

菜籽分离蛋白 - 卡拉胶轭合物 - 花椒精油 Pickering 乳液的构建及其理化性质分析

陈俊芃¹, 王雯曦¹, 张琴秋¹, 沈静², 张清¹

(1. 四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 宁津县市场监督管理局, 山东 德州 253400)

摘要:为促进花椒精油和菜籽蛋白的开发利用,采用热诱导法制备了菜籽分离蛋白(RPI) - 卡拉胶轭合物纳米颗粒,并以此为乳化剂制备 Pickering 乳液负载花椒精油。通过单因素试验和响应面法优化了 RPI - 卡拉胶轭合物 - 花椒精油 Pickering 乳液的制备条件。对制备的 RPI - 卡拉胶轭合物 - 花椒精油 Pickering 乳液的类型、微观结构、热稳定性、贮藏稳定性进行了表征,并考察了其抑菌活性。结果表明:RPI - 卡拉胶轭合物 - 花椒精油 Pickering 乳液最佳制备条件为 RPI - 卡拉胶轭合物纳米颗粒添加量 0.95%、花椒精油与大豆油混合物(体积比 2:3)添加量 50.6%、水相 pH 9.8,在此条件下包封率为 92.34%。制备的 RPI - 卡拉胶轭合物 - 花椒精油 Pickering 乳液为水包油型,其在 20~60℃范围内具有较好的稳定性,但在 60℃以上不稳定。经过 30 d 贮藏,乳液乳滴粒径变化较小。乳液具有良好的乳滴特征,为稳定性提供了物理基础。与花椒精油和大豆油的混合物相比,RPI - 卡拉胶轭合物 - 花椒精油 Pickering 乳液在作用受试菌 42 h 前具有相似的抑菌效果,但在 42 h 后表现出更强的抑菌效果。综上,RPI - 卡拉胶轭合物 - 花椒精油 Pickering 乳液包封率较高,且具备优越的热稳定性、贮藏稳定性和抑菌活性。

关键词:菜籽分离蛋白;卡拉胶;Pickering 乳液;花椒精油;抑菌效果

中图分类号:TS201.2;TS221 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)06-0034-08

Fabrication of rapeseed protein isolate - carrageenan conjugate - pepper essential oil Pickering emulsion and analysis of its physicochemical properties

CHEN Junpeng¹, WANG Wenxi¹, ZHANG Qinqiu¹,
SHEN Jing², ZHANG Qing¹

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China;

2. Ningjin County Administration for Market Regulation, Dezhou 253400, Shandong, China)

Abstract: In order to promote the development and utilization of pepper essential oil and rapeseed protein, rapeseed protein isolate (RPI) - carrageenan conjugate nanoparticle was prepared by thermal induction method, and Pickering emulsion was prepared to load pepper essential oil from this material.

The preparation conditions of RPI - carrageenan conjugate - pepper essential oil Pickering emulsion were optimized by single factor experiment and response surface methodology. The type, microstructure,

thermal stability and storage stability of the prepared RPI - carrageenan conjugate - pepper essential oil Pickering emulsion were characterized, and its antibacterial activities were investigated. The results showed that the optimal conditions for the preparation of RPI - carrageenan conjugate - pepper essential oil Pickering emulsion were obtained as follows: dosage of RPI -

收稿日期:2023-11-03;修回日期:2024-03-13

项目基金:国家自然科学基金青年项目(32101981);四川农业大学大学生创新训练计划项目(省级)

作者简介:陈俊芃(2003),男,在读本科,食品科学与工程专业(E-mail)3137568707@qq.com。

通信作者:张清,教授,博士(E-mail)zhangqing@sicau.edu.cn。

carrageenan conjugate nanoparticle 0.95%, dosage of pepper essential oil – soybean oil mixture (volume ratio 2:3) 50.6%, and aqueous phase pH 9.8. Under these conditions, the encapsulation rate was 92.34%. The prepared RPI – carrageenan conjugate – pepper essential oil Pickering emulsion was oil – in – water type, which had good stability at 20 – 60 °C, but was not stable above 60 °C. After 30 d storage, the average particle size of the emulsion changed little. The emulsions had good milk droplet characteristics, which provided a physical basis for stability. Compared with the blend of pepper essential oil and soybean oil, the RPI – carrageenan conjugate – pepper essential oil Pickering emulsion showed similar antibacterial effect within 42 h of action on the subject bacteria, but showed stronger antibacterial effect after 42 h. In conclusion, RPI – carrageenan conjugate – pepper essential oil Pickering emulsion has higher encapsulation rate and superior thermal stability, storage stability and antibacterial activity.

