

# 花生水剂法制油工艺中蛋白质的结构特征研究

贾琪琪, 章绍兵, 李 端

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

**摘要:**为降低花生水剂法制油过程中固相的残油率与残蛋白率,以河南省主要花生栽培品种(豫花 37、豫花 9326 和远杂 6 号)为研究对象进行水剂法制油,通过分析亚基组成、内源荧光光谱、表面疏水性、粒径、Zeta 电位、三相接触角与聚集作用力等表征固相和水相中花生蛋白的结构特征。结果表明:在 pH 10 条件下,未脱皮花生豫花 37 的总固相残油率最低(5.73%),而残蛋白率(15.37%)与其他 2 个品种无显著差异;水剂法所得固相中含有较多可溶性蛋白,其亚基组成和水相蛋白相似,但前者的内源荧光强度、表面疏水性和三相接触角显著高于后者,表明固相可溶性蛋白结合油脂的能力更强;与水相蛋白相比,固相可溶性蛋白的平均粒径和 Zeta 电位绝对值更低;针对固相可溶性蛋白结合油脂能力强和携带电荷少的结构特点,进一步提高提取体系 pH,发现当 pH 为 11.0 时,脱皮豫花 37 的总固相残油率和残蛋白率分别降至 3.44% 和 11.86%。综上,可通过提高提取体系 pH 降低花生水剂法制油的固相残油率和残蛋白率。

**关键词:**水剂法;花生蛋白;制油;分子结构

中图分类号:TS224;O656.4

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2025)02-0063-08

## Structural characterization of proteins in aqueous extraction of peanut oil

JIA Qiqi, ZHANG Shaobing, LI Duan

(College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology,  
Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** In order to reduce residual oil rate and residual protein rate of solid-phase in the aqueous extraction of peanut oil, the main peanut cultivars (Yuhua 37, Yuhua 9326, and Yuanza 6) in Henan Province were used as the objects of the aqueous extraction, and the structural characteristics of peanut proteins in the solid- and aqueous-phases were characterized through determination of the subunit compositions, endogenous fluorescence spectra, surface hydrophobicity, particle sizes, Zeta potentials, three-phase contact angles and aggregation forces, etc. The results showed that at pH 10, the unpeeled Yuhua 37 had the lowest solid-phase residual oil rate (5.73%), while the residual protein rate (15.37%) was not significantly different from that of the other 2 cultivars. The solid-phase obtained by the aqueous extraction contained more soluble proteins with similar subunit compositions to the aqueous-phase proteins, but the endogenous fluorescence intensity, surface hydrophobicity and three-phase contact angles of solid-phase soluble proteins were significantly higher than those of aqueous-phase proteins, implying that the solid-phase soluble proteins had a stronger ability to bind peanut oil. Solid-phase

soluble proteins had lower mean particle sizes and absolute Zeta potentials than aqueous-phase proteins. To address the structural characteristics of solid-phase soluble proteins, which had a strong ability to bind oil and carried less charges, the pH of the extraction system was increased, and it was found that the residual oil rate and residual

收稿日期:2023-10-16;修回日期:2024-10-22

基金项目:国家自然科学基金(U21A20270)

作者简介:贾琪琪(1997),女,在读硕士,研究方向为食品蛋白质结构与功能(E-mail)jiaqiqi97@163.com。

通信作者:章绍兵,教授,博士(E-mail)shaobingzhang@126.com。

protein rate of the solid - phase of the peeled Yuhua 37 were reduced to 3.44% and 11.86%, respectively, when the pH was 11. In summary, increasing the pH of the extraction system can reduce the solid - phase residual oil rate and residual protein rate in the aqueous extraction process of peanut oil.

**Key words:** aqueous extraction method; peanut protein; oil production; molecular structure

花生是我国主要的油料作物之一,集中种植于黄淮海、长江流域及东北地区,其主要的种植大省有河南、山东、河北、吉林、辽宁、安徽、湖北等。随着花生消费需求量的增加,其产量也在逐年递增。花生主要作为食用和制油,其中制油消费量占花生总消费量的51.8%<sup>[1]</sup>。传统的花生制油方法有压榨法<sup>[2]</sup>和溶剂浸出法<sup>[3]</sup>,压榨法所得油脂品质较好,但通常生产自动化程度低、油脂提取率低;溶剂浸出法油脂提取率高,但所得原油成分复杂,需要严格精炼,而且环境污染和生产安全问题也不容忽视。无论是压榨法还是溶剂浸出法都无法实现同步分离花生油和花生蛋白,对饼粕中蛋白质的进一步提取利用需要延长工艺路线分步进行,增加了设备投资和生产成本。

