# 脂质相态对高蛋白质中间水分食品稳定性的影响

陆乃彦， 张 轩， 李 娟， 周 鹏*
（食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122）

**摘要**：高蛋白质中间水分食品的品质在储藏过程中会因发生严重的劣化而导致其货架期受到限制，其中脂质导致的相分离是重要原因之一。研究采用乳清分离蛋白质、酪蛋白酸钠和大豆分离蛋白质为蛋白源，以不同相变温度的十四酸甲酯（C14）和硬脂酸甲酯（C18）为模型脂质，建立中间水分食品模型体系，通过质构仪、激光共聚焦荧光显微镜、低场核磁共振和差示扫描量热等手段，研究了脂质相态对该体系在储藏过程中稳定性的影响。结果表明，在储藏过程中，C14（液态脂）体系的硬度相对C18（固态脂）体系较小，但在该体系中发生了严重的相分离情况，而C18体系中蛋白质与脂质通过疏水相互作用而结合，体系变得更为均匀，并且不易发生出油现象。

**关键词**：高蛋白质中间水分食品；脂质相态；蛋白源；储藏稳定性；硬化
**中图分类号**：TS 252.4　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689（2016）010—1020—08

# Effect of Lipid Phase State on the Storage Stability of High-Protein Intermediate-Moisture Foods

*LU Naiyan*， *ZHANG Xuan*， *LI Juan*， *ZHOU Peng**
（State Key Laboratory of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

**Abstract**：High-protein intermediate-moisture foods suffered from serious deterioration of quality during storage restricts the shelf life of this type of food. Phase separation between lipids and other compounds is known as one of the most important factors. Two types of lipids with different phases，methyl myristate（C14 methyl ester）in liquid form and methyl stearate（C18 methyl ester）in solid form，were added to high-protein intermediate-moisture food model systems made with whey protein isolate，sodium caseinate or soy protein isolate. Texture analyzer，confocal laser scanning microscope，low-field nuclear magnetic resonance，and differential scanning calorimeter were used to investigate the influence of lipid phase states on the system stability during storage. It was found that systems with solid lipids were harder than those with liquid lipids during storage. However，the latter system suffered from phase separation，while the C18 systems became more homogeneous as the storage progressed，and without oil exudation was found.

**收稿日期**：2016-04-08
**基金项目**：国家自然科学基金项目（31471697，31071492）；教育部科学技术研究项目（113032A）；高等学校学科创新引智计划（111 Project-B07029）；食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题（SKLF-ZZA-201507）。
**作者简介**：陆乃彦（1985—），男，江苏无锡人，理学博士，副教授，主要从事食品蛋白质和脂质方面的研究。E-mail：lunaiyan@jiangnan.edu.cn
***通信作者**：周 鹏（1975—），男，山东青岛人，工学博士，教授，主要从事食品物性、乳制品与水产品加工方面的研究。E-mail：zhoupeng@jiangnan.edu.cn

**Keywords**：high-protein intermediate-moisture foods，lipid phase，protein source，storage stability，hardening

高蛋白质中间水分食品通常指的是一类蛋白质质量分数在 15%~45%且水分活度在 0.5~0.8 的食品（如高蛋白质营养棒），主要含有蛋白质、脂质、碳水化合物以及其他小分子保湿剂和增塑剂[1]。这类食品在加工过程中不需要干燥或加热，并且其相对较低的水分活度能够抑制微生物的生长[2]。然而，中间水分食品在储藏过程中会发生一系列物理化学变化，导致其品质发生严重的劣化[3-4]。

在储藏过程中引起高蛋白质中间水分食品品质发生劣化的机制十分复杂，包括蛋白质聚集[5-6]、美拉德反应[7]、糖结晶[8]、相分离[4,9]和水分迁移[4,9-11]等。高蛋白质营养棒体系中的脂质易与体系中其他成分发生相分离现象，如酪蛋白酸钙营养棒中的可可脂会逐渐迁移到营养棒的表面[11]；乳清蛋白营养棒在储藏过程中会发生严重的相分离现象，而将其部分水解后，相分离现象会得到抑制[9]。蛋白棒中的相分离会导致其质地发生硬化，并且不同相变温度的脂质在室温储藏条件下所处的相态不同，会对该硬化过程产生不同程度的影响[12]。

