

# 玉米醇溶蛋白/乳清蛋白纤维核复合纳米粒稳定 Pickering 乳液的制备与性质

付思晗, 齐玉堂, 张维农, 贺军波, 张燕鹏, 吕晓雅

(武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 武汉 430023)

**摘要:**以玉米醇溶蛋白和乳清蛋白为原料,利用反溶剂共沉淀法制备玉米醇溶蛋白/乳清蛋白纤维核复合纳米粒,并与玉米油高速剪切制备 Pickering 乳液。探究了复合纳米粒在不同 pH 下的乳化性,以及复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液粒径、微观形貌、储藏稳定性及流变学特性的影响。结果表明:玉米醇溶蛋白与乳清蛋白纤维核复合后乳化性显著提高,制备的 Pickering 乳液类型为水包油型;随着复合纳米粒添加量的增加, Pickering 乳液粒径先减小后稍增大,添加量大于 3 g(100 mL 玉米油)后无显著性差异;在复合纳米粒添加量为 4 g(100 mL 玉米油)时, Pickering 乳液油滴大小均一,储藏稳定性最好; Pickering 乳液为假塑性流体,随复合纳米粒添加量的增加,表观黏度先减小后增大。

**关键词:**玉米醇溶蛋白;乳清蛋白纤维核; Pickering 乳液;稳定性;流变特性

中图分类号:TQ936;O69

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)01-0043-05

## Preparation and property of zein/whey protein fiber core complex nanoparticle stabilized Pickering emulsions

FU Sihan, QI Yutang, ZHANG Weinong, HE Junbo,  
ZHANG Yanpeng, LYU Xiaoya

(College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** Using zein and whey protein as raw materials, the zein/whey protein fiber core complex nanoparticle were prepared by anti-solvent co-precipitation method and used for the preparation of corn oil loaded Pickering emulsions by high-speed shearing method. The emulsification property of complex nanoparticle was evaluated at different pH, and the effects of different nanoparticle dosages on the particle size, microscopic morphology, storage stability and rheological properties of Pickering emulsions were studied. The results showed that the emulsification property of zein/whey protein fiber core complex nanoparticle was significantly improved, and the prepared Pickering emulsions were oil-in-water emulsions. The particle size of Pickering emulsions reduced as the increase of complex nanoparticle dosage, and there was no significant difference above 3 g(100 mL corn oil). When the dosage was 4 g(100 mL corn oil), the Pickering emulsions had uniform oil droplets and the best storage stability. The Pickering emulsions were pseudoplastic fluid, and the apparent viscosity first decreased and then increased as the increase of complex nanoparticle dosage.

**Key words:** zein; whey protein fiber core; Pickering emulsions; stability; rheological property

收稿日期:2021-01-26;修回日期:2021-09-02

基金项目:湖北省技术创新专项(重大项目)(2019ABA105)

作者简介:付思晗(1996),女,在读硕士,研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程(E-mail)475556276@qq.com。

通信作者:齐玉堂,教授(E-mail)oilfat@126.com。

玉米醇溶蛋白是玉米蛋白中的主要成分,因其氨基酸组成主要是疏水性氨基酸,如谷氨酰胺、亮氨酸、脯氨酸和丙氨酸,而极性、带电的酸性氨基酸和碱性氨基酸含量则很少,所以其具有特殊的溶解性,即在纯水中的溶解度非常低<sup>[1]</sup>,而溶于乙醇溶液。

玉米醇溶蛋白特殊的溶解性阻碍了其在食品行业的应用。因此,很多研究利用壳聚糖、阿拉伯胶、果胶等多糖提高其亲水性,从而提高乳液的稳定性<sup>[2]</sup>。

研究表明,在低 pH、低离子强度、高温和长时间加热条件下可促进蛋白质的展开,进而形成纤维聚合物。Gao 等<sup>[3]</sup>在 pH 2.0、90 °C 条件下加热乳清蛋白 10 h 后形成状态良好的纤维聚合物。纤维聚合物的形成过程分为成核期、增长期和稳定期,成核期形成的主要是纤维核<sup>[4]</sup>。纤维核属于低聚物,具有高活化能和稳定性<sup>[5]</sup>。乳清蛋白纤维核是一种具有高活化能的低聚物,是乳清蛋白纤维形成过程中一种稳定的中间产物,具有良好的溶解性和乳化性。乳清蛋白纤维核与玉米醇溶蛋白的复合纳米粒能显著提升玉米醇溶蛋白的水溶性、乳化性及稳定性<sup>[6]</sup>。

