

小麦醇溶蛋白纳米颗粒稳定皮克林乳液的研究

许雪儿*, 王孟姣, 张开云, 杨柳, 肖苏慧, 金绍娣

(盐城工业职业技术学院, 药品与健康学院, 盐城 224005)

摘要: **目的** 构建负载丁香酚的小麦醇溶蛋白/果胶纳米颗粒稳定皮克林乳液, 提高丁香酚生物利用率。**方法** 通过反溶剂法制备复合纳米颗粒, 以乳液粒径、乳析指数为指标, 考察复合纳米颗粒对皮克林乳液稳定性影响; 以抑菌率为指标, 考察皮克林乳液中丁香酚的生物利用率。**结果** 当负载丁香酚的小麦醇溶蛋白/果胶纳米颗粒浓度达 5.00%, 油相比比例不超过 60%, 盐离子浓度低于 250 mmol/L, 储藏时间 60 d 以内时: 皮克林乳液液滴颗粒分散, 体系较为稳定。与此同时, 当皮克林乳液最小抑菌浓度为 1.00 mg/mL 时, 可有效抑制大肠杆菌的生长。**结论** 负载丁香酚的小麦醇溶蛋白/果胶纳米颗粒可在油水两相间形成界面膜以稳定皮克林乳液, 其抑菌性能通过延长食品货架期的形式应用于食品保鲜领域中。**关键词:** 丁香酚; 小麦醇溶蛋白; 果胶; 纳米颗粒; 皮克林乳液

Research on Pickering emulsion stabilized by gliadin nanoparticles

XU Xue-Er*, WANG Meng-Jiao, ZHANG Kai-Yun, YANG Liu, XIAO Su-Hui, JIN Shao-Di

(College of Medicine and Health, Yancheng Institute of Industry Technology, Yancheng 224005, China)

ABSTRACT: Objective To construct Pickering emulsion with eugenol/pectin nanoparticles and improve the bioavailability of eugenol. **Methods** The composite nanoparticles were prepared by anti solvent method, and the effect of composite nanoparticles on the stability of Pickering emulsion was investigated with the particle size and the creaming stability as the indexes; the bioavailability of eugenol in Pickering emulsion was investigated with the bioavailability as the index. **Results** When the concentration of eugenol loaded gliadin/pectin nanoparticles reached 5.00%, the proportion of oil phase not more than 60%, the concentration of salt ions was less than 250 mmol/L, and the storage time was less than 60 d, the drops of Pickering emulsion were dispersed, the system was relatively stable. Furthermore, when the minimum inhibitory concentration of Pickering emulsion was 1.00 mg/mL, it could effectively inhibit the growth of *Escherichia coli*. **Conclusion** Eugenol loaded gliadin/pectin nanoparticles can form an interfacial facial mask between oil and water to stabilize Pickering emulsion, and its antibacterial properties can be applied in the field of food preservation by extending the shelf life of food.

KEY WORDS: eugenol; gliadin; pectin; nanoparticle; Pickering emulsion

基金项目: 盐城工业职业技术学院自然科学一般项目(yg202104)、江苏省产学研合作项目(BY20221368)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Yancheng Institute of Industry Technology (yg202104), and the Foundation of Industry-university-research Institute Integration in Jiangsu Province (BY20221368)

*通信作者: 许雪儿, 硕士, 讲师, 主要研究方向为粮食精深加工。E-mail: 464538173@qq.com

*Corresponding author: XU Xue-Er, Master, Lecturer, Yancheng Institute of Industry Technology, No.285, Jiefang Road, Yancheng 224005, China. E-mail: 464538173@qq.com

0 引言

丁香酚, 一种绿色、天然、安全的苯丙烷类小分子化合物, 提取自丁香及丁香罗勒油中, 具有良好的抑菌防腐、抗氧化、抗衰老等功效^[1]。但因其难溶于水, 且极易受空气、温度、水分含量等因素影响, 使得丁香酚的应用范围受限^[2-3]。研究表明, 可通过纳米颗粒、微胶囊、微乳液、皮克林乳液等包埋技术处理以减少其与外界的接触, 进而提高其溶解度和稳定性^[4-5]。其中, 因皮克林乳液具有比传统乳液更好的乳化稳定性、抗聚结性以及避免使用表面活性剂等优点^[6], 在疏水性活性物质运载领域得到广泛关注。

