

核桃蛋白-低聚半乳糖复合纳米颗粒的制备及其 Pickering 乳液性质

刘炯娜¹, 张丹¹, 蒋雨心¹, 范方宇^{1,2,3*}

(1. 西南林业大学 生命科学学院, 云南 昆明 650224; 2. 西南地区生物多样性保育国家林业和草原局重点实验室, 云南 昆明 650224; 3. 云南省森林灾害预警与控制实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: 以核桃蛋白 (WalPI) 和低聚半乳糖 (GOS) 为原料, 采用 pH 循环-超声联合制备了 WalPI-GOS, 将其与茶油混合, 制备了 Pickering 乳液。通过 FTIR、纳米粒度及 Zeta 电位仪、紫外-可见分光光度计、荧光分光光度计、DSC 对 WalPI-GOS 进行了表征, 考察了 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 对 WalPI-GOS 颗粒特性及 Pickering 乳液性质的影响。结果表明, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 4$ 时, WalPI-GOS 和 Pickering 乳液具有最佳的性能。WalPI-GOS 的平均粒径为 82.08 nm, Zeta 电位为 -52.37 mV, 乳化活性、乳化稳定性为 $31.12 \text{ m}^2/\text{g}$ 和 4346.35 min; WalPI 部分疏水基团被包埋于 WalPI-GOS 分子内部, 降低了表面疏水性 (840.81 a.u.), 提高了游离巯基含量 ($8.78 \mu\text{mol}/\text{g}$) 和熔融温度 ($93.74 \text{ }^\circ\text{C}$); WalPI 与 GOS 的复合改变了 WalPI 的二级和三级结构, 形成以 β -折叠为主的二级结构, WalPI 与 GOS 通过氢键、静电相互作用和疏水相互作用形成紧密的网络结构; Pickering 乳液平均粒径仅为 $5.24 \mu\text{m}$, 液滴均匀分布, 形成了弹性凝胶网络结构; 当剪切速率为 0.1 s^{-1} 时, 具有最高的表观黏度 ($1.06 \text{ Pa}\cdot\text{s}$)。WalPI 与 GOS 间的高交联密度增强了 Pickering 乳液的凝胶网络结构。

关键词: 核桃蛋白; 低聚半乳糖; 复合纳米颗粒; Pickering 乳液; 稳定性; 食品用化学品

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2024) 07-1590-09 开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Preparation of walnut protein isolate-galactooligosaccharides composite nanoparticles and properties of their Pickering emulsion

LIU Jiongn¹, ZHANG Dan¹, JIANG Yuxin¹, FAN Fangyu^{1,2,3*}

(1. College of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Biodiversity Conservation in Southwest China, Kunming 650224, Yunnan China; 3. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: Walnut protein-galactooligosaccharides (WalPI-GOS) composite nanoparticles were synthesized from WalPI and GOS by pH cycling and ultrasound, characterized by FTIR, nanoparticle size and Zeta potentiometer, ultraviolet-visible spectrophotometer, fluorescence spectrophotometer and DSC, and then mixed with tea oil to obtain Pickering emulsions. The effects of $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ on the properties of WalPI-GOS and Pickering emulsion were further investigated. The result showed that the WalPI-GOS composite nanoparticles and Pickering emulsion exhibited the best properties when $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 4$. The WalPI-GOS composite nanoparticles displayed an average particle size, Zeta potential, emulsifying activity index and emulsion stability index of 82.08 nm, -52.37 mV, $31.12 \text{ m}^2/\text{g}$, and 4346.35 min, respectively. The embedding of partial WalPI hydrophobic groups in WalPI-GOS molecules led to reduction in the surface hydrophobicity of WalPI-GOS (840.81 a.u.) and increment in the free sulfhydryl

收稿日期: 2023-09-08; 定用日期: 2023-10-24; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230754

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760470); 云南省“兴滇英才支持计划”青年人才专项资助项目 (YNWR-QNBJ-2018-046)

作者简介: 刘炯娜 (1998—), 女, 硕士生, E-mail: 2715537052@qq.com. 联系人: 范方宇 (1979—), 男, 教授, E-mail: ffy118@163.com.

content (8.78 $\mu\text{mol/g}$) as well as melting temperature (93.74 $^{\circ}\text{C}$). The complexation of WalPI and GOS changed the secondary and tertiary structure of WalPI and formed a secondary structure dominated by β -folding. WalPI and GOS formed a compact network structure by hydrogen bonding, electrostatic interaction, and hydrophobic interaction. Pickering emulsion exhibited a particle size of only 5.24 μm , uniform droplet distribution, and an elastic gel network structure, while displayed the highest apparent viscosity of 1.06 Pa·s at a shear rate of 0.1 s^{-1} . The high cross-linking density between WalPI and GOS enhanced the gel network structure of Pickering emulsion.

Key words: walnut protein isolate; galactooligosaccharides; composite nanoparticles; Pickering emulsions; stability; food chemicals

蛋白质具有两亲性、构象可调节性、生物相容性和可降解性等特点,是潜在的食品级乳化剂。核桃粕为核桃加工副产物,蛋白质含量高于 50%,但其综合利用率较低,导致了蛋白资源的浪费^[1]。研究^[2]表明,pH 循环-超声联合制备的核桃蛋白纳米颗粒可作为乳化剂稳定 Pickering 乳液,由于超声的空化效应和机械剪切可促进蛋白质结构展开,削弱蛋白质分子间的非共价相互作用,促进其与多糖相互作用,强烈的空化效应还可以使蛋白质断裂,减小其粒径。与单一 pH 循环相比,pH 循环-超声联合制备的蛋白纳米颗粒粒径更小、溶解性和表面疏水性更高^[3]。但以此制备的 Pickering 乳液在中性条件下稳定性较差^[2]。与多糖和蛋白质相比,蛋白质-多糖复合颗粒具有良好的乳化性和较强的空间稳定性,是制备 Pickering 乳液的理想乳化剂。蛋白质-多糖复合颗粒吸附于油-水界面时,分散液滴周围形成黏弹性薄膜,可提高乳液抵抗机械应力的能力和空间稳定性^[4-5]。YILDIZ 等^[6]采用 pH 循环-超声联合制备大豆分离蛋白(SPI)-淀粉复合颗粒时发现,SPI 的乳化性和溶解性(等电点附近溶解性良好)得到提高,复合颗粒乳液稳定,油脂氧化程度低。