Pickering 乳液是指利用固体颗粒稳定、不添加表面活性剂的乳液,近年来受到科学界的广泛关注<sup>[7]</sup>。然而,目前鲜有利用玉米醇溶蛋白颗粒稳定 Pickering 乳液的研究。本文基于乳清蛋白纤维核的良好溶解性和乳化性,与玉米醇溶蛋白复配,并用于制备玉米醇溶蛋白/乳清蛋白纤维核复合纳米粒稳定的 Pickering 乳液,探究不同复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液粒径、微观形貌、储藏稳定性及流变学特性的影响,从而促进玉米醇溶蛋白作为乳化剂制备 Pickering 乳液的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

微胚乳玉米,广西益宝油料玉米开发有限公司;乳清蛋白,合肥博美生物科技有限责任公司;盐酸、氢氧化钠、碘、碘化钾,国药集团化学试剂有限公司;玉米油,购于超市;异硫氰酸荧光素、尼罗红, Sigma - Aldrich 中国有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

ME204/02 电子天平、F20 pH 计,梅特勒 - 托利多仪器有限公司;冷冻干燥机,美国 Labconco 公司;Mastersizer 3000 激光粒度仪,马尔文帕纳科公司;激光共聚焦显微镜,日本 Olympus 公司;多功能流变仪,美国 TA 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 玉米醇溶蛋白的提取

将微胚乳玉米粉碎,过 0.250 mm (60 目)筛,按料水比 1:10 加入去离子水,在 60 °C 下加热糊化 15 min,加入 1.5% 淀粉酶酶解,搅拌。每 10 min 利用碘液检测溶液中是否还有淀粉残余,直至碘液不变

蓝,酶解结束,水洗,分离,所得沉淀在 50 °C 下真空干燥 10 h。

将脱淀粉样品在 50 °C 下以料液比 1:5 加入正己烷搅拌 1 h,抽滤,然后重复提取,直至残油低于 1%。将脱脂样品以料液比 1:10 加入 80% 乙醇溶液超声 40 min,离心,取上清液,加入与上清液等体积的 4 °C 去离子水,静置 12 h,离心,将沉淀冷冻干燥,得到玉米醇溶蛋白。

#### 1.2.2 乳清蛋白纤维核的制备

准确称取 10 g 乳清蛋白,溶于 250 mL 去离子水中,调节 pH 为 2,在 5 000 r/min 条件下离心 30 min,取上清液,测定蛋白质含量,用去离子水稀释,使蛋白质含量为 3%。然后调节 pH 为 2,在 90 °C 水浴下加热 2 h,得到乳清蛋白纤维核<sup>[8-10]</sup>。

#### 1.2.3 玉米醇溶蛋白/乳清蛋白纤维核复合纳米粒的制备

准确称取 3.0 g 玉米醇溶蛋白,溶于 100 mL 70% 乙醇溶液作为储备液,将储备液 pH 调节至 2.0。配制玉米醇溶蛋白与乳清蛋白纤维核质量比 2:3 的复合纳米粒溶液,利用旋转蒸发器将混合液中乙醇除去,然后于 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,使用激光粒度仪测定复合纳米粒的粒径和分散性系数(PDI),然后将上清液冷冻干燥,得到复合纳米粒<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.4 复合纳米粒乳化性的测定

为确定不同 pH 对复合纳米粒乳化性的影响,分别将 pH 为 2、7、12 的 15 mL 0.5% 复合纳米粒溶液与 5 mL 玉米油混合,使用高速分散机于 10 000 r/min 分散 3 min。立即取底部乳液 100 μL,加入到 5 mL 0.1% SDS 中混合均匀,以 0.1% SDS 为空白,在 500 nm 处测定吸光值(A)<sup>[12]</sup>。以玉米醇溶蛋白为对照。按下式计算乳化性( $E_s$ )。

$$E_s = \frac{2 \times 2.303 \times A \times N}{C \times \Phi \times 10\,000} \quad (1)$$

