doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2021.10.044

Pickering 高内相乳液制备及其稳定性与消化特性研究

江连洲[1,2]　孙远达[1]　钟明明[1]　赵晓明[1]　谢凤英[1]　齐宝坤[1]
(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省绿色食品科学研究院, 哈尔滨 150000)

摘要: 利用大豆球蛋白(11S)和 β-伴大豆球蛋白(7S)在酸性条件下制备 Pickering 高内相乳液,通过粒径、ζ-电位、傅里叶红外光谱(FITR)、冷冻扫描电镜、乳化性和流变学等研究其稳定性,并探讨其消化特性。结果表明:在 pH 值 2.0 时,7S 和 11S 形成的乳液均具有较高的乳化活性和乳化稳定性,11S 比 7S 具有更高乳化性能。当蛋白质量浓度为 0.015 g/mL,油相体积分数为 78% ~82% 时,可以形成稳定的高内相乳液。通过增加内相体积分数,7S 和 11S 蛋白颗粒稳定的 Pickering 乳液体系分布更加均匀,不易发生聚集,并且可以形成较强的凝胶网络结构。模拟体外消化实验表明,在酸性条件下,蛋白形成的高内相乳液可以不同程度地延迟脂质的释放。本研究明晰了在酸性条件下 7S 和 11S 的结构特性以及 7S 和 11S 高内相乳液在胃肠道中的消化行为,可为食品功能性成分递送体系研究提供理论支撑。

关键词: β-伴大豆球蛋白; 大豆球蛋白; Pickering 高内相乳液; 稳定性; 消化特性
中图分类号: TS214.2　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-1298(2021)10-0417-08　　**OSID**:

Stability and Digestion Characteristics of Pickering High Internal Phase Emulsion Formed by 7S and 11S

JIANG Lianzhou[1,2]　SUN Yuanda[1]　ZHONG Mingming[1]　ZHAO Xiaoming[1]　XIE Fengying[1]　QI Baokun[1]
(1. *College of Food Science*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*
2. *Heilongjiang Institute of Green Food Science*, *Harbin* 150000, *China*)

Abstract: Pickering high internal phase emulsion was prepared by using soybean globulin (11S) and soy β-conglycinin (7S) under acidic conditions. The stability of the emulsion was studied by particle size, potential, Fourier transform infrared spectroscopy (FITR), freeze scanning electron microscopy, optical microscopy and rheology, and its digestion characteristics were also discussed. The results showed that when pH value was 2.0, the emulsion formed by 7S and 11S had higher emulsifying activity and emulsifying stability, and 11S had higher hydrophobicity and emulsifying property than 7S. When the protein concentration was 0.015 g/mL and the volume fraction of oil phase was 78% ~82%, stable high internal phase emulsion can be formed. By increasing the volume fraction of the internal phase, the emulsion system with stable 7S and 11S protein particles distributed more evenly and was not easy to aggregate, which enhanced the formation of gel network. Compared with 7S stabilized Pickering high internal phase emulsion, 11S formed a stronger gel network structure with stronger gel strength and more stable emulsion system. Simulated in vitro digestion experiments showed that under acidic conditions, the particle size and potential value of the emulsion were lower, and the fat release was less. The high internal phase emulsion formed by the protein could delay the release of lipid to varying degrees. The research result clearly identified the structural characteristics of 7S and 11S under acidic conditions and the digestive behavior of stable high internal phase emulsions in gastrointestinal tract, and provided theoretical support for the research and development of food functional ingredient delivery system.

Key words: soy β-conglycinin; soy globulin; Pickering high internal phase emulsion; stability; digestive characteristics

收稿日期: 2021-03-23　修回日期: 2021-04-27
基金项目: 黑龙江省百千万工程重大专项(2019ZX08B01-03)和山东省重点研发计划项目(2019JZZY010722)
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: jlz@neau.edu.cn
通信作者: 齐宝坤(1986—),男,副教授,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: qibaokun22@163.com

0 引言

加工食品中的大多数反式脂肪均来自部分氢化油(PHOs),PHOs 的有效替代方法是构建 Pickering 高内相乳液[1]。高内相乳液也称为高浓缩乳液,它是两相系统,要求内相体积分数超过 74%。常规的高内相乳液由小分子量表面活性剂及固体胶体颗粒来稳定,与传统的表面活性剂相比,Pickering 高内相乳液具有许多优点,例如,乳化剂的添加量更少,抗聚结且储藏稳定性更高,不易受环境问题影响。已有研究证明几种食品级胶体颗粒适用于 Pickering 高内相乳液的构建,例如:乳清蛋白微凝胶[2]、纤维素纳米晶体[3]、淀粉纳米晶体[4]、二氧化硅[5]等,但由于润湿性能差和化学残留物量大,其中一些不适合在食品工业中广泛应用。相反,基于蛋白质的(纳米)颗粒似乎更有望作为高内相乳液的乳化剂。

7S 和 11S 是大豆分离蛋白中最常见的两种储存蛋白,其亚基在天然状态下均有高度的结构完整性和强大的分子内相互作用[6],因此它们是制备 Pickering 高内相乳液的理想原料。目前对 7S 和 11S 蛋白颗粒稳定的高内相乳液已有研究报道,如文献[6]证明天然的 7S 是高内相乳液的 Pickering 分子稳定剂,其乳化效率和形成凝胶状高内相乳液的能力与卵清蛋白相当;文献[7]研究发现乙醇处理的 7S 可作为出色 Pickering 稳定剂来改善乳液或高内相乳液的乳化性能和界面稳定性;文献[8]研究发现大豆可溶性多糖的糖基化处理极大地改善了 11S 高内相乳液的乳化性能、凝胶网络结构和稳定性,证明了糖基化修饰蛋白对于形成高内相乳液具有重要意义。但上述高内相乳液已不能满足功能食品对乳液肠道缓释的要求。由于研究者均选择在中性 pH 值下对两种蛋白乳液进行研究,乳液或乳液凝胶能够满足中性条件的稳定性,但不能在胃环境(酸性)中保持稳定的状态。

