

摘要

大豆分离蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的制备、表征及特性研究

叶黄素(Lutein)具有较强的生物活性,能够保护视觉、预防癌症、治疗心血管疾病等。然而,叶黄素对环境因素、加工和贮藏条件敏感,化学稳定性较差。纳米乳液因粒径小、分散性好且不易变形,常被用来作为稳定性较差的功能因子的载体。本研究拟采用高速剪切、超声辅助法制备水包油型(O/W)叶黄素纳米乳液,并对其进行微观表征;此外,考察不同贮藏条件及食品添加剂对纳米乳液稳定性的影响;最后,对叶黄素纳米乳液的自由基清除能力进行测定,并构建体外模拟消化模型,观察叶黄素纳米乳液在消化过程中发生的变化。具体研究内容如下:

(1) 大豆分离蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的制备。对比大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)和瓜尔豆胶(Guar Gum, GG)在不同浓度下的静态流变学特性、乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)。静态流变学结果表明:4.0%为 SPI 的缠结浓度,0.2%为 GG 的缠结浓度。同时,当 SPI 浓度为 4.0%、GG 浓度为 0.2%时, EAI、ESI 均为最高值。因此,选择 4.0%的 SPI 和 0.2%的 GG 作为制备纳米乳液中的乳化剂浓度;采用高速剪切、超声辅助法制备叶黄素纳米乳液,通过单因素试验和正交优化,探讨水油比例、剪切速率、剪切时间、超声功率及超声时间对纳米乳液平均粒径、Zeta-电位及叶黄素包埋率的影响。最终确定乳液的最佳制备工艺参数如下:水油比 9:1、剪切时间为 3 min、剪切速率为 10000 r/min、超声功率为 700 W 和超声时间为 28 min,在上述条件下获得的乳液粒径为 225.73 ± 4.61 nm、Zeta-电位值为 -43.87 ± 0.67 mV,叶黄素包埋率为 $85.58 \pm 1.20\%$;

(2) 最优工艺条件下制备获得的叶黄素纳米乳液表征。通过光学显微镜观察、内源荧光光谱分析和傅里叶红外光谱分析(FTIR)对叶黄素纳米乳液进行表征,结果显示:叶黄素纳米乳液在微观形态上整体均一且液滴间彼此分离,无聚集现象;经荧光和红外分析均证实体系中主要通过氢键和静电斥力、疏水相

互作用这一类分子间相互作用力维持体系的稳定性；

(3) 考察不同环境因素、食品添加剂、杀菌方式和贮藏条件下叶黄素纳米乳液的稳定性。结果表明：过酸和过碱性环境均会导致纳米乳液的稳定性降低，且在过酸条件下较为明显；当 Na^+ 浓度在 20-80 mM、山梨酸钾浓度在 0.2-0.8 g/Kg、抗坏血酸浓度为 0.10-0.14 mg/mg 和蔗糖浓度为 7-9 g/mL 时，纳米乳液稳定性保持较好；且 SPI-GG 组纳米乳液在经过巴氏、高压蒸汽灭菌后的稳定性显著比 SPI 组强，说明 SPI-GG 复合体系可以提高纳米乳液的稳定性；最后，考察贮藏温度、时间和光照条件对叶黄素纳米乳液稳定性的影响，得出在 4 °C、黑暗条件下最适宜纳米乳液贮藏，此条件下贮藏 7 d 内叶黄素纳米乳液表现出较好稳定性；

(4) 考察叶黄素纳米乳液自由基清除能力。构建体外自由基(DPPH·自由基、ABTS⁺·自由基)清除模型，结果表明：两种模型评价下纳米乳液组均拥有较高自由基清除能力；在 4 °C、黑暗条件下贮藏 7 d 后，纳米乳液组叶黄素的自由基清除能力未有显著性下降，体现出纳米乳液在改善并维持叶黄素自由基清除能力的优势；

(5) 叶黄素纳米乳液的消化特性考察。构建纳米乳液体外模拟消化模型，结果表明：模拟胃消化阶段，因 pH、消化蠕动等因素导致乳液中液滴发生聚集，但体系整体未被破坏，对叶黄素仍具有保护作用；模拟肠消化阶段，纳米乳液被水解，叶黄素被大量释放。整个模拟消化阶段，纳米乳液组能够在模拟胃肠道阶段维持较好的稳定性，在肠消化阶段时释放出大量叶黄素，有效提高叶黄素的生物可利用度。

关键词：

叶黄素，大豆分离蛋白，瓜尔豆胶，纳米乳液，稳定性，模拟消化

Abstract**Fabrication, Characterization and Properties of Lutein Nano Emulsion****Based on Soybean Protein Isolate-Guar gum**

Lutein has strong biological activity, which can protect vision, prevent cancer, treat cardiovascular diseases. However, lutein is sensitive to environmental factors, processing and storage conditions, and has poor chemical stability. Due to its small particle size, good dispersion and low deformation, nano emulsions are often used as carriers for functional factors with poor stability. In this study, high speed shear and ultrasonic assisted methods were used to prepare oil-in-water (O/W) lutein nano emulsions and microscopic characterization. In addition, the effects of different storage conditions and food additives on the stability of nano emulsions were investigated. Finally, the free radical scavenging capacity of lutein nano emulsion was measured, and an in vitro simulated digestion model was established to observe the changes of lutein nano emulsion during digestion. The specific research contents are as follows:

(1) Preparation of soybean protein isolate (SPI) - Guar gum (GG) based lutein nano emulsion. The static rheological properties, emulsifying activity (EAI) and emulsifying stability (ESI) of SPI and GG were compared at different concentrations. The static rheological results showed that 4.0% was the tangled concentration of SPI and 0.2% was the tangled concentration of GG. At the same time, when the SPI concentration was 4.0% and the GG concentration was 0.2%, EAI and ESI were the highest values. Therefore, 4.0% SPI and 0.2% GG were selected as emulsifier concentrations in the preparation of nano emulsions. Lutein nano emulsions were prepared by high-speed shear and ultrasound-assisted methods, and the effects of water-oil ratio, shear rate, shear time, ultrasonic power and ultrasonic time on the average particle size, Zeta-potential and lutein embedment rate of nano emulsions were investigated through single-factor experiments and orthogonal optimization. Finally, the optimal preparation parameters of emulsion were as follows: When the

water-oil ratio was 9:1, shear time of 3 min, shear rate of 10000 r/min, ultrasonic power of 700 W and ultrasonic time of 28 min, the particle size of the emulsion was 225.73 ± 4.61 nm and the Zeta-potential value was -43.87 ± 0.67 mV, and the lutein embedding rate was $85.58 \pm 1.20\%$.

(2) Characterization of lutein nano emulsions prepared under optimal process conditions. Lutein nano emulsions were characterized by optical microscopy, endogenous fluorescence spectroscopy and Fourier infrared spectroscopy (FTIR). The results showed that lutein nano emulsions were homogeneous in micromorphology and the droplets were separated from each other without aggregation. Fluorescence and infrared analysis show that the stability of the system was mainly maintained by hydrogen bonding, electrostatic repulsion and hydrophobic interaction.

(3) The stability of lutein nano emulsions under different environmental factors, food additives, sterilization methods and storage conditions were investigated. The results show that both over acid and over alkaline environments will reduce the stability of nano emulsions, and it is more obvious under the condition of acid. When Na^+ concentration is 20-80 mM, potassium sorbate concentration is 0.2-0.8 g/Kg, ascorbic acid concentration is 0.10-0.14 mg/mg and sucrose concentration is 7-9 g/mL, the stability of the nano emulsion remained good. Moreover, the stability of SPI-GG nano emulsion after pasteurization is significantly stronger than that of SPI group, indicating that SPI-GG composite system can improve the stability of the emulsion. Finally, the effects of storage temperature, time and light condition on the stability of lutein nano emulsion were investigated, and it was concluded that at 4 °C, and the lutein nano emulsion within 7 days of storage under these conditions showed good stability.

(4) The free radical scavenging ability of lutein nano emulsion was investigated. Free radical scavenging models (DPPH· free radical and $\text{ABTS}^{+\cdot}$ free radical) were constructed in vitro. The results showed that the nano emulsion group had high free radical scavenging ability under the evaluation of the two models. After storage at 4 °C and dark for 7 days, the free radical scavenging capacity of lutein in the nano

emulsion group did not decrease significantly. It shows that the nano emulsion has the advantage of improving and maintaining the scavenging ability of lutein free radical.

(5) Investigation on digestive properties of lutein nano emulsions. The results show that the droplets in the emulsion aggregate due to pH, digestive peristalsis and other factors in the simulated gastric digestion stage, but the system as a whole was not destroyed, which still has a protective effect on lutein. Simulating the intestinal digestion stage, the nano emulsion was hydrolyzed and lutein was released in large quantities. In the whole simulated digestion stage, the nano emulsion could maintain good stability in the simulated gastrointestinal tract stage, and a large amount of lutein was released in the intestinal digestion stage, effectively improving the bioavailability of lutein.

Key Worlds:

Lutein, Soybean Protein Isolate, Guar Gum, Nano emulsion, Simulated digestion

目 录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 叶黄素概述	1
1.1.1 叶黄素的基本理化性质.....	1
1.1.2 叶黄素的功能特性.....	1
1.1.3 叶黄素的消化特性.....	2
1.2 大豆分离蛋白概述	2
1.2.1 大豆分离蛋白概念.....	2
1.2.2 大豆分离蛋白基本理化性质	3
1.2.3 大豆分离蛋白的乳化特性	3
1.3 瓜尔豆胶概述	3
1.4 蛋白质与多糖间的相互作用	5
1.4.1 共价相互作用.....	5
1.4.2 非共价相互作用.....	5
1.5 纳米乳液体系	5
1.5.1 纳米乳液组成.....	6
1.5.2 纳米乳液制备方法.....	6
1.5.3 纳米乳液稳定性分析	6
1.5.4 纳米乳液在食品中的应用	6
1.6 课题研究的目的、意义及主要研究内容	7
1.6.1 研究目的及意义.....	7

1.6.2 研究内容.....	8
1.6.3 技术路线.....	9
第 2 章 大豆分离蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的制备	10
2.1 前言	10
2.2 材料与设备	10
2.2.1 材料与试剂.....	10
2.2.2 仪器与设备.....	10
2.3 实验方法	11
2.3.1 静态流变学特性测定.....	11
2.3.2 乳化特性测定.....	11
2.3.3 负载叶黄素的纳米乳液体系的制备	12
2.3.4 SPI-GG 叶黄素纳米乳液制备工艺优化.....	12
2.3.5 评价指标.....	14
2.3.6 数据处理.....	15
2.4 结果与分析	15
2.4.1 不同乳化剂溶液静态流变学特性分析	15
2.4.2 不同乳化剂溶液的乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)分析	17
2.4.3 水油比对叶黄素纳米乳液的性能影响	18
2.4.4 剪切速率对叶黄素纳米乳液性能的影响	20
2.4.5 剪切时间对叶黄素纳米乳液性能的影响	21
2.4.6 超声功率对叶黄素纳米乳液性能的影响	23