式中: $N$  为稀释倍数; $C$  为样品中蛋白质质量浓度; $\Phi$  为油相体积分数。

#### 1.2.5 Pickering 乳液的制备

分别取 1、2、3、4、5 g 复合纳米粒溶于 100 mL 去离子水中,充分搅拌后,依次加入 100 mL 玉米油,于 14 000 r/min 高速剪切 3 min,形成 Pickering 乳液,4 °C 保存备用。

#### 1.2.6 Pickering 乳液粒径的测定

分别取制备的 Pickering 乳液,用 Mastersizer 3000 激光粒度仪进行粒径的测定。水和玉米油的折射率分别是 1.33 和 1.47。乳液的粒径以面积平

均径( $d_{(3,2)}$ )及体积平均径( $d_{(4,3)}$ )表示<sup>[13]</sup>。

### 1.2.7 Pickering 乳液微观形貌的表征

使用异硫氰胺荧光素和尼罗红进行染色,以异丙醇为溶剂配制 1 mg/mL 的异硫氰胺荧光素和尼罗红溶液,在 1 mL Pickering 乳液中分别加入 20  $\mu\text{L}$  异硫氰胺荧光素溶液和 10  $\mu\text{L}$  尼罗红溶液,混匀,取 10  $\mu\text{L}$  染色后的乳液滴在载玻片上,盖上盖玻片后使用激光共聚焦显微镜观察乳液的微观形貌,其中尼罗红染色激发波长为 488 nm,异硫氰胺荧光素染色激发波长为 543 nm<sup>[14]</sup>。

### 1.2.8 Pickering 乳液的储藏稳定性

将 Pickering 乳液常温储存于 5 mL 储藏瓶中,在储藏 0、5 d 时测定粒径。

### 1.2.9 Pickering 乳液的表观黏度

使用多功能流变仪测定 Pickering 乳液的表观黏度<sup>[15]</sup>。测定条件:模具平板为 PU40 mm,剪切速率 0.1 ~ 10  $\text{s}^{-1}$ ,间隙 1 mm,25  $^{\circ}\text{C}$  平衡 5 min。

### 1.2.10 数据处理与分析

所有数据均采用 Origin 2018 软件绘图,SPSS 软件进行显著性分析。显著性水平设为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 复合纳米粒的粒径与 PDI 值

玉米醇溶蛋白与乳清蛋白纤维核质量比 2:3 制备的复合纳米粒的粒径为  $(205.0 \pm 4.2)$  nm, PDI 值为  $0.198 \pm 0.009$ ,表明复合纳米粒呈均一的纳米分散体系。

### 2.2 pH 对复合纳米粒乳化性的影响

pH 对玉米醇溶蛋白和复合纳米粒乳化性的影响如图 1 所示。

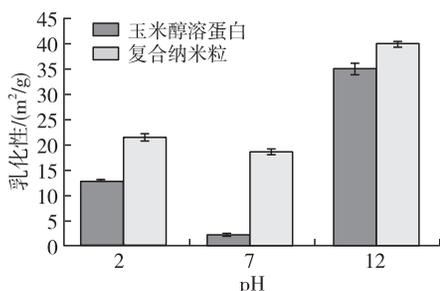


图 1 pH 对玉米醇溶蛋白和复合纳米粒乳化性的影响

由图 1 可知,随着 pH 的增加,玉米醇溶蛋白的乳化性先减弱后增强, pH 为 7 时乳化性最弱,因为此时 pH 接近玉米醇溶蛋白的等电点 ( $\text{pI } 6.2 \sim 6.8$ )<sup>[16]</sup>,分子之间的相互作用力减弱,液滴容易发生聚集,从而乳化性减弱,该结果与吴娜娜等<sup>[17]</sup>的研究结果一致。乳清蛋白纤维核有着良好的乳化性,与乳清蛋白纤维核复配后,玉米醇溶蛋白在不同

pH 下乳化性都有显著改善,其中中性条件下乳化性增强最为明显,可能是因为复配后等电点降低,在 pH 为 7 时蛋白质分子之间净电荷增加,相同电荷相互排斥,蛋白质颗粒凝聚减少,故液滴之间聚集减少,乳化性增强。因此,选择在中性条件下制备 Pickering 乳液。

