

# N-乙酰化程度对壳聚糖稳定Pickering乳液乳化性能的影响

吴 军<sup>1</sup>, 施兆娟<sup>1</sup>, 袁传勋<sup>1,2,\*</sup>, 王兴婷<sup>1</sup>, 金日生<sup>1,2</sup>

(1.合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230009;

2.合肥工业大学农产品生物化工教育部工程中心, 安徽 合肥 230009)

**摘 要:** 本研究旨在利用将乙酰基共价接枝到多糖链上的修饰策略以改善壳聚糖的乳化性能, 并探究最佳乙酰化范围。红外谱图验证了乙酸酐重乙酰化工艺能调控壳聚糖的乙酰度, 并且取代只发生在C2位的氨基上。接触角分析结果表明乙酰化能有效提高壳聚糖的非极性部分, 致使其乳化性增强, 修饰后的壳聚糖稳定Pickering乳液的液滴尺寸显著降低, 当乙酰度为32%时, 壳聚糖稳定Pickering乳液的乳化活性指数和乳化稳定性增至最大(分别为39.56 m<sup>2</sup>/g和65.54 min), 乳液的平均液滴尺寸达到最小(12.71 μm), 乳液稳定性增加, 乳析指数下降明显(下降至11.3%)。综上, 改变壳聚糖上N-乙酰-D-氨基葡萄糖单元的物质量的量比可以有效改善壳聚糖的乳化性能和所稳定乳液的贮藏稳定性。

**关键词:** 壳聚糖; Pickering乳液; 乙酰化; 乳化性; 稳定性

## Effect of N-Acetylation Degree on the Properties of Chitosan-Stabilized Pickering Emulsions

WU Jun<sup>1</sup>, SHI Zhaojuan<sup>1</sup>, YUAN Chuanxun<sup>1,2,\*</sup>, WANG Xingting<sup>1</sup>, JIN Risheng<sup>1,2</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 2. Engineering Center of Agricultural Products Biochemistry, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** The aim of this study is to apply a modification strategy based on covalently grafting acetyl groups onto polysaccharide chains to improve the emulsifying properties of chitosan. A second aim is to explore the optimal degree of acetylation (DA). Infrared spectroscopy (IR) confirmed that acetic anhydride reacylation could regulate the DA of chitosan, and substitution only occurred on the amino group at the C2 position. The contact angle results showed that acetylation could effectively improve the non-polar part of chitosan, resulting in enhanced emulsifying properties. The droplet size of the Pickering emulsion stabilized by the modified chitosan significantly decreased compared with that observed with untreated chitosan. The emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) of acetylated chitosan with 32% DH were the highest (39.56 m<sup>2</sup>/g and 65.54 min, respectively), and the average droplet size of the emulsion was the smallest (12.71 μm). In addition, the creaming index (CI) decreased significantly to 11.3% compared with that using untreated chitosan. It is proved that changing the molar proportion of N-acetyl-D-glucosamine units in chitosan can effectively improve the emulsifying properties of chitosan and the storage stability of emulsions.

**Keywords:** chitosan; Pickering emulsions; acetylation; emulsifying capacity; stability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240519-129

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 24-0036-09

引文格式:

吴军, 施兆娟, 袁传勋, 等. N-乙酰化程度对壳聚糖稳定Pickering乳液乳化性能的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(24): 36-44. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240519-129. <http://www.spkx.net.cn>

WU Jun, SHI Zhaojuan, YUAN Chuanxun, et al. Effect of N-acetylation degree on the properties of chitosan-stabilized Pickering emulsions[J]. Food Science, 2024, 45(24): 36-44. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240519-129. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2024-05-19

基金项目: 安徽省科技重大专项 (202103b06020025)

第一作者简介: 吴军 (1999—) (ORCID: 0009-0009-1017-7356), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品工程。

E-mail: 1725116916@qq.com

\*通信作者简介: 袁传勋 (1964—) (ORCID: 0000-0003-2464-1411), 男, 研究员, 博士, 研究方向为天然活性物质研究与开发。E-mail: ycx608@sohu.com

Pickering乳液是指由有机或无机固体颗粒替代传统表面活性剂稳定两种不相混溶液组成的体系,相对于传统乳液, Pickering乳液具有无表面活性剂、环境友好、低毒性和稳定性强等明显优势<sup>[1]</sup>。此外, 固体颗粒成本低、来源丰富和性质可调控的优点赋予Pickering乳液独特的属性, 使其在食品<sup>[2]</sup>、生物医药<sup>[3-4]</sup>和化妆品<sup>[5]</sup>等领域有巨大的应用潜力。近年来, 使用生物来源的天然材料作为固体乳化剂制备Pickering乳液是国内外研究的一个热门课题<sup>[6]</sup>。来源于天然材料的多糖颗粒因具有独特的生物活性和低毒性、可降解的特性, 被作为乳化剂广泛用于制备Pickering乳液。

甲壳素是仅次于纤维素的第二大天然高分子聚合物。壳聚糖(chitosan, CS)是一种天然存在的阳离子多糖, 是由甲壳素碱性水解将*N*-乙酰基-*D*-氨基葡萄糖转化为*D*-氨基葡萄糖, 并且*N*-乙酰基含量降低到约50%以下的产物<sup>[7]</sup>。依赖于CS天然的阳离子性质、低成本效益、良好的生物相容性与生物降解性等性质, 使其成为“绿色”稳定剂在稳定Pickering乳液方面具有广泛的应用前景<sup>[8]</sup>。但是由于CS是高度亲水的分子, 不能形成具有适当润湿特性的颗粒<sup>[9]</sup>, 难以吸附油-水界面, 导致乳化性能差。这限制了它们在食品、医药和农业领域的潜在用途。而乙酰度(degree of acetylation, DA)是CS利用的关键因素之一, DA决定了CS上*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖单元的物质量的量比, 是决定CS物化性能和生物性质的重要因素<sup>[10-12]</sup>。因此, DA可能是有效改善CS乳化性能的关键因素。然而有研究证明, 如果乙酰化反应发生在多糖羟基基团上会影响多糖羟基所带来的抗氧化性<sup>[13]</sup>, 因此本研究着重聚焦发生在氨基上的*N*-乙酰化。先前的研究证明, 再乙酰化被认为是一种产生不同DA CS的过程, 对其分子质量几乎没有影响<sup>[14-15]</sup>。

山茶油是中国南方部分省份常见的优质食用油, 富含不饱和脂肪酸、多酚、植物甾醇、茶皂素、角鲨烯等功能成分, 使其在食品、化妆品和医药领域具有广阔的应用前景, 素有“东方橄榄油”的美誉<sup>[16]</sup>。然而, 其疏水性和油腻的味道对食品领域的加工和利用造成了不利影响, 因此本研究选择山茶油作为乳液油相进行乳化以提高其生物利用度。

