

乳清分离蛋白-多糖乳状液制备与乳化稳定性研究*

崔健¹ 邴金龙¹ 刘欢² 殷丽君¹ 李永玉³

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国水产科学研究院质量与标准研究中心, 北京 100141;
3. 中国农业大学工学院, 北京 100083)

【摘要】 在 pH 值 7.0 时以乳清分离蛋白为乳化剂制备初级乳状液, 利用静电自组装技术, 通过加入具有不同电性的阴离子型果胶、中性瓜尔豆胶、阳离子型壳聚糖制备具有良好稳定性的乳清分离蛋白-多糖的二级乳状液, 并考察 pH 值、乳清分离蛋白与多糖的比例对乳状液稳定性的影响。结果表明: 瓜尔豆胶与乳清蛋白乳状液粒子间无静电作用; 在 pH 值 5.0 ~ 6.0 条件下, 壳聚糖能够吸附到乳状液粒子表面, 但形成的乳状液稳定性较差; 在 pH 值 3.0 ~ 5.0、果胶质量分数为 0.2% ~ 0.5% 条件下, 乳清分离蛋白-果胶为乳化界面构建的二级乳状液, 稳定性最高。

关键词: 乳清蛋白 乳状液 多糖 静电自组装 乳化稳定性

中图分类号: TS201.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2011)09-0133-05

Whey Protein Isolated-polysaccharide Multilayer Emulsions by Layer-by-layer Electrostatic Self-assembly Technique

Cui Jian¹ Li Jinlong¹ Liu Huan² Yin Lijun¹ Li Yongyu³

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Quality and Standards Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China

3. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract

O/W emulsions (pH value 7.0) stabilized by whey protein isolated was prepared as the primary emulsion at first, and then polysaccharides with different electrical properties, e. g. anionic pectin, neutral guar gum, and cationic chitosan were added to the secondary emulsions structure. The influences of pH value, protein and polysaccharide ratio on the formation of protein-polysaccharide multilayer membranes were investigated. It showed that no electrical reaction between guar gum and emulsion particles could be detected. Chitosan could adsorb to the surface of particles at a pH value 5.0 ~ 6.0, however, the formed WPI-chitosan secondary emulsions were unstable. Pectin molecules could absorb to the surface of particles and formed WPI-pectin secondary emulsion at the pH value 3.0 ~ 5.0. Stable WPI-pectin secondary emulsion could be formed at pectin concentration 0.2% ~ 0.5%.

Key words Whey protein, Emulsion, Polysaccharide, Layer-by-layer electrostatic self-assembly, Emulsion stability

引言

蛋白质、多糖、磷脂等生物聚合物以及部分小分子表面活性剂是最为常用的乳化剂和稳定剂^[1~2]。

乳化剂自身特性不同, 其乳化能力及制得的乳状液性质也存在很大差别, 目前没有任何单一乳化剂可以完全满足各类食品加工的要求^[2~3]。

多层静电自组装技术 (layer-by-layer

收稿日期: 2010-09-20 修回日期: 2010-12-27

* 国家自然科学基金资助项目(20976187)、教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-09-0741)和“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2011BAD23B04)

作者简介: 崔健, 博士生, 主要从事食品乳状液稳定性研究, E-mail: cuijian1a@163.com

通讯作者: 李永玉, 讲师, 主要从事农产品加工与贮藏研究, E-mail: yyli@cau.edu.cn

electrostatic self-assembly technique, 简称 LBL) 是近 30 年发展起来的用于构建微纳米颗粒的技术。它是利用电解质分子间的静电作用, 将带有不同电荷的离子型表面活性剂交替沉积在微粒表面, 其优势是能够在微米或纳米尺度上, 调控界面膜和壁材的组成、厚度、结构形态和表面状态^[4-5]。近来, McClements 等将多层静电自组装技术的概念引入到界面工程领域, 用于改善蛋白质、磷脂为乳化剂的乳状液稳定性^[6-10]。