Key words: rapeseed protein isolate; carrageenan; Pickering emulsion; pepper essential oil; antibacterial effect

花椒精油是从花椒中提取的具有麻辣味的黄色或淡黄绿色油状液体,主要含有芳樟醇、*D*-柠檬烯、伪柠檬烯、4-松油烯醇、 β -月桂烯、 α -松油醇、蒎品烯-4-醇等活性成分^[1]。相较花椒原料而言,花椒精油具有香气纯正、使用方便等优势。与其他植物精油类似,花椒精油拥有较好的抑菌性能,随着其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等病菌的抑制能力持续得到证实^[2],花椒精油有向保鲜剂方面发展的趋势^[3]。然而,由于存在易挥发、环境稳定性差、亲水性弱等劣势,花椒精油在食品、医药、化妆品等领域的应用受到一定限制。采用乳化对花椒精油进行包封,可降低花椒精油的氧化变质风险、保护挥发性组分、掩盖刺激性气味、实现缓释以延长作用时间,并且有利于提高其在水体系下的溶解度及稳定性。

乳化包封需要选择适宜的乳化剂。传统乳化剂以小分子表面活性剂为主,为保持体系稳定,乳化剂的添加量相对偏高。此外,在使用过程中,表面活性剂常导致起泡、空气夹带等问题,所得乳液也易受外界环境因素的影响。相较而言,由植物源固体颗粒稳定的 Pickering 乳液具有乳化剂用量少、乳化剂无毒无害、抗奥氏熟化、不易被破坏等优点,在食品、医药、材料、纺织等领域具有广阔的应用前景^[4]。植物蛋白和多糖是目前用于制备 Pickering 乳液的天然植物性固体颗粒的主要生物大分子,蛋白质与多糖通过糖基化等反应进行轭合形成蛋白质 – 多糖轭合物,其作为一种功能成分,可用于提高乳液体系的稳定性,或将生物活性化合物封装,从而提高食品的营养价值^[5]。菜籽粕因成本较低成为满足该领域生产的潜在资源。从菜籽粕中获得的菜籽分离蛋白(Rapeseed protein isolate, RPI)是一种优质的天然植物蛋白,其营养丰富、功能特性优良,在食品领域被广泛应用。卡拉胶是由半乳糖及脱水半乳糖所组

成的多糖类硫酸酯的钙、钾、钠、铵盐。作为一种从红藻类海藻中提取出来的亲水性胶体,卡拉胶与蛋白质共轭结合后可改善蛋白质的热稳定性、乳化活性等加工特性^[6]。针对植物精油这类不稳定、直接暴露易氧化、受到光热变化影响易分解的天然生物活性成分,以 Pickering 乳液为负载体系对其进行包封递送具有良好的应用前景。因此,本研究采用热诱导凝胶法制备 RPI – 卡拉胶轭合物纳米颗粒,以大豆油为油相、RPI – 卡拉胶轭合物纳米颗粒为 Pickering 乳液固体颗粒制备 Pickering 乳液负载花椒精油,通过单因素试验和响应面试验优化 RPI – 卡拉胶轭合物 – 花椒精油 Pickering 乳液制备条件,对乳液类型、微观结构和稳定性进行表征,同时测定该乳液的抑菌活性,以期增强花椒精油的稳定性及抑菌活性,实现花椒精油和 RPI 的进一步开发利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

RPI(蛋白质含量为 80%),蓝力生物技术(西安)有限公司; κ -卡拉胶,绿新食品有限公司;花椒精油,上海源叶生物科技有限公司;大豆油,益海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司;PDA 培养基,青岛海博生物技术有限公司;卷枝毛霉,保藏于四川农业大学食品学院;溴化钾、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙醇、氢氧化钠、生理盐水、正己烷、盐酸等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

VarioskanFlash 酶标仪, HK – 20B 型摇摆式高速中药粉碎机, JY10002 型电子天平, DHG – 2200B 型电热恒温干燥箱, FE20K 型 pH 计, MYP11 – 2 型数显恒温磁力搅拌器, X3R 型高速冷冻离心机, LGJ – 18S 型冷冻干燥机, ZWY – 211B 型卧式恒温摇床, ThermoBR4i 型冷冻离心机, Rise – 2006 激光

粒度分析仪, E200 双目生物显微镜, 759S 紫外分光光度计, SW-CJ-2FD 洁净工作台, Nano ZS 动态光纳米粒度电位仪等。

1.2 试验方法

1.2.1 RPI-卡拉胶复合物的制备

参考赵丹等^[7]的方法并稍作修改。将 RPI 与 κ -卡拉胶(1.5 g/100 mL)以质量比 2:1 混合,用超纯水溶解至最终质量分数为 2%,缓慢搅拌 8 h 混合均匀后,置于 4 °C 冰箱水合过夜,随后冷冻干燥 24 h,置于 4 °C 冰箱中冷藏备用。取一定量干燥后的粉末置于培养皿中,在 60 °C、相对湿度 79% 的培养箱中反应 24 h 后,立即冷却以停止反应,得到 RPI-卡拉胶复合物,置于 -20 °C 储存备用。

1.2.2 RPI-卡拉胶复合物纳米颗粒的制备

参考王志高^[8]的热诱导法并稍作修改。在磁力搅拌下,将 RPI-卡拉胶复合物充分溶解在超纯水中得到质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,停止搅拌,将溶液置于 90 °C 水浴中加热 30 min,随后立即将加热后的溶液置于冰水中冷却至 25 °C,然后冷冻干燥得到 RPI-卡拉胶复合物纳米颗粒(后简称“纳米颗粒”)。

1.2.3 纳米颗粒稳定的 Pickering 乳液的制备

参考 Liu 等^[9]的方法并稍作修改。将一定量纳米颗粒分散于超纯水中作为水相,用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 调节水相 pH 后加入一定量的油相,采用高速剪切机于 12 000 r/min 下分散 3 min,静置 30 min,获得 Pickering 乳液。