低聚半乳糖(GOS)作为功能性寡糖,不被人体消化吸收,可促进肠道益生菌增殖代谢,具有调节脂质代谢、提高机体免疫力和促进钙吸收等作用^[7]。研究^[8]表明,通过湿法糖基化制备蛋白质-GOS 复合物可提高蛋白质的乳化性和稳定性,蛋白质与 GOS 发生共价交联形成致密有序的凝胶网络结构,增强了疏水相互作用和二硫键作用。赵晨宇等^[9]通过湿法糖基化改性 SPI 制备 SPI-GOS,显著提高了 SPI 的溶解度与乳化性($P < 0.05$),增强了乳液稳定性。但湿法糖基化改性蛋白质易受反应时间、温度及相对湿度等因素的影响,且其反应可控性差,极易发生 Maillard 反应高级阶段,产生大量副产物,从而限制了其工业化应用^[10]。目前,通过 pH 循环-超声联合制备核桃蛋白-低聚半乳糖非共价复合纳米颗粒(WalPI-GOS),并以 WalPI-GOS 为乳化剂制备 Pickering 乳液的研究鲜有报道

本文拟以 WalPI 和 GOS 为原料,采用 pH 循环〔先将 WalPI (pH 7.0) 溶于水调 pH 至 11.5 使其充分展开后,使用 D-葡萄糖酸- δ -内酯(GDL)调 pH 至 7.0〕超声联合制备 WalPI-GOS,研究 WalPI 和 GOS 质量比对 WalPI-GOS 粒径、Zeta 电位、乳化性和表面疏水性等的影响,揭示 WalPI 和 GOS 间相互作用力。同时,以 WalPI-GOS 为乳化剂制备 Pickering 乳液,探究 WalPI 和 GOS 质量比对 Pickering 乳液性质的影响,以期核桃蛋白和功能性食品的开发利用提供新思路及理论参考。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

WalPI 固体颗粒,参照文献[2]方法自制(pH=7.0,其中蛋白质质量分数 80.17%,灰分质量分数 2.22%,水质量分数 7.83%,脂肪质量分数 0.87%);茶油,益海嘉里食品营销有限公司;GDL、2-硝基苯甲酸(DNTB)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na),上海麦克林生化科技股份有限公司;十二烷基磺酸钠(SDS),天津市风船化学试剂科技有限公司;8-苯氨基-1-萘磺酸盐(ANS)、GOS,上海源叶生物科技有限公司;所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Nano-ZS 型纳米粒度及 Zeta 电位仪,英国 Malvern 公司;UV-2600 型紫外-可见分光光度计、IR Prestige-21 型傅里叶变换红外光谱仪、RF-5301PC 型荧光分光光度计,日本 Shimadzu 公司;FJ200-SH 型数显高速分散均质机,上海沪析实业有限公司;LA-960V2 型激光粒度仪,日本 Horiba 公司;HR 20 Discovery 型混合型流变仪,美国 TA Instruments 公司;3500 Sirius 型差示扫描量热仪,德国 Netzsch 公司;SK2009 光学显微镜,深圳赛克电子科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 WalPI-GOS 的制备

基于本课题组方法^[2]制备 WalPI-GOS:分别制

备质量浓度 20 g/L 的 WalPI 水溶液 (用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 至 11.5) 和质量浓度 2、4、6、8、10 g/L 的 GOS 水溶液, 各自在室温搅拌 4 h (200 r/min); 将 WalPI 水溶液与 GOS 水溶液等体积混合, 保持 WalPI 质量浓度恒定为 10 g/L, 调节 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 为 10 : 0、10 : 1、10 : 2、10 : 3、10 : 4 和 10 : 5。用浓度 1 mol/L 的 NaOH 水溶液调混合液 pH 至 11.5, 室温搅拌 3 h 后, 冰浴超声 (570 W, 25 kHz) 破碎 5 min, 静置 1 h; 用质量分数 10% 的 GDL 溶液调 pH 至 7.0, 12000 r/min 离心 15 min, 上清液透析 (截留相对分子质量为 3500) 48 h, 取袋内物冷冻干燥 (-60 °C, 0.06 MPa) 24 h, 即得不同 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 的 WalPI-GOS。

1.3.2 Pickering 乳液的制备

将一定量冻干的 WalPI-GOS 颗粒加入 8.0 mL 去离子水中于 12000 r/min 高速分散 2 min 后得到质量浓度为 20 g/L 的 WalPI-GOS 样品溶液, 缓慢加入 12 mL 茶油, 于 12000 r/min 分散 3 min 后, 冰浴超声 (475 W, 25 kHz) 破碎 4 min, 得 Pickering 乳液^[1]。

1.4 WalPI-GOS 性质测定

1.4.1 粒径、多分散系数和 Zeta 电位测定

用纳米粒度及 Zeta 电位仪测定 WalPI-GOS 的粒径、多分散系数 (PDI) 和 Zeta 电位, 测试温度 25 °C。

1.4.2 乳化活性与乳化稳定性测定

取 100 μL 新鲜 Pickering 乳液, 用质量分数 0.1% 的 SDS 溶液稀释至 300 倍, 以质量分数 0.1% 的 SDS 溶液为空白, 测定稀释后的 Pickering 乳液在 500 nm 处的吸光度 (A_0), 静置 30 min 后再次测其吸光度 (A_{30})。根据公式 (1) 和 (2) 计算乳化活性 (EAI, m^2/g) 与乳化稳定性 (ESI, min)^[1]。

$$\text{EAI} = 2 \times 2.303 \times \frac{A_0 \times N}{\rho \times \varphi \times L \times 10000} \quad (1)$$

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

式中: N 为 Pickering 乳液的稀释倍数, 300; ρ 为蛋白质质量浓度, 0.02 g/mL; φ 为油相体积分数, 60%; L 为比色皿光程, 1 cm; A_0 和 A_{30} 为放置 0、30 min 后的吸光度。

1.4.3 表面疏水性测定

参照 ZHANG 等^[11]方法, 略作修改。将一定量冻干的 WalPI-GOS 颗粒加入到浓度为 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH=7.0) 中得到质量浓度分别为 0.005、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 和 0.5 g/L 的 WalPI-GOS 样液。取 2.0 mL 样液, 加入 40 μL 的 ANS 溶液 (8 mol/L) 混匀, 静置 15 min。用荧光分光光度计在 390 nm 激发波长和 470 nm 发射波长下测定溶液的荧光强度, 狭缝 5 nm。以蛋白质质

量浓度和荧光强度为横、纵坐标作图, 其初始斜率为表面疏水性 (H_0)。

1.4.4 游离巯基含量测定

参照 ZHANG 等^[12]方法, 略作修改。将一定量冻干的 WalPI-GOS 颗粒加入 20 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 PBS (pH 为 8.0, 含 1.0 mmol/L EDTA-2Na 和质量分数 1.0% 的 SDS) 中配成蛋白质量浓度为 3.75 g/L 的 WalPI-GOS 溶液, 于 4000 r/min 离心 15 min。取 1.5 mL 上清液, 加入 1.5 mL 的 PBS (0.1 mol/L, pH 为 8.0) 和 0.05 mL DNTB 溶液 [396 mg DTNB 溶于 0.1 mol/L PBS (pH 为 8.0) 定容至 100 mL] 混匀, 涡旋 1 h 后, 4000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 412 nm 处测定其吸光度, 以蒸馏水代替 DNTB 为空白。按公式 (3) 计算样品中游离巯基含量 ($\mu\text{mol/g}$)。

$$\text{游离巯基含量} = \frac{A_{412} \times D}{\varepsilon \times \rho \times L} \times 10^6 \quad (3)$$

