

水酶法提花生油中乳状液性质及破乳方法

王瑛瑶^{1,2}, 王璋^{2*}, 罗磊³

(1. 国家粮食局科学研究院, 北京 100037; 2. 江南大学食品学院, 无锡 214122;

3. 河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471003)

摘要: 为了破除花生水酶法提油时形成的乳状液, 提高出油率, 研究了乳状液的性质, 比较了界面吸附肽和水相中肽的相对分子质量分布、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和反相色谱图, 发现使乳状液稳定的界面吸附肽性质主要与其构象、组成、电荷等性质有关。通过测定乳状液的静态、动态流变学性质发现, 该乳状液是一个典型的以弹性为主的体系, 随温度及剪切速率的提高, 乳状液的稳定性下降。在上述研究基础上, 采用4种物理机械方法破乳, 结果显示, 冷冻解冻结合离心的方法破乳效果最佳, 乳状液中油回收率超过91.6%; 而高速剪切是一个再乳化的过程, 不能回收乳状液的油。

关键词: 水酶法, 肽, 乳状液, 破乳, 花生

中图分类号: TS224

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2008)-12-0259-05

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 CSAE, 2008, 24(12): 259—263.(in Chinese with English abstract)

0 引言

水酶法提油技术是新近国内外比较关注的油脂提取技术, 它最显著的优势是: 作用条件温和、能耗低; 避免使用有机溶剂; 得到的油透明、清香, 后续精炼工艺少、成本低; 能同时回收油料中的蛋白质、可溶性糖类物质。但现在很多研究表明, 对于一些蛋白质含量高的油料作物, 采用水酶法提油过程中, 会不同程度地形成乳状液, 从而给工艺的下游操作及经济效益带来限制。

为此, 工艺中需要优化操作参数(包括物料前处理方式、酶品种、酶复配、酶添加次序、酶作用条件等), 以避免形成稳定的乳状液。在工艺设计中, 必须同时考虑游离油得率、蛋白质等的回收率、乳状液稳定性乃至回收的蛋白质等物质的功能特性等多种指标。如椰子^[1]、玉米胚芽^[2]在水酶法处理工艺中, 虽然会形成乳状液, 但乳状液稳定性低, 非常容易破乳回收其中的油, 工艺技术简单可行。然而对于大豆, 采用水酶法提油虽然能得到等电点可溶的水解蛋白, 但工艺中形成的稳定乳状液限制了油得率^[3,4], 影响了工艺的技术、经济可行性。

20世纪70年代末以来, 国内外学者对不同油料的水酶法提油进行了各种探索, 但大部分研究集中在工艺路线、操作参数方面。迄今为止, 对水酶法提油中形成的乳状液性质及如何进行破乳研究报道极少。蛋白质具有很好的界面稳定特性, 本文以花生水酶法提油中形成的乳状液为研究对象, 比较了界面吸附蛋白和水相中蛋白的性质差异, 研究了乳状液的流变学特性, 在此基础上,

比较几种物理破乳方法的效果, 以期水酶法工艺中筛选破乳方法、优化破乳参数奠定基础。

1 材料与方法

1.1 乳状液形成工艺

乳状液形成工艺参照文献[6]方法, 花生粉碎(平均粒径为28.79 μm)→加入5倍体积的水→碱提→酶解→离心→(离心后的一相)乳状液

碱提条件为: pH8.50, 温度60℃, 提取时间30 min; 酶解条件: 60℃, pH 8.50, 加入1.5% (酶体积与蛋白质质量之比), 蛋白酶Alcalase酶解5 h; 离心条件: 3000 r/min, 离心10 min。

1.2 仪器

812型磁力恒温搅拌器(上海华岩仪器设备有限公司), TG16-WS台式高速离心机(湘潭离心机有限公司), DY-501型电泳仪(上海万达科技器材服务部); AR1000型流变仪(美国TA公司)。

1.3 方法

1.3.1 乳状液主要成分的测定

乳状液水分的测定: 真空干燥法^[5]; 乳状液蛋白质的测定: 凯氏定氮法^[5]; 乳状液油脂的测定: 罗紫-哥特里(Rose-Gottlieb)法^[5]; 乳状液纤维的测定: 酸性洗涤纤维法^[5]; 乳状液淀粉的测定: 酸水解法^[5]。