综上, 利用CS分子内氨基良好的化学反应性和乙酰化可赋予其优良的理化性能和生物性质。本研究以不同*N*-乙酰化系列的CS为固体颗粒, 使用山茶油作为油相制备水包油(O/W)型Pickering乳液, 并系统探究体系的结构性质、粒径分布、乳化特性及贮藏稳定性。本研究旨在确定最佳的*N*-乙酰化程度, 以制备具有优异乳化性能的CS, 从而获得稳定性更高、粒径分布更均匀的Pickering乳液。通过了解*N*-乙酰化程度对Pickering乳液乳化性的影响, 以期开发基于CS的乳液体系提供新视角。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

CS (DA≤95%) 上海麦克林生化科技股份有限公司; 乙酸酐 国药集团化学试剂有限公司; 山茶油(单不饱和脂肪酸含量79.5%、多不饱和脂肪酸含量9.5%、饱和脂肪酸含量11%) 玉山县大成仓食品有限公司; 所有化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

FD-1真空冷冻干燥机 博医康(北京)仪器有限公司; Nicolet傅里叶变换红外光谱(Fourier transform-infrared spectroscopy, FT-IR)仪 美国Thermo Fisher Scientific公司; HARKE-SPCAX1接触角测量仪 北京哈科试验仪器厂; MS 2000激光粒度分析仪 英国马尔文仪器有限公司; COXEM EM-30+扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM) 韩国库赛姆公司; ML31光学显微镜 日本Mshot公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 CS的再乙酰化

参照Gatto<sup>[17]</sup>的方法并稍作修改。将CS溶解在体积分数2%乙酸溶液中配制成质量浓度为100 mg/mL的溶液, 在4℃冰箱中过夜至完全水合。用甲醇稀释CS溶液, 使得乙酸溶液与甲醇的体积比为1:1。将乙酸酐缓慢加入CS溶液中, 制备不同的样品, 如表1所示。室温搅拌5 h, 反应结束后向反应体系中滴加1 mol/L NaOH溶液调整pH值至8~9, 4℃过夜, 沉淀反应物。然后, 将获得的反应物溶液引入透析袋(截留分子质量为3 500 Da)中, 并在室温条件下浸入含有蒸馏水的玻璃容器中, 放置48 h, 换水8次。反应结束后浓缩, 冷冻干燥后获得不同DA的*N*-乙酰化壳聚糖, 分别命名为N1-CS、N2-CS、N3-CS、N4-CS和N5-CS。

表1 每克CS的乙酸酐添加量和所得乙酰化程度  
Table 1 Levels of acetic anhydride addition per gram of CS and resulting DAs

样品	乙酸酐体积/mL	DA/%
CS	0.000	≤5
N1-CS	0.025	17
N2-CS	0.040	26
N3-CS	0.055	32
N4-CS	0.075	43
N5-CS	0.100	50

#### 1.3.2 *N*-乙酰化壳聚糖DA的测定

参照Huang Zhi等<sup>[13]</sup>的方法进行检测。向10 mL 0.01 mol/L NaOH溶液中加入20 mg制备的*N*-乙酰化壳聚糖。然后, 将混合物加热至50℃, 并持续2 h。未乙酰化的CS作为对照组。以酚酞为指示剂, 使用0.01 mol/L HCl溶液滴定中和过量的NaOH。分别按式(1)、(2)计算乙酰基含量和DA:

$$\text{乙酰基含量}/\% = \frac{[(V_1 - V_2) \times c \times 0.043] \times 100}{m} \quad (1)$$

$$\text{DA} = \frac{162 \times \text{乙酰基含量}}{4\,300 - 42 \times \text{乙酰基含量}} \quad (2)$$

式中： $V_1$ 为对照组所需的HCl体积/mL； $V_2$ 为实验组所需的HCl体积/mL； $c$ 为HCl浓度/（mol/L）； $m$ 为样品的质量/g。

### 1.3.3 FT-IR测定

取2~3 mg样品与KBr以质量比1:100进行充分研磨，压制成薄片。用FT-IR仪进行光谱扫描，扫描波数范围4 000~500  $\text{cm}^{-1}$ ，分辨率4  $\text{cm}^{-1}$ ，扫描64次。

### 1.3.4 X射线衍射（X-ray diffraction, XRD）测定

利用XRD仪对CS原料和N-CS进行分析。衍射条件：铜靶电压40 kV，电流40 mA，Cu-K $\alpha$ 辐射。扫描范围（ $2\theta$ ）为5°~70°，步长0.02°，扫描速率为4°/min。

### 1.3.5 微观结构观察

将CS原料与制备好的N-CS在导电胶黏剂中均匀地分布，置于镀膜台上对其喷金90 s，利用SEM放大200倍和5 000倍对其微观结构进行观察，以获得具有典型特征的颗粒形貌。

### 1.3.6 接触角测定

将冻干后的待测样品用压片机压成厚度均匀的2 mm圆片，置于样品台上，用专用注射器在圆片表面滴一滴超纯水（4  $\mu\text{L}$ ）。待平衡后，通过高速摄像机记录水滴形状的变化。每组测量3次取平均值。

### 1.3.7 Pickering乳液的制备

采用均质乳化技术制备Pickering乳液<sup>[18]</sup>。CS原料和N-CS储备液的质量分数为1.5%，用5 mol/L NaOH溶液和1 mol/L HCl溶液调pH值至5.5，以油茶籽油作为油相，油-水相体积比为3:2，乳液的总体积为20 mL。高速剪切机转速为12 000 r/min，剪切3 min，乳液于4℃条件下保存，以备后续实验。

采用稀释法判断乳液类型<sup>[19]</sup>。取两滴乳状液，分别滴入水性或油性稀释剂中，因稀释剂只能稀释乳液外相，内相不受稀释剂影响。若液滴在水中呈扩散状，而在油中仍维持液滴状，则为O/W型乳状液；反之，则为W/O型乳状液。经判断，本实验样品均在水中均匀扩散，而在油中仍能够有效地聚集，因此样品均为O/W型乳状液。

### 1.3.8 Pickering乳液粒径分布与Zeta电位的测定

#### 1.3.8.1 乳液粒径分布

利用激光粒度仪的动态光散射技术测量系列乙酰化壳聚糖基Pickering乳液的平均粒径 $D_{4.3}$ 和多分散性指数（polydispersity index, PDI）。用去离子水将乳液质量浓度稀释到1 mg/mL，样品颗粒的折射率为1.52，分散介质为水，室温条件下测试。

