纤维素衍生物-大豆分离蛋白稳定的Pickering乳液构建及性质比较

钟媛，华晓晗，崔未宁，杨旭东，殷丽君*

（中国农业大学食品科学与营养工程学院，北京 100083）

摘要：Pickering乳液在食品领域中应用广泛，探究稳定剂性质与Pickering乳液稳定性的关系至关重要。研究将大豆分离蛋白分别与微晶纤维素和纤维素纳米晶制备混合体系，比较了体系在表面电荷、微观形貌、构象状态、界面吸附等方面的性质差异，探讨了稳定剂对Pickering乳液性质的影响。微晶纤维素使蛋白质界面吸附率由52.19%降低至40.55%，乳液粒径由13.26 μm增加至20.58 μm，对乳液流变性能及稳定性无明显改善作用。纤维素纳米晶通过静电相互作用和氢键与蛋白质形成复合物，构建空间网络结构稳定乳液。其有助于使蛋白质界面吸附率增加至59.16%~76.81%，并使乳液粒径达较低水平（3.99~6.75 μm）。含高比例纤维素纳米晶的复合物形成的乳液流变性能和稳定性更好，当比例为1:3时效果最佳。综上所述，纤维素纳米晶能够通过与蛋白质形成复合物以构建性质良好的Pickering乳液。研究为纤维素衍生物－大豆分离蛋白Pickering乳液的开发提供理论支撑，为构建稳定Pickering乳液提供了有效的新方案。

关键词：纤维素纳米晶；微晶纤维素；大豆分离蛋白；Pickering乳液；乳液稳定性

文章编号：1673-9078(2025)04-01-13 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.1818

Preparation and Properties of Pickering Emulsions Stabilized by Cellulose Derivatives and Soy Protein Isolate

ZHONG Yuan, HUA Xiaohan, CUI Weining, YANG Xudong, YIN Lijun*

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Pickering emulsions have been widely applied in the food industry, emphasizing the importance of elucidating the relationship between stabilizer properties and emulsion stability. Two mixed systems were prepared: one comprising microcrystalline cellulose and soy protein isolate, and the other incorporating cellulose nanocrystals and soy protein isolate. A comparison was conducted to analyze the effects of stabilizers on the properties of pickering emulsions by examining the differences in the surface charge, micromorphology, conformational structure, and interfacial adsorption characteristics of the systems. The interfacial protein adsorption rate was reduced from 52.19% to 40.55%, and the emulsion particle size was increased from 13.26 μm to 20.58 μm by incorporating microcrystalline cellulose in the soy protein isolate

引文格式：

钟媛,华晓晗,崔未宁,等.纤维素衍生物-大豆分离蛋白稳定的Pickering乳液构建及性质比较[J].现代食品科技,2025,41(4):1-13.

ZHONG Yuan, HUA Xiaohan, CUI Weining, et al. Preparation and properties of pickering emulsions stabilized by cellulose derivatives and soy protein isolate [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 1-13.

收稿日期：2024-12-06

基金项目：国家自然科学基金资助项目（32272337）；国家重点研发计划项目（2022YFD2100804-1）

作者简介：钟媛（2000-），女，硕士研究生，研究方向：食品胶体，E-mail：yuanzhong00@163.com

通讯作者：殷丽君（1971-），女，博士，教授，研究方向：食品胶体科学，E-mail：ljyin@cau.edu.cn

system, with no marked improvement being observed in the rheological properties and stability of the pickering emulsion. Complexes of cellulose nanocrystals and proteins were formed by electrostatic interactions and hydrogen bonds, resulting in an emulsion with a stable spatial network structure. The interfacial protein adsorption rate increased to 59.16%~76.81%, and the emulsion particle size reduced from 3.99 μm to 6.75 μm. Superior rheological properties and stability were observed in pickering emulsions formulated with cellulose nanocrystal-soy protein isolate complexes at high cellulose nanocrystal proportions, with optimal performances at a cellulose nanocrystal-to-soy protein isolate ratio of 1:3. In summary, cellulose nanocrystals can be utilized to produce high-quality pickering emulsions by forming complexes with protein. This study offers theoretical insights for the development of cellulose derivative-soy protein isolate pickering emulsions and presents an innovative and effective strategy for producing stable pickering emulsions.

Key words: cellulose nanocrystal; microcrystalline cellulose; soy protein isolate; pickering emulsion; emulsion stability

新型乳液材料 Pickering 乳液是一种由固体颗粒不可逆地吸附在油水界面上而稳定的乳液，具有高稳定、多功能的特点，在国内外备受关注。在 Pickering 乳液的制备上，生物来源的稳定剂有着绿色和可持续的优势[1]，往往更受青睐。其中，蛋白质、多糖及复合物颗粒制备的 Pickering 乳液受到广泛研究。在目前的研究中，研究者以醇溶蛋白及大豆多糖制备了复合纳米颗粒，与醇溶蛋白 Pickering 乳液相比，复合颗粒乳液液滴更加均匀，具有较厚界面膜和较好的稳定性，可应用于鲜切卷心菜清洗领域[2]。进一步的，已有研究采用乳铁蛋白－表没食子儿茶素没食子酸酯－高甲酯果胶-*β*-环糊精制备了蛋白质－多酚－双多糖四元复合物，并以此稳定 Pickering 乳液，复合物表现出更适宜的润湿性，稳定的高内相乳液具有更好的均一性[3]。多项研究表明，由复合颗粒作稳定剂的 Pickering 乳液往往更加稳定，在食品领域中具有广阔的应用前景。

Pickering 乳液的稳定性与稳定剂的种类和性质息息相关，受到颗粒润湿性[4]、形状[5]、尺寸[6]、表面电荷[7]等多种因素的影响。蛋白质稳定剂能够在界面上进行自组装[8]，其中，植物蛋白具有来源广泛、成本低廉的优势。作为食品工业中使用最为广泛的水溶性蛋白质，大豆分离蛋白（Soy Protein Isolate, SPI）具有高营养价值，是 Pickering 乳液稳定剂的良好来源[8]。在大豆分离蛋白体系中添加多糖有助于改善蛋白质的亲疏水性及分散稳定 性[8]，进而使 Pickering 乳液更加稳定。纤维素是自然界中分布最广泛、含量最丰富的多糖，其本身润湿性较差，经过物理或化学处理后可制得具有一定润湿性的材料，吸附于油水界面上稳定 Pickering 乳液[1]。微晶纤维素（Microcrystalline Cellulose, MCC）与纤维素纳米晶（Cellulose Nanocrystal, CNC）是两种典型的纤维素衍生物。MCC 本质上为一种微尺寸的、部分水解的纤维素[9]，以较短的结晶碎片的形式存在。CNC 是具有纳米结构和高结晶度的棒状或针状刚性晶体[10]，具有较高的长径比。MCC 与 CNC 组成相似、结构不同，二者在与 SPI 相互作用并稳定 Pickering 乳液方面的差异仍有待探究。

因此，研究以纤维素为原料，以酸水解法制备 MCC，在此基础上，以 2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物（2,2,6,6-Tetramethylpiperidoxyl, TEMPO） 氧 化联合超声法制备 CNC，将二者分别与 SPI 制备微晶纤维素－大豆分离蛋白混合物（Microcrystalline Cellulose-Soy Protein Isolate Mixture, MS）和纤维素纳米晶－大豆分离蛋白复合物（Cellulose Nanocrystal-Soy Protein Isolate Complex, CS），以此为稳定剂，采用高速剪切－高压均质两步法制备 Pickering 乳液，比较 MS、CS、单一蛋白和单一多糖在稳定乳液方面的差异。进一步的，改变了体系中 CNC 与 SPI 的比例，探究 Pickering 乳液的性质差异，以期为纤维素衍生物－大豆分离蛋白 Pickering 乳液的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 原料

纤维素、TEMPO（纯度＞98%）、溴化钠（分析纯），上海麦克林生化科技股份有限公司；次氯酸钠溶液：有效氯 13%~16%，上海麦克林生化科技股份有限公司；溴化钾（光谱纯），上海阿拉丁生化科技股份有限公司；SPI，北京索莱宝科技有限公司；所有其他化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