1.3.2 乳状液水相中和界面上肽的分离

参考文献[7,8]方法, 分离乳状液水相中和界面上肽。30 g乳状液室温下以10000 r/min离心10 min, 乳状液分为3层: 油相、乳化层和水相。去除油相后, 用注射器移取下层水相, 并加入适量的氯仿/甲醇(2:1, V/V), 10000 r/min离心10 min, 取出上层, 旋转蒸发脱去有机溶剂后冷冻干燥得到处于乳状液水相中的肽。

乳化层重新分散到20 mL pH7.0的20 mmol/L磷酸钾缓冲液中, 加入Tween 20使其最终浓度为1%, 室温下

收稿日期: 2007-11-16 修订日期: 2008-04-08

作者简介: 王瑛瑶(1978—), 女, 浙江人, 博士, 副研究员, 主要从事粮油深加工与脂质技术研究。北京 国家粮食局科学研究院, 100037。

Email: wyy@chinagrains.org

*通讯作者: 王璋(1941—), 男, 教授, 主要从事食品生物技术的教学与科研。无锡 江南大学食品学院, 214122

搅拌 1 h, 然后加入氯仿/甲醇 (2:1, V/V) 3 mL, 10000 r/min 离心 10 min, 取出上层, 旋转蒸发脱去其中的有机溶剂, 用 C_{18} 吸附柱过滤透析液并冷冻干燥得到吸附在乳状液界面上的肽。

1.3.3 乳液水相中肽与界面吸附肽的性质分析

1) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

取 20% 乳状液水相中肽和界面吸附肽各 10 μ L 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对电泳胶带扫描并进行图谱分析^[10]。

2) 相对分子质量分布的凝胶色谱

用 Sepharose CL-6B (ϕ 1.6 cm \times 100 cm) 凝胶柱过滤色谱法测定肽相对分子质量的分布, 洗脱液: 0.05 mol/L, pH9.5 的 $Na_2B_4O_7$ -NaOH 溶液, 洗脱液流速: 18 mL/h; 相对分子质量 (M_w) 校正曲线所用标准品: 甲状腺球蛋白 (M_w 669000)、铁蛋白 (M_w 440000)、过氧化氢酶 (M_w 232000)、醛缩酶 (M_w 158000)、牛血清白蛋白 (M_w 67000), 相对分子质量 (M_w) 与洗脱体积 (x) 的回归方程是 $\lg M_w = -0.009x + 6.511$, $R = 0.9922$ 。

3) 反相高效液相色谱

WatersTM650E HPLC 系统, 色谱柱: BondaparkTM C18; 检测器: Dual λ Absorbance Detector 220nm; 进样量: 20 μ L; 流速 1 mL/min; 洗脱条件: 乙腈梯度洗脱, 在 0~45 min 之内, 乙腈浓度由 0 上升到 100%。

1.3.4 乳状液静态流变性质

采用 AR1000 型流变仪测定乳状液在剪切速率为 $5s^{-1}$, 升温速率为 $5^\circ C/min$ 条件下黏度随温度的变化。

采用 AR1000 型流变仪测定乳状液在 $25^\circ C$ 时黏度随剪切速率的变化。

1.3.5 乳状液动态流变性质

采用 AR1000 型流变仪, 选择直径为 40 mm 不锈钢平行板测量系统, 平行板间距为 1 mm, 测定乳状液复合模量 G^* 随振荡应力的变化。复合模量 G^* 恒定的振荡应力区为线性黏弹区。在线性黏弹区范围内, 固定振荡应力, 测定乳状液样品的储能模量 G' 、损耗模量 G'' 和动力学黏度 η' 随振荡频率的变化。

1.3.6 物理机械破乳

取相同质量的乳状液, 分别采用如下方法破乳, 收集油层, 真空干燥至恒重, 称量。

冷冻解冻: 乳状液在 $-20^\circ C$ 冻结 15 h, 然后在 $35^\circ C$ 解冻 2 h, 3000 r/min 离心 20 min;

高速剪切: 乳状液用高速分散器在 21000 r/min 下剪切 5 min, 然后 3000 r/min 离心 20 min;

