

# 超声处理大豆分离蛋白与壳聚糖复合物对O/W型乳液稳定性的影响

丁 俭, 隋晓楠, 王 婧, 董济萱, 马文君, 李 杨, 齐宝坤, 江连洲\*  
(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 为探究超声处理大豆分离蛋白-壳聚糖 (soybean protein isolate-chitosan, SPI-CS) 复合物对形成O/W型乳液性质的影响, 主要研究了复合物表面疏水性、乳化活性、乳化稳定性与油-水界面张力、乳液粒径、乳液稳定性之间的关系。结果表明: 未经超声处理的SPI-CS复合物表面疏水性、乳化活性、乳化稳定性和界面吸附性较低, 形成的O/W型乳液粒径相对较大, 约100  $\mu\text{m}$ , 乳液Zeta电位较低, 乳滴有发生聚集的倾向。乳液贮存7 d后乳层析指数最高。经超声处理后SPI-CS复合物形成的乳状液性质发生明显变化, 随着超声功率的增加, 形成的O/W型乳液的稳定性有所增加: 超声功率为400 W时SPI-CS复合物形成的乳液最为稳定, 乳层析指数最低; 当超声功率超过400 W时, 乳液的光学显微镜观察显示其粒径有所增大, 同时乳液的Zeta电位、乳化活性和乳化稳定性明显下降, 界面张力降低缓慢。超声处理暴露了蛋白质分子的内部结构, 使部分结构展开、柔性增加, 促进了其与壳聚糖之间的静电相互作用, 说明超声处理的大豆分离蛋白与壳聚糖形成的复合物影响了O/W型乳液的稳定性及相关性质。

**关键词:** 超声处理; 大豆分离蛋白; 壳聚糖; O/W型乳液; 稳定性

## Effect of Ultrasonic Treatment on Stability of Oil-in-Water (O/W) Emulsion Containing Soybean Protein Isolate-Chitosan Complex

DING Jian, SUI Xiaonan, WANG Jing, DONG Jixuan, MA Wenjun, LI Yang, QI Baokun, JIANG Lianzhou\*  
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The purpose of this study was to explore the effect of ultrasonic treatment on the properties of O/W emulsion containing soybean protein isolate-chitosan (SPI-CS) complex. The relationship between surface hydrophobicity, emulsifying activity and emulsion stability and oil-water interfacial tension, particle size and stability of the emulsion were investigated. The results showed that surface hydrophobicity, emulsifying activity, emulsion stability and interfacial adsorption of SPI-CS without ultrasonic treatment were relatively low, and the particle size of the formed O/W emulsion was about 100  $\mu\text{m}$ . The zeta potential of the emulsion was low and the droplets tended to aggregate. Creaming index was the highest after storage for 7 days. Ultrasonic treatment of SPI-CS formed emulsions with markedly improved properties. The O/W emulsion became more stable with increasing ultrasonic power, and it had the highest stability and lowest creaming index at 400 W. However, when the ultrasonic power exceeded 400 W, the particle size of emulsions was increased under light microscope, and zeta potential, emulsifying activity, emulsion stability and interfacial tension decreased obviously. Ultrasonic treatment exposed the internal structure of SPI protein molecules, unfolded part of the protein structure and increased molecular flexibility, thereby promoting the electrostatic interaction between chitosan and the protein, which indicated that ultrasonic-treated SPI-CS could affect the stability and relevant properties of O/W emulsion.

**Keywords:** ultrasonic treatment; soybean protein isolate; chitosan; O/W emulsion; stability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201813012

中图分类号: TS214.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 13-0074-07

引文格式:

丁俭, 隋晓楠, 王婧, 等. 超声处理大豆分离蛋白与壳聚糖复合物对O/W型乳液稳定性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 74-80. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201813012. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-03-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31571876); “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2016YFD0400700)

第一作者简介: 丁俭 (1989—), 男, 博士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白。E-mail: 18845619206@163.com

\*通信作者简介: 江连洲 (1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: jlzname@163.com

DING Jian, SUI Xiaonan, WANG Jing, et al. Effect of ultrasonic treatment on stability of oil-in-water (O/W) emulsion containing soybean protein isolate-chitosan complex[J]. Food Science, 2018, 39(13): 74-80. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201813012. <http://www.spkx.net.cn>

大豆分离蛋白作为天然大分子,具有较高的营养价值和较好的功能特性,其分子具有双亲性结构,使蛋白质具有较好的乳化性,可以作为乳化剂扩散并吸附在油-水界面<sup>[1]</sup>。大豆分离蛋白作为乳化剂,可以形成O/W型乳液,是重要的食品配料。但由于大豆分离蛋白作为乳化剂所稳定的O/W型乳液仍是一种热力学不稳定体系,其稳定性易受到环境等因素的影响<sup>[2]</sup>。为了提高大豆分离蛋白的功能特性,拓展大豆分离蛋白在食品加工中的应用,有研究利用热处理、超声、微波、超高压等技术改变蛋白质的空间结构和分子排布,从而改善蛋白质的功能特性,提高所形成乳液的稳定性<sup>[3-6]</sup>。