JY92-IIN 超声细胞破碎仪，宁波新艺超声设备有限公司；LGJ-25D 真空冷冻干燥机，北京四环启航科技有限公司；T25 basic 高速剪切机，德国 IKA 公司；C5 微射流均质机，加拿大 AVESTIN 公司；SU3500 扫描电子显微镜，日立 HITACHI 公司；XD-3 X 射线衍射仪，北京普析通用仪器有限责任公司；SPECTRUM 100 傅里叶变换红外光谱仪，美国 PerkinElmer 公司；ZEN3700 纳米粒度电位仪，英国 Malvern Panalytical 公司；T6 紫外分光光度计，普析通用仪器有限责任公司；MultiMode 8 原子力显微镜，德国 Bruker 公司；FS5 爱丁堡稳态瞬态荧光光谱仪，英国爱丁堡公司；OCA25 视频接触角测量仪，德国 Dataphysics 公司；Mastersizer 3000 激光粒度分析仪，英国 Malvern Panalytical 公司；CX23 光学显微镜，奥林巴斯（中国）有限公司；DHR-2 流变仪，美国 TA 仪器公司；LUMiSizer 全自动稳定分析仪，德国 LUM 仪器公司。

1.3 试验方法

1.3.1 纤维素衍生物的制备与表征

1.3.1.1 纤维素衍生物的制备

MCC 采用酸水解法进行制备[11]。将纤维素与 6 mol/L 的盐酸以 1:20 的料液比进行混合，于 70 ℃的恒温磁力搅拌器中处理 90 min，通过加入 20 倍体积的冷蒸馏水结束反应。体系静置过夜后，收集白色沉淀，用去离子水反复洗涤，至洗涤后清液的 pH 值接近中性。将所得的白色粘稠状物质进行 48 h 的冷冻干燥，产物即为 MCC。CNC 采用 TEMPO 氧化联合超声法进行制备[10,12]。采用 TEMPO/NaBr/NaClO 氧化体系，将 2 g MCC 分散于 100 mL Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 缓冲溶液中（pH 值为 10~11），分别加入 0.32 g NaBr 及 0.032 g TEMPO，于 50 ℃的恒温磁力搅拌器中处理 1 min，使体系混合均匀。向体系中加入 62.4 g NaClO 溶液，在 50 ℃下反应 14 h，然后加入 40 mL 乙醇以终止反应。反应产物在 8 000 r/min 的条件下离心 10 min，弃去上清液，重复加入去离子水并分散均匀，反复离心。收集上层液体，透析、浓缩后，在 455 W 条件下超声处理 60 min，交替开关周期为开 4 s 关 3 s，所得产物即为 CNC 浓缩液。

1.3.1.2 形貌结构

取干燥的纤维素及其衍生物固定于粘有导电胶的样品台上，喷金处理以增加样品导电性，通过扫描电子显微镜（Scanning Electron Microscope, SEM）观察样品表面微观形貌，加速电压为 5.00 kV。

1.3.1.3 X射线衍射

纤维素及其衍生物置于 X 射线衍射仪的载物台上进行扫描。设置参数为：管电压 36 kV，管电流 20 mA，铜靶，旋转 2θ 角：5°~50°，步长 0.02°2θ/s。采用 Segal 法计算样品的相对结晶度，如式（1）所示。

$$B = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

B——相对结晶度（CrI），%；

I_{002}——结晶区的衍射强度；

I_{am}——无定形区的衍射强度。

1.3.1.4 傅里叶变换红外光谱

称取 2 mg 纤维素及其衍生物与 200 mg KBr 充分混合研磨，在 25 MPa 下保持 90 s，获得均匀薄片进行扫描。测试以 KBr 作空白对照。测试参数：光谱范围 400~4 000 cm^{-1}，扫描 32 次，分辨率 4 cm^{-1}。

1.3.2 纤维素衍生物-大豆分离蛋白混合物的制备与表征

1.3.2.1 混合物的制备

将 SPI 粉末分散于去离子水中，配制质量分数为 5% 的分散液。体系在室温下磁力搅拌 2 h，于 4 ℃的冰箱中水化过夜后，在 8 000 r/min 下离心 10 min，取上清液，在 80 ℃下水浴加热 30 min 后冷却待用。通过 Bradford 法测定上清液中的 SPI 含量，其质量分数为 2.71%。称取适量 SPI 溶液、CNC 浓缩液与去离子水共混，使混合体系中 SPI 质量分数为 1%，CNC 与 SPI 质量比分别为 1:3、1:4、1:5、1:7、1:9，磁力搅拌 30 min 后调节复合物水分散体的 pH 值为 2.5，制得 CS 水分散体。MS 水分散体采用相同的配制方法，其中 MCC 与 SPI 的质量比为 1:5。

1.3.2.2 Zeta电位与浊度

将样品浓度稀释至质量分数为0.1%（以SPI计），调节 pH 值至 2.0~8.0 范围，磁力搅拌 15 min。采用纳米粒度电位分析仪进行 SPI、CNC、MCC、CS 及 MS 水分散体的 Zeta 电位测试，样品在 25 ℃下测量三次。通过紫外可见分光光度计测试样品的浊度，记录在 25 ℃、600 nm 波长下样品的吸光度，平行测量三次。

1.3.2.3 微观形貌

采用原子力显微镜（Atomic Force Microscope, AFM）对样品形貌进行观察。将 10 μL 稀释至质量分数为 0.05% 的样品均匀滴加至云母片表面，自然干燥后进行扫描，通过 NanoScope Analysis 1.8 软件进行分析。

1.3.2.4 荧光光谱

采用荧光光谱仪测量 SPI、CS 及 MS 的内源荧光光谱。用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液（Phosphate Buffered Saline, PBS）将样品稀释至 0.1 mg/mL（以 SPI 计）进行测试。设置参数为：激发波长 280 nm，发射光谱扫描范围 300~450 nm，狭缝宽度 3 nm，测量三次。

采用 8-苯胺 -1- 萘磺酸（8-Anilino-1-Naphthalenesulfonic Acid, ANS）荧光探针法表征样品表面疏水性。用 10 mmol/L PBS 溶液将样品分别稀释至 0.04、0.08、0.12、0.16 及 0.20 mg/mL（以 SPI 计），在 5 mL 样品稀释液中加入 20 μL 10 mmol/L ANS 溶液混合均匀，在 25 ℃的黑暗环境中反应 10 min 后进行测试。设置参数为：激发波长 390 nm，发射光谱扫描范围 400~600 nm，狭缝宽度 3 nm，测量三次。以 SPI 浓度为横坐标，以荧光强度为纵坐标，绘制线性回归曲线，曲线的初始斜率作为蛋白质表面疏水性，记为 H_0。

1.3.2.5 界面吸附性能

采用视频接触角测量仪通过悬滴法测定样品分散液与石蜡油的界面张力。在石英玻璃皿中加入石蜡油，将注射器尖端深入石蜡油中，注射样品分散液使单个分散液滴悬浮于石蜡油中，在 25 ℃下捕获液滴图像，记录 400 s 内界面张力随时间的变化。

1.3.3 纤维素衍生物-大豆分离蛋白Pickering乳液的制备与表征

1.3.3.1 Pickering乳液的制备

以石蜡油为油相，以 SPI、CNC、MCC、CS 及 MS 水分散体分别为水相，固定水油比为 6:4，通过高速剪切 - 高压均质两步法制备乳液。用高速剪切机在 11 000 r/min 下对油水混合物处理 1 min，然后用微射流均质机在 50 MPa 下处理 3 个循环，制得均一乳液。

1.3.3.2 界面蛋白负载

将 1 mL 新鲜制备的乳液于 5 000 r/min 下离心 5 min，收集下层水相，用 Bradford 法测定水相中的蛋白质质量浓度。乳液的界面蛋白负载率计算方法如式（2）所示。

$$R = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

R——界面蛋白负载率，%；

C_0——乳液中总蛋白质量浓度，mg/mL；

C_f——乳液离心后水相蛋白质量浓度，mg/mL。

1.3.3.3 乳液粒径

采用激光粒度分析仪以静态光散射原理测量各乳液粒径尺寸，以水为分散剂，使用 Mie 模型分析衍射模式。通过光学显微镜观察乳液的微观形貌，将乳液用蒸馏水稀释十倍，吸取 12 μL 滴加至载玻片上，覆上盖玻片后在 40× 物镜下进行观察。