加热离心: 把乳状液加热到 $90^\circ C$ 并保持 10 min, 3000 r/min 离心 20 min;

微波破乳: 微波辐射 (功率 850 W, 频率 915 MHz) 2 min, 3000 r/min 离心 20 min。

1.3.7 破乳效果的评价

$$\text{乳状液中油回收率} = \frac{\text{破乳离心后得到的油质量}}{\text{乳状液中油质量}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 乳状液成分

用冲淡法测定乳状液的类型, 将两滴乳状液放在载玻片上, 一滴中加入水, 一滴中加入油, 轻轻搅拌, 在 $10\times$ 显微镜下观察, 发现水相易于和乳状液搀合在一起, 所以得到的是 O/W 型乳状液。乳状液主要成分见表 1。从中可以看出, 乳状液中油的比例占到 43.97%, 蛋白质含量为 5.59%, 此外, 还有少量淀粉与纤维颗粒。这些组分的存在, 可以降低界面张力或是在液滴间形成静电或空间阻碍, 防止液滴絮凝或者聚集。此外, 它们还可以增加有效吸附层的厚度和界面黏度, 使乳状液具有空间和时间上的稳定性。这意味着要破坏乳状液的稳定性达到相分离是有难度的。

表 1 乳状液主要成分

Table 1 Main components of the emulsion					
组分	水	油	蛋白质	淀粉	纤维
含量/%	44.53 \pm 0.31	43.97 \pm 0.20	5.59 \pm 0.19	2.11 \pm 0.27	3.68 \pm 0.17

2.2 酶解对乳状液中蛋白质的影响

两亲的蛋白质不仅有助于乳状液的形成, 而且还是乳状液的稳定剂。本文体系中, 花生蛋白质经过蛋白酶水解以后, 水解度 (DH) 在 20% 左右^[6], 理论上形成的肽类物质已不足以起到稳定乳状液的作用。但在实际体系中, 并非如此。

非变性聚丙烯酰胺 (PAGE) 分离蛋白质的原理是基于蛋白质的分子量、形状和所带电荷的不同, 蛋白质作为乳状液界面大分子稳定剂, 其上述性质都会影响乳状液的稳定性。从图 1 可以看出, 界面吸附肽与乳状液水相中肽的 PAGE 电泳图有明显差异。界面吸附肽中 4 号峰的光密度积分占总量的 41.9%, 这组分的特性可能为乳状液的稳定性做了很大的贡献。从图 2 可以看出, 界面吸附肽和水相中肽的相对分子质量都主要集中在 71.9 万、23.8 万、11.1 万和 8.5 万, 而且主要以 11.1 万和 8.5 万的组分为主。参考图 1、图 2 结果推断认为, 界面吸附的肽之所以能稳定乳状液, 不仅是因为它相对分子质量较大, 具有较长的链, 能形成较厚的保护层围绕在粒子周围, 提供较好的抗絮凝与聚结作用, 这部分肽具有良好乳化稳定作用与其构象、氨基酸组成、带电性质也有很大关系。

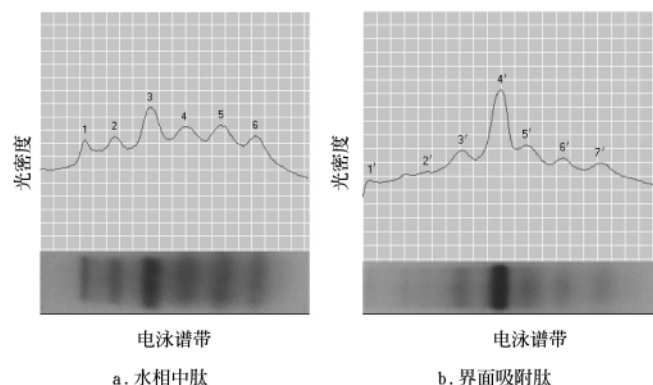


图 1 样品聚丙烯酰胺电泳扫描图

Fig.1 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) scanning graphs of peptide in the emulsion