在食品加工中,由于受到食品体系环境条件的影响,当蛋白质所处的溶液体系pH值在其等电点附近时,其乳化性能基本消失。有研究表明,通过蛋白与多糖的复合可以改善乳液的稳定性,而且蛋白-多糖复合体系是一种合适的食品配料,蛋白与多糖之间相互作用可以作为蛋白质乳化、结构修饰的一种重要手段<sup>[7]</sup>。壳聚糖作为天然阳离子多糖,可以与蛋白质通过静电相互作用和氢键在pH 2.5~5.0之间形成可溶性复合物,其构建的乳液在酸性环境中能保持较好的稳定性。Huang Guoqing等<sup>[8]</sup>的研究表明,pH 3.0~5.0时大豆分离蛋白-壳聚糖(soybean protein isolate-chitosan, SPI-CS)复合的效果好,形成的复合物较为稳定。在蛋白质-多糖复合物稳定的乳液中,蛋白质分子会吸附在油-水界面,而多糖与蛋白质发生静电相互作用包裹在油滴表面,形成层层沉积的界面膜结构,提高了乳液的稳定性。Jourdain等<sup>[9]</sup>通过静电相互作用把壳聚糖吸附到由 $\beta$ -乳球蛋白制备的乳液表面,发现在等电点(pH 4.5~5.5)附近乳液仍保持较好的稳定性。Wang Xiaomei等<sup>[10]</sup>通过干热处理制备SPI-CS复合物,发现复合物的乳化性能相比大豆分离蛋白得到很好的改善,且形成的乳液的粒径较小,絮凝程度降低。

综上所述,大豆分离蛋白与壳聚糖的复合对形成乳液的稳定性有重要影响,但关于超声处理SPI-CS复合物的结构特性与形成O/W型乳液稳定性关系的研究目前仍然有限。因此,为了使蛋白和多糖能够形成更加稳定的复合物及乳液,本研究利用不同超声功率处理,控制大豆蛋白与壳聚糖所形成的复合物的结构,构建O/W型乳液体系,并对SPI-CS复合物的相关性质和形成O/W型乳液体系的稳定性进行研究。通过研究复合物的乳化活性指数(emulsification activity index, EAI)、乳化稳定性指数(emulsification stability index, ESI)和界面学

特性,分析超声处理后蛋白质分子结构的改变对复合物的形成及在乳液油滴表面吸附过程中的影响。通过Zeta电位和平均粒径表征复合物形成乳液的性质,最后采用光学显微镜观察乳液体系的微观结构。本研究为开发蛋白乳化体系的新型食品配料,构建流变性和稳定性好的SPI-CS O/W型乳液提供了理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白由本实验室自制;食品级壳聚糖(平均分子量150~500 kDa,脱乙酰度大于90%,水分质量分数8.0%) 郑州优然食品配料有限公司;葵花籽油北京金世仓粮油贸易有限公司;氢氧化钠 天津市光复精细化工研究所;盐酸 北京新光化工试剂厂;乙酸、磷酸二氢钠 天津市东丽区天大化学试剂厂;1-苯胺基-8-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS) 美国Sigma公司;其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司;AL204型分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;6 L落地式冻干机 上海汇分电子科技有限公司;pHSJ-4A型实验室pH计 上海雷磁公司;GL-20G-II型高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂;ULTRA-TURRAX UTL2000乳化机 德国IKA仪器设备有限公司;Master-sizer 2000激光粒度仪 英国马尔文仪器有限公司;PALS-Zeta电位仪 美国布鲁克海文仪器有限公司;FB-110T超高压均质机 上海励途机械设备工程有限公司;F-4500型荧光分光光度计 日本HITACHI公司;UV-5100型高性能紫外-可见分光光度计 上海奥析科学仪器;BX53型显微镜 日本奥林巴斯公司;J-810型圆二色光谱仪、J-810型分光偏振计 日本JASCO公司;DCAT21型全自动表面张力仪 德国Sartorius公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 大豆分离蛋白的制备

采用Petruccelli等<sup>[11]</sup>的方法。将大豆粉碎后用正己烷萃取,得脱脂豆粕。脱脂豆粕与水混合(料液比1:20),用2 mol/L的NaOH溶液调节pH值至8.0,25 ℃下搅拌2 h后进行离心(10 000×g、30 min、4 ℃),离心后的上清液用2 mol/L的HCl溶液调节pH值至4.5。静置后再次离心(6 000×g、20 min、4 ℃),将下层沉淀再于5倍体积的蒸馏水中洗涤3次,最后用蒸馏水溶

解沉淀,用2 mol/L的NaOH溶液调节pH值至7.0后离心(10 000×g、30 min、4℃),取上清液在4℃下用去离子水透析48 h脱盐,冷冻干燥,即为大豆分离蛋白,其蛋白质量分数为90.11%,粗脂肪质量分数为1.43%,灰分质量分数为4.51%。

### 1.3.2 大豆分离蛋白的超声处理

将大豆分离蛋白溶解在去离子水中,在室温下搅拌2 h。超声处理方法和条件参考Hu Hao等<sup>[12]</sup>的方法,将超声处理器的钛探头(直径0.636 cm)插入液面,超声时间4 s,间隔时间2 s,在此条件下300 W超声处理12 min时蛋白的EAI和ESI最高,而450 W超声处理24 min时,过高功率和长时间处理会造成蛋白的乳化性质下降。在此方法基础上进行一定改进,本实验选择在20 kHz下,输出功率分别为200、300、400、500、600 W超声处理蛋白溶液15 min,得到大豆分离蛋白溶液。