1.3.3.4 流变性能

采用流变仪分析乳液的流变行为，选用直径为 40 mm 的椎板夹具，设置测量间距为 1 mm，测试温度为 25 ℃。稳态剪切扫描：设置剪切速率由 0.01 s^{-1} 增加至 100 s^{-1}，记录乳液黏度变化。应变扫描：固定频率为 1 Hz，设置应变由 0.01% 增加至 100%，确定乳液的线性粘弹区。频率扫描：在线性粘弹区范围内，设置频率由 0.1 Hz 增加至 10 Hz，记录储能模量和损耗模量的变化。

1.3.3.5 贮藏稳定性

以乳析指数（Creaming Index, CI）表征乳液的贮藏稳定性，将新鲜制备的乳液加入至玻璃样品瓶中，置于 4 ℃下贮藏，记录不同时间下的乳析指数。计算方法如式（3）所示。

$$D = \frac{H_w}{H_t} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

D——乳析指数（CI），%；

H_w——乳液下层析水的高度，cm；

H_t——乳液的总高度，cm。

1.3.3.6 LUMiSizer稳定性

采用全自动稳定分析仪测试乳液的 LUMiSizer 稳定性。设置参数为：25 ℃，轮廓线 360，间隔 10 s，光因子 1.00，转速 2 500 r/min，处理 1 h。

1.4 数据统计分析

试验数据用平均值 ± 标准差的形式表示。所得结果用 SPSS 21 软件进行分析，比较数据的显著性，显著性水平为 5%。采用 Origin 2019 进行制图。

2 结果与讨论

2.1 纤维素及其衍生物的形貌表征

通过扫描电镜比较了纤维素及纤维素衍生物的微观形貌，如图 1 所示。纤维素呈长杆状，由聚集的粗纤维束构成。与之相比，MCC 由短杆和不规则块状结构构成，并且较为疏松、粗糙，同时有孔洞分布于表面。由纤维素到 MCC 的结构变化与目前的研究结果相契合[11]。对于产生 MCC 的酸处理过程，纤维素的无定形区具有较高的可及性和反应活性，因此，氢离子能够在无定形区使糖苷键断裂，降解纤维素[13]，使其在尺寸和形貌上产生变化。CNC 的形貌与纤维素和 MCC 差距较大，呈现出纵横交错的蓬松丝状纤维结构。一方面，TEMPO 氧化将纤维素的羟基选择性地转变为羧基，致使纤维素表面负电荷增加，产生静电斥力，促进细纤束分解和微纤化[14]，进一步的超声处理通过空化效应在样品表面产生微射流和冲击波[15]，通过破坏范德华力和氢键破碎 MCC[16]，降低颗粒尺寸。另一方面，冷冻干燥过程使得破碎的 CNC 发生自组装[17]，在氢键和范德华力的作用下形成丝状结构，这一过程在前人的研究中得到支持[17]。

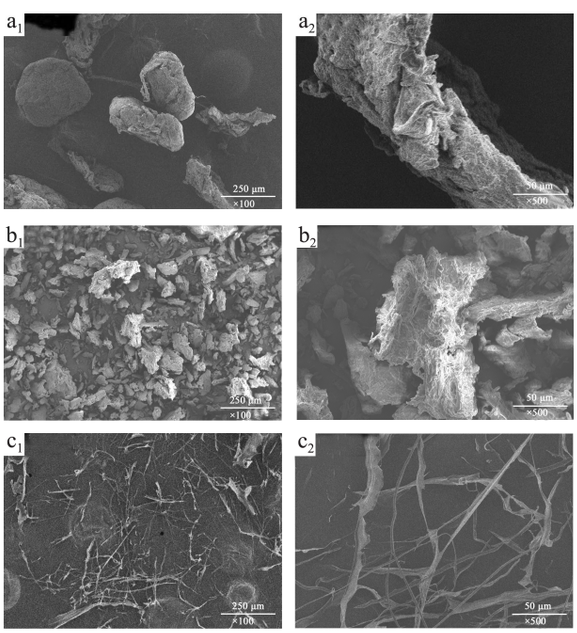


图 1 纤维素、微晶纤维素、纤维素纳米晶的扫描电子显微镜形貌图像

Fig.1 Scanning electron microscopy morphology images of cellulose, microcrystalline cellulose and cellulose nanocrystal

注：a 为纤维素，b 为微晶纤维素，c 为纤维素纳米晶。

2.2 纤维素及其衍生物的物理及化学结构表征

XRD 结果表征了样品的晶体结构，如图 2a 所示。三种样品的衍射峰位置相似，在 2θ=16.52°、22.26° 及 34.5° 附近均出现衍射峰，与纤维素结构中的（110）、（200）、（004）晶面相对应[18]。结果表明，在制备 MCC 和 CNC 的过程中，纤维素的晶型未发生明显变化，产物仍具有典型的 I 型纤维素结构。纤维素的结晶度为 67.33%，与文献报道的 α-纤维素结晶度水平相符[19]。MCC 和 CNC 的结晶度均高于纤维素，分别为 80.68% 和 77.49%。酸水解制备 MCC 有助于去除纤维素中的非晶态区域，提高结晶区比例。TEMPO 氧化处理制备 CNC 对纤维素非晶态区域进行进一步破坏，有利于提高样品的结晶度[10]。然而，长时间超声处理能够非选择性地去除样品结构中的结晶区和非结晶区，同时通过断裂分子间氢键破坏晶体结构，使得 CNC 的结晶度降低[20]。

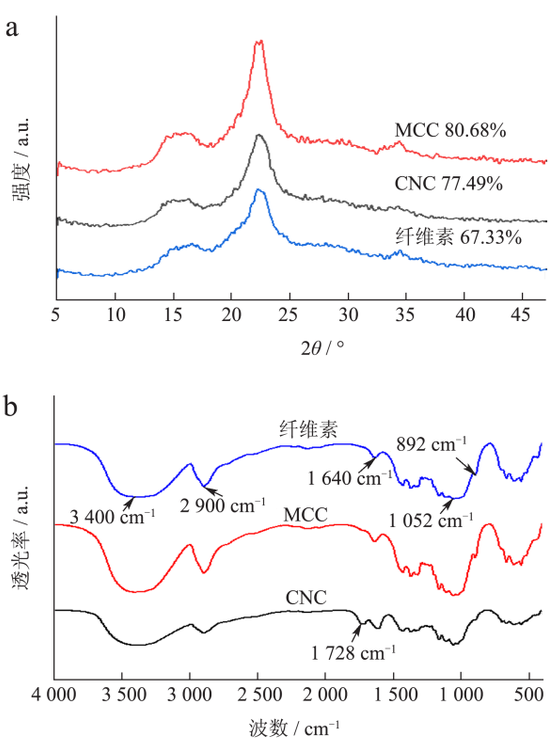


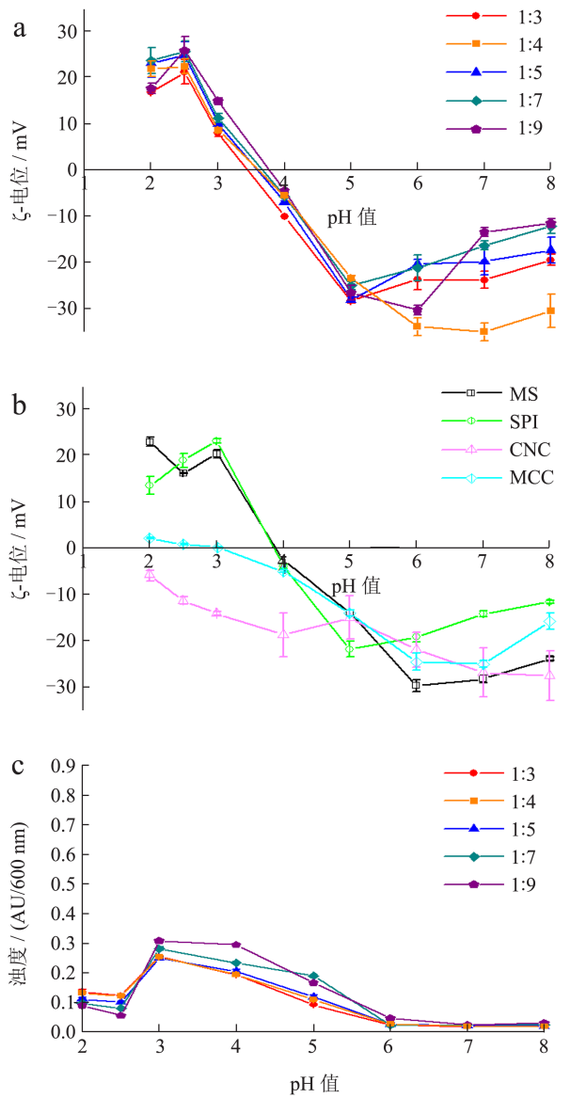
图 2 纤维素及其衍生物的 X 射线衍射图谱（a）和傅里叶变换红外光谱（b）

Fig.2 X-ray diffraction pattern (a) and Fourier transform infrared spectrum (b) of cellulose derivatives