因此,本文以 7S 和 11S 为研究对象,研究在酸性条件下 7S 和 11S 的功能特性以及结构特性,并对 7S 和 11S 形成的高内相乳液的微观结构、流变特性和消化特性进行分析,以期为 7S 和 11S 形成的高内相乳液更好地应用于功能性食品载体领域打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆,华粮天下经贸有限公司;大豆油(市售);盐酸、氢氧化钠、正己烷、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾等,北京新光化工试剂厂;去离子水;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LGR20 - W 型台式高速冷冻离心机,北京京立离心机有限公司;PHS - 25 型数显台式酸度计,上海雷磁公司;Mastersizer 2000 型激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;F - 4500 型荧光分光光度计,日本日立公司;BX53 型科研正置光学显微镜,日本奥林巴斯有限公司;MCR302 型流变仪,奥地利安东帕公司。

1.3 方法

1.3.1 7S、11S 蛋白提取

参照文献[9]的方法稍作修改,将大豆磨粉,过 60 目筛后使用正己烷进行脱脂。将 10 g 脱脂大豆粉分散到 150 mL 磷酸盐缓冲液(pH 值 8.5),在室温(20℃)下搅拌 1 h,9 000 g 离心 30 min 后,收集上清液,将固体 $NaHSO_3$ 添加到上清液中,并用 1 mol/L HCl 将 pH 值调节至 6.4,在 4℃下将溶液放置 12 h,然后将静置溶液在 6 500 g 下离心 20 min,沉淀物用纯水洗涤 3 次,用 1 mol/L NaOH 将溶液 pH 值调节至 7.0,所得溶液在纯水上透析 48 h,冷冻干燥获得 11S 组分。将固体 NaCl 添加到提取完 11S 的上清液中至浓度为 0.25 mol/L,用 1 mol/L HCl 将 pH 值调节至 5.5,然后在室温下搅拌 0.5 h,9 000 g 离心 30 min 后除去沉淀物,上清液用纯水稀释 2 倍,用 1 mol/L HCl 将 pH 值调节至 4.8,6 500 g 下离心 30 min,将沉淀物用纯水洗涤 3 次,用 1 mol/L NaOH 将 pH 值调节至 7.0,随后将所得溶液透析 48 h,冷冻干燥获得 7S 组分。

1.3.2 7S、11S 蛋白颗粒制备

将冷冻干燥的 7S 和 11S 蛋白粉末溶解于磷酸盐缓冲溶液中,使分散液中蛋白质质量分数为 1.5%。通过滴加 1 mol/L HCl 将分散液的 pH 值调节至 2.0。然后使用 Ultra Turrax T10 型高速分散机以 10 000 r/min 对 7S 和 11S 蛋白分散液均质 1 min,即形成在酸性条件下的蛋白颗粒溶液。

1.3.3 粒径和 ζ-电位

参照文献[10]的方法稍加修改,利用 NANO ZS90 型粒度与电位分析仪对所有样品进行粒径和 ζ-电位测定。为了研究 pH 值(1.5 ~ 4.0)对蛋白颗粒的粒径和 ζ-电位的影响,将样品用不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液(0.01 mol/L)稀释 1 000 倍后测量粒径和 ζ-电位。

1.3.4 表面疏水性

参照文献[11]的方法稍作修改,在 25℃下,采用 ANS(8-苯胺-1-萘磺酸)作为荧光探针测定不同 7S、11S 蛋白样品的表面疏水性指数 H_0。将蛋白

质样品(质量浓度 0.01 g/mL)分别在 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 1.5 ~ 3.0)中稀释,最终使蛋白质质量浓度为 0.000 2 ~ 0.001 g/mL,将 20 μL ANS 储备溶液(8 mmol/L)加入到 4 mL 稀释蛋白质溶液中。随后在激发波长 390 nm、发射波长 497 nm、夹缝宽度 5 nm 条件下测定溶液荧光强度。荧光强度与样品质量浓度关系曲线的斜率定义为蛋白质的 H_0。

1.3.5 乳化性和乳化稳定性

参照文献[12]的方法,将新鲜配制的乳液分散在质量浓度 0.01 g/mL SDS(十二烷基硫酸钠)中。充分混合后在 500 nm 处测定吸光度,以 SDS 做空白对照。乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性指数(ESI)分别表示为

$$E_{AI} = 2 \times 2.303 \frac{A_0 N}{10\,000\theta LC} \tag{1}$$

$$E_{SI} = \frac{10A_0}{A_0 - A_{10}} \tag{2}$$

式中　E_{AI}——乳化活性指数,m^2/g

E_{SI}——乳化稳定性指数,min

N——稀释倍数,取 200

θ——油相体积分数,取 25%

L——比色杯厚度,取 1 cm

C——乳化液形成前蛋白质水溶液中蛋白质质量浓度,取 5 mg/mL

A_0——0 min 时的吸光度

A_{10}——10 min 时的吸光度

1.3.6 傅里叶红外光谱

将不同 pH 值的蛋白溶液冻干,冻干后的样品置于干燥器中用 P_2O_5 充分干燥,取样品 1.5 mg,与 200 mg 溴化钾研磨混匀后压片进行红外光谱测定。在实验过程中,为了减少蒸汽的干扰,用干燥的 N_2 持续注入测量室。测定时波数范围为 4 000 ~ 400 cm^{-1},扫描次数为 64,分辨率 4 cm^{-1},得到的红外吸收曲线采用 Peak fitting 软件进行高斯曲线拟合处理,分析 7S、11S 蛋白在不同 pH 值下二级结构含量的变化[13]。