### 1.3.3 不同超声条件处理SPI-CS复合物的制备

准确称取一定质量的不同超声条件处理大豆分离蛋白样品溶于去离子水中,使蛋白质量浓度为20 mg/mL。准确称取一定质量的壳聚糖样品溶于100 mmol/L乙酸缓冲液(pH 3.0)中,在室温下搅拌3 h后放入冰箱中水化过夜,得到壳聚糖质量浓度为10 mg/mL的储备液。将壳聚糖与大豆分离蛋白按照质量比1:3在pH 2.0~5.0条件下进行复合,最终确定可溶性复合物最佳的复合条件为pH 3.0,在复合物中添加0.02 g/L叠氮化钠防止微生物生长。

### 1.3.4 圆二色光谱的测定

利用圆二色光谱在远紫外区(190~260 nm)测定蛋白质二级结构。将制得的不同超声条件处理的SPI-CS复合物溶液稀释10倍,使用光谱分辨率0.2 nm的J-810分光偏振计在25℃下进行测定。样品池光程为0.1 cm,扫描速率为100 nm/min,响应时间为0.125 s,使用缓冲溶剂进行校正,每个样品重复测定3次。

### 1.3.5 不同超声条件处理SPI-CS复合物表面疏水性的测定

超声处理SPI-CS复合物的表面疏水性测定参考Kato等<sup>[13]</sup>的方法,将不同超声条件处理的SPI-CS复合物溶液以10 000×g离心30 min,取上清液测定蛋白质量浓度,用0.01 mol/L磷酸盐缓冲液依次将蛋白样品稀释,保证质量浓度在0.05~0.40 mg/mL。实验中激发波长 $\lambda_{ex}$ =390 nm,发射波长 $\lambda_{em}$ =468 nm,夹缝宽度为5 nm,扫描速率10 nm/s。取溶液4 mL,分别加入40  $\mu$ L用0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)配制的最终浓度为8 mmol/L的ANS溶液,经快速振荡混合后静置3 min,利用F-4500型荧光分光光度计测定样品荧光强度。以荧光强度与蛋白质量浓度作图,表面疏水性的值为蛋白质量浓度的初始段斜率。

### 1.3.6 不同超声条件处理SPI-CS复合物EAI和ESI的测定

SPI-CS复合物的EAI和ESI测定参考Nakamura等<sup>[14]</sup>的

方法。取30 mL SPI-CS复合物,分别加入10 mL葵花籽油进行均质(20 000 r/min均质1 min),取50  $\mu$ L乳液加入5 mL 0.1 g/L的SDS溶液稀释,在500 nm波长处测吸光度 $A_0$ 。静置30 min后,再次从底部各取50  $\mu$ L样品,测定吸光度 $A_{30}$ 。EAI/(m<sup>2</sup>/g)和ESI/min计算公式如式(1)、(2)所示。

$$EAI/(m^2/g) = 2 \times 2.303 \frac{A_0 \times N}{\rho \times \varphi \times 10\,000} \quad (1)$$

$$ESI/min = \frac{A_0}{A_0 - A_{30}} \times 30 \quad (2)$$

式中: $N$ 为稀释倍数(250); $\rho$ 为乳化液形成前溶液中SPI-CS复合物质量浓度/(g/mL); $\varphi$ 为乳化液中油相体积分数%; $A_0$ 为0 min时的吸光度; $A_{30}$ 为30 min时的吸光度。

### 1.3.7 不同超声条件处理SPI-CS复合物界面张力的测定

不同超声条件处理SPI-CS复合物的界面张力测定参考梁蓉<sup>[15]</sup>的方法,将制备好的复合物配制成不同质量浓度的溶液,采用DCAT21全自动表面张力仪测定葵花籽油油相的界面张力。实验中选用小号铂金片(长度为10.00 mm、宽度为9.95 mm、厚度为0.20 mm)。首先将铂金片用蒸馏水清洗干净,再用酒精灯灼烧至微红,时间为20~30 s,冷却后挂在仪器上待用。将待测溶液加入到样品皿中,置于升降平台上进行测定。

### 1.3.8 不同超声条件处理SPI-CS复合物O/W型乳液的制备

按照最佳的复合条件,将SPI-CS复合物溶液调节至pH 3.0,然后向混合液中加入2.5%的葵花籽油,均质制备乳液,转速为30 000 r/min,均质3 min,得到不同类型的乳液,加入0.02 g/L叠氮化钠抑制微生物生长,4℃下贮藏。

### 1.3.9 乳液Zeta电位和平均粒径的测定

参照齐军茹等<sup>[16]</sup>的方法,将制备的不同乳液分散到pH 3.0的磷酸盐缓冲液中,使其质量分数为0.005%,在常温下测定其Zeta电位,测定时的温度为25℃,每个样品平行测定3次。同样将不同乳液分散到pH 3.0的磷酸盐缓冲液中,使其质量分数为0.100%,用激光粒度仪测定其平均粒径,达到相应的遮光度后进行测定,每个样品平行测定3次。