1.2.4 RPI、RPI-卡拉胶混合物及 RPI-卡拉胶复合物粒径及多分散指数(PDI)测定

将 RPI、RPI-卡拉胶混合物(质量比 2:1)及 RPI-卡拉胶复合物分别溶解于超纯水,使其质量分数为 2%。用超纯水稀释 40 倍后,采用 Nano ZS 动态光纳米粒度电位仪对样品的平均粒径和 PDI 进行测定。

1.2.5 Pickering 乳液包封率的测定

参考 Qin 等^[10]的方法并稍作修改。将 0.5 mL 乳液与 4.5 mL 正己烷在 50 mL 离心管中混合,4 000 r/min 离心 10 min,收集上层正己烷层。将上层正己烷层稀释 10 倍后,用紫外分光光度计在波长 279 nm(大豆油为油相)/258 nm(大豆油和花椒精油混合物为油相)下测定吸光度,根据大豆油/花椒精油的标准曲线,计算乳液中游离油相质量浓度(C_1),以初始油相质量浓度(C_0)和 C_1 按式(1)计算包封率(E)。

$$E = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\% \quad (1)$$

1.2.6 Pickering 乳液稳定性测定

参考 Zhang 等^[11]的方法并稍作修改,以乳化稳定时间(ESI)表征乳液稳定性。取 100 μ L 乳液与

5 mL 1.0% SDS 混合,分别在 0 min 和 30 min 后在底部取样,使用紫外分光光度计在 500 nm 处测定样品的吸光度(A_0 和 A_{30})。乳化稳定时间(S)根据公式(2)进行计算。

$$S = A_0 \times 30 / (A_0 - A_{30}) \quad (2)$$

1.2.7 RPI-卡拉胶复合物-花椒精油 Pickering 乳液的表征

1.2.7.1 乳液类型测定

采用乳液分散法^[12]测定。将 RPI-卡拉胶复合物-花椒精油 Pickering 乳液(后简称“花椒精油 Pickering 乳液”)分别加入大豆油或超纯水中。如果乳液液滴在油相中快速分散,并在水相中保持团聚,则是油包水(W/O)型乳液,反之则是水包油(O/W)型乳液。

1.2.7.2 微观结构观察

参考吴子涵等^[13]的方法,取 100 μ L 新鲜制得的花椒精油 Pickering 乳液滴加到载玻片上,盖上盖玻片,采用生物显微镜观察液滴分布。

1.2.7.3 热稳定性和贮藏稳定性

参考 Wang 等^[14]的方法,并稍作修改。将同批制备的花椒精油 Pickering 乳液分别置于 20、40、60 °C 和 80 °C 下水浴加热 30 min,测定不同温度下液滴的粒径变化分析其热稳定性。将新制备的花椒精油 Pickering 乳液分别倒入不同的试管中,密封,室温(26 °C)下保持不同的时间(0、6、12、18、24、30 d),测定不同时间下液滴的粒径变化分析其贮藏稳定性。

1.2.7.4 乳滴粒径测定

参考 Lin 等^[15]的方法,利用 Rise-2006 激光粒度分析仪发射激光对样品的平均粒径进行测定,在激光束照射下,粒径与散射光的角度成反比,而散射光光强随角度增加呈对数规律衰减。测定时保持泵转速为 2 000 r/min,遮光比大于 1。

1.2.8 花椒精油 Pickering 乳液抑菌活性测定

1.2.8.1 花椒精油对毛霉的半效抑菌浓度(EC_{50})的测定

采用琼脂稀释法^[16]进行测定。将具有一定浓度梯度的花椒精油加入 100 mL PDA 培养基中,分别使花椒精油含量依次为 0、0.6、1.2、2.4、4.8、9.6、19.2、38.4、76.8 μ L/mL,将培养皿做好标记。再用直径为 6 mm 的无菌打孔器从培养 3~5 d 的卷枝毛霉菌落边缘位置切取菌饼,将菌饼镶嵌在含花椒精油的培养皿中,于 28 °C 培养箱中培养 72 h,观察并记录卷枝毛霉生长情况。采用十字交叉法测定菌落直径,按照式(3)计算菌丝的径向生长抑制率

(I)。对花椒精油含量和生长抑制率进行拟合,得到花椒精油对毛霉的 EC_{50} 。

$$I = (D_0 - D) / D_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中: D_0 和 D 分别为对照菌菌落直径和处理菌菌落直径, mm。

1.2.8.2 花椒精油及花椒精油 Pickering 乳液对受试菌生长的抑制作用

将花椒精油与大豆油混合液(体积比 2:3)和花椒精油 Pickering 乳液于超净工作台, 打开紫外照射灯, 室温放置 3 h 后再进行后续试验。将花椒精油与大豆油混合液和花椒精油 Pickering 乳液按照一定浓度加入 100 mL PDA 培养基中, 分别接种卷枝毛霉于精油培养皿和精油乳液培养皿中, 将培养皿置于 28 °C 恒温培养箱内培养, 分别在 6、18、30、42、54、66 h 和 78 h 时, 记录菌落直径, 绘制毛霉在不同抑菌成分下的生长曲线。同时以不添加精油和精油乳液的培养皿作对照。

1.2.9 数据处理

样品重复 3 次试验, 采用 SPSS20.0 软件进行数据处理, 采用 Design - Expert 13 软件进行响应面分析, 采用 Origin2022 软件绘图, 显著水平均为 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 RPI - 卡拉胶复合物的粒径及 PDI