皮克林乳液是指一类由固体颗粒代替传统的表面活性剂稳定水油两相的乳液, 因固体颗粒具有较高的自由能, 可通过分子间重排和展开等方式吸附于油水界面以形成强有力的物理屏障, 降低界面张力并实现对乳液的稳定作用, 有效避免发生液滴聚结和奥氏熟化^[7]。基于绿色、健康的生活理念导向, 多采用食品级天然来源的生物大分子如淀粉^[8]、壳聚糖^[9]、醇溶蛋白^[10]等作为固体颗粒壁材制备形成皮克林乳液。其中小麦醇溶蛋白因其两性性及高营养价值被认为是理想的稳定剂之一。小麦醇溶蛋白作为一种两性醇溶蛋白, 当体系中溶剂极性改变时, 会驱动小麦醇溶蛋白分子自组装形成纳米颗粒, 这一特性使得其用于稳定皮克林乳液有较大的优势, 但由于其内在亲水性限制了其在水油两相界面的稳定性, 其稳定的皮克林乳液存在不能长效储存且析油率高等问题^[11]。因此, 越来越多的研究者考虑运用多糖、多酚等亲水性物质修饰小麦醇溶蛋白结构, LI 等^[12]通过复合阿拉伯胶稳定醇溶蛋白纳米颗粒, 实现皮克林乳液的制备, 可有效延长乳液储藏时间; WU 等^[13]借助酪蛋白酸钠复合醇溶蛋白以降低水油两相界面张力, 制备所得皮克林乳液体系稳定且乳析指数较低。除了阿拉伯胶、酪蛋白酸钠等亲水性物质之外, 果胶作为一种天然的水溶性多糖, 其所带负电荷可与带正电荷的小麦醇溶蛋白通过静电相互作用结合, 使其二级结构变得更加致密, 并以此形成稳定结构。李文婧^[14]研究发现, 果胶可显著提高醇溶蛋白-果胶纳米颗粒的凝胶强度和持水性, 复合纳米颗粒稳定的皮克林乳液也有效实现对姜黄素的稳定负载。因此, 为解决小麦醇溶蛋白纳米颗粒稳定的皮克林乳液储藏稳定性差、易发生析油和乳析现象等问题, 本研究选用果胶作为稳定剂, 借助果胶与小麦醇溶蛋白间的相互作用修饰小麦醇溶蛋白纳米颗粒结构, 提高其界面润湿性, 以此增强皮克林乳液的水油界面结构并调控乳液特性, 进一步实现皮克林乳液对丁香酚的稳定运载及长效包埋。

本研究采用反溶剂法制备负载丁香酚的小麦醇溶蛋白/果胶纳米颗粒作为连续相, 通过不可逆吸附的方式形成多层界面膜, 以稳定油相液滴形成皮克林乳液, 研究小

麦醇溶蛋白/果胶纳米颗粒浓度、油相比例、pH 及盐离子浓度对皮克林乳液稳定性的影响, 并探究其抑菌能力, 为疏水性活性物质的负载, 及食品保鲜、包装领域的研究开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦醇溶蛋白(纯度 99%, 南通瑞生科技有限公司); 大豆油(盐城雅家乐超市)。

大肠杆菌(盐城工业职业技术学院药品与健康学院微生物实验室保藏); 果胶粉(分析纯)、丁香酚、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC)、尼罗红(色谱纯)(美国 Sigma 公司); 无水乙醇、琼脂、酵母浸膏(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

LXJ-IIIB 型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); R-1001N 旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司); R05 磁力搅拌器、T18 高速分散器(德国 IKA 公司); CR21G 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司); TW1280 恒温恒湿培养箱(上海皓庄仪器有限公司); Zetasizer Nano 纳米粒度仪(英国 Malvern 公司); AAH44212K 型恒温培养摇床(韩国杰奥特有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 小麦醇溶蛋白/果胶纳米颗粒制备

称取 0.5 g 小麦醇溶蛋白于 10 mL 体积分数为 70% 的乙醇水溶液中, 置于磁力搅拌器上搅拌 10 min 后备用; 称取 2.0 g 果胶于 10 mL 的蒸馏水中, 置于磁力搅拌器上搅拌 1 h 后备用; 将一定体积的小麦醇溶蛋白乙醇溶液快速滴至 38.9 mL 蒸馏水中, 得到小麦醇溶蛋白纳米颗粒, 以小麦醇溶蛋白与果胶质量比为 1:2, 移取一定量的果胶溶液快速滴至小麦醇溶蛋白纳米颗粒中, 并置于磁力搅拌器上搅拌 60 min 后, 离心除去不溶物, 冷冻干燥上清液得到小麦醇溶蛋白/果胶纳米颗粒。

1.3.2 小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒制备

以小麦醇溶蛋白与丁香酚质量比为 10:1 制备小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒, 移取相应质量的丁香酚置于 1.3.1 中的小麦醇溶蛋白乙醇溶液, 得到负载丁香酚的小麦醇溶蛋白乙醇溶液; 随后将其按照 1.3.1 后续步骤进行制备得到小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒。

1.3.3 小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒稳定的皮克林乳液的制备

移取一定量的小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒置于 50 mL 样品瓶中, 随后移取一定量的大豆油置于其中, 通过高速分散器以 10000 r/min 转速均质 3 min, 便可得新鲜制备的皮克林乳液。

1.3.4 皮克林乳液类型判定

移取 20 mL 去离子水及 20 mL 大豆油至透明样品瓶中, 分别滴入 1 mL 新鲜制备的皮克林乳液, 等待 30 s 后观察并拍照记录液滴在水相及油相中的形态。若乳液液滴在水相中分散开, 在油相中聚集成液滴状, 则乳液为水包油型(O/W), 若乳液液滴在油相中分散开, 在水相中聚集成液滴状, 则乳液为油包水型(W/O)^[15]。