乳清分离蛋白 (WPI) 是从牛奶中提取的一种蛋白质产品, 具有良好的营养性、乳化性、起泡性和胶凝性, 在食品加工中经常用作乳化剂及发泡剂等。以乳清分离蛋白为乳化剂制备的乳状液粒径小, 但受环境条件 (温度、pH 值和离子强度) 影响, 乳状液易发生粒径增大、乳状液分层等脱稳现象^[11]。本文基于多层静电自组装技术, 以 WPI 为乳化剂制备初级乳状液, 以不同电性多糖为涂层, 构建具有 WPI-多糖双层乳化界面的乳状液, 研究 pH 值、蛋白质与多糖的添加比例等对乳状液稳定性的影响, 为进一步通过调整界面组成来提高蛋白质乳状液的稳定性提供基础。

1 实验材料与仪器

1.1 材料与试剂

乳清分离蛋白 (Glanbia 公司, 蛋白含量 92% ~ 95%), 果胶 (P-9135), 瓜尔豆胶 (BG-24, 北京古达尔贸易有限公司), 壳聚糖 (脱乙酰度大于等于 95%, 山东海得贝生物工程有限公司), 大豆油 (市售一级)。

1.2 仪器与设备

T25 型高速混匀机 (德国 IKA 公司), NS1001L 型高压均质机 (意大利 Niro Soavi 公司), Zetasizer Nano-ZS90 型 Zeta-电位仪 (Malvern 公司), LS230 型激光粒度分析仪 (美国贝克曼-库尔特公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液制备

果胶、瓜尔豆胶溶液制备: 将适量果胶、瓜尔豆胶粉末分别溶解于 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 值 7.0) 中, 4℃ 贮存备用。

壳聚糖溶液制备: 将适量壳聚糖粉末溶解于 pH 值 3.0、50 mmol/L 醋酸缓冲液中, 4℃ 贮存备用。

1.3.2 乳状液制备

(1) 初级乳状液

将 1.0% 的乳清分离蛋白与 0.02% 的叠氮化钠溶于 50 mmol/L 磷酸缓冲液中 (pH 值 7.0), 室温下磁力搅拌 4 ~ 6 h, 制备成水相。将油相 (市售大豆

油) 与水相按质量比 1:9 混合 (体系总质量 200 g), 利用高速混匀机于 19 000 r/min 下混合 1 min。

将混匀后的乳状液采用两级阀控制高压均质机进行均质, 一级压力为 50 MPa, 二级压力 5 MPa, 均质一次, 使制备的乳状液中油相质量分数为 10%, WPI 质量分数为 0.9%。

(2) 二级乳状液

向初级乳状液 (pH 值 7.0) 中分别加入果胶或瓜尔豆胶溶液, 使制备的乳状液中油相质量分数为 5%, WPI 质量分数为 0.45%, 多糖质量分数为 0.2%; 将乳状液搅拌 30 min 后, 用 1 mol/L HCl 调节乳状液的 pH 值至 3.0, 获得二级乳状液。乳状液于 4℃ 贮藏 24 h 后, 进行乳状液特性分析。

将初级乳状液用 1 mol/L HCl 调至 pH 值 3.0, 加入壳聚糖溶液, 使制备的乳状液中油相质量分数为 5%, WPI 质量分数为 0.45%, 多糖质量分数为 0.2%; 乳状液搅拌 30 min 后, 用 1 mol/L NaOH 调节乳状液的 pH 值至 7.0。

1.3.3 乳状液特性指标

(1) Zeta-电位

乳状液 Zeta-电位 (ζ -电位) 的测量是利用电位仪根据粒子在特定电场中移动的方向和速度确定的。为避免多重散射的影响, 需要用相应 pH 缓冲液将待测乳状液稀释至油相质量分数约为 0.008%。

(2) 粒度分布

利用 LS230 型激光粒度分析仪测定乳状液中粒子的粒度分布, 用体积分数平均粒径 ($d_{4,3}$) 表示。实验中大豆油的折射率为 1.436, 蒸馏水的折射率为 1.33, 粒子的吸收值为 0.001。

