

# 顽固乳状液的破乳处理提高花生游离油提取率

迟延娜<sup>1</sup>, 张文斌<sup>1,2</sup>, 杨瑞金<sup>1,2\*</sup>, 华 霄<sup>1,2</sup>, 赵 伟<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 无锡 214122)

**摘 要:** 水相法同时提取花生油脂和蛋白质工艺中往往形成可观的乳状液, 经蛋白酶破乳可回收相当量的油脂, 但得到的顽固乳状液十分稳定, 需进一步研究其特性方可加以利用。该文对该顽固乳状液中可能起主要稳定作用的界面蛋白的电泳性质、疏水性、乳化活性及乳化稳定性进行了研究, 并通过激光共聚焦显微镜对顽固乳状液的微观结构进行了观察。结果表明, 水相取油工艺碱提过程中, 温度和 pH 值的协同作用, 使含疏水性碱性亚基较多的蛋白质的构象发生变化, 疏水基团暴露, 表面吸附能力增强, 促使乳状液稳定性提高。经酶解离心后, 顽固乳状液中的油滴数量和油滴粒径大小明显降低, 降解后形成的小分子亚基依赖二硫键的作用形成肽段聚集并紧紧吸附在油滴表面, 形成黏弹性的膜, 使得顽固乳状液稳定存在。应用超声辅助、冷冻解冻、热、极端 pH 值、乙醇辅助等方法处理顽固乳状液。结果显示, 冷冻解冻和乙醇辅助处理可使顽固乳状液中的油滴聚集。在乙醇体积分数为 50% 的条件下, 乙醇辅助处理可使顽固乳状液的破除率达 90% 以上, 从而使全工艺流程总游离油提取率从原来的 88% 提高到 93%, 极大地推进了水相法提取花生油脂工艺的产业化发展。

**关键词:** 稳定性; 蛋白质; 乳状液; 花生; 水相法

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2014.08.030

中图分类号: TS224; O648.2<sup>+</sup>3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2014)-08-0257-08

迟延娜, 张文斌, 杨瑞金, 等. 顽固乳状液的破乳处理提高花生游离油提取率[J]. 农业工程学报, 2014, 30(8): 257-264.

Chi Yanna, Zhang Wenbin, Yang Ruijin, et al. Destabilization of stubborn emulsion formed during aqueous extraction improving extraction rate of total free oil from peanut[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2014, 30(8): 257-264. (in Chinese with English abstract)

## 0 引 言

水相取油技术是一种新型的提油方法, 它以机械破碎和酶解为手段破坏植物细胞壁, 在提取过程中不需要有机溶剂, 提取的油脂不需要脱胶工序, 这样就降低了投资成本和能量消耗, 且在提油过程中一些油料中的有毒或抗营养因子能很好的除去。在提取油脂的同时, 有效回收原料中的蛋白质(或其水解产物)及碳水化合物, 解决中国优质蛋白资源短缺的问题。

自 20 世纪 70 年代, 水相法提油就逐步成为国内外学者研究的热点, 前后经过三波研究高潮。在花生<sup>[1-2]</sup>、大豆<sup>[3-4]</sup>、油菜籽<sup>[5-6]</sup>、玉米胚芽<sup>[7]</sup>、葵花籽<sup>[8-10]</sup>、南瓜籽<sup>[11]</sup>等多种作物中进行的应用研究表明, 乳状液的形成是制约水相提油工艺中油脂提取率的主要瓶颈之一。在油料磨浆和提油的过程中,

部分磷脂转移到油中, 与蛋白质结合并吸附在油滴表面形成稳定的乳状液<sup>[12]</sup>。雷丁大学 Rosenthal 等<sup>[13]</sup>在将乳状液稳定性列为水相取油工艺的重要指标, 指出以回收乳状液中油脂为目的的破乳环节是水相取油技术的一大难点。Rosenthal 等<sup>[13]</sup>还提出一些诸如减少水料比、控制磨浆程度、酶解油料蛋白等减少过程乳状液形成的方法。在最近 10 a 里, 与水相取油技术相关的乳状液的稳定性和破除技术研究<sup>[14-15]</sup>、油体的结构和性质<sup>[16]</sup>研究明显增多, 主要是因为乳状液的稳定性涉及到水相取油技术的经济性和潜在应用价值。Campbell 等<sup>[3]</sup>对不同大豆预处理方式所得乳状液的性质差异及其破乳方法进行了很好的综述。章绍兵等<sup>[6]</sup>对菜籽水酶法提油过程中形成的乳状液的破除进行过报道。王瑛瑶等<sup>[17]</sup>也探讨了花生水酶法提油过程中产生的乳状液的性质并进行破除研究, 但对未加酶的水相法工艺产生的乳状液及破乳后体系则没有进行研究。

近年来研究发现, 采用水相法可以得到接近传统水酶法工艺的游离油得率, 且所回收的蛋白组分功能性质更好, 应用前景凸显优势<sup>[18]</sup>。但花生水相取油过程中产生的乳状液较多, 采用蛋白酶破乳后, 残留的顽固乳状液中仍约含原料 6%~10% 的油脂。因此, 在尽可能减少乳状液生成量和破除乳

收稿日期: 2013-11-05 修订日期: 2014-03-28

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2012116); 国家“863”计划项目(2013AA102103 与 2013AA102104)

作者简介: 迟延娜(1989—), 女, 研究方向为酶应用技术。无锡 江南大学食品学院, 214122。Email: chiyanan@163.com

\*通信作者: 杨瑞金(1964—), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品生物技术及食品化学。无锡 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 214122。Email: yjrj@jiangnan.edu.cn