1.3.5 不同小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒浓度下皮克林乳液粒径的测定

固定油相比例为 30%、水油两相总体积为 10 mL, 分别设定小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒浓度为 1.25%、2.50%、3.75%、5.00%、6.25%、7.50%、8.75%, 以 10000 r/min 速度均质 3 min 后得到不同复合纳米颗粒浓度稳定的皮克林乳液。移取新鲜制备的不同纳米颗粒浓度稳定的皮克林乳液 5 mL 至激光粒度分布仪的样品池中, 测定 $D_{3,2}$ 值。

1.3.6 不同小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒浓度下皮克林乳液乳析指数的测定

将所得不同小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒浓度下皮克林乳液静置 2 h 后, 用相机拍摄皮克林乳液外观的光学照片。取 10 mL 待测皮克林乳液于透明样品瓶中, 分别静置 24 h 后读取乳液上半部分的水层高度, 以公式(1)计算待测样品的乳析指数^[16]:

$$E = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, E 表示乳析指数; A_1 表示水层高度, A_0 表示乳液总高度。

1.3.7 不同油相比例下皮克林乳液粒径的测定

固定水油两相总体积为 10 mL, 设定浓度为 5.00% 的小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒作为水相, 调节油相比例为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%, 以 10000 r/min 速度均质 3 min 后得到不同油相比例的皮克林乳液。取新鲜制备的不同油相比例的皮克林乳液 5 mL 至激光粒度分布仪的样品池中, 测定 $D_{3,2}$ 值。

1.3.8 不同油相比例下皮克林乳液乳析指数的测定

制备所得不同油相比例下皮克林乳液静置 2 h 后, 测定步骤同 1.3.6。

1.3.9 不同盐离子浓度下皮克林乳液粒径的测定

固定水油两相总体积为 10 mL, 固定油相比例为 30%, 设定浓度为 5.00% 的小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒作为水相, 以 10000 r/min 速度均质 3 min 后, 分别加入 0、10、50、100、150、200、250、300、500 mmol/L 的 NaCl 溶液得到不同盐离子浓度下的皮克林乳液。取新鲜制备的不同盐离子浓度的皮克林乳液 5 mL 至激光粒度分布仪的样品池中, 测定 $D_{3,2}$ 值。

1.3.10 不同储藏时间条件下皮克林乳液粒径的测定

固定水油两相总体积为 10 mL, 固定油相比例为 30%, 设定浓度为 5.00% 的小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒

作为水相, 以 10000 r/min 速度均质 3 min 后, 置于恒温恒湿培养箱(温度 25°C、相对湿度 35%)中进行储藏实验, 分别放置 1、7、14、21、30、37、44、60 d 以得到不同储藏时间的皮克林乳液。分别移取不同储藏时间的皮克林乳液 5 mL 至激光粒度分布仪的样品池中, 测定 $D_{3,2}$ 值。

1.3.11 皮克林乳液激光共聚焦的测定

用激光共聚焦显微镜观察连续相复合纳米颗粒稳定皮克林乳液的方式, 测定方法如下: 分别移取 1 mL 新鲜皮克林乳液及储藏 60 d 的皮克林乳液置于 1.5 mL 离心管中, 分别在两份待测样品中先后滴入 20 μ L 0.1% ($m:V$) 的 FITC 和 20 μ L 0.1% ($m:V$) 的罗丹明 B 染料并涡旋振荡以混合均匀, 移取 200 μ L 染色后的皮克林乳液滴于载玻片上, 缓慢盖上盖玻片并用指甲油封片后静置 2 min, 待指甲油干燥后置于激光共聚焦显微镜载物台上进行形貌观察。分别设定双通道激发波长为 552 nm 和 488 nm, 获得单通道及双波长的复合图。

1.3.12 负载丁香酚的皮克林乳液的抗菌能力测定

首先, 将保存于甘油中的大肠杆菌活化后按照生长曲线于 180 r/min 的气浴摇床中进行菌种培养, 其中, 选取液体 LB 作为大肠杆菌的培养基, 根据对数生长曲线在 2.5 h 取出作为待测菌悬液。其次, 分别将 1.500、1.000、0.500、0.250、0.125、0.062、0.031、0.016 mg/mL 质量浓度的小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒及其稳定的皮克林乳液加入固体 LB 培养基中, 并于室温下凝固 10 min。固化后, 移取 100 μ L 菌悬液涂布于培养基表面并在 37°C 下培养 24 h, 以肉眼可见的菌落时所用样品浓度为最小抑菌浓度^[17-18]。

1.4 数据处理

以上实验均重复测定 3 次, 并用标准差对数据进行平均数分析。利用 SPSS 26.0 软件对所得实验数据进行统计学分析, 采用 Duncan 检验法进行显著性分析。所有图形均由 Origin 2013 软件进行绘制分析。

2 结果与分析

2.1 皮克林乳液的类型

从图 1 可以看出, 待测皮克林乳液滴入水相中呈现连续均一状, 滴入油相中呈独立球型液滴状, 该结果表明, 小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒稳定的皮克林乳液为水包油型(O/W)型。