(3) 分层系数

取 10 mL 处理后的乳状液于离心管中, 在 4℃ 贮藏 7 d 后, 乳状液发生分层现象, 上相浑浊, 下相澄清。乳状液的分层系数定义为

$$C_1 = H_s / H_T \times 100\%$$

式中 H_s ——下相的高度

H_T ——乳状液总高度

分层系数为乳状液中粒子聚集的非直接指标, 粒子聚集越多, 粒径越大, 乳状液发生分层越快, 分层系数越大。

2 结果与分析

2.1 多糖添加对乳状液制备特性影响

2.1.1 ζ -电位

在制备乳清分离蛋白稳定的初乳液基础上, 向初乳液中加入具有不同电性的多糖 (阴离子型果

胶、中性瓜尔豆胶、阳离子型壳聚糖) 构建 WPI-多糖的二级乳状液, 多糖种类对乳状液 ζ -电位的影响变化如图 1 所示。

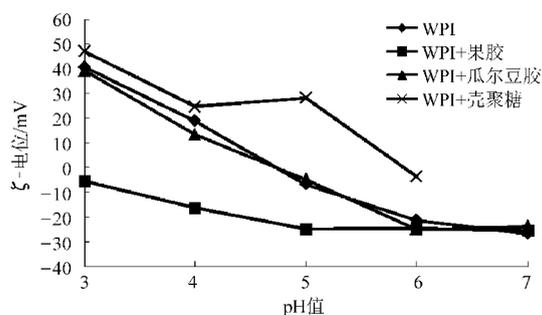


图 1 pH 值对乳状液 ζ -电位的影响

Fig. 1 Effect of pH value on ζ -potential of emulsions

图 1 表示在不同 pH 值条件下, WPI-多糖(0.2% 果胶、瓜尔豆胶和壳聚糖) 乳状液的 ζ -电位变化情况。从图中可以看出, 对照组在 pH 值从 3.0 上升到 7.0 时, ζ -电位从 40 mV 变化到 -20 mV; 在 pH 值降低至 4.8 左右, 乳状液的 ζ -电位为零, 这是因为 pH 值接近 WPI 的等电点。

由于中性多糖瓜尔豆胶不带电, 因此它的加入并未改变乳状液的带电性, ζ -电位变化趋势以及大小与对照基本吻合; 对加入果胶的乳状液而言, 在低 pH 值(小于等电点) 范围内, 乳清分离蛋白乳状液带正电, 与带负电的果胶可以发生静电吸附, 因此在 pH 值 3.0 下 ζ -电位值由对照的约 40 mV 降低为约 -5.5 mV, 而在 pH 值 4.0 下 ζ -电位值由对照的约 20 mV 降低为约 -16 mV。

在相对较高的 pH 值 6.0 ~ 7.0 时, 加入果胶后, 乳状液与初级乳状液具有相近的 ζ -电位值, 且稳定在 -25 mV 左右; 此时, 果胶与界面上的乳清分离蛋白层不发生静电吸附而是存在静电排斥, 果胶存在于乳状液的水相中而远离乳状液界面^[12]。在 pH 值 5.0 下 ζ -电位值由对照的约 -7 mV 降低为约 -25 mV, 这是因为尽管 pH 值仅略高于乳清分离蛋白等电点, 但是乳清分离蛋白表面还存在局部的正电荷区域, 因此与果胶之间仍然发生局部吸附。研究结果显示此种现象也发生在阴离子型卡拉胶参与构建的多层乳状液中, 这也是由于 β -乳球蛋白表面存在带正电荷的基因。

加入壳聚糖溶液后乳状液 ζ -电位的变化情况为: 在 pH 值 3.0 ~ 4.0 条件下, 加壳聚糖的乳状液 ζ -电位与初级乳状液相比无明显变化, 这是由于蛋白包裹的粒子和壳聚糖均带正电荷, 他们之间产生静电排斥力, 因此壳聚糖不能吸附到粒子表面。在 pH 值 5.0 ~ 6.0 的条件下, 乳状液电位发生明显变化, 例如在 pH 值 5.0 时, 乳状液的 ζ -电位值由对照

