

葡萄籽油/大米水解蛋白复合乳液工艺优化及稳定性研究

段方宇, 王越, 张旭, 张莹, 张浩, 赵玮*

(吉林农业大学食品科学与工程学院 长春 130118)

摘要 以葡萄籽油和 大米水解蛋白为原料, 制备水包油型乳液。选择大米水解蛋白质量分数、油相占比、pH 值、高压均质时间、高压均质压力做单因素实验。在此基础上采用 Box-Behnken 试验设计, 以乳液粒径及乳化稳定性为响应值做响应面分析试验, 确定最优工艺参数是: 大米水解蛋白质量分数 2%, 油相占比 10%, pH 7, 均质时间 5 min, 均质压力 50 MPa, 此时测定平均粒径为 $(0.894 \pm 0.013) \mu\text{m}$, 乳化稳定性为 $(18\ 157.7 \pm 137) \text{min}$ 。在上述最优工艺条件下, 制备葡萄籽油/大米水解蛋白复合乳液, 分别于储藏 1, 7, 15, 30 d, 考察乳液粒径、乳化指数、乳液微观结构的变化, 并对乳液的储藏稳定性进行评估。结果表明, 该乳液为水包油型, 油相于水相中分散均匀, 储藏 30 d 内乳液外观无明显变化, 乳液粒径随储藏时间的增加略有增大, 乳化指数逐渐下降, 总体稳定性较好。

关键词 葡萄籽油; 大米水解蛋白; 乳液; 稳定性

文章编号 1009-7848(2023)05-0125-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.014

葡萄籽是葡萄酿酒或榨汁后的副产物, 一般占葡萄总质量的 1%~3%。法国和意大利等国葡萄酒工业中产生的葡萄籽, 约 80% 得以利用, 利用率较高^[1]。我国酿酒工业中产生的葡萄籽深加工基本为空白, 通常将葡萄籽连同葡萄皮一起加工成饲料, 附加值低, 有的直接丢弃, 造成浪费^[2]。葡萄籽的含油率为 14%~17%^[3], 其含有丰富的不饱和脂肪酸, 其中亚油酸含量在 77% 以上^[4]。葡萄籽中具有多种生物活性组分, 如葡萄籽油、原花青素、单宁等。对葡萄籽活性组分充分利用, 可开发出多种产品, 延长葡萄加工产业链, 变废为宝, 提高葡萄加工企业的综合效益和水平^[5]。

蛋白质具有特殊的大分子结构, 其可用于乳化剂, 可溶性蛋白更是在蛋白质乳化体系中起重要作用。大米中的可溶性蛋白含量很低, 仅为 0.4%~0.5%^[6], 故大米蛋白的乳化性很差, 限制了其在食品领域中的应用^[7]。大米水解蛋白是指经酶解处理后的大米蛋白, 其主要成分为小分子多肽, 具有良好的溶解性、乳化性、发泡性, 可用于制备 O/W 型乳液^[8]。大米水解蛋白同时具有优良的生物活性, 如降血压、抗衰老、抗吗啡和免疫调节等^[9], 其中研

究最多的是抗氧化活性和降血压活性。

本研究以葡萄籽油和 大米水解蛋白为原料, 制备水包油型复合乳液。以提高乳液稳定性为目标, 优化葡萄籽油/大米水解蛋白乳液制备工艺, 并通过观察乳液宏观、微观形貌, 测定乳液粒径和乳化指数等, 对乳液 30 d 内储藏稳定性进行评估。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

葡萄籽, 产自新疆维吾尔自治区, 哈尔滨凝赞商贸有限公司; 大米(东北小町), 产自吉林省吉林市, 吉林省华兴粮油有限公司; 叠氮钠(分析纯级)、盐酸(分析纯级)、氢氧化钠(分析纯级)、氯化钠(分析纯级), 北京化工厂; 十二烷基磺酸钠(SDS, 分析纯级), 国药集团化学试剂有限公司; 尼罗红荧光染料(分析纯级)、尼罗蓝荧光染料(分析纯级), 上海瑞永生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

FA25 高速型高剪切分散乳化机, 弗鲁克科技发展有限公司; HL-2000 型高压均质机, 红礼生物科技(上海)有限公司; BT-9300HT 激光粒度分布仪, 丹东市百特仪器有限公司; Gemini Sigma 300 超低温扫描电子显微镜(cryo-SEM)、ZEISS LSM900 激光共聚焦显微镜, 德国卡尔·蔡司有限公司。

收稿日期: 2022-05-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32072169)

第一作者: 段方宇, 男, 硕士

通信作者: 赵玮 E-mail: zhaow1229@163.com

1.3 方法

1.3.1 葡萄籽油和大米水解蛋白的制备 称取葡萄籽粉 20 g 于 250 mL 烧杯中,按照料液比 1:5 加入蒸馏水,将烧杯放入超声反应设备中,设定超声功率,调节溶液 pH 值为 11,加入一定量的酶,在 45 °C 下酶解 5 h,冷却至室温,以转速 6 000 r/min 离心分离 10 min,得上层游离油 I;将分离后下层溶液于 100 °C 水浴锅内进行破乳处理,相同条件下 2 次离心,得上层游离油 II,将油 I 和 II 合并称重,得葡萄籽油^[9]。

原料大米经粉碎过 100 目筛,加水、加热去可溶性糖,抽滤得滤渣;加水按 1.125% (以大米质量为基准)加碱性蛋白酶,调节 pH 值为 9.5,于 65 °C 下水解 5 h。水解液经 2 次离心处理取后,合并两次上清液,95 °C 灭酶 3 min,酸沉取沉淀部分,冷冻干燥得大米水解蛋白^[10]。

1.3.2 葡萄籽油/大米水解蛋白乳液制备 称取一定量的大米水解蛋白,溶于去离子水中,充分混合,配制成一定浓度的大米水解蛋白溶液;加入 0.02% 的叠氮钠抑制微生物生长。将葡萄籽油按一定比例添加到大米水解蛋白溶液中;采用高速型高剪切分散乳化机于 10 000 r/min 的剪切速度处理物料 1 min 进行预混^[11],预混后的粗乳液倒入高压均质机内,在一定压力下均质处理^[12],得到葡萄籽油/大米水解蛋白乳液,成品密封放置于 4 °C 条件下备用。