2.2 不同小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒浓度对皮克林乳液的影响

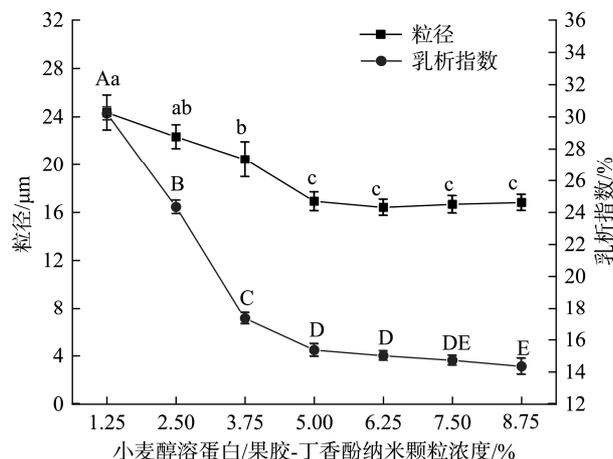
如图 2 所示, 当小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒浓度为 1.25% 时, 皮克林乳液体系的 $D_{3,2}$ 值为 24.35 μ m; 随着浓度的升高, 乳液体系的 $D_{3,2}$ 值逐渐减小, 当浓度为 5.00% 时乳液体系粒径显著 ($P < 0.05$) 下降至 16.92 μ m。皮克林乳液粒径的变化表明, 随着排列和堆积在水油两相之间



图 1 皮克林乳液类型判断
Fig.1 Type of Pickering emulsion

的小麦醇溶蛋白/果胶纳米颗粒数量的增多, 更多的油相分子在得到稳定剂的稳定后, 有效降低了体系粒径值, 也提高了乳液的稳定性^[19]。当浓度高于 5.00% 时, 乳液粒径无显著变化, 但随着浓度增大至 8.75% 时粒径略有升高。该结果表明当纳米颗粒数量达到可以稳定油水两相所需颗粒浓度时, 皮克林乳液粒径将趋于平稳, 此时纳米颗粒已稳定存在于油水两相间且未吸附的纳米颗粒数逐渐变少。而当浓度继续升高时, 过量的纳米颗粒易聚集于界面层使得界面膜增厚, 粒径稍有回升。该结果与 LIN 等^[20]研究结果一致, 随着纳米颗粒浓度的增大, 均质过程中所形成的界面面积增大且皮克林乳液液滴增多, 因此更多的纳米颗粒将吸附于油滴表面形成稳定状态。

从图 2 中还可以看出, 随着复合纳米颗粒浓度增大至 5.00% 时, 皮克林乳液乳析指数从 30.21% 显著 ($P < 0.05$) 降低至 15.25%, 即乳液的稳定性逐渐加强; 此时再增大浓度, 乳液乳析指数虽有所降低但变化较小。该结果表明, 当复合纳米颗粒浓度较低时, 不足以在水油两相界面形成完整的界面膜以稳定油滴颗粒。而随着复合纳米颗粒数量的增大, 可通过分子间重排的方式形成空间位阻, 形成较厚的稳定的界面膜, 有效抑制油相颗粒在体系中的聚集。结合斯托克斯定律分析可得, 随着复合纳米颗粒浓度的增加, 过剩的纳米颗粒在连续相中有效提高了体系黏度, 且由于连续相中未吸附于界面上的粒子的存在, 形成了粒子与液滴间的三维网状结构, 有效减小乳析指数^[19,21]。此外, 复合纳米颗粒环绕于油滴表面, 可有效增加油滴密度, 使得连续相与油相间的密度差降低, 有效提高乳液稳定性。该结果与 LI 等^[22]研究表明, 玉米醇溶蛋白稳定皮克林乳液时, 连续相浓度越高, 乳液的抗分层稳定性显著增强的结果相一致。



注: 图中相同字母代表差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

图 2 不同小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒浓度对皮克林乳液粒径及乳析指数的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of gliadin/pectin-eugenol nanoparticles on the particle size and the creaming stability of Pickering emulsions

2.3 不同油相比对皮克林乳液的影响

从图 3 中可以看出, 随着皮克林乳液体系中的油相比降低, 乳液粒径 $D_{3,2}$ 值下降至 $6.32 \mu\text{m}$ 。体系粒径的改变可能是因为当纳米颗粒稳定剂数量增多时, 粒子会持续吸附并锚定于油水两相界面间, 直至达到平衡, 固体颗粒所产生的空间保护层也会逐渐变厚, 可有效抑制油相粒子的聚集^[23]。而当油相比高于 60% 时, 无法完全形成皮克林乳液, 体系粒径变大, 且不稳定, 易产生奥式熟化及析油现象。这是由于复合纳米颗粒无法形成完整的界面保护层, 因此乳液液滴只能通过聚结以获得合适的界面颗粒覆盖密度。陈雨桐^[24]用纳米颗粒稳定皮克林乳液时则表明, 油相体积分数的增大使得单位油滴的蛋白可利用度减小, 进而导致乳液液滴粒径变大, 破坏体系稳定性, 与本研究结果相一致。