2.4.7 超声时间对叶黄素纳米乳液性能的影响	24
2.4.8 正交试验优化结果.....	25
2.4.9 叶黄素纳米乳液制备最优工艺验证	27
2.5 本章小节	27
第 3 章 大豆分离蛋白瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的表征及稳定性考察.....	28
3.1 前言	28
3.2 材料与设备	28
3.2.1 材料与试剂.....	28
3.2.2 仪器与设备.....	29
3.3 实验方法	29
3.3.1 大豆分离蛋白瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的制备	30
3.3.2 大豆分离蛋白瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的表征	30
3.3.3 大豆分离蛋白瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液稳定性考察	30
3.3.4 评价指标.....	31
3.4 结果与分析	33
3.4.1 大豆分离蛋白瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的微观表征	33
3.4.2 大豆分离蛋白瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液稳定性的考察 ..	35
3.5 本章小节	46
第 4 章 叶黄素纳米乳液自由基清除活性评价及体外模拟消化研究	47
4.1 前言	47

4.2 材料与设备	47
4.2.1 材料与试剂.....	47
4.2.2 仪器与设备.....	48
4.3 实验方法	49
4.3.1 叶黄素纳米乳液的制备	49
4.3.2 叶黄素纳米乳液自由基清除活性评价.....	49
4.3.3 叶黄素纳米乳液体外模拟消化实验	50
4.3.4 评价指标.....	51
4.4 结果与分析	53
4.4.1 叶黄素纳米乳液自由基清除活性分析	53
4.4.2 叶黄素纳米乳液消化过程中平均粒径和 Zeta-电位变化.....	53
4.4.3 叶黄素纳米乳液消化过程中自由基清除活性变化	54
4.4.4 叶黄素纳米乳液消化过程中 SDS-电泳分析.....	57
4.4.5 叶黄素纳米乳液模拟肠消化阶段游离脂肪酸变化	57
4.4.6 模拟消化后叶黄素生物可利用度评价	59
4.5 本章小节	59
第 5 章 结论与展望.....	61
5.1 主要结论	61
5.2 展望	62
5.3 创新点	62
参考文献.....	63

导师简介.....	70
作者简介和科研成果	71
致谢.....	72

第1章 绪论

1.1 叶黄素概述

叶黄素(Lutein)是自然界中类胡萝卜素的两大类别之一,大多存在于芥蓝、绿色花椰菜、芦笋、菠菜及甘蓝等深绿色蔬菜^[1]。除玉米黄质外,叶黄素是唯一能够存在于眼睛中的一种类胡萝卜素,具有较强的抗氧化活性,可有效抵抗紫外线的照射^[2]、预防老年性黄斑和白内障等眼疾^[3-6]。此外,叶黄素还能够有效预防并降低癌症的发生率^[7]、治疗心血管疾病^[8]等。叶黄素以其优良的生物学特性广泛应用于食品及医药等多个领域^[9]。

1.1.1 叶黄素的基本理化性质

叶黄素($C_{40}H_{56}O_2$)又可称为 3'-二羟基- α -胡萝卜素,相对分子量为 568.87^[1]。分子结构如图 1.1 所示。图中可以看出,叶黄素含有多个共轭双键,常以反式结构存在于人体和植物中^[10];叶黄素分子结构的两端均含有羟基,是影响其自身功能特性的重要基团^[11]。叶黄素是一种难溶于水的脂溶性粉末,能够溶解于己烷、二甲基亚砷(DMSO)及二氧化碳等有机溶剂中,熔点在 183-190 °C之间^[1]。叶黄素具有较强的抗氧化活性,但因其分子中含较多共轭双键,导致其对环境的抵抗力特别差,如:在光照、温度、氧气和酸性条件下,极容易发生氧化降解^[12, 13],导致叶黄素的生物活性降低($\leq 10-15\%$)^[14]。

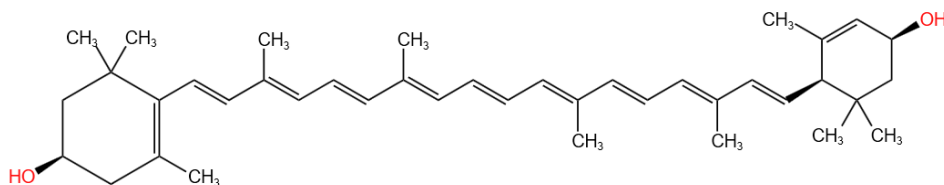


图 1.1 叶黄素分子结构式

Fig. 1.1 The molecule structure of lutein

1.1.2 叶黄素的功能特性

叶黄素是一种类胡萝卜素异戊二烯类似物,具有多种生物活性^[10]。在众多类胡萝卜素中,叶黄素是视网膜黄斑中发现的一种重要色素,能够作为抗氧化剂清除自由基以保护细胞免受氧化应激^[15]。另一方面,叶黄素能够聚集在人眼

的黄斑区，吸收特定波长范围内的蓝光，从而维持眼部的健康。研究发现，每天补充叶黄素量维持在 6-14 mg 能够有效预防黄斑变性和白内障^[16, 17]。叶黄素具有一定的安全性，研究证明，连续两个月摄入叶黄素的量控制在每天 40 mg 的剂量，不具有致毒性或其它不良反应^[18]。同时，叶黄素能够改善儿童和老年人的大脑认知功能、心血管疾病、抗炎、抗血管生成、抗突变、抗癌等生理功能^[1, 19, 20]。

1.1.3 叶黄素的消化特性

叶黄素在人体内不能合成，只能通过膳食摄入以满足人体日常需要^[10]。同时，叶黄素因为在水中的溶解性和化学稳定性较低，不能直接加入到水基食品中，通常会被包裹到一些输送系统，如水包油(O/W)乳液体系中来解决上述问题。叶黄素进入人体胃肠道后，主要在小肠阶段被消化。由胆盐、磷脂和脂质消化产物形成的混合胶束相能够溶解和运输疏水性生物活性物。因此，被消化后的叶黄素能够溶于胶束相内，通过被动扩散进入小肠上皮细胞，并在小肠上皮细胞内的高尔基体中与乳糜微粒结合，再被转运至不同的组织^[21-23]，从而提高叶黄素对人体的生物可利用度。

另一方面，叶黄素的生物可利用度相对较差主要与其复杂的基质有关。叶黄素由于具有类异戊二烯结构，容易发生聚集^[24]，从而在肠黏膜处发生聚集而不易被消化，导致叶黄素的生物可利用度降低。

1.2 大豆分离蛋白概述

1.2.1 大豆分离蛋白概念

大豆是世界种植范围最广的作物之一。大豆中的蛋白质含量丰富，占大豆内营养成分组成的 40%^[25, 26]，此外还含有磷脂、维生素、矿物质等成分，以及含量较低的胰蛋白酶、低聚糖等活性物质^[27]。大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)是从大豆粕中通提取出来的一种优质蛋白，营养价值高，被广泛应用于豆奶、饮料等乳制品中^[28, 29]。SPI 具有良好的功能特性，主要包括乳化性、成膜性及保健功能，对高胆固醇、肥胖症、心脏病、高血压等病人具有帮助恢复的功效^[30]。

1.2.2 大豆分离蛋白基本理化性质

大豆球蛋白是 SPI 的主要成分。因大豆球蛋白含有丰富的酸性氨基酸、碱性氨基酸和疏水氨基酸等^[31], 使得 SPI 表面同时覆盖了大量的阴离子和阳离子, 从而提高了 SPI 的乳化特性^[29]。SPI 组成成分如表 1.1 所示。其中 7S 和 11S 是大豆球蛋白的主要组成, 分别占 SPI 的 45%和 34%^[32]。7S 球蛋白由 α 、 α' 和 β 亚基非共价结合形成聚合体, 11S 球蛋白由六对碱性亚基(As)和酸性亚基(Bs)通过二硫键缠绕连接形成^[33-35]。7S 球蛋白具有较好的乳化性, 11S 球蛋白可使 SPI 具备优良的凝胶性、起泡性和持水性^[28, 36]。

表 1.1 大豆分离蛋白组成^[37]

Table 1.1 Composition of Soy Protein Isolate^[37]

分类	分子量($\times 10^4$)	占比(%)
2S	0.8-2.15	8
7S	6.17-21	35
11S	35	52
15S	60	5

1.2.3 大豆分离蛋白的乳化特性

SPI 因其优良的乳化性而被当作乳化剂广泛应用于食品行业中^[38, 39]。由于 SPI 表面同时覆盖有亲水和疏水基团^[40, 41], 所以乳化性良好、界面张力低^[28, 42, 43]。与一定量的油相在高速剪切条件下能够形成乳液。SPI 附着在油滴表面, 有利于蛋白乳液的形成并维持蛋白乳液的稳定。经研究表明, SPI 的乳化特性受内部因素(蛋白类型和微观结构变化等)和外部因素(pH、温度和离子强度等)的影响^[25, 29]。

然而, 目前国内添加 SPI 的食品种类较少, 对 SPI 的深加工技术和应用都大幅落后于发达国家^[44]。因此, 进一步开发 SPI 产品、扩宽 SPI 产品在食品行业中的应用, 是急需解决的重要课题。

1.3 瓜尔豆胶概述

瓜尔豆胶(Guar Gum, GG)又称瓜尔胶或古尔胶, 是一种从印度产的豆科植物瓜尔豆中提取出来的物质^[45, 46]。瓜尔豆胶是一种具有溶胀性、粘合性的水溶

性多糖。瓜尔豆胶的分子量较高，约为 20-30 万，是一种高聚物。^[47]。在分子结构上，瓜尔豆胶以(1-4)- β -D-甘露糖为单位作为线性主链，侧链由 α -1,6 糖苷键连接 α -D-半乳糖所构成。因甘露糖与半乳糖之比为 1.8:1(近似 2:1)，所以可看作平均每两个甘露糖单位就有一个半乳糖单位在 C-6 位与主链相连^[48]；另外，瓜尔豆胶还拥有丰富的羟基^[46, 49, 50]，其分子结构见图 1-2^[51, 52]。