#### 1.3.8.2 Zeta电位的测定

用去离子水将乳液质量浓度稀释到1 mg/mL，使用Nano-ZS粒度及电位分析仪测量乳液Zeta电位。每个样品测量3次，取平均值。

### 1.3.9 Pickering乳液界面层微观结构和分布测定

参考Meng Weihao等<sup>[20]</sup>的方法。均质前加入质量分数0.1%尼罗红染料搅拌30 min对油相进行染色，均质后将染色的乳液滴加在载玻片上以均匀分布。然后将载玻片倒置在显微镜载物台上，使用激光扫描共聚焦显微镜（confocal laser scanning microscope, CLSM）观察所制得Pickering乳液的微观结构，采用激发波长为488 nm的氩/氦获得CLSM图像。

#### 1.3.10 Pickering乳液光学显微镜观察

将制备的系列乙酰化壳聚糖基Pickering乳液制片，然后于光学显微镜下放大40倍进行观察。

#### 1.3.11 Pickering乳液的乳化活性指数（emulsification activity index, EAI）与乳化稳定性（emulsion stability index, ESI）测定

将制备的系列乙酰化壳聚糖基Pickering乳液分别在0、10 min时从底部吸取30  $\mu\text{L}$ 乳液，与5 mL质量分数0.1%的十二烷基硫酸钠溶液混合，振荡搅匀，于500 nm波长处测量吸光度，分别按式（3）、（4）计算样品的EAI和ESI<sup>[21]</sup>：

$$\text{EAI}/(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_1 \times N}{\rho \times (1 - \varphi) \times t} \quad (3)$$

$$\text{ESI}/\text{min} = \frac{A_1}{A_1 - A_2} \times t \quad (4)$$

式中： $A_1$ 、 $A_2$ 分别为0、10 min时的吸光度； $N$ 为稀释倍数； $\rho$ 为蛋白质量浓度/（g/L）； $\varphi$ 为油相体积分数/%； $t$ 为间隔时间/min。

#### 1.3.12 乙酰化壳聚糖基Pickering乳液乳析指数（creaming index, CI）测定

参考Xu Wei等<sup>[22]</sup>的方法。将制备的乙酰化壳聚糖基Pickering乳液置于样品管中，添加质量分数0.02%的叠氮化钠以抑制细菌的生长，室温（25℃）贮存30 d。分别在1、5、10、15、20、25、30 d对样品进行观察，记录样品的分层情况。按式（5）计算样品的CI：

$$\text{CI}/\% = \frac{H_1}{H_2} \times 100 \quad (5)$$

式中： $H_1$ 为下层清液高度/cm； $H_2$ 为乳液总高度/cm。

### 1.4 数据分析

所有实验均测试至少3次，数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 24.0软件对数据进行方差分析，采用Duncan和最小显著差异法分析进行显著性比较，可信区间为95%（ $P < 0.05$ ），使用Origin软件绘图。



## 2 结果与分析

### 2.1 FT-IR分析

在 $3\ 300\sim3\ 500\text{ cm}^{-1}$ 范围的特征峰由O—H的伸缩振动和N—H的伸缩振动重叠引起；—CH在 $2\ 850\sim2\ 940\text{ cm}^{-1}$ 范围出现一个弱的吸收峰； $987\sim1\ 130\text{ cm}^{-1}$ 吸收谱则由多糖糖环产生，这些为CS的主要特征峰<sup>[23]</sup>。如图1所示，未发生取代基反应CS谱图在 $1\ 600\text{ cm}^{-1}$ 处具有明显的氨基特征谱峰，同时乙酰氨基的特征峰仅在 $1\ 670\text{ cm}^{-1}$ （酰胺I带）出现一个较小的突起。与CS组相比，N-CS的谱图在 $1\ 700\sim1\ 300\text{ cm}^{-1}$ 范围内存在一些吸收变化。N-CS分别在 $1\ 670$ （C=O）、 $1\ 520$ （N—H）、 $1\ 350\text{ cm}^{-1}$ （C—N）出现了3个酰胺谱峰<sup>[24]</sup>；不同的CS在 $1\ 670\text{ cm}^{-1}$ （酰胺I带）有非常明显的吸收峰出现，而且其强度随着DA增加而逐步增大，同时 $1\ 600\text{ cm}^{-1}$ 处的氨基吸收也有所减小。此外，位于 $3\ 300\sim3\ 500\text{ cm}^{-1}$ 区域的峰值随着DA增加由深变浅，证明氢键作用有所减弱。另外，发生在甲醇介质中的乙酰化反应过程中， $1\ 700\sim1\ 725\text{ cm}^{-1}$ 波数之间也未发现与—COO—相对应的吸收带。因此，该方法制备的样品乙酰基只取代在C2位的氨基上，没有在C3和C6位上发生羟基的乙酰基取代，合成产物仅为N-乙酰化壳聚糖。

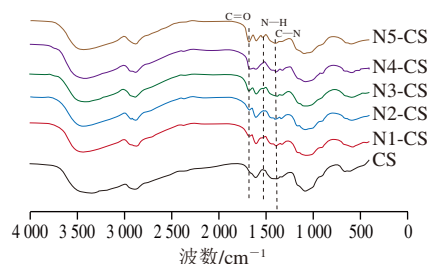


图1 不同N-乙酰化壳聚糖的FT-IR图

Fig. 1 FT-IR spectra of N-acetylated chitosan with different DAs

### 2.2 XRD分析

CS属于单斜晶系，具有两种晶体形态<sup>[25]</sup>，分别为晶型I（ $2\theta$ 在 $10^\circ$ 左右）和晶型II（ $2\theta$ 在 $20^\circ$ 左右）<sup>[26]</sup>。如图2所示，CS仅在 $19.45^\circ$ 有一个显著的衍射峰，表明CS原料中只有一种晶形（晶型II）存在，CS经N-乙酰化后该衍射峰的强度逐渐降低，当DA增加至26%时半峰宽度也增加（ $3.87\sim4.73$ ）（表2），表明乙酰基的引入降低了结构的有序性。同时N-CS分子在 $11^\circ$ 左右出现晶型I，这表明伴随着CS的N-乙酰化，CS链构象由晶型II转变为晶型I。

由表2可知，CS原料结构较为规整、结晶度很高（55.41%）。随着乙酰氨基的增加，结晶度不断降低，证明原有的规整结构遭到了破坏；当DA为32%时，结晶度降至41.42%，但随着更多的N-乙酰基引入CS分子链中，结晶度开始由减转增，即高取代度的N-CS（DA为50%）具有更高的结晶度（51.73%）。产生这一结