1.3.3 乳液平均粒径的测定 将乳液用蒸馏水稀释 1 000 倍,逐滴加入激光粒度分布仪的样品池中,当遮光率达到 14%~16% 时开始测量,每组乳液测量 3 次,取平均值,得乳液平均粒径。

1.3.4 乳液乳化活性和乳化稳定性的测定 制备新鲜的大米蛋白/葡萄籽油乳液,于乳状液底部吸取 10 μL,将 0.1% SDS (十二烷基磺酸钠) 稀释 500 倍,以 SDS 溶液为空白参照,测定 500 nm 处的吸光度值 A_0 ^[13]。乳化活性指数 (EAI) 和乳化稳定性 (ESI) 分别按式 (1) 和式 (2) 计算。

$$EAI(m^2/g) = 2 \times T \times \frac{A_0 \times N}{1000 \times \theta \times L \times C} \quad (1)$$

$$ESI(\min) = \frac{A_0}{A_0 - A_{30}} \times 30 \quad (2)$$

式中, T ——2.303; A_0 ——0 min 处的吸光度;

N ——稀释因子, 100; θ ——油相体积分数, %; C ——SPI 的质量浓度, g/mL; A_{30} ——30 min 处的吸光度; L ——比色皿光径, 1 cm。

1.3.5 乳液乳化指数的测定 将乳状液置于透明的密闭样品瓶中,并于室温下储藏。分别在第 1, 7, 15 天和 30 天定期测量乳状液体积高度 (H_1) 和乳状液总高度 (H_0), 乳化指数越大, 乳状液稳定性越好。乳化指数 (Emulsion Index, EI) 按下式计算^[14]。

$$EI(\%) = \frac{H_1}{H_0} \times 100 = \frac{V_1}{V_0} \times 100 \quad (3)$$

式中, H_1 ——乳液层高度, cm; H_0 ——总高度, cm; V_1 ——乳状液层体积, mL; V_0 ——乳液总体积, mL。

1.3.6 乳液低温扫描电子显微镜观察 在样品台上涂上导电碳胶,用镊子夹起铜盘放在导电碳胶上,吸取 0.5 μL 乳液样品滴在铜盘上,然后浸入液氮中并快速冷冻 30 s。将冷冻的样品平台在真空 (-200 Pa) 下转移到制备室,在 -90 °C 升华 10 min 后,在暴露和断裂的表面溅射 5 nm 厚的金层。使用低温扫描电子显微镜 (cryo-SEM) 进行测定,样品在 5 kV 和 140 °C 下测定成像^[15]。

1.3.7 乳液激光共聚焦显微镜观察 利用共聚焦激光扫描显微镜观测乳液的微观形貌。用无水乙醇分别制备尼罗红 (1%) 和尼罗蓝 (0.1%) 染料,然后将染料各 10 μL 添加到 1 mL 复合乳液中,用于乳液的染色,将样品置于载玻片上。分别利用 488 nm 和 633 nm 激发的氩和 He-Ne 激光对载玻片进行观测。图片中显示脂肪呈绿色、蛋白呈红色^[16]。

1.3.8 单因素条件对乳液稳定性的影响 利用单因素实验分别考察大米水解蛋白质量分数、油相占比、pH 值、高压均质时间、高压均质压力 5 个因素对乳液稳定性的影响。

1.3.9 响应面优化最优工艺条件 单因素实验结果表明均质压力对乳液粒径大小影响不明显,因而选取大米水解蛋白质量分数、油相占比、pH 值、高压均质时间四因素进行响应面试验设计;采用 Box-Behnken 设计方法,以乳液平均粒径和乳化稳定性为响应值,通过响应面曲面分析 (Response surface analysis),对葡萄籽油/大米水解蛋白乳液制备工艺进行优化。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Response surface test factors and levels

水平	因素			
	蛋白质质量分数(A)/%	油相占比(B)/%	pH 值(C)	均质时间(D)/min
-1	1.5	5	5	3
0	2.0	10	7	5
1	2.5	15	9	7

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 大米水解蛋白质质量分数对乳液稳定性的影响 按 1.3.2 节工艺条件, 保持油相占比为 10%、

pH 值为 7、均质压力为 50 MPa、均质时间为 5 min 不变, 改变不同大米水解蛋白质质量分数 (1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%), 考察其对乳液平均粒径、乳化活性、乳化稳定性的影响。

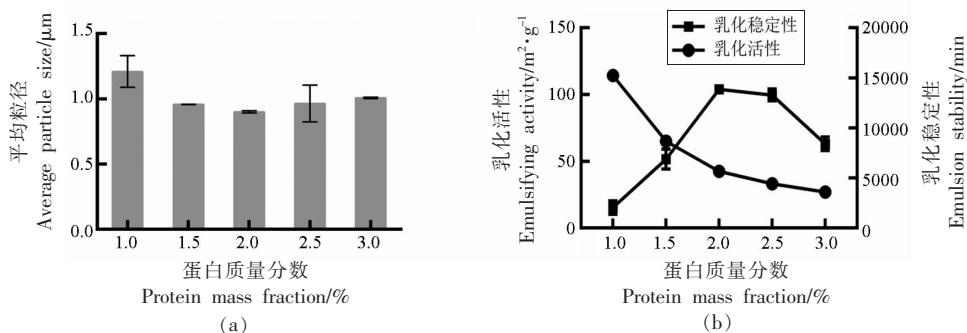


图 1 大米水解蛋白质质量分数对乳液 ESI、EAI、平均粒径的影响

Fig.1 Effects of mass fraction of rice hydrolysate protein on emulsion ESI, EAI and average particle size

乳液粒径是考察乳液稳定性的重要指标, 液滴在分散相中的平均粒径越小, 说明乳液越稳定^[17-18]。改变乳液中大米水解蛋白质质量分数, 考察不同蛋白质质量分数内乳液粒径、ESI 和 EAI 的变化。液滴平均粒径柱形图显示, 随着水相中蛋白质质量分数的增加, 乳液平均粒径先下降后略有增大。当蛋白质质量分数为 2% 时, 平均粒径最小; 当蛋白质质量分数大于 2% 时, 平均粒径呈增大趋势。当蛋白质质量分数较低时, 蛋白不足以完全将油相完全包裹, 油相易发生聚集, 油滴体积较大; 随着蛋白质质量分数的增加, 乳化程度达到最大, 油滴粒径最小; 蛋白质质量分数持续增加, 多余的大米蛋白由于彼此间的同等电荷排斥反而会破坏乳液的稳定性, 使粒径增大^[19-21]。EAI 和 ESI 曲线图也显示, 随着蛋白质质量分数增加, 乳液乳化活性逐渐下降, 乳化稳定性呈现先增大后下降的趋势^[21], 蛋白质质量分数为 2% 时, 乳液稳定性达到最高值。说明蛋白质质量分数为 2% 时, 蛋白与油相比比例适宜, 蛋白质