RPI、RPI - 卡拉胶混合物和 RPI - 卡拉胶复合物的粒径及 PDI 见表 1。

表 1 RPI、RPI - 卡拉胶混合物和 RPI - 卡拉胶复合物的粒径及 PDI

样品	平均粒径/nm	PDI
RPI	161.0 ± 5.3	0.460 ± 0.017
RPI - 卡拉胶混合物	353.4 ± 16.8	1.000 ± 0.000
RPI - 卡拉胶复合物	710.2 ± 6.4	0.627 ± 0.038

由表 1 可以看出, RPI - 卡拉胶复合物的平均粒径大于 RPI 和 RPI - 卡拉胶混合物的粒径, 说明 RPI 与卡拉胶反应导致粒径增大。RPI - 卡拉胶混合物 PDI 为 1.000, 说明其粒径大小均一度极低, 而 RPI - 卡拉胶复合物的 PDI 小于混合物的, 说明 RPI - 卡拉胶复合物的粒径分布更均一, 为 Pickering 乳液的稳定提供了前置条件。

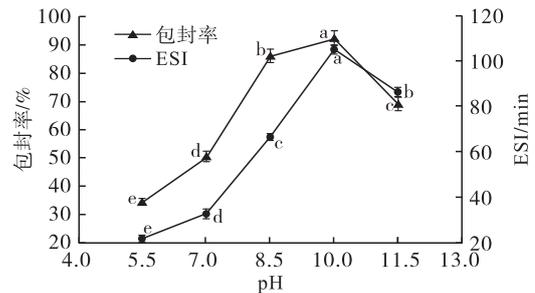
2.2 花椒精油 Pickering 乳液制备条件的确定

2.2.1 未负载花椒精油 Pickering 乳液制备的单因素试验

2.2.1.1 水相 pH 对 Pickering 乳液包封率及稳定性的影响

固定纳米颗粒添加量为 0.9% (以水相质量为基准), 大豆油添加量为 50% (以水和油的总体积为

基准), 调节水相 pH 分别为 5.5、7.0、8.5、10.0、11.5, 考察水相 pH 对 Pickering 乳液包封率及稳定性的影响, 结果如图 1 所示。



注: 同一曲线上不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同

图 1 不同水相 pH 下 Pickering 乳液的包封率和乳化稳定时间

由图 1 可知: 水相 pH 在 8.5 ~ 11.5 时, 乳液的乳化稳定时间及包封率较大, 说明对应乳液的乳化效果较好, 稳定性较高; 水相 pH 在 5.5 ~ 10.0 时, 乳液包封率和乳化稳定时间呈显著上升趋势, 在 pH 10.0 时达到最高点, 之后随水相 pH 升高呈下降趋势。沈小倩等^[17]在对甘蔗渣纳米纤维 Pickering 乳液的稳定性影响因素研究中发现乳液稳定性随 pH 增大而增大, 与本研究结果不同。本研究中, 在水相 pH 超过 10.0 时, 乳化稳定时间和包封率下降, 可能是由于加入过量的负离子屏蔽了颗粒表面电荷, 导致吸附效率减弱^[18]。综合考虑, 选择水相 pH 8.5、10.0 和 11.5 作为优化 Pickering 乳液制备的条件。

2.2.1.2 纳米颗粒添加量对 Pickering 乳液包封率及稳定性的影响

固定水相 pH 为 10.0, 大豆油添加量为 50%, 通过调节纳米颗粒添加量分别为 0.6%、0.9%、1.2%、1.5% 和 1.8%, 考察纳米颗粒添加量对 Pickering 乳液包封率及稳定性的影响, 结果如图 2 所示。

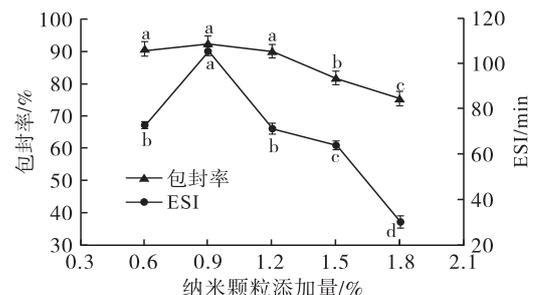


图 2 不同纳米颗粒添加量下 Pickering 乳液的包封率和乳化稳定时间

由图 2 可知: 纳米颗粒添加量在 0.6% ~ 1.2% 时, 乳液的包封率变化较为平缓, 且存在较高值, 纳米颗粒添加量在 1.2% ~ 1.8% 时则呈下降趋势; 在纳米颗粒添加量为 0.9% 时乳化稳定时间达到峰

值,说明此时乳液具有较好的乳化稳定性,在纳米颗粒添加量大于 0.9% 时,乳化稳定时间呈显著下降趋势,这可能是由于过量的纳米颗粒可能使乳滴絮凝和聚集^[19],导致乳液包封率和稳定性下降。综合考虑,选择纳米颗粒添加量为 0.6%、0.9% 和 1.2% 作为优化 Pickering 乳液制备的条件。

2.2.1.3 大豆油添加量对 Pickering 乳液包封率及稳定性的影响

固定纳米颗粒添加量为 0.9%,水相 pH 为 10.0,调节大豆油添加量分别为 40%、50%、60%、70% 和 80%,考察大豆油添加量对 Pickering 乳液包封率及稳定性的影响,结果如图 3 所示。