水剂法制油是利用油料中非油成分(蛋白质和碳水化合物)对油和水亲和力的差异及油和水密度的差异而将油与蛋白质同时分离<sup>[4]</sup>。近年来有不少学者通过物理<sup>[5]</sup>、化学<sup>[6]</sup>或生物酶<sup>[7]</sup>耦合水剂法同步制备花生油和花生蛋白,并取得了一定的成果。在水剂法制油工艺中,油水混合体系在离心分离后一般可获得四相:最上层为油相,然后依次是乳相、水相和固相。目前对水剂法研究关注的焦点是细胞解离条件的优化、乳液破乳以及水相中蛋白质的结构与功能<sup>[8-10]</sup>。除水相溶解大量蛋白质外,在水剂法制油过程中蛋白质还可通过自身相互结合形成蛋白质聚集体<sup>[11]</sup>,或与油脂、多糖等物质<sup>[12]</sup>相互作用形成溶解性较差的复合物沉淀至固相,最终导致固相的残油率和残蛋白率偏高。尽管可通过蛋白酶水解蛋白质显著减少固相残油率和残蛋白率<sup>[13]</sup>,但由此获得的水解蛋白在功能性质方面存在不足,导致其应用受限。因此,既要保留蛋白质原有的功能性质,又要显著减少固相残油率和残蛋白率已成为水剂法工艺研究的重要目标。我们在前期研究中发现,花生水剂法制油(不使用蛋白酶)所得固相经水洗后残油率和残蛋白率均大幅下降,这说明固相中仍含有较多的可溶性蛋白,而且该蛋白能够结合较多油脂,但目前这种固相可溶性蛋白的结构特征仍不明晰。

本实验以河南省3个主要花生栽培品种为研究对象,分别对其进行水剂法同步分离油脂和蛋白质,对得到的固相进行水洗,获得固相可溶性蛋白,对水

相进行酸沉获得水相蛋白,通过对二者亚基组成、内源荧光光谱、表面疏水性、粒径、电位、三相接触角与聚集作用力的测定,进一步揭示水剂法制油工艺中花生蛋白的结构特征,以期采取针对性措施降低固相残油率与残蛋白率提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

豫花37(高油酸花生品种,水分4.22%,油脂49.61%,蛋白质21.87%),河南邦农种业有限公司;豫花9326(球蛋白亚基缺失品种,水分4.65%,油脂44.48%,蛋白质21.73%),河南豫研种子科技有限公司;远杂6号(水分4.42%,油脂48.71%,蛋白质19.36%),郑州鹏讯种业有限公司;十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒,合肥新恩源生物技术有限公司;8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、5,5'-二硫代(2-硝基苯甲酸)(DTNB),上海源叶生物科技有限公司;二硫苏糖醇(DTT),上海索莱宝生物科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS),天津市天力化学试剂有限公司;正己烷、硫酸钾、硫酸铜、浓硫酸、氢氧化钠、三氯乙酸、丙酮、尿素均为市售分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

CLF-10C 摇摆式粉碎机,浙江温岭创力药材器械厂;G9800A 荧光分光光度计,安捷伦科技有限公司;DYY-6C 电泳仪,北京市六一仪器厂;SZC-101 脂肪测定仪,上海纤检仪器有限公司;Kjeltec8400 全自动定氮仪,丹麦福斯分析仪器公司;722N 可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;DT5-4B 低速台式离心机,北京时代北利离心机有限公司;Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度电位分析仪,英国马尔文仪器有限公司;DSA25 接触角测量仪,德国克吕士仪器公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 水剂法获取花生固相

参考李万山等<sup>[6]</sup>的方法并略有改动。取200g未脱皮花生放入粉碎机,粉碎成花生浆,放置48h后,称取20g花生浆放入250mL的离心瓶中,加入4倍体积的蒸馏水搅匀,放入50℃的水浴锅中150

r/min 振荡 30 min, 用 2 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 10, 再次放入 50 °C 的水浴锅中 150 r/min 振荡 40 min, 3 300 × g 离心 15 min, 从上到下依次得到油相、乳相、水相和固相。收集固相至培养皿, 于 60 °C 电热恒温鼓风干燥箱中烘 6 h, 得到花生干渣(总固相), 保存备用。

### 1.2.2 固相可溶性蛋白的提取

收集 1.2.1 中制备的固相, 加入 4 倍体积蒸馏水, 在 50 °C 的水浴锅中 150 r/min 振荡 30 min, 3 300 × g 离心 15 min 后, 弃掉乳化层, 留上清液和不溶性固相。收集不溶性固相至培养皿, 于 60 °C 电热恒温鼓风干燥箱中烘 6 h, 得到不溶性干渣。

向上清液中加入等体积的氯仿-甲醇(体积比 2:1)溶液, 室温搅拌 30 min, 2 800 × g 离心 15 min, 用胶头滴管吸取甲醇相, 以 2 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 至 4.5, 水洗沉淀 2 次并离心(3 300 × g, 15 min), 加入 80% 丙酮溶液(预冷)洗涤沉淀 2 次, 1 620 × g 离心 15 min, 丙酮挥发后得到固相可溶性蛋白, 冷冻干燥后备用。

### 1.2.3 残油(蛋白)率测定

参照 GB 5009.6—2016 采用索氏抽提法测定油脂含量, 参照 GB 5009.5—2016 采用凯氏定氮法测定蛋白质含量。根据花生干渣(总固相)中油脂(蛋白质)质量与花生中油脂(蛋白质)质量的比值计算总固相残油(蛋白)率, 通过总固相残油(蛋白)率与不溶性干渣(不溶性固相)残油(蛋白)率的差计算可溶性固相残油(蛋白)率。

### 1.2.4 水相蛋白的提取

收集 1.2.1 中制备的水相, 以 2 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 至 4.5, 水洗沉淀 2 次, 3 300 × g 离心 15 min 得到水相蛋白, 冷冻干燥后备用。