1.3.7 Pickering 高内相乳液制备

为了研究乳液形成时的内相体积分数对乳液结构的影响,在蛋白分散液中滴加体积分数为 20%、40%、60%、74%、78%、80%、82%、84% 的大豆油,用 Ultra Turrax T10 型高速分散机于 8 000 r/min 均质 2 min,形成乳液,其中当内相体积分数大于 74% 时,形成 Pickering 高内相乳液[14]。

1.3.8 光学显微镜

将样品置于显微镜载玻片上,轻轻将盖玻片放置在玻片的顶部,并确保内部没有气泡,用光学显微镜观察 Pickering 高内相乳液的微观结构,图像以 40 倍放大拍摄[15]。

1.3.9 冷冻扫描电镜

使用冷冻扫描电镜对 Pickering 高内相乳液进行观察。将一滴样品沉积在铝制支架上,并用液氮进行冷却,然后将其转移至 -160℃ 真空制备室,并用刀片使样品破裂,一旦破裂,将样品转移至低温转移单元,并在 -100℃ 下升华 15 min,将样品表面涂上铂,最后将涂覆的样品转移到 -140℃ 的冷冻室内观察[15]。

1.3.10 流变特性

参照文献[16]的方法,使用旋转黏度计测量乳液的流变特性。在 25℃ 扫频模式下,推板间隙为 0.80 mm,恒定应变为 0.5%,扫描频率为 0.1 ~ 10 Hz 的条件下测量 Pickering 高内相乳液的弹性模量和黏性模量。

1.3.11 模拟体外消化

参照文献[17]的方法进行模拟体外消化。将 0.32 g 胃蛋白酶和 0.2 g NaCl 均匀混合,并在装有磷酸盐缓冲液的容量瓶中将体积调节至 100 mL,随后,用 1.0 mol/L HCl 将 pH 值调节至 1.2,以获得模拟胃液(SGF)。将 5 g 乳液与 30 mL SGF 均匀混合,用 0.1 mol/L NaOH 和 1.0 mol/L HCl 将 pH 值调节至 1.2 后,将混合物在 37℃ 的恒定温度下以 200 r/min 的转速搅拌 60 min,随后用 0.1 mol/L NaOH 将上述胃消化物的 pH 值调节至 7.0,胃消化结束,测量粒径与 ζ-电位。将 8 mL 的 48.5 mg/mL 胆汁盐、2 mL 的750 mmol/L $CaCl_2$ 溶液和 10 mL 的 12 mg/mL 胰脂肪酶逐渐添加到 20 mL 胃消化后的 SGF 中,并均匀混合至获得模拟的肠液(SIF),随后,用 0.1 mol/L NaOH 将 pH 值维持在 7.0,并记录了 NaOH 的消耗量,最后通过在冰浴中浸泡 10 min 来终止反应,并测量粒径与 ζ-电位。

1.3.12 游离脂肪酸(FFAs)释放率测定

参照文献[18]的方法,在肠道消化 2 h 的过程中将 0.1 mol/L NaOH 滴定到消化容器中并将其控制在 pH 值 7.0,根据维持 pH 值 7.0 所需的 NaOH 物质的量计算样品中 FFAs 释放率,公式为

$$F = \frac{C_{NaOH} V_{NaOH} M_{oil}}{2m_{oil}} \times 100\% \tag{3}$$

式中　F——游离脂肪酸释放率,%

C_{NaOH}——用于滴定的标准 NaOH 溶液的浓度,mol/L

V_{NaOH}——模拟肠消化时消耗的 NaOH 溶液体积,mL

M_{oil}——油的平均相对分子质量,g/mol

m_{oil}——油在肠液中的质量,g

1.4 数据处理

本实验均重复 3 次,结果表示为平均数 ± 标准差。结果采用 SPSS 22.0 分析软件和 Origin 8.0 软件进行处理,采用 ANOVA 对数据进行差异显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 7S、11S 蛋白粒径分析

粒径是鉴定蛋白颗粒大小和液体稳定性的主要指标,通常随着粒径减小,蛋白颗粒液体稳定性增加。表 1 为 pH 值对 7S 和 11S 粒径、ζ-电位的影响,pH 值为 3.5 ~ 4.0 时,7S、11S 蛋白溶液粒径突然变大,为 2 000 ~ 5 000 nm,可能是因为在 pH 值为 3.5 和 4.0 时,更接近两种蛋白等电点,蛋白易发生聚集,从而形成了肉眼可见的不稳定的蛋白悬浮液,因此不能通过 NANO ZS90 型粒度与电位分析仪准确测量该 pH 值条件下蛋白颗粒的平均粒径。pH 值为 1.5、2.5、3.0 时,两种蛋白的粒径均在 300 ~ 500 nm之间,在 pH 值为 2.0 时,7S 与 11S 的粒径相对较大。该粒径范围与文献[2,19]研究结果相似。