### 1.3.10 乳液的光学显微镜观察

取新鲜乳液样品置于正置显微镜载物台上,用载玻片固定,40倍光学显微镜观察。用BX53显微镜获取照片,照片从连接到电脑的数字图像处理软件获得。

### 1.3.11 乳析稳定性的测定

乳液乳析稳定性的测定参考Moschakis等<sup>[17]</sup>的方法。将制备好的新乳液分别置于10 mL的具塞比色管中,于室温条件下20℃放置7 d,为防止微生物的生长,加入

少量的叠氮化钠 (0.02 g/L)，将具塞比色管用玻璃塞密封，每天进行乳液乳析稳定性的测定并记录。乳析稳定性通常采用乳析指数 (creaming index, CI) 表示，如式 (3) 所示计算。

$$CI/\% = \frac{H_s}{H_T} \times 100 \quad (3)$$

式中： $H_s$ 为乳清层的高度/cm； $H_T$ 为比色管中乳液的高度/cm。

#### 1.4 数据统计分析

所有数据均重复实验3次，结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。数据统计分析采用SPSS 18.5软件对数据进行ANOVA差异显著性分析，以 $P < 0.05$ 为差异显著；绘图采用Origin 8.5软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同超声条件处理对SPI-CS复合物中蛋白质二级结构的影响

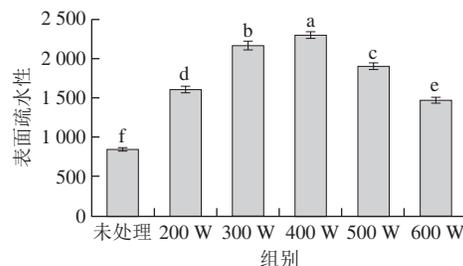
**表 1 不同超声条件处理SPI-CS复合物中蛋白质的二级结构相对含量**  
**Table 1 Secondary structure contents of untreated and ultrasonically treated SPI-CS complex**

样品	$\alpha$ -螺旋相对含量	$\beta$ -折叠相对含量	$\beta$ -转角相对含量	无规卷曲相对含量
未处理	15.39±1.90 <sup>a</sup>	39.47±2.20 <sup>a</sup>	17.15±0.50 <sup>e</sup>	28.03±0.70 <sup>e</sup>
200 W	15.18±1.40 <sup>a</sup>	38.34±1.10 <sup>b</sup>	18.48±0.40 <sup>d</sup>	28.92±0.90 <sup>e</sup>
300 W	14.95±0.70 <sup>b</sup>	36.42±0.40 <sup>c</sup>	19.05±0.50 <sup>e</sup>	29.15±1.30 <sup>b</sup>
400 W	12.57±1.70 <sup>c</sup>	35.31±0.20 <sup>d</sup>	22.26±0.60 <sup>b</sup>	30.38±1.10 <sup>a</sup>
500 W	12.46±1.50 <sup>c</sup>	35.57±0.40 <sup>d</sup>	21.55±0.80 <sup>b</sup>	29.42±1.20 <sup>b</sup>
600 W	12.36±0.50 <sup>c</sup>	35.97±0.20 <sup>c</sup>	21.98±0.80 <sup>b</sup>	28.99±1.30 <sup>cd</sup>

注：同列肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，下同。

通过圆二色光谱表征复合物中蛋白质二级结构的相对含量。蛋白质圆二色光谱的远紫外区段 (190~240 nm) 属于肽键吸收范围，包含了蛋白质主链构象的信息。利用CD Pro拟合软件对得到的图谱进行分析计算。如表1所示，大豆分离蛋白经超声处理后，随着超声功率的增加， $\alpha$ -螺旋相对含量由15.39%降低到12.36%， $\beta$ -折叠相对含量先降低后升高， $\beta$ -转角和无规卷曲相对含量先升高后降低。Li Huijing等<sup>[18]</sup>研究超声处理改变大豆分离蛋白的空间结构也得到类似的结果。说明大豆分离蛋白经超声处理后，由 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的刚性分子结构向 $\beta$ -转角和无规卷曲结构转化，其二级结构变得松散，柔性结构含量增加，蛋白质分子结构由有序变得无序。大豆分离蛋白 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠结构主要由氢键维持，超声处理可能破坏了二级结构中的氢键作用，使蛋白质分子展开，二级结构被破坏，蛋白质不同程度的改变和伸展，可能会影响大豆蛋白质分子与其他小分子物质的结合<sup>[19]</sup>，为此，本实验进一步研究了超声处理大豆分离蛋白与壳聚糖的相互作用。

### 2.2 不同超声条件处理对SPI-CS复合物表面疏水性的影响



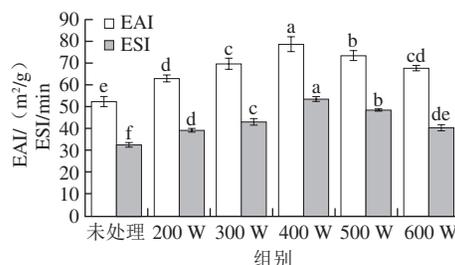
小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，下同。