### 1.2.5 花生蛋白结构性质的测定

#### 1.2.5.1 SDS-PAGE

参考张淑艳等<sup>[14]</sup>的方法并稍有改动。称取 50 mg 蛋白样品溶解于 10 mL 蒸馏水中, 2 656 × g 离心 15 min, 取上清液稀释至蛋白质质量浓度为 3 mg/mL, 作为蛋白样液。取 10 μL 蛋白样液与蛋白上样缓冲溶液等体积混合, 在沸水浴中煮 5 min, 室温冷却, 进行 SDS-PAGE 分析。测定条件: 5% 浓缩胶, 12% 分离胶; 恒压模式, 浓缩胶中电压为 80 mV, 分离胶中电压为 120 mV。电泳完成后, 采用考马斯亮蓝染色 2 h, 脱色液换液 3 次脱色至条带清晰, 观察其亚基条带情况。

#### 1.2.5.2 暴露游离巯基含量

参考颜东琼<sup>[15]</sup>的方法并稍有改动。用 Tris-甘氨酸(Gly)缓冲溶液溶解蛋白样品, 2 656 × g 离

心 15 min 后, 取上清液稀释至蛋白质质量浓度为 2 mg/mL, 作为蛋白样液。在 3 mL 蛋白样液中加入 50 μL 4 mg/mL 的 Ellman 试剂, 涡旋振荡后放置 1 h, 在 412 nm 下以 Tris-Gly 缓冲溶液作为空白对照测定吸光度。按公式(1)计算暴露游离巯基含量( $H_1$ )。

$$H = \frac{73.53 A_{412} N}{C} \quad (1)$$

式中:  $H$  为巯基含量, μmol/g;  $A_{412}$  为 412 nm 处的吸光度;  $C$  为蛋白样液质量浓度, mg/mL;  $N$  为稀释倍数。

#### 1.2.5.3 二硫键含量

二硫键含量测定参考罗明江等<sup>[16]</sup>的方法并稍有改动。

蛋白样液制备: 向 30 mg 蛋白样品中加入 4.7 g 盐酸胍, 以 Tris-Gly 缓冲溶液定容至 10 mL, 搅拌至溶解。

总游离巯基含量: 取 1 mL 蛋白样液, 加入 4 mL 脲-盐酸胍溶液(8 mol/L 脲, 5 mol/L 盐酸胍, Tris-Gly 缓冲溶液定容至 1 L)和 50 μL 4 mg/mL 的 Ellman 试剂, 涡旋后放置 1 h, 在 412 nm 下以脲-盐酸胍溶液作为空白对照测定吸光度。按公式(1)计算总游离巯基含量( $H_2$ )。

总巯基含量: 取 1 mL 的蛋白样液加入 50 μL β-巯基乙醇和 4 mL 脲-盐酸胍溶液, 静置 1 h, 加入 10 mL 12% 的三氯乙酸, 静置 1 h, 2 656 × g 离心 15 min, 沉淀用 10 mL 12% 三氯乙酸洗涤 2 次, 以 5 mL 尿素(8 mol/L)溶解完全, 加入 40 μL 4 mg/mL 的 Ellman 试剂, 涡旋后放置 1 h, 在 412 nm 下以尿素溶液作为空白对照测定吸光度。按公式(1)计算总巯基含量( $H_3$ )。通过公式(2)计算样品中二硫键含量( $S$ )。

$$S = (H_3 - H_2) / 2 \quad (2)$$

#### 1.2.5.4 内源荧光光谱

参考 Zhou 等<sup>[17]</sup>的方法并稍有改动。用磷酸盐缓冲溶液(pH 8, 0.01 mol/L)溶解蛋白样品并稀释至 0.1 mg/mL, 作为蛋白样液。取一定量的蛋白样液, 在激发波长 290 nm、扫描范围 200~400 nm 下, 进行内源荧光光谱分析。

#### 1.2.5.5 表面疏水性

参考 Mu 等<sup>[18]</sup>的方法并稍有改动, 采用荧光探针法测定样品表面疏水性。将蛋白样品溶解于磷酸盐缓冲溶液(pH 8, 0.01 mol/L)中, 2 656 × g 离心 15 min 后, 取上清液并分别稀释至蛋白质质量浓度为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mg/mL, 作为蛋白样液。取 20 μL 8 mmol/L 的 ANS 试剂溶于每个稀

释梯度的蛋白样液中,使混合液总体积为 4 mL,涡旋后放置 15 min,测定荧光吸收强度(激发波长 380 nm,发射波长 480 nm)。以荧光吸收强度为纵坐标,蛋白质质量浓度为横坐标作图,所得斜率为该样品的表面疏水性。

#### 1.2.5.6 粒径和电位

参考 Chen 等<sup>[19]</sup>的方法并稍有改动,采用纳米粒度电位分析仪测定粒径和电位。以磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0, 0.01 mol/L)溶解蛋白样品,2 656 × g 离心 15 min,将上清液稀释至 1 mg/mL,作为蛋白样液。取 1.5 mL 蛋白样液放至比色皿/电位样品池中测定粒径和电位。

#### 1.2.5.7 接触角

取适量蛋白样品于红外压片机压成圆片后,将其置于载玻片上。将载玻片放于接触角测量仪的可升降台上,采用座滴法测量接触角,滴 2 μL 水滴,当水滴与圆片接触瞬间保存其图像,用 Laplace -