组的 -7 mV 变为实验组的 28 mV, 而在 pH 值 6.0 下, ζ -电位值由 -20 mV 变为 -4 mV, 说明在高于等电点的 pH 值条件下, WPI 带负电, 因此带正电的壳聚糖分子可以吸附到蛋白粒子表面, 形成 WPI-壳聚糖为乳化界面的二级乳状液。类似结论在 Guzey 等^[13]的研究中也有报道。在 pH 值 7.0 的条件下, 实验用壳聚糖在水相中不溶解, 乳状液产生絮状物, 无法进行 ζ -电位的测定。

由以上结果可得: 在 pH 值 3.0 ~ 5.0 下, 可形成 WPI-果胶为乳化界面的二级乳状液; 而在 pH 值 5.0 ~ 6.0 下, 可形成 WPI-壳聚糖为乳化界面的二级乳状液, 而无法形成 WPI-瓜尔豆胶二级乳状液。

2.1.2 粒径分布和分层稳定性

在乳清分离蛋白乳状液中, 添加果胶和壳聚糖并调整 pH 值。测得的乳状液平均粒径见表 1, 分层性如图 2 所示, 图中从左至右 5 支试管分别为 pH 值 3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0。

表 1 多层膜乳状液的平均粒径

Tab. 1 Mean particle diameter of multilayer emulsions

pH 值	$d_{4,3}/\mu\text{m}$		
	对照	果胶	壳聚糖
3.0	1.69 ± 0.48	1.74 ± 0.15	7.25 ± 0.05
4.0	9.07 ± 5.96	1.76 ± 0.36	12.15 ± 5.60
5.0	19.19 ± 4.69	2.04 ± 0.19	24.05 ± 7.41
6.0	1.32 ± 0.02	1.67 ± 0.54	18.22 ± 0.69
7.0	1.32 ± 0.05	1.21 ± 0.12	110.95 ± 3.32

表 1 可见, pH 值变化明显影响初乳液(对照)的平均粒径 $d_{4,3}$, 在 pH 值 7.0 下, 初乳液的平均粒径仅为 $(1.32 \pm 0.05) \mu\text{m}$; 在 pH 值 4.0 和 5.0 条件下, 初乳液平均粒径分别为 $(9.07 \pm 5.96) \mu\text{m}$ 和 $(19.19 \pm 4.69) \mu\text{m}$, 并且伴随有乳状液分层现象发生; 在 pH 值 3.0 条件下, 乳液的平均粒径与原始乳液(pH 值 7.0) 相类似, 乳液无分层现象。这种现象的产生是由于当体系 pH 值接近蛋白质等电点时, 乳状液粒子间排斥力降低甚至消失, 而 pH 值远离等电点时, 排斥力增加。特别是在 pH 值 5.0 条件下, 乳状液粒子间的 ζ -电位值接近零(如图 1 所示), 因此粒子间的静电排斥力不足以克服粒子间的反应(范德华力和疏水相互作用), 导致粒子聚结或絮凝, 粒径值增大; 而在其他 pH 值条件下, 粒子间的 ζ -电位绝对值大于等于 20 mV, 粒子间的静电排斥力足够强使粒子保持分散状态。

对加入果胶的二级乳状液而言, 在 pH 值 3.0 ~ 5.0 下, 阴离子型果胶吸附到蛋白粒子表面。pH 值 3.0、6.0、7.0 下加果胶乳状液与对照组相比, 平均