采用 FT-IR 分析纤维素处理前后官能团及化学结构的变化，如图 2b 所示。纤维素、MCC 和 CNC 在多个波数处表现出相似的吸收，2 900、1 640、1 052

和 892 cm^{-1} 处的吸收峰对应于纤维素分子固有结构的特征峰[21]。结果表明，在处理前后，纤维素及其衍生物的特征峰未产生明显变化，样品始终保持着纤维素的基本化学结构。与其他样品不同，CNC 在 1 728 cm^{-1} 处出现独特的-COOH 特征吸收峰，表明 TEMPO 处理纤维素过程中发生了羟基的氧化。同时，CNC 仍具有 3 400 cm^{-1} 处的宽峰，即-OH 伸缩振动峰，说明上述氧化过程只发生在纤维素表面的部分羟基中，CNC 中仍有大量羟基结构存在。目前，一些关于 TEMPO 氧化法制备纤维素纳米纤维[1]及纤维素纳米晶[10]的研究报道了相似的峰形变化，该过程中的氧化为选择性氧化。

2.3 Zeta电位与浊度表征



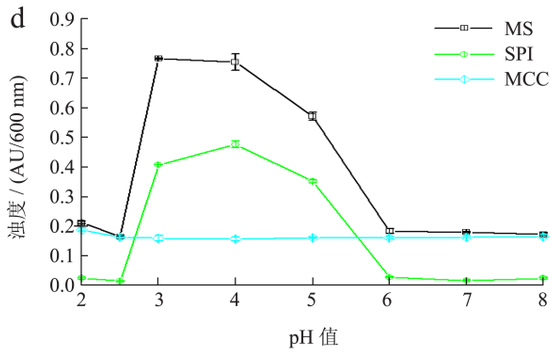


图 3 pH 值对纤维素衍生物、SPI 及其混合体系 Zeta 电位（a，b）和浊度（c，d）的影响

Fig.3 The influence of pH value on the Zeta potential (a,b) and turbidity (c,d) of cellulose derivatives, SPI and their mixed systems

对复合物 Zeta 电位与浊度的测定可以反映 SPI 与 MCC 或 CNC 的相互作用和结合情况。如图 3a、3b 所示，在单一体系中，随着 pH 值的增加，SPI 体系的 Zeta 电位由正值（+13.4 mV）逐渐降低为负值（−11.6 mV），MCC 具有相同的变化趋势（由 +2.1 mV 到 −15.8 mV），CNC 的电位始终为负值（由 −5.9 mV 到 −27.6 mV）。CNC 的羧基结构使其以带负电荷的形式稳定存在。

在 pH 值为 2.0~3.0 时，SPI 与 CNC 带异种电荷，二者的复合体系带有正电荷。随着 CNC 相对含量的增加，Zeta 电位逐渐降低，静电吸引作用下的电势中和降低了复合物整体的电荷密度。当 pH 值为 2.5 时，复合体系表现出最高的电势水平（+21.2 mV ~+25.9 mV），带电粒子间排斥力最强，体系具有较强的胶体稳定性。在已报道的文献中，发现酸性条件下 SPI 与寡糖形成复合物，与 SPI 相比，其等点向酸性偏移[22]，表现出电位变化。

在 600 nm 下分析各个体系的浊度。CNC 为澄清的分散液，其他体系的浊度如图 3c、3d 所示，MCC 分散液的浊度在 0.2 左右，且基本不受 pH 值的变化影响，归因于其较差的溶解性。含有 SPI 的体系在等电点附近表现出较高的浊度，SPI 体系在 pH 值 4.0 时浊度达 0.477。pH 值为 2.0~5.0 时体系浊度水平高，pH 值为 6.0~8.0 时体系较为澄清，浊度处于较低水平。浊度的变化与 SPI 在等电点附近具有自聚集形成较大颗粒的倾向有关[22]，能够反映体系的稳定性。在 pH 值 2.5 下，体系浊度较低，

此时 SPI/CNC 复合物聚集沉淀的倾向较弱，体系稳定程度较高。结合 Zeta 电位结果可知，当体系 pH 值为 2.5 时，SPI 与 CNC 通过静电吸引等相互作用形成的复合物具有较高的稳定性，适于进一步探讨和挖掘其相互作用规律和在稳定乳液方面的能力。

2.4 微观形貌表征

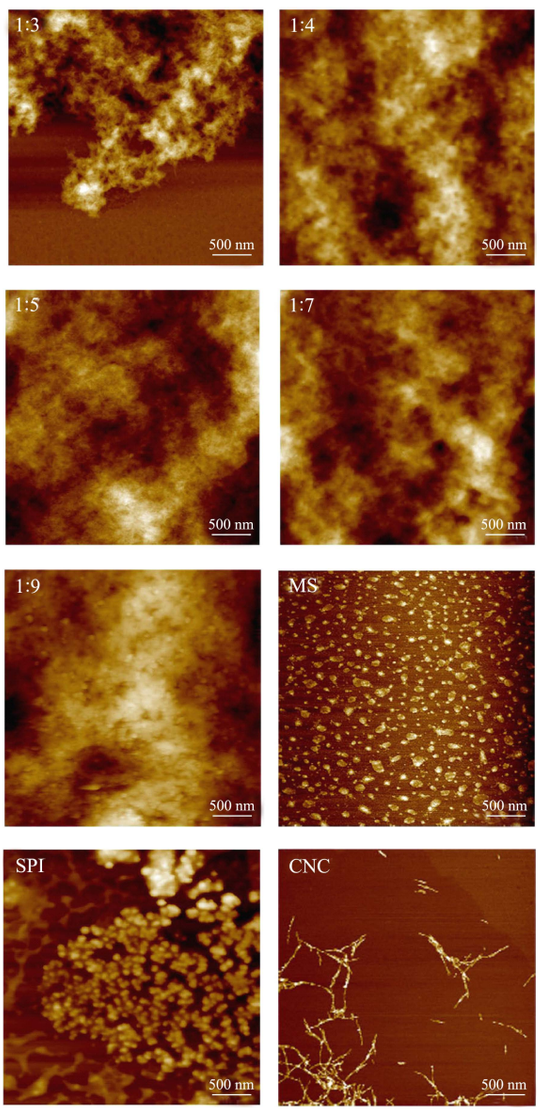


图 4 纤维素衍生物、SPI 及其混合体系的原子力显微镜形貌图像

Fig.4 Atomic force microscopy morphology images of cellulose derivatives, SPI and their mixed systems

通过 AFM 观察样品的形态特征，如图 4 所示。SPI 具有相对均一球状结构，且以聚集体粒子的状态存在。CNC 表现出针状结构，在 pH 值为 2.5 的环境中具有团聚倾向，显现出相互交错的形态结构。二者构成的 CS 团聚程度高，在静电相互作用下形成大范围的聚集体，并随二者的比例变化表现出多样的形貌特征。在 CNC 与 SPI 添加量为 1:9 时，复合物表现出以连绵球状物质为主体的形貌结构，此时，在 CNC 的作用下，受到静电相互作用和氢键的影响，蛋白质的聚集程度大幅提升。随着 CNC 添加量的提升，复合物的形态逐渐转变，针状的 CNC 在球状的 SPI 周围紧密分布，呈现出均匀的网络结构。在 CNC 与 SPI 比例为 1:3 时，网络结构最为清晰。在此添加比例下，CNC 紧紧包裹于 SPI 外侧，形成了多层网络，使得 SPI 颗粒间距离有所增加，复合物呈现均匀分布状态。在先前的文献报道中，花生分离蛋白及 CNC 复合物表现出多糖包围蛋白质的形貌结构，并将复合物中蛋白质颗粒尺寸的减小与稳定剂性质提升相联系[10]。因此，在稳定 Pickering 乳液方面，CS 复合物具有优于 SPI 的潜力。对于 MS，MCC 呈破碎且不规则的颗粒，与样品制备过程中的研磨处理有关[23]。MS 中的 SPI 颗粒分散程度高，粒径相对较小，且 MCC 与 SPI 呈互不接触的分离状态，说明 MCC 的加入削弱了 SPI 的聚集倾向。