果的原因可能是乙酰化过程去除了CS链中的无定形成分，新增的乙酰氨基葡萄糖单元开始形成有序的结构（晶型I），致使结晶度开始增加，Sukmawan等<sup>[27]</sup>也报道了类似的现象。并且Lim等<sup>[28]</sup>在研究中指出CS链由于结晶面积的增加而变得具有刚性，这也为酰基锚定进入油相提供了空间。综上，CS的N-乙酰化过程不仅是化学取代的过程，同时也伴随着物理结构的转变。

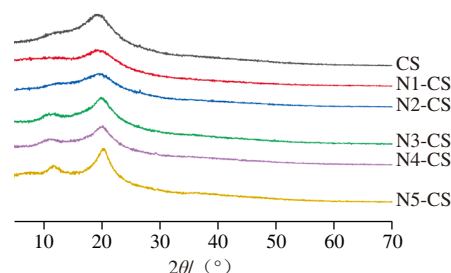


图2 不同N-乙酰化壳聚糖的XRD图

Fig. 2 XRD spectra of N-acetylated chitosan with different DAs

表2 不同N-乙酰化壳聚糖的XRD分析

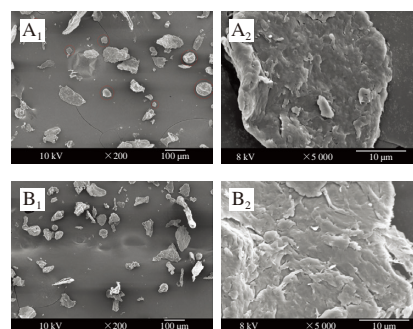
Table 2 XRD analyses of N-acetylated chitosan with different DAs

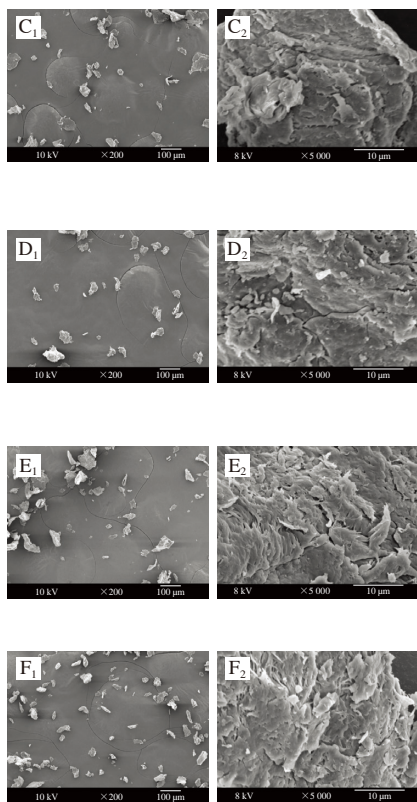
组别	结晶度/%	$2\theta/^\circ$	半峰宽度
CS	$55.41\pm1.65^a$	$19.45\pm0.01$	$3.87\pm0.14$
N1-CS	$48.31\pm3.05^{bc}$	$19.30\pm0.38$	$4.03\pm0.11$
N2-CS	$43.55\pm1.07^d$	$19.27\pm0.33$	$4.73\pm0.23$
N3-CS	$41.42\pm2.72^d$	$11.77\pm0.25; 19.98\pm0.42$	$2.89\pm0.17; 2.13\pm0.05$
N4-CS	$45.63\pm2.19^{cd}$	$11.47\pm0.37; 20.28\pm0.43$	$2.35\pm0.08; 1.73\pm0.03$
N5-CS	$51.73\pm2.64^{ab}$	$11.22\pm0.51; 20.34\pm0.37$	$1.74\pm0.04; 1.53\pm0.03$

注：同列不同字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

### 2.3 SEM分析

如图3所示，原料CS结构致密，呈规则颗粒且表面光滑平整，而乙酰化的CS结构呈不规则状，表面出现部分断裂的致密堆积团簇。并且随着N-乙酰化程度的增加，CS表面的褶皱和裂纹数量增加。这种乙酰化修饰给多糖形貌所带来的影响与Adebawale等<sup>[29]</sup>的研究一致。可能的原因是CS的分子内和分子间氢键遭到严重破坏，导致致密的结构变得松散，其中氢键作用的减弱与FT-IR所观察到的结果一致。这可能也是导致具有高DA的CS水解速率更高的原因之一<sup>[30-31]</sup>，再次证实了N-乙酰化破坏了CS颗粒的晶体结构。





A~F分别为CS、N1-CS、N2-CS、N3-CS、N4-CS、N5-CS, 图4、6、7同; 下标1、2分别为放大200、5 000 倍。

图3 乙酰化对CS颗粒结构的影响

Fig. 3 Effect of acetylation on the granular structure of CS

## 2.4 接触角分析

颗粒与界面的接触角是影响乳液稳定性、流变性和结构的重要指标,三相接触角可描述颗粒润湿性和界面活性<sup>[32]</sup>。有研究表明,当接触角接近90°时界面张力最低,乳液的稳定性最大<sup>[33]</sup>。CS分子的过度亲水性限制了其作为Pickering乳液稳定剂的使用。如图4所示,与未改性的CS (58.11°) 相比, N-CS接触角逐渐增大 (62.32°~85.75°), 因此N-乙酰化改性可以赋予CS更高的疏水性,这可能是由于亲水性氨基被疏水性乙酰基团取代而降低其亲水性。并且随着取代度的提高N-乙酰化壳聚糖的接触角逐渐增大,虽然仍然小于90°,属于亲水范围,但相较于原料CS已有了明显的提升。表明乙酰化改性增强了CS的两亲性和表面活性。

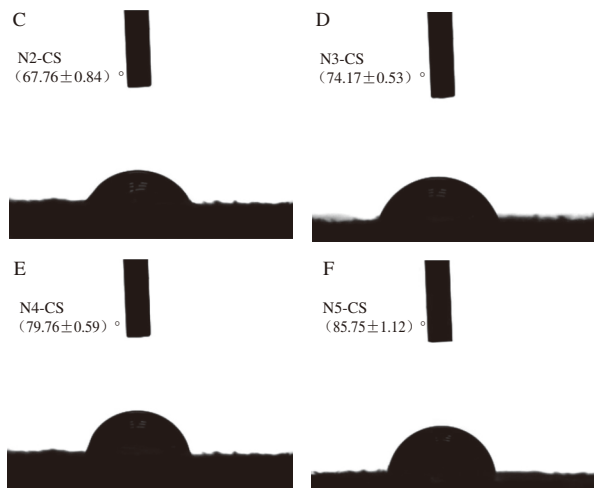
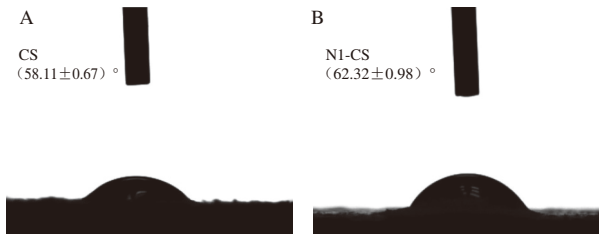


