

大豆分离蛋白乳状液稳定性的几种分析方法比较

张芬芬, 曾茂茂, 何志勇, 陈洁*

(江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 用不同质量分数(0.5%、1%、2%、3%)的大豆分离蛋白(SPI)和大豆油制备 3% O/W 型乳状液, 比较不同离心力作用下和添加不同量 SPI 乳状液稳定性的差异以及添加不同量 SPI 乳状液黏度的差异, 考察贮存期延长过程中的浊度法测定乳状液稳定性以及乳状液粒径和 Zeta 电位的变化, 结合外观和微观观察, 寻找一种快速准确测定乳状液稳定性的方法。结果表明: 离心法、贮存期浊度法与乳状液外观观察的结论一致, 都表明添加 3% SPI 的乳状液最稳定, 并且 SPI 添加量越高, 乳状液黏度越大, 稳定性越好。贮存期乳状液平均粒径和 Zeta 电位发生变化, 但难以作为乳状液稳定性的判断标准。本实验进一步验证, 离心法能够快速、准确地预测乳状液的稳定性, 适于产品开发和成品检验的需要。

关键词: 大豆分离蛋白; 乳状液; 稳定性分析; 离心法

Comparison of Analytical Methods for Evaluating the Stability of Soybean Protein Isolate Emulsions

ZHANG Fen-fen, ZENG Mao-mao, HE Zhi-yong, CHEN Jie*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Oil-in-water emulsions were prepared by combinations of various concentrations (0.5%, 1%, 2% and 3%) of soybean protein isolate (SPI) with 3% soybean oil. We analyzed the differences of these emulsions in stability under various centrifugal forces and viscosity under various shearing rates. Meanwhile, we evaluated the storage stability of these emulsions by measuring the turbidity, and the changes in particle size and Zeta potential and performing visible and microscopic observations. The above experiments consistently showed that the emulsion with 3% SPI had the best stability. Moreover increasing SPI concentration resulted in higher viscosity and better stability. Despite of having changes during storage, average particle size and Zeta potential were not suitable to be used for evaluating the stability of emulsions. This study further confirms that the centrifugation method allows rapid and accurate prediction of the stability of emulsions and therefore can be used in product development and testing.

Key words: soybean protein isolate; emulsion; stability analysis; centrifugation method

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0044-04

乳状液体系是食品、保健品、化妆品、饲料以及药品等领域最重要的体系之一。乳浊体系是由多种物质组成的复杂乳状液体系, 属热力学不稳定体系^[1]。乳状液的稳定性特别是乳化稳定性一直是食品加工行业面临的难点之一。乳饮料属于蛋白质乳浊体系, 蛋白质乳浊体系的不稳定, 严重影响到产品的外观和货架期, 是乳品工业中常遇到的问题, 其主要表现为蛋白质沉淀、脂肪上浮、析水等^[2]。这些变化在产品实验和生产中很难被肉眼发现, 仅能通过加速实验或者其他相关分析方

法, 与实际产品贮存期变化相比较, 从而在较短时间内准确判断产品的稳定寿命, 并及时对产品进行调整。

判断乳状液稳定性的方法很多, 常温放置观察是很多企业目前采用的方法, 这种方法准确性相对较高, 但耗费时间长, 不适应产品开发和检验的需要。粒径分析测定乳状液稳定性也存在着一定的争议, 苏米亚等^[3]通过离心、显微镜分析、激光粒径分析和稳定性分析仪检测等方法对超高温牛奶产品货架期内的稳定性进行了分析, 发现稳定性分析和粒径分析相结合, 可以得

收稿日期: 2011-07-25

基金项目: 国家“973”计划前期研究专项(2010CB535014); 国家自然科学基金项目(20976071)

作者简介: 张芬芬(1987—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品蛋白质功能研究。E-mail: Felicia.87@163.com