状液的同时,水相取油技术研究必须考虑顽固乳化体系的破除。本研究首次以未加酶的水相提油工艺中形成的不能被酶法完全破除的顽固乳状液为研究对象,研究顽固乳状液的微观结构、界面蛋白的性质,以及其不同处理下的稳定性,为提出有效破除顽固乳状液的方法、进一步提高花生水相提油工艺的总油提取率提供支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

脱皮花生,产地南通,购自无锡朝阳市场;荧光染料尼罗红(Nile red)和异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate)购自 sigma 公司;木瓜蛋白酶购自广西科学院生物研究所;低分子量标准蛋白购自 GE 生命科学有限公司(UK);N-乙基马来酰亚胺(NEM, N-ethylmaleimide), 8-苯胺萘磺-1-酸盐(anilinonaphthalene-8-sulfonate)、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺购自 Pharmacia 公司;四甲基乙二胺(tetramethyl ethylenediamine)购于 MERCK 公司;三(羟甲基)氨基甲烷(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)、甘氨酸、羟基乙醇、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)、氯仿、甲醇、乙醇等试剂均为分析纯,购自国药集团。

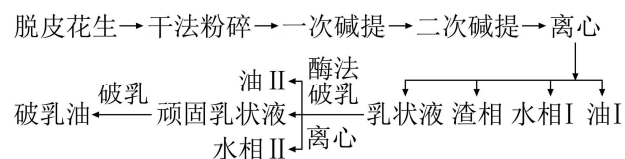
### 1.2 仪器与设备

中药粉碎机(山东省青州市精诚机械有限公司);MP-501A 超级恒温循环槽(上海一恒科技有限公司);Mini-protein tetra cell 垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);LSM710 激光共聚焦显微镜(德国蔡司公司);T50 高速分散器(德国 IKA 公司);自动消化装置(上海晟声自动化分析仪器有限公司);KDN-103F 自动定氮仪(上海纤检仪器有限公司);CT14D 型高速离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司);SIEMENS BCD-212 型冰箱(博西华家用电器有限公司);UV-1100 分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);FD-5 型冷冻真空干燥箱(上海离心机机械所)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 水相取油工艺中顽固乳状液的形成

花生水相取油工艺中顽固乳状液的形成工艺如下:



采用中药粉碎机将脱皮花生粉碎至平均粒径  $24\ \mu\text{m}$  左右,一次碱提条件为: pH 值 9,  $60^\circ\text{C}$  提取

30 min, 二次碱提时将 pH 值再次调回 9,  $60^\circ\text{C}$  下搅拌 4 h,  $3300\times g$  离心 20 min。酶法破乳条件: 木瓜蛋白酶, pH 值 7, 温度  $60^\circ\text{C}$ , 酶添加量  $9\ 000\ \text{U/g}$  底物蛋白, 酶解时间 4 h。

工艺中总油提取率定义如下:

$$\text{总油提取率} = \frac{(\text{油 I} + \text{油 II} + \text{破乳油})}{\text{花生原料中的总油质量}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 1.3.2 不同蛋白质的提取

花生原料蛋白的提取: 上述取油工艺中离心工序后, 除去渣相和油相, 将乳状液相和水相 I 用  $1\ \text{mol/L}$  的 HCl 调节 pH 值至 4.50 沉淀蛋白质, 离心后用水复溶并将体系调至中性, 冷冻干燥后得黄色粉末(残留部分油脂)。

蛋白粉末中油脂的脱除: 正己烷洗去粉末中残留的非极性油脂, 再用氯仿/甲醇(体积比 2:1)洗去残留的极性油脂, 抽滤除去有机试剂, 挥发去除残留溶剂, 冷冻干燥得花生原料蛋白粉。

水相中蛋白质的提取: 取上述工艺中的水相 I 进行与花生原料蛋白提取同样的操作, 冷冻干燥得水相中蛋白粉。

乳状液相及顽固乳状液相中蛋白质的提取: 将工艺中乳状液相及顽固乳状液相分别经  $15500\times g$  高速离心 20 min 后分为 3 层, 除去上层油相, 小心吸取下层水相, 然后将中间乳化层反复多次冷冻解冻, 采用花生原料蛋白提取相同的脱脂处理, 冷冻干燥, 分别得到乳状液相和顽固乳状液相中蛋白粉<sup>[17]</sup>。

#### 1.3.3 蛋白质电泳分析

还原态电泳: 根据 Laemmli<sup>[19]</sup>采用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶对不同种类蛋白质进行电泳分析。取  $5\ \text{mg/mL}$  蛋白溶液与样品缓冲液按 1:1 比例混合, 沸水浴 3 min,  $10000\times g$  离心 10 min, 取  $10\ \mu\text{L}$  样品液进行电泳分析。电泳开始用 80 V 电压, 等样品进入分离胶后换 120 V 电压。电泳完毕后, 用考马斯亮蓝 R-250 进行染色<sup>[20]</sup>。

非还原态电泳: 与还原态电泳处理蛋白质的方法基本一致, 但样品缓冲液中不含巯基乙醇, 另外为了防止样品加热处理过程中出现二硫键, 上样缓冲液中加入  $1\ \text{mmol/L}$  的 N-乙基马来酰亚胺 NEM<sup>[21]</sup>。