在食品体系中，蛋白质与脂质之间的相互作用比较复杂，如在适当的 pH 值下，蛋白质与磷脂之间会发生静电相互作用[13]；蛋白质与脂肪酸、甘油单酯等脂质间存在氢键相互作用；脂质氧化过程中会与蛋白质间形成共价键[14]。在蛋白棒体系中，最常用的脂质包括植物起酥油、可可脂、菜籽油等。疏水相互作用是大多数甘油三酯与蛋白质间最主要的相互作用，对于储藏过程中脂质在蛋白棒体系中的分布情况有重要影响[13]。研究表明，乳清蛋白营养棒体系中的脂质在储藏一天后就被从连续相中分离出来，而酪蛋白酸钙营养棒体系中的脂质则存在于蛋白质颗粒组成的网络结构的间隙中[11]。

以疏水性不同的 3 种蛋白质（乳清蛋白质、酪蛋白酸钠和大豆蛋白质）为蛋白源，以十四酸甲酯和硬脂酸甲酯为模型脂质（在室温储藏条件下分别处于液态相和固态相），建立中间水分食品模型体系，通过激光共聚焦荧光显微镜、低场核磁共振和差示扫描量热等手段，研究脂质相态对高蛋白质中间水分食品体系在储藏过程中的相分离情况及稳定性的影响，为进一步提高高蛋白质中间水分食品稳定性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采用 3 种喷雾干燥后制得的食品蛋白质颗粒。酪蛋白酸钠（NaCN，质量分数 87%）和乳清分离蛋白质（WPI，质量分数 90%），购于恒天然乳品集团；大豆分离蛋白质（SPI，质量分数 87%），购于南通光合生物技术有限公司；荧光染料 FITC，购于 Sigma-Aldrich 公司；甘油和山梨醇（分析纯），购于国药集团；十四酸甲酯和硬脂酸甲酯，购于阿拉丁试剂公司。

### 1.2 主要仪器设备

CLSM 710 型激光共聚焦显微镜，德国 Zeiss 公司制造；NMI20-Analyst 核磁共振分析仪，上海纽迈电子科技股份有限公司制造；TA-XT-plus 质构仪，英国 Stable Micro Systems 公司制造；SHP-250 型生化培养箱，上海森信实验仪器有限公司制造；水分活度密闭容器，美国 Decagon 公司制造；DSC 214 Polyma 示差扫描量热仪，德国 Netzsch 公司制造。

### 1.3 方法

**1.3.1 高蛋白质中间水分食品模型体系的制备** 样品配方包括 4 g 蛋白质、1 g 脂质、2.25 g 山梨醇、1.5 g 甘油及 1.25 g 水（见表 1）。首先将山梨醇溶于水中，加入甘油并搅拌均匀。向混合液中加入蛋白质和脂质，初步搅拌后用手揉搓均匀成团，装进水分活度密闭容器中，并用封口膜密封以防止水分丢失。制备过程在 40 ℃进行，保证使用的脂质处于液态相。将制好的样品置于 25 ℃生化培养箱中贮藏，每个模型体系制备 3 个平行样品。样品中使用的蛋白质分别为 WPI、NaCN 和 SPI，脂质分别为十四酸甲酯和硬脂酸甲酯，不同原料制得的样品分别标记为 WPI-C14、WPI-C18、NaCN-C14、NaCN-C18、SPI-C14 和 SPI-C18。

**1.3.2 体系硬度变化的测定** 用质构仪检测贮藏

表 1　高蛋白质中间水分食品模型体系配方

Table 1　Formula of high-protein intermediate-moisture food model systems

| 模型体系 | 质量/g | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 蛋白质 | 脂质 | 山梨醇 | 甘油 | 水 |
| WPI-C14 | 乳清蛋白质 4 | 十四酸甲酯 1 | 2.25 | 1.5 | 1.25 |
| WPI-C18 | 乳清蛋白质 4 | 硬脂酸甲酯 1 | 2.25 | 1.5 | 1.25 |
| SPI-C14 | 大豆蛋白质 4 | 十四酸甲酯 1 | 2.25 | 1.5 | 1.25 |
| SPI-C18 | 大豆蛋白质 4 | 硬脂酸甲酯 1 | 2.25 | 1.5 | 1.25 |
| NaCN-C14 | 酪蛋白酸钠 4 | 十四酸甲酯 1 | 2.25 | 1.5 | 1.25 |
| NaCN-C18 | 酪蛋白酸钠 4 | 硬脂酸甲酯 1 | 2.25 | 1.5 | 1.25 |

过程中模型体系的硬度变化，选取的时间分别为 0、1、3、7、14 d。选取直径为 2 mm 的圆柱形 P/2 探头进行穿刺实验，下压速度为 1.0 mm/s，触发应力为 5 g，下压程度为 50 %。通过穿刺过程中得到的最大应力表示为模型体系的硬度，每次测量做 3 次并取平均值。