Young 方程计算接触角( $\theta$ )。实验重复 2 次。

#### 1.2.5.8 聚集作用力

参考 Zhang 等<sup>[20]</sup>的方法并稍有改动,对脱皮后豫花 37 进行蛋白聚集作用力的测定。当蛋白溶液(1 mg/mL)与 3 种蛋白干扰剂(6 mol/L 尿素,1% SDS,30 mmol/L DTT)单独、两两联合(体积比 1:1)、三者联合(体积比 1:1:1)混合时,测定混合液的粒径,判断聚集作用力的类型。

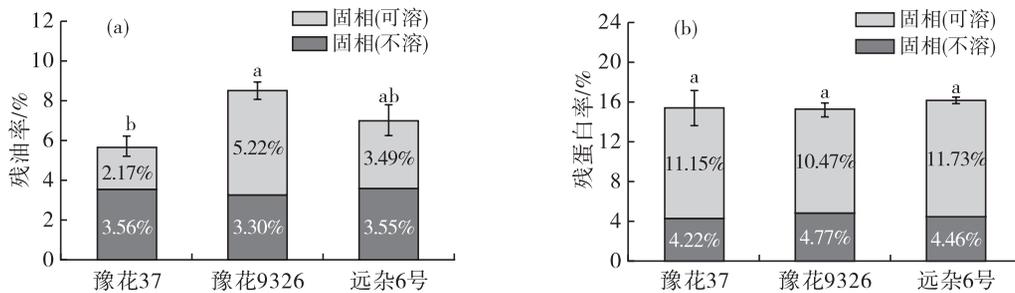
#### 1.2.6 数据处理

所有实验除接触角外均重复 3 次或以上,结果以“平均值 ± 标准差”表示,采用 SPSS 软件对数据进行显著性分析,采用 Origin 软件作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同品种花生水剂法制油后固相的残油率与残蛋白率

不同品种花生水剂法制油后固相的残油率与残蛋白率见图 1。



注:不同字母表示总固相有显著差异( $p < 0.05$ )

Note: Different letters indicate significant differences in total solid - phase ( $p < 0.05$ )

图 1 不同品种花生的固相残油率和残蛋白率

Fig. 1 Solid phase residual oil rate and residual protein rate of different varieties of peanut

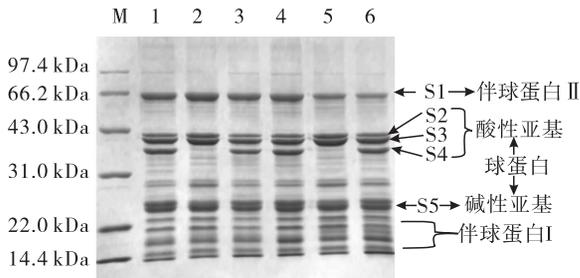
由图 1 可知,在相同的提取条件下,不同品种花生的固相残油率有较大区别,豫花 37 的总固相残油率为 5.73%,显著低于豫花 9326 的,而 3 个品种花生的总固相残蛋白率接近,均约 15%。不同品种花生水剂法制油所得固相经水洗后,不溶性固相的残油率均降至 4% 以下,残蛋白率均降至 5% 以下,这说明固相中存在较多的可溶性蛋白,在水洗过程中,其中的可溶性蛋白和与其结合的油脂能同时被提取出来。李瑚传<sup>[21]</sup>采用水剂法加工花生,结果发现,水分含量在 4% 以下的花生经脱皮提油后得到的固相残渣,再用 2 ~ 3 倍稀碱水洗涤,其残油率降至 5% 以下,但蛋白质回收率较低。王瑛瑶<sup>[22]</sup>对水酶法制备花生油得到的固相进行水洗,发现游离油和水解蛋白得率均提高。尽管水洗可以在一定程度上提高油脂和蛋白质得率,但是该过程延长了水剂法工艺路线,增加了水的消耗,并不利于在实际生产中推广应用。

### 2.2 花生固相可溶性蛋白与水相蛋白的结构性质比较

#### 2.2.1 亚基组成

花生固相可溶性蛋白与水相蛋白的亚基组成见图 2。

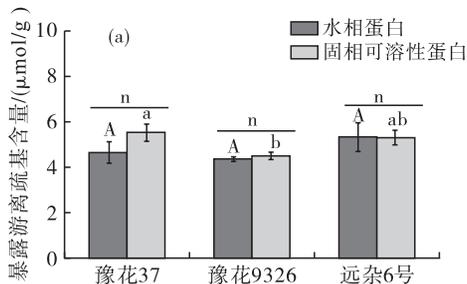
花生蛋白在 SDS - PAGE 上一般呈现伴球蛋白 II (61.0 kDa)、球蛋白(40.5、37.5、35.5、23.5 kDa)和伴球蛋白 I (15.5、17.0、18.0 kDa) 8 个条带<sup>[23]</sup>。由图 2 可知,豫花 37 和远杂 6 号的水相蛋白电泳图谱相似,均含有上述 8 个主要条带,但豫花 9326 的水相蛋白缺失分子质量为 35.5 kDa 的酸性亚基。杜寅<sup>[24]</sup>研究不同品种花生的亚基组成时发现,有部分品种花生缺失 35.5 kDa 亚基,并指出花生蛋白亚基组成不同,其结构和功能特性也有所不同。本研究中,同一品种花生的固相可溶性蛋白与水相蛋白亚基组成无明显不同,说明这 2 种蛋白虽然在离心后分布于不同相中,但它们的一级结构非常相似。