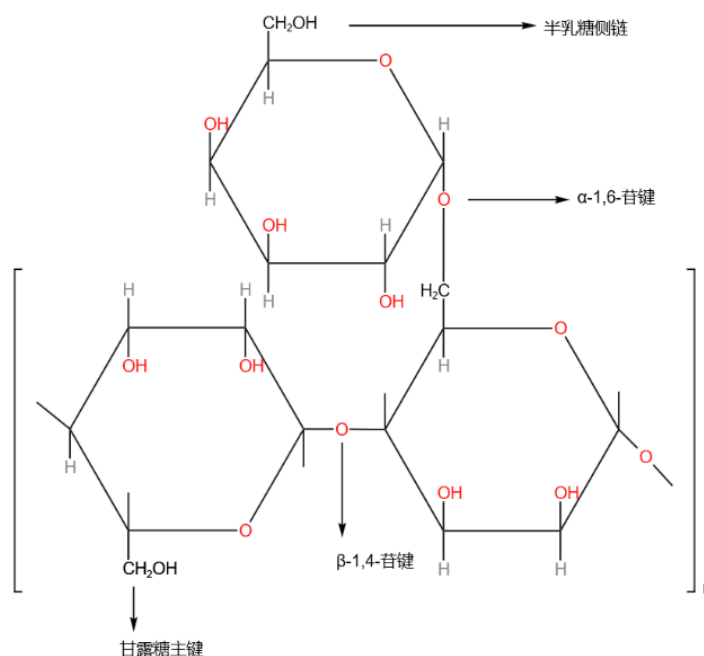


图 1.2 瓜尔豆胶分子结构式

Fig. 1.2 The molecule structure of guar gum

瓜尔豆胶于 1993 年进入中国市场，因其优良的理化特性和实惠的价格，在食品制造、生物医药、工业生产中都有着广泛的应用^[53-55]。研究发现，瓜尔豆胶具有许多功能特性，如：能够降低胆固醇和血脂^[56, 57]，促进肠道的蠕动、延缓胃排空率^[58]，增加肠腔内高粘度性、治疗便秘和预防结肠癌方面^[59, 60]。随着生活水平的提高，人们对功能性食品的需求日益增加，瓜尔豆胶这种功能性多糖更多的被应用到了功能性食品中。有研究证明，一定浓度的多糖能够通过蛋白发生较强的相互作用，从而产生静电斥力提高乳液的稳定性^[61]。瓜尔豆胶因其良好的粘合性、安全性及生物相容性，常被添加于蛋白质中用来提高蛋白质-多糖复合物和疏水性功能活性物质运载体系的稳定性，如：Santos 等人^[62]通过向马铃薯蛋白中加入瓜尔豆胶，以此提高乳液的稳定性；Zeyue Ren 等人^[63]

证实, 向山药粘液(对生薯蓣粘液)加入瓜尔豆胶可以增加液滴表面间的静电斥力, 提高水包油乳液的稳定性。

1.4 蛋白质与多糖间的相互作用

蛋白质和多糖因自身丰富的营养功能特性, 是食品行业的重要材料, 受到了人们广泛的关注。蛋白质和多糖之间的相互作用类型主要分为两种: 共价相互作用(美拉德反应)和非共价相互作用(静电斥力、疏水相互作用及氢键等)^[64-67]。

1.4.1 共价相互作用

蛋白质和多糖间的共价相互作用主要为美拉德反应, 这是一种引起共价键和效应的非酶促反应, 通常由不同的反应时间、温度及 pH 等条件促使其发生。如, 姜欣雨^[68]通过糖基化反应制备鼠李糖和乳清分离蛋白缀合物, 对姜黄素进行包埋, 从而提高了亲脂性活性物质姜黄素的溶解度和稳定性以及修饰了乳清蛋白的功能活性。沈双伟^[69]的研究中, 借助美拉德反应诱导乳清蛋白进行糖基化反应, 构建了乳蛋白-咖啡酸-葡萄糖三元共价复合物, 从而提高了蛋白质的乳化性和抗氧化活性。

1.4.2 非共价相互作用

携带相反电荷的蛋白质和多糖还可以通过氢键、静电斥力及疏水相互作用等发生非共价相互作用, 从而形成致密的界面膜^[70], 将生物活性成分包埋在内部, 提高食品乳液、凝胶等的稳定性^[71, 72]。在不同的 pH 和离子强度条件下会影响蛋白质与多糖间的非共价相互作用^[73, 74]。

这种由非共价相互作用而形成的复合物相较于美拉德反应操作更加便捷, 且耗时较短, 反应可逆, 是极具吸引力的一个研究方向。在本文中, GG 溶液呈弱酸性, 液滴表面附着 H^+ , 且溶液 pH 大于 SPI 的等电点($pI=4.6$, 此时 SPI 带负电)。因此, 当 GG 与 SPI 混合, 二者可通过氢键、静电斥力等非共价相互作用结合, 为 SPI-GG 形成稳定复合体系对叶黄素进行包埋提供了可行性。

1.5 纳米乳液体系

1.5.1 纳米乳液组成

乳状液是两种互不相溶组分借助乳化剂和一定的能量输入，从而形成一种液体以液滴形式分散在另一种液体中的分散体系^[75]，常见类型有油包水型(W/O)和水包油型(O/W)^[76]。通常情况下，粒径范围在 50-500 nm 之间的乳液被称为纳米乳液(Nano emulsions)^[77, 78]。纳米乳液因有较小的液滴尺寸，是一种在动力学上稳定的输送体系。

1.5.2 纳米乳液制备方法

纳米乳液制备方式包括高能法和低能法^[79]。高能法主要通过强烈搅拌产生足够强的破坏力，使两种互不相溶的液体之间的界面被打破形成液滴^[80, 81]。低能法则是利用体系内部能量变化驱动形成微小乳滴，且低能法一般需要较多量的合成乳化剂^[82]，故食品工业中常采用高能法制备乳液产品，如：高压均质、微射流均质、超声乳化等^[83]。相比于高压、微射流均质乳化，超声借助超声波产生的空化效应，能够快速混合水油相，形成细小的液滴^[84, 85]；所需功率和耗材较少，操作简单便捷，较适合前期的乳液制备研究。

1.5.3 纳米乳液稳定性分析

纳米乳液因具有粒径小、分散性好且不易变形等特点，具有较强的动力学稳定性，能够在一定程度上避免出现上浮、聚结、沉降、絮凝和相转变等不稳定现象^[86, 87]。然而，纳米乳液仍然具有一些与普通乳液相似的特点，如：有自发地减小分散相和分散介质间的相对界面面积的趋势^[86]，从而导致分散介质中的小液滴逐渐聚集，体系稳定性降低。纳米乳液不稳定机理主要包括聚结和奥氏熟化^[88]。聚结主要是因为液滴间会发生布朗运动，从而相互碰撞导致液滴合并、聚结^[89]；奥氏熟化主要是因为分散相在介质中具有一定的溶解度，随着时间的延长，小液滴逐渐溶于大液滴^[90, 91]。针对以上问题，常常通过选择合适的乳化剂或高分子聚合物，以提高液滴间的空间稳定性和静电稳定作用，降低液滴间的布朗运动和碰撞几率，从而达到提高纳米乳液稳定性的作用^[86]。

1.5.4 纳米乳液在食品中的应用

食品中的生物活性成分在加工、储存和运输过程中必须保持稳定，才能有效发挥自身功效^[92]。其中，生物活性成分的溶解度和稳定性是影响生物利用度

的主要因素^[93]。将纳米乳液对这类水溶性不好且稳定性不强的亲脂生物活性成分进行包埋和运送，可以在一定程度上改善这类物质的亲水性和稳定性，提高生物可利用度。如：李松南^[94]通过玉米醇溶蛋白与淀粉复合形成不同界面活性和乳液结构的皮克林乳液凝胶体系，探究了不同凝胶网络结构对叶黄素贮藏稳定性的影响；杨晓花^[95]通过多酚和蛋白质相互作用形成乳液体系对叶黄素进行包埋，有效维持了乳液的稳定性及保护了叶黄素的生物可利用度。

1.6 课题研究的目的、意义及主要研究内容

1.6.1 研究目的及意义

叶黄素作为一种脂溶性功能活性成分，具有保护视网膜、减少白内障和夜盲症等多种功能，同时还具有提高机体免疫能力、降低由氧化应激引起疾病的风险。然而，叶黄素不能由人类自身合成，必须通过食物摄入。研究报告表明：饮食补充叶黄素或者食用含有叶黄素丰富的水果和蔬菜能够预防某些癌症、心血管疾病、老年性视网膜黄斑病变等疾病。然而叶黄素的性质不稳定，对 pH、离子强度、温度、光照及氧气等较敏感，这使得其在食品加工条件下容易被破坏，叶黄素生物活性降低，从而限制了其在食品领域的应用。因此，构建具有一定载运能力、释放特性、稳定性和安全性的叶黄素载运体系对提高叶黄素生物利用度有重要作用。

纳米乳液由于具有构建安全性较高，构建方式和体系组成相对简单、包封率较高且成本相对较低，能显著提高芯材的溶解性、分散性、稳定性和生物可利用度等优点，而成为目前应用比较广泛的功能活性成分载运体系。纳米乳液的制备常需要具有一定乳化活性的生物大分子作为乳化剂，如：蛋白质、多糖、磷脂和皂苷等。大豆分离蛋白因其自身优良的凝胶性、乳化性等性质使其在递送领域具有广阔的应用前景。但通过大豆分离蛋白乳化形成的乳液在长期贮存条件下仍不稳定，容易聚结。有研究证实^[29, 96]，蛋白质-多糖可通过静电相互作用、氢键相互作用等非共价作用力形成纳米复合物，与单独的蛋白递送体系或者单独的多糖递送体系相比，具有稳定性高的优点。

本研究拟用脂溶性生物活性物质叶黄素作为芯材，将天然多糖瓜尔豆胶与

大豆分离蛋白共同构建稳定的大豆蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液体系，为叶黄素在食品与医药上的应用提供一定的理论基础。

1.6.2 研究内容

本研究中，拟以脂溶性营养物质叶黄素为研究对象，大豆分离蛋白及瓜尔豆胶为乳化剂，构建大豆分离蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液，主要实验内容围绕以下展开：

（1）大豆分离蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的制备。通过对大豆分离蛋白、瓜尔豆胶的静态流变学特性和乳化特性进行考察，确定两者在纳米乳液体系中的最佳浓度；以大豆分离蛋白、瓜尔豆胶为乳化剂，玉米油为油相，采用超声高能法制备纳米乳液，以平均粒径、Zeta-电位和叶黄素包埋率为指标，采用单因素和正交试验确定纳米乳液的最佳制备工艺参数；

（2）大豆分离蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的表征。采用光学显微镜观察、内源荧光光谱和傅里叶红外光谱对体系间的相互作用进行表征；

（3）大豆分离蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的稳定性研究。以平均粒径、Zeta-电位和叶黄素化学稳定性为指标，考察 pH、Na⁺浓度、山梨酸钾浓度、抗坏血酸浓度、蔗糖浓度、杀菌方式、光照、贮藏温度及时间对纳米乳液稳定性的影响；

（4）评价大豆分离蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的抗氧化活性及体系在体外模拟消化过程中的变化。构建自由基清除模型(DPPH·自由基清除模型、ABTS⁺·自由基清除模型)，以叶黄素纳米乳液对 DPPH·和 ABTS⁺·自由基的清除能力评价其抗氧化活性；构建体外模拟消化模型，以平均粒径、Zeta-电位、自由基清除能力、SDS-电泳和游离脂肪酸为指标，研究叶黄素纳米乳液在模拟消化过程中的变化规律。