**1.3.3　体系微观结构变化的测定**　用激光共聚焦荧光显微镜检测模型体系在贮藏过程中微观结构的变化，时间分别为 0、1、3、14 d，其中蛋白质用荧光染料 FITC 标记，脂质用荧光染料尼罗红标记[15]。将染色剂 FITC 溶于丙酮中配成 20 μg/mL 的 FITC 染色液。将染色剂尼罗红溶于丙酮中配 20 μg/mL 的尼罗红染色液。取 1 g 新鲜样品，滴加 12 μL FITC 染色液和 20 μL 尼罗红染色液并搅拌，取适量样品（约 0.3 g）置于玻底培养皿中，密封后在 25 ℃ 下避光保存。观察时，将样品置于载物台上，20 倍物镜下通过两个荧光通道进行观测，其中 FITC 激发波长为 488 nm，尼罗红激发波长为 552 nm。使用仪器自带软件 Zen 2011（德国 Zeiss 公司）进行图像拍摄。

**1.3.4　体系横向弛豫时间 $T_2$ 变化的测定**　用核磁共振分析仪检测模型体系在贮藏过程中氢原子横向弛豫时间（$T_2$）的变化（0、1、3、14 d），从而进一步反映模型体系中脂质的流动性变化。取适量样品（约 0.5 g）并用聚四氟乙烯包裹，将其放入核磁管中并放进设备，用硬脉冲序列调节中心频率进行多脉冲回波序列扫描，每次测量重复 3 遍；采样点数 94 220，回波个数 2 048，重复扫描次数 64，弛豫衰减时间 1 s。通过 MultiExp InvAnalysis 软件对测得结果进行反演，得到模型体系横向弛豫时间 $T_2$ 的连续分布图。

**1.3.5　示差扫描量热仪测定热流**　使用 DSC 214 Polyma 示差扫描量热仪测定样品升温过程中的热流变化。分别使用纯水和铟为参照校正温度和热流。样品测定时先以−20 ℃/min 冷却至 5 ℃，在 5 ℃ 平衡 3 min，再以 5 ℃/min 升温至 95 ℃。通过检测升温过程中热流（mW/mg）的变化，反映样品中脂质的相变情况。每个体系做 3 个平行。

## 2　结果与讨论

### 2.1　模型体系的硬度变化

贮藏过程中模型体系的硬度变化趋势如图 1 所示。所有模型体系在储藏过程中其硬度随时间上升，其中 WPI 体系质地最为柔软，而 NaCN 体系硬度最大，与作者的前期研究结果一致[10]。NaCN 和 SPI 体系的硬度变化趋势相似，在第一个星期的储藏过程中硬度迅速上升，随后硬化速度逐渐变慢，而 WPI 体系在储藏过程中硬化速度基本保持不变，并且最终的硬度远远小于 NaCN 和 SPI 体系。另外，对于相同的蛋白质体系，加入固态 C18 甲酯样品的硬度大于加入液态 C14 甲酯样品的硬度。

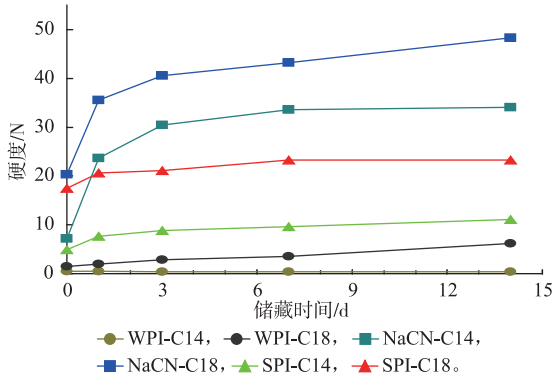
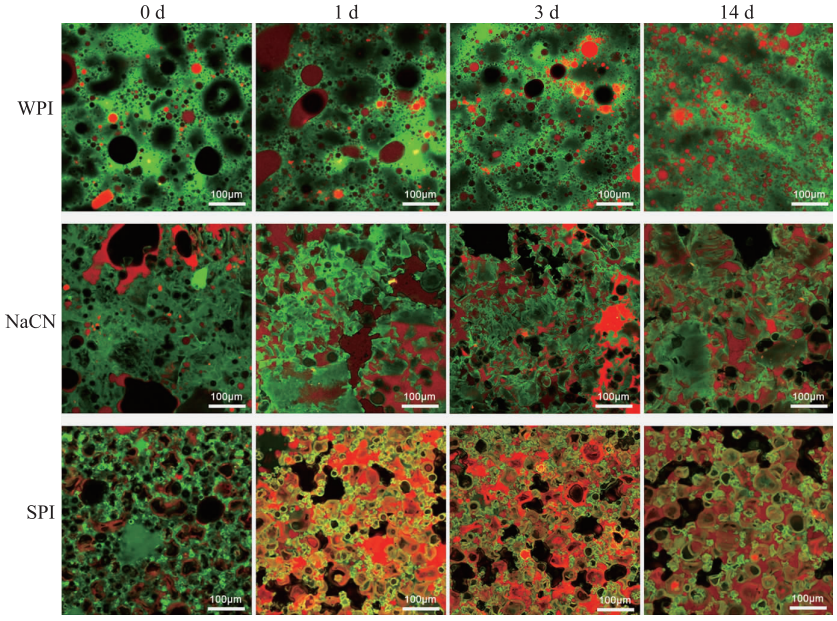