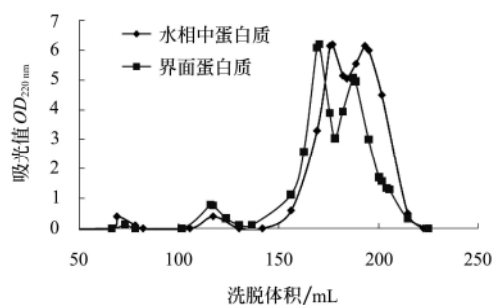


图 2 样品肽的相对分子质量分布

Fig.2 Molecular weight distribution of peptide in the emulsion

要真正了解蛋白质在乳状液稳定中起到的作用，需要分析界面吸附蛋白的分子结构，色谱及质谱联用的发展解析界面吸附蛋白的一级结构提供了可能。笔者采用反相高效液相色谱对水相中肽和界面吸附肽的肽谱图进行分析（图 3），可以看出界面吸附肽的数量与构成与水相中肽都存在比较大的差别，这再次证实界面吸附肽的乳化特性与其组成电荷等有很大关系。因此，后续研究中优化色谱条件对肽进行分离以便定性主要肽的一级结构，将有助于更好地解释界面吸附肽在乳状液稳定中起到的作用。

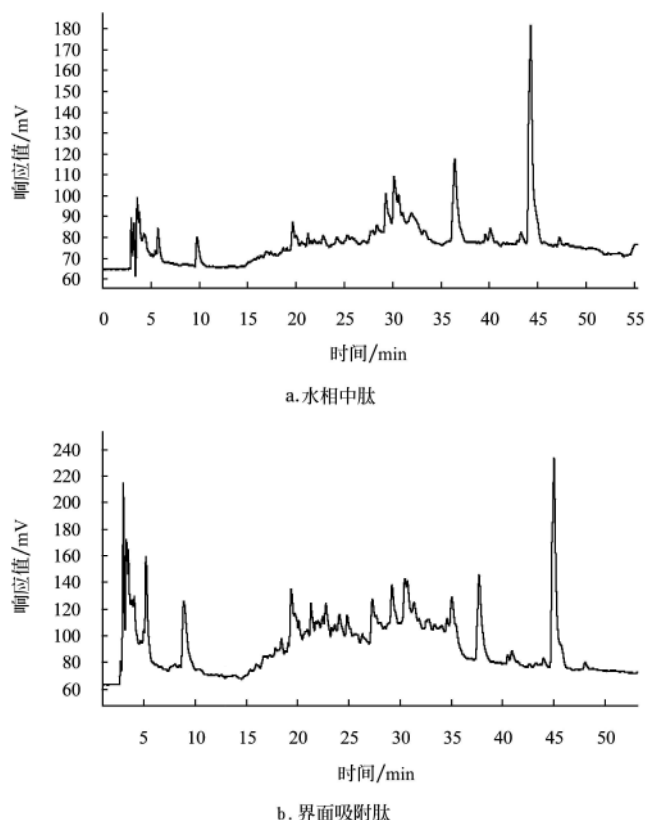


图 3 乳状液中肽类物质的反相色谱图

Fig.3 Reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC) graphs of peptide in the emulsion

2.3 乳状液流变性质的研究

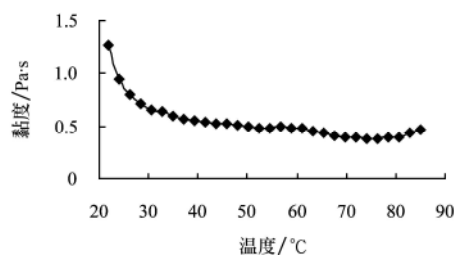
蛋白质、淀粉等物质吸附在油滴与水的界面上影响着分散体系的流变性质，如黏度、弹性等，这些性质决

定油滴耐聚集的特性。为此，对乳状液的流变性质进行研究，以期寻求合适的破乳方法提供指导。

2.3.1 花生乳状液的静态流变性质

1) 温度对乳状液黏度的影响

从图 4 可以看出，随着温度升高，乳状液的黏度不断降低。这是由于温度升高，乳状液中粒子布朗运动加剧，粒子间相互作用减弱，分子流动阻力降低，从而使黏度下降。所以要降低乳状液稳定性，提高温度是一种途径。