粒径无明显变化。在 pH 值 4.0 和 pH 值 5.0 条件下,二级乳状液与对照组相比,平均粒径略有升高,但乳液保持较好的分层稳定性(见图 2)。

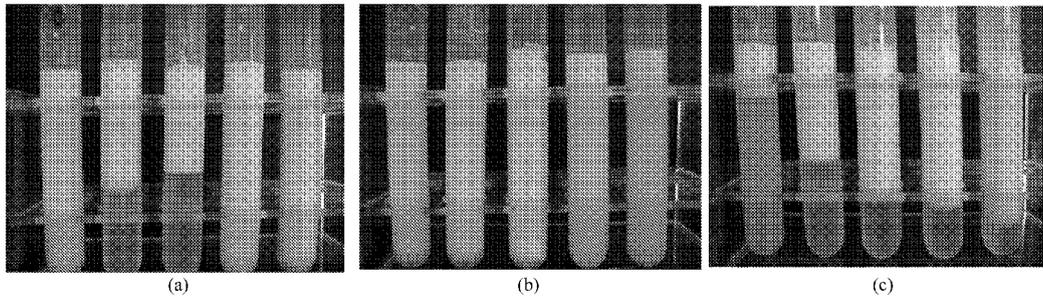


图 2 多层膜乳状液的分层性

Fig. 2 Creaming index of multilayer emulsions

(a) 初乳液 (b) 加入果胶的乳状液 (c) 加入壳聚糖的乳状液

从上述研究可知:在实验所选择的多糖浓度下,果胶与 WPI 形成的二级乳状液粒径小,不易分层,具有较好的稳定性。

2.2 果胶质量分数对 WPI-果胶二级乳状液稳定性影响

2.2.1 乳状液 ζ -电位

果胶质量分数(0~0.5%)对制备的二级乳状液 ζ -电位的影响如图 3 所示。

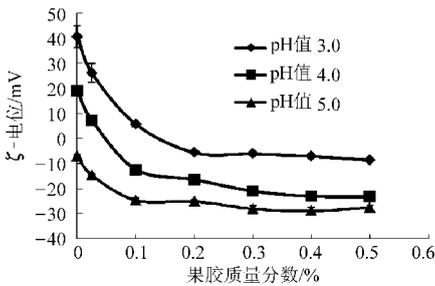


图 3 果胶质量分数对乳状液 ζ -电位的影响

Fig. 3 Effect of pectin concentrations on ζ -potential of emulsions

由图 3 可知,随着果胶质量分数的增加,乳状液的 ζ -电位值逐渐降低,表明阴离子型果胶吸附到蛋白粒子表面,形成 WPI-果胶为乳化界面乳状液。当果胶质量分数为 0.2% (pH 值 3.0)、0.3% (pH 值 4.0)、0.1% (pH 值 5.0) 时,乳状液的 ζ -电位值基本保持不变,分别为 -10、-20 和 -25 mV,表明此时蛋白粒子上的吸附位点已完全被果胶覆盖。继续增加果胶质量分数,果胶分子已经无法再继续被吸附,而是存在于水相中。