分子全部被油相表面吸附, 形成包覆层, 两相界面张力较小, 形成均匀油滴, 蛋白层有效抑制油相结合, 乳液处于稳定状态^[22]。综上所述, 当大米水解蛋白质质量分数为 2% 时, 乳液平均粒径最小, 乳液最稳定。

2.1.2 油相占比对乳液稳定性的影响 按 1.3.2 节工艺流程, 保持大米蛋白质质量分数为 2%、pH 值为 7、均质压力为 50 MPa 均质时间为 5 min 不变, 改变不同油相占比 (5%、10%、15%、20%、25%), 考察其对乳液平均粒径、乳化活性、乳化稳定性的影响。

由图 2 可知, 油相占比为 10% 时, 乳液平均粒径最小, 当油相占比大于 10% 时, 乳液平均粒径逐渐增大。EAI 和 ESI 曲线图也显示, 乳化活性和乳化稳定性均呈现先增大后减小的趋势, 二者皆在油相占比为 10% 时达到最高值。油相占比过低, 不利于形成乳液; 当油相占比为 10% 时, 油相分子被蛋白包裹, 油滴间相互排斥力高, 乳液黏度增大,

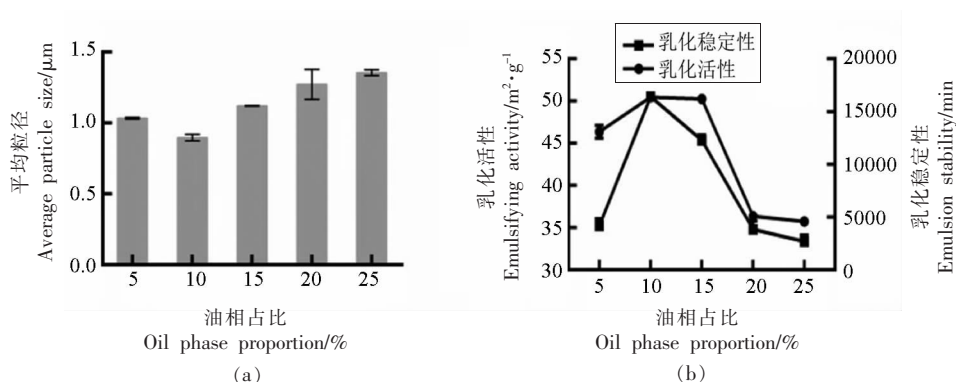


图2 油相占比对乳液 ESI、EAI、平均粒径的影响

Fig.2 Effect of oil phase proportion on ESI, EAI and average particle size of emulsion

液滴粒径最小,乳液稳定性最好;油相占比过大,水相中蛋白分子不足以将全部油脂包裹起来,而未吸附的油滴则相互聚集,加速了乳液的奥氏熟化,乳液黏度降低,油滴之间容易发生聚集,平均粒径变大,乳化活性及乳化稳定性下降^[23-24]。综上所述,油相占比为 10%时,结果最优。

2.1.3 pH 值对乳液稳定性的影响 按 1.3.2 节工艺流程,保持大米水解蛋白质量分数为 2%、油相占比为 10%、均质压力为 50 MPa、均质时间为 5 min 不变,改变 pH 值(3,5,7,9,11),考察其对乳液平均粒径、乳化活性、乳化稳定性的影响。

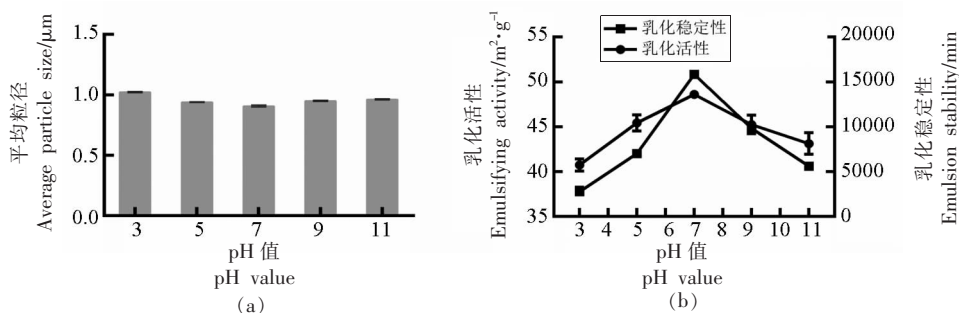


图3 pH 值对乳液 ESI、EAI、平均粒径的影响

Fig.3 Effects of pH value on ESI, EAI and average particle size of emulsion

由图 3 可以,体系 pH 值不同,乳液平均粒径相差不明显。当 pH 值为 7 时乳液平均粒径最小,EAI 和 ESI 曲线图也显示随体系 pH 值逐渐增大,乳液乳化活性和乳化稳定性均呈现先升后降的趋势,二者均于 pH 值为 7 时达到最高值。蛋白质在不同 pH 值条件下溶解度不同,当 pH 值较低时,乳液液滴间的静电斥力减小,维持蛋白稳定的静电及空间位阻作用减小,导致乳液发生聚集,粒径变大,乳化活性、乳化稳定性降低;当体系 pH 值为 7 时,液滴之间斥力较大,平均粒径最小,乳化活性和乳化稳定性最高;当 pH 值大于 7 时,乳液粒径略有增加,乳化活性及乳液稳定性下降。综合

所述,pH 值为 7 时,乳液稳定性最优。

2.1.4 均质时间对乳液稳定性的影响 按 1.3.2 节工艺流程,保持大米水解蛋白质量分数为 2%、油相占比为 10%、pH 值为 7、均质压力为 50 MPa 不变,改变不同均质时间(1,3,5,7,9 min),考察其对乳液平均粒径、乳化活性、乳化稳定性的影响。