图 1　不同模型体系在储藏过程中（25 ℃）的硬度变化

Fig. 1　Hardness changes of model systems made with different types of protein powders and methyl esters during storage at 25 ℃

### 2.2 模型体系的微观结构变化

模型体系在储藏过程中微观结构的变化如图2、图3所示,其中红色部分为尼罗红标记的脂质,绿色部分为FITC标记的蛋白质。对于WPI-C14体系,从储藏的初始状态就可以观测到明显的相分离现象。连续相中的主要成分包括蛋白质和水分等小分子,脂质则存在于空隙中。在储藏过程中,空隙中的脂质互相融合,逐渐从微观相分离过度到介观相分离。然而,对于WPI-C18体系,其微观结构的变化趋势则相反。在储藏的初始状态,体系中同样能够观测到脂质小球,但是由于C18脂质在25 ℃下处于固态相,流动性较差,这些脂质无法进一步融合,反而通过与蛋白质之间的疏水相互作用进入到连续相中(图中黄色部分),脂质与连续相的界限逐渐变模糊。NaCN体系中脂质分布情况的变化趋势与WPI体系类似。在NaCN-C14体系中,在储藏初始阶段就可以观察到相分离现象。脂质小滴在储藏过程中逐渐融合并形成较大的脂质区域(图2中红色部分)。由于NaCN的疏水性相对WPI较强,在图像中可以观察到由于脂质与蛋白质间的疏水相互作用,导致部分区域两者的重叠。然而,由于C14脂质在储藏过程中的融合,导致其比表面积较小,蛋白质与脂质相互作用而融合的程度远远低于C18体系。