图 1.3 技术路线图

Fig. 1.3 Technology Roadmap

第2章 大豆分离蛋白-瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的制备

2.1 前言

叶黄素因化学稳定性差，对环境因素、加工和贮藏条件敏感，极大限制了叶黄素的生物可利用度。因此，构建具有一定稳定性的纳米乳液体系，对叶黄素进行包埋、提高叶黄素的稳定性有重要意义。

本章首先以大豆分离蛋白(SPI)、瓜尔豆胶(GG)为乳化剂，考察两种乳化剂在不同浓度下的静态流变学特性、乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)，选择乳化剂的最佳浓度。其次，采用高速剪切、超声辅助制备 SPI-GG 基叶黄素纳米乳液，以平均粒径、Zeta-电位和叶黄素包埋率为指标，通过单因素和正交试验，考察水油比例(9:1-1:1)、剪切速率(6000-14000 r/min)、剪切时间(1-9 min)、超声功率(100-900 W)及超声时间(10-50 min)对纳米乳液的影响，确定纳米乳液的最佳制备工艺。

2.2 材料与设备

2.2.1 材料与试剂

表 2.1 材料与试剂

Table 2.1 Materials and reagents

材料或试剂名称	规格	生产厂家
大豆分离蛋白	食品级	上海源叶生物科技有限公司
瓜尔豆胶	食品级	上海麦克林生物试剂有限公司
叶黄素	食品级	上海麦克林生物试剂有限公司
十二烷基磺酸钠	分析纯	天津百伦斯生物技术有限公司
玉米油	食品级	购自当地超市
乙酸乙酯	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

2.2.2 仪器与设备

表 2.2 仪器与设备

Table 2.2 Instruments and equipment

仪器名称	型号	生产厂家
磁力搅拌器	HJ-4A	上海康路仪器设备有限公司
电子分析天平	JD200-3	沈阳龙腾电子有限公司
超声波清洗器	KQ-250DE	昆山市超声仪器有限公司
超声细胞破碎仪	SCINETZ-08	宁波新芝生物科技股份有限公司
流变仪	DHR-3	沃特世科技上海有限公司
高速剪切机	T18	德国 IKA 公司
纳米粒度-Zeta 电位仪	ZEN3600	英国 Malvern 公司
紫外可见分光光度计	UV-2550	日本 Shimadzu 公司

2.3 实验方法

2.3.1 静态流变学特性测定

使用 DHR-3 流变仪测量 SPI、GG 溶液在不同浓度下的静态流变学特性。SPI 溶液的质量浓度范围设置为 0.5、1、2、4、6%，GG 溶液的质量浓度范围设置为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.4%。在室温下，剪切速率设置为 0-400 s⁻¹ 进行测量。根据 Herschel-Bulkley 模型方程对流变数据进行分析^[97]。

$$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n \dots\dots\dots (2-1)$$

式中：τ 为剪切应力，Pa；γ̇ 为剪切速率，s⁻¹；τ₀ 为屈服值，Pa；K 为稠度系数，Pa·sⁿ；n 为流性指数^[98]。

2.3.2 乳化特性测定

2.3.2.1 乳化活性(EAI)测定

参考吴婉仪^[99]的方法并作修改。取 30 mL 不同浓度的 SPI 溶液与 GG 溶液分别和 10 mL 玉米油混合，在 10000 r/min 下用高速剪切机对样品进行分散 1 min，然后在 0 min 和 10 min 两个时间点分别取 100 μL 分散样的底层液体，加入到 10 mL 0.1%的十二烷基磺酸钠(SDS)溶液中。震荡均匀后，以 0.1% SDS 溶液为空白对照，在 500 nm 波长处分别测定样品在 0 min 时的吸光度 A₀和在 10 min 时的吸光度 A₁₀，A₀即为分散样的乳化活性指数(EAI)^[100]。

2.3.2.2 乳化稳定性(ESI)测定

在 2.3.2.1 的基础上, 测定乳液乳化稳定性指数(ESI)公式如下所示^[101]:

$$\text{乳化稳定性 ESI} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times \Delta t \dots\dots\dots (2-2)$$

式中: A_0 和 A_{10} 分别为分散液反应时间为 0 min 和 10 min 时的吸光值; Δt 为时间差, 10 min。

2.3.3 负载叶黄素的纳米乳液体系的制备

以溶解了叶黄素的玉米油作为油相, 溶解了 SPI 和 GG 的蒸馏水作为水相, 选择高速剪切与超声辅助的方法制备 SPI-GG 叶黄素纳米乳液。以平均粒径、Zeta-电位和叶黄素包埋率为指标, 考察水油比例、剪切速率、剪切时间、超声功率和超声时间对纳米乳液的上述指标产生的影响。通过单因素实验及正交实验优化获得制备 SPI-GG 叶黄素纳米乳液的最佳工艺条件参数。

2.3.3.1 水、油相配制

水相: 将 SPI 和 GG 粉末溶解于蒸馏水中, 使得 SPI 和 GG 的质量浓度分别为 4.0%和 0.2%, 充分磁力搅拌 2 h 使 SPI 和 GG 完全溶解于水中, 置于 4 °C 下储存待用。

油相: 参照李季楠^[1]的方法并作修改, 将叶黄素按照质量分数为 0.06%的比例分散于玉米油中进行磁力搅拌, 后超声 10 min 以辅助叶黄素溶解于玉米油中, 充分溶解后置于棕色瓶内, 于 4 °C 下避光储存待用^[94]。

2.3.3.2 SPI-GG 叶黄素纳米乳液制备

将准备好的 SPI-GG 溶液与含有叶黄素的油相按一定的比例混合, 经 1 h 磁力搅拌后, 于一定的高速剪切条件下制备得到粗乳液, 再通过一定条件下的超声辅助得到 SPI-GG 叶黄素纳米乳液。

2.3.4 SPI-GG 叶黄素纳米乳液制备工艺优化

以平均粒径、Zeta-电位及叶黄素包埋率为检测指标, 测定制备过程中水油比例、剪切速率、剪切时间、超声功率及超声时间这几个因素对 SPI-GG 叶黄素纳米乳液上述指标的影响, 并进一步设计正交优化试验, 从而获得 SPI-GG 叶黄素纳米乳液最佳制备工艺。

2.3.4.1 水油比例

在剪切速率为 12000 r/min, 剪切时间为 5 min, 超声功率为 500 W, 超声

时间为 10 min 的条件下, 设置水油比例分别为 9: 1、4: 1、7: 3、3: 2、1: 1 时对 SPI-GG 叶黄素纳米乳液平均粒径、Zeta-电位及叶黄素包埋率的影响。

2.3.4.2 剪切速率

在水油比例为 9: 1, 剪切时间为 5 min, 超声功率为 500 W, 超声时间为 10 min 的条件下, 设置剪切速率分别为 6000 r/min、8000 r/min、10000 r/min、12000 r/min、14000 r/min 时对 SPI-GG 叶黄素纳米乳液平均粒径、Zeta-电位及叶黄素包埋率的影响。

2.3.4.3 剪切时间

在水油比例为 9: 1, 剪切速率为 12000 r/min, 超声功率为 500 W, 超声时间为 10 min 的条件下, 设置剪切时间分别为 1 min、3 min、5 min、7 min、9 min 时对 SPI-GG 叶黄素纳米乳液平均粒径、Zeta-电位及叶黄素包埋率的影响。

2.3.4.4 超声功率

在水油比例为 9: 1, 剪切速率为 12000 r/min, 剪切时间为 5 min, 超声时间为 10 min 的条件下, 设置超声功率分别为 100 W、300 W、500 W、700 W、900 W 时对 SPI-GG 叶黄素纳米乳液平均粒径、Zeta-电位及叶黄素包埋率的影响。

2.3.4.5 超声时间

在水油比例为 9: 1, 剪切速率为 12000 r/min, 剪切时间为 5 min, 超声功率为 700 W 的条件下, 设置超声时间分别为 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min 时对 SPI-GG 叶黄素纳米乳液平均粒径、Zeta-电位及叶黄素包埋率的影响。

2.3.4.6 正交优化试验

按照 2.3.2.2 中的 SPI-GG 叶黄素纳米乳液制备方法, 在单因素试验的基础上, 选取主要影响因素超声时间、超声功率、剪切速率及剪切时间等对 SPI-GG 叶黄素纳米乳液稳定性影响较大的因素作为考察对象。设计正交试验表见表 2.3, 采用 $L_9(3)^4$ 正交试验优选 SPI-GG 叶黄素纳米乳液的最佳制备工艺, 结果见表 2.4。

表 2.3 正交试验因素水平表

Table 2.3 Horizontal table of orthogonal test factors

水平	因素			
	A 超声时间	B 超声功率	C 剪切速率	D 剪切时间
	(min)	(W)	(r/min)	(min)
1	28	600	9000	2
2	30	700	10000	3
3	32	800	11000	4

2.3.5 评价指标

2.3.5.1 平均粒径

利用纳米粒度-Zeta 电位仪测定 SPI-GG 叶黄素纳米乳液的平均粒径。吸取一定量的纳米乳液样品，用蒸馏水稀释 1000 倍至澄清透光，以测定纳米乳液的平均粒径大小。样品测定在常温下进行，并重复测定 3 次。

2.3.5.2 Zeta-电位

利用纳米粒度-Zeta 电位仪测定 SPI-GG 叶黄素纳米乳液的 Zeta-电位值。吸取一定量的纳米乳液样品，用蒸馏水稀释 100 倍，转移至样品池中进行测定。所有样品测定均在常温下进行，并重复测定 3 次。

2.3.5.3 叶黄素包埋率

参照 Sharma^[102]等的方法并稍作修改。采用溶剂提取法测定 SPI-GG 叶黄素纳米乳液的叶黄素包埋率。一定量的纳米乳液样品与乙酸乙酯溶液按照 1:3 的体积混合均匀，涡旋震荡 30 s 后以 10000 g 的速度离心 10 min 以提取出未被包埋的叶黄素。吸取上层有机溶剂层于容量瓶中，准确定容至 50 mL。以乙酸乙酯溶液作为对照，于 448 nm 处测定样品的吸光度 A。同时精准配制不同浓度的叶黄素乙酸乙酯溶液(0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8mg/mL)，绘制叶黄素的标准曲线(图 2.1)。根据叶黄素标准曲线方程计算游离的叶黄素含量，按下式计算得到叶黄素的包埋率：

$$\text{叶黄素包埋率}(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \dots\dots\dots (2-3)$$

其中， m_1 为新制纳米乳液中叶黄素的含量，mg； m_2 为经离心后上层有机溶剂中叶黄素的含量，mg。

如图 2.4 所示为叶黄素标准曲线。叶黄素在 448 nm 处的标准曲线方程为：

$y=10.432x+0.0332$ ，最终拟合得到的相关系数 $R^2>0.999$ ，这说明该标准曲线合格。当叶黄素浓度在 0.01-0.08 mg/mL 范围内时，吸光度值在 0.1-0.8 之间且线性关系良好。