由图 4 可知,随着均质时间的增加,乳液平均粒径呈先下降后上升趋势,EAI 和 ESI 曲线呈先上升后下降的趋势。高压均质可以改变乳液液滴的尺寸,从而改变乳液的稳定性。随着均质时间的增加,)乳液平均粒径下降,当均质时间为 5 min

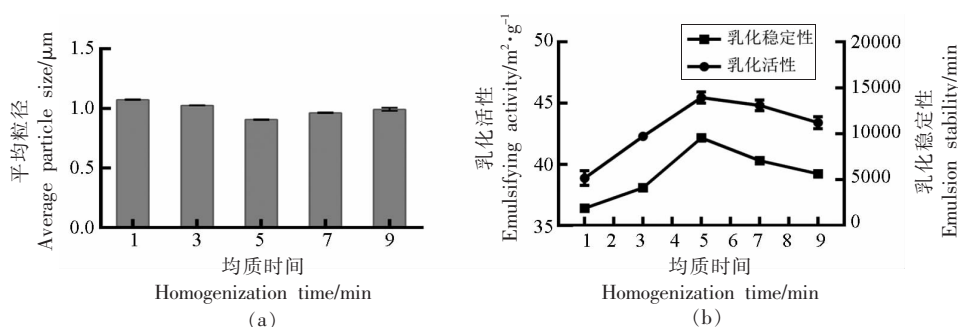


图 4 均质时间对乳液 ESI、EAI、平均粒径的影响

Fig.4 Effect of homogenization time on ESI, EAI and average particle size of emulsion

时,液滴平均粒径最小,乳化指数和乳化稳定性最高;随着均质时间的延长,乳液粒径变大,乳化指数和乳化稳定性有所下降。综上所述,均质时间为 5 min 时,乳液稳定性最优。

2.1.5 均质压力对乳液稳定性的影响 按 1.3.2

节工艺流程,保持大米水解蛋白质量分数为 2%、油相占比为 10%、pH 值为 7、均质时间为 5 min 不变,改变均质压力(0,30,50,70,90 MPa),考察其对乳液平均粒径、乳化活性、乳化稳定性的影响。

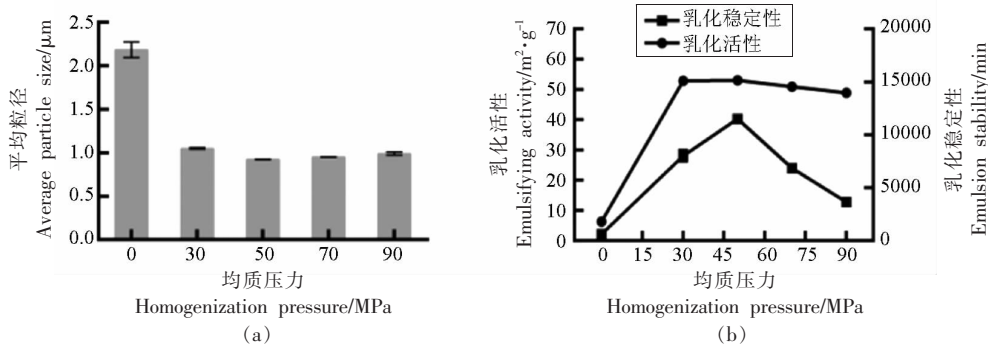


图 5 均质压力对乳液 ESI、EAI、平均粒径的影响

Fig.5 Effect of homogenizing pressure on ESI, EAI and average particle size of emulsion

由图 5 可知,高压均质后的乳液平均粒径比未均质前明显降低,这是由于高压均质可将乳液充分打散成小液滴,降低了乳液粒径。随着均质压力的增加,乳液粒径呈现下降的趋势^[25-26],当均质压力大于 50 MPa 时,乳液粒径略微增大,但不明显,乳化稳定性曲线亦呈先上升后逐渐平稳的趋势。综上所述,均质压力对乳液粒径大小影响不明显,均质压力的提高会增加设备能耗以及提高机械的要求,因此,选择乳液制备的均质压力为 50 MPa。

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 Box-Behnken 试验结果与方差分析 由表 3 和表 4 可知,葡萄籽油/大米水解蛋白乳液平均粒径及乳化稳定性两个模型差异都极显著($P <$

0.01),而失拟项差异均不显著,说明残差均由随机误差引起。两个模型的拟合度 R^2 分别为 0.9320 和 0.9364,模型拟合度较好,使用该模型对葡萄籽油/大米水解蛋白乳液的平均粒径及乳化稳定性进行预测是可靠的。在平均粒径模型中,一次项 A 、 B 、 D 、 AD ,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对平均粒径影响达到极显著水平,一次项 BC 对平均粒径影响显著,其它项差异不显著;在乳化稳定性模型中,一次项 A 、 B 、 D 、 BC ,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对乳化稳定性影响达到极显著水平,一次项 C 对乳化稳定性影响显著,其它项差异不显著。这表明各因素对乳液平均粒径和乳化稳定性影响复杂。经回归拟合后,得二次多项式如下:

$$\text{平均粒径} = 0.92 + 0.094A - 0.071B - 5.083 \times$$

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface experimental design and results

试验号	A	B	C	D	平均粒径/ μm	ESI/min
1	0	-1	1	0	1.146	1 887.670
2	0	1	1	0	0.962	1 3731.300
3	0	0	0	0	0.949	15 635.000
4	-1	0	0	-1	1.010	8 710.800
5	-1	1	0	0	0.911	18 573.000
6	0	-1	0	1	1.070	9 515.000
7	-1	-1	0	0	1.074	5 351.330
8	0	0	-1	1	1.021	8 610.000
9	1	-1	0	0	1.297	1 342.350
10	0	1	0	-1	1.027	7 515.000
11	0	0	0	0	0.945	17 379.300
12	0	1	0	1	0.953	15 509.800
13	0	0	0	0	0.942	18 467.300
14	-1	0	1	0	0.998	13 501.000
15	0	0	-1	-1	1.142	488.630
16	0	0	0	0	0.938	18 488.800
17	-1	0	-1	0	1.003	13 345.300
18	0	0	1	-1	1.106	3 499.990
19	1	0	0	1	1.018	6 539.300
20	1	0	-1	0	1.107	1 103.330
21	0	0	1	1	1.005	12 251.300
22	0	1	-1	0	1.128	3 231.100
23	0	0	0	0	0.845	20 114.100
24	-1	0	0	1	1.015	11 375.800
25	1	0	0	-1	1.401	4 043.800
26	1	0	1	0	1.228	4 325.700
27	1	1	0	0	1.086	5 146.690
28	0	-1	0	-1	1.222	507.150
29	0	-1	-1	0	1.105	5 738.300