注: M. 标准分子质量蛋白; 1~3 分别为豫花 37、豫花 9326、远杂 6 号水相蛋白; 4~6 分别为豫花 37、豫花 9326、远杂 6 号固相可溶性蛋白

Note: M. Standard molecular weight proteins; 1-3 are aqueous-phase proteins of Yuhua 37, Yuhua 9326 and Yuanza 6 respectively; 4-6 are solid-phase soluble proteins of Yuhua 37, Yuhua 9326 and Yuanza 6 respectively

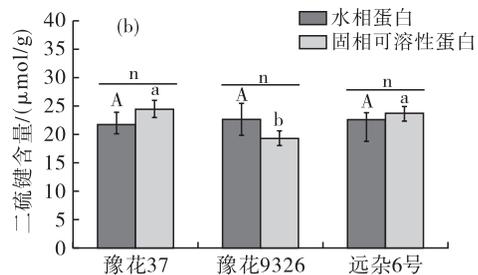
图 2 花生固相可溶性蛋白与水相蛋白的亚基组成  
Fig. 2 Subunit composition of peanut solid-phase soluble proteins and aqueous-phase proteins



### 2.2.2 暴露游离巯基和二硫键含量

花生蛋白中半胱氨酸主要是以游离巯基(—SH)和二硫键(—S—S—)的形式存在,其对维持蛋白质的稳定构象有重要影响<sup>[25]</sup>。花生固相可溶性蛋白与水相蛋白暴露游离巯基和二硫键含量见图 3。

由图 3 可知,3 个品种花生的水相蛋白之间暴露游离巯基及二硫键含量均无显著差异,但与其他 2 个品种花生相比,豫花 9326 固相可溶性蛋白中的暴露游离巯基和二硫键含量均偏低,推测与该品种缺失 35.5 kDa 亚基有关。徐飞<sup>[26]</sup>指出未缺失 35.5 kDa 亚基品种花生球蛋白的二硫键含量低于缺失品种花生球蛋白的,与本文研究结果相反,这可能与不同的花生品种有关。此外,在暴露游离巯基与二硫键含量方面,3 个品种花生的固相可溶性蛋白与水相蛋白之间均无显著差异。



注:同一指标不同字母表示有显著差异( $p < 0.05$ );n 表示无显著差异。下同

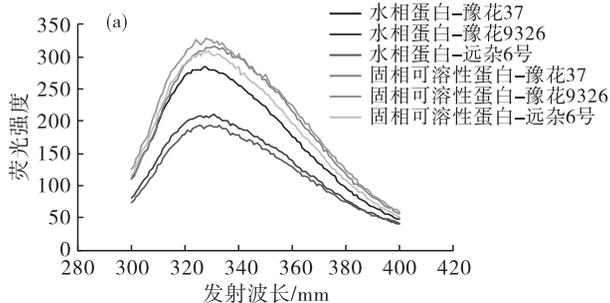
Note: Different letters for the same indicator indicate significant differences ( $p < 0.05$ ); "n" indicates no significant difference. The same below

图 3 花生固相可溶性蛋白与水相蛋白的暴露游离巯基和二硫键含量  
Fig. 3 Exposed free sulfhydryl and disulfide bond contents of peanut solid-phase soluble proteins and aqueous-phase proteins

### 2.2.3 内源荧光光谱和表面疏水性

蛋白质的内源荧光是由疏水性芳香族氨基酸(酪氨酸、色氨酸以及苯丙氨酸)残基在激发波长

290 nm 下所产生的荧光<sup>[27]</sup>。花生固相可溶性蛋白与水相蛋白的内源荧光光谱和表面疏水性见图 4。



注: \* 表示差异显著( $p < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著( $p < 0.01$ )。下同

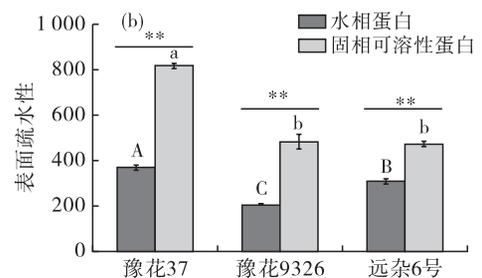
Note: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . The same below

图 4 花生固相可溶性蛋白与水相蛋白的内源荧光光谱和表面疏水性

Fig. 4 Endogenous fluorescence spectra and surface hydrophobicity of peanut solid-phase soluble proteins and aqueous-phase proteins

由图 4a 可知:3 个品种花生的水相蛋白和固相可溶性蛋白的最大荧光发射波长( $\lambda_{max}$ )无显著差

异,均在 330 nm 附近;从荧光强度来看,各品种花生的固相可溶性蛋白均显著高于其水相蛋白的,这可



能是因为固相可溶性蛋白中能够发射荧光的疏水性芳香族氨基酸含量更高。

由图 4b 可知,与其他 2 个品种花生相比,豫花 37 的固相可溶性蛋白和水相蛋白的表面疏水性均更高,豫花 9326 水相蛋白的表面疏水性显著低于其他 2 个品种,这可能与其缺失 35.5 kDa 亚基有关<sup>[26]</sup>。3 个品种花生的固相可溶性蛋白的表面疏水性均极显著高于其水相蛋白的,这也与荧光强度的变化规