此外, 图 3 中不同油相比对皮克林乳液乳析指数的影响实验数据显示, 当油相比为 10% 时, 体系中的油相液滴分子较少, 与此同时, 连续相中的纳米颗粒数量远远大于稳定油相液滴所需要的量, 过剩的纳米颗粒悬浮于连续相中, 具体体现为乳析指数较高, 达 35.41%。当油相比增大至 60% 时, 皮克林乳液的乳析指数逐渐减小至 9.47%, 表明纳米颗粒吸附于油滴外层的界面膜逐渐增厚, 且可有效覆盖油相少的体系中的小油滴, 而相邻油滴之间吸附的纳米颗粒表面电荷也以静电排斥作用将油滴分开, 并保持乳液体系可长时间处于动力学平衡状态下, 而油相颗粒也逐渐被水相中纳米颗粒包裹并形成稳定且具有一定黏度的皮克林乳液^[25]。但当油相比超过 70% 时无法完全形成皮克林乳液, 因此乳析指数不好测量。综上所述, 当

油相比例不超过 60% 时可形成稳定皮克林乳液的这一实验结果, 与 YUE 等^[26]研究发现结果相一致, 表明小麦醇溶蛋白/果胶复合纳米颗粒有望作为皮克林乳液高内相乳液的优良稳定剂, 可通过制备形成储油能力较强的油相凝胶以替代传统脂肪, 可有效减少有害脂肪和反式脂肪酸的摄入, 降低患心脑血管类疾病的风险。

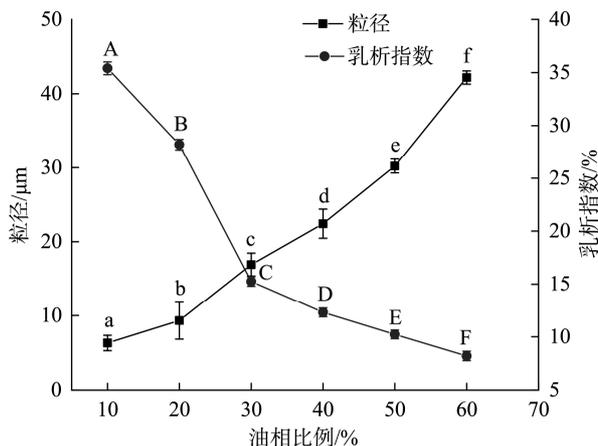


图 3 不同油相比对皮克林乳液粒径和乳析指数影响

Fig.3 Effects of different oil fractions on the particle size and the creaming stability of Pickering emulsions

2.4 不同盐离子浓度对皮克林乳液粒径的影响

如图 4 所示, 皮克林乳液的 $D_{3,2}$ 值随着盐离子浓度的增大上升至 76.19 μm 。当盐离子浓度低于 250 mmol/L 时, 对乳液体系粒径影响较小。该结果表明, 纳米颗粒与油相液滴间的相互作用力可有效抵御 250 mmol/L 的盐离子浓度对乳液的干扰。这可能是由于果胶的侧链结构与小麦醇溶蛋白形成一定的空间位阻, 促进复合纳米颗粒与油相液滴形成稳定结构, 且溶液中的电荷不足以打破纳米颗粒吸附于水

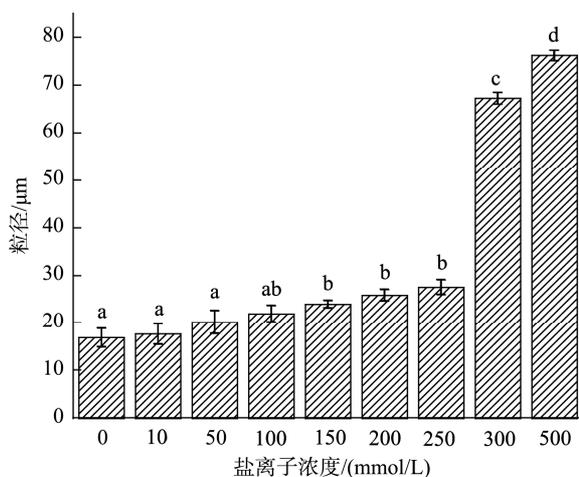


图 4 不同盐离子浓度对皮克林乳液粒径影响

Fig.4 Effects of the different salt ion concentrations on the particle size of Pickering emulsions

油两相界面的作用力, 即液滴间的相互作用大于盐离子作用对乳液体系的破坏, 因此乳液体系未受显著影响^[27]。但当进一步提高盐离子浓度至 500 mmol/L 时, 溶液中电荷的增大降低了纳米颗粒的两亲性和乳化性使得形成液滴间界面膜的作用力被破坏, 产生电荷屏蔽作用, 体系容易发生盐析现象, 进而使得油滴间发生的聚结现象逐渐严重, 易出现桥状絮凝^[28]。

2.5 不同储藏时间对皮克林乳液的影响

2.5.1 不同储藏时间对皮克林乳液粒径的影响

如图 5 所示, 在 60 d 的储藏时间内, 皮克林乳液颗粒未有显著变化 ($P > 0.05$), $D_{3,2}$ 在 15~25 μm 之间。该实验结果表明小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒稳定的皮克林乳液储藏稳定性较好, 单个油滴被纳米颗粒在水油界面形成的三维网络状结构稳定住, 阻碍了油滴分子间的聚集和碰撞, 使得皮克林乳液具有较好的储藏稳定性。