2.5 荧光光谱表征

通过内源荧光光谱扫描，检测色氨酸基团的荧光光谱变化，阐释在加入 CNC 或 MCC 后 SPI 构象的变化，如图 5a 所示。CS 体系荧光光谱的最大发射波长均小于单一 SPI 体系，并且，随着 CNC 的添加，复合物荧光光谱逐渐蓝移（由 338.8 nm 移动至 337.3 nm）。添加 CNC 使 SPI 更多的色氨酸残基得到暴露，微环境向疏水方向变化。CNC 添加量越高，疏水变化程度越大。而 MCC 的加入使得体系最大发射波长从 338.8 nm 移动到 339.4 nm，荧光光谱出现轻微红移，蛋白质空间构象变得紧凑，微环境极性提高。内源荧光光谱的结果与 AFM 结果一致，共同反映 MCC 的加入对 SPI 产生的变化。

如图 5b 所示，ANS 外源荧光光谱能够表征蛋白质表面疏水性（H_0）的变化，结果与蛋白质表面疏水基团的数量和位置有关。添加少量的 CNC 对 SPI 表面疏水性无显著影响，当 CNC 与 SPI 比例达到 1:4 及以上时，SPI 的 H_0 逐渐得到增加，SPI 在 CNC 的影响下逐渐去折叠化，内部疏水基团暴露程度增加。CS 复合物在 pH 值 2.5 的酸性环境中制备形成，该 pH 值条件与 CNC 中羧基的 pKa 值相近。

CNC 的 C6 位羧基具备一定的质子化程度，使得其与 SPI 间的氢键作用加强，进而令 SPI 暴露出更多的疏水基团，表面疏水性增加[24]。目前，关于明胶与细菌纤维素纳米纤维体系的研究报道了强酸性条件下的蛋白质变化，发现复合物比例显著影响了蛋白质疏水性[24]。SPI 本身具有较强的亲水性，H_0 的增加使其亲疏水性平衡得到一定改善，进而使复合物在稳定 Pickering 乳液方面具有更强的潜力[25]。与之相反的是，MCC 的加入使 SPI 的 H_0 有所降低，SPI 的构象向结构紧凑方向变化。

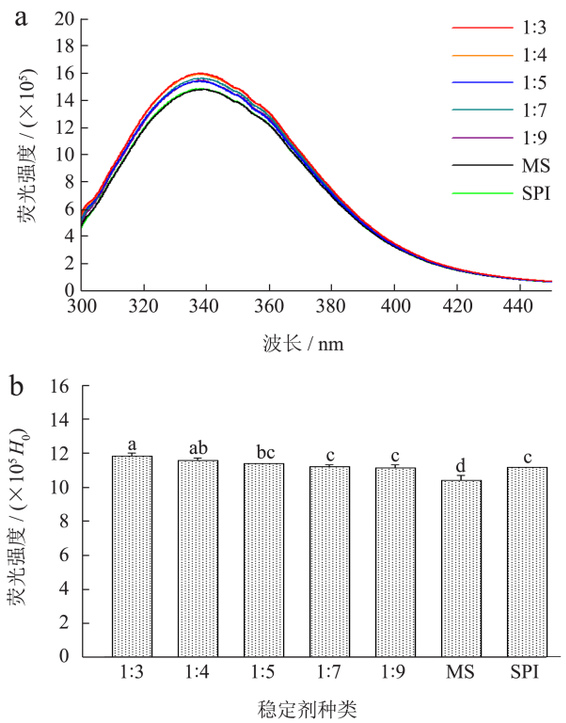


图 5 CS、MS 及 SPI 的内源荧光光谱（a）和表面疏水性（b）

Fig.5 Intrinsic fluorescence spectra (a) and surface hydrophobicity (b) of CS, MS and SPI

注：不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

2.6 界面吸附性能表征

颗粒在油水界面上的吸附过程对 Pickering 乳液的形成和性质有重要影响。如图 6 所示，研究不同体系中油水界面的动态界面张力以观测颗粒的界面吸附性能。与含有 SPI 的体系相比，在 400 s 时，CNC（50.50 mN/m）和 MCC（49.41 mN/m）体系表现出较高的界面张力，这与其结构中大量存在羧基与羟基而表现出的强亲水性有关，预示着二者在稳定乳液方面的能力相对较差。含有 SPI 的各个体系界面张力较低，在吸附扩散阶段，混合物界面张力下降速度快于 SPI，表明混合物能够快速吸附在油水界面上。当界面张力变化逐渐平稳后，大部分 CS 复合物的界面张力高于 SPI（17.53 mN/m），这与复合物颗粒间的非共价相互作用及网络结构产生的空间位阻有关[26]。随着复合物中 CNC 比例的提升，空间位阻愈发强烈，界面张力随之提升。在 CNC 与 SPI 比例为 1:5 时，体系界面张力最高，达 18.16 mN/m，与其表现出的致密微观结构有关。MS 的界面张力为 16.83 mN/m，小于 SPI，这与加入的 MCC 减少了蛋白质聚集体的形成有密切关系。界面张力的变化显现出与文献报道相似的结果[24]，但整体处于较低水平，有利于作为 Pickering 乳液稳定剂以稳定乳液。

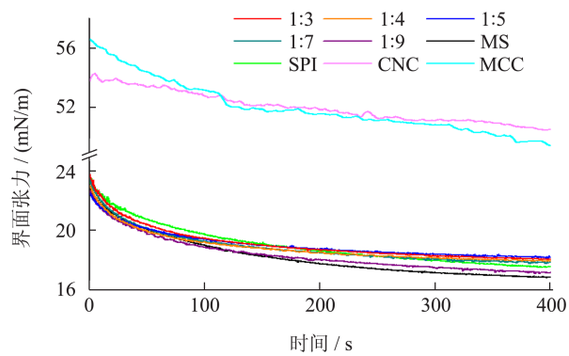


图 6 纤维素衍生物、SPI 及其混合体系界面张力随时间的变化

Fig.6 Changes in interfacial tension of cellulose derivatives, SPI and their mixed systems over time

2.7 界面蛋白负载表征

如图 7 所示，研究了乳液体系中的界面蛋白质负载水平。与 SPI（52.19%）相比，CS 乳液的蛋白质界面吸附率增加，并且，CNC 添加量越高，SPI 界面吸附率越大，由 59.16% 增加至 76.81%。一方面，荧光光谱结果表明，CS 复合物的形成有助于改善 SPI 的亲疏水性平衡，CNC 的引入能够促进 SPI 在油水界面上的吸附排列过程，增加界面处蛋白的吸附含量[8]。另一方面，CS 体系中的网络结构使得复合物紧密纠缠，防止了剪切及均质过程中 SPI 从油水界面上脱附，令更多的 SPI 在界面上保持稳固[25]。与之不同的是，在 MS 乳液中，蛋白质界面吸附率比 SPI 乳液低，为 40.55%。结合荧光光谱的结果，MS 体系中的 SPI 在疏水性方面比 SPI 更差，使 SPI 更难被油相润湿而吸附在油水界面上，造成了较低的 SPI 负载水平。