表 1 7S、11S 蛋白粒径和 ζ-电位结果

Tab. 1 7S and 11S particle size and potential

pH 值	粒径/nm		ζ-电位/mV	
	7S	11S	7S	11S
1.5	(317.20 ± 4.98)^{e}	(467.80 ± 4.75)^{e}	(15.93 ± 0.02)^{a}	(18.33 ± 0.05)^{a}
2.0	(520.70 ± 8.73)^{c}	(1 031.00 ± 11.23)^{c}	(13.00 ± 0.03)^{b}	(11.17 ± 0.08)^{b}
2.5	(349.80 ± 5.43)^{d}	(486.60 ± 7.45)^{d}	(10.57 ± 0.07)^{c}	(10.54 ± 0.03)^{c}
3.0	(315.40 ± 4.32)^{f}	(218.70 ± 2.56)^{f}	(9.26 ± 0.08)^{d}	(9.60 ± 0.02)^{d}
3.5	(2 547.00 ± 30.49)^{b}	(2 247.00 ± 27.88)^{b}	(7.84 ± 0.03)^{e}	(7.94 ± 0.03)^{e}
4.0	(4 733.00 ± 70.32)^{a}	(4 415.00 ± 70.32)^{a}	(6.76 ± 0.09)^{f}	(6.46 ± 0.08)^{f}

注:同列数据不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 ζ-电位以及表面疏水性分析

蛋白质的溶解度主要取决于其表面特性,如表面电荷和疏水性。从表 1 可以看出,7S 和 11S 蛋白在酸性条件下,ζ-电位为 6 ~ 19 mV,低于蛋白质的等电点,蛋白质带正电。已有研究指出,高电荷颗粒无法稳定乳液,因为带电颗粒在油水界面处会出现“图像电荷”,并在靠近界面时会遇到排斥能垒[20]。因此,颗粒电荷在高内相乳液的形成和物理性能中起着重要作用,高电荷颗粒很难吸附在油水界面,导致油水界面的稀疏覆盖,不利于稳定乳化体系的形成,而酸性条件下的蛋白颗粒电荷较低,更加有利于乳液的形成。在强酸条件下 7S 和 11S 蛋白颗粒表面同性电荷增多,同性电荷间的相互排斥使蛋白质溶液更稳定,减弱了蛋白颗粒分子间的相互作用,促进 7S 和 11S 蛋白颗粒作为 Pickering 高内相乳液的稳定剂。此外,从图 1(不同大写字母表示 7S 蛋白之间的差异显著($P<0.05$),不同小写字母表示 11S 蛋白之间的差异显著($P<0.05$),下同)可以看出,pH 值 2.0 ~ 3.5 时随着 pH 值的降低,其疏水性逐渐增大,在 pH 值为 2.0 时,11S、7S 疏水性都最大,这可能因为在酸性条件下,随着 pH 值的降低,产生大量电荷,使球蛋白自身结构发生改变,埋藏在蛋白分子内的疏水基团暴露出来,分散在蛋白颗粒表面,或疏水基团被所应用的荧光探针掩盖[11]。

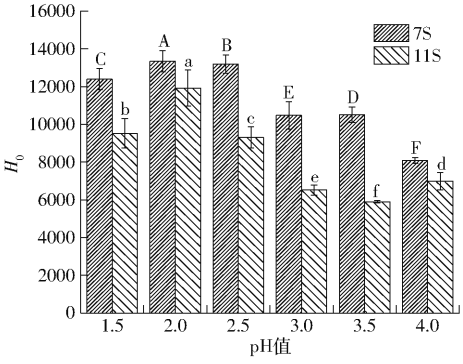


图 1 pH 值对蛋白表面疏水性的影响

Fig. 1 Effect of pH value on protein surface hydrophobicity

2.3 乳化活性和乳化稳定性

EAI 表征颗粒形成油水界面的能力,即它在水相中的溶解能力以及强烈吸附在油-水界面形成乳化层的能力,ESI 表征乳状液形成小液滴的稳定能力[21]。如图 2 所示,在 pH 值为 2.0 时,7S、11S 的乳化活性和乳化稳定性都最高。如图 2a 所示,随着 pH 值的增加,当 pH 值达到 4.0 时,7S 的乳化活性远高于 11S,蛋白质在酸性条件时,不会对蛋白的性质发生改变,pH 值小于 4.0 时,11S 的乳化活性始终高于 7S 的乳化活性,这可能是因为强酸改变了蛋白的电荷,导致其结构发生变化,溶解度增大,这与疏水性结果相一致。从图 2b 中可以看出,在酸性条件 pH 值 3.5 和 pH 值 4.0 时,两种蛋白的乳化稳定性都是最低的,只有在强酸条件时,乳化稳定性会增