红色:尼罗红标记的脂质;绿色:FITC标记的蛋白质

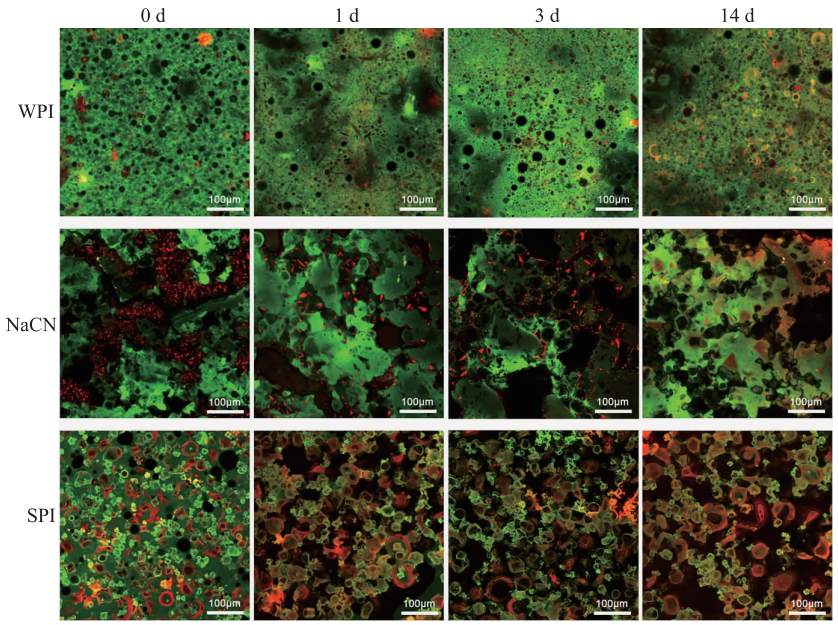
**图2 C14模型体系在储藏过程中的微观结构变化**

**Fig. 2 Microstructure of C14 methyl ester added model systems observed by CLSM**

SPI的疏水性最强[16],其无法在样品制备过程中被完全溶解,在体系中仍然保持颗粒状态,并且脂质与其之间的疏水相互作用明显比另外两个体系更强。如图中所示,C14甲酯包裹于SPI颗粒表面,并且在储藏过程中逐渐进入到颗粒内部,但在14 d后依然有较多脂质未与蛋白质结合。SPI-C18体系观察到的现象与此类似,但脂质在3 d内就基本完全进入到连续相中,这也是SPI-C18体系的硬度在3 d后基本保持不变的原因(见上图1)。

为了进一步验证脂质相态对模型体系储藏稳定性的影响,将NaCN-C18体系置于45 ℃恒温培养箱中储藏14 d,其在储藏后的微观结构如图4所示(25 ℃下观察)。在该储藏温度下,硬脂酸甲酯处于液态相。从图可见,绝大多数的C18脂质依然存在于蛋白网络结构的孔隙中,其相分离状态与25 ℃下储藏的C14脂质(液态相)相近。以上结果对比表明,25 ℃下储藏的C14体系和C18体系中脂质分布情况的差异是由脂质的相态不同所致。

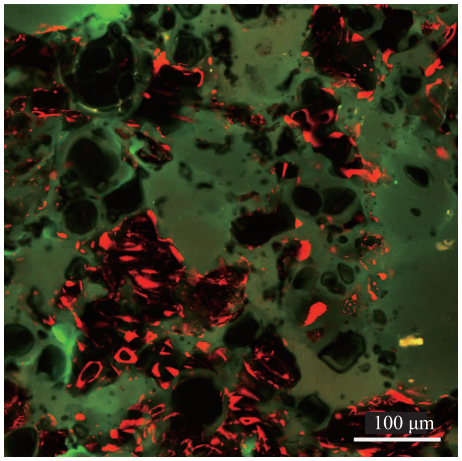
另外,当体系中加入不同相变温度的脂质,其相分离情况的区别同样对其在储藏过程中外观性质的变化有重要影响。对于WPI-C14和NaCN-C14体系,由于其相分离程度更高,脂质从连续相中排




红色:尼罗红标记的脂质;绿色:FITC 标记的蛋白质

**图 3　C18 模型体系在储藏过程中的微观结构变化**

**Fig. 3　Microstructure of C18 methyl ester added model systems observed by CLSM**




红色:尼罗红标记的脂质;绿色:FITC 标记的蛋白质

**图 4　NaCN-C18 体系在 45 ℃储藏 14 d 后的微观结构(25 ℃观测)**

**Fig. 4　Microstructure of NaCN-C18 model system stored at 45 ℃ for 14 d,observed at 25 ℃ by CLSM**

出,导致体系表面在储藏过程中出油变黏,进一步降低其品质。而对于相应的 C18 体系,样品的表面性质则不会因此而劣化。

### 2.3　体系中脂质分子流动性的变化

采用横向弛豫时间($T_2$)的分布情况来反映体系中脂质和水分等小分子的流动性,$T_2$ 值越大,则说明分子的流动性越强。对于同一个样品来说,特定横向弛豫时间的信号强度代表处于相应状态的分子的含量。由于邻近的水分子和其他亲水化合物间氢键的存在,自由状态下水、甘油和山梨醇等小分子的横向弛豫时间远远小于脂质的横向弛豫时间[17]。如图 5 所示,处于自由状态脂质的 $T_2$ 值大于 100 ms,其余相对较小的 $T_2$ 值则对应水、甘油和山梨醇等小分子[10]。对于 WPI-C18 体系,对应自由脂质 $T_2$ 值(> 100 ms)的信号峰在储藏过程中迅速变小,并在1 d 后消失,表明其与蛋白质间发生相互作用,从而导致流动性下降。而对于 WPI-C14 体系来说,对应自由脂质的信号峰强度在储藏过程中几乎保持不变,表明绝大多数脂质依然处于自由状态,未与蛋白质结合。NaCN 和 SPI 体系中脂质对应的横向弛豫时间的变化趋势与 WPI 体系相似,进一步表明 C18 体系中脂质与蛋白质相互作用更强,限制了脂质分子的流动性。

### 2.4　体系中脂质相变温度的变化

采用示差扫描量热仪进一步研究模型体系中脂质相态的影响,其结果如图 6 所示。从图可见,当加入到模型体系中后,C14 和 C18 脂质的相变温度略为升高,相变峰变宽,并且在储藏过程中进一步升高。此现象可能是由于疏水相互作用诱导的蛋白