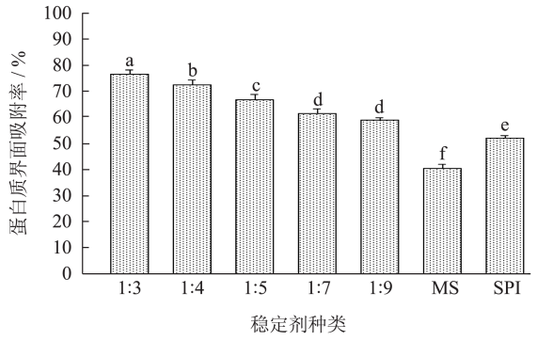


图 7 CS、MS 及 SPI 乳液的蛋白质界面负载

Fig.7 Interfacial protein loading of CS, MS and SPI emulsion

注：不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

2.8 乳液粒径表征

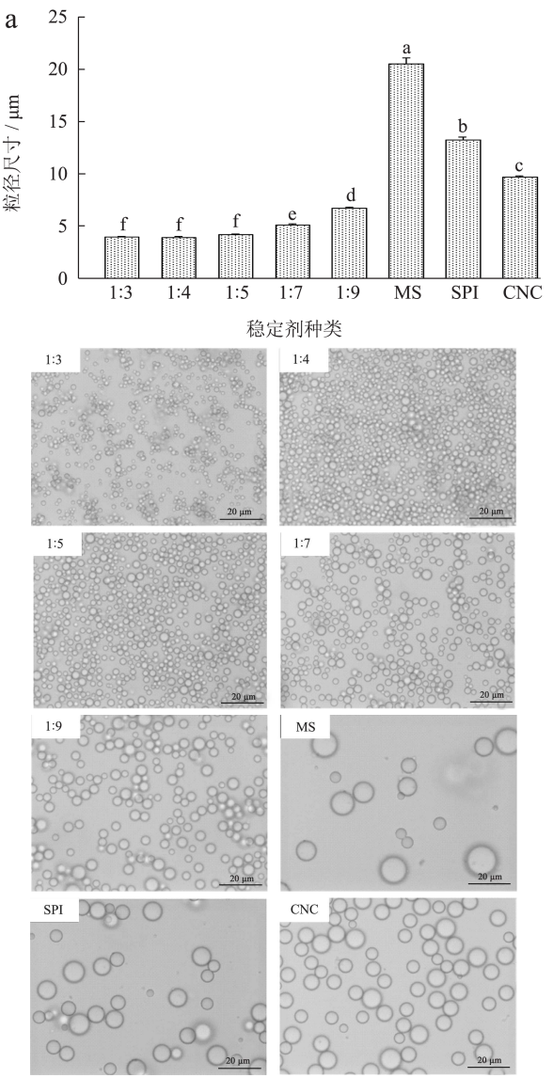


图 8 CS、MS 及 SPI 乳液的粒径（a）和光学显微镜图像（b）

Fig.8 Particle size (a) and optical microscope images (b) of CS, MS and SPI emulsion

注：不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

由于 MCC 不具备通过高速剪切形成初级乳液的能力，仅采用 SPI、CNC、CS 及 MS 进行乳液制备，通过激光粒度分析仪表征乳液粒径，如图 8a 所示。与单一的 CNC 乳液（9.72 μm）及单一的 SPI 乳液（13.26 μm）相比，CS 乳液粒径较小（3.99 ~6.75 μm），同时，随着 CNC 添加量的增加，乳液粒径尺寸具有减小的倾向。CNC 与 SPI 的静电相互作用增强了二者的界面吸附性能，使其在油水界面上发生协同吸附[10]，在形成的三维网络结构中嵌入乳滴，促进形成尺寸较小的 Pickering 乳液液滴。当 CNC 与 SPI 的比例为 1:5 时，Pickering 乳液粒径达到较低水平，即 4.26 μm，继续提高 CNC 添加比例对粒径的影响不显著。该现象与 CS 具有的致密网络结构有关，其可以通过较强的空间位阻作用抑制液滴聚结，使乳液液滴具有较小的尺寸。与 SPI 相比，MS 乳液粒径较大，为 20.58 μm，可以归因于其较低的界面蛋白吸附率，乳液油滴表面复合物颗粒覆盖程度低，乳液易于发生聚集和絮凝，形成大尺寸液滴[27]。在酸性条件下，蛋白质与纳米纤维素复合物乳液具有较小粒径，这一结果在先前的文献中得到支持[8]。

通过光学显微镜观察了乳液的微观形貌，如图 8b 所示，表现出与粒径相符的结果。乳液液滴均为均一球形，MS、SPI、CNC、CS 乳液的粒径依次减小。在 CS 乳液中，随着 CNC 添加比例的增加，乳液粒径逐渐减小。当 CNC 与 SPI 比例为 1:3 时，乳液液滴紧密堆积，粒径均一程度较高。

2.9 乳液的流变性能表征

对乳液进行流变性能的测试可以反映其流变行为及稳定性。如图 9a、9b 所示，在剪切速率由 0.1 s^{-1} 增加至 1 s^{-1} 的过程中，各乳液样品黏度逐渐降低，显现出剪切变稀的非牛顿流体特征。CS 乳液具有更高水平的剪切黏度，并且随着 CNC 比例的增加，乳液黏度增加。体系黏度与乳液粒径有关，含高 CNC 比例的乳液粒径较小，液滴堆积紧密，分子间流动阻力较大，在剪切速率逐渐增加时表现出更高的黏度[28]。当剪切速率进一步提升时，乳液的流变行为出现明显差异。MS 乳液和 SPI 乳液先后出现剪切增稠现象，与大量聚集体形成、流体阻碍作用增强有关[24]。其中，使 MS 乳液流变行为产生变化的剪切速率临界值比 SPI 乳液更早出现，归因于 MCC 能够促进乳液液滴聚集，使乳液更容易受到剪切作用的影响。CS 乳液由于 CNC 的添加而具有一定的结构稳定性，在较广的剪切速率范围内保持着假塑性流体的性质。

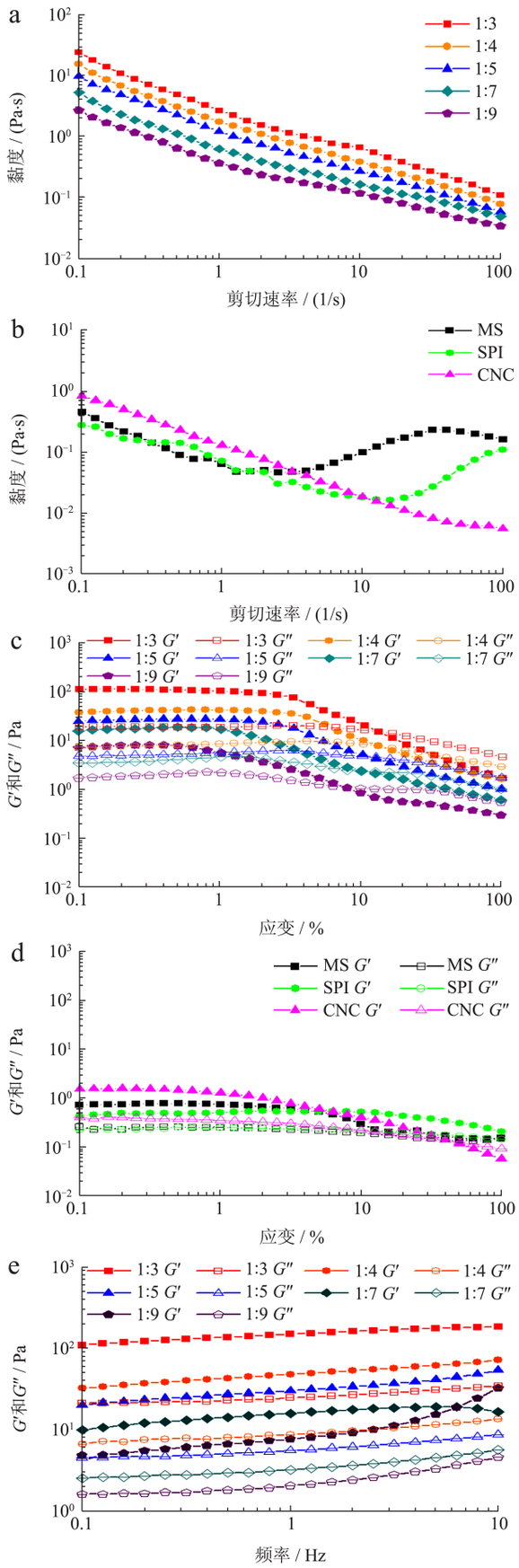


图 9 乳液的稳态剪切扫描（a，b）、应变扫描（c，d）和频率扫描（e，f）

Fig.9 Steady shear sweep (a, b), strain sweep (c, d), and frequency sweep (e, f) of emulsions