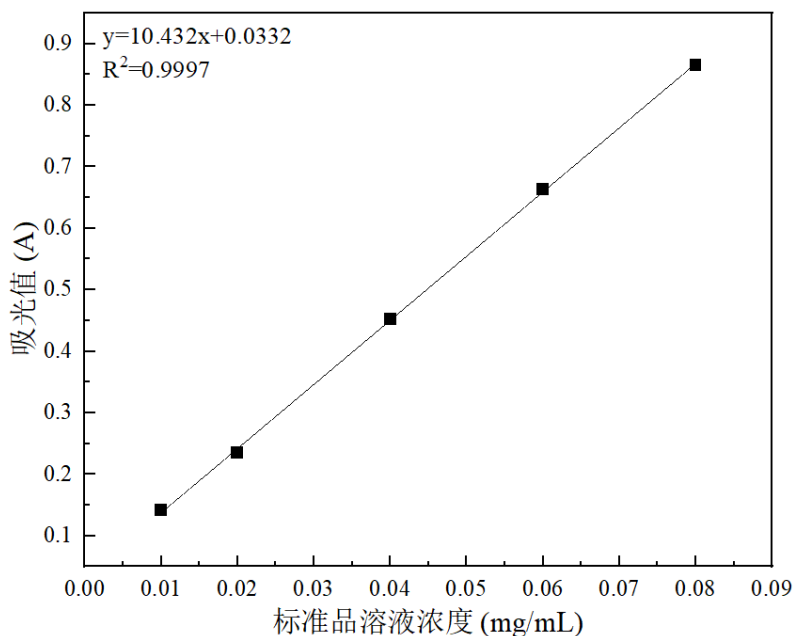


图 2.1 叶黄素标准曲线

Fig. 2.1 The standard curve of lutein

2.3.6 数据处理

所有实验均重复 3 次，实验结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示，利用 SPSS 进行数据的差异显著性分析。

2.4 结果与分析

2.4.1 不同乳化剂溶液静态流变学特性分析

乳化剂的静态流变学性质在纳米乳液的形成、稳定性和结构中均起到了比较关键的作用。图中 2.2 的(a), (b)显示了不同浓度的 SPI 溶液和 GG 溶液的表现粘度与剪切速率的关系。采用 Herschel-Buckley 模型进行数据拟合，其所得参数见表 2.4。由下图 2.2(a), (b)可知，当剪切速率在 0-400 s^{-1} 时，两种乳化剂溶液的表现粘度均随着乳化剂浓度的增加而增加，且当剪切速率范围在 0-50 s^{-1} 时，不同浓度的两种乳化剂的表现粘度随着剪切速率的增加而迅速降低，体现出假塑性流体特性，具有良好的粘度。当剪切速率范围在 50-400 s^{-1} 时，不同浓度的

两种乳化剂的表现粘度随着剪切速率的增加而变化不大。以上现象称为剪切稀化行为，是流变学常见性质。随着剪切速率的增大，吸附在液滴表面的乳化剂会阻碍液滴间的布朗运动，导致液滴的流动速度降低、流动阻力减小，体系的粘度逐渐降低。此现象与宿华林、吴迪等人^[103]的研究结果一致。

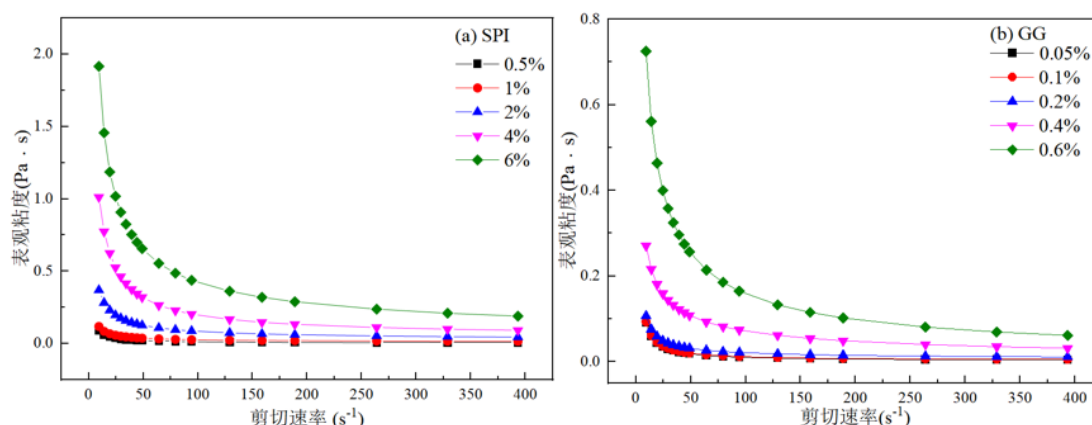


图 2.2 不同乳化剂溶液（a:SPI, b:GG）在不同浓度下的剪切速率与表现粘度的关系

Fig. 2.2 The relationship between shear rate and apparent viscosity of different emulsifier solutions at different concentrations (a:SPI, b:GG)

表 2.4 不同乳化剂溶液的静态流变拟合参数

Table 2.4 Static rheological fitting parameters of different emulsifier solutions

样品	浓度(%)	稠度系数 $K(\text{Pa} \cdot \text{s}^n)$	流变指数 n	决定系数 R^2
SPI	0.5	0.4658	0.798	0.9913
	1	0.4604	0.647	0.9925
	2	1.1764	0.663	0.9963
	4	2.063	0.623	0.9992
	6	8.0116	0.644	0.9999
GG	0.05	0.368	0.77	0.9921
	0.1	0.3741	0.756	0.9904
	0.2	0.3897	0.638	0.9962
	0.4	1.005	0.577	0.9994
	0.6	2.3669	0.635	0.9976

当流变指数 $n=1$ 时代表牛顿流体，当 $0 < n < 1$ 时，表明该体系为假塑性流体^[104]。由表 2.4 所知，两种乳化剂的流变指数 n 均小于 1，说明均表现为假塑性流体，且决定系数 R^2 大于 0.99，拟合结果较好。另一方面，两种溶液的 K 值

随着乳化剂浓度的增加而增加。在 SPI 溶液中, 当浓度高于 4.0% 时, K 值随着乳化剂浓度的增大而迅速升高。当稠度系数 K 发生急剧上升时溶液对应的浓度称为缠结浓度^[105], 故 4.0% 为 SPI 溶液的缠结浓度。在 GG 溶液中, 当浓度高于 0.2% 时, K 值随着乳化剂浓度的增大而迅速升高, 此时 0.2% 即为 GG 溶液的缠结浓度。体系黏度增大有利于防止液滴聚结。然而, 在制备乳液的过程中, 如果乳化剂的浓度超过自身的缠结浓度, 乳化剂则会在一定压力和快速震荡的影响下发生熔体破裂^[106], 即: 液体发生无规律的不稳定流动现象, 从而增加了纳米乳液的加工难度, 同时也会降低其制备效果^[99]。因此, 用于制备纳米乳液的 SPI 和 GG 溶液的浓度分别不应超过 4.0% 和 0.2%。

2.4.2 不同乳化剂溶液的乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)分析

乳化特性与乳化剂在水油界面上的吸附、扩散和定向排列有关^[107], 包括乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性指数(ESI)^[2], 这是乳化剂的重要特性。EAI 和 ESI 是评价乳化剂在水油界面乳化性能的良好指标^[108]。EAI 和 ESI 越高, 则形成的乳状液就越稳定、越不容易沉淀。图 2.3 (a), (b) 为 SPI 和 GG 分别在不同溶液浓度下 EAI 和 ESI 的变化。由图可知, 随着浓度的升高, 两种乳化剂的 EAI 和 ESI 均呈现先上升后下降的趋势。在 SPI 浓度在 0.5-4.0% 范围内时, EAI 和 ESI 升高且均具有显著性差异($P > 0.05$)。当 SPI 浓度为 4.0% 时, 达到最高值 EAI (1.70 A) 和最高值 ESI (557.99 A)。当 SPI 浓度在 4.0-6.0% 范围内时, EAI 和 ESI 均有一定程度的下降且具有显著性差异($P > 0.05$)。当 GG 浓度范围为 0.05-0.20% 时, EAI 和 ESI 增加且均具有显著性差异($P > 0.05$)。当 GG 浓度为 0.2% 时, 达到最高值 EAI (1.95 A) 和最高值 ESI (97.17 A)。当 GG 浓度范围在 0.2-0.6% 时, EAI 和 ESI 均有一定程度的下降且具有显著性差异($P > 0.05$)。Kato^[109]的研究中提出: 乳化性能与乳化剂的表面疏水性相关, 表面疏水性升高会降低界面张力, 从而提高乳化性能。乳化剂具有两亲性, 随着乳化剂浓度的升高, SPI 和 GG 中的更多的亲水基团倾向于水相移动, 疏水基团向油相移动。存在于 SPI 和 GG 内部的疏水基团暴露, 疏水性增强^[110], 且疏水基团与油滴的相对接触面积增大, 促使疏水基团与油滴发生吸附与定向排列^[111]。而界面张力由界面基团受力不平衡引起, 当基团有序排列时, 水油界面张力减小, 形成一层致密、稳定的膜, 因此提高了 EAI 和 ESI。EAI 和 ESI 降低可能是因为过量的 SPI 和 GG 易发生一

定程度的聚集^[112]，导致形成的液滴分子间构象不稳定，从而破坏了水油界面的稳定性，导致 EAI 和 ESI 降低。此结果与李迎秋^[113]、王莹^[114]的研究中的变化趋势一致。

参考 SPI 和 GG 的静态流变学特性结果，其浓度分别不应超过 4.0%和 0.2%；参考 EAI 和 ESI 结果，当 SPI 和 GG 的浓度分别为 4.0%和 0.2%时，此时乳化特性最好。综上，选择 4.0%和 0.2%作为 SPI 和 GG 的最佳浓度。