式中: ρ 为蛋白质量浓度, g/L; ε 为 Ellman 的消光系数, 13600 L/(mol·cm); A_{412} 为上清液于 412 nm 处测定的吸光度; L 为光程, 1 cm; D 为稀释倍数, 2.03。

1.4.5 热稳定性测定

采用差示扫描量热仪 (DSC) 分析 WalPI-GOS 的热稳定性。取 2.5 mg 的 WalPI-GOS 于坩埚中, 空坩埚为对照, 测试温度 30~180 °C, 升温速率 10 °C/min, 氮气流速为 20 mL/min。

1.4.6 内源荧光光谱测定

参照 ZHANG 等^[11]方法并稍作修改。取样品溶液进行荧光光谱扫描, WalPI-GOS 质量浓度为 0.02 g/L (溶于 0.01 mol/L PBS, pH 为 7.0)。发射波长 300~500 nm, 激发波长 285 nm。

1.4.7 FTIR 测定

用 FTIR 测定 WalPI-GOS 的结构, 波数范围 4000~400 cm^{-1} , 扫描 32 次, 分辨率为 4 cm^{-1} 。

1.5 Pickering 乳液性质测定

1.5.1 乳液粒径

用激光粒度仪测定 Pickering 乳液的平均粒径与粒径分布, 测试温度 25 °C。

1.5.2 显微结构

采用光学显微镜观察 Pickering 乳液形态, 于 1000 倍下观察并拍照保存。

1.5.3 流变特性

在温度 25 °C、剪切速率 0.1~1000 s^{-1} 的条件下, 用混合型流变仪测定 Pickering 乳液的表观黏度; 振荡频率 0.01~100 Hz, 记录乳液的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'')。

1.6 数据处理与分析

采用 SPSS 22.0 软件处理分析数据, 文中所有图的不同小写字母表示数据差异显著 ($P < 0.05$),

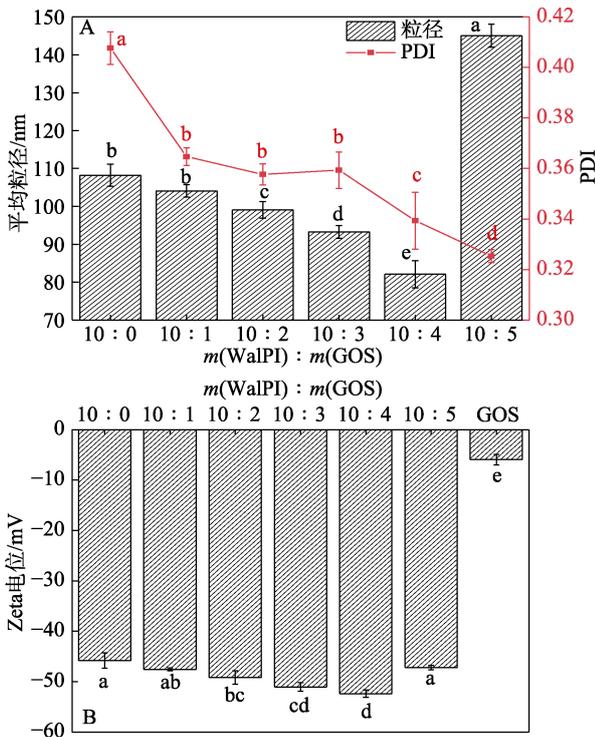
Origin 9.0 软件绘图, 图表中数据为 3 次实验平均值。

2 结果与讨论

2.1 WalPI-GOS 颗粒特性

2.1.1 粒径和 Zeta 电位

图 1 为 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 对 WalPI-GOS 平均粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响。



图中不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 下同

图 1 WalPI 和 GOS 质量比对 WalPI-GOS 平均粒径、PDI (A) 和 Zeta 电位 (B) 的影响

Fig. 1 Effects of mass ratio of WalPI to GOS on average particle size and PDI (A), as well as Zeta potential (B) of WalPI-GOS

从图 1A 可以看出, 随着 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 从 10 : 0 变化至 10 : 5, WalPI-GOS 平均粒径先减小后增大, PDI 总体上减小。当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 4$ 时, WalPI-GOS 平均粒径为 82.08 nm ($P < 0.05$), PDI 为 0.34, 表明 WalPI-GOS 粒径分布范围较窄, 粒径最小。由于 GOS 与 WalPI 通过氢键和疏水相互作用紧密结合, WalPI-GOS 平均粒径要比纯 WalPI [$m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 0$] 减小^[13-14], 同时 GOS 添加量增加, WalPI-GOS 分子间静电斥力增强, 其聚集程度降低, 表现为 PDI 的降低。但随着 GOS 添加量继续增加 [$m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 5$], WalPI-GOS 平均粒径显著增至 145.03 nm ($P < 0.05$), 原因为大分子的空间位阻造成多糖与蛋白质结合位点较少^[15], 多余 GOS 包覆至 WalPI 表面, 导致 WalPI-GOS 结构松散, 颗粒间发生黏连, 粒径增大。

李娜等^[16]也发现类似结果。

从图 1B 可以看出, 除 GOS (-5.96 mV) 外, 所有样品 Zeta 电位绝对值均大于 30 mV, 具有良好的稳定性。随着 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 从 10 : 0 变化至 10 : 5, WalPI-GOS 的 Zeta 电位绝对值先增大后减小, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 4$ 时, Zeta 电位为 -52.37 mV。Zeta 电位可反映颗粒的稳定性, 其绝对值越大颗粒稳定性越高, 同时反映颗粒间的相互作用^[17]。上述结果表明, GOS 添加量的增加增强了 WalPI-GOS 间的静电斥力和体系稳定性, 与粒径结果一致。XU 等^[17]研究表明, 带相同静电荷的生物聚合物可通过表面选择性贴片结合产生静电相互作用。所以, 在 WalPI 与 GOS 复合过程中, 两者间产生静电相互作用, 使 WalPI-GOS 的 Zeta 电位绝对值增大。此外, 在碱性和超声条件下, WalPI 与 GOS 复合, 改变了 WalPI 的构象, 部分极性基团暴露, 增加了极性基团电离过程中分子表面净负电荷和带电残基数量^[18-19]。

2.1.2 EAI 与 ESI 分析

图 2 为 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 对 WalPI-GOS 的 EAI 和 ESI 的影响。