* 通信作者: 陈洁(1969—), 女, 教授, 博士, 主要从事食品蛋白质功能研究。E-mail: chenjie@jiangnan.edu.cn

到更为有效的分析报告。张秀玲等^[4]采用粒径分析和离心沉淀分析方法研究了络合剂对蓝莓果汁乳饮料稳定性的影响,确定了最佳的络合剂条件。但是Tcholakova等^[5]用离心法对乳状液短期稳定性进行评价,与长期稳定性的比较表明,短期贮存期乳状液平均粒径的变化与长期稳定性没有联系。目前基于光散射技术的Turbiscan Lab分散稳定性分析仪也主要用于分析乳状液的稳定性,苏米亚等^[3]用稳定性分析仪测定了不同牛奶产品的状态变化,杭铎等^[6]用Turbiscan Lab分散稳定性分析仪评价超高温灭菌乳稳定性。因此,本实验采用不同方法测定乳状液的稳定性,并与贮存期实际观察结果相比较,以期得到一种快速准确预测乳状液稳定性的方法。

大豆分离蛋白(SPI)具有良好的溶解性、起泡性和乳化性等,现已有较多乳制品公司应用大豆分离蛋白来改善口味、降低成本,另外,由于乳清蛋白价格的急剧上涨和双蛋白工程的提倡,大豆分离蛋白更加引起了企业的重视^[7]。本实验以大豆分离蛋白为乳化剂,选择不同的实验方法,通过综合分析,以期找到一种快速判断乳状液产品稳定性及变化趋势的方法,为产品开发中的配方选择及生产中的产品检验提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

乳化型大豆分离蛋白(湿基蛋白含量为84.86%) 南通光合技术有限公司;金龙鱼大豆油 嘉里粮油有限公司;十二烷基磺酸钠(SDS,分析纯) 上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

T18型高速分散机 广州仪科实验室技术有限公司;AH-basic型高压均质机 ATS工业系统有限公司;UV-2800型紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)科学仪器有限公司;Nano ZS动态光散射仪 马尔文仪器有限公司;DM5000B相差显微镜 莱卡显微系统有限公司;AR-G2流变仪 英国TA Instrument公司;LRH-150生化培养箱 上海恒科技有限公司;IKA RO10高效10点磁力搅拌器 广州仪科实验室技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 乳状液的制备

分别准确称取1.25、2.5、5、7.5g SPI溶于242.5g水中,磁力搅拌1h后制成不同质量分数的水相,然后准确称取4份7.5g大豆油作为油相,将油相分别加入不同的水相混合搅匀,置于55℃保温10min,然后用高速分散机在21500r/min条件下乳化2min,再将乳状液用高压均质机在30MPa均质2次,最后得到4种250mL不同

蛋白质量分数(0.5%、1%、2%、3%)的3% O/W型乳状液,并加入NaN₃(0.02g/100mL)作为抑菌剂。

1.3.2 浊度法测定乳状液稳定性

参考Pearce等^[8]的方法。将制备好的乳状液迅速倒入15mL小瓶中,在离瓶底2cm处取30μL乳状液于试管中,在试管中加入5mL 0.1% SDS溶液,混匀后在500nm处测定吸光度。浊度用500nm波长处的吸光度 A_{500nm} 表示。

$$\text{乳状液稳定性}/\% = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 和 A_t 分别表示乳化液放置0和 t (贮存期)时间后的吸光度。

1.3.3 离心法测定乳状液稳定性

在2mL圆底离心管中准确加入2mL乳状液,选择不同的离心力($100 \times g$ 、 $300 \times g$ 、 $500 \times g$ 、 $800 \times g$ 、 $1000 \times g$ 、 $1500 \times g$ 、 $2000 \times g$ 、 $3000 \times g$)离心10min,在距离心管底部1cm处取样,采用浊度法测定吸光度(A_{500nm})。乳状液稳定性系数用式(2)计算。

$$\text{乳状液稳定性系数} = \frac{A_t}{A_0} \quad (2)$$

式中: A_0 为离心前乳状液的吸光度; A_t 为离心后乳状液的吸光度。

1.3.4 乳状液黏度的测定

采用AR-G2流变仪的稳态转动模式(steady state flow)测定添加不同质量分数SPI的乳状液黏度差异。夹具为4cm,锥板4°,测定参数为(25 ± 0.1)℃,剪切速率为 $0.1 \sim 100s^{-1}$,所有的测定在乳状液制备好的24h内完成^[9]。