**图 1 不同超声条件处理SPI-CS复合物的表面疏水性**

**Fig. 1 Surface hydrophobicity of untreated and ultrasonically treated SPI-CS complex**

表面疏水性可以衡量疏水性官能团的存在及数目的多少<sup>[20]</sup>，壳聚糖的加入和超声处理会影响蛋白质的表面结构。由图1可知，未经超声处理的SPI-CS复合物表面疏水性最低，主要是由于未经超声处理的大豆蛋白中大多数疏水基团被紧密包埋在蛋白质球状结构内，蛋白质的疏水基团和荧光探针之间的接触受到抑制，表面疏水性较低。而经过超声处理后，所有复合物中蛋白质的表面疏水性都有所升高，且在超声功率为400 W时，复合物的表面疏水性最强。这可能是由于蛋白质原来致密的刚性结构在超声波的作用下打开，内部的疏水性基团暴露增多，此时形成的复合物疏水性增加。而超声功率大于500 W时复合物的疏水性降低，这可能是由于较高的功率使原本暴露的疏水基团发生相互作用，使蛋白发生一定程度的聚集，部分疏水基团重新被包埋，阻止了其于荧光探针的结合，而且功率越大蛋白聚集程度越强，导致了表面疏水性下降<sup>[20]</sup>。

### 2.3 不同超声条件处理对SPI-CS复合物乳化性的影响



**图 2 不同超声条件处理SPI-CS复合物的EAI和ESI**

**Fig. 2 EAI and ESI of untreated and ultrasonically treated SPI-CS complex**

EAI及ESI是表征SPI-CS复合物功能性质的重要指标，可以反映复合物在油-水界面形成乳化层的能力和形成乳状液的稳定性。由图2可知，与未经超声处理的SPI-CS复合物溶液相比，经过超声处理后，溶液的EAI及ESI得到显著提高，但随着超声功率的继续增加，EAI和ESI均呈现先升高后降低的趋势。其中，400 W超声处

理的SPI-CS复合物具有较高的EAI和ESI, 别为78.5 m<sup>2</sup>/g和53.3 min, 与未经超声处理的复合物相比分别提高了50.01%和63.35%。这可能是由于复合物溶解性及表面疏水性的增加或是表面电荷分布发生变化, 使大豆蛋白与壳聚糖复合物的吸附层由原来的刚性变为黏弹性, 乳化性能增加。而复合物在油-水界面吸附时, 主要的驱动力为疏水吸附, 因此疏水性官能团的存在有利于复合物吸附在油滴表面, 与表面疏水性的测定结果一致<sup>[21]</sup>。SPI-CS复合物600 W超声时的ESI降低, 可能是由于过高的超声功率使蛋白质空间构象不稳定, 致使其暴露出较多的亲水基团, 造成了乳化性的降低<sup>[22]</sup>。另外, 超声处理影响复合物在油-水界面的分布, 复合物的结构特性及在油-水界面发生的构象重排都会影响复合物的EAI和ESI<sup>[23]</sup>。

#### 2.4 不同超声条件处理对SPI-CS复合物界面张力的影响

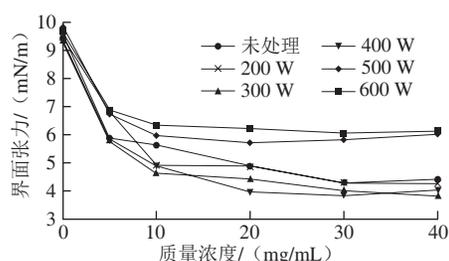


图3 不同超声条件处理SPI-CS复合物的界面张力  
Fig. 3 Interfacial tension of untreated and ultrasonically treated SPI-CS complex

界面行为对于乳状液的制备和稳定具有重要意义, 界面张力越小, 形成乳状液的稳定性越好<sup>[24]</sup>。复合物的乳化特性通过测定复合物溶液的界面张力进行表征。复合物在油-水界面上快速吸附, 迅速降低界面张力, 可以增加乳液的稳定性, 阻止油滴的聚集。从上述结论可以看出, 超声处理SPI-CS复合物改变了大豆蛋白的乳化性质。为了更好地研究乳液性质与SPI-CS复合物乳化性之间的关系, 本实验对不同超声条件处理的SPI-CS复合物的界面性质进行了分析。如图3所示, 所有复合物样品的界面张力均随着复合物质量浓度的增加而迅速下降。最终界面张力变化趋于平缓, 表示在油-水界面上的复合物将达到饱和, 此时界面压趋于一个恒定的值, 即达到临界胶束浓度。经超声处理后的SPI-CS复合物的加入有效地降低了油-水界面的界面张力, 随着超声功率的增加, 400 W超声的SPI-CS复合物界面张力不断下降, 最低至3.86 mN/m。这可能是由于此时该复合物的ESI、EAI高于其他功率处理的SPI-CS复合物, 导致其在油-水界面具有较高的吸附能力。而经过较高功率处理后, 可能由于复合物发生自聚集行为, 使其在油-水界面的伸展吸附作用减弱, 乳液的界面张力相对较大。因此, 适度超声处理的SPI-CS形成的复合物与未经超声处理相比, 乳化能力有较大提升, 降低界面热力学不稳定作用的能力增强<sup>[25]</sup>。