#### 1.3.4 蛋白质的疏水性、乳化性质及乳化稳定性测定

参考王瑛瑶等的方法测定疏水性<sup>[22]</sup>: 采用荧光探测剂 8-苯胺萘磺-1-酸盐 ANS 法, 将蛋白质样品溶于 pH 值 8,  $0.01\ \text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液配成浓度范围在  $0.15\sim 0.75\ \text{mg/mL}$  的系列样品。在激发波长为  $390\ \text{nm}$ , 发射波长为  $470\ \text{nm}$  的条件下, 取不同浓度的样品  $2\ \text{mL}$ , 测定荧光强度  $FI_0$ ; 在样品中加

入 10  $\mu\text{L}$  8 mmol/L 的 ANS 溶液后, 测定其荧光强度  $FI'$ 。  $FI_0$  与  $FI'$  的差值记为  $FI$ , 以蛋白质浓度为横坐标,  $FI$  为纵坐标做图, 曲线初始阶段的斜率记为蛋白质分子的表面疏水性指数  $S_0$ 。

参考 Pearce 等的方法测定各种蛋白质的乳化性和乳化稳定性<sup>[23]</sup>: 用去离子水配制 70 mL 质量浓度为 0.2 g/100 mL 蛋白质溶液, 加入花生油 10 mL, 室温下用高速分散器 13 500 r/min 乳化分散 1 min, 分别在 0 min 和 10 min 取样, 用 0.1% 十二烷基硫酸钠 SDS 稀释 50 倍, 取稀释后的样品测定 500 nm 处的吸光值  $A$ , 其浊度记为  $T$ , 乳化活性指标 (emulsifying activity index, EAI) 定义如下:

$$\begin{aligned} T &= 2.303 \times 50 A / L \\ \text{EAI} &= 2T / (1 - \Phi)C \end{aligned} \quad (2)$$

式中:  $\Phi$  为油相体积分数, %;  $C$  为单位体积水相中蛋白质的质量, g;  $L$  为光路长度, cm。乳化稳定性 (emulsion stability index, ESI) 用 10 min 时测定其浊度  $T_1$  的变化程度表示:

$$\text{ESI} = T_1 / T \quad (3)$$

### 1.3.5 共聚焦显微镜分析

分别取 1 mL 乳状液至 2 mL 的试管中, 加入 10  $\mu\text{L}$  尼罗红染料和 10  $\mu\text{L}$  异硫氰酸荧光素 FITC 染料, 高速震荡 5 min, 对乳状液中的油脂和蛋白质进行染色, 取一滴染色后的乳状液滴在载玻片上, 盖上盖玻片后 20 倍放大倍数的共聚焦显微镜下观察<sup>[24]</sup>。

### 1.3.6 顽固乳状液在不同物理化学处理下的稳定性

1) 超声处理: 将一定量的顽固乳状液在 100 kW 的功率下超声 20 min, 3300 $\times$ g 离心 20 min。

2) 反相法处理: 测定乳状液中油的质量百分比, 然后加入一定质量的花生油, 使乳状液中油的体积分数达到 85% 以上, 随后采用高速分散仪在 21 000 r/min 下对其剪切 5 min, 3300 $\times$ g 离心 20 min。

3) 极端 pH 值处理: 取一定量的顽固乳状液按 1:1 的比例加水稀释后用 2 mol/L 的 HCl 将体系 pH 值调节至 1.5、2.5、3.5, 用 2 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值 10、11、12, 3300 $\times$ g 离心 20 min, 计算破乳率, 取其最大值<sup>[25]</sup>。

4) 热处理: 将一定量的顽固乳状液在 95 $^{\circ}\text{C}$  水浴中加热 20 min, 3300 $\times$ g 离心 20 min。

5) 冷冻解冻处理: 将一定量顽固乳状液放入 -20 $^{\circ}\text{C}$  的冰箱中冷冻 24 h, 在 40 $^{\circ}\text{C}$  解冻 30 min, 3300 $\times$ g 离心 20 min。

6) 乙醇辅助处理: 用 50% 的乙醇与顽固乳状液按体积比 1:1 的比例混合后缓慢搅动洗涤

20 min, 3300 $\times$ g 离心 20 min。

分别称量破乳油的质量, 按罗紫·哥特里 (Rose-Gottlieb) 法测定乳状液中总油量<sup>[26]</sup>, 计算破乳率:

$$\text{破乳率} = \frac{\text{破乳油的质量}}{\text{顽固乳状液中的总油质量}} \times 100\% \quad (4)$$

### 1.3.7 表面蛋白浓度计算方法和 Stocks 公式

据 Agboola 等<sup>[27]</sup>的方法, 乳状液表面蛋白浓度 ( $\Gamma$ ) 的计算公式如下:

$$\Gamma = \frac{M_{P/O} \times D_{3.2} \times \rho_{\text{oil}}}{6} \quad (5)$$

式中:  $\Gamma$  是指乳状液表面蛋白浓度, mg/m<sup>2</sup>;  $M$  是指蛋白质和油脂的质量比;  $P$  是指顽固乳状液中蛋白质的含量, g;  $O$  是指乳状液中油脂的含量, g; 蛋白质的测定方法: 凯式定氮法 GB/T 5009.5-2003。油脂的测定方法: 参照罗紫·哥特里<sup>[26]</sup>的方法。  $D_{3.2}$  是指油滴的表面平均粒径, nm, 用激光光散射粒径分析仪测定,  $\rho_{\text{oil}}$  是指花生油的密度, g/cm<sup>3</sup>。