1.3.5 乳状液中乳化颗粒性质的表征

用粒径和Zeta电位表征乳状液中乳化颗粒的性质^[10]。为了避免质量分数过高而导致的多重散射效应,用纯净水将制备好的乳状液稀释到质量分数0.05%后进行测定,测定温度为25℃,分散体系折射系数1.33,黏度 $0.89mPa \cdot s$ 。使用马尔文Nano ZS型粒度仪中的DTS1060C模具,在SOP模式分别测定乳状液的粒径和Zeta电位。

1.3.6 乳状液微观结构的观察

取2μL乳状液样品滴在载玻片上,盖上盖玻片,并确保盖玻片和载玻片中间没有气泡。将制备好的样品放置在相差显微镜下观察,找到有代表性的图片后,用显微镜附带的相机进行拍摄,在连接相机的电脑上记录下拍摄的图片。

1.3.7 乳状液外观的观察

取 15mL 制备好的乳状液分装于带盖的小瓶中在 37℃ 条件下保存,在不同贮藏时间时取出用浊度法测其稳定性,并且用数码相机进行拍摄,记录下乳状液在放置过程中的外观变化。

2 结果与分析

2.1 不同离心力作用下乳状液的稳定性差异

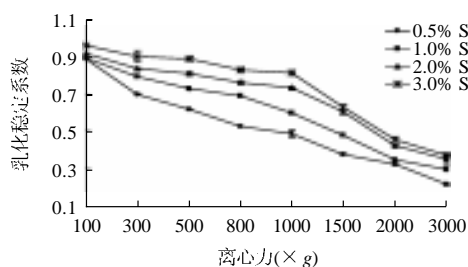


图1 离心力对添加不同添加量 SPI 的乳状液稳定性影响
Fig.1 Effect of centrifugal force on the stability of emulsions with different contents of SPI

从图1可以看出,随着离心力的增大,4种乳状液的稳定性越来越差,趋于崩溃。当离心力较小时,不足以破坏液滴间的相互作用,4种乳状液间稳定性差异不大;随着离心力的增大,乳状液中液滴间相互作用力的破坏作用增大,稳定性差异变得明显;而当离心力超过 $2000 \times g$ 时,稳定性差异又减小,可能是因为在较大的离心力下,离心力已经远远大于不同乳状液中液滴间的相互作用,使得相互之间差异性减小^[11]。此外,随着添加 SPI 量的增加,乳状液稳定性增加,可能由于有足够的蛋白质作为乳化剂降低了油水界面的张力,使得乳状液更加稳定。

2.2 添加不同量 SPI 对乳状液黏度的影响

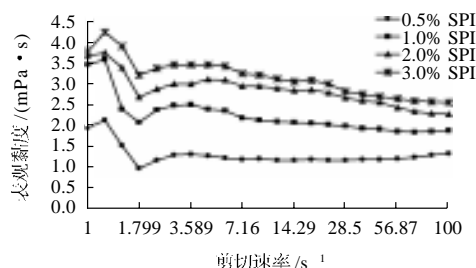


图2 不同含量 SPI 的乳状液黏度变化
Fig.2 Viscosity change of emulsions with different contents of SPI

如图2所示,当剪切速率从 $2s^{-1}$ 增大到 $100s^{-1}$,表观黏度变化很小,且 SPI 添加量越大,乳状液表观黏度越大,乳化稳定性越好。Rambhau 等^[12]研究了不同乳

化剂和不同油对制得的乳状液稳定性的影响,结果表明乳状液稳定性差异主要是由于油和乳化剂的化学性质以及分子间的兼容性引起的,而与黏度关系不大。但是对于本实验,在油和乳化剂一定的情况下,可能由于黏度大,液滴间相互碰撞聚集机会减少^[13],所以乳状液更稳定。