表3 平均粒径方差分析表

Table 3 Analysis of variance table for mean particle size

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.39	14	0.028	13.70	< 0.0001	**
蛋白质质量分数(A)	0.11	1	0.11	52.33	< 0.0001	**
油相占比(B)	0.060	1	0.060	29.61	< 0.0001	**
pH(C)	3.101×10^{-4}	1	3.101×10^{-4}	0.15	0.7010	
均质时间(D)	0.057	1	0.057	28.16	0.0001	**
AB	5.760×10^{-4}	1	5.760×10^{-4}	0.29	0.6016	
AC	3.969×10^{-3}	1	3.969×10^{-3}	1.97	0.1827	
AD	0.038	1	0.038	18.64	0.0007	**
BC	0.011	1	0.011	5.31	0.0371	*
BD	1.521×10^{-3}	1	1.521×10^{-3}	0.75	0.4001	
CD	1.000×10^{-4}	1	1.000×10^{-4}	0.050	0.8271	
A ²	0.061	1	0.061	30.11	< 0.0001	**
B ²	0.037	1	0.037	18.52	0.0007	**

(续表 3)

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
C^2	0.034	1	0.034	16.74	0.0011	**
D^2	0.039	1	0.039	19.08	0.0006	**
残差	0.028	14	0.002019			
失拟	0.020	10	0.002044	1.04	0.5286	不显著
纯误差	0.007827	4	0.001957			
总和	0.42	28				
R^2	0.9320					
R^2_{Adj}	0.8640					
信噪比	13.415					
变异系数/%	4.25					

注:* 表示显著差异, $P < 0.05$; ** 表示极显著差异, $P < 0.01$; 下同。

表 4 乳化稳定性方差分析表

Table 4 Analysis of variance table for emulsification stability

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.032×10^9	14	7.371×10^7	14.74	< 0.0001	**
蛋白质质量分数(A)	1.949×10^8	1	1.949×10^8	38.95	< 0.0001	**
油相占比(B)	1.291×10^8	1	1.291×10^8	25.81	0.0002	**
pH(C)	2.319×10^7	1	2.319×10^7	4.63	0.0492	*
均质时间(D)	1.270×10^8	1	1.270×10^8	25.38	0.0002	**
AB	2.217×10^7	1	2.217×10^7	4.43	0.0538	
AC	2.351×10^6	1	2.351×10^6	0.47	0.5042	
AD	7 182.56	1	7 182.56	1.436×10^{-3}	0.9703	
BC	5.149×10^7	1	5.149×10^7	10.29	0.0063	**
BD	2.566×10^5	1	2.566×10^5	0.051	0.8241	
CD	99 206.10	1	99 206.10	0.020	0.8900	
A^2	1.412×10^8	1	1.412×10^8	28.22	0.0001	**
B^2	1.842×10^8	1	1.842×10^8	36.83	< 0.0001	**
C^2	2.430×10^8	1	2.430×10^8	48.58	< 0.0001	**
D^2	1.798×10^8	1	1.798×10^8	35.94	< 0.0001	**
残差	7.003×10^7	14	5.002×10^6			
失拟	5.913×10^7	10	5.913×10^6	2.17	0.2370	不显著
纯误差	1.090×10^7	4	2.726×10^6			
总和	1.102×10^9	28				
R^2	0.9364					
R^2_{Adj}	0.8729					
信噪比	10.805					
变异系数/%	24.39					

$$10^{-3}C - 0.069D - 0.012AB + 0.031AC - 0.097AD - 0.052BC + 0.019BD + 5.000 \times 10^{-3}CD + 0.097A^2 + 0.076B^2 + 0.072C^2 + 0.077D^2$$

$$ESI = 18016.90 - 4029.67A + 3280.42B + 1390.03C + 3252.99D - 2354.33AB + 766.67AC -$$

$$42.37AD + 3587.71BC - 253.26BD + 157.4CD - 4665.47A^2 - 5329.18B^2 - 6121.07C^2 - 5264.45D^2$$

各因素对平均粒径和乳化稳定性的影响大小顺序均为:蛋白质质量分数 > 油相占比 > 均质时间 > pH 值。

2.2.2 响应面分析与优化 通过对模型方程优化分析,得出制备葡萄籽油/大米水解蛋白乳液的最佳工艺条件为大米水解蛋白质量分数 2.17%、油相占比为 10.32%、pH 值为 7.39、均质时间为 5.81 min,在均质压力为 50 MPa 时,乳液平均粒径和乳化稳定性的理论预测值分别为 0.925481 μm 和 17 023.1 min。在均质压力为 50 MPa 下对以上条件进优化,确定最优工艺条件为大米水解蛋白质

量分数 2%,油相占比为 10%,pH 值为 7,均质时间为 5 min,此时测定平均粒径为 (0.894 ± 0.013) μm ,乳化稳定性为 $(18\ 157.7\pm 137)$ min。

2.3 贮藏时间对乳液稳定性的影响

按上文所得最优工艺条件制备新鲜葡萄籽油/大米水解蛋白乳液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮藏。对比贮藏时间分别为 1,7,15,30 d 时,乳液宏观形貌、乳液平均粒径、乳化指数、乳液微观形貌变化,并