注：剪切速率： 5 s^{-1} ，升温速率 $5^\circ\text{C}/\text{min}$

图 4 温度对乳状液黏度的影响

Fig.4 Effect of temperature on the emulsion viscosity

2) 剪切速率对黏度的影响

乳状液是一种复杂的流体，它的流变模型与乳状液液滴间的相互作用及液滴的性质有关。由图 5 可知，温度 25°C ，在剪切速率为 $0\sim 100\text{ s}^{-1}$ 的范围内，乳状液的黏度随着剪切速率的增加而降低，表现为剪切变稀，呈现假塑性流体特性。但当剪切速率大于 100 s^{-1} ，乳状液的黏度不再随着剪切速率的变化而变化，呈现牛顿流体的性质。有研究表明^[7]，乳状液从非絮凝状态到絮凝状态的转变常伴随着流体性质的改变。随着剪切速率提高，乳状液的流体性质发生改变，所以试验中可以尝试采用提高剪切速率的方法来破坏乳状液的稳定性。

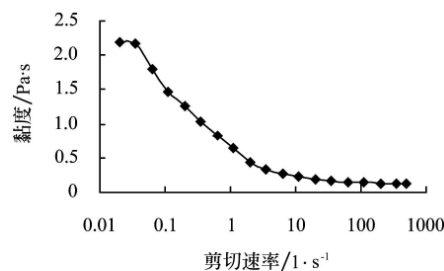


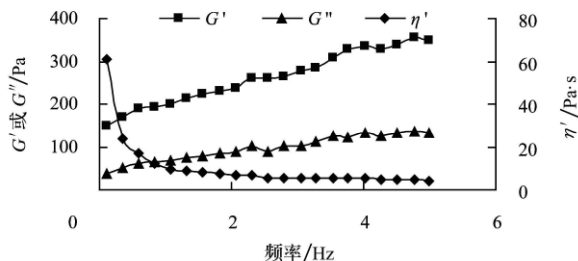
图 5 剪切速率对黏度的影响

Fig.5 Effect of shear rate on the emulsion viscosity

2.3.2 乳状液的动态流变性质

在乳状液的线性黏弹区，即振荡应力为 $0.2\sim 1.1\text{ Pa}$ 的范围内来测定乳状液的动态流变性质。图 6 显示了 1.0 Pa 的振荡应力下乳状液的 G' 、 G'' 及动力黏度 η' 随振荡频率的变化。 G' 反映体系类固体的性质即黏性， G'' 反应体系类液体性质即黏性。从中可以看出，乳状液的 η' 随振荡频率的增大而减小，表现出剪切变稀的特性，这与静态流变测定的性质相符。在所采用的振荡频率范围内，乳

状液的贮能模量 G' 始终大于损耗模量 G'' ，因此乳状液是一个典型的以弹性为主的体系。乳状液的弹性特性主要是由吸附在其中的蛋白质、淀粉等大分子物质的弹性变形引起的。对于黏弹性物质来说，三维弹性网络结构越是完整、坚固，弹性就会越明显^[8]。乳状液界面膜的弹性特性能使乳状液承受机械冲击，因而比低相对分子质量表面活性剂所稳定的分散体系更稳定，要降低其稳定性，必须破坏界面膜的结构。



注：振荡应力：1.0 Pa，温度：25℃

图6 乳状液的动态流变性质图

Fig.6 Dynamic rheological spectra of emulsion

2.4 水酶法工艺中乳状液的破乳

依据乳状液静态、动态流变学性质的研究结果，结合水酶法技术，避免有机溶剂及极端条件（高压、高温等）使用的优势，本文考察了4种物理破乳方法的不同效果，结果见表2。从中可以看出：不同的破乳方法，破乳效果差异很大。冷冻解冻后离心破乳效果最好，乳状液中油的回收率达到91.6%；微波辐照结果次之；采用高速剪切离心的方法起到了再次乳化的作用，不能达到破坏乳状液的效果。Boekel等人^[9]认为冷冻解冻能较好地破坏乳状液稳定性是因为冷冻过程中乳状液中出现油相结晶，这些脂肪晶体可以刺入水相，假如脂肪晶体恰好出现在相邻油滴之间，则将刺穿界面膜引起油滴的聚集，从而大幅度降低乳状液稳定性达到破乳的目的。