#### 2.5 不同超声条件处理对SPI-CS复合物形成O/W型乳液粒径的影响

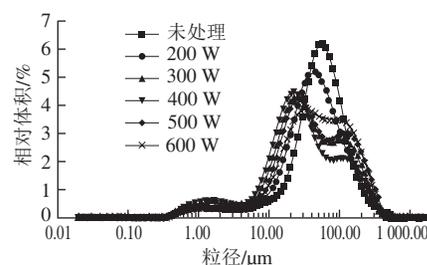


图4 不同超声条件处理SPI-CS复合物形成乳液的粒径分布  
Fig. 4 Particle size distribution of untreated and ultrasonically treated SPI-CS emulsion

如图4所示, 经超声处理的SPI-CS复合物制备的乳液粒径都相对比较小, 乳液粒径分布范围较窄, 粒径几乎都分布在50 μm左右, 未处理的SPI-CS复合物形成乳液的粒径大部分分布在70 μm左右, 乳液的粒径较大, 这说明超声处理大豆分离蛋白与壳聚糖相互作用可形成有利于乳液稳定的复合物, 未经超声处理的蛋白由于结构没有展开, 表面所带电荷及分布不适合为壳聚糖提供有效的界面结合位点和静电相互作用力<sup>[24]</sup>, 因此限制了壳聚糖在界面的结合, 从而减弱了相互作用, 影响了复合物的乳化能力。适度的超声处理复合物形成乳液的平均粒径较小, 可能是由于乳液表面吸附了大量亲水性的壳聚糖, 复合物之间产生空间位阻作用, 可以抑制乳液液滴之间的相互作用, 有利于提高乳液的稳定性和界面膜强度<sup>[18]</sup>。

#### 2.6 不同超声条件处理对SPI-CS复合物形成O/W型乳液Zeta电位的影响

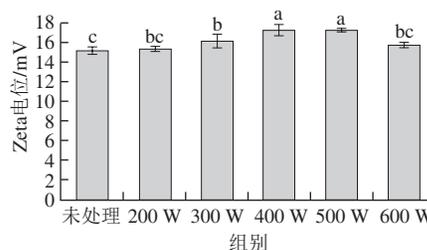
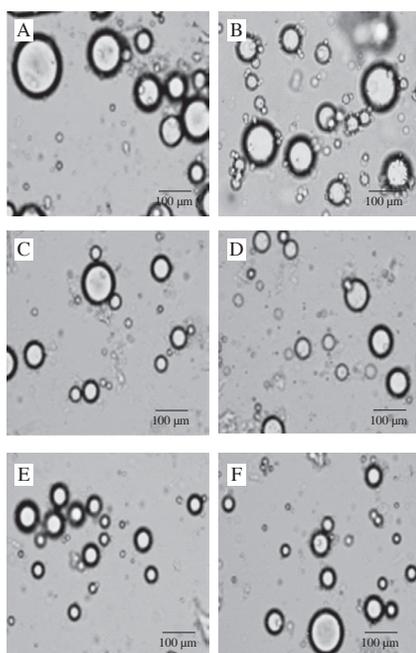


图5 不同超声条件处理SPI-CS复合物形成乳液的Zeta电位变化  
Fig. 5 Changes in zeta potential of untreated and ultrasonically treated SPI-CS emulsion

乳液的表面电荷密度能有效反应乳滴之间的静电相互作用, 表面净电荷越多, 乳滴之间静电斥力越大, 乳液越稳定<sup>[26]</sup>。由于复合物之间通过大豆分离蛋白所带负电荷的羧基基团与壳聚糖所带正电荷的氨基基团以静电相互作用结合, 因此复合物带电荷的多少对复合物及乳液的稳定具有重要影响。如图5所示, 在pH 3.0的缓冲溶液中, 未经超声处理的复合物乳液的Zeta电位为

15.1 mV, 超声处理后最大Zeta电位变为17.5 mV, 随着超声功率的增加, Zeta电位先升高后降低, 但乳液体系的Zeta电位变化并不明显, 400 W超声处理的SPI-CS复合物乳液表面电荷密度最大。通过研究发现, 超声处理后的乳液Zeta电位均高于未超声处理的乳液, 这可能是由于超声处理暴露了蛋白质分子的内部结构, 增加了内层蛋白质与壳聚糖的接触, 而未处理和高功率超声处理的蛋白形成的复合物乳液Zeta电位略有降低, 这是由于蛋白结构没有打开或者重新聚集, 间接地降低了对壳聚糖带电基团的消耗, 蛋白质与壳聚糖之间的静电相互作用诱导蛋白质形成特定的定向排布, 说明超声处理促进了两者之间的复合, 使更多的阳离子壳聚糖与蛋白之间产生相互作用<sup>[27]</sup>。超声处理使蛋白质分子的结构发生变化, 氨基酸残基暴露, 其蛋白质结构、氨基酸残基的极性及所带电荷的多少会影响蛋白质的表面活性, 进而影响其与壳聚糖之间的相互作用<sup>[27]</sup>。

2.7 不同超声条件处理SPI-CS复合物形成O/W型乳液的微观结构



A~F分别为0、200、300、400、500、600 W超声处理的SPI-CS复合物。

图6 不同超声条件处理SPI-CS复合物形成乳液的微观结构

Fig. 6 Microscopic structures of untreated and ultrasonically treated SPI-CS emulsion