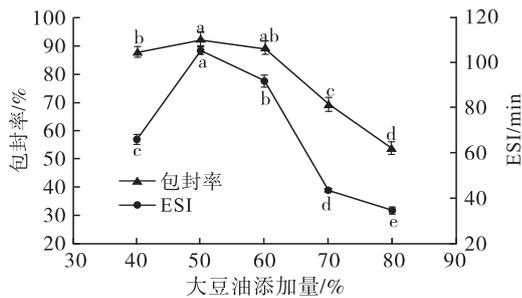


图 3 不同大豆油添加量下 Pickering 乳液的包封率和乳化稳定时间

由图 3 可知:大豆油添加量在 40% ~ 60% 时,乳液的包封率具有较高值,在大豆油添加量为 60% ~ 80% 时则呈显著下降趋势;大豆油添加量在 50% 时,乳液的乳化稳定时间达到峰值,随后逐渐降低,这可能是由于 0.9% 的纳米颗粒添加量对油相覆盖有上限,过量的大豆油无法被纳米颗粒完全乳化。综合考虑,选择大豆油添加量 40%、50% 和 60% 作为优化 Pickering 乳液制备的条件。

2.2.2 未负载花椒精油 Pickering 乳液制备的响应面优化试验

在单因素试验的基础上,根据 Box - Behnken 设计原理,选择水相 pH (A)、纳米颗粒添加量 (B)、大豆油添加量 (C) 为考察因素,以乳液体系的包封率 (Y) 以及乳化稳定时间 (Z) 为响应变量,进行 Pickering 乳液制备条件的响应面优化试验,使用 Design - Expert 13 软件进行数据分析。响应面优化试验设计及结果见表 2,包封率和乳化稳定时间的响应面回归模型方差分析分别见表 3 及表 4。

表 2 响应面优化试验设计及结果

试验号	A	B/%	C/%	Y/%	Z/min
1	10.0	1.2	60	86.52	87.90
2	10.0	0.9	50	90.58	101.43
3	10.0	0.9	50	90.33	112.40
4	8.5	1.2	50	88.49	54.46

续表 2

试验号	A	B/%	C/%	Y/%	Z/min
5	8.5	0.9	40	83.80	61.51
6	11.5	0.9	60	65.35	71.63
7	10.0	0.9	50	90.21	104.76
8	10.0	0.6	60	86.43	44.43
9	8.5	0.6	50	84.34	60.22
10	11.5	1.2	50	69.23	78.10
11	10.0	1.2	40	90.52	57.40
12	8.5	0.9	60	86.44	70.76
13	11.5	0.9	40	73.23	78.56
14	10.0	0.9	50	92.76	103.42
15	10.0	0.6	40	82.26	62.93
16	10.0	0.9	50	92.32	108.82
17	11.5	0.6	50	70.75	74.24

表 3 包封率的响应面回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	1 194.60	9	132.73	67.69	<0.000 1	**
A	520.19	1	520.19	265.27	<0.000 1	**
B	15.07	1	15.07	7.69	0.027 6	*
C	3.21	1	3.21	1.64	0.241 3	
AB	8.04	1	8.04	4.10	0.082 6	
AC	27.67	1	27.67	14.11	0.007 1	**
BC	16.69	1	16.69	8.51	0.022 4	*
A ²	521.82	1	521.82	266.10	<0.000 1	**
B ²	15.28	1	15.28	7.79	0.026 9	*
C ²	35.47	1	35.47	18.09	0.003 8	**
残余项	13.73	7	1.96			
失拟项	7.93	3	2.64	1.82	0.283 2	
纯误差	5.80	4	1.45			
总和	1 208.32	16				

注: * 表示显著 ($p < 0.05$), ** 表示极显著 ($p < 0.01$)。下同

表 4 乳化稳定时间的响应面回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	6 830.99	9	759.00	15.78	0.000 7	**
A	386.14	1	386.14	8.03	0.025 3	*
B	162.36	1	162.36	3.38	0.108 8	
C	25.63	1	25.63	0.53	0.489 1	
AB	23.14	1	23.14	0.48	0.510 3	
AC	65.45	1	65.45	1.36	0.281 6	
BC	600.25	1	600.25	12.48	0.009 6	**
A ²	1 075.27	1	1 075.27	22.36	0.002 1	**
B ²	2 311.53	1	2 311.53	48.06	0.000 2	**
C ²	1 612.65	1	1 612.65	33.53	0.000 7	**
残余项	336.68	7	48.10			
失拟项	258.82	3	86.27	4.43	0.092 2	
纯误差	77.85	4	19.46			
总和	7 167.67	16				

根据表2数据得到包封率的二次多项式回归模型为 $Y = -587.09 + 105.18A + 108.22B + 5.21C - 3.15AB - 0.18AC - 0.68BC - 4.95A^2 - 21.17B^2 - 0.03C^2$ 。由表3可知,包封率模型 p 小于 0.000 1,表明回归模型极显著,失拟项 p 为 0.283 2,大于 0.05,表明失拟项不显著,试验误差小,且决定系数 (R^2) 为 0.988 6,调整决定系数 (R^2_{Adj}) 为 0.974 0,表明模型拟合效果良好,可以用于对乳液包埋率的预测。回归模型的一次项 A (水相 pH) 影响极显著 ($p < 0.000 1$), B (纳米颗粒添加量) 影响显著, C (大豆油添加量) 影响不显著;交互项与二次项中 AC 、 A^2 、 C^2 影响极显著, BC 、 B^2 影响显著,其余无统计学意义 ($p > 0.05$)。通过 F 值可知,3 个因素对乳液包封率的影响强弱顺序是水相 pH > 纳米颗粒添加量 > 大豆油添加量。

