团聚氧乙烯的热脱水,胶体结构发生变形聚集^[26]。最佳条件制备的大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液只有在 50℃,超过 20 d 后才显示出不稳定的迹象。对于所有其他储存条件下的样品和初始样品(0 d)对照 30 d 内平均粒径(图 6)均未观察到显著差异 ($p > 0.05$); ζ -电位与初始样品无差异 ($p > 0.05$,图未给出),说明纳米乳液的稳定性较好。纳米乳液不稳定的主要原因是奥氏熟化,由于分散相在连续相中的溶解,小液滴逐渐消融,大液滴逐渐增大,乳液体系向着自由能降低的方向演变^[27]。奥氏熟化速率可以通过使用液滴半径的立方与时间的线性回归来计算,其中当 R^2 大于 0.8 时,表明奥氏熟化导致了纳米乳液不稳定^[28]。储存在 50℃ 的鱼油纳米

乳液的 R^2 为 0.94, 因此可认为是奥氏熟化导致的鱼油纳米乳液不稳定。其他导致平均液滴尺寸增大的原因可能是絮凝和聚结^[29]。

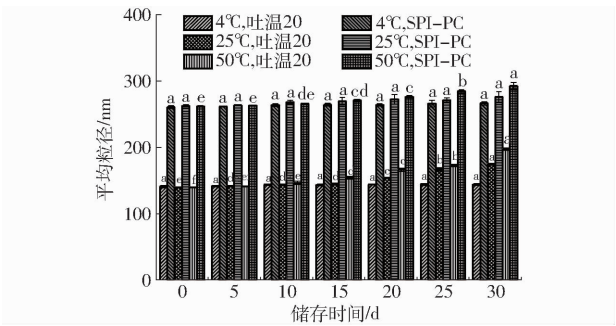


图 6 储存温度对鱼油纳米乳液平均粒径的影响
Fig. 6 Mean particle size of fish oil nano-emulsion under different storage temperature conditions

2.6.2 盐离子浓度

盐是常见的食品添加剂, 也存在于人体胃肠道中, 可能会影响产品中或摄入后胶态递送系统的功能性。鉴于此, 本研究以吐温为参照, 考察了 Na^+ 浓度 ($0.1 \sim 0.5 \text{ mol/L NaCl}$) 和 Ca^{2+} 离子浓度 ($0.01 \sim 0.05 \text{ mol/L CaCl}_2$) 对鱼油纳米乳液稳定性的影响。 Na^+ 、 Ca^{2+} 的加入不会引起吐温稳定的鱼油纳米乳液平均粒径的显著变化, 但 ζ -电位的绝对值逐渐降低 (图 7b)。 Na^+ 浓度对大豆蛋白-磷脂酰胆碱稳定的鱼油纳米乳液平均粒径和 ζ -电位影响不大

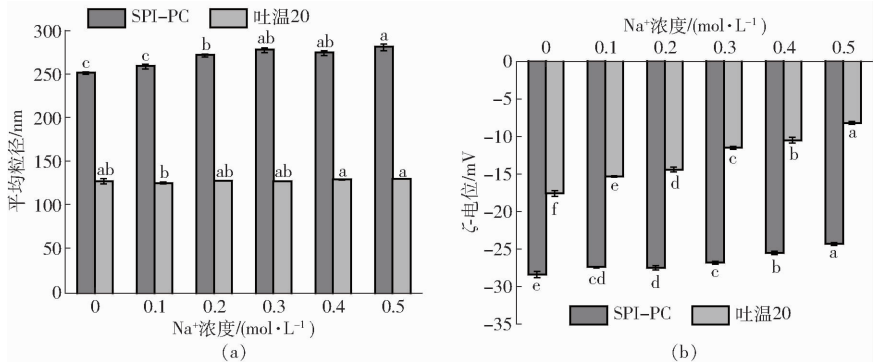


图 7 Na^+ 浓度对鱼油纳米乳液平均粒径和 ζ -电位的影响

Fig. 7 Effect of Na^+ concentration on mean particle size and ζ -potential of fish oil nano-emulsion

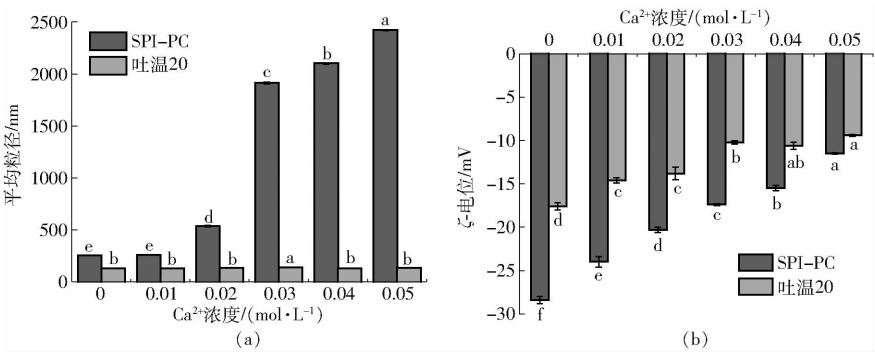


图 8 Ca^{2+} 浓度对鱼油纳米乳液平均粒径和 ζ -电位的影响

Fig. 8 Effect of Ca^{2+} concentration on mean particle size and ζ -potential of fish oil nano-emulsion