表2 各种破乳方法破乳效果的比较

Table 2 Efficiencies of different demulsification methods

破乳方法	乳状液中油回收率/%
高速剪切后离心	0
加热(90℃)后离心	32.7±0.94
冷冻解冻后离心	91.6±1.17
微波辐照	44.5±1.41

注：试验结果以2次试验结果的平均值与标准偏差表示。

乳状液的存在及稳定性强限制了水酶法工艺的游离油得率及经济效益，成了现阶段制约该技术大规模应用

的因素之一。表2的研究结果表明，花生水酶法提油工艺中形成的乳状液完全可以采用简单的物理机械法加以破乳回收其中的油，在后续研究中，对冷冻解冻法和微波辐照法的破乳参数进行优化，以达到进一步提高乳状液中油回收率、减少污染、提高工艺经济效益的目的。

3 结 论

1)花生水酶法技术中形成的O/W型乳状液中界面吸附的肽与水相中肽的相对分子质量分布接近，但构成与电荷等性质存在很大差异，这也是导致界面吸附肽具有强的乳化稳定性的因素之一。

2)乳状液是一个典型的以弹性为主的体系，随温度升高、剪切速率增加，其稳定性下降。

3)采用4种不同的物理机械方法破乳，冷冻解冻方法的破乳效果最佳，乳状液中油回收率达到91.6%；微波辐照方法次之，乳状液中油回收率为44.5%；高速剪切是一个再乳化的过程，不能回收乳状液的油。

[参 考 文 献]

- [1] McGlone O C, Canales A L M, Carter J V. Coconut oil extraction by a new enzymatic process[J]. Journal of Food Science, 1986, 51(3): 695-697.
- [2] 李 新, 王 璋. 水酶法提取玉米胚芽油和纳滤技术回收蛋白质[J]. 食品工业科技, 2005, 26(12): 60-66.
- [3] 王 璋, 许时婴, 林 岚, 等. 酶法从全脂大豆中同时制备大豆油和大豆水解蛋白工艺的研究[J]. 无锡轻工业学院学报, 1994, 13(3): 180-191.
- [4] 钱俊青, 何国庆. 水相酶解大豆蛋白的条件及其油脂分布的影响[J]. 浙江大学学报(工业版), 2001, 35(6): 684-688.
- [5] 大连轻工业学院, 华南理工大学, 郑州轻工业学院等合编. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [6] 王瑛瑶, 王 璋. 水酶法从花生中提取水解蛋白与油—酶解工艺参数[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(4): 60-64.
- [7] Dimitrova T D, Leal-Calderon F. Rheological properties of highly concentrated protein-stabilized emulsions[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2004, 108: 49-61.
- [8] 陈克复, 卢晓江, 金醇哲, 等编译. 食品流变学及其测量[M]. 北京: 轻工业出版社, 1989: 37-38.
- [9] Boekel M A J S, Walstra P. Stability of oil-in-water emulsions with crystals in the disperse phase[J]. Colloids Surf, 1981, 3: 109-118.
- [10] 罗 磊. 猪血G型免疫球蛋白的分离提取研究[D]. 无锡: 江南大学食品学院, 2006.

Property of the emulsion formed in aqueous enzymatic extraction of oil from peanut and demulsification methods

Wang Yingyao^{1,2}, Wang Zhang^{2*}, Luo Lei³

(1. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China;

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

3. Food and Bioengineering Department, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: In order to demulsify the emulsion forming in the aqueous enzymatic extraction of oil from peanut and improve the free oil yield, the property of the emulsion was studied. The molecular weight distribution, the Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) and reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC) graphs of the peptide in aqueous phase and in interface were compared. The results indicated that the property of the interfacial peptide contributing to stability of emulsion were relative to its conformation, composition and electric charge. The rheological characteristics of the emulsion showed that the emulsion was a typical elasticity system, and the stability of emulsion could be reduced by improving the temperature and shear rate of the emulsion. Based on those results, the effects of four different demulsification methods were compared and the results showed the effect of the method of freezing and thawing combining with centrifugation was the best and the oil recovery was more than 91.6%. High-speed shearing couldn't recover the oil from emulsion and it caused the emulsion to emulsify again.

Key words: aqueous enzymatic extraction, peptides, emulsions, demulsification, peanut