根据表2数据得到乳化稳定时间的二次多项式回归模型为 $Z = -1 275.98 + 155.35A + 226.02B + 18.77C + 5.34AB - 0.27AC + 4.08BC - 7.10A^2 - 260.34B^2 - 0.20C^2$ 。由表4可知,模型 p 为 0.000 7,表明回归模型极显著,失拟项 p 为 0.092 2,大于 0.05,表明失拟项不显著,试验误差小,且 R^2 为 0.953 0, R^2_{Adj} 为 0.892 6,表明模型拟合效果良好,可以用于对乳液乳化稳定时间的预测。回归模型的一次项 A (水相 pH) 影响显著, B (纳米颗粒添加量)、 C (大豆油添加量) 影响不显著;交互项与二次项中 BC 、 A^2 、 B^2 和 C^2 影响极显著 ($p < 0.01$),其余无统计学意义 ($p > 0.05$)。通过 F 值可知,3 个因素对乳液乳化稳定时间的影响强弱顺序是水相 pH > 纳米颗粒添加量 > 大豆油添加量。

用 Design - Expert 13 软件对回归方程模型以包封率和乳化稳定时间为最大值进行优化,并结合实际操作条件,得到稳定 Pickering 乳液的最佳制备条件为水相 pH 9.8、纳米颗粒添加量 0.95%、大豆油添加量 50.6%,在此条件下预测包封率为 92.33%,乳化稳定时间为 105.10 min。为验证模型可靠性,采用上述条件制备 Pickering 乳液,测得包封率为 91.24%,乳化稳定时间为 107.43 min,实测值与预测值之间相对误差在 $\pm 5\%$ 之内,说明该模型可以反映 3 个因素对乳液包封率及乳化稳定时间的影响,真实可靠。

2.2.3 油相中花椒精油与大豆油体积比例的确定

将花椒精油与大豆油体积比调整为 1:4、2:3、3:2、4:1 后,在 2.2.2 确定的 Pickering 乳液最佳制备工艺条件下,考察花椒精油与大豆油体积比对花椒精油包封率的影响,结果见图 4。

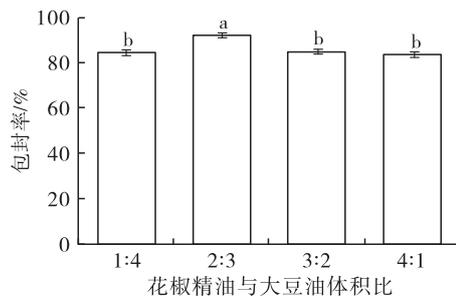


图4 不同花椒精油与大豆油体积比下 Pickering 乳液对花椒精油的包封率

由图4可知,随着花椒精油与大豆油体积比的增加,花椒精油的包封率增加,在花椒精油与大豆油体积比为 2:3 时包封率达到最大值(92.34%),继续减少大豆油体积,花椒精油的包封率下降。因此,选择花椒精油与大豆油体积比 2:3 结合响应面优化的条件制备花椒精油 Pickering 乳液,并进行后续试验。

2.3 花椒精油 Pickering 乳液的表征

2.3.1 乳液类型

将花椒精油 Pickering 乳液分别滴在超纯水和大豆油中,乳滴在水相中快速分散,在油相中保持团聚,证明该体系是 O/W 型乳液。

2.3.2 微观结构

图5为未添加纳米颗粒的油水混合物与花椒精油 Pickering 乳液在 400 倍显微镜下的微观结构。

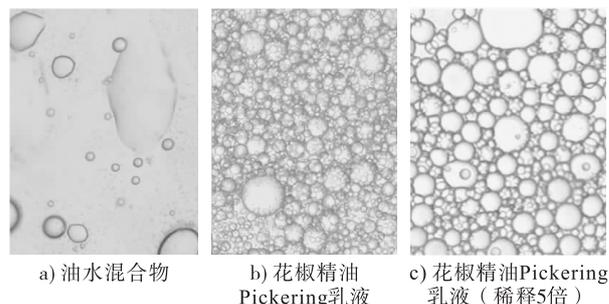


图5 Pickering 乳液的微观图像

由图5可知:经过纳米颗粒乳化后的乳液具有更均匀的结构和特征,乳滴的密度相对较高,而粒径较小,这与胡亚琼^[20]的研究结果一致。另外,乳滴的分布并不完全均匀,而是由两种不同粒径大小的乳滴构成。这种差异在稀释 5 倍后的乳液微观图像中更为清晰可见,可能与花椒精油和大豆油的性质不同有关^[21]。不同的油相可能因其不同的黏度而形成不同大小的乳滴,通常情况下黏度较高的油相会形成较大的乳滴,同时其稳定性可能较差。乳滴显示出明显的轮廓,并呈现出均匀的球形,这表明乳滴的结构相对稳定^[22],不存在破乳和析油的现象,进一步说明了乳液的乳化效果良好。从稀释后的乳