图4 不同N-乙酰化壳聚糖的接触角

Fig. 4 Contact angle plots of N-acetylated CS with different DAs

## 2.5 Pickering乳液粒径分布与Zeta电位分析

高乙酰化CS由于大量氨基被乙酰基取代,更倾向于形成疏水相互作用,而低乙酰化CS保留了较多的氨基,在酸性条件下有较强的质子化能力<sup>[34]</sup>。图5A为未改性CS和不同改性N-CS (质量分数为1.5%) 稳定新鲜O/W乳液的液滴尺寸分布。如图5B所示,由未改性CS稳定乳液的液滴尺寸分布覆盖了较宽的尺寸范围 (0.5~80 μm), 其平均液滴尺寸为32.65 μm。相比之下, N-CS稳定乳液的液滴尺寸分布向较低的范围移动,这证实了乙酰化改性对提高CS乳化能力的有效性。可能的原因是引入的疏水基团降低了界面张力,进而加速分子在界面上的吸附,从而导致较小液滴的快速形成<sup>[17]</sup>。PDI可以用于评估颗粒尺寸分布的均匀程度。如图5B所示,所制备的乳液PDI均在0.3~0.5之间,表明所制备的乳液颗粒尺寸均有宽泛的分布,这也与图5A一致。随着DA从17%变化到32%,乳液的平均液滴尺寸达到最小,为12.71 μm。而当DA增加到50%时,平均液滴尺寸变大。这可能是因为具有最高乙酰化的N-CS有更多的氨基被取代,在酸性条件下产生的静电排斥作用不足以维持乳液液滴的均匀分散,使液滴聚集,因此影响了乳化过程并形成更大的液滴。

乳液的Zeta电位可以评估静电排斥维持乳液稳定性的效果<sup>[35]</sup>。如图5C所示,由CS、N1-CS、N2-CS、N3-CS、N4-CS和N5-CS稳定的乳液Zeta电位分别为56.27、50.33、33.26、41.23、37.06 mV和28.10 mV。CS在酸性条件下C2位上氨基发生质子化而带正电荷,因此当氨基被乙酰基取代后能够发生质子化的氨基减少,因此所制备的乳液Zeta电位总体呈下降趋势。虽然乙酰化修饰部分消除了氨基,但DA由26%进一步提高至32%、43%时N-CS制备的乳液显示出更高的绝对电势 ( $P<0.05$ )。可能的解释是疏水性的增加有助于加速乳化剂的吸附,使更多的乳化剂负载在界面层上,最终导致乳液具有更高的绝对电位。

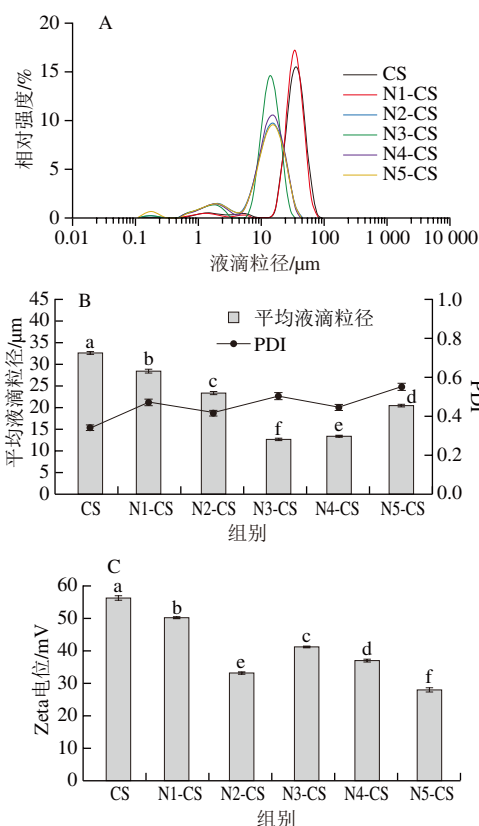


图5 乳液的粒径分布(A)、平均粒径(B)和Zeta电位(C)

Fig. 5 Droplet size distribution (A), mean droplet size (B) and zeta potential (C) of emulsions

## 2.6 Pickering乳液界面层微观结构分析

如图6所示,油相为山茶油,用尼罗红染色,油相液滴周围轮廓清晰可见,即水相(未染色区域)在液滴表面形成致密的包覆层,证实了所制备的乳液类型为O/W型。不同DA CS稳定乳液液滴的大小分布有明显差异,原料CS稳定的乳液液滴最大,并且少部分液滴存在聚结现象,这是因为在乳化过程中CS大分子迁移并吸附到油-水界面上,疏水性乙酰基锚定到油相中,亲水性片段则锚定到水相中。对于原料CS,最低的DA提供了最弱的疏水相互作用,导致最大液滴的形成,而少部分的聚集是因为在乳化过程中CS在油-水界面的吸附量有限,导致对油滴的保护不足。相较于高度脱乙酰化的CS, N1-CS、N2-CS、N3-CS、N4-CS所稳定的乳状液液滴更小、更加均一。这与Wang Chenglei等<sup>[36]</sup>报道的结果一致,不同的是,相较于将疏水性的植物甾醇与CS通过静电作用络合,通过引入乙酰基改变CS的N-乙酰-D-氨基葡萄糖单元物质的量比,所产生的液滴尺寸更小。而N5-CS稳定乳液的絮凝现象最严重,产生的差异可归因于它们具有不同的液滴之间排斥相互作用。相比于原料CS, N-CS稳定乳液中的液滴更小且分散均匀,这些观察结果与液滴尺寸测量结果一致。