### 2.3 Pickering 乳液体系的确定

采用异硫氰胺荧光素和尼罗红分别对蛋白质和油相进行染色,然后,使用激光共聚焦显微镜观察乳液液滴的分布情况。结果显示,水相中较均匀地分布着油相液滴,复合纳米粒包裹在油滴上,制备的 Pickering 乳液为水包油型乳液。

### 2.4 复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液粒径的影响

复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液粒径的影响如图 2 所示。

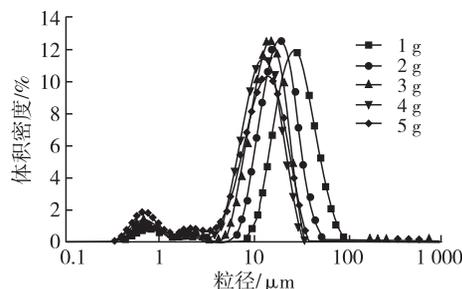


图 2 复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液粒径的影响

复合纳米粒添加量为 1、2、3、4、5 g 时, Pickering 乳液的  $d_{(3,2)}$  分别为 7.16、4.21、3.85、2.74、3.10  $\mu\text{m}$ 。所有乳液的平均粒径都在 10  $\mu\text{m}$  以下,随着复合纳米粒添加量的增加,乳液的平均粒径先减小后稍增大(见图 2)。这与王丽娟<sup>[18]</sup>的研究结果相似。在复合纳米粒添加量较低时,颗粒多吸附于油滴表面,此时颗粒较少,乳液体系并不稳定,油滴易聚集,故粒径较大。在一定范围内,随着复合纳米粒添加量的增加,颗粒间排斥增强,油滴不易聚集,粒径变小。当达到最小粒径时,增加复合纳米粒添加量不会使粒径继续变小。

### 2.5 复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液微观形貌的影响

复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液微观形貌的影响如图 3 所示。由图 3 可知, Pickering 乳液中油滴均为球型,复合纳米粒添加量少时,油滴大小不均一,体积较大的油滴周围围绕着体积较小的油滴,随着复合纳米粒添加量增大,提高了油滴间的排斥力,导致油滴尺寸变小和均匀度变好。在复合纳米粒添加量为 4 g 时,油滴的粒径最小且最均一,这与粒径测定结果一致。

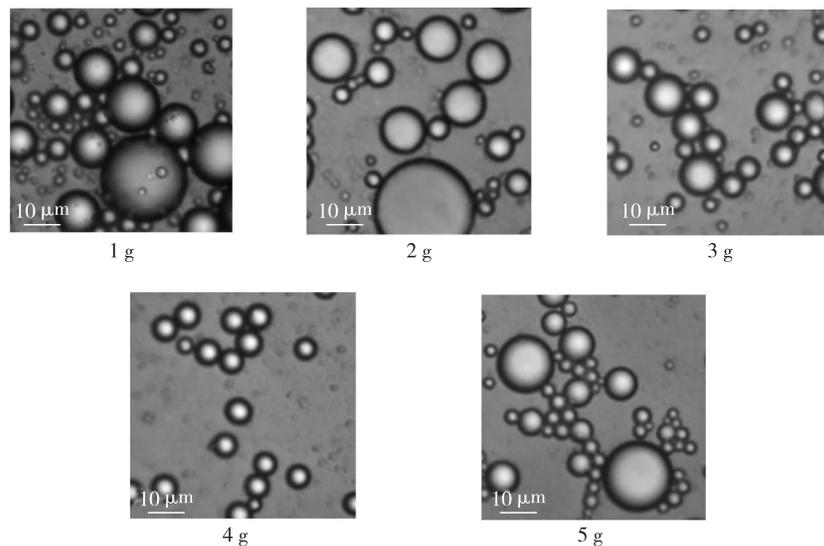


图3 复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液微观形貌的影响

## 2.6 复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液储藏稳定性的影响

不同复合纳米粒添加量的 Pickering 乳液储藏 0 d 和 5 d 的粒径如表 1 所示。

由表 1 可知,储藏 5 d 后,不同添加量的复合纳米粒稳定的 Pickering 乳液粒径都有所增加,但添加量大的乳液粒径始终较小。添加量为 4 g 和 5 g 的复合纳米粒稳定的 Pickering 乳液在储藏 5 d 后粒径趋于一致。添加量为 1~3 g 的复合纳米粒稳定的