液微观图可看出,乳滴分布明显更加规则,没有出现重叠的现象,同样也反映了乳液的出色乳化效果。

2.3.3 热稳定性

加热过程中花椒精油 Pickering 乳液乳滴粒径变化如图 6 所示。

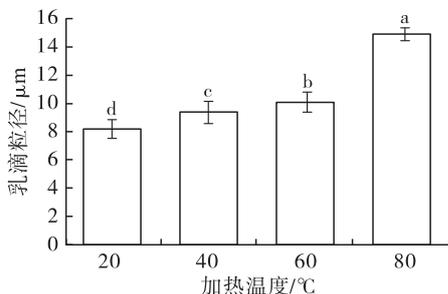


图 6 不同加热温度下花椒精油 Pickering 乳液乳滴粒径

由图 6 可知,随着加热温度的升高,乳液中的乳滴粒径逐渐增大。在 20~60 °C 范围内,乳滴粒径的增加幅度相对较小。然而,当温度从 60 °C 升至 80 °C 时,乳滴粒径增幅较大。随着温度升高,蛋白质分子中的疏水基团可能会显露出来,增加了分子间的吸引力,促使乳滴聚集,进而导致乳滴粒径的增大。此外,温度升高会增加分子的热运动,可能导致乳滴之间的碰撞频率增加,也有助于乳液粒径的增大。这与潘晴楣等^[23]的研究结果类似。

2.3.4 贮藏稳定性

在室温(26 °C)、不同贮藏时间下花椒精油 Pickering 乳液乳滴粒径变化如图 7 所示。

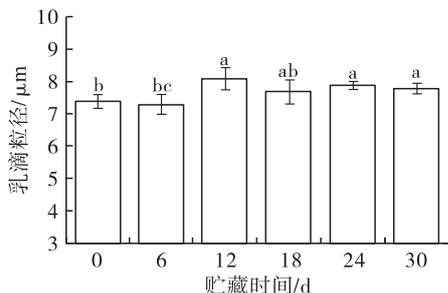


图 7 不同贮藏时间下花椒精油 Pickering 乳液乳滴粒径

由图 7 可知,乳液中的乳滴粒径在贮藏时间的延长过程中未显示明显的变化,这表明该乳液在贮藏期间表现出出色的稳定性,这对于确保乳液能够成功应用具有重要意义。这种优良的贮藏稳定性可能是由于纳米颗粒相对较小,并且 κ -卡拉胶的加入促使水相发生胶结构化,进一步增强了连续油相的凝胶网络,从而提高了乳液的水合能力、物理稳定性及贮藏稳定性^[24]。

2.4 花椒精油 Pickering 乳液抑菌活性

经测定,花椒精油对毛霉的 EC_{50} 为 58.36 $\mu\text{L}/\text{mL}$,在此基础上考察花椒精油及花椒精油 Pickering 乳

液对受试菌生长的抑制作用,结果见图 8。

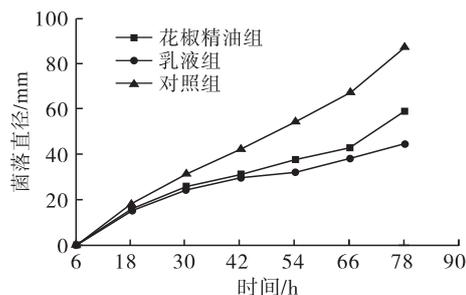


图 8 花椒精油和花椒精油 Pickering 乳液的抑菌生长曲线

从图 8 可以看出,在 6~78 h 之间,花椒精油 Pickering 乳液组相对于花椒精油组(花椒精油与大豆油混合物)表现出了更好的抑菌效果。在毛霉的早期生长阶段,即 6~42 h 之间,花椒精油 Pickering 乳液组的抑菌生长曲线几乎与花椒精油组的重合。而在 42 h 后,花椒精油 Pickering 乳液组显示出更好和更持续的抑菌效果,这表明乳液体系强化了花椒精油对毛霉的抑制效果,具有更卓越的抑菌性能。史沛青等^[25]在研究桉叶精油 Pickering 乳液的抑菌作用时,观察到了对植物性精油的缓慢释放现象,这可能是 Pickering 乳液具有更良好抑菌效果的原因。同时在培养过程中可以观察到,花椒精油组在 PDA 培养基中出现了油滴的渗出,而花椒精油 Pickering 乳液组在 PDA 培养基中没有油滴渗出,表现出优良的溶解性。