图 9c、9d 的应变扫描结果显示，CS 乳液的弹性储能模量和粘性损耗模量较高，表现出比其他乳液更强的固体行为，在乳液稳定性方面具有更强的潜力。进一步的，图 9e、9f 的频率扫描结果表明，各类乳液的储能模量均高于损耗模量，具有弹性的类凝胶特征。CS 乳液的模量值高于其他乳液，且随着 CNC 比例的增加得到进一步提升，与 CNC 和 SPI 形成的三维网络结构有关。致密的网络结构有助于赋予油水界面更高的粘弹性，从而提升乳液的模量值，使破坏乳液稳定时需要克服的阻力增加，提升乳液稳定性。相似的流变学特性在纳米纤维素乳液、蛋白质与纳米纤维素的复合乳液中有所体现[18,29]。

2.10 乳液的贮藏稳定性表征

通过乳液贮藏过程中乳析指数的变化来表征乳液的稳定性。如图 10a 所示，新鲜制备的乳液在经过 1 d 后乳析指数迅速增加，在后续的贮藏过程中变化逐渐趋于平缓。CNC 乳液表现出最高的 CI，在经过 14 d 的贮藏后达 43.80%，且 CI 变化速率最快，制备 1 d 后 CI 增加至 30.98%，表现出最差的乳液稳定性。CNC 表面大量羟基及羧基的存在赋予其强亲水性，不利于其在界面处稳定吸附，在稳定乳液方面效果较差[30]。与 SPI 乳液相比，CS 乳液的 CI 较低，随 CNC 添加量的增加而表现出更低的 CI。其中，当 CNC 与 SPI 达到 1:3 时，乳液始终未出现可见的乳析分层现象，在 30 d 的贮藏期内表现出很好的稳定性。在静电相互作用和氢键下，复配后的复合物在润湿性上得到改善，同时，复合物具有的网络结构能够抑制液滴的流动[24]，形成的厚界

面层也能够通过静电斥力和空间位阻来阻碍液滴的聚集[31]，使乳液具有较强的稳定性和更好的功能性。MS 乳液的 CI 变化较为复杂，在最初的第 1 天时为 10.61%，与加入少量 CNC 的 CS 乳液（11.34%）具有相似水平，然后不断增加，在 14 d 后，CI 达 26.80%，与 SPI 的 29.78% 更为接近。MS 乳液最初具有的低 CI 水平与其较低的界面张力有关，能够保持相对稳定。然而，结合乳液粒径结果可知，MS 乳液液滴粒径较大，易于发生聚结和絮凝，因此在后续的贮藏过程中乳析愈发明显，稳定性逐渐变差。图 10b 用乳液的宏观形貌直观地展现了上述贮藏过程中乳液的变化。与先前文献报道的多种蛋白质与纳米纤维素的复合乳液相比[8,30]，通过调节 CNC 与 SPI 比例为 1:3，构建出了 CI 值更低、更加稳定的乳液。

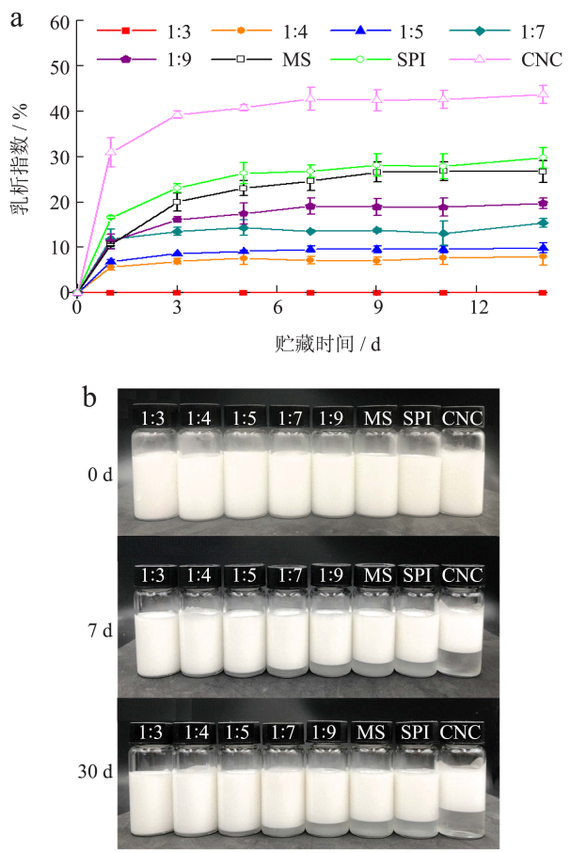
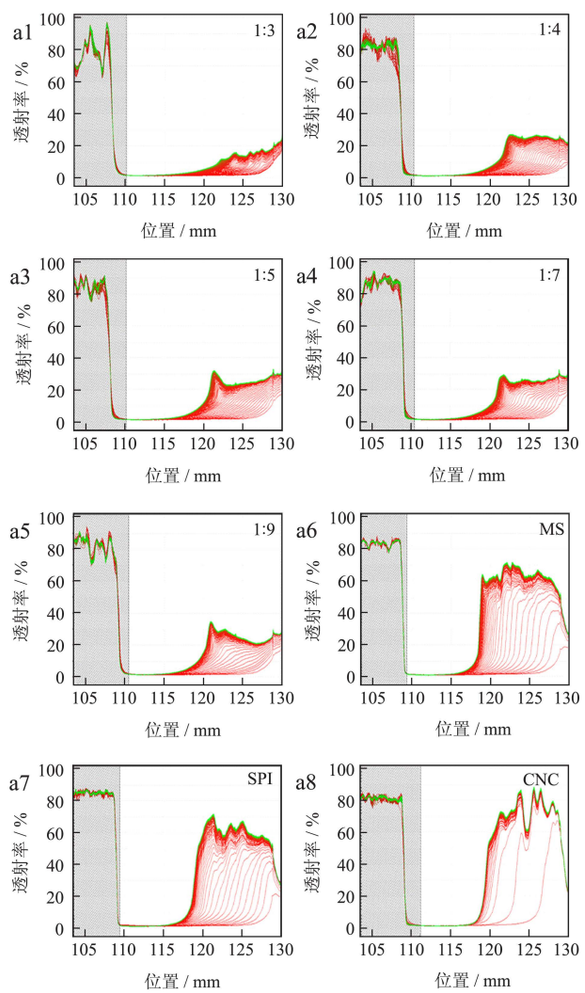


图 10 贮藏过程中乳液的乳析指数变化（a）及表观形貌变化（b）

Fig.10 Changes of emulsion index (a) and appearance (b) of emulsion during storage

2.11 乳液的LUMiSizer稳定性表征

通过离心条件下的加速实验评价乳液的 LUMiSizer 稳定性。图 11a 记录了 1 h 内乳液各个位置的透光率变化。在离心过程中，所有乳液样品在样品池中部至底部位置透光率有所增加，说明乳液在离心力的作用下出现析水现象。在离心结束后，CS 乳液的透光率远小于 MS、SPI 及 CNC 乳液，并且，随着 CNC 添加量的增加，乳液透光率变化幅度减小。结果表明，CS 颗粒在稳定乳液方面具有最佳效果，且 1:3 为 CNC 与 SPI 的最优质量比。在含 SPI 的乳液中，MS 及 SPI 乳液在样品池底部的透光率低于附近位置，而 CS 乳液中未出现上述现象。样品池底部表现出的低透光率与颗粒沉降有关。SPI 乳液和 MS 乳液中的颗粒在离心力的作用下发生沉降，乳液较为不稳定。CS 乳液中，复合物颗粒紧密吸附在油水界面上，乳液稳定性较强。图 11b 通过样品澄清指数随时间的变化表征了离心过程中乳液整体发生的改变。CS 乳液的澄清指数为 0.067~0.138，远低于其他乳液，并且在初始阶段曲线的斜率更低，乳液在离心作用下变化更小，稳定性更强。MS 乳液的澄清指数为 0.367，略高于 SPI 乳液的 0.341，说明 MCC 的加入在一定程度上削弱了乳液的离心稳定性。



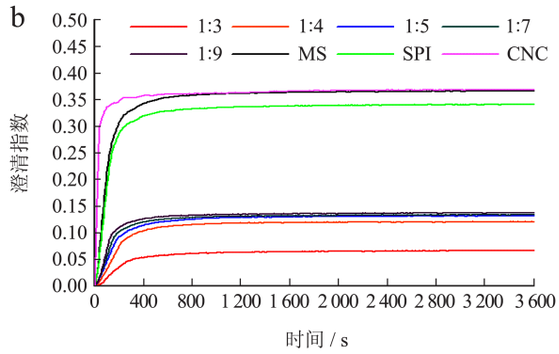


图 11 离心处理下乳液透光率变化（a）及澄清指数变化（b）

Fig.11 Change of light transmittance (a) and clarification index (b) of emulsion under centrifugation