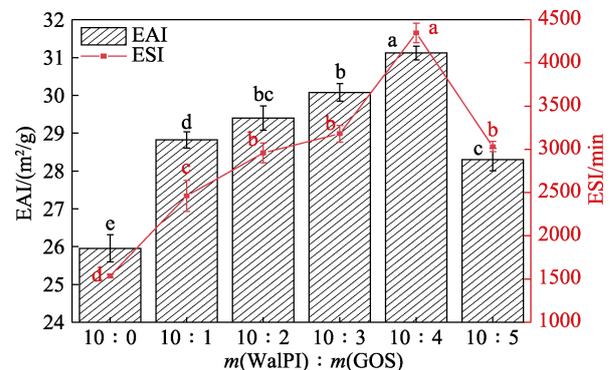


图 2 WalPI 和 GOS 质量比对 WalPI-GOS 的 EAI 和 ESI 的影响

Fig. 2 Effects of mass ratio of WalPI to GOS on EAI and ESI of WalPI-GOS

蛋白质-多糖复合物的乳化能力与其复合状态有关, 其协同吸附可提高蛋白质的乳化能力, 并在油相表面形成弹性膜, 增强乳液稳定性^[4,20]。从图 2 可以看出, 随着 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 从 10 : 0 变化至 10 : 5, WalPI-GOS 的 EAI 和 ESI 均先增大后减小, 但当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 5$ 时, WalPI-GOS 的 EAI 和 ESI 还是均显著高于 10 : 0 时的值 ($P < 0.05$)。这是因为, 亲水性羟基的引入改善了 WalPI 的亲水亲油平衡。当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 4$ 时, WalPI-GOS 的 EAI 和 ESI 分别为 31.12 m²/g 和 4346.35 min ($P < 0.05$)。由于 GOS 的亲水基团吸附于 WalPI 分子内, 二者通过疏水相互作用结合, WalPI 疏水区

域被包埋^[21], 其对油-水和气-液界面的吸附率增加。此外, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 4$ 时, 更多的 GOS 糖基链接枝至 WalPI 内, WalPI-GOS 结构增强, 可紧密吸附于油水界面。而 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 5$ 时 WalPI-GOS 的 EAI 和 ESI 降低, 由于过量多糖使乳液体系黏性增加, 液滴再分散性降低^[22]。

2.1.3 表面疏水性分析

表面疏水性由蛋白质表面与水环境接触的疏水基团数量决定, 其大小与蛋白质结构和乳化特性有关^[23]。图 3 为 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 对 WalPI-GOS 的表面疏水性的影响。

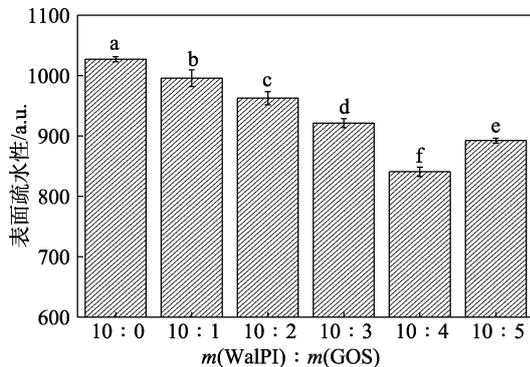


图 3 WalPI 和 GOS 质量比对 WalPI-GOS 表面疏水性的影响

Fig. 3 Effects of mass ratio of WalPI to GOS on surface hydrophobicity of WalPI-GOS

从图 3 可以看出, 随着 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 从 10 : 0 变化至 10 : 5, WalPI-GOS 的表面疏水性先减小后增大, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 4$ 时, 表面疏水性最小, 仅为 840.81 a.u.。这是因为, 一方面, GOS 与 WalPI 相互作用导致 WalPI-GOS 结构紧缩, 将疏水基团包埋于 WalPI-GOS 内部, pH 由 11.5 降至 7.0 时, WalPI 与 GOS 共同折叠, 将部分疏水氨基酸包埋于复合体系中, WalPI 与 GOS 分子间发生疏水相互作用^[24-25]; 另一方面, 多糖可增强蛋白质表面的空间位阻, 将更多表面疏水基团包埋于分子内部, 降低表面疏水性^[26]。丛海花等^[26]发现, 与酶解褐藻寡糖复合后, 鲢肌原纤维蛋白表面疏水性降低, 与本文研究结果一致。

2.1.4 游离巯基含量分析

图 4 为 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 对 WalPI-GOS 的游离巯基的影响。

从图 4 可以看出, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 0$ 时, WalPI-GOS 游离巯基含量为 $1.83 \mu\text{mol/g}$; 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 为 10 : 4 时, 其游离巯基含量显著增至 $8.78 \mu\text{mol/g}$ ($P < 0.05$); 而当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 为 10 : 5 时, 其游离巯基含量增加不显著 ($P > 0.05$)。这是因为, 一方面, 碱性和超声条件下,

蛋白质内部二硫键断裂, 肽链伸展, 其分子内部巯基暴露; 另一方面, 适量多糖可促进蛋白质结构展开, 暴露更多巯基, 而过量添加多糖, 可导致蛋白质与多糖间发生相分离, 促进蛋白质分子间相互交联、聚集, 部分巯基被包埋于分子内部^[23], 所以, 其含量变化不显著 ($P > 0.05$)。徐永霞等^[23]探究酵母 β -葡聚糖添加量对肌球蛋白巯基含量的影响时发现类似结果。

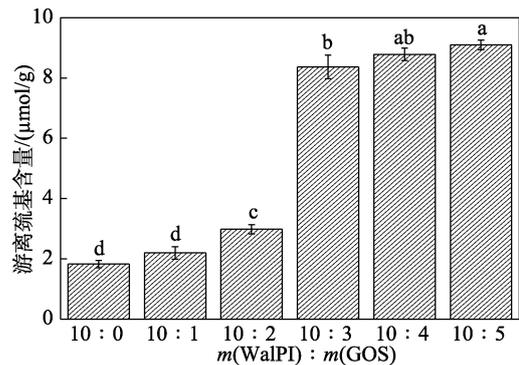
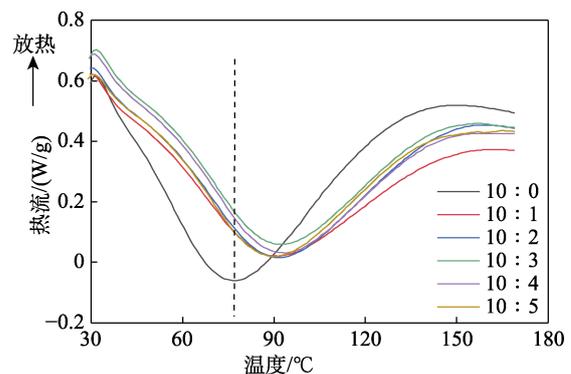


图 4 WalPI 和 GOS 质量比对 WalPI-GOS 游离巯基含量的影响

Fig. 4 Effects of mass ratio of WalPI to GOS on content of free sulfhydryl group in WalPI-GOS