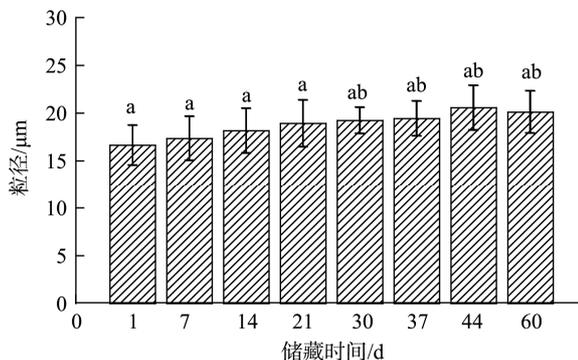


图 5 不同储藏时间对皮克林乳液粒径影响

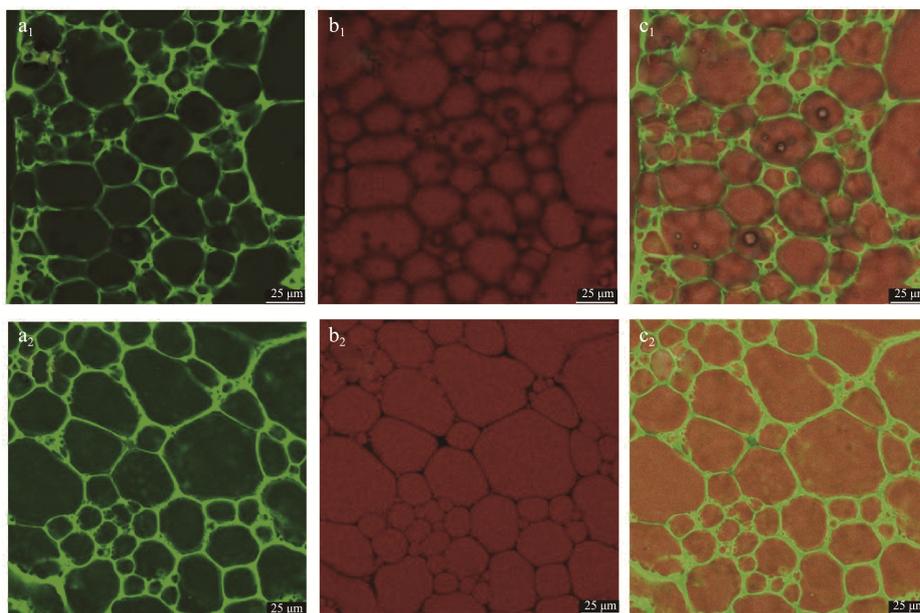
Fig.5 Effects of the different storage times on the particle size of Pickering emulsions

2.5.2 不同储藏时间对皮克林乳液激光共聚焦的影响

如图 6 所示, 分别选取新鲜制备的和 60 d 的小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒稳定的皮克林乳液进行激光共聚焦观察和测定。使用 FITC 标记复合纳米颗粒为绿色, 尼罗红标记作为油相的大豆油。光学照片显示, 经过 60 d 的储藏实验, 皮克林乳液均未发生析水、析油现象, 且乳析指数未有显著变化。激光共聚焦显示, 红色的油相液滴被绿色的连续相颗粒包围, 且油相液滴间无聚集且连接紧密, 这说明吸附于油水界面间的复合纳米颗粒的堆积密度足以形成机械屏障, 可一定程度上维持稳定的三维网络状结构, 进而实现乳液体系的空间稳定。此外, 微观结构图也符合 2.5.1 中的粒径结果。WU 等^[29]研究表明, 纳米颗粒以液桥的方式稳定吸附于水油两相界面, 并形成有一定厚度的界面吸附膜, 其不可逆性吸附使得形成的皮克林乳液液滴稳定性能有较大的提高这一点, 也佐证了本研究中储藏 60 d 的皮克林乳液储藏稳定性较好的实验结果。

2.6 抗菌性实验

采用二倍稀释法对抑菌情况进行分析。实验结果表明, 丁香酚对大肠杆菌的最小抑菌浓度为 0.25 mg/mL, 小麦醇



注: a₁: 新鲜制备的皮克林乳液 FITC 染小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒; b₁: 尼罗红染油相; c₁: 复合图; a₂: 储藏 60 d 的皮克林乳液 FITC 染小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒; b₂: 尼罗红染油相; c₂: 复合图(图中标尺为 25 μm)。

图 6 不同储藏时间的皮克林乳液激光共聚焦图

Fig.6 Laser confocal diagram of Pickering emulsions with different storage time

溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒最小抑菌浓度为 0.50 mg/mL, 是丁香酚的最小抑菌浓度的两倍。这可能是由于果胶通过静电相互作用与小麦醇溶蛋白结合, 有效延缓了丁香酚的释放速率, 因此需要提高复合纳米颗粒浓度才能实现丁香酚的控释, 及对大肠杆菌的抑制作用。该研究结果与 ZHANG 等^[30]研究百里香油-玉米醇溶蛋白复合物对于百里香酚的抑菌作用时结果相似, 即外层核壳结构的形成一定程度上延缓了丁香酚与大肠杆菌的接触面, 且降低接触时间, 可通过提高复合纳米颗粒浓度以达到与百里香油相同的抑菌效果。同时, 皮克林乳液的最小抑菌浓度为 1.00 mg/mL, 是小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒最小抑菌浓度的两倍。该结果可能是由于纳米颗粒稳定的位于油水界面, 形成的界面膜对丁香酚起到长效缓释和保护作用, 降低丁香酚与大肠杆菌的接触几率^[31], 因此, 需较高浓度的皮克林乳液才可有效抑制大肠杆菌的生长。