(图 7), 可能是由于大豆蛋白与磷脂酰胆碱的复合在液滴表面产生更大的电荷密度, 被静电吸引吸附到蛋白质分子上的 Na^+ 会显著增加吸附在油滴表面上的蛋白质分子的数量^[30]。这可以认为在纳米乳液中的液滴之间产生大量的静电排斥力以避免 Na^+ 的电荷中和作用^[31]。

随着 Ca^{2+} 的加入, 大豆蛋白-磷脂酰胆碱稳定的鱼油纳米乳液平均粒径增大 (图 8a), 尤其是当浓度达到 0.03 mol/L , 粒径急剧增加, ζ -电位绝对值减小 (图 8b)。这可能是由于静电斥力是维持大豆蛋白-磷脂酰胆碱纳米乳液的主要作用力, 在相对较低的盐浓度下, 静电斥力仍然足够强, 以克服弱范德华力和疏水吸引力, 但是在临界盐浓度以上时, 其不够强以致吸引力占优势, 导致液滴聚集^[32]。

Ca^{2+} 对鱼油纳米乳液 ζ -电位的影响大于 Na^+ , 在 Ca^{2+} 作用下, 纳米乳液 ζ -电位变化绝对值为 16.9 mV , Na^+ 作用下, 纳米乳液的 ζ -电位变化绝对值为 4.1 mV 。这是因为多化合价的离子 (Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+}) 比单化合价离子 (Na^+ 、 Cl^- 、 K^+) 产生的静电屏蔽更强, 在低浓度时可屏蔽的电荷数比单化合价离子多^[12]。李冉等^[33] 也发现乳液对 Na^+ 的承受浓度要远高于 Ca^{2+} 的浓度, 二价阳离子对乳液稳定性的影响要显著高于一价阳离子。因此, 大豆蛋白-磷脂酰胆碱纳米乳液可以抵抗一定浓度的 Na^+

强度的影响而稳定存在, Ca^{2+} 浓度变化对纳米乳液稳定性的影响较大。

2.6.3 pH 值

pH 值会影响大豆蛋白的电离程度和乳化性, 从而影响纳米乳液的稳定性。由图 9 可以看出, pH 值对吐温稳定的鱼油纳米乳液的平均粒径影响不大(图 9a), 但随着 pH 值的降低 ζ -电位的绝对值逐渐减小(图 9b), 这可能是由于在低 pH 值下脂肪酸以质子化形式存在, 液滴表面上的负电荷减少^[34]。大豆蛋白-磷脂酰胆碱稳定的鱼油纳米乳液平均粒径在 pH 值 3.0 ~ 6.0 范围内均较大, pH 值 8.0 ~ 10.0

与 pH 值 7.0 相比变化不显著(图 9a, $p > 0.05$), 说明大豆蛋白-磷脂酰胆碱稳定的鱼油纳米乳液在酸性条件下不稳定发生絮凝聚集并且在碱性条件下稳定(没有相分离或聚集)。大豆蛋白-磷脂酰胆碱稳定的鱼油纳米乳液的 ζ -电位随着 pH 值的减小而增加, 当 pH 值为 3.0、4.0 时, ζ -电位为正值(图 9b)。由此可知: 液滴絮凝主要是由于 pH 值接近蛋白质的等电点(4.6), 液滴之间的静电排斥降低, 这促进了大豆蛋白-大豆蛋白和大豆蛋白-磷脂酰胆碱相互作用引起的颗粒聚集。虽然磷脂酰胆碱的乳化性受 pH 值影响小, 但其含量少不能抵制乳液在等电点附近的聚集。