3 结论

通过单因素试验和响应面试验,得到花椒精油 Pickering 乳液最佳制备条件为水相 pH 9.8、纳米颗粒添加量 0.95%、花椒精油与大豆油混合物(体积比 2:3)添加量 50.6%,此条件下包封率达到了 92.34%。此外,花椒精油 Pickering 乳液在 20~60 °C 范围内表现出较好的稳定性,但在 60 °C 以上不稳定,在 30 d 的常温(26 °C)贮藏后,粒径变化较小,证明乳液在常温贮藏条件下具有出色的稳定性。同时,乳液微观结构中观察到两种不同大小的规则球形乳滴,分别由大豆油和花椒精油形成,体现出 Pickering 乳液分散体系的特性,为乳液的稳定性提供了物理基础。花椒精油 Pickering 乳液在作用受试菌前 40 h 内与花椒精油具有接近的抑菌效果,但在 42 h 后表现出更强的抑菌效果,这表明 RPI-卡拉胶-卡拉胶-卡拉胶纳米颗粒能够实现对花椒精油的缓慢释放并增强其抑菌稳定性。综上,本研究开发了稳定负载花椒精油的 Pickering 乳液,具备良好的热稳定性、贮藏稳定性和抑菌活性,为 RPI 和花椒精油的进一步开发利用提供了一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 赵驰,董玲,张凤菊,等. 青花椒精油抑制蜡样芽孢杆菌的活性与机理[J]. 食品科学, 2022, 43(17): 64-73.
- [2] CALO J R, CRANDALL P G, O' Bryan C A, et al. Essential oils as antimicrobials in food systems: A review [J]. Food Control, 2015, 54: 111-119.
- [3] SUN X, ZHANG D, ZHAO L, et al. Antagonistic interaction of phenols and alkaloids in Sichuan pepper (*Zanthoxylum bungeanum*) pericarp [J/OL]. Ind Crops Prod, 2020, 152: 112551 [2023-11-03]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112551>.
- [4] 徐嫦悦. 多功能微胶囊的 Pickering 乳液法制备及其在纺织品上的应用[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2021.
- [5] ZHANG S, WANG K, QIN Y, et al. The synthesis, biological activities and applications of protein-polysaccharide conjugates in food system: A review [J/OL]. Food Qual Saf, 2023, 7: 006 [2023-11-03]. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyad006>.
- [6] ZHANG Q, WU D, LUO W, et al. Molecular structure and functional properties of glycinin conjugated to κ -carrageenan and guar gum: A comparative study [J/OL]. Food Chem, 2022, 386: 132810 [2023-11-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132810>.
- [7] 赵丹,孙一熙,张清. 响应面优化豌豆分离蛋白-木聚糖复合物的制备及结构功能研究[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(2): 118-125.
- [8] 王志高. 菜籽蛋白基纳米载体的构建及其生物学效价研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2019.
- [9] LIU Z, LI Y, GENG S, et al. Fabrication of food-grade Pickering high internal phase emulsions stabilized by the mixture of β -cyclodextrin and sugar beet pectin [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 182: 252-263.
- [10] QIN Y, WANG J, QIU C, et al. Effects of degree of polymerization on size, crystal structure, and digestibility of debranched starch nanoparticles and their enhanced antioxidant and antibacterial activities of curcumin [J]. ACS Sust Chem Eng, 2019, 7(9): 8499-8511.
- [11] ZHANG B, KANG X, CHENG Y, et al. Impact of high moisture contents on the structure and functional properties of pea protein isolate during extrusion [J/OL]. Food Hydrocolloid, 2022, 127: 107508 [2023-11-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107508>.
- [12] LIU Q, CHANG X, SHAN Y, et al. Fabrication and characterization of Pickering emulsion gels stabilized by zein/pullulan complex colloidal particles [J]. J Sci Food Agric, 2021, 101(9): 3630-3643.
- [13] 吴子涵,陈泽平,刘震宇,等. 大豆蛋白纤维聚集体 Pickering 乳液提高 β -胡萝卜素的包埋稳定性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(21): 152-159.
- [14] WANG K, HONG Y, GU Z, et al. Stabilization of Pickering emulsions using starch nanocrystals treated with alkaline solution [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 155: 273-285.
- [15] LIN Q, LIANG R, ZHONG F, et al. Effect of degree of octenyl succinic anhydride (OSA) substitution on the digestion of emulsions and the bioaccessibility of β -carotene in OSA-modified-starch-stabilized-emulsions [J]. Food Hydrocolloid, 2018, 84: 303-312.
- [16] 沈妍,傅瑜,陈健初,等. 柑橘精油在食品中的抗菌应用[J]. 食品工业科技, 2009, 30(9): 315-318.
- [17] 沈小倩,张梦,周伟,等. pH和离子强度对甘蔗渣纳米纤维 Pickering 乳液稳定性的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 102-108.
- [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] 郑芸岭,徐玉佩. 天然絮凝剂壳聚糖回收大豆蛋白的研究 [J]. 粮食与油脂, 1997, 10(1): 6-12.
- [20] 胡亚琼. 小麦醇溶蛋白胶体颗粒稳定的 Pickering 乳液、高内相乳液的制备及特性 [D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [21] FENG X, SUN Y, TAN H, et al. Effect of oil phases on the stability of myofibrillar protein microgel particles stabilized Pickering emulsions: The leading role of viscosity [J/OL]. Food Chem, 2023, 413: 135653 [2023-11-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135653>.
- [22] 杨传玺,王小宁,杨诚. Pickering 乳液稳定性研究进展 [J]. 科技导报, 2018, 36(5): 70-76.
- [23] 潘晴楣,张志鹏,冉乐童,等. 蛋清蛋白 Pickering 乳液制备及其负载 β -胡萝卜素的稳定性 [J]. 中国食品学报, 2023, 23(3): 271-277.
- [24] 孙雅晖,韩立娟,苏凌志,等. κ -卡拉胶对蜂蜡基乳液凝胶微观结构和性质的影响 [J]. 食品科学, 2023, 44(12): 25-33.
- [25] 史沛青,郑艳茹,陈晖,等. 改性凹凸棒黏土/羧甲基壳聚糖协同稳定桉叶精油 Pickering 乳液制备及缓释抑菌性能 [J]. 食品科学, 2022, 43(18): 47-54.