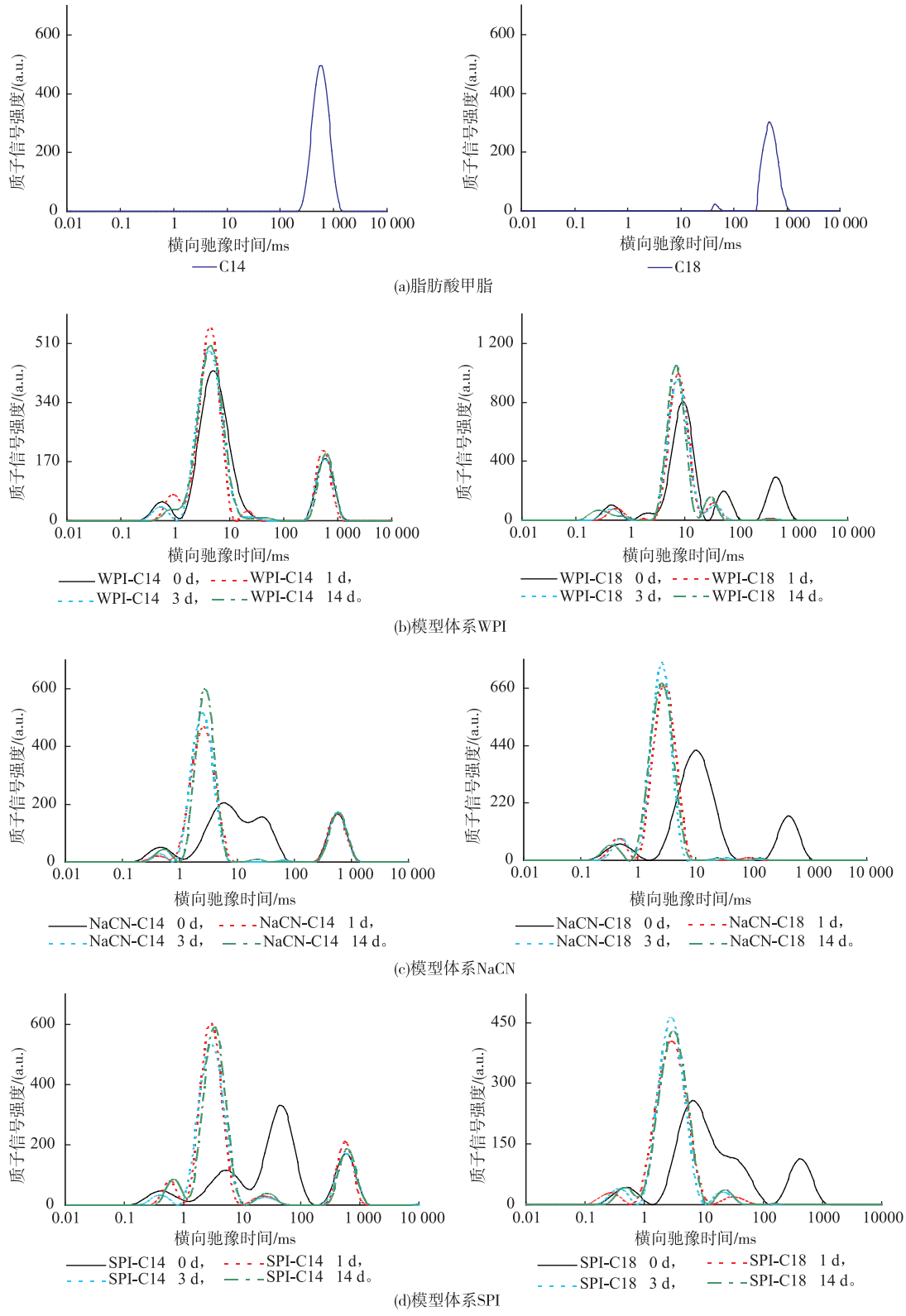
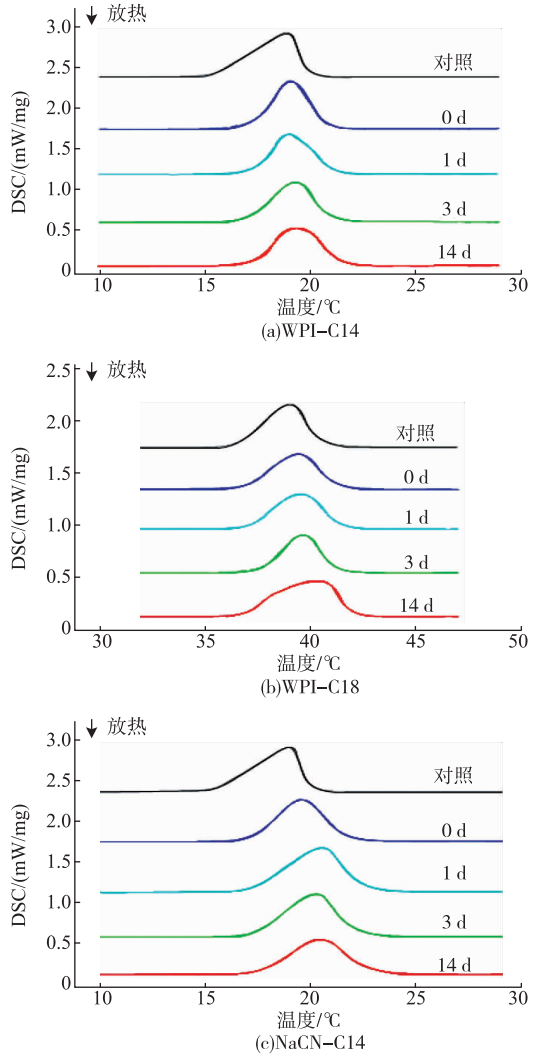