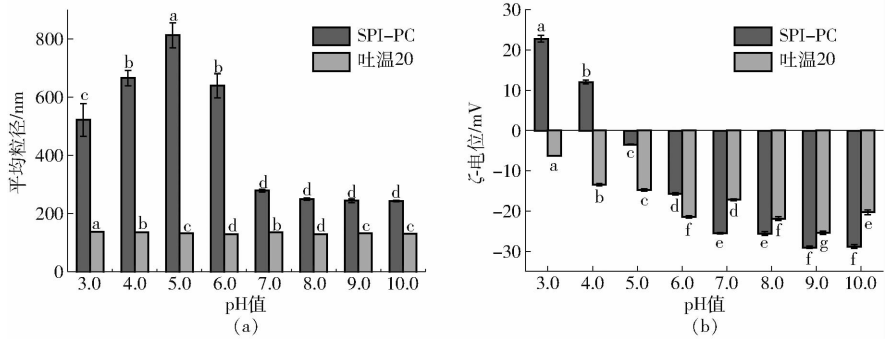


图 9 pH 值对鱼油纳米乳液平均粒径和 ζ -电位的影响

Fig. 9 Effect of pH value on mean particle size and ζ -potential of fish oil nano-emulsion

3 结束语

以大豆蛋白-磷脂酰胆碱作为复合乳化剂, 运用高压均质制备鱼油纳米乳液最佳制备工艺参数为: 大豆 SPI 质量分数为 2%, 磷脂酰胆碱质量分数为 0.2%, 鱼油质量分数为 1.5%, 均质压力为 100 MPa, 得到鱼油纳米乳液平均粒径为 (245 ± 3.1) nm, PDI 为 0.226 ± 0.019 , ζ -电位为 (-30.2 ± 0.6) mV, 浊度

为 (2413 ± 34.7) cm^{-1} 。超高分辨显微镜结果表明, 鱼油能够被大豆蛋白-磷脂酰胆碱包埋且均匀分布在乳液体系中; 通过稳定性研究发现: 大豆蛋白-磷脂酰胆碱鱼油纳米乳液分别在 4℃ 和 25℃ 储存 30 d 均稳定, 比吐温 20 鱼油纳米乳液储存稳定性好; 对一定浓度的 Na^+ 有较好的抗性, Ca^{2+} 浓度变化对纳米乳液稳定性的影响较大; 碱性条件稳定, 为鱼油在食品行业的应用提供了理论依据。

参 考 文 献

1 SILVA H D, CERQUEIRA M Â, VICENTE A A. Nanoemulsions for food applications: development and characterization[J]. Food & Bioprocess Technology, 2012, 5(3):854-867.

2 TIWARI S B, AMIJI M M. Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations[J]. Journal of Nanoscience & Nanotechnology, 2006, 6(9-10):3215-3221.

3 DEY T K, GHOSH S, GHOSH M, et al. Comparative study of gastrointestinal absorption of EPA & DHA rich fish oil from nano and conventional emulsion formulation in rats[J]. Food Research International, 2012, 49(1):72-79.

4 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.

5 MCCLEMENTS D J. Food emulsions: principles, practices, and techniques[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2004, 36(2):223-224.

6 何君, 姚晓玲, 冯桂仁, 等. 胡柚精油纳米乳的制备及品质评价[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(1):3-6.

HE Jun, YAO Xiaoling, FENG Guiren, et al. Preparations of the nano-emulsion grapefruit essential oil and its quality evaluation [J]. Food Research and Development, 2015, 36(1):3-6. (in Chinese)

7 季方圆, 何艳琳, 隋箐, 等. 深海鱼油纳米乳制备方法研究[J]. 中国油脂, 2018(3):75-78.

JI Fangyuan, HE Yanlin, SUI Qing, et al. Preparation of deep sea fish oil nanoemulsion[J]. China Oils and Fats, 2018(3):75-78. (in Chinese)

8 NISHINARI K, FANG Y, GUO S, et al. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39(2):301-318.

9 李秋慧, 齐宝坤, 隋晓楠, 等. 大豆分离蛋白-磷脂复合乳化体系乳化及氧化稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2016, 16(5):46-52.

