

文章编号 :1009-038X(2003)04-0060-05

水酶法从花生中提取蛋白质与油 ——酶解工艺参数

王瑛瑶, 王璋

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 采用水酶法从花生中同时提取油与水解蛋白质, 对酶制剂的筛选, 酶解工艺中酶用量、蛋白质的水解度(DH)、降低乳状液稳定性以及部分破乳的方法等进行了研究. 确定选用 Alcalase 作为水解酶, 酶与底物比为 2.5 g/dL. 推断了 DH 与清油得率及等电可溶水解蛋白质得率的关系, 并对花生水解蛋白质的部分功能性质及花生油质量进行了分析.

关键词: 水酶法; 乳状液; 花生水解蛋白质; 花生油

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

Aqueous Enzymatic Extraction of Peanut Protein and Oil ——On the Parameters of the Enzymatic Progresses

WANG Ying-yao, WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The aqueous enzymatic process of simultaneously preparing oil and peanut protein hydrolysates from peanut was introduced in this article. The selection of protease, the enzyme concentration, the degree of hydrolysis(DH) for protein, the ways to decrease the stability of the O/W emulsion by heating and adding salt, and the method of partly breaking the emulsion were investigated. The Alcalase was chosen to hydrolyze the peanut protein and 2.5 percent enzyme of protein was used. The relationship among the DH, the yield of free oil, and isoelectric soluble peanut protein hydrolysates yield was studied. The functional properties of the isoelectric soluble protein hydrolysates and the quality of oil were analyzed.

Key words: aqueous enzymatic process; emulsion; peanut protein hydrolysates; peanut oil

花生是世界上占第四位的植物油料, 约占世界油料年产量的 14%^[1]. 花生中油脂含量高达质量分数 44.27%~58.26%, 大多数为不饱和脂肪酸, 特别是人体必需的亚油酸含量丰富. 花生内蛋白质质量分数占到 23.76%~33.74%, 可消化性达 99%, 含人体必需的 8 种氨基酸^[2], 是世界第三位的植物

蛋白源, 约可提供世界需要量的 11%^[3]. 因而花生是一种很好的油与蛋白供给源, 从花生中同时提取蛋白质与油在 20 世纪 50 年代就开始受到人们的重视. 探求一种可以提高花生油与花生蛋白质的得率和品质, 降低花生蛋白质产品中含油率, 延长货架期, 降低能耗的新工艺已成为油脂工业的发展要求

收稿日期 2003-02-19; 修回日期 2003-03-06.

作者简介: 王瑛瑶(1978-), 女, 浙江浦江人, 食品科学博士研究生.

万方数据

之一。

随着酶制剂工业的发展,人们开始把酶应用于油脂工业。与传统提油工艺相比水酶法提油工艺具有处理条件温和,能同时得到纯度高可利用性强的蛋白质和质量较高的油等优点。本实验就水酶法从花生中提油与蛋白质进行了研究,在确定了生产工艺路线和碱提工艺参数的基础上^[4],对酶解过程进行了探讨,选出了最佳用酶和酶用量,同时对酶解后得到的 O/W 型乳状液进行破乳研究,以提高花生水解蛋白质与清油得率。

1 材料与方法

1.1 实验材料

花生仁 购自无锡市北塘顺达食品厂;酶制剂:由 Novo 公司生产;花生蛋白:自制;花生水解蛋白(DH 20%):自制。

1.2 检测方法

蛋白质含量测定:凯氏定氮法^[5];蛋白质水解度(DH)的测定与控制:pH-Stat 法^[6];

1.3 实验方法

1.3.1 水酶法从花生中提蛋白质与油工艺流程



清油得率 = 总的游离油/原料中的油

花生水解蛋白得率 = 水解液中蛋白的质量/原料中总的蛋白质质量

1.3.2 蛋白酶的筛选试验 将在最佳碱提取条件下^[4]处理后得到的碱提取液按表 1 中的条件进行酶水解。经不同酶作用不同时间后再经离心,测定游离油 I 得率,选出最佳酶制剂。