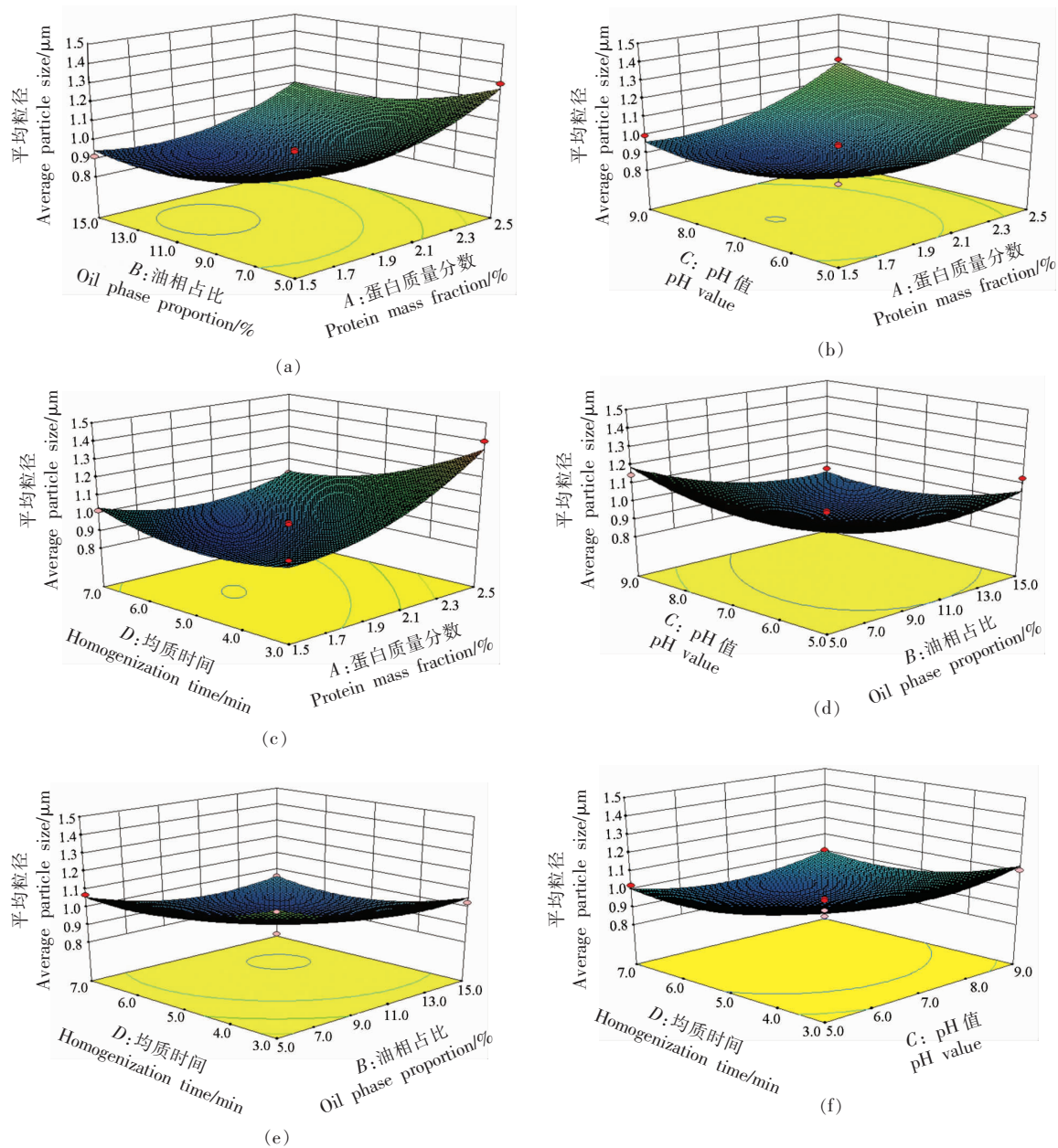


图 6 各因素交互作用对平均粒径影响的响应面

Fig.6 Response surface of the interaction of each factors on the average particle size

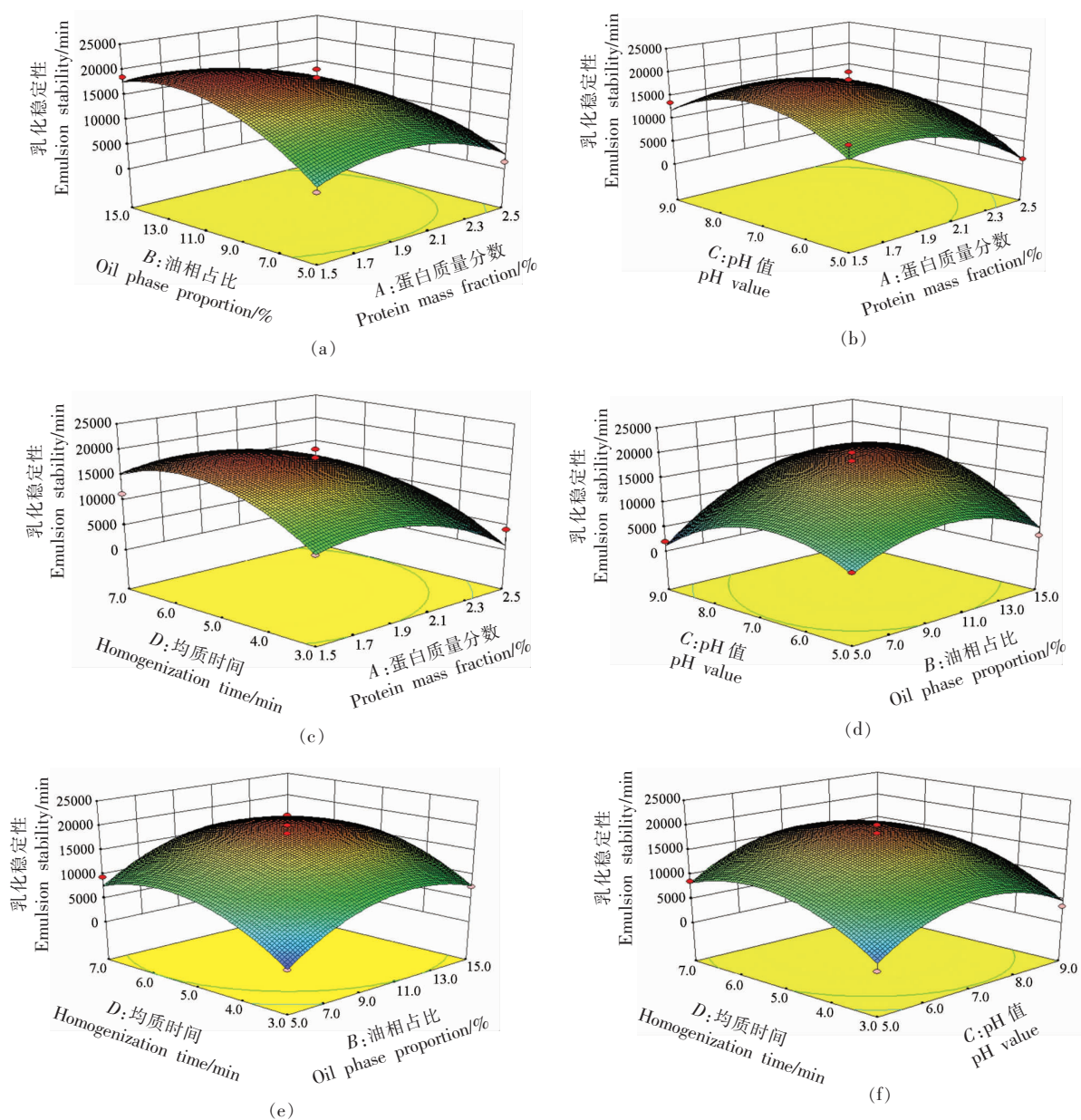


图 7 各因素交互作用对乳化稳定性影响的响应面

Fig.7 Response surface of the interaction of each factors on the stability of emulsification