2.1.5 热稳定性分析

DSC 曲线可反映蛋白质-蛋白质、蛋白质-多糖间的相互作用^[27]。图 5 是不同 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 的 WalPI-GOS 的 DSC 曲线。



图例中比例均为 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$, 下同

图 5 WalPI-GOS 的 DSC 曲线

Fig. 5 DSC curves of WalPI-GOS

从图 5 可以看出, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 在 10 : 0~10 : 5 变化时, WalPI-GOS 的熔融温度分别为 76.65、91.70、90.70、92.76、93.74 和 89.72 $^{\circ}\text{C}$, 表明 WalPI 与 GOS 相互作用形成了稳定的网络结构, 提高了 WalPI-GOS 的热稳定性。原因在于, WalPI 与 GOS 结合产生的空间位阻限制了分子链运动^[28], 体系的交联密度增强; 此外, WalPI 与 GOS 间的氢

键作用也限制了蛋白质链的节段迁移率^[29], 进一步增强了 WalPI-GOS 的热稳定性。与 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 0$ 相比, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 4$ 时, WalPI-GOS 熔融温度由 $76.65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增至 $93.74\text{ }^{\circ}\text{C}$, 提高了 $17.09\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。原因在于, GOS 与 WalPI 通过氢键、静电相互作用和疏水相互作用形成稳定的网络结构, GOS 用量增加会导致此网络结构更加紧密, 进而增强 WalPI-GOS 热稳定性。DAI 等^[27]发现, 卵磷脂、玉米醇溶蛋白和姜黄素间的疏水和静电相互作用可提高复合颗粒的热稳定性。而当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 5$ 时, WalPI-GOS 熔融温度降低。原因在于, GOS 添加量过多发生团聚, 因而无法均匀分布于蛋白质表面, 减弱了 WalPI-GOS 的结构, 进而降低其熔融温度。

2.1.6 内源荧光光谱分析

内源荧光光谱可反映蛋白质芳香族氨基酸残基微环境极性变化, 是评价蛋白质三级结构变化的重要方法。图 6 是不同 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 的 WalPI-GOS 内源荧光光谱图。

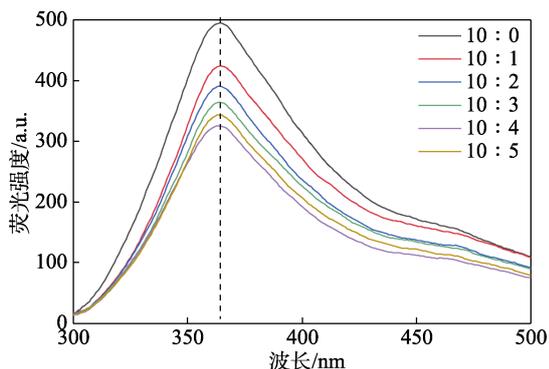


图 6 WalPI-GOS 的内源荧光光谱
Fig. 6 Endogenous fluorescence spectra of WalPI-GOS

从图 6 可看出, 随着 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 从 $10 : 0$ 变化至 $10 : 5$, WalPI-GOS 的荧光强度先下降后上升, 最大发射波长不变 (364 nm)。表明 GOS 与 WalPI 形成非共价复合物, 两者间存在疏水相互作用, 改变了蛋白质三级结构, WalPI 重折叠速率降低, 形成了刚性结构, 导致荧光猝灭, 这与 2.1.4 节结果一致。当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 4$ 时荧光强度最低, 这是因为, WalPI 与 GOS 复合为内源色氨酸残基提供了疏水环境^[30], 蛋白质分子内的荧光基团与多糖作用, 荧光强度降低^[31-32]。此外, 多糖的羟基对荧光也产生屏蔽作用^[33]。

2.1.7 FTIR 分析

图 7 是不同 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 的 WalPI-GOS 的 FTIR 谱图和二级结构。

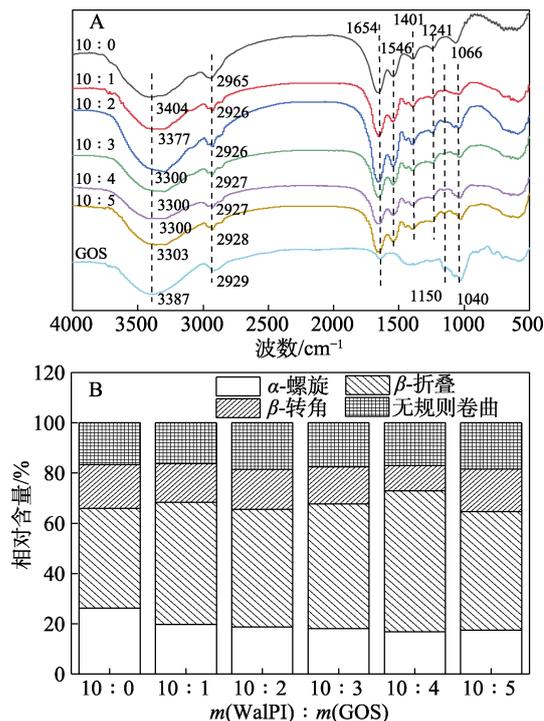


图 7 WalPI 和 GOS 质量比对 WalPI-GOS 的 FTIR 谱图 (A) 和二级结构 (B) 的影响

Fig. 7 Effects of mass ratio of WalPI to GOS on FTIR spectra (A) and secondary structure (B) of WalPI-GOS

从图 7A 可以看出, WalPI-GOS 于 $3000\sim 3600\text{ cm}^{-1}$ 处宽峰为 O—H 键伸缩振动, $2926\sim 2965\text{ cm}^{-1}$ 处峰为 C—H 键伸缩振动。 1654 、 1546 和 1241 cm^{-1} 附近峰分别对应酰胺 I 带 C=O 键伸缩振动、酰胺 II 带 C—N 键的伸缩和 N—H 键的弯曲振动、酰胺 III 带甘氨酸和脯氨酸的—CH₂ 键的弯曲振动^[34]。与 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 0$ 相比, $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 1\sim 10 : 5$ 的 3404 cm^{-1} 峰发生偏移 ($3377\sim 3300\text{ cm}^{-1}$), 酰胺 I ($1654\sim 1646\text{ cm}^{-1}$) 和酰胺 II 带 ($1546\sim 1539\text{ cm}^{-1}$) 峰发生轻微偏移。表明 WalPI 中谷氨酰胺的酰胺基与 GOS 的羟基发生作用形成氢键, 两者发生静电和疏水相互作用^[14,35]。LIU 等^[35]也发现类似结果。此外, 1401 、 1150 、 $1066(1040)\text{ cm}^{-1}$ 处峰与—OH 的弯曲振动、吡喃糖环 C—O 吸收峰、C—O 键伸缩振动有关^[36]。当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 1\sim 10 : 5$ 时, WalPI-GOS 具有 WalPI 和 GOS 的特征峰, 表明 WalPI 与 GOS 间产生相互作用, GOS 参与复合纳米颗粒的形成, 改变了 WalPI 的结构。综上, WalPI 与 GOS 通过氢键、疏水相互作用和静电相互作用非共价络合。