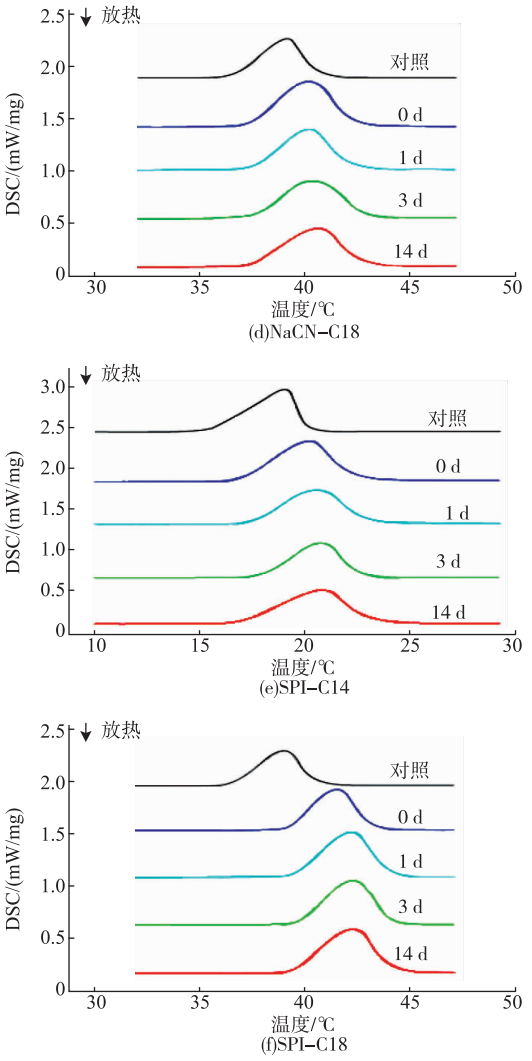

**图 5　脂肪酸甲酯的核磁共振结果及模型体系在储藏过程中的 $T_2$ 横向弛豫时间变化**

**Fig. 5　NMR results of pure methyl esters and changes in $T_2$ relaxation time distribution of the model systems during storage**

质和脂质结合所致。在所应用的 3 种蛋白质中,SPI 疏水性最强,WPI 疏水性最弱, 而相变温度升高的程度也与此相对应。

从以上结果可以看出,在模型体系储藏过程中同时存在两个互相拮抗的作用:一方面,由于表面能较大, 脂质小滴在储藏过程中趋向于互相融合,从而导致体系发生相分离[18];另一方面,脂质小滴与蛋白质之间的疏水相互作用促使脂质分子进入到连续相中。对于 C18 体系来说,由于固态相的脂质流动性相对较差,减弱了第一个方面的作用,并且未融合的脂质小滴具有更大的比表面积,进一步促进了其与蛋白质间的相互作用,即增强了第二个方面的作用。在这两方面的作用下,最终体系中的脂质处于两个不同的状态:自由存在于脂质小滴中以及通过疏水相互作用与蛋白质结合[12],这与体系的相变峰变宽是一致的。