表 1 各种酶对碱提液的水解条件

Tab.1 The hydrolysis conditions of four kinds of enzymes to the alkaline extraction solution

酶名称	(E/S) (g/dL)	初始反应 pH	温度/ ℃	时间/ h
As1398 中性蛋白酶	5	7.0	40	4
Netrase	5	7.0	50	4
Papain	2	8.5	60	5
Alcalase	2	8.0	60	5

1.3.3 破乳的研究及水解条件的确定 从花生中提取油与蛋白质的酶解过程中,将酶解参数中的 pH 值和温度固定在 Alcalase 酶的最适 pH 值和温度范围内。Alcalase 用量为 2 g/dL(E/S),自然酶解 5 h

后,游离油 I 得率为 65%,还有 30%左右的油以 O/W 型乳状液形式存在^[4]。为降低乳状液稳定性提高清油得率和水解花生蛋白得率,采用如下两种途径:1)酶解后得到的乳状液在 90℃下加热 5 min 后再次进行离心;2)在酶解的过程中用 pH-Stat 法控制体系的 pH 值等于 8 直至达到所需的水解度。

通过比较不同酶用量(E/S)、水解时间对清油得率和花生水解蛋白回收率的影响,确定了酶用量和水解时间。

1.3.4 水解度对等电点可溶水解蛋白得率与清油得率的影响 将碱提取液 pH 值调至适当值,加入一定量的 Alcalase,以 4 mol/L 的 NaOH 滴定保持酶反应体系的 pH 值恒定,反应达到一定水解度(DH)后,加酸灭酶终止酶反应。按如下公式计算 DH^[6]

$$DH = (B \times N_b) / (\alpha \times M_p \times h_{总})$$

其中,B 为滴定时耗碱量(L);

N_b 为碱液的质量浓度;

M_p 为反应体系中蛋白质的量($N \times 6.25$);

$h_{总}$ 为每公斤蛋白质中肽键的总摩尔数;

α 为 α -NH₂ 的平均解离度。

1.3.5 花生水解蛋白相对分子质量的测定 采用凝胶过滤色谱法测定花生水解蛋白的相对分子质量的分布,其基本条件如下:凝胶材料:Sephadex G-15 柱体积: $\phi 1.6 \times 100$ cm;洗脱液:0.2 mol/L, pH 值为 5.0 的 HAc-NaAc 溶液;洗脱液体积流量:20 mL/h;标准分子质量物质:谷胱甘肽,相对分子质量 307;酪氨酸,相对分子质量 181。

1.3.6 产品性能研究

1)花生水解蛋白部分性能测定:花生水解蛋白溶解度的测定^[7],即测定不同 pH 值下各样品的氮溶解性指数 NSI 值;以考马斯亮蓝法测蛋白质含量;起泡能力的测定^[8];3 g 蛋白产品溶解到 100 mL 蒸馏水中,调节 pH 值等于 7.0 然后在 YQ-3 型匀浆机中以 8 000 r/min 的速度均质 2 min,记录均质停止时泡沫体积。

$$\text{起泡性} = \frac{\text{均质停止时泡沫体积 (mL)}}{100}$$

记录均质停止 1,10,30,60,120 min 后泡沫的体积,用其来衡量泡沫稳定性。

2)花生油性质测定见参考文献[9]。

2 结果与讨论

2.1 几种酶对花生蛋白碱提取液水解能力的比较 4 种酶对花生碱提取液水解后游离油 I 的得率见图 1。不经酶作用,清油得率很低,只有 5%左右。

酶水解液经离心后发现,As1398 中性蛋白酶和 Netrase 的量即使达到 5 g/dL(E/S),仍有沉淀即等电点不溶的花生蛋白存在,而且清油得率较低。这是因为经 As1398 和 Netrase 酶解后,40%的油与等电不溶花生蛋白紧密结合残留在沉淀中,因而这两种酶不适合用于花生碱提取液的水解。从图 1 可见,4 种酶提高游离油 I 得率的能力依次为 papain \geq Alcalase>As1398>Netrase,说明 papain 能作用的肽键数量较多。但 papain 的价格比 Alcalase 高,为降低生产成本,选用 Alcalase 为水解酶。