Stocks 公式 (6):

$$u_i = \sqrt{\frac{4d(\rho - \rho_s)w^2 R}{3\rho\zeta}} \quad (6)$$

式中:  $u_i$  为油滴在连续相中的沉降速率, m/s;  $d$  是指油滴的粒径, m;  $\rho$ ,  $\rho_s$ ,  $\zeta$ ,  $w$ ,  $R$  分别为连续相和分散相的密度 (kg/m<sup>3</sup>)、摩擦阻力系数、离心角速度 (r/s) 和旋转半径 (m)。

### 1.3.8 数据处理

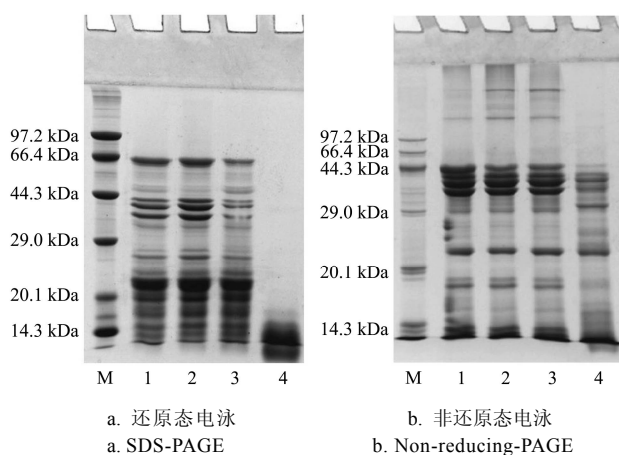
蛋白质疏水性、乳化活性和乳化稳定性、乳状液破除等试验数据均为 3 次重复的均值, 误差项以均方差表示, 数据方差分析采用 Sigmaplot 11.0 软件完成, 显著差异水平  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 顽固乳状液中蛋白质的电泳性质

图 1 显示了水相取油工艺所得乳状液酶法处理前后乳状液界面上蛋白的亚基组成情况。花生中的主要蛋白质种类有花生球蛋白、伴花生球蛋白和花生 2S 蛋白。Yamada 等<sup>[28]</sup>研究花生球蛋白的亚基组成, 证实花生球蛋白由 3 个分子质量较大的亲水性质的酸性亚基 (41、38.5、37.5 kDa) 和 3 个分子质量较小的疏水性质 (18 kDa) 的碱性亚基组成, 伴花生球蛋白由 60 kDa 的亚基组成。图 1a 结果证实了在花生原料、花生水相取油工艺所得水相以及乳状液界面中, 亚基组成具有很大相似性, 然而, 水相取油工艺中, 乳状液界面上富集的蛋白亚基与水相中的相比, 其伴花生球蛋白与分子量较大的酸性亚基比例较小。可能是由于碱提条件下, 温度和 pH

值的协同作用使得含疏水基团较多的花生蛋白的碱性亚基由卷曲状态舒展开来,导致原来包裹在里面的疏水基团暴露,卷曲结构外部的亲水基团减少,进而增强了这部分蛋白的疏水性质<sup>[29]</sup>,富集形成乳状液界面蛋白。但与二者相比,顽固乳状液界面蛋白体现了更大的差异,其酸性亚基及伴花生球蛋白亚基被充分降解,仅剩部分碱性亚基和较大的肽段富集在界面上。非还原电泳(图 1b)显示花生原料、花生水相取油工艺所得水相以及乳状液界面中蛋白亚基组成十分相近,表明乳状液界面上伴花生球蛋白、花生球蛋白碱性亚基等对二硫键有明显的依赖性。顽固乳状液界面上蛋白亚基非还原态下的组成与还原态下的组成差异十分显著,显示酶解作用已将乳状液中蛋白质的大分子亚基降解成小分子的亚基,这些小分子亚基通过二硫键连接在一起,形成了分子量范围在 10~50 kDa 内的肽段聚集体紧紧吸附在油水界面,在油滴周围形成黏弹性的膜,阻碍油滴的聚集,从而稳定着顽固乳状液。



注: M. 标准蛋白, 1.花生原料蛋白, 2.水相中蛋白, 3.乳状液相蛋白, 4. 顽固乳状液相蛋白

Note: M Marker, 1. Peanut protein, 2. Protein in the aqueous phase, 3. Protein in the emulsion phase, 4. Protein in the stubborn emulsion

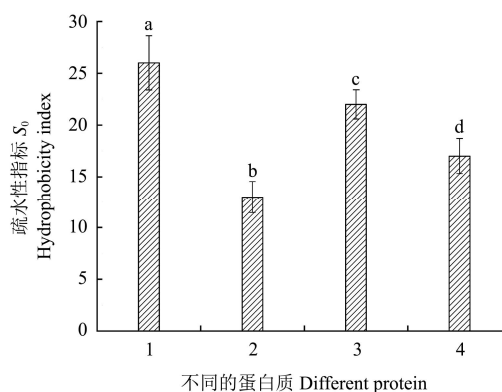
图 1 顽固乳状液中蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.1 Polyacrylamide gel electrophoresis of protein from different treatments

## 2.2 顽固乳状液中的蛋白质的疏水性质和乳化性质

顽固乳状液的稳定性与界面蛋白的功能性质密切相关。一些研究认为蛋白质的疏水性越强,界面上蛋白质的浓度就会越大,界面张力越低,乳状液越稳定<sup>[30]</sup>。结合上述电泳结果分析可知,碱提过程中,温度和 pH 值的协同作用使得含疏水基团较多的花生蛋白的碱性亚基由卷曲状态舒展开来,导致原来包裹在里面的疏水基团暴露,进而使得乳状液相蛋白质的疏水性明显高于水相中蛋白质的疏水性(图 2)。顽固乳状液中蛋白质的疏水性质均