大，7S 和 11S 的差异也较大，11S 的乳化稳定性也高于 7S。因此，pH 值 2.0 是 7S、11S 制备高内相乳液的最佳条件。

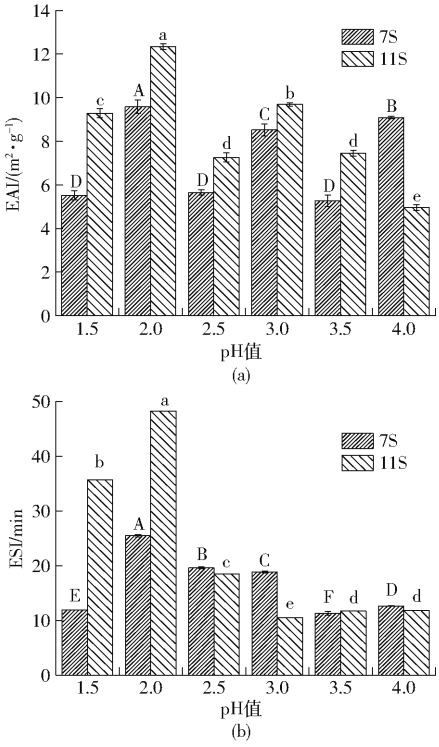


图 2　pH 值对蛋白 EAI 和 ESI 的影响

Fig. 2　Effects of pH value on protein EAI and ESI

2.4　傅里叶红外光谱

红外光谱是有机结构定性分析的重要方法之一。一个典型的特征是羟基数量的变化，在红外光谱上，在 3 700 ~ 3 200 cm^{-1} 的波数处有一个宽的拉伸振动峰，在 1 260 ~ 1 000 cm^{-1} 的波数处发生强烈的振动[22]。如图 3 所示，7S 和 11S 表示未处理的蛋白，7S－2 和 11S－2 表示在 pH 值 2.0 时的 7S 和 11S 蛋白。当 7S 处于强酸性环境时，在 3 700 ~ 3 200 cm^{-1} 处都有较宽的吸收峰，表明强酸会导致蛋白的羟基数目增加，引起振动吸收。而 11S 在酸性条件下，在 3 700 ~ 3 200 cm^{-1} 处吸收峰变窄。但是 11S 在 1 260 ~ 1 000 cm^{-1} 处的吸收峰显著增强，表明 C—N 数量增加。FTIR 可以反映肽链结构的变化，从而影响蛋白质分子的构象稳定性。

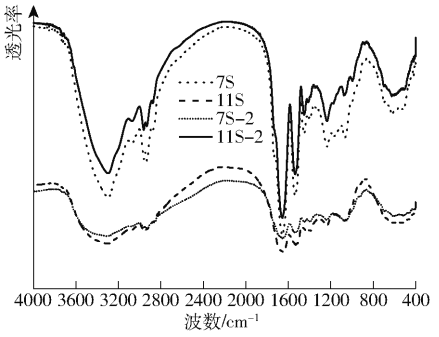


图 3　7S、11S 蛋白红外光谱分析

Fig. 3　Infrared spectrum analysis of 7S and 11S

从表 2 可知，β-折叠是 7S 和 11S 二级结构的主要组成部分，7S 在强酸性条件下，α-螺旋和 β-折叠的含量减少，β-转角的含量增加，这可能是由于强酸性环境引起的空化作用促使 7S 蛋白的机械运动，使分子相互撞击，蛋白质的立体二级结构向不定型结构转变，分子柔性增加，更有利于在界面吸附[10]。α-螺旋的减少总是表现出蛋白质聚集的迹象，而 11S 在强酸性条件下，与 7S 相反，α-螺旋含量增加。由于蛋白质的二级结构取决于分子不同部分之间的相互作用，以上结果可能表明在强酸性条件下会破坏这些相互作用，从而导致二级结构发生变化[23]。

表 2　7S、11S 蛋白二级结构相对含量

Tab. 2　Relative content of secondary structure of 7S and 11S　%

样品	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲
7S	(17.63 ± 0.01)^{c}	(50.07 ± 0.05)^{c}	(14.74 ± 0.01)^{b}	(17.57 ± 0.02)^{a}
11S	(22.93 ± 0.03)^{b}	(61.05 ± 0.08)^{b}	(5.00 ± 0.01)^{c}	(11.02 ± 0.01)^{c}
7S－2	(15.82 ± 0.01)^{d}	(44.75 ± 0.06)^{d}	(24.34 ± 0.03)^{a}	(15.09 ± 0.02)^{b}
11S－2	(24.59 ± 0.05)^{a}	(62.60 ± 0.08)^{a}	(2.49 ± 0.01)^{d}	(10.33 ± 0.01)^{d}

注：同列数据不同字母表示显著差异（$P < 0.05$）。

2.5　Pickering 高内相乳液外观观察分析

当 pH 值 2.0、蛋白质量浓度 0.015 g/mL 时，不同油相体积分数形成的乳液及乳液凝胶的外观图与微观结构如图 4、5 所示，可以看出在 pH 值 2.0 时，7S 与 11S 均可以形成高内相乳液。当内相体积分数为 20% ~70% 时，两种蛋白乳液出现了显著的分层现象，并且随着油相体积分数的增加，上层乳白色絮状层增厚，内相体积分数为 74% 时，其表面呈奶油状，细腻均一，较为黏稠，容易粘附在样品瓶内壁和底部，这与高内相乳液的定义是完全一致的，表明 7S 与 11S 形成了高内相乳液。从微观结构可以看到当油相体积分数小于 74% 时，液滴随机分散分布，随着油相体积分数的增加，形成高内相乳液后，液滴处于更紧密的填充状态，排列整齐，相互连接，形成了致密的凝胶网络。尤其在油相体积分数为 80% 时，与其它体积分数相比，液滴排列最整齐，变得更加均匀，表明此时高内相乳液乳化性能最佳。

2.6　Pickering 高内相乳液冷冻电镜观察分析

为进一步探究微观结构改变，用冷冻扫描电镜对 7S 和 11S 颗粒稳定的 Pickering 高内相乳液进行表征（图 6）。所有油滴都被包裹在由 7S 和 11S 颗粒构成的三维网络状结构中，蛋白颗粒大小均一，油