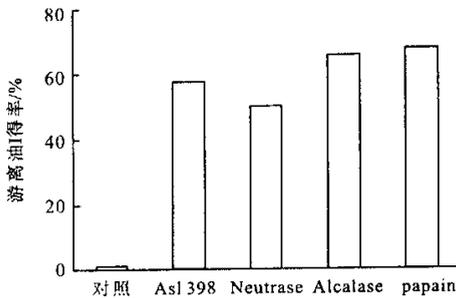


图 1 4 种酶对花生碱提取液水解的能力

Fig.1 The different hydrolysis ability of the different enzymes to the alkaline extraction solution

2.2 破乳的研究及水解条件的确定

碱提取液在不同 Alcalase 量(E/S)作用下自然酶解 5 h,得到的乳状液在 90 ℃下加热 5 min 后再次进行离心,合并游离油 I 与游离油 II,计算清油得率,结果见表 2。

表 2 酶量及热破乳对清油得率的影响

Tab.2 The effect of the enzyme concentration and the heat treatment on the free oil yield

E/S(g/dL)	乳状液中油质量分数/%	清油得率%
1.5	30.53	65.24
2.0	24.50	72.00
2.5	18.03	78.48

酶解过程中用 pH-Stat 法控制体系 pH 值等于 8,同时对得到的乳状液进行热处理(90 ℃加热 5 min)后再次进行离心,合并游离油 I 与游离油 II,计算清油得率,结果见表 3。

从图 1 可知,Alcalase 用量为 2 g/dL(E/S),自然酶解 5 h 后,清油得率 65.8%。从表 2 可看出,在相同条件下,对得到的乳状液加热后再次离心,清油得率上升到 72%。说明加热法可以部分地破乳,这是因为温度高,分子的热运动加剧,有利于油珠

的聚结,而且温度升高时,外相粘度降低,从而降低了乳状液的稳定性。

表 3 酶量、盐及热破乳对清油得率的影响

Tab.3 The effect of the enzyme concentration, salt and the heat treatment on the free oil yield

酶用量 E/S/(g/dL)	酶解时间/h	清油得率/%	DH/%	乳状液中油质量分数/%
1.5	7	75.0	—	20.77
2.0	6	82.0	20.0	14.50
2.5	5	86.2	20.0	10.30

从表 2 与表 3 结果可知,用 pH-Stat 法控制体系 pH 值使清油得率比相同 E/S(2.5 g/dL),相同酶解时间(5 h)自然酶解的结果高近 8%。说明体系中加入一定浓度的水溶性无机盐,乳状液的稳定性变差。实验中一直滴加 NaOH 以控制体系的 pH 值,而后加入 HCl 调 pH 值到花生蛋白的等电点灭酶,因此在体系中存在一定浓度的无机盐 NaCl。由于 O/W 乳状液的分散油滴带负电荷,钠离子的存在有电性中和作用,使带电的油滴失去电荷,在碰撞中容易聚结^[10]。同时 NaCl 有一定的水合能力,它能破坏表面活性剂在油滴表面形成的界面膜上的水化层,使界面膜变得不稳定^[10],而且水溶性无机盐的存在会使水相密度进一步提高,使油水相密度差进一步加大,有利于离心时油水分离。

从表 2,3 可看出,随加酶量从 1.5 g/dL 上升到 2.5 g/dL,清油得率相应上升。为提高清油得率和最大限度的回收花生水解蛋白,酶量选择为 2.5 g/dL,酶解时间为 5 h。