3 结论

研究以纤维素为原料，通过酸水解法制备 MCC，通过 TEMPO 氧化联合超声法制备 CNC，以此构建 MS 及 CS，并通过高速剪切－高压均质两步法制备 Pickering 乳液，以比较 MS 与 CS 的性质差异及其对乳液性质的影响。纤维素衍生物 MCC（结晶度 80.68%）与 CNC（结晶度 77.49%）具有相似的Ⅰ型纤维素结构及较高的结晶度，但构建出的复合物及乳液具有大相径庭的性质。在 pH 值 2.5 的环境中，CNC 与 SPI 通过静电相互作用和氢键作用形成复合物 CS。CS 具有利于稳定的高电势水平（+21.2~+25.9 mV）和致密的网络结构，疏水性与 SPI 相比有所改善。虽然 CS 的界面张力水平相对较高，在平衡 400 s 时达到 17.14~18.16 mN/m，但形成的乳液具有高蛋白质界面吸附率（59.16%~76.81%）和低粒径水平（3.99~6.75 μm），并表现出良好的流变学性质，具有较好的乳液稳定性。其中，CNC 与 SPI 质量比例为 1:3 时 Pickering 乳液稳定性最好，在 30 d 的贮藏期内未发生乳析，与目前研究中的纳米纤维素－蛋白质乳液相比稳定性达到更高水平，在制备稳定的 Pickering 乳液方面具有应用价值。与之不同的是，MS 中的 MCC 与 SPI 分布较为分散，与 SPI 相比，MS 疏水性较低，蛋白质界面吸附率低（40.55%），形成的乳液粒径大（20.58 μm），对乳液流变性和稳定性无明显改善。由此可见，纤维素纳米晶能够通过与蛋白质形成复合物以构建流变性能和稳定性良好的 Pickering 乳液。研究为开发纤维素衍生物－大豆分离蛋白复合颗粒并构建 Pickering 乳液提供理论依据，为得到在食品领域中具有适用性的 Pickering 乳液体系提供可行路径。

参考文献

[1] 张梦,柳艳萍,周伟,等.芒果核壳纤维素纳米纤维的结构表征及其稳定的Pickering乳液性质分析[J].食品工业科技,2023,44(18):50-57.

[2] SHEN C, CHEN W Q, LI C Z, 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 Research International, 2022, 161: 111886.

[3] 谢丽清,徐班萌,梁新红,等.乳铁蛋白、表没食子儿茶素没食子酸酯、高甲酯果胶和β-环糊精四元复合物基高内相Pickering乳液的构建及表征[J].食品科学,2023,44(14):54-62.

[4] BAI L, HUAN S, ROJAS O J, et al. Recent innovations in emulsion science and technology for food applications [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(32): 8944-8963.

[5] KALASHNIKOVA I, BIZOT H, BERTONCINI P, et al. Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions [J]. Soft Matter, 2013, 9(3): 952-959.

[6] NAN F F, WU J, QI F, et al. Uniform chitosan-coated alginate particles as emulsifiers for preparation of stable Pickering emulsions with stimulus dependence [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014, 456: 246-252.

[7] FANCH C, FABRICE C, ISABELLE C. Structural description of the interface of Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals [J]. Biomacromolecules, 2015, 17(2): 496-502.

[8] ZHANG X Z, LEI Y J, LUO X G, et al. Impact of pH on the interaction between soybean protein isolate and oxidized bacterial cellulose at oil-water interface: dilatational rheological and emulsifying properties [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 115: 106609.

[9] KIAN L K, SABA N, JAWAID M, et al. Characterization of microcrystalline cellulose extracted from olive fiber [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 156: 347-353.

[10] NIE C L, LIU B Q, TAN Y F, et al. Synergistic stabilization of high internal phase Pickering emulsions by peanut isolate proteins and cellulose nanocrystals for β-carotene encapsulation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 267: 131196.

[11] ZHAO T, CHEN Z Z, LIN X R, et al. Preparation and characterization of microcrystalline cellulose (MCC) from tea waste [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 184: 164-170.

[12] NI Y, LI J W, FAN L P. Effects of ultrasonic conditions on the interfacial property and emulsifying property of cellulose nanoparticles from ginkgo seed shells [J].

Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 70: 105335.
[13] 董凤霞,刘文,刘红峰,等.棉浆不同预处理方法制备纤维素纳晶的研究[J].中国造纸,2012,31(12):1-5.
[14] MADIVOLI E S, KARERU P G, GACHANJA A N, et al. Isolation of cellulose nanofibers from *Oryza sativa* residues via TEMPO mediated oxidation [J]. Journal of Natural Fibers, 2020, 6(8): 1310-1322.
[15] ABRAL H, LAWRENSIUS V, HANDAYANI D, et al. Preparation of nano-sized particles from bacterial cellulose using ultrasonication and their characterization [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 191: 161-167.
[16] CHEN W S, YU H P, LIU Y X, et al. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(4): 1804-1811.
[17] HAN J Q, ZHOU C J, WU Y Q, et al. Self-assembling behavior of cellulose nanoparticles during freeze-drying: effect of suspension concentration, particle size, crystal structure, and surface charge [J]. Biomacromolecules, 2013, 14(5): 1529-1540.
[18] GAO J B, QIU Y H, CHEN F, et al. Pomelo peel derived nanocellulose as Pickering stabilizers: fabrication of Pickering emulsions and their potential as sustained-release delivery systems for lycopene [J]. Food Chemistry, 2023, 415: 135742.
[19] SALEM K S, KASERA N K, RAHMAN M A, et al. Comparison and assessment of methods for cellulose crystallinity determination [J]. Chemical Society Reviews, 2023, 52(18): 6417-6446.
[20] ISHAK N A M, KHALIL I, ABDULLAH F Z, et al. A correlation on ultrasonication with nanocrystalline cellulose characteristics [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 246: 116553.
[21] 边开强,贺金涛,朴光哲.过硫酸铵一步氧化法制备羧基化纤维素纳米晶体及其胆甾型液晶[J].青岛科技大学学报(自然科学版),2020,41(6):21-30.
[22] 樊雪静,刘红玉,迟玉杰.大豆分离蛋白与寡糖静电相互作用及复合物乳化性的分析[J].食品科学,2018,39(12): 126-132.
[23] LIU Y, CHEN Y H, LIU H T, et al. Modification of microcrystalline cellulose enhanced by impact milling and solvothermal process and its Pickering emulsion [J]. Colloid and Interface Science Communications, 2021, 44: 100487.
[24] WU Y L, LEI C, LI J, et al. Improvement of O/W emulsion performance by adjusting the interaction between gelatin and bacterial cellulose nanofibrils [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 276: 118806.
[25] 刘晏玮.基于脂肪酶/壳聚糖聚电解质复合物的Pickering乳液两相催化反应体系构建及其机理研究[D].山东:山东农业大学,2023.
[26] FENG X, DAI H J, TAN H X, et al. Improvement of low-oil gelatin emulsions performance by adjusting the electrostatic interaction between gelatin and nanocellulose with different morphologies [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 139: 108592.
[27] SHARKAWY A, BARREIRO M F, RODRIGUES A E. Preparation of chitosan/gum arabic nanoparticles and their use as novel stabilizers in oil/water Pickering emulsions [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 224: 115190.
[28] HUANG X N, ZHOU F Z, YANG T, et al. Fabrication and characterization of Pickering high internal phase emulsions (HIPEs) stabilized by chitosan-caseinophosphopeptides nanocomplexes as oral delivery vehicles [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 93: 34-45.
[29] BENOIT S M, AFIZAH M N, RUTTARATTANAMONGKOL K, et al. Effect of pH and temperature on the viscosity of texturized and commercial whey protein dispersions [J]. International Journal of Food Properties, 2012, 16(2): 322-330.
[30] 傅亮,李雪影,杨涛,等.三种蛋白包覆纤维素纳米晶稳定皮克林乳液的构建及体外消化特性[J].现代食品科技,2024,40(8):39-49.
[31] 李想,隋沅均,庞一帆,等.基于纤维素稳定乳液的生物活性物质运载体系研究进展[J].食品工业科技,2024,45(4):389-399.