对乳液的储藏稳定性进行评估。

2.3.1 乳液宏观形貌观测结果 由图 8 可知,在乳液中未添加任何稳定剂的情况下,乳液贮藏 7 d 内未发生视觉可见的析水析油现象;贮藏时间为 15 d 时,乳液发生轻微分层,乳液下层有微量水相析出;贮藏时间为 30 d 时,乳液上层有极少量脂肪浮出。总体而言,贮藏 30 d 内,大部分乳液能够稳定存在。

2.3.2 乳液乳化指数测定结果 由图 9 可知,贮藏时间为 7 天时,乳液乳化指数与新鲜乳液无异,

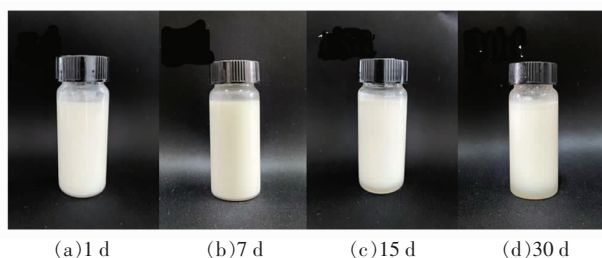


图 8 不同贮藏时间内乳液宏观观测图

Fig.8 Macrograph of emulsion at different storage time

即乳液无明显分层,稳定性较好;贮藏时间为 15 d 时,乳化指数有所下降,由于少量蛋白与油滴分离,乳液下方出现少量水相层;贮藏时间为 30 d 时,乳液乳化指数下降更为明显,此时乳液上层亦出现少量脂肪层,故乳化高度有所下降。乳化指数柱状图可以说明,随着贮藏时间的延长,乳液出现分层情况,乳液稳定性逐渐下降。

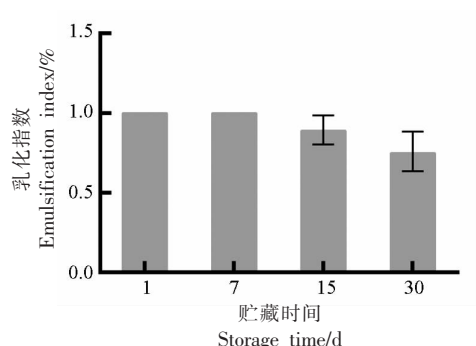


图9 不同贮藏时间内乳液乳化指数

Fig.9 EI of emulsion at different storage time

2.3.3 乳液平均粒径测定结果 粒径是评估乳液稳定性的重要指标之一,平均粒径越小,乳液乳化性能越好,乳析速度越慢,乳液越稳定。由图 10 可知,随着贮藏时间的延长,乳液平均粒径虽逐渐增大,但是总体都小于 1.5 μm 。乳液粒径整体较小,说明乳液稳定性较好。

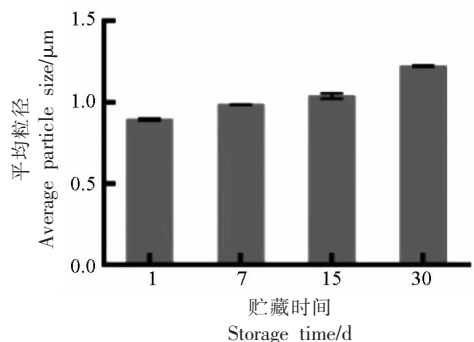


图10 不同贮藏时间对乳液平均粒径的影响

Fig.10 Effect of different storage time on average particle size of emulsion

2.3.4 乳液激光共聚焦显微镜观测结果 激光共聚焦显微镜 (CLSM) 可以用于乳液的微观形貌观测,特别是乳液界面框架和网络结构^[27]。图中第 1 行图片显示,乳液中油滴染色后呈绿色,形状为均匀球形;第 2 行图片显示,蛋白分子染色后呈红色,以分散形式呈现;第 3 行图片显示,混合染色后,红色的大米水解蛋白包裹在绿色油滴周围,形

成一层物理屏障,抑制了油滴的絮凝、聚集以及奥氏熟化等现象的发生。对比不同贮藏时间下乳液混合染色图片可知,乳液中油滴粒径随贮藏时间增加逐渐增大;当贮藏时间为 30 d 时,乳液内油滴发生聚集现象,说明乳液中蛋白乳化性逐渐变差,乳液稳定性下降。

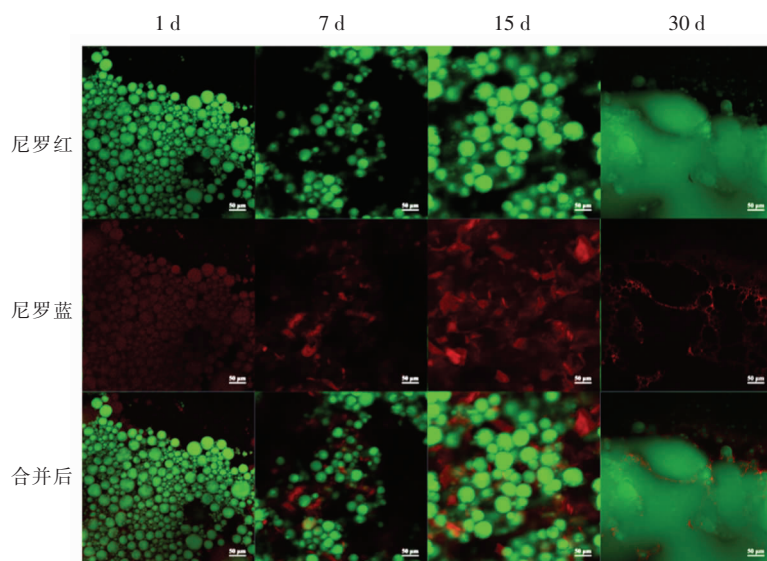


图11 不同贮藏时间乳液的 CLSM

Fig.11 CLSM of emulsions with different storage times

2.3.5 乳液低温扫描电镜观测结果分析 采用扫描电镜可以对乳液的微观形貌及空间结构进行观测。上图显示显微镜不同放大倍数下观测到的新鲜乳液的图片。由图 12a 可知,乳液整体外观大致呈球形;由图 12b 可知,乳液分布情况良好,液滴