2.3 水解度与等电点可溶水解蛋白得率、清油得率关系

测定不同 DH 时相应的清油得率及水解蛋白回收率的结果见图 2。

一般球状蛋白质经酶解至 DH15% 时,水解液中已不再有等电点不溶的肽,然而,从图 2 可知,随水解度从 15% 上升到 20%,等电点可溶水解蛋白得率仍然有明显增加。根据 pH-Stat 原理,蛋白质的水解度仅仅是一个表观水解度,而在实际酶反应体系中并不是所有的蛋白质都以相同的方式同时发生降解,其反应机制可用 one-by-one 模式解释^[11],即蛋白质分子一个接一个发生降解,且降解后的短肽由于肽键暴露更易被酶作用,使反应体系中同时有较小的肽和较大分子的蛋白质。当到达一定水解度后,酶作用于与脂结合的能形成乳状液的那部分大分子蛋白质,从而提高了油与花生水解蛋白的得

率,降少了乳状液质量.对不同 DH 下得到的乳状液中的蛋白质含量进行分析,结果发现 DH 等于 15% 的乳状液中蛋白质含量比 DH 等于 20% 的高 3.33%.但随水解度增加,花生球蛋白分子中的疏水区逐渐暴露,得到的水解蛋白苦味加重.

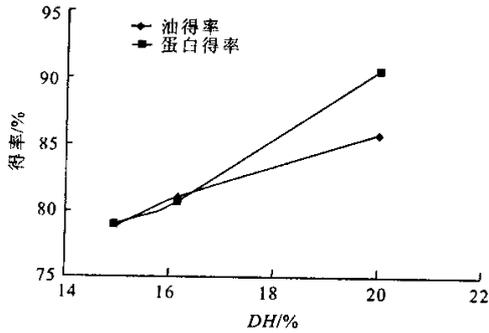


图 2 水解度与等电点可溶花生蛋白得率、清油得率的关系

Fig.2 The relationship among the DH, the yield of free oil, and the ISO-electric soluble hydrolysates

2.4 不同水解度花生水解蛋白相对分子质量分布

水解度为 16% 和 20% 的水解液中蛋白质相对分子质量分布见图 3.从图 3 可知,随水解度从 16% 升高到 20%,相对分子质量较低的花生水解蛋白所占的比例稍有增大,但相对分子质量分布范围并无显著差异,相对分子质量集中在 200~300 之间,相当于为二肽至三肽.从图中还可看出,当水解度达 20% 时,水解蛋白中已存在一定比例的氨基酸,水解产物相对分子质量太小,给脱盐脱苦和回收利用带来限制.为此,在酶解过程中应选择合适的水解度,既保证有较高的清油得率,又使水解产物相对分子质量处于合适的范围以利于脱盐脱苦处理.

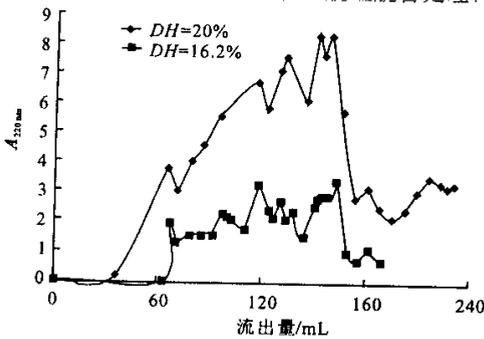


图 3 不同 DH 的水解蛋白相对分子质量分布

Fig.3 The relative molecular weight of the hydrolyzed protein with different DH

在应用凝胶过滤色谱测定蛋白质相对分子质量时,如果被测定的是球状蛋白质,那么得到的结果比较准确.花生蛋白被水解至很高的水解度,此时,短肽没有呈球状构象的可能性,因此,从凝胶过滤色谱得到的相对分子质量分布的数据也只能提供比较或参考而已.

2.5 产品性能

蛋白质的溶解性是最重要的一个功能特性,如蛋白产品在制备过程中由加热或其他处理,造成蛋白质溶解度的降低,则其乳化性、起泡性等特性都会受影响,从而限制蛋白产品在食品工业中的应用.从图 4 可知,花生水解蛋白的溶解度几乎不受 pH 值的影响,在花生蛋白的等电点 4.5 时花生水解蛋白的 NSI 达 97%,溶解性能很好.