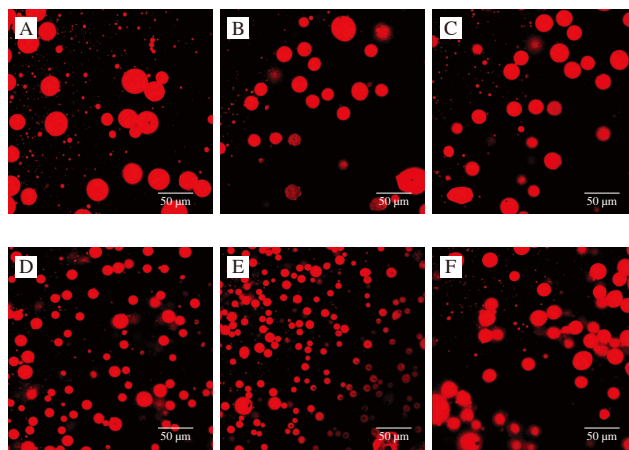


图6 不同DA CS稳定Pickering乳液的CLSM图像

Fig. 6 CLSM images of Pickering emulsions stabilized by N-acetylated chitosan with different DAs

## 2.7 Pickering乳液光学显微镜分析

如图7所示,未改性CS稳定的乳液液滴较大且不均一,而随着乙酰化程度的增加,产生平均粒径更小的乳液液滴,且液滴分布也趋向均一,没有任何液滴絮凝。但过高的取代度会使乳液液滴在分布上有明显的液滴聚集现象,这也与CLSM观察到的结果一致。液滴尺寸的变化可能是因为接枝的乙酰基会加速分子在界面上的吸附,从而导致更小液滴的快速形成。而液滴分布的趋势则由乳液的电势引起,高的电势能够提供更多的静电斥力稳定乳液,也导致液滴间的分布更加均匀。而由中取代度CS所稳定的乳液液滴粒径最小,分布更均匀,这可能是CS疏水改性所带来的界面活性与质子化所形成的静电斥力之间存在平衡,这种平衡会使颗粒在油-水界面处发生不可逆的吸附,起到防止油滴碰撞和聚结的作用,从而提升聚集颗粒稳定乳液液滴的能力。因此在合适的取代度以及电势的共同作用下,液滴呈现出小尺寸且分布均匀的状态。

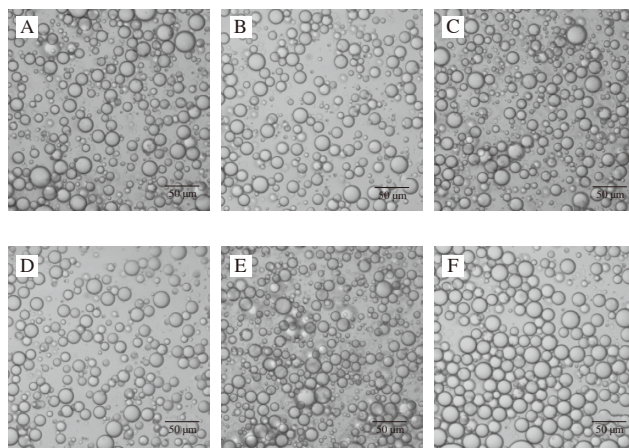


图7 光学显微镜下乳液分布情况

Fig. 7 Distribution of emulsions under optical microscope



### 2.8 Pickering乳液的EAI与ESI分析

如图8所示,随着乙酰化程度的增大,由CS稳定乳液的EAI从 $25.1 \text{ m}^2/\text{g}$ 上升,直至DA为32%时乳液EAI达到最大值,为 $39.5 \text{ m}^2/\text{g}$ ;后虽略有下降,但修饰后的N-CS稳定的乳液仍具有更高的EAI。ESI的变化与EAI具有一致性,N-CS稳定的乳液相较于CS稳定乳液ESI均有不同程度的提高,并在DA为32%时乳液ESI达到最大值(65.5 min)。结合上述颗粒特性分析结果,CS接枝乙酰基EAI与ESI的提高主要归因于疏水基团的引入带来更好的表面润湿性和更小的乳液粒径,以及与CS分子链上电荷密度的共同作用。一方面,乙酰基修饰减小了壳聚糖基Pickering乳液的粒径。有研究表明,乳液的稳定性对乳液粒径具有一定程度的依赖性,通常情况下,乳液的稳定性随液滴粒径的减小而增加<sup>[37]</sup>。因此较小的乳液液滴更有利于乳液的稳定。另一方面,接触角分析结果证明,疏水改性处理可赋予CS更好的两亲性能,有利于提高乳液的物理稳定性。此外,低乙酰化CS的氨基含量较多,在酸性条件下发生质子化后CS分子链上带更多的负电荷,提供更多的静电斥力,分子链呈更为刚性的延伸结构,这使得有限的疏水位点更难渗入油相中形成稳定的O/W液滴,并且带正电荷的CS也容易与带负电荷的油相互作用<sup>[38]</sup>。随着侧链氨基逐渐被乙酰基取代,质子化提供的静电相互作用减弱,CS分子链形成柔性的紧密结构,并且疏水性乙酰基团提供了可以更容易渗透到油相中的疏水位点,而位于水相中的亲水氨基基团可以提高空间稳定性,这使得相应的乳液具有更高的EAI和ESI。

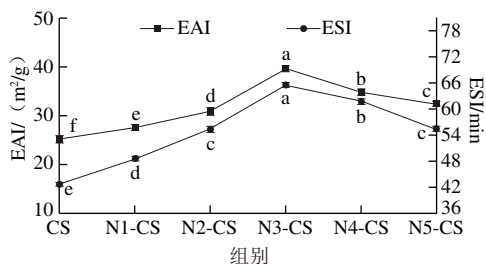


图8 N-乙酰化对乳液EAI和ESI的影响

Fig. 8 Effect of N-acetylation on EAI and ESI of emulsions

### 2.9 Pickering乳液CI分析

应用于食品的乳液需要在长期贮存条件下稳定,因此Pickering乳液的配方通常包含水相和油相成分,以及各种确保液滴稳定的有机或无机固体颗粒,有利于提高产品的稳定性和持久性。贮藏稳定性能够评估不同成分之间的相容性和相互作用。在贮藏过程中乳液CI可以评估乳液的贮藏稳定性。如图9所示,在室温条件下乳液CI随着贮存时间的延长而逐渐增加,CI越高说明相分离越明显,乳液稳定性越差<sup>[39]</sup>。DA的增加可以有效提高乳液的贮藏稳定性。未改性以及低取代度的乳液样品在