2.2.2 乳状液粒径分布和分层稳定性

果胶质量分数对 WPI-果胶双层乳液平均粒径和分层性变化的影响如图 4、5 所示。

如图 4、5 所示,当果胶质量分数小于 0.1% 时,乳状液中粒子粒径明显增加,且乳液发生明显分层。这是由于一个果胶分子能吸附于多个粒子表面,果

加入壳聚糖的乳状液,与对试样相比,所有样品粒径明显增大,并伴随有分层现象产生。低 pH 值导致分层现象更加明显。

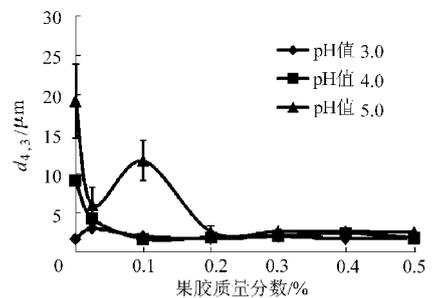


图 4 果胶质量分数对乳状液平均粒径的影响

Fig. 4 Effect of pectin concentrations on mean particle diameter of emulsions

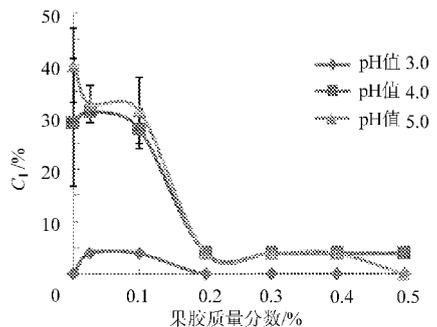


图 5 果胶质量分数对乳状液分层性的影响

Fig. 5 Effect of pectin concentrations on creaming index of emulsions

胶作为一个关联链导致桥联絮凝^[14]。随着果胶质量分数的继续增加,形成的二级乳状液中粒子粒径逐渐降低且分层系数也减小。当加入的果胶质量分数达到 0.2% 时,WPI-果胶为乳化界面的乳状液平均粒径分别为 $(1.74 \pm 0.15) \mu\text{m}$ (pH 值 3.0)、 $(1.85 \pm 0.46) \mu\text{m}$ (pH 值 4.0)、 $(2.64 \pm 0.70) \mu\text{m}$ (pH 值 5.0)。当果胶质量分数在 0.2%~0.5% 范围内,乳状液粒子平均粒径仍维持稳定,多余果胶的存在并未使乳状液发生空缺絮凝^[15]。

一般认为稳定的乳状液的粒子的 ζ -电位绝对值应大于等于 20 mV。本文中,pH 值 3.0 条件下加入

的果胶质量分数为 0.2% ~ 0.5% 时, 粒子表面的 ζ -电位值约为 -10 mV, 乳状液仍保持稳定。乳状液能够保持稳定, 这是空间位阻和静电排斥共同作用的结果。

3 结束语

分别将阴离子型多糖果胶、中性多糖瓜尔豆胶、阳离子型多糖壳聚糖加入到 WPI 稳定的初级乳状

液中, 考察不同电性多糖与 WPI 包裹的粒子间的静电作用及形成的乳状液特性。结果表明: pH 值 3.0 ~ 5.0 下果胶与带电荷的粒子发生静电吸附, pH 值 5.0 ~ 6.0 下壳聚糖与带电荷的粒子发生静电吸附, 瓜尔豆胶和粒子间无静电作用; 在 pH 值 3.0 ~ 5.0 条件下, 当加入果胶质量分数为 0.2% ~ 0.5% 时, 可形成稳定的 WPI-果胶为乳化界面的乳状液。

参 考 文 献

- 1 Dickinson E, McClements D J. *Advances in food colloids* [M]. Blackie Academic and Professional, 1995: 81 ~ 101.
- 2 McClements D J. *Food emulsions: principles, practice, and techniques* [M]. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- 3 Garti N, Reichman D. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers [J]. *Food Structure*, 1993, 12(4): 411 ~ 426.
- 4 Calvo P, Remunan-Lopez C, VilaJato L, et al. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions [J]. *Colloid and Polymer Science*, 1997, 275 (1): 46 ~ 53.
- 5 Caruso F, Mohwald H. Protein multilayer formation on colloids through a stepwise self-assembly technique [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(25): 6 039 ~ 6 046.
- 6 Aoki T, Decker E A, McClements D J. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique [J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 19(2): 209 ~ 220.
- 7 Gu Y S, Regnier L, McClements D J. Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-iota-carrageenan membranes [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 286(2): 551 ~ 558.
- 8 Guzey D, McClements D J. Influence of environmental stresses on O/W emulsions stabilized by beta-lactoglobulin-pectin and beta-lactoglobulin-pectin-chitosan membranes produced by the electrostatic layer-by-layer deposition technique [J]. *Food Biophysics*, 2006, 1(1): 30 ~ 40.
- 9 Ogawa S, Decker E A, McClements D J. Influence of environmental conditions on the stability of oil in water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(18): 5 522 ~ 5 527.
- 10 Ogawa S, Decker E A, McClements D J. Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(11): 3 595 ~ 3 600.
- 11 Chu B S, Ichikawa S, Kanafusa S. Stability of protein-stabilized β -carotene nanodispersions against heating, salts and pH [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2008, 88(10): 1 764 ~ 1 769.
- 12 Moreau L, Kim H J, Decker E A, et al. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-pectin membranes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(22): 6 612 ~ 6 617.
- 13 Guzey D, McClements D J. Characterization of β -lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study [J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 20(1): 124 ~ 131.
- 14 Dickison E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems [J]. *Food Hydrocolloids*, 2003, 17(1): 25 ~ 39.
- 15 McClements D J. Theoretical analysis of factors affecting formation and stability of multilayered colloidal dispersions [J]. *Langmuir*, 2005, 21(21): 9 777 ~ 9 785.