Pickering 乳液在储藏 1 d 后出现明显的分层现象,乳液上浮,水相析出,说明体系不稳定。储藏 5 d 后,添加量为 4 g 和 5 g 的复合纳米粒稳定的 Pickering 乳液也出现分层现象,但随着添加量的上升,乳析速率变缓。添加量为 1 g 的乳液水相析出明显,而添加量为 5 g 时乳液出现分层但界面并不明显,这说明提高复合纳米粒添加量有利于提高乳液的稳定性,因为添加量大,浓度增加,从而形成了凝胶网络结构,而这种结构对乳液稳定性十分重要<sup>[19-20]</sup>。

表 1 复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液储藏稳定性的影响

复合纳米粒 添加量/g	储藏 0 d		储藏 5 d	
	$d_{(3,2)}/\mu\text{m}$	$d_{(4,3)}/\mu\text{m}$	$d_{(3,2)}/\mu\text{m}$	$d_{(4,3)}/\mu\text{m}$
1	$7.16 \pm 0.32^a$	$20.3 \pm 1.0^a$	$8.45 \pm 0.42^a$	$26.7 \pm 0.8^a$
2	$4.21 \pm 0.56^b$	$15.9 \pm 1.2^b$	$6.14 \pm 0.32^b$	$17.5 \pm 0.4^b$
3	$3.85 \pm 0.42^{bc}$	$11.3 \pm 0.5^c$	$4.79 \pm 0.33^c$	$13.1 \pm 0.5^c$
4	$2.74 \pm 0.10^c$	$8.6 \pm 0.5^d$	$3.97 \pm 0.21^c$	$11.3 \pm 0.4^c$
5	$3.10 \pm 0.33^{bc}$	$9.1 \pm 0.9^d$	$3.90 \pm 0.22^c$	$11.8 \pm 0.3^c$

注:同列数据不同字母上标表示在 0.05 水平上差异显著。

## 2.7 复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液表观黏度的影响

复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液表观黏度的影响如图 4 所示。

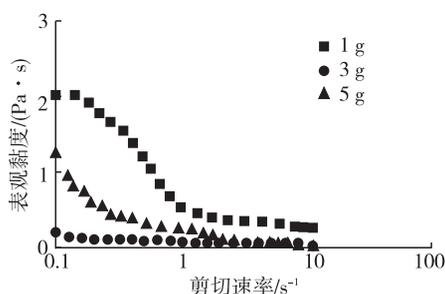


图4 复合纳米粒添加量对 Pickering 乳液表观黏度的影响

由图 4 可知,随着剪切速率的增大,乳液的表观黏度逐渐减小,为非牛顿流体中的假塑性流体。随着复合纳米粒添加量的增大,溶液的表观黏度先减小后增大。可能是因为在复合纳米粒添加量较低时,颗粒量不足以维持界面的稳定<sup>[21]</sup>,油滴易于聚集,从而黏度较大;随着复合纳米粒添加量增大,乳液达到最小粒径的过程中,油滴逐渐均一,流动阻力减小,使黏度减小;此后复合纳米粒添加量继续增大,不需要维持界面稳定的颗粒增多,这些颗粒相互聚集,使黏度增大。

## 3 结论

为了改善玉米醇溶蛋白的水溶性和乳化性,利

用反溶剂共沉淀法制备了玉米醇溶蛋白/乳清蛋白纤维核复合纳米粒,并将其用于制备 Pickering 乳液。结果表明:玉米醇溶蛋白与乳清蛋白纤维核复合后,乳化性明显提升,制备的 Pickering 乳液为水包油型乳液;在中性条件下 Pickering 乳液稳定性更佳;复合纳米粒添加量分别为 1、2、3、4、5 g 时, Pickering 乳液的  $d_{(3,2)}$  分别为 7.16、4.21、3.85、2.74、3.10  $\mu\text{m}$ , 粒径先减小后稍增大;复合纳米粒添加量为 4 g 时 Pickering 乳液的储藏稳定性较好;随着复合纳米粒添加量的增大, Pickering 乳液的表观黏度先减小后增大。