从图 7B 可以看出, 随着 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 从 $10 : 0$ 变化至 $10 : 4$, 蛋白质 α -螺旋和 β -转角相对含量降低, 而 β -折叠和无规则卷曲相对含量增加, 形成以 β -折叠为主的二级结构, β -折叠相对含量增

加有助于形成更有序的网络结构^[37]。这表明, GOS 可促进 α -螺旋和 β -转角向 β -折叠和无规则卷曲转变, 改变 WalPI 的二级结构和空间构象, 氢键参与了 WalPI-GOS 的形成。原因在于, GOS 可促进蛋白质 α -螺旋结构展开, 诱导蛋白质的去折叠反应, 蛋白质内部氢键相互作用降低, 部分活性基团(疏水基团和活性巯基)暴露^[38-39], 使其与 GOS 结合形成致密的三维网状结构。栗俊广等^[39]也发现类似结果。

2.2 Pickering 乳液性质

2.2.1 乳液粒径与微观形态

图 8 为 Pickering 乳液平均粒径和粒径分布图。

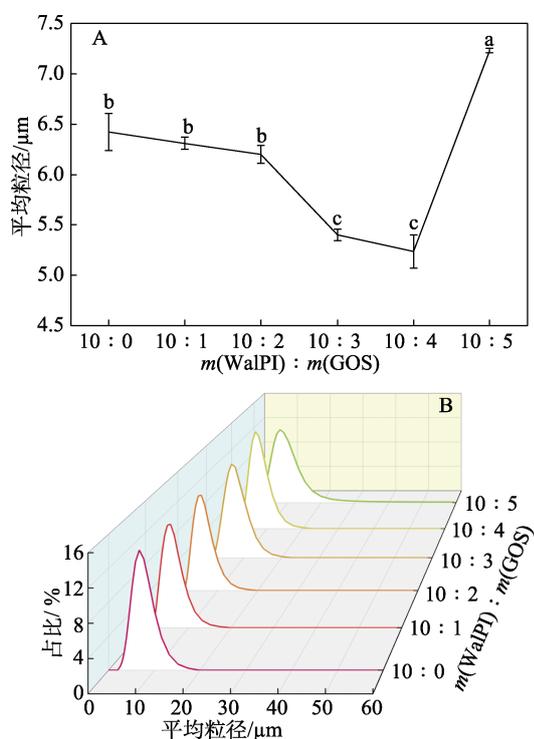


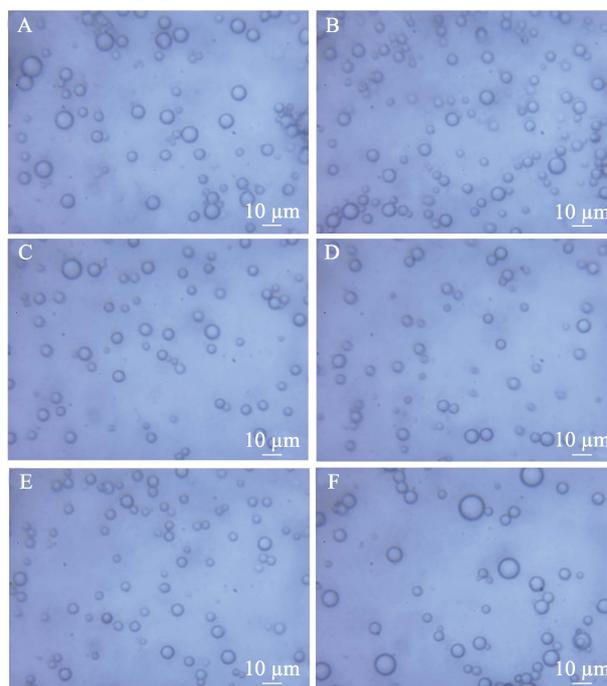
图 8 WalPI 和 GOS 质量比对 Pickering 乳液的平均粒径 (A) 和粒径分布 (B) 的影响

Fig. 8 Effects of mass ratio of WalPI to GOS on average particle size (A) and particle size distribution (B) of Pickering emulsions

从图 8 可以看出, 随着 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 从 10 : 0 变化至 10 : 5, Pickering 乳液平均粒径先减小后增大(图 8A), 粒径分布均呈单分散体系(图 8B)。相较于 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 0$, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 4$ 时, Pickering 乳液平均粒径从 $6.42 \mu\text{m}$ 降低至 $5.24 \mu\text{m}$, 降幅 18.38%, 粒径分布范围窄, 峰值高。原因在于, 一方面, 固体颗粒粒径小可提高其油水界面吸附率, 乳液粒径降低, 表明液滴表面静电荷增加, 液滴间静电斥力增强, 其分散越均匀, 稳定性越高^[40-41]; 另一方面, WalPI-GOS 不可逆地紧密吸附于油水界面, 界面膜有效阻碍了

液滴间的碰撞和絮凝^[42]。当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 5$ 时, 乳液平均粒径显著增至 $7.23 \mu\text{m}$ ($P < 0.05$), 粒径分布范围宽, 峰值低。这是因为, GOS 添加量超过临界值, 过量 GOS 自身或与蛋白质分子间结合形成络合物引起液滴絮凝, 导致乳液粒径增大, 稳定性降低; 此外, 乳液粒径大小是液滴破裂和再聚集间平衡的结果, 大固体颗粒吸附能力较差, 促进液滴的重新聚集, 导致乳液粒径增大^[43]。此结果与 2.1.1 节结果一致。

图 9 为 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 对 Pickering 乳液微观结构的影响。



A~F 为 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 0 \sim 10 : 5$ 的 Pickering 乳液图 9 WalPI 和 GOS 质量比对 Pickering 乳液微观结构的影响

Fig. 9 Effects of mass ratio of WalPI to GOS on microstructure of Pickering emulsions

从图 9 可以看出, Pickering 乳液均呈圆球状、结构完整。当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 4$ 时, 乳液液滴分布均匀, 粒径最小。这是因为, 液滴间的静电斥力和糖链的空间位阻效应阻碍了液滴聚集^[42], WalPI-GOS 在油-水界面形成牢固且有序的界面层, 阻碍液滴发生团聚和奥斯特瓦尔德熟化 (Ostwald Ripening), 提高了 Pickering 乳液的稳定性。当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})=10 : 5$ 时, 乳液液滴分布变得不均匀, 粒径增大。原因可能在于, 多余的 GOS 与 WalPI-GOS 竞争吸附于油-水界面, 部分 WalPI-GOS 被 GOS 替代, 导致界面蛋白含量减少, 界面张力增强, 界面膜无法包裹油相, 乳液粒径增大, 稳定性降低。此结果与乳液粒径结果一致。