对照:脂肪酸甲酯的 DSC 曲线

**图 6　模型体系在储藏过程中的 DSC 曲线**

**Fig. 6　DSC curves of the model systems during storage**

## 3 结　语

以 WPI、NaCN 和 SPI 为蛋白源,十四酸甲酯和硬脂酸甲酯为模型脂质,研究了脂质相态对高蛋白质中间水分食品储藏稳定性的影响。研究结果表明,当体系中的脂质处于液态相时,脂质与连续相(包括蛋白质、水分、山梨醇和甘油等)在储藏过程中发生相分离; 而当体系中的脂质处于固态相时,体系的相分离受到阻遏,脂质分子在储藏过程中逐渐进入到连续相中。另外,对于同一种蛋白质,含有固态脂体系的硬度较含有液态脂体系的硬度要大,然而含有固态脂的体系更为均一,不会产生出油现象。

## 参考文献:

[1] HOGAN S A,CHAURIN V,O'Kennedy B T,et al. Influence of dairy proteins on textural changes in high-protein bars[J]. **International Dairy Journal**,2012,26(1):58-65.

[2] CHILDS J L,YATES M D,DRAKE M A. Sensory properties of meal replacement bars and beverages made from whey and soy proteins[J]. **Journal of Food Science**,2007,72(6):425-434.

[3] BANACH J C,CLARK S,LAMSAL B P. Texture and other changes during storage in model high-protein nutrition bars formulated with modified milk protein concentrates[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2014,56(1):77-86.

[4] LOVEDAY S M,HINDMARSH J P,CREAMER L K,et al. Physicochemical changes in a model protein bar during storage[J]. **Food Research International**,2009,42(7):798-806.

[5] BANACH J C,CLARK S,LAMSAL B P. Microstructural changes in high-protein nutrition bars formulated with extruded or toasted milk protein concentrate[J]. **Journal of Food Science**,2016,81(2):332-340.

[6] RAO Q,KAMDAR A K,GUO M,et al. Effect of bovine casein and its hydrolysates on hardening in protein dough model systems during storage[J]. **Food Control**,2016,60:621-628.

[7] ZHOU P,GUO M F,LIU D S,et al. Maillard-reaction-induced modification and aggregation of proteins and hardening of texture in protein bar model systems[J]. **Journal of Food Science**,2013,78(3):437-444.

[8] BELCOURT L A,LABUZA T P. Effect of raffinose on sucrose recrystallization and textural changes in soft cookies [J]. **Journal of Food Science**,2007,72(1):65-71.

[9] MC Mahon D J,ADAM S L,MC Manus W R. Hardening of high-protein nutrition bars and sugar/polyol-protein phase separation [J]. **Journal of Food Science**,2009,74(6):312-321.

[10] LU N Y,ZHANG L,ZHANG X,et al. Molecular migration in high-protein intermediate-moisture foods during the early stage of storage:Variations between dairy and soy proteins and effects on texture[J]. **Food Research International**,2016,82:34-43.

[11] LOVEDAY S M,HINDMARSH J P,CREAMER L K,et al. Physicochemical changes in intermediate-moisture protein bars made with whey protein or calcium caseinate[J]. **Food Research International**,2010,43(5):1321-1328.

[12] LOPEZ C,BRIARD-BION V,BEAUCHER E,et al. Multiscale characterization of organization of triglycerides and phospholipids in emmental cheese:From microscopic to molecular level [J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**,2008,56(7):2406-2414.

[13] ALZAGTAT A A,ALLI I. Protein-lipid interactions in food systems:A review[J]. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**,2002,53(3):249-260.

[14] FARKYE N Y. Advanced dairy chemistry(Volume 2):Lipids[M]. New York:Springer US,2002:451-465.

[15] LINAEK H M,BROE M L,HOIER E,et al. Improving the yield of mozzarella cheese by phospholipase treatment of milk[J]. **Journal of Dairy Science**,2009,89(11):4114-4125.

[16] GAN C Y,CHEN L H,EASA A M. Physicochemical properties and microstructures of soy protein isolate gels produced using combined cross-linking treatments of microbial transglutaminase and Maillard cross-linking [J]. **Food Research International**,2008,41(6):600-605.

[17] BERTRAM H C,WIKING L,NIELSEN J H,et al. Direct measurement of phase transitions in milk fat during cooling of cream—A low-field NMR approach[J]. **International Dairy Journal**,2005,15(10):1056-1063.

[18] TOLSTOGUZOV V. Some thermodynamic considerations in food formulation[J]. **Food Hydrocolloid**,2003,17(1):1-23.