图6A~F分别给出了不同超声条件处理SPI-CS复合物形成乳液的光学显微镜的形貌学分布。结合乳液形貌学微观结构观察和粒径分布可知, 400 W超声处理的SPI-CS复合物(图6D)稳定的乳液中乳滴形状规则, 分布较为均匀, 油滴分散在体系中, 乳滴的粒径较小。未处理(0 W)的SPI-CS复合物(图6A)稳定的乳液中有较大的油滴出现, 乳液中部分油滴出现了聚集趋势, 出

现这种不稳定现象的原因可能是由于未经超声处理的蛋白与壳聚糖形成的复合物结构没有充分展开, 形成的复合物较不稳定, 不足以完全覆盖乳滴表面, 因此乳滴之间发生了桥联聚集, 降低了乳液的稳定性。超声处理后的蛋白与壳聚糖形成复合物的乳液粒径相对较小且分布较为均匀, 这可能是由于超声处理使蛋白中具有表面活性的结构增加, 同时超声处理使蛋白质的刚性结构部分转变为柔性结构, 能更有利于包裹到油滴的表面, 可以形成并且稳定一些较小的液滴, 使复合物在油-水界面具有较高的界面压和吸附量<sup>[28]</sup>, 增加了乳液的稳定性, 乳液的微观结构与乳液的Zeta电位、平均粒径和ESI测定的结果具有一致性。

2.8 不同超声条件处理SPI-CS复合物形成O/W型乳液的乳析稳定性

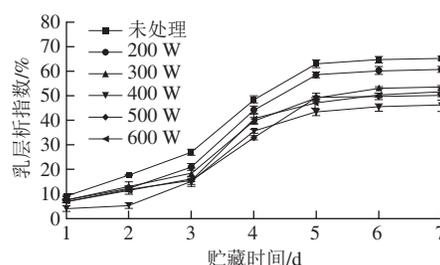


图7 不同超声条件处理SPI-CS复合物形成乳液乳层析指数

Fig. 7 Creaming indexes of untreated and ultrasonically treated SPI-CS emulsion

如图7所示, 不同乳液7 d的贮藏稳定性实验结果表明, 乳液的分层现象随时间延长有所不同, 其中未经超声处理的大豆分离蛋白与壳聚糖复合形成的乳液乳层析指数最高, 说明乳液的稳定性最差。几乎所有的乳液在放置24 h后都出现不同程度的乳析现象, 在400 W超声处理的SPI-CS复合物形成的乳液样品中乳析现象最不明显, 但所有乳液贮藏7 d后都发生了絮凝现象。超声处理的样品乳液乳层析指数相对较小, 这也很好地解释了上述的实验结果。结果表明, 乳液液滴的粒径越大, 越容易发生絮凝(贮藏7 d后, 未超声处理的SPI-CS复合物的乳层析指数为65.2%, 400 W超声处理的SPI-CS复合物乳液的乳层析指数为45.8%)。未处理和低功率(200 W)超声处理形成的复合物的乳液具有较弱的稳定性, 在油滴界面形成不稳定和不完整的界面膜, 蛋白结构没有充分展开, 所以没有完整的包裹在油滴表面, 使乳液液滴容易发生变形和聚结。而超声处理后的大豆分离蛋白与壳聚糖形成的复合物更易于吸附在油滴界面, 而且超声处理暴露了蛋白质分子的内部结构, 使更多的壳聚糖与蛋白相互结合, 这样既可以增加乳液的界面膜强度和表面电荷数量, 同时壳聚糖也可以通过空间位阻的作用为液滴间提供足够的排斥力, 抑制乳液液滴之间的相互作用, 阻止乳析现象的发生<sup>[29]</sup>。

### 3 结论

通过制备不同超声功率处理的SPI-CS复合物,发现相同处理时间、不同超声强度使复合物形成乳液的稳定性有所差异,400 W超声处理形成的复合物EAI和ESI最高,乳液粒径较小、呈小球状均匀分布,乳层析指数最低,乳化体系相对稳定,表明超声处理改性大豆分离蛋白与壳聚糖相互作用影响复合体系的乳化性。

对不同超声条件处理SPI-CS复合物表面疏水性、表面电荷和界面张力等性质的分析表明,超声处理影响了复合物的表面电荷分布和蛋白质的空间结构,大豆分离蛋白经超声处理后, $\alpha$ -螺旋相对含量降低, $\beta$ -折叠和无规卷曲相对含量增加,由原来的刚性变为黏弹性结构,界面吸附量增加,蛋白结构的伸展和构象的改变影响了其与壳聚糖之间的静电相互作用,说明复合物在油滴表面的界面吸附性的不同对乳液的稳定性产生了很大影响。

光学显微镜观察结果表明,400 W超声的SPI-CS复合物形成的乳液粒径分布在较小的范围且形状规则,乳液较为稳定。超声处理使蛋白中具有表面活性的结构数量增加,与壳聚糖之间形成更有利于在油滴界面吸附的复合物。超声功率过高影响了蛋白的结构和活性基团的暴露,进而影响复合物的乳化特性,形成的乳液粒径较大,导致乳液不稳定。