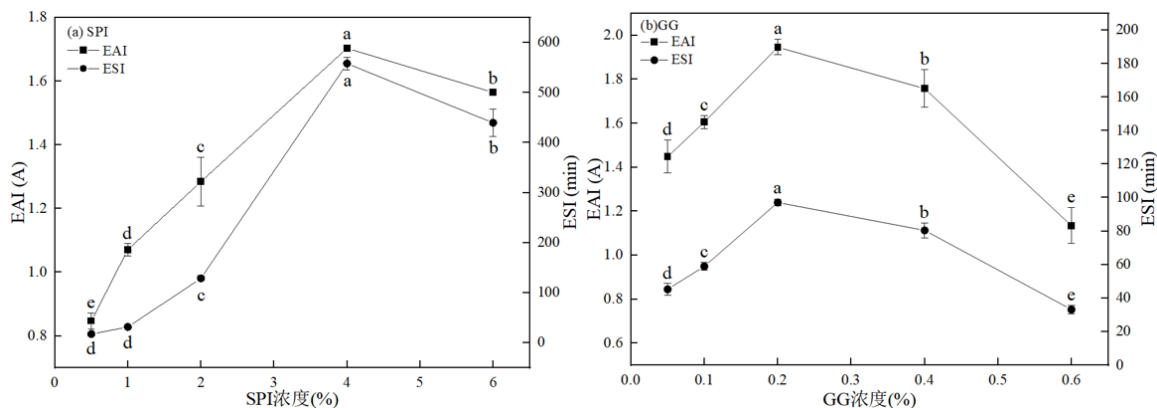


图 2.3 不同浓度乳化剂(a:SPI, b:GG)的乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)

Fig. 2.3 Emulsifying activity index (EAI) and emulsifying stability index (ESI) of two emulsifiers with different concentrations (a:SPI, b:GG)

注：相同字母代表差异性不显著($P < 0.05$)，不同字母代表差异性显著($P > 0.05$)，以下图、表中字母同此。

2.4.3 水油比对叶黄素纳米乳液的性能影响

图 2.4 为水、油相体积比例对 SPI-GG 叶黄素纳米乳液平均粒径和 Zeta-电位的影响。当水油比例为 9:1 时纳米乳液有最小的平均粒径 275.4 ± 8.90 nm 和最大的电位绝对值 45.7 ± 0.31 mV。随着油相比比例的增加，纳米乳液的粒径显著增加到 3180.67 ± 105.55 nm，电位绝对值显著降低到 35.2 ± 0.70 mV。水油比例为 4:1 时的纳米乳液平均粒径与水油比例为 9:1 时的平均粒径相比，未体现出显著性差异($P < 0.05$)；当水油比大于 7:3 时，与水油比 9:1 体现出显著性差异($P > 0.05$)，这说明适当提高纳米乳液中油相所占比例对体系的平均粒径影响不大，但此时体系的电位绝对值显著降低。所以，增大油相的所占比例虽然增加了叶黄素的载量，但增大油相的同时会导致一定量的乳化剂不足以吸附、排列在水油界面，从而界面稳定结构被破坏，液滴间的静电斥力减少，导致体系的电位

绝对显著值降低。

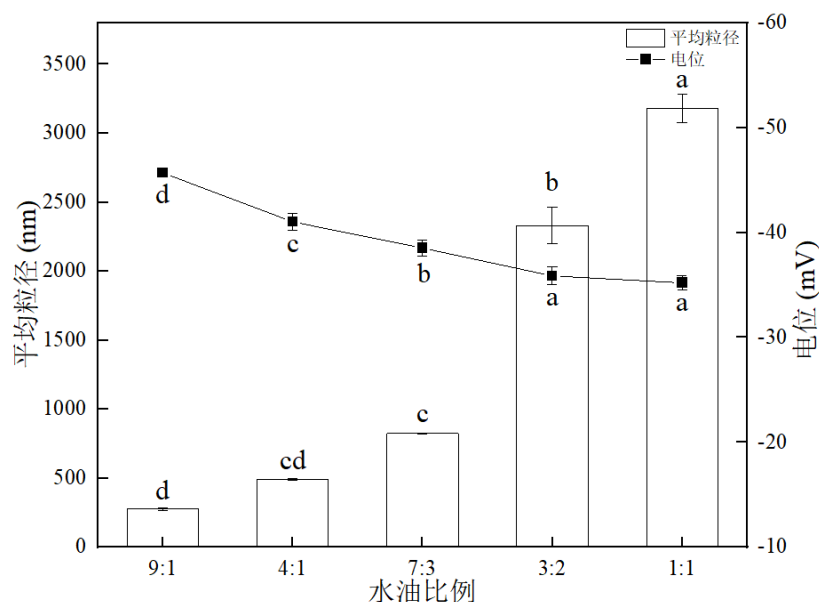


图 2.4 水油比对纳米乳液平均粒径和电位的影响

Fig. 2.4 Effect of water-oil ratio on the particle size and potential of nano emulsions

在制备纳米乳液时，一些外力操作如剪切、超声等及氧气、环境等因素对叶黄素有一定的影响，因此会造成少量的损失。从图 2.5 可以看出纳米乳液中叶黄素的包埋率随着水油比例的增大而降低，此现象说明并非油相占比越高则包埋叶黄素的量越多。当油相占比升高时，体系的平均粒径增大，电位绝对值降低，纳米乳液稳定性降低，一部分叶黄素因水包油结构被破坏从而被释放出来，导致包埋率降低。当水油比例为 9:1 时，叶黄素包埋率达到了 $83.32 \pm 0.18\%$ ，与水油比例为 4:1 时叶黄素包埋率无显著性差异($P < 0.05$)，与剩下三组均有显著性差异($P > 0.05$)。

因此，以能够包埋更多叶黄素为基础，以纳米乳液能够维持稳定为前提，综合上述平均粒径、电位的变化，选择水油比例为 9:1 来制备纳米乳液。

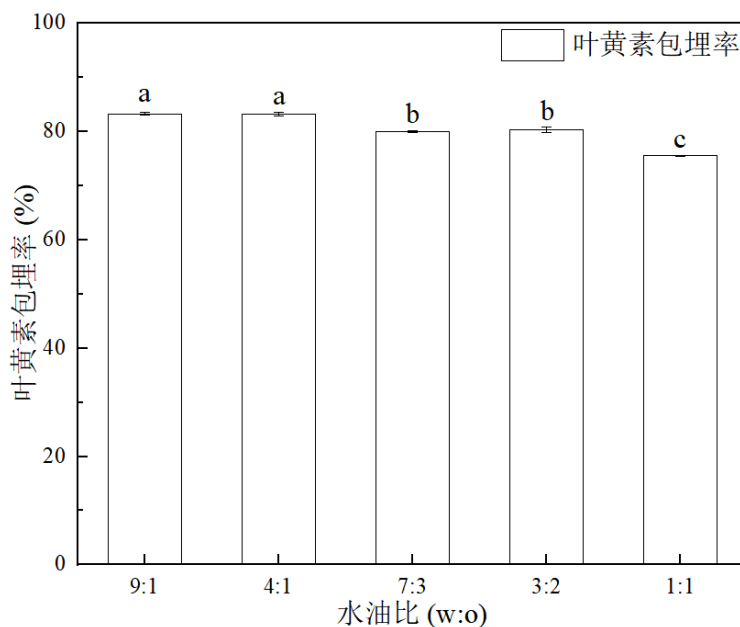


图 2.5 水油比例对纳米乳液中叶黄素包埋率的影响

Fig. 2.5 Effect of water-oil ratio on the embedding rate of lutein in nano emulsion

2.4.4 剪切速率对叶黄素纳米乳液性能的影响

高速剪切过程中, 剪切速率的大小在一定程度上会影响纳米乳液体系的稳定性。图 2.6 和图 2.7 分别显示了剪切速率对乳液平均粒径、Zeta-电位以及叶黄素包埋率的影响。结果表明, 随着剪切速率的增加, 乳液的平均粒径、电位值均呈现先下降后上升的趋势, 而叶黄素包埋率均呈现先增加后降低的趋势。当剪切速率在 8000-10000 r/min 变化时, 乳液的平均粒径、电位值分别从 537.63 ± 4.35 nm、 -37.67 ± 0.49 mV 降低到了 293.03 ± 6.89 nm 和 -41.17 ± 0.67 mV, 叶黄素包埋率从 $72.89 \pm 0.36\%$ 升高到了 $90.41 \pm 0.18\%$, 且均具有显著性差异($P > 0.05$)。此现象说明, 随着剪切速率的增加, 体系中剪切力增强, 水油相不断在力的作用下被分散成小液滴, 平均粒径逐渐减小且形成均匀的乳液。当剪切速率增加到 12000-14000 r/min 时, 剪切力、分散力持续增加, 体系内的布朗运动增强, 液滴间持续碰撞导致部分液滴发生结合形成较大液滴, 为 392.10 ± 4.03 nm 和 407.73 ± 15.89 nm; 液滴平均粒径增大, 导致乳化剂不足以维持水油界面稳定存在, 乳液破乳叶黄素被释放, 导致包埋率显著降低。

综上, 当选择剪切速率为 10000 r/min 时, 此时制备得到的叶黄素纳米乳液平均粒径最低、Zeta-电位绝对值最高且叶黄素包埋率最高。

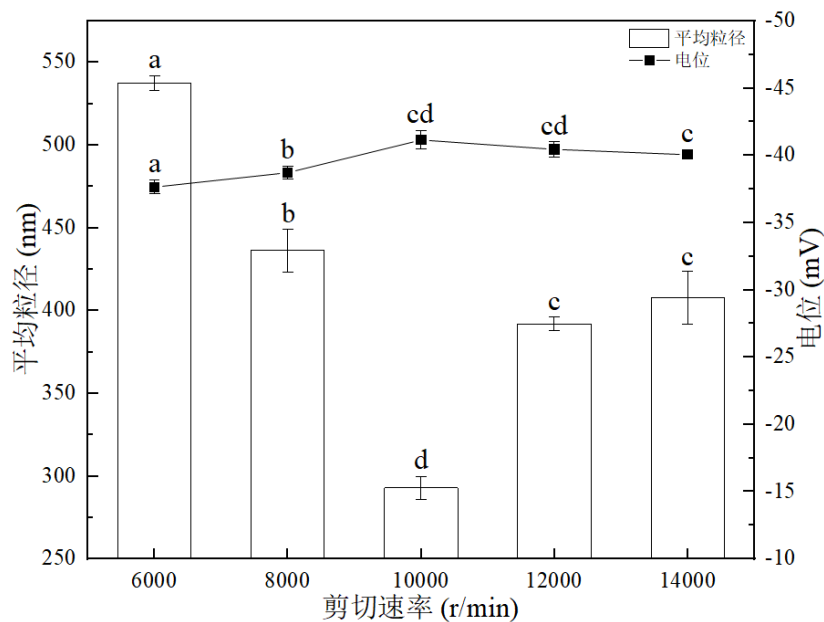


图 2.6 剪切速率对纳米乳液平均粒径和电位的影响

Fig. 2.6 Effect of shearing rate on the particle size and potential of nano emulsions