2.3 乳状液贮存期稳定性、粒径和 Zeta 电位的变化

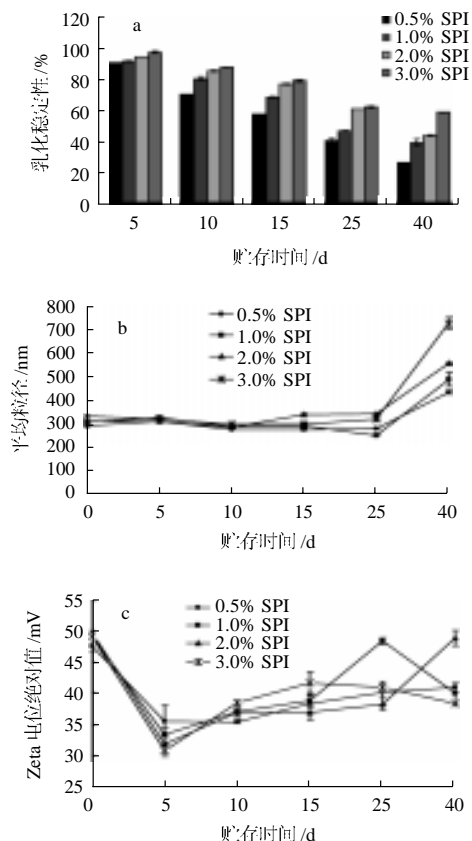


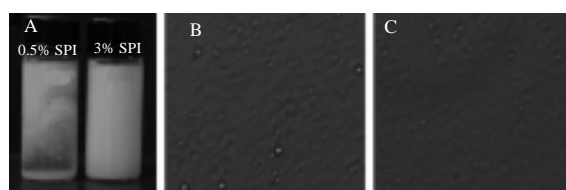
图3 贮存期间不同 SPI 添加量的乳状液稳定性(a)、粒径、Zeta 电位绝对值(c)的变化
Fig.3 Changes in stability (a), average particle size (b) and Zeta potential (c) emulsions with different contents of SPI during storage

如图3a所示,随着贮存期的延长,乳状液稳定性下降,可能由于随着时间的延长,液滴间聚集严重,导致稳定性下降,另外, SPI 添加量越高,乳化稳定性越好,这与 Tcholakova 等^[5]对蛋黄稳定的乳状液贮存期稳定性下降的结果相吻合。乳状液随贮存期的延长其粒径变化如图3b所示,在贮存25d前,平均粒径变化不大,并没有出现粒径变大的趋势,这与 Tcholakova 等^[5]的研究结果相符,但在40d时粒径陡增,可能是由于乳状液聚集严重而导致。贮存期间乳状液的 Zeta 电位变化如图3c所示,添加不同含量 SPI 的乳状液刚均质完的 Zeta 电位没有显著性差异,但是当贮存5d后, Zeta 电位下降

较大, 这可能与油滴表面的乳化剂含量有关, 随贮存期延长, 蛋白的聚集或者降解使得油滴表面覆盖的 SPI 减少, 从而导致电位变化^[12]。徐明进等^[14]研究了 Zeta 电位对水包油型乳状液稳定性的影响, 结果表明当界面膜强度相差不大时, Zeta 电位绝对值越大, 乳状液稳定性越好。

2.4 乳状液外观和微观观察

乳状液贮存 40d 后, 外观观察表明添加 0.5% SPI 的乳状液絮凝严重, 出现明显不稳定情况, 而添加 3% SPI 的乳状液外观仍保持稳定状态(图 4A), 这与离心法和浊度法的结果相吻合, 从而验证了离心法测定乳状液稳定性的准确性。由微观观察的结果(图 4B、C)可以看出, 添加 0.5% SPI 的乳状液液滴比添加 3% SPI 乳状液的液滴大, 可能是由于低大豆蛋白质量分数条件下的乳状液黏度小, 液滴间碰撞机会增加, 使得液滴间趋向于聚集, 从而导致不稳定。