值与乳状液相蛋白的疏水性质均值也存在差异,这是由于乳状液中蛋白质在蛋白酶处理过程中,表面蛋白质的部分肽键断裂,肽段长度明显降低,疏水性也出现显著变化,使得顽固乳状液有着与乳状液不同的稳定性质。图 3 表明顽固乳状液的乳化性质和乳化稳定性均明显低于乳状液中的蛋白质(图 3),这可能是由于界面蛋白在水解时分子刚性降低,球形分子数目减少,线形分子数目增大,进而提高了蛋白质的分子柔性,使得蛋白质分子在油水界面上的排列更为有序<sup>[31-32]</sup>,形成的蛋白质薄膜具有良好的黏弹特性和抗应变能力,乳液稳定性较高。但当水解度过高时,蛋白质过高的水溶性破坏了其乳化稳定所需的亲水亲油平衡性,电荷的大幅度增加打破了形成表面活性层平衡,减少界面张力能力降低,乳化能力随之降低,对乳液稳定性也十分不利<sup>[32]</sup>。



注: 1. 花生原料蛋白, 2. 水相中蛋白, 3. 乳状液相蛋白, 4. 顽固乳状液相蛋白; 误差线上标注的字母不同表明数据存在差异显著 ( $p < 0.05$ ), 下同。

Note: 1. Peanut protein, 2. Protein in the aqueous phase, 3. Protein in the emulsion phase, 4. Protein in the stubborn emulsion. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ); The same as below.

图 2 不同蛋白质的表面疏水性质  
Fig.2 Hydrophobicity of different proteins

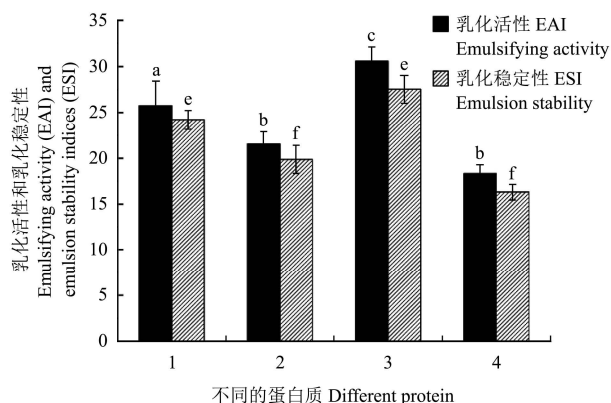
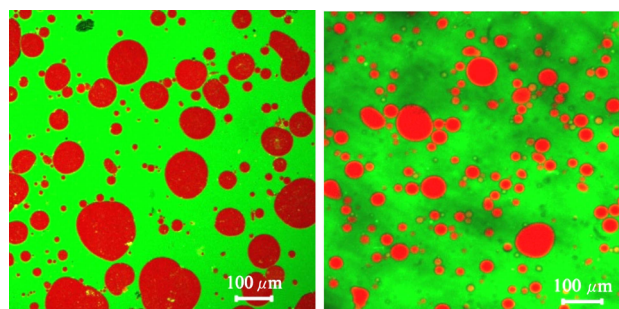


图 3 不同蛋白质的乳化活性和乳化稳定性  
Fig.3 Emulsifying activity and emulsion stability indices of different proteins

## 2.3 顽固乳状液的微观结构

表面蛋白浓度 ( $\Gamma$ ) 是用来表征乳状液稳定性的一个指标。表面蛋白浓度越高, 油滴越难聚集, 乳状液越稳定<sup>[33]</sup>。通过相同放大倍数的共聚焦显微镜对乳状液和顽固乳状液的微观结构进行观察, 由试验结果可知 (见图 4), 与乳状液相比, 顽固乳状液中油滴的数量和油滴粒径 ( $D$ ) 大小明显降低, 且顽固乳状液是在乳状液酶解后离心除去部分油脂和水相后的非水体系中形成的, 蛋白质和油脂的比例 ( $M$ ) 更大, 因此表面蛋白浓度 ( $\Gamma$ ) 明显变大, 乳状液更稳定。由 Stocks 公式可知乳液体系的油滴聚集速度与油滴的粒径的平方根成正比, 粒径越小, 聚集速度越小, 乳状液越稳定。酶解过后, 顽固乳状液中的油滴粒径变小, 表面蛋白浓度增大, 油滴聚集速度减慢, 顽固乳状液更加稳定。因此, 在顽固乳状液界面蛋白的疏水性质和乳化性质并不比乳状液中界面蛋白高的情况下, 顽固乳状液形成过程中的动力学因素成为导致其天然稳定性的主因<sup>[32]</sup>。



a. 乳状液  
a. Emulsion  
b. 顽固乳状液  
b. Stubborn emulsion

注: 红色代表油脂, 绿色代表蛋白质。  
Note: Red stands for oil, green stands for protein.