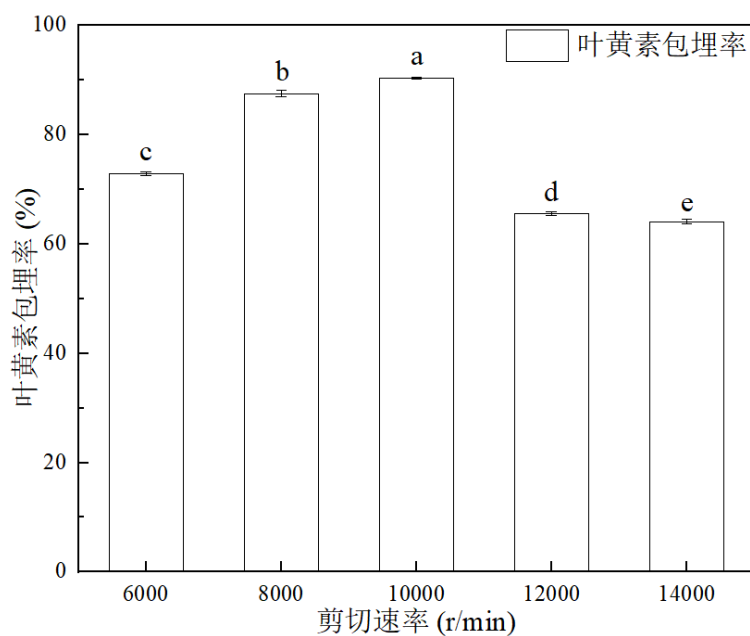


图 2.7 剪切速率对纳米乳液中叶黄素包埋率的影响

Fig. 2.7 Effect of shearing rate on the embedding rate of lutein in nano emulsion

2.4.5 剪切时间对叶黄素纳米乳液性能的影响

剪切时间对叶黄素纳米乳液的影响如下图 2.8 和图 2.9。当剪切时间为 1 min 时，纳米乳液平均粒径为 394.23 ± 13.15 nm，Zeta-电位值为 -41.87 ± 0.71 mV，叶黄素包埋率为 $92.00 \pm 0.09\%$ 。虽然此时叶黄素包埋率较高，但体系平均粒径

较大。出现此现象可能因为当剪切时间过短时，体系中发生分散作用的时间较小，导致部分油相与水相未充分分散，叶黄素仍溶于大油滴中而未形成 O/W 结构，此时的体系不足以维持长时间的稳定。当均质时间为 3 min 时，体系的平均粒径达到最小值 328.23 ± 4.35 nm，电位为 -42.43 ± 0.95 mV，叶黄素包埋率为 $87.28 \pm 0.49\%$ 。当剪切时间在 5-9 min 时，随着时间延长，分散时间过长，机械产热导致体系温度升高，促进了液滴间持续碰撞与结合，液滴间会再次形成较大液滴。与 1 min 时相比，3 min 时纳米乳液的平均粒径降低了 20.11%，Zeta-电位绝对值降低了 1.34%，叶黄素包埋率降低了 5.41%。由此可见，剪切时间对纳米乳液的平均粒径影响更加显著。故以剪切时间对纳米乳液平均粒径的影响为主要考虑因素，选择剪切时间为 3 min 以制备纳米乳液。

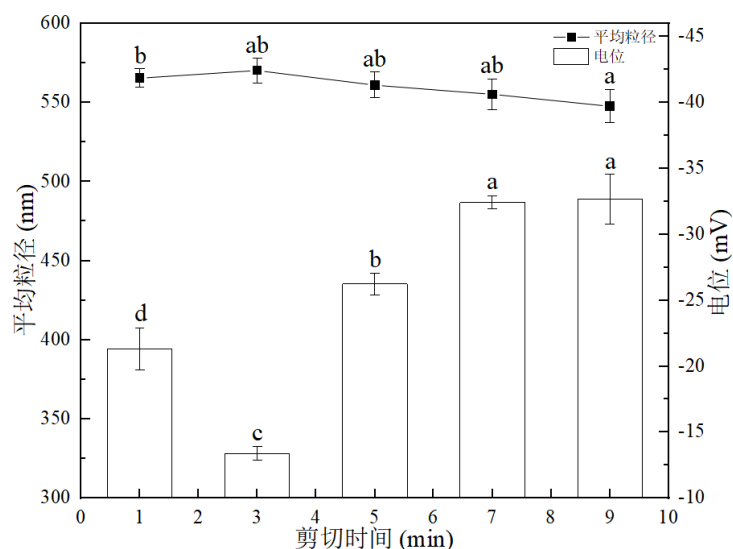


图 2.8 剪切时间对纳米乳液平均粒径和电位的影响

Fig. 2.8 Effect of shearing time on the particle size and potential of nano emulsions

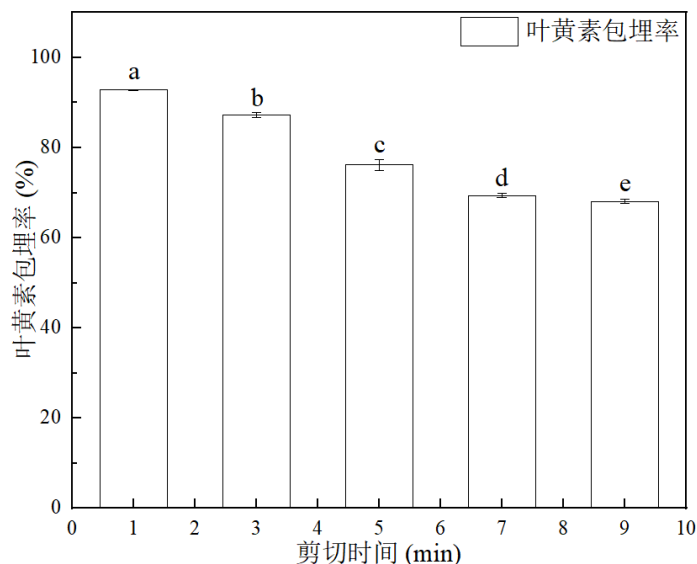


图 2.9 剪切时间对纳米乳液中叶黄素包埋率的影响

Fig. 2.9 Effect of shearing time on the embedding rate of lutein in nano emulsion

2.4.6 超声功率对叶黄素纳米乳液性能的影响

超声功率对叶黄素纳米乳液性能的影响如下图 2.10 和图 2.11。当超声功率的范围在 100-700 W 时，纳米乳液的平均粒径显著降低，Zeta-电位绝对值先降低后升高，叶黄素包埋率之间无显著性差异($P < 0.05$)。当超声功率达到 700 W 时，平均粒径达到最小值 373.67 ± 6.39 nm、电位绝对值最大 47.10 ± 0.60 mV，叶黄素包埋率为 $87.50 \pm 0.12\%$ 。当超声功率超过 700 W 后，体系平均粒径显著增大，电位绝对值和叶黄素包埋率也缓慢降低，这说明适当的增加超声功率能有效地降低纳米乳液的平均粒径、提高电位绝对值，但对叶黄素包埋率影响不大；进一步增加超声功率则不能提高体系的电位值和叶黄素包埋率，相反可能会出现降低的现象。此趋势与甘凌的研究结果相同^[115]。对于已定量的水油相来说，形成稳定纳米乳液所需要的外界能量是确定的^[116]。纳米乳液过度超声，即较高能量的持续输入，增加了液滴间的碰撞，一些分散后的小液滴又会重新聚集^[117]，从而导致体系的平均粒径增大、电位绝对值降低。因此，选择 700 W 作为制备纳米乳液的最佳超声功率。

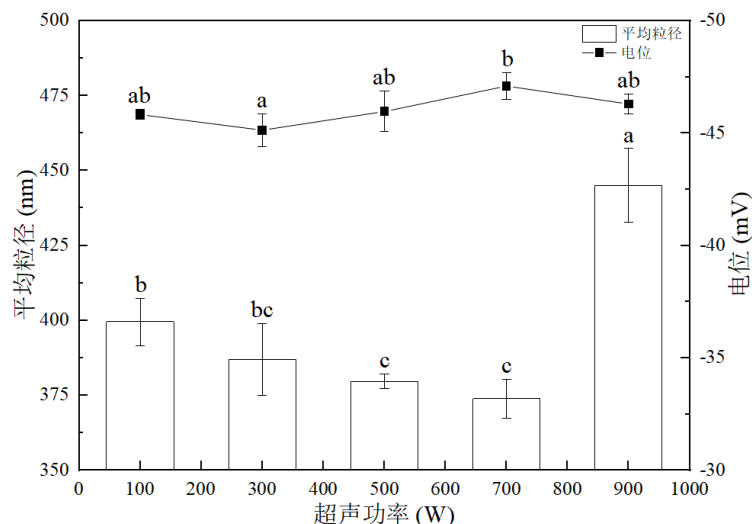


图 2.10 超声功率对纳米乳液平均粒径和电位的影响

Fig. 2.10 Effect of ultrasound powers on the particle size and potential of nano emulsions

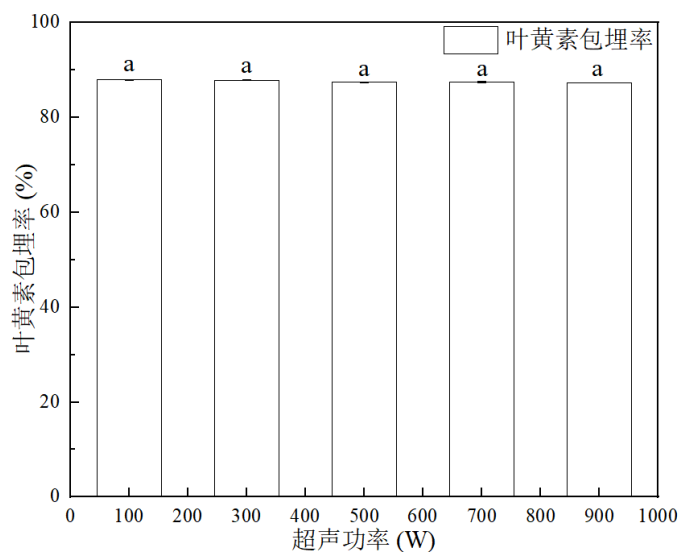


图 2.11 超声功率对纳米乳液中叶黄素包埋率的影响

Fig. 2.11 Effect of ultrasound powers on the embedding rate of lutein in nano emulsion

2.4.7 超声时间对叶黄素纳米乳液性能的影响

超声时间对叶黄素纳米乳液的影响结果如图 2.12 和图 2.13 所示，乳液的平均粒径、Zeta-电位绝对值及叶黄素包埋率均随着超声时间的增加先减后增，并在超声时间为 30 min 时平均粒径达到最小值、电位绝对值和叶黄素包埋率达到最大值。超声 30 min 之后，乳液粒径又呈现增大趋势，可能因为纳米乳液经历长时间的碰撞和过高的空化能，进而导致其液滴结构遭到破坏，纳米体系稳定