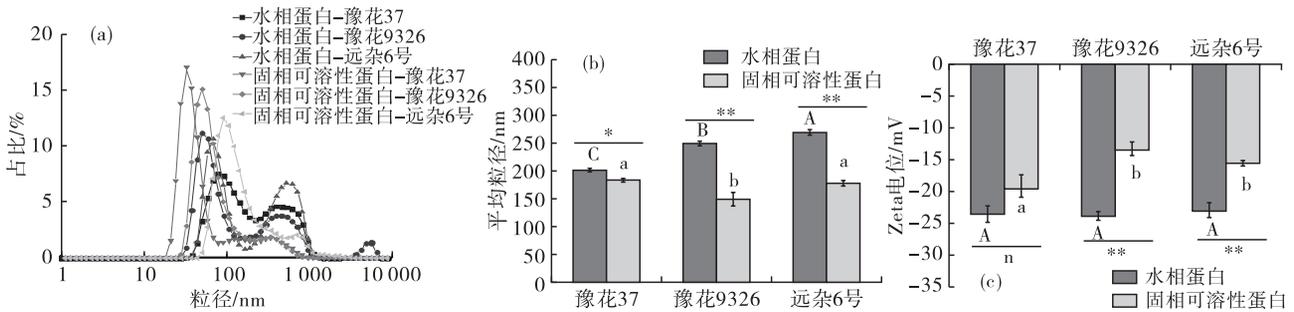


图 5 花生固相可溶性蛋白与水相蛋白的粒径分布、平均粒径和 Zeta 电位

Fig. 5 Particle size distribution, mean particle sizes and Zeta potentials of peanut solid-phase soluble proteins and aqueous-phase proteins

由图 5a 可知,花生固相可溶性蛋白的粒径分布相对集中,主要呈现 1 个大峰,而水相蛋白的粒径分布呈现 2 个大峰。多分散性指数(PDI)可以反映所测样品体系中粒径分布情况,数值小表示粒径分布较为均匀。豫花 37、豫花 9326 和远杂 6 号的固相可溶性蛋白的 PDI 分别为 0.32、0.43、0.31,均显著小于其水相蛋白的 PDI(0.39、0.57、0.47),说明固相可溶性蛋白的粒径分布更为均匀。

由图 5b 可知:就水相蛋白而言,远杂 6 号的平均粒径(269.30 nm)显著高于豫花 9326(250.70 nm)和豫花 37(201.70 nm)的;就固相可溶性蛋白而言,豫花 9326 的平均粒径(149.80 nm)最小。此外,3 个品种花生水相蛋白的平均粒径均显著或极显著大于其固相可溶性蛋白的。这可能是因为固相可溶性蛋白表面疏水性高,容易与油脂结合,从而阻碍了自身之间的相互作用和聚集,导致粒径较小。

由图 5c 可知,3 个品种花生水相蛋白间的 Zeta 电位无显著差异,但豫花 37 固相可溶性蛋白的 Zeta 电位绝对值显著高于豫花 9326 和远杂 6 号的。结合图 4b 表明,与其他 2 个花生品种相比,豫花 37 固相可溶性蛋白的表面不但疏水基团分布更多,而且带电基团也更多。3 个品种花生的固相可溶性蛋白 Zeta 电位绝对值均小于其水相蛋白的,这也是前者容易聚沉的重要原因之一。因此,可考虑通过提高固相可溶性蛋白的表面电荷,增强蛋白质分子间的相互排斥作用,从而促进蛋白质的溶解。

律一致。在分子结构均没有展开的情况下,花生蛋白表面疏水性高意味着表面疏水性氨基酸含量高。表面疏水性高的蛋白质分子亲油性强而亲水性弱,因此与水相蛋白相比,固相可溶性蛋白在水中溶解性较差,经离心后容易沉积于固相。

#### 2.2.4 粒径和电位

花生固相可溶性蛋白与水相蛋白的粒径分布、平均粒径和电位见图 5。

#### 2.2.5 三相接触角和聚集作用力

接触角是指在气液固三相交点所作的气-液界面的切线与固-液交界线之间的夹角,夹角越大,亲脂性越强<sup>[28]</sup>。以豫花 37 为研究对象,进一步比较了固相可溶性蛋白和水相蛋白聚集体的接触角,并对花生蛋白的聚集作用力进行测定,结果见图 6。

由图 6a 可知,固相可溶性蛋白的三相接触角显著高于水相蛋白的,这与表面疏水性的实验结果相符。固相可溶性蛋白较高的亲脂性导致其能够“携带”油脂同时从固相中释放出来。

尿素、SDS 与 DTT 常被用于检测蛋白质聚集作用力,其中 SDS 对应疏水作用力,尿素对应氢键,DTT 对应二硫键<sup>[29]</sup>。当蛋白质与这些溶剂混合时,分子间作用力会受到干扰而断裂,蛋白质聚集体粒径也随之发生变化。由图 6b 可知,在单独使用尿素处理时,固相可溶性蛋白的粒径不减反增,这可能是因为其受到尿素处理后虽然氢键被破坏,但分子发生变性后相互作用增强,发生了聚集。单独或者联合使用 DTT 处理时,除与尿素二者联合处理外,固相可溶性蛋白的粒径均显著下降,说明维系固相可溶性蛋白聚集体的主要作用力是二硫键。刘付<sup>[30]</sup>在研究大豆分离蛋白聚集作用力时也发现了这一现象。水相蛋白在单独使用 DTT、SDS 或二者联合处理时聚集体粒径均下降,说明水相蛋白的聚集作用力主要是二硫键与疏水作用力。