- LI Qiuhui, QI Baokun, SUI Xiaonan, et al. Study on emulsification and oxidative stability of soy protein isolate-phospholipid complex emulsification system[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(5):46–52. (in Chinese)
- 10 XUE J, ZHONG Q. Thyme oil nanoemulsions coemulsified by sodium caseinate and lecithin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(40): 9900–9907.
- 11 PUPPO M C, BEAUMAL V, CHAPLEAU N, et al. Physicochemical and rheological properties of soybean protein emulsions processed with a combined temperature/high-pressure treatment[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(6): 1079–1089.
- 12 陈冬, 张晓阳, 刘尧政, 等. 姜油纳米乳液超声波乳化制备工艺及其稳定性研究[J/OL]. 农业机械学报, 2016, 47(6): 250–258. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20160633&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2016.06.033.
- CHEN Dong, ZHANG Xiaoyang, LIU Yaozheng, et al. Study on preparation and stability of ginger oil nano-emulsions[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2016, 47(6):250–258. (in Chinese)
- 13 QIAN C, MCCLEMENTS D J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5):1000–1008.
- 14 PRIMOZIC M, DUCHEK A, NICKERSON M, et al. Effect of lentil proteins isolate concentration on the formation, stability and rheological behavior of oil-in-water nanoemulsions[J]. Food Chemistry, 2017, 237: 65–74.
- 15 LI M, MA Y, CUI J. Whey-protein-stabilized nanoemulsions as a potential delivery system for water-insoluble curcumin[J]. LWT—Food Science and Technology, 2014, 59(1):49–58.
- 16 BOUYER E, MEKHLOUFI G, ROSILIO V, et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2012, 436(1–2): 359–378.
- 17 HEBISHY E, BUFFA M, GUAMIS B, et al. Physical and oxidative stability of whey protein oil-in-water emulsions produced by conventional and ultra high-pressure homogenization: effects of pressure and protein concentration on emulsion characteristics[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 32:79–90.
- 18 徐明进, 李明远, 彭勃, 等. Zeta 电位和界面膜强度对水包油乳状液稳定性影响[J]. 应用化学, 2007, 24: 623–627.
- XU Mingjin, LI Mingyuan, PENG Bo, et al. Effect of Zeta potential and interfacial film strength on the stability of oil-in-water emulsion[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2007, 24:623–627. (in Chinese)
- 19 姚艳玉, 马培华, 曾庆晗, 等. 油相种类对姜黄素纳米乳液稳定性的影响[J]. 食品科技, 2017(9):238–242.
- YAO Yanyu, MA Peihua, ZENG Qinghan, et al. Effect of oil phases on the stability of curcumin nanoemulsion[J]. Food Science and Technology, 2017(9):238–242. (in Chinese)
- 20 WANG S, SHI Y, TU Z, et al. Influence of soy lecithin concentration on the physical properties of whey protein isolate-stabilized emulsion and microcapsule formation[J]. Journal of Food Engineering, 2017, 207: 73–80.
- 21 GARCÍAMORENO P J, HORN A F, JACOBSEN C. Influence of casein-phospholipid combinations as emulsifier on the physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(5): 1142–1152.
- 22 MATSUMIYA K, TAKAHASHI Y, NAKANISHI K, et al. Diglycerol esters of fatty acids promote severe coalescence between protein-stabilized oil droplets by emulsifier-protein competitive interactions[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 42:397–402.
- 23 MA P, ZENG Q, TAI K, et al. Preparation of curcumin-loaded emulsion using high pressure homogenization: impact of oil phase and concentration on physicochemical stability[J]. LWT—Food Science and Technology, 2017, 84: 34–46.
- 24 MASON G, WILKING J N, MELESON K, et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties[J]. Journal of Physics Condensed Matter, 2006, 18(41):R635.
- 25 FERNANDEZ-AVILA C, TRUJILLO A J. Ultra-High pressure homogenization improves oxidative stability and interfacial properties of soy protein isolate-stabilized emulsions[J]. Food Chemistry, 2016, 209:104–113.
- 26 DEY T K, BANERJEE P, CHATTERJEE R, et al. Designing of ω -3 PUFA enriched biocompatible nanoemulsion with sesame protein isolate as a natural surfactant: focus on enhanced shelf-life stability and biocompatibility[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2018, 538: 36–44.
- 27 买尔哈巴·塔西帕拉提, 阙雯, 张辉. 可食用纳米乳液的研究进展[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1):213–223.
- MAIERHABA·Taxipalati, QUE Fei, ZHANG Hui. Research progress of edible nanoemulsion [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(1):213–223. (in Chinese)
- 28 BERNARDI D S, PEREIRA T A, MACIEL N R, et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2014, 28(4):44–67.
- 29 GALVÃO K C S, VICENTE A A, SOBRAL P J A. Development, characterization, and stability of O/W pepper nanoemulsions produced by high-pressure homogenization[J]. Food & Bioprocess Technology, 2018, 11(2):355–367.
- 30 XU J, MUKHERJEE D, CHANG S. Physicochemical properties and storage stability of soybean protein nanoemulsions prepared by ultra-high pressure homogenization[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 1005–1013.
- 31 SHARMA M, MANN B, SHARMA R, et al. Sodium caseinate stabilized clove oil nanoemulsion: physicochemical properties[J]. Journal of Food Engineering, 2017, 212: 38–46.
- 32 SARI T P, MANN B, KUMAR R, et al. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43:540–546.
- 33 李冉, 白婧, 冷小京, 等. 花生油乳液稳定特性研究[J]. 中国奶牛, 2009(7):39–42.
- LI Ran, BAI Jing, LENG Xiaojing, et al. The stability characteristics of peanut oil emulsion[J]. China Dairy Cattle, 2009(7): 39–42. (in Chinese)
- 34 RAO J, DAVIDJULIAN M C. Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(6):1413–1423.