#### 参考文献:

- [1] 杨永杰. 玉米醇溶蛋白的研究及应用[J]. 天津化工, 2006, 20(4): 47-50.
- [2] LUO Y, ZHANG B, CHENG W H, et al. Preparation, characterization and evaluation of selenite - loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating [J]. Carbohydr Polym, 2010, 82(3): 942-951.
- [3] GAO Y Z, XU H H, JU T T, et al. The effect of limited proteolysis by different proteases on the formation of whey protein fibrils [J]. J Dairy Sci, 2013, 96(12): 7383-7392.
- [4] KUMAR E K, HAQUE N, PRABHU N P. Kinetics of protein fibril formation: methods and mechanisms[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 100: 30590-30596.
- [5] POWERS E T, POWERS D L. The kinetics of nucleated polymerizations at high concentrations: amyloid fibril formation near and above the "supercritical concentration" [J]. Biophys Chem, 2006, 91(1): 122-132.
- [6] OBOROCEANU D, WANG L, MAGNER E, et al. Fibrillization of whey proteins improves foaming capacity and foam stability at low protein concentrations[J]. J Food Eng, 2014, 121: 102-111.
- [7] BERTON - CARABIN C C, SCHROË N K. Pickering emulsions for food applications: background, trends, and challenges[J]. Annu Rev Food Sci T, 2014, 6(1): 263-297.
- [8] NILSSON M R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro [J]. Methods, 2004, 34(1): 151-160.
- [9] MUNIALO C D, MARTIN A H, LINDEN E V D, et al. Fibril formation from pea protein and subsequent gel formation [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(11): 2418-2427.
- [10] WANG J, XU H H, XU Y. Nanofibril formation of whey protein concentrate and their interfacial properties [J]. Adv Mater Res, 2013, 2203: 1268-1273.
- [11] 董世荣. 改性玉米醇溶蛋白结构形态与功能关系的研究[D]. 沈阳:东北农业大学, 2017.
- [12] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. J Agric Food Chem, 1978, 26(3): 716-723.
- [13] 吴滋灵. 玉米醇溶蛋白胶体颗粒稳定的高内相 Pickering 乳液制备及其营养输送特性研究[D]. 广州:华南理工大学, 2018.
- [14] YE F, MIAO M, JIANG B, et al. Elucidation of stabilizing oil - in - water Pickering emulsion with different modified maize starch - based nanoparticles [J]. Food Chem, 2017, 229: 152-158.
- [15] XIN G, CAMPBELL L J, EUSTON S R. Influence of sugars on the characteristics of glucono -  $\delta$  - lactone - induced soy protein isolate gels [J]. Food Hydrocolloid, 2009, 23(2): 314-326.
- [16] HUANG S, HE J, HAN L, et al. Zein - polyglycerol conjugates with enhanced water solubility and stabilization of high oil loading emulsion [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(42): 11810-11816.
- [17] 吴娜娜, 杨晓泉, 郑二丽, 等. 大豆油体乳液稳定性和流变性分析 [J]. 农业工程学报, 2012, 28(S1): 369-374.
- [18] 王丽娟. 玉米醇溶蛋白胶体颗粒的制备及应用研究 [D]. 广州:华南理工大学, 2014.
- [19] TZOUMAKI M V, MOSCHAKIS T, KIOSSEOGLOU V, et al. Oil - in - water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles [J]. Food Hydrocolloid, 2011, 25(6): 1521-1529.
- [20] TORRES L G, ITURBE R, SNOWDEN M J, et al. Preparation of O/W emulsions stabilized by solid particles and their characterization by oscillatory rheology [J]. Colloids Surf A, 2007, 302(1/2/3): 439-448.
- [21] DICKINSON E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions [J]. Trends Food Sci Tech, 2012, 24(1): 4-12.