3 结 论

本研究采用反溶剂法制备的小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒以稳定皮克林乳液, 当负载丁香酚的小麦醇溶蛋白/果胶纳米颗粒浓度达 5.00%以上, 油相比比例不超过 60%, 盐离子浓度低于 250 mmol/L, 储藏时间 60 d 以内时, 制备所得皮克林乳液具有较好的 pH 稳定性、盐离子耐受性、储藏稳定性。当复合纳米颗粒质量浓度过低, 油相比比例、盐离子浓度较高时, 皮克林乳液稳定性较差。

本研究用小麦醇溶蛋白/果胶-丁香酚纳米颗粒代替传

统表面活性剂, 有效解决了传统乳液稳定性差、安全性低及生物不相容性等问题, 为丁香酚等疏水性药物的运载提供了新思路。与此同时, 复合果胶后的小麦醇溶蛋白纳米颗粒, 可对丁香酚有较好的保护作用 and 控释能力, 使得其在食品的抗菌保鲜方面很有应用前景。在减缓脂质氧化方面, 负载丁香酚的复合纳米颗粒形成的壳层具有屏障效果, 且界面处有抗氧化剂的分布, 所以其稳定的皮克林乳液具有比普通乳液更强的稳定性和抗氧化能力。此外, 食品级皮克林乳液可替代传统脂肪, 在减少有害脂肪和反式脂肪酸的摄入方面具有重要意义。在应用方面, 可以进一步深入探讨生物活性物质的缓释性能以及复合纳米颗粒稳定皮克林乳液的相互作用机制, 盘活小麦等粮食资源的同时, 有利于丁香酚抗菌、抗氧化等功能性产品的研发。

参考文献

- [1] MARCELLO S. Formation and characterization of zein-caseinate-pectin complex nanoparticles for encapsulation of eugenol [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2018, 89: 596–603.
- [2] 邢承宇. 精油纳米颗粒的制备及抑菌活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
XING CY. Preparation and antifungal activity of essential oil-loaded nanoparticle [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [3] 蔡哲. 基于玉米醇溶蛋白/壳聚糖的抗菌体系构建表征及应用[D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
CAI Z. Construction, characterization and application of antibacterial system based on zein/chitosan [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.
- [4] 刘瑞琦, 唐文婷, 蒲传奋. 玉米醇溶蛋白肽-丁香酚纳米复合粒子稳定的皮克林乳液的制备及性质[J]. *粮食与油脂*, 2019, 32(3): 45–49.
LIU RQ, TANG WT, PU CF. Preparation and properties of Pickering