2.2.2 乳液流变特性

图 10 为 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 对 Pickering 乳液流变特性的影响。

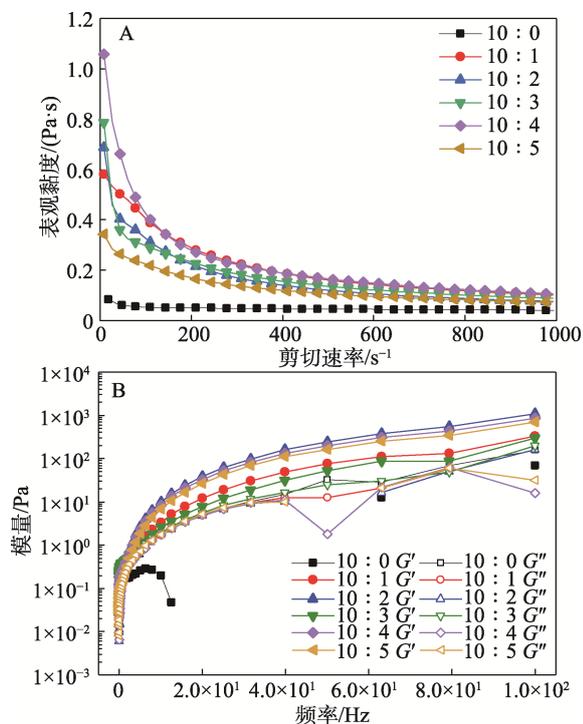


图 10 WalPI 和 GOS 质量比对 Pickering 乳液表观黏度 (A)、 G' 和 G'' (B) 的影响

Fig. 10 Effects of mass ratio on apparent viscosity (A), G' and G'' (B) of Pickering emulsions

从图 10A 可以看出, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 0$ 时, 在剪切速率为 $0.1 \sim 25 \text{ s}^{-1}$ 的区间, Pickering 乳液表观黏度随剪切速率增大而减小, 呈剪切稀化特性, 属假塑性流体; 而在剪切速率 $25 \sim 1000 \text{ s}^{-1}$ 的区间, Pickering 乳液表观黏度基本保持不变, 呈牛顿流体特性。这是由于剪切速率增大, 乳液内部网络结构被破坏, 液滴发生形变并沿流线方向有序排列, 其流动阻力降低^[44]。当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 1 \sim 10 : 5$ 变化时, 在剪切速率为 $0.1 \sim 600 \text{ s}^{-1}$ 的区间, Pickering 乳液呈剪切稀化特性; 在剪切速率为 $600 \sim 1000 \text{ s}^{-1}$ 的区间, 乳液呈牛顿流体特性。表明 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 的变化未改变 Pickering 乳液的牛顿流体特性。当剪切速率为 0.1 s^{-1} 时, Pickering 乳液表观黏度随 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 0 \sim 10 : 5$ 变化呈先增大后减小的趋势, 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 4$ 时乳液表观黏度最大, 为 $1.06 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ 。表明 GOS 用量的增加, 可增强液滴间的相互联结, 形成致密的三维网状结构。因 WalPI-GOS 紧密排列于油水界面, 乳液粒径和界面张力减小^[42], Pickering 乳液表观黏度增大, 液滴迁移率降低。GOS 用量增加, 在连续相中形成紧密堆积的界面层和三维网状

结构^[14], 提高了 WalPI-GOS 的力学性能, 形成稳定有序的网络结构。当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 5$ 时 Pickering 乳液表观黏度降低, 原因为多余的 GOS 与 WalPI-GOS 竞争吸附于油水界面, 加剧了乳滴间的布朗运动, 导致乳液发生聚集或絮凝。但因 WalPI-GOS 间的静电作用, 游离的 GOS 可作为填充剂填充于连续相中提高 Pickering 乳液表观黏度, 因此, $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 5$ 时的 Pickering 乳液表观黏度大于 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 0$ 时的。

乳液动态模量通过 G' 和 G'' 表示, G' 和 G'' 分别反映乳液的弹性 (凝胶) 和黏性 (流体) 性质^[44]。从图 10B 可以看出, 频率 $0.01 \sim 100 \text{ Hz}$ 下, 所有 Pickering 乳液 [除 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 0$ 之外] G' 均高于 G'' , 表明形成了弹性为主的凝胶网络结构。在频率为 $1 \times 10^{-4} \sim 10 \text{ Hz}$ 范围内, $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 0$ 的 Pickering 乳液呈弱凝胶网络结构 ($G' > G''$), 继续增加频率 ($> 10 \text{ Hz}$), 其凝胶网络结构被破坏 ($G' < G''$)。表明增加 GOS 用量可增强 Pickering 乳液的凝胶网络结构, 这是因为, GOS 在凝胶网络中起到“活性填料”的作用^[1], GOS 作为多糖具有增稠和填充作用, 可在水相中形成网络结构, 通过空间位阻限制油滴的流动, 增强乳液的凝胶网络结构^[31]。此外, WalPI 与 GOS 间的高交联密度有助于增强 Pickering 乳液的凝胶网络结构。

3 结论

以 WalPI 和 GOS 为原料, 采用 pH 循环-超声联合制备 WalPI-GOS, 并将其与茶油混合, 制备了 Pickering 乳液。探究 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 在 $10 : 0 \sim 10 : 5$ 变化对 WalPI-GOS 颗粒特性及 Pickering 乳液性质的影响。

(1) 与 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 0$ 相比, $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS})$ 在 $10 : 1 \sim 10 : 5$ 时, WalPI-GOS 及其 Pickering 乳液综合性能更佳。

(2) 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 4$ 时, WalPI-GOS 的平均粒径、Zeta 电位分别为 82.08 nm 和 -52.37 mV , 表现出良好的稳定性; EAI、ESI 为 $31.12 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 4346.35 min , 展现了良好的乳化性; WalPI 部分疏水基团被包埋于 WalPI-GOS 分子内部, 表面疏水性降至 840.81 a.u. , 而其游离巯基含量 ($8.78 \text{ }\mu\text{mol/g}$) 和熔融温度 ($93.74 \text{ }^\circ\text{C}$) 增加; WalPI 与 GOS 的复合改变了 WalPI 的二级和三级结构, 形成以 β -折叠为主的二级结构, WalPI 与 GOS 通过氢键、静电相互作用和疏水相互作用形成紧密的网络结构。

(3) 当 $m(\text{WalPI}) : m(\text{GOS}) = 10 : 4$ 时, Pickering 乳液平均粒径仅为 $5.24 \text{ }\mu\text{m}$, 液滴均匀分布, 形成了