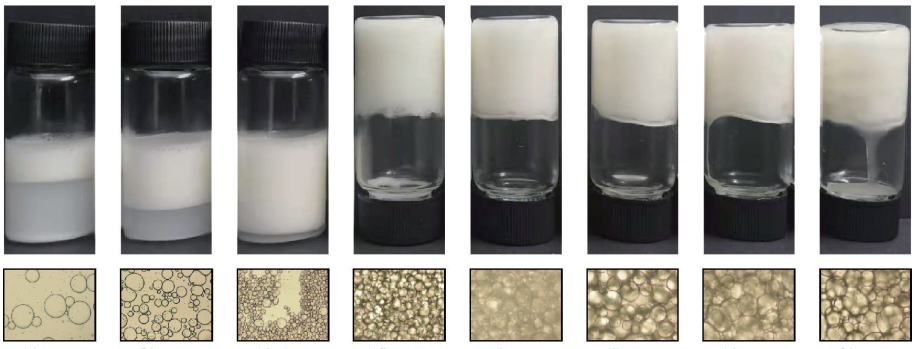


图 4 7S 形成的高内相乳液

Fig. 4 High internal phase emulsion formed by 7S

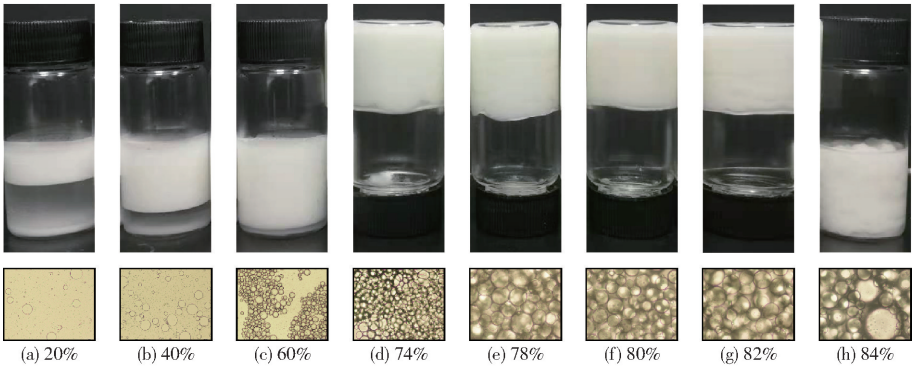
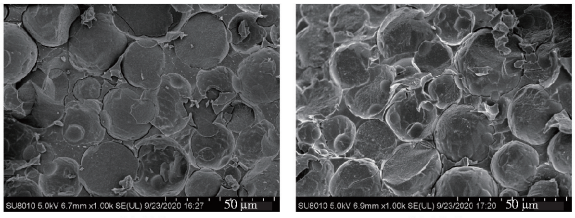


图 5 11S 形成的高内相乳液

Fig. 5 High internal phase emulsion formed by 11S



(a) 7 S (b) 11 S

图 6 Pickering 高内相乳液的冷冻电镜观察图

Fig. 6 Observation pictures of Pickering high internal phase emulsion cryo-scanning electron microscope

滴间分布紧密,这与光学显微镜是完全一致的。此外,在油滴之间由单层蛋白颗粒稳定,蛋白颗粒可以桥接液滴,形成桥接絮凝状网络结构,使乳液体系更加稳定,而桥接絮凝是 Pickering 乳液独有的性质[24]。此外,可以观察到图像中 7S 形成的高内相乳液蛋白颗粒间有明显的裂痕,而 11S 则更加光滑圆润,这表明 11S 作为制备 Pickering 高内相乳液的原料要优于 7S,与上述研究结果一致。

2.7 Pickering 高内相乳液流变性质

图 7 显示了蛋白质量浓度为 0.015 g/mL、内相体积分数为 80% 时,Pickering 高内相乳液的流变分析图。所有测试的样品均表现出以弹性为主的粘弹性,随着频率的增加,Pickering 高内相乳液的弹性模量和黏性模量逐渐增大,并且储能模量 G' 的幅度明显大于损耗模量 G'',表明形成了凝胶网络结构[25]。

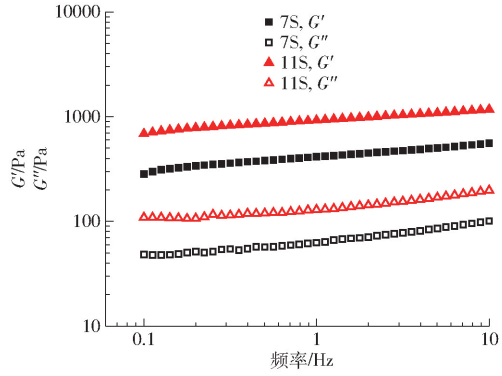


图 7 Pickering 高内相乳液流变分析

Fig. 7 Rheological analysis diagram of Pickering high internal phase emulsions

而且经研究发现 11S 在酸性条件下,无论是 G' 还是 G'',都高于 7S,这表明 11S 形成了更好的凝胶状网络结构,其凝胶强度远高于 7S。

2.8 Pickering 高内相乳液的消化特性

乳滴的粒径变化越小,在胃、肠道中消化越稳定。如表 3 所示,7S 和 11S 形成的乳液,在胃中消化时变化范围相对较小,尤其是 11S,在胃道时,仅从 593.80 nm 减小到 402.10 nm,因此可以说明 11S 形成的乳液在模拟胃液(SGF)消化中具有更好的稳定性。这可能是因为在酸性条件下形成的高内相乳液,与 SGF 中的 pH 值相近,可以更加有利于乳液的稳定。在 SGF 消化后,制备乳液的 ζ-电位绝对值

表 3　7S 和 11S 形成的高内相乳液消化特性分析

Tab. 3　Analysis of digestion characteristics of high internal phase emulsion formed by 7S and 11S