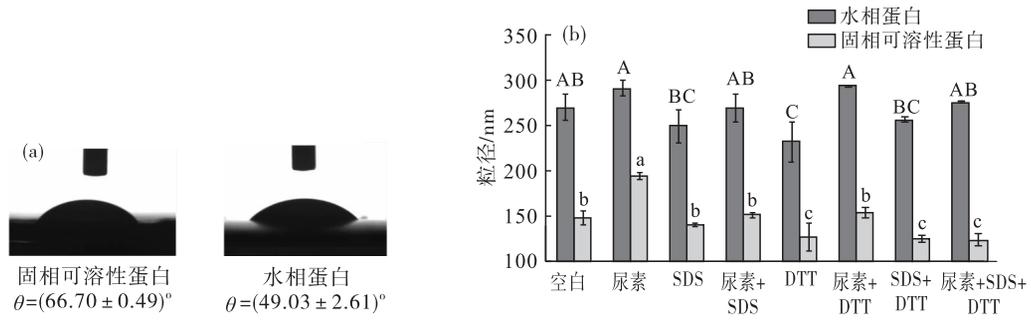


图 6 豫花 37 固相可溶性蛋白与水相蛋白的三相接触角和聚集作用力

Fig. 6 Three-phase contact angles and aggregation forces of solid-phase soluble proteins and aqueous-phase proteins of Yuhua 37

### 2.3 pH 对豫花 37 花生固相残油率与残蛋白率的影响

比较 3 个品种花生的水剂法制油工艺发现豫花 37 的总固相残油率最低(图 1a),同时由蛋白质结构特征分析可知,相比水相蛋白,豫花 37 固相可溶性蛋白的表面疏水性高(“携带”油脂能力强)、Zeta 电位绝对值低,因此通过提高体系 pH 而增加蛋白的表面电荷(增强蛋白质分子间的相互排斥),有望

促进固相可溶性蛋白和油脂从固相中释放出来,进一步降低水剂法加工花生的固相残蛋白率和残油率。同时,为降低花生油色泽,减少花生粕中的纤维,提高其蛋白质含量,对豫花 37 进行脱皮后,按 1.2.1 方法在提取 pH 分别为 10.0、10.5、11.0、11.5、12.0 条件下,制备花生油和花生蛋白,测定固相的残油率与残蛋白率,结果见图 7。

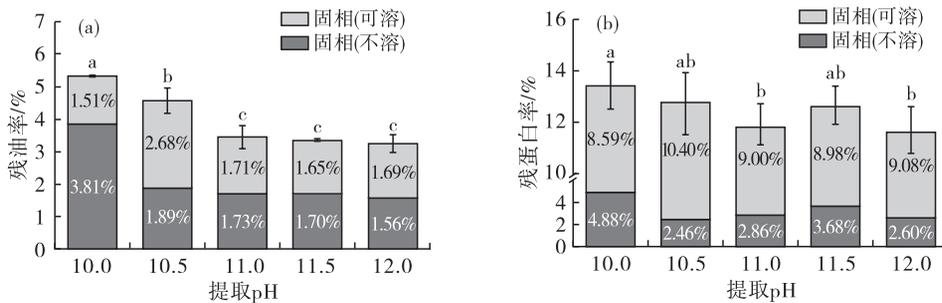


图 7 pH 对花生固相残油率与残蛋白率的影响

Fig. 7 Effect of pH on residual oil rate and residual protein rate of peanut solid-phase

由图 7 可知,在提取 pH 为 10.0 时,与未脱皮豫花 37 相比,脱皮豫花 37 总固相残油率从 5.73% (图 1a)降至 5.32%,而总固相残蛋白率从 15.37% (图 1b)降至 13.47%。当提取 pH 增加至 11.0 时,总固相残油率和残蛋白率分别进一步下降至 3.44% 和 11.86%,而继续增加 pH 后二者均无显著变化。赵翔等<sup>[31]</sup>在 pH 11 的条件下采用水剂法同时制备花生油和花生蛋白,固相残油率和残蛋白率分别为 3.79% 和 10.09%,其固相残蛋白率低于本实验结果,原因可能与其固液比(1:10)很低有关,而本实验中的固液比仅为 1:4。当提取 pH 由 10.0 增至 11.0 时,豫花 37 不溶性固相残蛋白率从 4.88% 降至 2.86%。推测是因为部分固相不溶性蛋白由于相互排斥作用加强,转变为固相可溶性蛋白或直接溶解于水相。

### 3 结论

在水剂法制取花生油过程中,高油酸花生品种

豫花 37 的总固相残油率显著低于豫花 9326 与远杂 6 号,而三者总固相残蛋白率相近。分析和比较水剂法提取的花生蛋白结构特征发现,固相可溶性蛋白与水相蛋白的暴露游离巯基、二硫键含量及最大荧光发射波长均无显著差异,但前者内源荧光强度、表面疏水性与三相接触角均显著高于后者,平均粒径与 Zeta 电位绝对值均低于后者,前者的聚集作用力主要为二硫键,而后者的聚集作用力主要为二硫键和疏水作用力。通过增加蛋白质表面电荷可以进一步促进花生蛋白和油脂从固相中的同步释放,因此可通过提高提取 pH 降低花生水剂法的固相残油率和残蛋白率。