性降低，从而纳米乳液平均粒径增大、电位绝对值和叶黄素包埋率降低。因此，选择 30 min 作为制备纳米乳液的最佳超声时间。

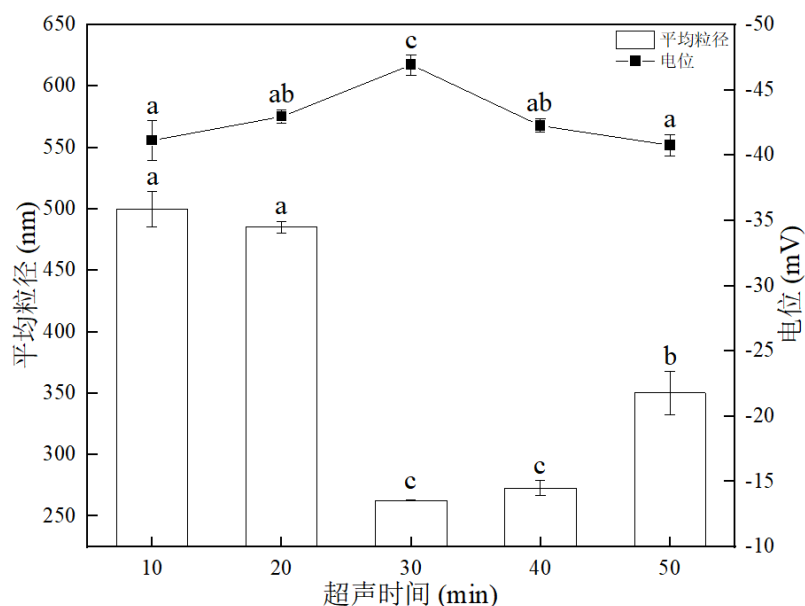


图 2.12 超声时间对纳米乳液平均粒径和电位的影响

Fig. 2.12 Effect of ultrasound time on the particle size and potential of nano emulsions

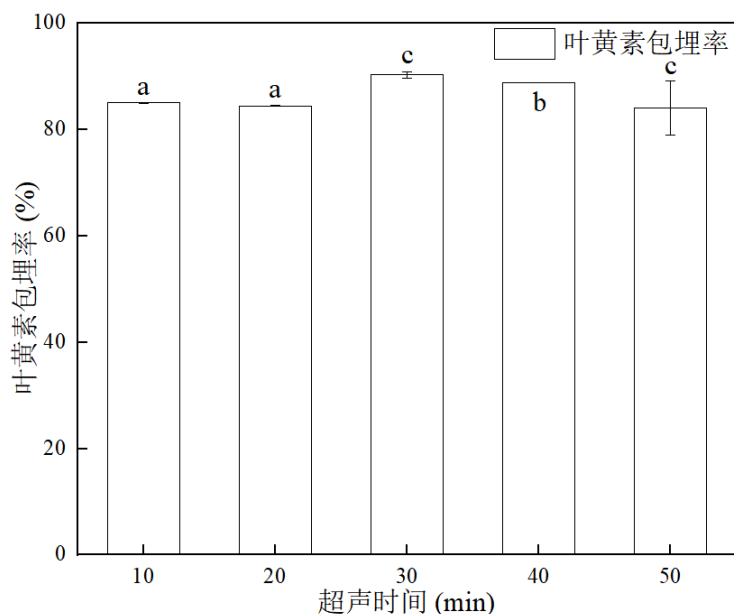


图 2.13 超声时间对纳米乳液中叶黄素包埋率的影响

Fig. 2.13 Effect of ultrasound time on the embedding rate of lutein in nano emulsion

2.4.8 正交试验优化结果

根据单因素试验结果，选定超声时间、超声功率、剪切速率和剪切时间为正交试验因素，以平均粒径、Zeta-电位和叶黄素包埋率为测定指标，并选择合

适的实验水平，设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。正交试验和正交试验极差分析结果分别见表 2.5 和表 2.6，以确定叶黄素纳米乳液制备的最佳工艺参数。

表 2.5 叶黄素纳米乳液制备条件正交结果表

Table 2.5 Orthogonal results of preparation conditions of lutein nano emulsion

序号	因素				平均粒 径	电位	包埋率
	A	B	C	D	(nm)	(mV)	(%)
1	28	600	9000	2	287.5	-42.17	83.92
2	28	700	10000	3	265.47	-45.43	86.27
3	28	800	11000	4	292.5	-41.93	79.57
4	30	600	10000	4	307.35	-41.83	78.90
5	30	700	11000	2	241.77	-43.23	81.23
6	30	800	9000	3	257.93	-42.23	79.90
7	32	600	11000	3	316.8	-39.7	71.91
8	32	700	9000	4	310.87	-41.17	74.24
9	32	800	10000	2	320.3	-39	73.24

表 2.6 叶黄素纳米乳液制备条件正交结果处理表

Table 2.6 Orthogonal result processing Tab. For preparation conditions of lutein nano emulsion

参考指标	极差分析	因素				极差分析结果
		A	B	C	D	
平均粒径	K ₁	281.82	303.88	285.43	283.19	不同因素优化的选择结果 A ₂ B ₂ C ₃ D ₂ A>B>D>C
	K ₂	272.17	272.7	297.71	280.07	
	K ₃	315.99	290.24	283.69	303.57	
	R	43.82	31.18	14.02	23.5	
电位	K ₁	-43.18	-41.23	-41.86	-41.47	不同因素优化的选择结果 A ₁ B ₂ C ₂ D ₂ A>B>D>C
	K ₂	-41.72	-43.28	-42.09	-42.46	
	K ₃	-39.96	-41.06	-41.62	-41.64	
	R	-3.22	-2.22	-0.47	-0.99	
包埋率	K ₁	83.26	78.24	79.35	79.46	不同因素优化的选择结果 A ₁ B ₃ C ₂ D ₁ A>B>C>D
	K ₂	77.68	80.58	79.47	79.36	
	K ₃	73.13	77.57	77.57	77.57	
	R	10.13	3.01	1.9	1.89	

由表 2.6 可知，对平均粒径做极差分析可以得出影响平均粒径的因素由大

到小顺序为 $A > B > D > C$ ，最佳因素组合为 $A_2B_2C_3D_2$ ；对电位值的影响大小为 $A > B > D > C$ ，最佳因素组合为 $A_1B_2C_2D_2$ ；对叶黄素包埋率影响大小为 $A > B > C > D$ ，最佳因素组合为 $A_1B_3C_2D_1$ 。综合正交试验的几个参考因素结论可知，影响叶黄素纳米乳液制备稳定性由大到小依次是 $A > B > D > C$ ，制备叶黄素纳米乳液的最优条件为 $A_1B_2D_2C_2$ 。

2.4.9 叶黄素纳米乳液制备最优工艺验证

通过正交试验分析可知制备叶黄素纳米乳液的优化条件为：超声时间为 28 min、超声功率为 700 W、剪切速率为 10000 r/min、剪切时间为 3 min。在此条件下制备的叶黄素纳米乳液稳定性如表 2.7 所示。

表 2.7 最优工艺条件下叶黄素纳米乳液性质

Table 2.7 Properties of lutein nano emulsion under optimal technological conditions		
平均粒径 (nm)	电位 (mV)	包埋率 (%)
221.3	-44.6	86.72
230.5	-43.3	85.69
225.4	-43.7	84.32

2.5 本章小节

本章对叶黄素纳米乳液体系进行了制备，并对制备工艺进行了优化，获得如下结论：

(1) 通过静态流变学特性和 EAI、ESI 的分析，SPI 和 GG 浓度分别在 4.0% 和 0.2% 时具有最佳的流变特性和乳化特性；

(2) 采用单因素试验和正交优化分析得到制备叶黄素乳液的最优工艺参数为：水油比例为 9:1、剪切时间为 3 min、剪切速率为 10000 r/min、超声功率为 700 W 及超声时间为 28 min，在此制备条件下，叶黄素纳米乳液平均粒径为 225.73 ± 4.61 nm、Zeta-电位值为 -43.87 ± 0.67 mV 及叶黄素包埋率为 $85.58 \pm 1.20\%$ 。

第3章 大豆分离蛋白瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液的表征及稳定性考察

3.1 前言

食品行业中,产品在加工、储存和运输的过程中,其质量会受到食品添加剂、加工条件如 pH、温度、以及运输贮存条件的影响。因此,考察不同添加剂(防腐剂、抗氧化剂及甜味剂)、加工贮存条件(离子浓度、酸碱环境、杀菌方式、贮存温度、光照及贮存时间)下的叶黄素纳米乳液的稳定性就显得尤为重要。

本章实验中,以大豆分离蛋白(SPI)、瓜尔豆胶(GG)为乳化剂,玉米油为油相,依据第二章优化获得的最佳工艺条件下制备 SPI-GG 基叶黄素纳米乳液为研究对象,通过光学显微观察、内源荧光光谱分析及傅里叶红外光谱分析(FTIR)对大豆分离蛋白瓜尔豆胶基叶黄素纳米乳液体系的结构进行表征。其次,以纳米乳液的平均粒径、电位及叶黄素化学稳定性为指标,考察了叶黄素纳米乳液在不同 pH(2.0-12.0)、不同 Na^+ 浓度(20-100 mM)、不同山梨酸钾浓度(0.2-0.8 g/Kg)、不同抗坏血酸浓度(0.1-0.16 mg/mL)、不同蔗糖浓度(7-11 g/mL)、不同杀菌方式(巴氏杀菌、高压蒸汽灭菌)、贮藏时间(0-14 d)及有无光照条件下的稳定性,为疏水性功能因子纳米乳液体系的生产及贮存条件提供理论基础。

3.2 材料与设备

3.2.1 材料与试剂

表 3.1 材料与试剂

Table 3.1 Materials and reagents

材料或试剂名称	规格	生产厂家
大豆分离蛋白	食品级	上海源叶生物科技有限公司
瓜尔豆胶	食品级	上海麦克林生物试剂有限公司
叶黄素	食品级	上海麦克林生物试剂有限公司
玉米油	食品级	购自当地超市

续表 1

乙醇	分析纯	上海麦克林生物试剂有限公司
溴化钾	分析纯	上海麦克林生物试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	上海麦克林生物试剂有限公司
盐酸	分析纯	上海麦克林生物试剂有限公司
氯化钠	分析纯	上海麦克林生物试剂有限公司
山梨酸钾	分析纯	上海麦克林生物试剂有限公司
抗坏血酸	分析纯	上海麦克林生物试剂有限公司
蔗糖	分析纯	上海麦克林生物试剂有限公司

3.2.2 仪器与设备

表 3.2 仪器与设备

Table 3.2 Instruments and equipment

仪器名称	型号	生产厂家
磁力搅拌器	HJ-4A	上海康路仪器设备有限公司
电子分析天平	JD200-3	沈阳龙腾电子有限公司
高速剪切机	T18	德国 IKA 公司
超声细胞破碎仪	SCINETZ-08	宁波新芝生物科技股份有限公司
光学显微镜	T1-SM	日本尼康公司
荧光分光光度计	RF5301	日本岛津公司
傅里叶红外光谱仪	IRXross	日本 Shimadzu 公司
纳米粒度-Zeta 电位仪	ZEN3600	英国 Malvern 公司
紫外可见分光光度计	UV-2550	日本 Shimadzu 公司

3.3 实验方法

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/537100063102006044>