	粒径/nm			ζ-电位/mV		
	胃液(15 min)	胃液(60 min)	肠液(120 min)	胃液(15 min)	胃液(60 min)	肠液(120 min)
7S	(406.40 ± 30.58)^{c}	(901.10 ± 40.43)^{b}	(1 447.00 ± 60.14)^{a}	(1.72 ± 0.32)^{b}	(5.13 ± 0.89)^{a}	(−15.80 ± 2.54)^{c}
11S	(593.80 ± 20.32)^{b}	(402.10 ± 31.43)^{c}	(951.60 ± 42.67)^{a}	(15.00 ± 1.43)^{a}	(4.53 ± 0.76)^{b}	(−21.27 ± 3.33)^{c}

注：粒径数据中和 ζ-电位数据中，同行不同小写字母表示显著差异，$P<0.05$。

较低，这是由于模拟胃环境的高酸性和离子强度所致，而在肠液(SIF)中消化后导致大量的负电荷聚集，ζ-电位绝对值明显增加，可能是以下原因导致：在中性环境中蛋白质表面带负电荷；肠液中的阴离子胆汁盐形成脂质消化产生的胶束引起电荷聚集。因此，囊泡和油滴的表面具有增加的净负电荷[26]。

为了探究在酸性条件下 7S 和 11S 颗粒形成的高内相乳液在消化中起到的缓释作用，在胃消化后，对散装大豆油、7S 以及 11S 形成的高内相乳液进行了模拟肠液消化。结果表明，3 种样品的脂质在消化前 20 min 都可以更快地水解。更具体地说，与 Pickering 高内相乳液相比，散装大豆油在整个肠内消化过程中观察到的油脂释放率(FFAs)很高。如图 8 所示，7S 和 11S 形成的高内相乳液的 FFAs 释放曲线相似，远低于散装大豆油，并且 11S 形成的高内相乳液释放的脂质略高于 7S 形成的高内相乳液，但在 100 min 之后，7S 形成的高内相乳液的 FFAs 迅速增多。这可能是因为 11S 液滴粒径在肠液消化 2 h 内小于 7S 形成的液滴，小颗粒具有较大的总比表面积，这有利于油相与吸附的脂肪酶之间的相互作用，导致较高的 FFAs 释放率[16]。胃肠道消化开始时，乳液体系就会遭到破坏，被分解成细小的颗粒[27]。高内相乳液稳定的固体状凝胶网络赋予其高粘度性能，如流变学分析所示，7S 和 11S 均形成了凝胶状网络结构，具有较高的刚性和良好的阻隔性能，抵抗了消化酶的水解和作用，从而减慢了脂质的消化。已有研究报道，乳清蛋白、麦醇溶蛋白、卵

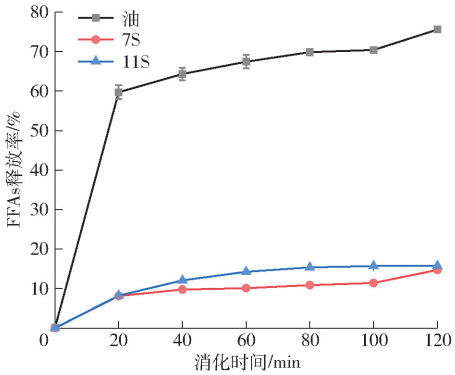


图 8　在小肠消化中 FFAs 释放率随消化时间的变化曲线

Fig. 8　Change in FFAs release rate during intestinal digestion

清蛋白颗粒稳定的高内相乳液都具有较低的消化率[19,28−29]。高内相乳液的脂质消化速度较慢，这一特性在生产低脂食品时具有重要意义。

3　结束语

酸性条件可以修饰 7S 和 11S 的基本性质和结构特性，形成稳定 Pickering 高内相乳液的蛋白颗粒。并且经过筛选结果表明，在 pH 值 2.0、内相体积分数为 80% 时，7S、11S 形成高内相乳液最稳定。此外，乳化性、微观结构和流变学特性结果表明在酸性条件下，11S 形成 Pickering 高内相乳液稳定性优于 7S。模拟体外消化实验表明，在酸性条件形成的 7S 和 11S 高内相乳液，更能适应胃液 pH 值，在胃环境中具有良好的稳定性，不易发生破裂漏油的现象，可以达到肠部定点释放的效果，具有一定的控释作用，在功能性食品行业具有广泛的应用前景。

参　考　文　献

[1] ZHAO Q, ZAABOUL F, LIU Y, et al. Recent advances on protein-based Pickering high internal phase emulsions (Pickering HIPEs): fab-rication, characterization and applications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(4): 1934 − 1968.

[2] DAI L, YANG S, WEI Y, et al. Development of stable high internal phase emulsionsby Pickering stabilization: utilization of zein-propylene glycol alginate-rhamnolipid complex particles as colloidal emulsifiers[J]. Food Chemistry, 2019, 275(44): 246 − 254.

[3] CHEN Q H, ZHENG J, XU Y T, et al. Surface modification improves fabrication of Pickering high internal phase emulsions stabilized by cellulose nanocrystals[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 75: 125 − 130.

[4] YANG T, ZHENG J, ZHENG B S, et al. High internal phase emulsions stabilized by starch nanocrystals[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 82: 230 − 238.

[5] WU R, MENNER A, BISMARCK A. Tough interconnected polymerized medium and high internal phase emulsions reinforced by silica particles[J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2010, 48(9): 1979 − 1989.