A 是拍摄的乳状液外观; B、C 分别是添加 0.5%、3% SPI 的乳状液放大 400 倍后的微观图。

图 4 添加不同添加量 SPI 的乳状液贮存 40d 后的外观和相差显微镜图
Fig.4 Appearance and phase contrast microscopic images of emulsions with different contents of SPI after storage for 40 days

3 结 论

不同方法测定乳状液稳定性的结果表明, 离心法与贮存期浊度法的结果相同, SPI 添加量越高, 乳状液稳定性越好。随着贮存期的延长, 浊度法测得的乳状液稳定性下降, 与实际观察结果相吻合。通过不同离心力下稳定性的测定能够快速准确的判断乳状液的稳定性差异, 但要选择合适的离心力, 离心力太大或者太小, 乳状液之间的稳定性差异不显著, $(300 \sim 1500) \times g$ 离心 10min 时各种乳状液稳定性的差异较大。对于贮存期浊度法测定, 短期内稳定性差异较小, 长期贮存差异较

大, 但是耗时长, 不利于及时更改产品配方和开发的需要。通过不同贮存期粒径和 Zeta 电位的变化, 可以推测产品是否发生聚集, 有助于判断造成产品不稳定的内在原因, 但是难以用平均粒径和 Zeta 电位绝对值的大小来判断乳状液之间稳定性的差异。对乳状液的外观观察能准确直接地表征乳状液的稳定性好坏, 但是耗时长; 显微镜观察对推断乳状液均质效果和液滴分散情况有一定的帮助, 但是主观性较强。综上所述, 离心法操作简便, 能够短期内对乳状液的稳定性准确判断。

参考文献:

- [1] DICKINSON E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology[J]. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 2001, 20(3): 197-210.
- [2] 张立永, 生庆海, 陈平, 等. 酸乳饮料稳定性预测模型的研究[J]. *核农学报*, 2008, 22(4): 464-468.
- [3] 苏米亚, 莫蓓红. 超高温牛奶产品货架期内的稳定性分析方法[J]. *乳品科学与技术*, 2006(5): 221-226.
- [4] 张秀玲, 江连洲, 陈蓓莉. 粒径分析法研究络合剂对蓝莓果汁乳饮料稳定性的影响[J]. *中国乳品工业*, 2008, 36(12): 26-29.
- [5] TCHOLAKOVA S, DENKOV N, IVANOV I B, et al. Evaluation of short-term and long-term stability of emulsions by centrifugation and NMR[J]. *Bulgarian Journal of Physics*, 2004, 31(3/4): 96-110.
- [6] 杭锋, 郭本桓, 任璐, 等. 基于混料设计优化超高温灭菌乳复配乳化剂[J]. *化工学报*, 2009, 60(4): 984-989.
- [7] 罗薇, 李晓东, 张福军, 等. 大豆分离蛋白在乳制品中的应用[J]. *中国乳品工业*, 2007, 35(6): 62-64.
- [8] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26(3): 716-723.
- [9] SUN Changhui, GUNASEKARAN S. Rheology and oxidative stability of whey protein isolate-stabilized menhaden oil-in-water emulsions as a function of heat treatment[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(1): C1-C8.
- [10] 吕兵, 陈洁, 夏文水. 乳化剂、油浓度及油滴粒径对乳状液中油脂氧化稳定性的影响[J]. *粮油加工*, 2007, 58(3): 53-55.
- [11] McCLEMENTS D J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2007, 47(7): 611-649.
- [12] RAMBHAU D, PHADKE D S, DORLE A K. Evaluation of O/W emulsion stability through Zeta potential: I[J]. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1977, 28(4): 183-196.
- [13] MAKRI E A, DOXASTAKIS G I. Study of emulsions stabilized with *Phaseolus vulgaris* of *Phaseolus coccineus* with the addition of Arabic gum, locust bean gum and xanthan gum[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(8): 1141-1152.
- [14] 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(6): 623-627.