前5 d观察到分层,这是由于高亲水性的CS自聚集颗粒无法有效吸附在油-水界面,因此不足以均质和稳定多余的油滴。有研究表明,高电荷密度带来的强烈静电排斥作用也会使颗粒难以吸附在油-水界面上<sup>[40]</sup>。而中高取代度的乳液样品在5 d内保持高度稳定,第10天才开始出现乳析分层。贮藏30 d时CS稳定乳液的CI提高到55.8%,而由N-CS稳定的乳液在贮藏过程中CI均出现了不同程度下降。这可能是由于氨基被乙酰基取代后质子化能力减弱,绝对电位降低,导致空间位阻较低,因此CS颗粒很容易吸附在油-水界面处<sup>[41]</sup>。然而贮藏稳定性并没有随着N-乙酰化的程度增加而递增。当DA达到32%时CI降到最低值,为11.3%,随着DA的进一步增大CI逐渐升高,这表明乳液开始表现出不稳定的结构,可能是因为高取代度颗粒易聚集降低了它们在油-水界面的密度,使得水包油体系的不稳定性增加。不同的贮藏稳定性可归因于CS的DA和液滴之间相互排斥作用存在差异。

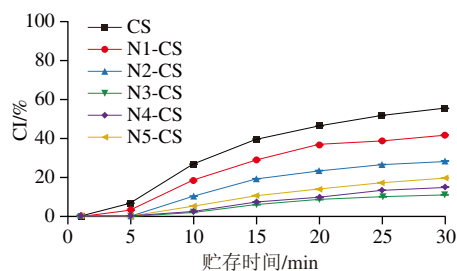


图9 N-乙酰化对乳液CI的影响

Fig. 9 Effect of N-acetylation on CI of emulsions

## 3 结论

本研究利用乙酸酐调控CS的DA获得不同的N-CS,并对乙酰化修饰引起的乳化性和乳液稳定性变化进行分析。结果表明,随着DA的增加CS两相接触角从 $58.11^\circ$ 增加至 $85.75^\circ$ ,非极性部分的增强赋予CS更好的乳化性能,所制备的O/W乳液电位绝对值减小,液滴尺寸分布向较低的尺寸范围移动,同时表现出更好的贮藏稳定性。当DA增加至32%时,得益于疏水作用的提升与Zeta电位提供空间电阻的共同作用,CS具备最大的EAI( $39.56 \text{ m}^2/\text{g}$ )和ESI(65.54 min),所稳定的Pickering乳液平均液滴尺寸降至最小( $12.71 \mu\text{m}$ )、乳液稳定性增加、CI明显下降;随着DA的进一步升高,由于缺乏足够的空间电阻,颗粒发生聚集,导致乳化性能和乳液稳定性减弱。综上所述,乙酰化CS具有不同的乳化稳定机制。在乳化过程中,低DA的CS具有较高的绝对电位,能够维持乳液稳定,但过度的亲水性会限制CS的乳化性能,并且强烈的静电排斥也会使胶体颗粒难以吸附在油-水界面上。所产生的乳液液滴较大,乳化活性与ESI较低,并且短时间的贮藏会产生分层。而中等DA的N-乙

酰化壳聚糖疏水改性所带来的界面活性与质子化所形成的静电斥力之间存在平衡,这种平衡在 $N$ -乙酰化壳聚糖大分子疏水性乙酰基锚定到油相中,亲水性碳水化合物片段进入水相的同时,提供的静电斥力能够防止油滴碰撞和聚结。这种具有两亲性CS产生的水包油乳液更加稳定,并且具有更好的乳化表现,但 $N$ -乙酰化程度过高会使氨基质子化能力降低,导致不能产生足够的静电斥力维持乳液的稳定。

#### 参考文献:

- [1] 韩春然,井弘书,黎晨晨,等.食品级固体颗粒稳定Pickering乳液机制的探讨[J].食品科技,2022,47(4):282-288. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2022.04.006.
- [2] JI C Y, WANG Y X. Nanocellulose-stabilized Pickering emulsions: fabrication, stabilization, and food applications[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2023, 318: 102970. DOI:10.1016/j.cis.2023.102970.
- [3] CHEN S Y, LAI H Z, SU X Y, et al. Rambutan-liked Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals for enhancing anti-bacterial activity and anti-inflammatory effect of *Chimonanthus nitens* Oliv. essential oil[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242: 124665. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.124665.
- [4] ZHANG J Q, LI H C, WANG J, et al. Dopamine-functionalized pectin-based Pickering emulsion as an oral drug delivery system[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2023, 673: 131807. DOI:10.1016/j.colsurfa.2023.131807.
- [5] PEITO S, PEIXOTO D, FERREIRA-FARIA I, et al. Nano- and microparticle-stabilized Pickering emulsions designed for topical therapeutics and cosmetic applications[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 615: 121455. DOI:10.1016/j.ijpharm.2022.121455.
- [6] 张倩洁,王平礼,张冬梅,等.天然固体颗粒稳定Pickering乳液的研究进展及其在化妆品中的应用[J].精细化工,2022,39(12):2377-2386,2397. DOI:10.13550/j.jxhg.20220465.
- [7] 隋振全,毛金超,徐桂云,等.天然生物基材料的制备、性质与应用(I):自然界唯一的碱性多糖:甲壳素/壳聚糖[J].日用化学工业,2022,52(1):7-14. DOI:10.3969/j.issn.1001-1803.2022.01.002.
- [8] 钱晓晴,王立敏,张文,等.壳聚糖基Pickering乳液及其在食品中的应用[J].食品科学,2023,44(21):386-395. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230428-280.
- [9] TANG Q L, HUANG G L. Improving method, properties and application of polysaccharide as emulsifier[J]. Food Chemistry, 2022, 376: 131937. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131937.
- [10] LI D D, TAO Y, SHI Y N, et al. Effect of re-acetylation on the acid hydrolysis of chitosan under an induced electric field[J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125767. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125767.
- [11] HAMDI M, NASRI R, HAJJI S, et al. Acetylation degree, a key parameter modulating chitosan rheological, thermal and film-forming properties[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 48-60. DOI:10.1016/j.foodhyd.2018.07.027.
- [12] POLAT E G, ACEMI A, ÖZEN F. The effects of chitosan and its acetylation degree on *in vitro* seed germination and organ development in *Ageratum houstonianum* Mill[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2022, 149(3): 809-821. DOI:10.1007/s11240-022-02305-5.
- [13] HUANG Z, ZONG M H, LOU W Y. Effect of acetylation modification on the emulsifying and antioxidant properties of polysaccharide from *Milletia speciosa* Champ[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107217. DOI:10.1016/j.foodhyd.2021.107217.
- [14] LAVERTU M, DARRAS V, BUSCHMANN M D. Kinetics and efficiency of chitosan reacylation[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1192-1198. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.08.096.
- [15] MAGHAMI G G, ROBERTS G A F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan[J]. Die Makromolekulare Chemie, 1988, 189(1): 195-200. DOI:10.1002/macp.1988.021890118.
- [16] GAO L, JIN L H, LIU Q N, et al. Recent advances in the extraction, composition analysis and bioactivity of *Camellia* (*Camellia oleifera* Abel.) oil[J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 143: 104211. DOI:10.1016/j.tifs.2023.104211.
- [17] GATTO M. Study of chitosan with different degrees of acetylation as cardboard paper coating[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 56: 63. DOI:10.1016/j.carbpol.2019.01.053.
- [18] LIU Q, CHANG X, SHAN Y, et al. Fabrication and characterization of Pickering emulsion gels stabilized by zein/pullulan complex colloidal particles[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(9): 3630-3643. DOI:10.1002/jsfa.10992.
- [19] LU X X, LIU H S, HUANG Q R. Fabrication and characterization of resistant starch stabilized Pickering emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103: 105703. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.105703.
- [20] MENG W H, SUN H N, MU T H, et al. Pickering emulsions with chitosan and macroalgal polyphenols stabilized by layer-by-layer electrostatic deposition[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 300: 120256. DOI:10.1016/j.carbpol.2022.120256.
- [21] LAJNAF R, TRIGUI I, SAMET-BALI O, et al. Comparative study on emulsifying and physico-chemical properties of bovine and camel acid and sweet wheys[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 268: 109741. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2019.109741.
- [22] XU W, NING Y L, WU S P, et al. Heat stability promoted Pickering emulsions stabilized by gliadin/sodium caseinate nanoparticles and konjac glucomannan[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 182: 114847. DOI:10.1016/j.lwt.2023.114847.
- [23] CHAE K S, SHIN C S, SHIN W S. Characteristics of cricket (*Gryllus bimaculatus*) chitosan and chitosan-based nanoparticles[J]. Food Science and Biotechnology, 2018, 27(3): 631-639. DOI:10.1007/s10068-018-0314-4.
- [24] SABNIS S, BLOCK L H. Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of  $N$ -deacetylation of chitosan[J]. Polymer Bulletin, 1997, 39(1): 67-71. DOI:10.1007/s002890050121.
- [25] ASHUROV N S, ABDURAZAKOV M, YUGAY S M, et al. Structure and thermal properties of chitin and chitosan from various sources[J]. Journal of Physics: Conference Series, 2022, 2388(1): 012011. DOI:10.1088/1742-6596/2388/1/012011.
- [26] 任东文,包德才,王为,等. $N$ -乙酰化壳聚糖的FTIR和XRD研究[J].光谱学与光谱分析,2006,26(7):1217-1220. DOI:10.3321/j.issn:1000-0593.2006.07.009.
- [27] SUKMAWAN R, KUSMONO, WILDAN M W. Optimizing acetic anhydride amount for improved properties of acetylated cellulose nanofibers from sisal fibers using a high-speed blender[J]. ACS Omega, 2023, 8(30): 27117-27126. DOI:10.1021/acsomega.3c02178.
- [28] LIM C, HWANG D S, LEE D W. Intermolecular interactions of chitosan: degree of acetylation and molecular weight[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 259: 117782. DOI:10.1016/j.carbpol.2021.117782.
- [29] ADEBOWALE K O, AFOLABI T A, OLU-OWOLABI B I. Functional, physicochemical and retrogradation properties of sword