[6] XU Y T, LIU T X, TANG C H. Novel Pickering high internal phase emulsion gels stabilized solely by soy β-conglycinin[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 88: 21 − 30.

[7] PENG L P, XU Y T, LI X T, et al. Improving the emulsification of soy β-conglycinin by alcohol-induced aggregation[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 83 - 92.
[8] HAO Z Z, PENG X Q, TANG C H. Edible Pickering high internal phase emulsions stabilized by soy glycinin: improvement of emulsification performance and Pickering stabilization by glycation with soy polysaccharide[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103: 51 - 70.
[9] YANG Y, WANG Q, LEI L, et al. Molecular interaction of soybean glycinin and β-conglycinin with (-)-epigallocatechin gallate induced by pH changes[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 1142 - 1151.
[10] XUE F, LI C, ADHIKARI B. Physicochemical properties of soy protein isolates-cyanidin-3-galactoside conjugates produced using free radicals induced by ultrasound[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 64: 104 - 112.
[11] PENG X Q, XU Y T, LIU T X, et al. Molecular mechanism for improving emulsification efficiency of soy glycinin by glycation with soy soluble polysaccharide[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2018, 66(46): 12316 - 12326.
[12] LI Y, ZHONG M, XIE F, et al. The effect of pH on the stabilization and digestive characteristics of soybean lipophilic protein oil-in-water emulsions with hypromellose[J]. Food Chemistry, 2020, 309(2): 125579.
[13] 李杨, 王迪琼, 齐宝坤, 等. 超声处理对大豆亲脂蛋白结构及溶解性的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2020, 51(2): 357 - 362,73.
LI Yang, WANG Diqiong, QI Baokun, et al. Effect of ultrasonic treatment on structure and solubility of soybean lipophilic protein[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(2): 357 - 362,73. http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? flag=1&file_no=2002039&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.02.039. (in Chinese)
[14] YANG T, LI X T, TANG C H. Novel edible Pickering high-internal-phase-emulsion gels efficiently stabilized by unique polysaccharide-protein hybrid nanoparticles from Okara[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 102 - 109.
[15] WEN J, ZHANG Y, JIN H, et al. Deciphering the structural network that confers stability to high internal phase Pickering emulsions by cross-linked soy protein microgels and their in vitro digestion profiles[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2020, 68(36): 9796 - 9803.
[16] 江连洲, 温家煜, 王禹涵, 等. SPI 凝胶颗粒制备及其 Pickering 高内相乳液特性[J/OL]. 农业机械学报, 2020, 51(12): 348 - 355.
JIANG Lianzhou, WEN Jiayu, WANG Yuhan, et al. Fabrication and characterization of high internal phase Pickering emulsion manipulated by gel particles of soy protein[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(12): 348 - 355. http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? flag=1&file_no=20201238&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.12.038. (in Chinese)
[17] LI Y, WANG D, ZHANG S, et al. Stability and in vitro simulated release characteristics of ultrasonically modified soybean lipophilic protein emulsion[J]. Food & Function, 2020, 11(5): 3800 - 3810.
[18] LUO S Z, WU X Z, PAN L H, et al. Pectin-peptide complexes ameliorated physicochemical stabilities and in vitro digestion abilities of β-carotene loaded emulsions[J]. Food Chemistry, 2021, 340: 128209.
[19] TAN H, ZHAO L, TIAN S, et al. Gelatin particle-stabilized high-internal phase emulsions for use in oral delivery systems: protection effect and in vitro digestion study[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2017, 65(4): 900 - 907.
[20] HU Y Q, YIN S W, ZHU J H, et al. Fabrication and characterization of novel Pickering emulsions and Pickering high internal emulsions stabilized by gliadin colloidal particles[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61: 300 - 310.
[21] 钟明明, 齐宝坤, 赵添, 等. 大豆亲脂蛋白-羟丙基甲基纤维素乳液制备及其稳定性[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 41 - 47.
ZHONG Mingming, QI Baokun, ZHAO Tian, et al. Preparation and stability of soybean lipophilic protein - hydroxypropyl methylcellulose emulsion[J]. Food Science, 2019, 40(18): 41 - 47. (in Chinese)
[22] OLIVER C M, KHER A, MCNAUGHTON D, et al. Use of FTIR and mass spectrometry for characterization of glycated caseins[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 76(1): 105 - 110.
[23] HUANG L, DING X, LI Y, et al. The aggregation, structures and emulsifying properties of soybean protein isolate induced by ultrasound and acid[J]. Food Chemistry, 2019, 279: 114 - 119.
[24] JU M, ZHU G, HUANG G, et al. A novel pickering emulsion produced using soy protein-anthocyanin complex nanoparticles [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 99: 87 - 97.
[25] RUAN Q, YANG X, ZENG L, et al. Physical and tribological properties of high internal phase emulsions based on citrus fibers and corn peptides[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 53 - 61.
[26] SINGH H, YE A, HORNE D. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion[J]. Progress in Lipid Research, 2009, 48(2): 92 - 100.
[27] CAREY M C, SMALL D, BLISS C M. Lipld digestion and absorption[J]. Annual Review of Physiology, 1983, 45: 651 - 677.
[28] YI J, GAO L, ZHONG G, et al. Fabrication of high internal phase Pickering emulsions with calcium-crosslinked whey protein nanoparticles for β-carotene stabilization and delivery[J]. Food & Function, 2020, 11(1): 768 - 788.
[29] XU Y T, TANG C H, LIU T X, et al. Ovalbumin as an outstanding Pickering nanostabilizer for high internal phase emulsions [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2018, 66(33): 8795 - 8804.