### 参考文献:

- [1] 李滢溪,张丽芬,赖少娟,等.花生蛋白稳定乳液研究进展及应用现状[J].食品研究与开发,2022,43(11):198-204.
- [2] 纪俊敏,刘玉兰,黄连燕,等.不同制油工艺制备花生

- 毛油及饼粕的品质分析[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(5): 82-87.
- [3] 王章存, 康艳玲. 花生油制取技术研究进展[J]. 粮油食品科技, 2007, 15(6): 40-41, 52.
- [4] 吕燕红. 油菜籽制油技术的研究进展[J]. 中国油脂, 2006, 31(2): 9-12.
- [5] 朱凯艳, 张文斌, 杨瑞金, 等. 粉碎处理对花生水酶法提取油脂和蛋白质的影响[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 119-122.
- [6] 李万山, 章绍兵, 颜东琼. 复合表面活性剂辅助水剂法同步制备花生油和蛋白[J]. 中国油脂, 2021, 46(12): 16-20.
- [7] 周龙正, 陈复生, 赵自通, 等. 水酶法同步提取花生油和蛋白研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(20): 219-224.
- [8] DÍAZ-SUÁREZ P, ROSALES-QUINTERO A, FERNANDEZ-LAFUENTE R, et al. Aqueous enzymatic extraction of *Ricinus communis* seeds oil using Viscozyme L[J/OL]. Ind Crops Prod, 2021, 170: 113811 [2023-10-16]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113811>.
- [9] LI P, GASMALLA M A A, LIU J, et al. Characterization and demulsification of cream emulsion from aqueous extraction of peanut[J]. J Food Eng, 2016, 185: 62-71.
- [10] LIU J, LI P, JIANG Z, et al. Characterisation of peanut protein concentrates from industrial aqueous extraction processing prepared by spray and freeze drying methods[J]. Int J Food Sci Tech, 2019, 54(5): 1597-1608.
- [11] CHEN N, ZHAO M, NIEPCERON F, et al. The effect of the pH on thermal aggregation and gelation of soy proteins[J]. Food Hydrocolloid, 2017, 66: 27-36.
- [12] POTES N, KERRY J P, ROOS Y H. Oil as reaction medium for glycation, oxidation, denaturation, and aggregation of whey protein systems of low water activity[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(15): 3748-3756.
- [13] 隋晓楠, 江连洲, 李杨, 等. 水酶法提取大豆油脂过程中蛋白相对分子质量变化对油脂释放的影响[J]. 大豆科技, 2019(S1): 275-279.
- [14] 张淑艳, 章绍兵, 陈林, 等. 花生蛋白的浓度对其超声改性效果的影响[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2022, 43(3): 58-64.
- [15] 颜东琼. 吐温 20 对大豆蛋白乳液界面性质及稳定性的影响[D]. 郑州: 河南工业大学, 2020.
- [16] 罗明江, 罗春霞, 吴赣香. Ellman's 试剂比色法测定食品中蛋白质的巯基和二硫键[J]. 郑州粮食学院学报, 1986(1): 92-95.
- [17] ZHOU M, LIU J, ZHOU Y, et al. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of soybean glycinin at different ionic strengths[J]. Innov Food Sci Emerg Tech, 2016, 34: 205-213.
- [18] MU L, ZHAO M, YANG B, et al. Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical properties of conjugates[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(7): 4494-4499.
- [19] CHEN L, ZHANG S B. Structural and functional properties of self-assembled peanut protein nanoparticles prepared by ultrasonic treatment: Effects of ultrasound intensity and protein concentration[J/OL]. Food Chem, 2023, 413: 135626 [2023-10-16]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135626>.
- [20] ZHANG X, ZUO Z, MA W, et al. Assemble behavior of ultrasound-induced quinoa protein nanoparticles and their roles on rheological properties and stability of high internal phase emulsions[J/OL]. Food Hydrocolloid, 2021, 117: 106748 [2023-10-16]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106748>.
- [21] 李翊传. 水剂法加工花生的工艺及设备的探讨[J]. 中国油脂, 1984, 9(S2): 506-511.
- [22] 王瑛瑶. 水酶法从花生中提取油与水解蛋白的研究[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2006.
- [23] 杜寅, 王强, 刘红芝, 等. 不同品种花生蛋白主要组分及其亚基相对含量分析[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 42-46.
- [24] 杜寅. 花生蛋白主要组分的制备及凝胶特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [25] 刘岩, 赵冠里, 苏新国. 花生球蛋白和伴球蛋白的功能特性及构象研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(9): 2095-2101.
- [26] 徐飞. 花生球蛋白亚基缺失对热特性的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [27] 李帅浩, 谭充, 冯子健, 等. 茶多酚对酪氨酸酶的抑制作用及分子机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(15): 40-46.
- [28] ARABESTANI A, KADIVAR M, SHAHEDI M, et al. Properties of a new protein film from bitter vetch (*Vicia ervilia*) and effect of CaCl<sub>2</sub> on its hydrophobicity[J]. Int J Biol Macromol, 2013, 57: 118-123.
- [29] 左中钰. 超声处理对藜麦蛋白微粒性质的影响及高内相乳液的构建[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2022.
- [30] 刘付. 大豆蛋白皮克林稳定剂的构建、表征及应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
- [31] 赵翔, 陆启玉, 章绍兵, 等. 水剂法同时提取花生油和蛋白质的工艺研究[J]. 农业机械, 2012(12): 35-38.