图 4 乳状液及顽固乳状液的激光共聚焦显微结构  
Fig.4 Emulsion and stubborn emulsion observation with confocal laser scanning microscopy

## 2.4 顽固乳状液的稳定性及失稳方法

尽管顽固乳状液在蛋白酶处理下已经较为稳定, 它在其他物理、化学作用下可能有不同表现。由图 5 可知, 超声处理并没能将油滴周围的蛋白质打散, 反而可能带来进一步的乳化。在转相法处理条件下, 顽固乳状液可以保持较好的稳定性, 在极端 pH 值和热处理后, 顽固乳状液出现部分失稳, 破乳率分别为 65.88%和 56.77%。冷冻解冻和乙醇辅助处理后, 顽固乳状液失稳较明显。其中冷冻解冻条件下, 顽固乳状液的破乳率可达 81.5%, 而乙醇属于水溶性破乳剂, 溶于连续相后可通过分子扩散到油水界面, 改变界面性质, 实现乳状液的破除, 曾被用于柴油生物脱硫乳状液<sup>[34]</sup>和油茶籽<sup>[35]</sup>提油

过程中乳状液的破乳。试验发现, 经 50%乙醇处理后顽固乳状液稳定性明显下降, 破乳率可高达 90%左右, 可使总油提取率由原来的 88%提高到 93%左右, 且乙醇可以回收利用, 是理想的破乳剂。

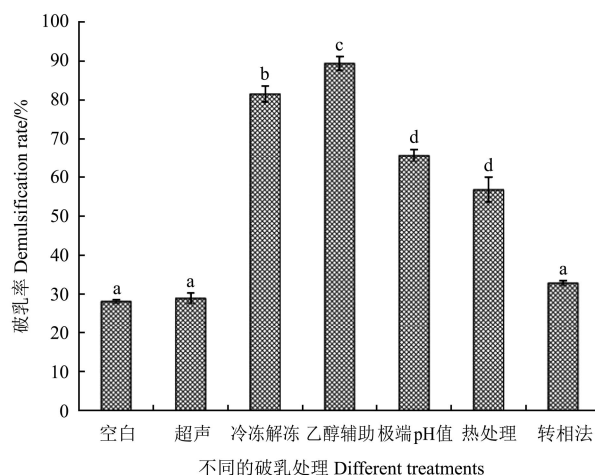
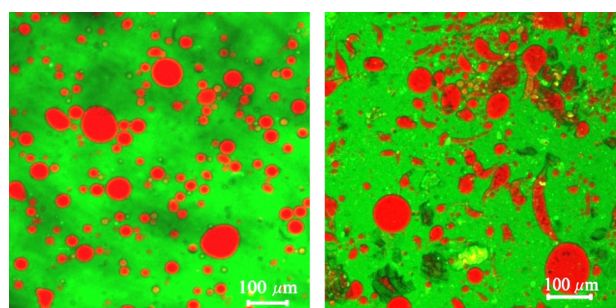
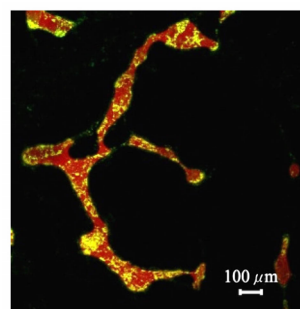


图 5 不同处理方式下顽固乳状液的破乳率  
Fig.5 Demulsification rate of stubborn emulsion with different treatment

对 2 种破乳效果相对较好的工艺处理前后的乳状液进行共聚焦观察, 发现冷冻解冻后乳状液的油滴由原来的分散状态聚集成较大油滴或成串状 (图 6b), 但仍有部分细小油滴无法聚集回收。合适的乙醇辅助处理条件下, 乙醇的强亲水性和适中



a. 处理前的乳状液  
a. Before treatments  
b. 冷冻解冻处理后  
b. After freezing-thaw



c. 乙醇辅助处理后  
c. After ethanol-assistant treatment

图 6 破乳处理前后顽固乳状液的激光共聚焦图像  
Fig.6 Changes of emulsion microstructure after freezing-thaw and ethanol addition treatment



密度正好使乙醇遍布整个乳化层。由于它对水相有强烈的亲和作用,改变了水相环境和水膜原来的结构<sup>[34]</sup>,同时对支撑分散相界面膜的双亲表面活性分子的亲水端有吸附作用。这种拉拽力改变了界面膜的稳定性,有利于油相小滴聚集成大液滴并逐渐浮到上层形成油相,导致顽固乳状液失稳,取得了较高的破乳率<sup>[36]</sup>。正如乙醇处理后的图像(图 6c)所示,油脂(单独为红色)和蛋白质(单独为绿色)呈现明显的叠加(显示黄色),说明蛋白质聚集,油滴聚集上浮在蛋白质的表面,离心处理即可回收破乳油。所以乙醇辅助处理是使花生水相取油过程中不能被酶法破除的顽固乳状液失稳的理想工艺,对比前期水相取油工艺<sup>[18]</sup>,顽固乳状液破乳后可使全工艺流程的游离油提取率由原来的 88%提高到 93%左右。

### 3 结 论

1) 花生水相取油过程中由于碱提过程中温度和 pH 值的协同作用,使得含疏水碱性亚基较多的蛋白质构象发生变化,疏水基团暴露,表面吸附能力增强,从而更易与油脂紧密吸附,促使乳状液稳定性提高。经酶解作用后,被降解后形成的小分子亚基依赖二硫键的作用形成肽段聚集,紧紧吸附在油滴表面,形成黏弹性的膜,使得顽固乳状液稳定。

2) 通过共聚焦显微镜对乳状液和顽固乳状液微观结构观察发现,顽固乳状液中油滴数量和粒径大小明显降低,这表明顽固乳状液表面蛋白浓度更高,油滴聚集速度更小,稳定性更好。在顽固乳状液界面蛋白乳化性质并不高于乳状液界面蛋白的情况下,顽固乳状液形成的动力学因素成为导致其天然稳定性的主因。

3) 乙醇是一种理想的破乳剂,顽固乳状液在 50%的乙醇辅助处理后,稳定性明显降低,破乳率可高达 90%左右。通过乙醇对顽固乳状液的破乳,全工艺流程的总游离油提取率也由原来的 88%提高到 93%。

#### [参 考 文 献]

- [1] Wang Yingyao, Wang Zhang, Cheng Shangwei, et al. Aqueous enzymatic extraction of oil and protein hydrolysates from peanut[J]. Food Science and Technology Research, 2008, 14(6): 533—540.
- [2] Jiang Lihua, Hua Di, Wang Zhang, et al. Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates[J]. Food and Bioproducts Processing, 2010, 88(2): 233—238.
- [3] Campbell K A, Glatz C E, Johnson L A, et al. Advances in aqueous extraction processing of soybeans[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2011, 88(4):

449—465.