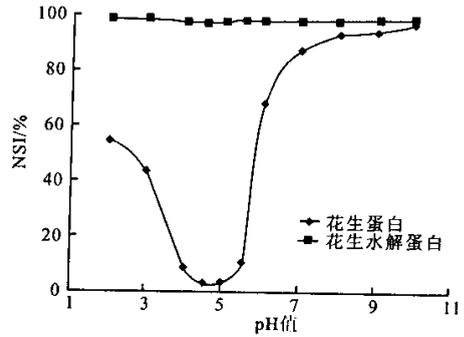


图 4 不同 pH 值下花生蛋白及其水解物的溶解度

Fig.4 The solubility of the peanut protein and peanut Protein hydrolysates under different pH

起泡性是指蛋白产品搅打起泡的能力,泡沫稳定性是指泡沫保持稳定的能力.蛋白产品的起泡性一般随蛋白质质量浓度的增加而增加,在蛋白质质量浓度为 3 g/dL 时,有最高的起泡性^[12].从表 4 可看出,花生蛋白经水解后,其泡沫稳定性明显下降.

花生油理化指标见表 5.从表 5 可看出用水酶法制得的油品质较好,无需再经精制处理,可节约能源.

表 4 花生蛋白与花生水解蛋白的起泡性与泡沫稳定性

Tab.4 The foaming capacity and the foam stability of peanut protein and peanut protein hydrolysates

蛋白质类型	起泡性/%	泡沫稳定性/mL				
		1 min	10 min	30 min	60 min	120 min
花生蛋白质	90	82	72	60	52	43
花生水解蛋白质	65	15	10	5	0	0

表 5 花生油质量

Tab.5 The quality of the peanut oil

花生油	折光指数 (20°)	比重	酸价 (KOH mg/g)	水分及 挥发物
自制 花生油	1.4722	0.9156	0.3911	0.0940
精炼 花生油	1.4695 -	0.9110 -	≤1.0	≤0.10

3 结 论

1) 几种蛋白酶对花生碱提取液的水解能力依次为: papain ≥ Alcalase > As1398 > Netrase, 综合考虑 Alcalase 是水酶法提取油与水解蛋白的理想蛋白

酶.

2) 加热及在酶解体系中加入一定质量浓度的水溶性盐有利于降低乳状液稳定性, 提高清油得率. 当 E/S 为 2.5 g/dL, 酶解 5 h 后, 清油与花生水解蛋白得率分别为 86% 与 89%.

3) 随 DH 升高, 清油得率与等电可溶花生水解蛋白得率相应增加. 随 DH 从 16% 上升到 20%, 相对分子质量较低的花生水解蛋白所占的比例稍有增加, 但相对分子质量分布范围无显著差异, 它集中在 200~300 之间.

4) 花生水解蛋白的溶解性能不受 pH 值影响, 水酶法制得的花生油品质符合精练花生油的质量要求.

参考文献:

- [1] 过祥鳌, 左青. 植物油料的加工和利用[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1989. 115-118.
- [2] 温士谦. 食用脱脂花生粉的制取和应用[J]. 中国油脂, 1987, 1(5): 17-22.
- [3] 殷凤华. 中国油脂工业的现状和发展趋势[J]. 中国油脂, 1997, 2(5): 1-4.
- [4] 王瑛瑶, 王璋. 水酶法从花生中提取油与蛋白质的碱提工艺研究[J]. 食品科技, 2002, 7: 6-10.
- [5] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1990.
- [6] Alder-Nissen J. Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins[M]. London: Elsevier Applied science Publishers, 1986.
- [7] AACC. Cereal Laboratory Method[M]. Minnesota: American of association of cereal chemists, 1974.
- [8] Lin M J Y. Certain functional properties of sunflower meal products[J]. J Food Sci, 1974, 39: 368.
- [9] 王慈肇. 粮油食品品质分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1994.
- [10] 王国庭. 胶体与表面化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998. 134-146.
- [11] Alder-nissen. Enzymatic hydrolysis of protein for increased solubility[J]. J Agric Food Chem, 1976, 24(6): 1090-1094.
- [12] Jobne, Kinsella. Functional properties of soy proteir[J]. JAOCS, 1979, 56: 242-245.

(责任编辑 杨 萌)