### 参考文献:

- [1] 迟玉杰,朱秀清,李文斌,等.大豆蛋白加工新技术[M].北京:科学出版社,2008:12-16.
- [2] YANN D, AMAUD S J, ANNIINA S, et al. Strong improvement of interfacial properties can result from slight structural modifications of proteins: the case of native and dry-heated lysozyme[J]. *Langmuir*, 2011, 27(24): 14947-14957. DOI:10.1021/la203485y.
- [3] PFEIFFER H, HEREMANS K, WEVERS M. The influence of correlated protein-water volume fluctuations on the apparent compressibility of proteins determined by ultrasonic velocimetry[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1784(11): 1546-1551. DOI:10.1016/j.bbapap.2008.08.002.
- [4] LAMACCHIA C, LANDRISCINA L, D'AGNELLO P. Changes in wheat kernel proteins induced by microwave treatment[J]. *Food Chemistry*, 2016, 197: 634-640. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.11.016.
- [5] KNORR D, HEINZ V, BUCKOW R. High pressure application for food biopolymers[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins & Proteomics*, 2006, 1764(3): 619-631. DOI:10.1016/j.bbapap.2006.01.017.
- [6] FLOURY J, DESRUMAUX A, LEGRAND J. Effect of ultra-high-pressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein-stabilized emulsions[J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(9): 3388-3395. DOI:10.1111/j.1365-2621.2002.tb09595.x.
- [7] AI W, FANG Y, XIANG S, et al. Protein/polysaccharide electrostatic complexes and their applications in stabilizing oil-in-water emulsions[J]. *Journal of Nutritional Science & Vitaminology*, 2015, 61(3): 168-170. DOI:10.3177/jnsv.61.S168.
- [8] HUANG Guoqing, SUN Yanting, XIAO Junxia, et al. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 534-539. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.04.140.
- [9] JOURDAIN L, LESER M E, SCHMITT C, et al. Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: relationship to complexation in solution[J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22(4): 647-659. DOI:10.1016/j.foodhyd.2007.01.007.
- [10] WANG Xiaomei, HU Ling, LI Chen, et al. Improvement in physical and biological properties of chitosan/soy protein films by surface grafted heparin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 83: 19-29. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.052.
- [11] PETRUCCELLI S, ANON M C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy proteins isolates. 1. structural and hydration properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(10): 2161-2169. DOI:10.1021/jf00046a017.
- [12] HU Hao, WU Jiahui, LI-CHAN C Y E, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30(2): 647-655. DOI:10.1016/j.foodhyd.2012.08.001.
- [13] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1980, 624(1): 13-20. DOI:10.1016/0005-2795(80)90220-2.
- [14] NAKAMURA A, TAKAHASHI T, YOSHIDA R, et al. Emulsifying properties of soybean soluble polysaccharide[J]. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18(5): 795-803. DOI:10.1021/jf60172a025.
- [15] 梁蓉. 以OSA变性淀粉为乳化剂的纳米乳液制备及特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 29-30.
- [16] 齐军茹, 翁静宜, 康燕辉, 等. 大豆酸溶蛋白/大豆多糖纳米乳液的制备及表征[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(6): 136-141.
- [17] MOSCHAKIS T, MURRAY B S, DICKINSON E. Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilised by sodium caseinate and xanthan gum[J]. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2005, 284(2): 714-728. DOI:10.1016/j.jcis.2004.10.036.
- [18] LI Huijing, ZHU Kexue, ZHOU Huiming, et al. Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(2): 808-814. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.11.040.
- [19] ZHANG Q T, TU Z C, XIAO H, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. *Food and Bioprocess Processing*, 2014, 92(1): 30-37. DOI:10.1016/j.fbp.2013.07.006.
- [20] CHANDRAPALA J, ZISU B, PALMER M, et al. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2011, 18(5): 951-957. DOI:10.1016/j.ultsonch.2010.12.016.
- [21] 王鹤. 金表面不同自组装表面结构模型对蛋白吸附的影响规律的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011: 56-58.
- [22] SONG X Z, ZHOU C Z, FU F, et al. Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 43(1): 538-544. DOI:10.1016/j.indcrop.2012.08.005.
- [23] BARZILAY A, KOREN-LICHTIG H. Bioactive compounds protection method and compositions containing the same: U.S. Patent 8,877,232[P]. 2014-11-04[2017-01-23].
- [24] 张超, 郭晓飞, 李武, 等. pH值对大豆分离蛋白/壳聚糖复合材料性能的影响[J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(10): 21-25.
- [25] 徐文俊, 曹光群, 刘俊逸, 等. 乳液液界面膜厚度与结构[J]. *无锡轻工业学院学报*, 1987(2): 28-38; 98-99.
- [26] QIAN C, DECKER E A, XIAO H, et al. Comparison of biopolymer emulsifier performance in formation and stabilization of orange oil-in-water emulsions[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2011, 88(1): 47-55. DOI:10.1007/s11746-010-1658-y.
- [27] 李浩. 荷电表面同电荷蛋白空间取向的分子动力学模拟[D]. 天津: 天津大学, 2012: 40-41.
- [28] SHANMUGAM A, ASHOKKUMAR M. Ultrasonic preparation of stable flax seed oil emulsions in dairy systems-physicochemical characterization[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 39(2): 151-162. DOI:10.1016/j.foodhyd.2014.01.006.
- [29] WONG B T, LI D, AUGUSTIN M A. Deamidated wheat protein-dextran Maillard conjugates: effect of size and location of polysaccharide conjugated on steric stabilization of emulsions at acidic pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(6): 1424-1432. DOI:10.1016/j.foodhyd.2011.01.017.