- [4] de Moura J, Johnson L. Two-Stage countercurrent enzyme-assisted aqueous extraction processing of oil and protein from soybeans[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2009, 86(3): 283—289.
- [5] 章绍兵,王璋. 水酶法从菜籽中提取油及水解蛋白的研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(9): 213—219.  
Zhang Shaobing, Wang Zhang. Aqueous enzymatic extraction technology of oil and protein hydrolysates from rapeseed[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2007, 23(9): 213—219. (in Chinese with English abstract)
- [6] Zhang Shaobing, Wang Zhang, Xu Shiyong. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007, 84(1): 97—105.
- [7] 钱志娟,王璋,许时婴,等. 玉米胚芽水酶法提油及蛋白质的回收[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(5): 58—62.  
Qian Zhijuan, Wang Zhang, Xu Shiyong, et al. Aqueous enzymatic extraction of corn germ oil and recovering protein[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2004, 23(5): 58—62. (in Chinese with English abstract)
- [8] Campbell K A. Protein and Oil Recoveries from Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Soybeans and Sunflower Seed[D]. Iowa State: Iowa State University, 2010.
- [9] Latif S, Anwar F. Effect of aqueous enzymatic processes on sunflower oil quality[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2009, 86(4): 393—400.
- [10] 冷玉娴,许时婴,王璋,等. 水酶法提取葵花籽油的工艺[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(10): 127—131.  
Leng Yuxian, Xu Shiyong, Wang Zhang, et al. Aqueous enzymatic extraction of sunflower seeds oil[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(10): 127—131. (in Chinese with English abstract)
- [11] 王丽波,徐雅琴,杨昱,等. 南瓜籽油的水酶法提取工艺及产品的理化性质[J]. 农业工程学报, 2011, 27(10): 383—387.  
Wang Libo, Xu Yaqin, Yang Yu, et al. Aqueous enzymatic extraction of pumpkin seeds oil and its physical-chemical properties[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2011, 27(10): 383—387. (in Chinese with English abstract)
- [12] 王文侠,任健. 植物油水酶法浸提工艺研究进展[J]. 现代食品科技, 2005, 21(2): 182—185.  
Wang Wenxia, Ren Jian. Summarization on plant oil extraction technology by aqueous enzymatic hydrolysis[J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(2): 182—185. (in Chinese with English abstract)
- [13] Rosenthal A, Pyle D, Niranjana K. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19(6): 402—420.