弹性凝胶网络结构; 当剪切速率为 0.1 s^{-1} 时, 具有最高的表观黏度 ($1.06 \text{ Pa}\cdot\text{s}$); WalPI 与 GOS 间的高交联密度增强了 Pickering 乳液的凝胶网络结构。

参考文献:

- [1] LIU J N, ZHANG H X, SUN X, *et al.* Development and characterization of Pickering emulsion stabilized by walnut protein isolate nanoparticles[J]. *Molecules*, 2023, 28(14): 5434.
- [2] LIU J N (刘炯娜), ZHANG H X (张恒瑄), JIANG Y X (蒋雨心), *et al.* Effect of pH value and NaCl concentration on the stability of Pickering emulsion of walnut protein isolate nanoparticles[J/OL]. *China Oils and Fats (中国油脂)*, 2023, 1-10. DOI: 10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.230232.
- [3] LEE H, YILDIZ G, DOS SANTOS L C, *et al.* Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 55: 200-209.
- [4] TELIS N, REGINA V. O/W emulsions stabilized by interactions between proteins and polysaccharides[J]. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 2019: 494-498.
- [5] ESPARZA Y, NGO T D, BOLUK Y. Preparation of powdered oil particles by spray drying of cellulose nanocrystals stabilized Pickering hempseed oil emulsions[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2020, 598: 124823.
- [6] YILDIZ G, DING J Z, ANDRADE J, *et al.* Effect of plant protein-polysaccharide complexes produced by mano-thermosonication and pH-shifting on the structure and stability of oil-in-water emulsions[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2018, 47: 317-325.
- [7] LIU J N (刘炯娜), XU Y Q (徐玉巧), FAN F Y (范方宇). Effects of four polysaccharide prebiotics on stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG microcapsules[J]. *Food Science (食品科学)*, 2023, 44(2): 125-131.
- [8] ZHANG G S (张根生), XU Y M (徐旖梦), LIU X C (刘欣慈), *et al.* Effects of protein glycosylation by hydrothermal processing on the gelling properties and gel microstructures of egg white proteins[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2023, 44(6): 105-112.
- [9] ZHAO C Y (赵晨宇), BU G H (布冠好), CHEN F S (陈复生), *et al.* Preparation and stability of nanoemulsions from glycosylated soy protein isolate[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition) (河南工业大学学报: 自然科学版)*, 2021, 42(4): 22-29.
- [10] ZHANG Q (张麒), WU H B (吴海波), YAN W W (颜文文), *et al.* Research progress on physicochemical properties and modification of soybean 7S and 11S globulins[J]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2022, 48(9): 324-335.
- [11] ZHANG X C, YANG X, LI Y Q, *et al.* Effect of peroxy radical-induced oxidation on functional and structural characteristics of walnut protein isolates revealed by high-resolution mass spectrometry[J]. *Foods*, 2022, 11(3): 385.
- [12] ZHANG S, LU Q. Characterizing the structural and surface properties of proteins isolated before and after enzymatic demulsification of the aqueous extract emulsion of peanut seeds[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 47: 51-60.
- [13] WEI Y, CAI Z X, WU M, *et al.* Comparative studies on the stabilization of pea protein dispersions by using various polysaccharides[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 98: 105233.
- [14] FENG T T, WANG X J, WANG X W, *et al.* High internal phase Pickering emulsions stabilized by pea protein isolate-high methoxyl pectin-EGCG complex: Interfacial properties and microstructure[J]. *Food Chemistry*, 2021, 350: 129251.
- [15] GENTILE L. Protein-polysaccharide interactions and aggregates in food formulations[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2020, 48: 18-27.
- [16] LI N (李娜), HUANG J W (黄霁雯), LEI M (雷敏), *et al.* Effect of *Tremella fuciformis* polysaccharides on gliadin nanoparticles and study of properties of composite[J/OL]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, [2023-06-12]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.035712.
- [17] XU L L, GU L P, SU Y J, *et al.* Formation of egg yolk-modified starch complex and its stabilization effect on high internal phase emulsions[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 247: 116726.
- [18] ZHANG W W (张唯唯), HE Z D (何振东), MA T Y (马天怡), *et al.* Extreme acid and alkaline pH-shifting processes improving the solubility and emulsifying properties of Ginkgo seed protein isolate[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(6): 1204-1211.
- [19] XIONG W F, WANG Y T, ZHANG C L, *et al.* High intensity ultrasound modified ovalbumin: Structure, interface and gelation properties[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, 31: 302-309.
- [20] WEI Z H, ZHU P, HUANG Q R. Investigation of ovotransferrin conformation and its complexation with sugar beet pectin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87: 448-458.
- [21] XU L N, CAO W H, LI R, *et al.* Properties of soy protein isolate/nano-silica films and their applications in the preservation of *Flammulina velutipes*[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2019, 43(11): e14177.
- [22] WANG W, LI J S, YAN L J, *et al.* Effect of oxidization and chitosan on the surface activity of soy protein isolate[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 151: 700-706.
- [23] XU Y X (徐永霞), HE X L (赫雪丽), YIN Y M (尹一鸣), *et al.* Interaction between yeast β -glucan and myosin and its effect on flavor adsorption properties of protein[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报)*, 2022, 22(10): 108-115.
- [24] YANG Y, WANG R, FENG W, *et al.* Carboxymethylcellulose/pectin inhibiting structural folding of rice proteins via ternary structural interplays[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 133: 93-100.
- [25] LI F S (李方斯). Construction of co-assembly hybrid composites by rice proteins and walnut proteins and its application in the preparation of high internal phase emulsions[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学).
- [26] CONG H H (丛海花), ZHOU Q (周倩), WU Y Z (吴西芝). Effect of enzymolysis alginate oligosaccharide on myofibrillar protein in simulated oral digestion[J]. *South China Fisheries Science (南方水产科学)*, 2023, 19(2): 124-132.
- [27] DAI L, SUN C X, LI R R, *et al.* Structural characterization, formation mechanism and stability of curcumin in zein-lecithin composite nanoparticles fabricated by antisolvent *co*-precipitation[J]. *Food Chemistry*, 2017, 237: 1163-1171.
- [28] QIN X G, LIU G, ZHENG W J, *et al.* Heat stability improvement of whey protein isolate via glycation with maltodextrin without control of the relative humidity[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(48): 41785-41792.
- [29] ZHAO G Y, ZHOU C Y, FAN F F. Preparation and properties of soy protein isolate/cotton-nanocrystalline cellulose films[J]. *International Journal of Polymer Science*, 2021, 2021: 1-7.
- [30] FAN X J (樊雪静). Research of emulsification and emulsification stability of soybean protein isolate-oligosaccharide complex system[D]. Harbin: Northeast Forestry University (东北农业大学), 2018.
- [31] CHEN W J, LYU R L, WANG W J, *et al.* Time effect on structural and functional properties of whey protein isolate-gum acacia conjugates prepared via Maillard reaction[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(10): 4801-4807.