- bean (*Canavalia gladiata*) acetylated and oxidized starches[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 65(1): 93-101. DOI:10.1016/j.carbpol.2005.12.032.
- [30] NUERXIATI R, MUTAILIPU P, ABUDUWAILI A, et al. Effects of different chemical modifications on the structure and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(6): 2434-2444. DOI:10.1111/1750-3841.15734.
- [31] HU Q B, WANG T R, ZHOU M Y, et al. *In vitro* antioxidant-activity evaluation of gallic-acid-grafted chitosan conjugate synthesized by free-radical-induced grafting method[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(29): 5893-5900. DOI:10.1021/acs.jafc.6b02255.
- [32] WANG S Y, ZHOU B, YANG X Q, et al. Tannic acid enhanced the emulsion stability, rheology and interface characteristics of *Clanis bilineata tingtauca* Mell protein stabilised oil-in-water emulsion[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(8): 5228-5238. DOI:10.1111/ijfs.15839.
- [33] LI F F, LI X H, HUANG K L, et al. Preparation and characterization of Pickering emulsion stabilized by hordein-chitosan complex particles[J]. Journal of Food Engineering, 2021, 292: 110275. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2020.110275.
- [34] TEA L, RENOU F, NICOLAI T. Effect of hydrophobicity and molar mass on the capacity of chitosan and  $\kappa$ -carrageenan to stabilize water in water emulsions[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 271: 118423. DOI:10.1016/j.carbpol.2021.118423.
- [35] MA L, ZOU L Q, MCCLEMENTS D J, et al. One-step preparation of high internal phase emulsions using natural edible Pickering stabilizers: gliadin nanoparticles/gum arabic[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105381. DOI:10.1016/j.foodhyd.2019.105381.
- [36] WANG C L, JIANG H, LI Y X. Water-in-oil Pickering emulsions stabilized by phytosterol/chitosan complex particles[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2023, 657: 130489. DOI:10.1016/j.colsurfa.2022.130489.
- [37] RAHN-CHIQUE K, URBINA-VILLALBA G. Dependence of emulsion stability on particle size: relative importance of drop concentration and destabilization rate on the half lifetimes of O/W nanoemulsions[J]. Journal of Dispersion Science and Technology, 2017, 38(2): 167-179. DOI:10.1080/01932691.2016.1149715.
- [38] WANG X Y, HEUZEY M C. Chitosan-based conventional and Pickering emulsions with long-term stability[J]. Langmuir, 2016, 32(4): 929-936. DOI:10.1021/acs.langmuir.5b03556.
- [39] ZHANG K M, MAO Z J, HUANG Y C, et al. Ultrasonic assisted water-in-oil emulsions encapsulating macro-molecular polysaccharide chitosan: influence of molecular properties, emulsion viscosity and their stability[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 64: 105018. DOI:10.1016/j.ultsonch.2020.105018.
- [40] SCHMIDT M M, BOCHENEK S, GAVRILOV A A, et al. Influence of charges on the behavior of polyelectrolyte microgels confined to oil-water interfaces[J]. Langmuir, 2020, 36(37): 11079-11093. DOI:10.1021/acs.langmuir.0c02081.
- [41] AHMED R, WANG M W, QI Z Y, et al. Pickering emulsions based on the pH-responsive assembly of food-grade chitosan[J]. ACS Omega, 2021, 6(28): 17915-17922. DOI:10.1021/acsomega.1c01490.