- [14] Jung S, Maurer D, Johnson L A. Factors affecting emulsion stability and quality of oil recovered from enzyme-assisted aqueous extraction of soybeans[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(21): 5340—5347.
- [15] Wu J, Johnson L A, Jung S. Demulsification of oil-rich emulsion from enzyme-assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(2): 527—533.
- [16] 程红焱, 宋松泉. 种子的贮油细胞器——油体及其蛋白[J]. *植物学报*, 2006, 23(4): 418—430.  
Cheng Hongyan, Song Songquan. Seed lipid storage organelles: Oil bodies and their proteins[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2006, 23(4): 418—430. (in Chinese with English abstract)
- [17] 王瑛瑶, 王璋, 罗磊. 水酶法提花生油中乳状液性质及破乳方法[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(12): 259—263.  
Wang Yingyao, Wang Zhang, Luo Lei. Property of the emulsion formed in aqueous enzymatic extraction of oil from peanut and demulsification methods[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2008, 24(12): 259—263. (in Chinese with English abstract)
- [18] 朱凯艳. 利用水相同时提取花生油和蛋白工艺的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.  
Zhu Kaiyan. Studies on Simultaneous Aqueous Extraction of Peanut Oil and Protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [19] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680—685.
- [20] Zhang Yanpeng, Zhao Wei, Yang Ruijin, et al. Preparation and functional properties of protein from heat-denatured soybean meal assisted by steam flash-explosion with dilute acid soaking[J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 119(1): 56—64.
- [21] Zhao Wei, Yang Ruijin. Pulsed electric field induced aggregation of food proteins: Ovalbumin and bovine serum albumin[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, 5(5): 1706—1714.
- [22] 王瑛瑶, 王璋. 水酶法从花生中提取油与水解蛋白的研究[J]. *食品与机械*, 2005, 21(3): 17—20, 23.  
Wang Yingyao, Wang Zhang. Investigation of aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates[J]. *Food and Machinery*, 2005, 21(3): 17—20, 23. (in Chinese with English abstract)
- [23] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26(3): 716—723.
- [24] Kerstens S, Murray B S, Dickinson E. Microstructure of  $\beta$ -lactoglobulin-stabilized emulsions containing non-ionic surfactant and excess free protein: influence of heating[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, 296(1): 332—341.
- [25] Jiang J, Chen J, Xiong Y L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(16): 7576—7583.
- [26] 大连轻工业学院, 华南理工大学, 郑州轻工业学院, 等. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [27] Agboola S O, Singh H, Munro P A, et al. Stability of emulsions formed using whey protein hydrolysate: Effects of lecithin addition and retorting[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(5): 1814—1819.
- [28] Yamada T, Aibara S, Morita Y. Isolation and some properties of arachin subunits[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1979, 43(12): 2563—2568.
- [29] 黄曼, 卞科. 理化因子对大豆蛋白疏水性的影响[J]. *郑州工程学院学报*, 2002, 23(3): 5—9.  
Huang Man, Bian Ke. Effects of physicochemical factors on the hydrophobicity of soybean protein[J]. *Journal of Zhengzhou Institute of Technology*, 2002, 23(3): 5—9. (in Chinese with English abstract)
- [30] 周瑞宝, 周兵. 蛋白质的生物和化学改性[J]. *中国油脂*, 2000, 25(6): 181—185.  
Zhou Ruibao, Zhou Bing. Biological and chemical modification of protein[J]. *China Oils and Fats*, 2000, 25(6): 181—185. (in Chinese with English abstract)
- [31] Kato A, Komatsu K, Fujimoto K, et al. Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1985, 33(5): 931—934.
- [32] 赵国华, 明建, 陈宗道. 酶解大豆分离蛋白乳化特性的研究[J]. *中国粮油学报*, 2002, 17(2): 48—50.  
Zhao Guohua, Ming Jian, Chen Zongdao. Emulsifying properties of enzymatic degraded soybean protein isolate[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2002, 17(2): 48—50. (in Chinese with English abstract)
- [33] Chabrand R M, Kim H J, Zhang C, et al. Destabilization of the emulsion formed during aqueous extraction of soybean oil[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2008, 85(4): 383—390.
- [34] 马挺, 李京浩, 王仁静, 等. 柴油生物脱硫乳状液的破乳[J]. *化工学报*, 2005, 56(4): 694—698.  
Ma Ting, Li Jinghao, Wang Renjing, et al. De-emulsion after diesel oil biodesulfurization[J]. *Journal of the Chemical Industry and Engineering (China)*, 2005, 56(4): 694—698. (in Chinese with English abstract)
- [35] 李强, 杨瑞金, 张文斌, 等. 乙醇对油茶籽油水相提取的影响[J]. *中国油脂*, 2012, 37(3): 6—9.  
Li Qiang, Yang Ruijin, Zhang Wenbin, et al. Influence of ethanol on aqueous extraction of oil-tea camellia seed oil[J]. *China Oils and Fats*, 2012, 37(3): 6—9. (in Chinese with English abstract)
- [36] 宋世谟, 王正烈, 李文斌. 物理化学: 下册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995.

## Destabilization of stubborn emulsion formed during aqueous extraction improving extraction rate of total free oil from peanut

Chi Yanna<sup>1</sup>, Zhang Wenbin<sup>1,2</sup>, Yang Ruijin<sup>1,2✉</sup>, Hua Xiao<sup>1,2</sup>, Zhao Wei<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Food Science and Technology School of Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** During aqueous processing of peanuts for simultaneous oil extraction and protein recovery, large amounts of emulsion could be formed and after enzymatic demulsification, substantial amounts of oil would be recovered while stubborn emulsions still remain. The destabilization of the stubborn emulsion is the key to improve the total free oil yield. Before its utilization and further destabilization, studying the characterization of the stubborn emulsion, especially its surface protein, which may play an essential role in emulsion stabilization, was necessary. The surface protein was extracted and its electrophoresis property, hydrophobicity, emulsifying activity, as well as emulsifying stability were studied. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used to investigate its microstructure. It was found that, though the protein from the emulsion surface had similar subunits (60, 41, 38.5, 37.5, and 18 kDa) with that from aqueous phase, its hydrophobicity and emulsion activity was significantly higher. This could be attributed to the synergistic effect of temperature and pH during the alkaline extraction, which led to the unfolding of some large peanut protein molecules containing hydrophobic basic arachins. This, consequently, caused the exposure of more hydrophobic groups and enhanced the hydrophobic and emulsifying properties of the protein. Thus emulsion formation was promoted. After enzymatic treatment, the protein in the emulsion was hydrolyzed into short peptides and no subunits with molecular weight higher than 20 kDa had been detected in Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). However, in non-reducing PAGE, except for the conarachin band of 60 kDa, protein from the stubborn emulsion surface showed similar bands with that from the emulsion surface and aqueous phase. This indicated that the hydrolyzed protein could still gather on the stubborn emulsion surface and contributed to its stability. Due to the hydrolysis of protein molecules, the hydrophobic property and emulsifying activity of protein from stubborn emulsion was lower than that from an untreated emulsion surface. CLSM observation showed that stubborn emulsion had less oil droplets and that their size was lower, while the surface protein concentration ( $\Gamma$ ) was higher, as compared with untreated emulsion. This explained the high stability of stubborn emulsion, though its surface protein has lower surface activity. To demulsify the stubborn emulsion, various treatments, including ultrasound, freeze-thaw, heating, extreme pH value, phase inversion, or ethanol addition were attempted. Free oil was obtained after centrifugation and total free oil yield was calculated thereafter. The microstructure of the stubborn emulsion after different treatments was also observed with CLSM. Results show that freeze-thaw and ethanol addition could remarkably aggregate the oil droplets in stubborn emulsion, especially after 50% ethanol addition, most oil droplets were combined and 90% of the oil in stubborn emulsion could be recovered. Under this condition, the total free oil yield could be increased to 93% from 88% in the overall process.

**Key words:** stability; proteins; emulsions; peanut; aqueous processing

(责任编辑: 刘丽英)