- emulsion stabilized by zein peptideeugenol nanocomposite particle [J]. *Cere Oils*, 2019, 32(3): 45–49.
- [5] XU W, SUN H, KANG MY, *et al.* Ethanol-tolerant pickering emulsion stabilized by gliadin nanoparticles [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, 162: 113440.
- [6] 吴滋灵, 尹寿伟, 党华. 高内相 Pickering 乳液荷载生物活性物质的构建[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(8): 3367–3373.
WU ZL, YIN SW, DANG H. Fabrication of high internal phase Pickering emulsion loaded with bioactive substances [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(8): 3367–3373.
- [7] 张羽. 基于玉米醇溶蛋白/大米淀粉构建皮克林乳液及其营养输送特性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
ZHANG Y. Construction of Pickering emulsion based on zein/rice starch and research of its nutrient delivery characteristics [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021.
- [8] ZHENG JY, ZHAO L, YI JJ, *et al.* Chestnut starch nanocrystal combined with macadamia protein isolate to stabilize pickering emulsions with different oils [J]. *Foods*, 2022, 11(21): 3320.
- [9] FAN YT, LUO DX, YI J. Resveratrol-loaded α -lactalbumin-chitosan nanoparticle-encapsulated high internal phase Pickering emulsion for curcumin protection and its *in vitro* digestion profile [J]. *Food Chem*, 2022, 15: 100433.
- [10] LEI L, CHEN YL, ZHU CH, *et al.* The novel pickering emulsion gels stabilized by zein hydrolysate-chitin nanocrystals coacervates: Improvement on stability and bioaccessibility for curcumin [J]. *Food Res Int*, 2022, 161: 111877.
- [11] CHENG C, GAO Y, WU ZH, *et al.* Gliadin nanoparticles Pickering emulgels for β -carotene delivery: Effect of particle concentration on the stability and bioaccessibility [J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4188.
- [12] LI J, XU X, CHEN ZX, *et al.* Zein/gum arabic nanoparticle-stabilized Pickering emulsion with thymol as an antibacterial delivery system [J]. *Carbohydrate Polym*, 2018, 200: 416–426.
- [13] WU XC, HU QY, LIANG XR, *et al.* Fabrication of colloidal stable gliadin-casein nanoparticles for the encapsulation of natamycin: Molecular interactions and antifungal application on cherry tomato [J]. *Food Chem*, 2022, 391: 133366.
- [14] 李文婧. 醇溶蛋白/原花青素/果胶复合纳米颗粒稳定 Pickering 乳液的制备及其负载姜黄素的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
LI WJ. Pickering emulsions stabilized by zein-proanthocyanidins-pectin composites and its application for curcumin loading [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2022.
- [15] REN GR, ZHU Y, SHI JY, *et al.* Fabrication of antioxidant pickering emulsion ased on resveratrol-grafted zein conjugates: Enhancing the physical and oxidative stability [J]. *Foods*, 2022, 11(23): 3851.
- [16] 龚穗菁. 玉米醇溶蛋白纳米颗粒和纤维素纳米晶协同稳定的皮克林双重乳液[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
GONG SJ. Pickering double emulsion synergistically stabilized by zein nanoparticles and cellulose nanocrystals [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [17] ANDRE L, FERREIRA C, IVES C, *et al.* Chitosan-coated zein nanoparticles containing eugenol potentiates anesthesia in Nile tilapia [J]. *Aquaculture*, 2020, 529: 735659.
- [18] 杨伟枫. 丁香酚/柠檬醛双层纳米乳液的制备及其在草莓保鲜中的应用[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
YANG WC. Preparation of double-layer nanoemulsion of eugenol/citral and its application in strawberry preservation [D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [19] ZHOU FZ, YU XH, LUO DH, *et al.* Pickering water in oil emulsions prepared from biocompatible gliadin/ethyl cellulose complex particles [J]. *Food Hydrocolloid*, 2023, 134: 108050.
- [20] LIN JW, MENG HC, YU SJ, *et al.* Genipin-crosslinked sugar beet pectin-bovine serum albumin nanoparticles as novel pickering stabilizer [J]. *Food Hydrocolloid*, 2021, 112: 106306.
- [21] SHEN C, CHEN WQ, LI CZ, *et al.* Pickering emulsion stabilized by gliadin/soybean polysaccharide composite colloidal nanoparticle: Physicochemical properties and its application on washing of fresh-cut cabbage [J]. *Food Res Int*, 2022, 161: 111886.
- [22] LI WJ, HUANG DJ, SONG WX, *et al.* Pickering emulsions stabilized by zein-proanthocyanidins-pectin ternary composites (ZPAAPs): Construction and delivery studies [J]. *Food Chem*, 2022, 404(Pt B): 134642.
- [23] WANG Y, XU JY, LIN W, *et al.* Citral and cinnamaldehyde-Pickering emulsion stabilized by zein coupled with chitosan against *Aspergillus*. spp and their application in food storage [J]. *Food Chem*, 2023, 403: 134272.
- [24] 陈雨桐. 小麦醇溶蛋白/单宁酸复合物稳定的皮克林乳液体系的构建及应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
CHEN YT. Fabrication of Pickering emulsion system stabilized by gliadin/tannic acid complexes and its application [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [25] 杨婷婷, 任李顺, 陈光未, 等. 玉米醇溶蛋白负载植物甾醇纳米颗粒的制备及性能[J/OL]. *食品科学*: 1-18. [2023-03-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221101.1621.024.html>
YANG TT, REN LS, CHEN GW, *et al.* Preparation and properties of zein loaded phytosterol nanoparticles [J/OL]. *Food Sci*: 1-18. [2023-03-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221101.1621.024.html>
- [26] YUE YK, YANG Z, XIN JJ, *et al.* Fabrication and stabilization mechanisms of Pickering emulsions based on gliadin/arabinoxylan complexes [J]. *Food Chem*, 2022, 393: 133458.
- [27] TENG F, HE MY, XU JW, *et al.* Effect of ultrasonication on the stability and storage of a soy protein isolate-phosphatidylcholine nanoemulsions [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14010.
- [28] LIN JW, MENG HC, YU SJ, *et al.* Genipin-crosslinked sugar beet pectin-bovine serum albumin nanoparticles as novel pickering stabilizer [J]. *Food Hydrocolloid*, 2021, 112: 106306.
- [29] WU XC, HU QY, LIANG XR, *et al.* Fabrication of colloidal stable gliadin-casein nanoparticles for the encapsulation of natamycin: Molecular interactions and antifungal application on cherry tomato [J]. *Food Chem*, 2022, 391: 133288.
- [30] ZHANG YQ, NIU YG, LUO YC, *et al.* Fabrication, characterization, and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers [J]. *Food Chem*, 2013, 246: 269–275.
- [31] 杨露, 覃书漫, 李志洪, 等. 丁香酚对解淀粉芽孢杆菌气液界面生物膜的抑制作用[J]. *食品科学技术学报*, 2023, 41(1): 88–98.
YANG L, QIN SM, LI ZH, *et al.* Inhibitory effect of eugenol on biofilm of bacillus amyloliquefaciens formed at air-liquid interface [J]. *J Food Sci Technol*, 2023, 41(1): 88–98.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



许雪儿, 硕士, 讲师, 主要研究方向为粮食精深加工。

E-mail: 464538173@qq.com