之间未聚集以及絮凝;由图 12c 可知,大米水解蛋白分子结构较小,其紧密镶嵌在油滴的表面,在油水界面形成了一层致密的网状结构,有效的阻隔了油滴间的聚集^[28],起到了很好的乳化作用,也进一步证实该乳液为一种水包油型乳液。

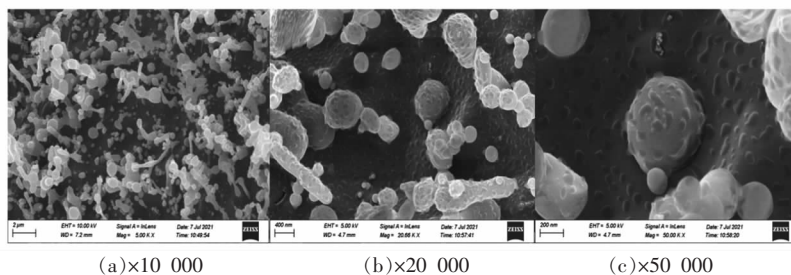


图 12 不同放大倍数下乳液低温扫描电子显微镜图

Fig.12 Under different magnification Cryo-SEM of emulsion

3 结论

以葡萄籽油和米水解蛋白为原料,制备葡萄籽油/大米水解蛋白水包油型乳液并对工艺进行优化。选择大米水解蛋白质量分数、油相占比、pH 值、均质时间、均质压力进行单因素实验,在此基础上采用 Box-Behnken 试验设计,以平均粒径和乳化稳定性为响应值进行响应面分析试验,确定最优工艺参数:确定大米水解蛋白质量分数为 2%,油相占比为 10%,pH 值为 7,均质时间为 5 min,均质压力 50 MPa;在该提取条件下,乳液平均粒径和乳化稳定性最优,其值分别为 0.894 μm 和 18 157.7 min。通过考察乳液粒径、乳化活性、乳化稳定性、乳化指数、宏观以及微观结构观察,评估了复合乳液的稳定性;结果表明,贮藏时间 30 d 内,乳液外观变化不明显,内部油滴尺寸缓慢增大,乳液总体稳定性较好。该复合乳液可用于食品工业及精细化工产业领域,可提供产品营养性和功能性,可用于制作微胶囊的壁材、营养补充剂、食品添加剂及化妆品基料等产品,用途广泛。在后期的研发工作中,拟通过向复合乳液中添加防腐剂、稳定剂等食品添加剂以达到延长产品货架期的目的,从而增加产品的实用性和应用性。

参 考 文 献

[1] BORDIGA M, TRAVAGLIA F, LOCATELLI M.

Valorisation of grape pomace: An approach that is increasingly reaching its maturity – a review[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(4): 933–942.

[2] ZHANG N, HOADLEY A, PATEL J, et al. Sustainable options for the utilization of solid residues from wine production[J]. Waste Management, 2017, 60: 173–183.

[3] 李桂华, 刘若瑜, 李珺. 葡萄籽油理化特性及组成分析的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2009, 30(6): 37–40.

LI G H, LIU R Y, LI J. Analysis of physicochemical properties and composition of grape seed oil[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2009, 30(6): 37–40.

[4] 林童, 卢贞希, 刘改霞, 等. 葡萄籽油的脂肪酸组成、抗氧化活性及其在可食性口红中的应用[J]. 中国油脂, 2021, 46(3): 118–121.

LIN T, LU Z X, LIU G X. Fatty acid composition and antioxidant activity of grape seed oil and its application in edible lipstick[J]. China Oil, 2021, 46(3): 118–121.

[5] ZHANG Y L, LI S, YIN C P, et al. Response surface optimisation of aqueous enzymatic oil extraction from bayberry (*Myrica rubra*) kernels[J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 304–308.

[6] 严静, 查园园, 钱家美, 等. 大米蛋白资源开发利用现状[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(5): 124–129.

- YAN J, CHA Y Y, QIAN J M, et al. The current development and utilization of rice protein[J]. *China Food Additives*, 2020, 31(5): 124–129.
- [7] 李清泉, 李德海. 大米蛋白的提取、特性及其应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(19): 347–351.
- LI Q Q, LI D H. Research progress in extraction, properties and application status of rice protein[J]. *Science and Technology of Food industry*, 2020, 41(19): 347–351.
- [8] 譙飞. 大米蛋白 ACE 抑制肽制备及其膜高效分离技术的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- QIAO F. The preparation of rice protein ACE inhibitory peptides and the research on its effective separation membrane technology[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016.
- [9] 赵玮, 王大为, 李倩. 水酶法提取玉米胚芽油工艺研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(24): 206–209.
- ZHAO W, WANG D W, LI Q. Optimal extraction processing of corn germ oil through water–enzymolysis method[J]. *Food Science*, 2010, 31(24): 206–209.
- [10] 徐敏. 酶法水解米渣蛋白制备寡肽工艺的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- XU M. Preparation of oligopeptide using enzymatic methodology from rice residues[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2012.
- [11] 喻芸. 复配大米蛋白理化性质和功能特性的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- YU Y. Changes of physical and chemical properties and functional properties of rice mixed protein[D]. Nanchang: Nanchang University, 2017.
- [12] HINDERINK E, BERTON–CARABIN C C. Physical and oxidative stability of food emulsions prepared with pea protein fractions[J]. *LWT*, 2021, 146: 111424.
- [13] YANG J Q, LIU G Y, ZENG H B, et al. Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83: 275–286.
- [14] 付婷婷, 木泰华. 高压均质处理对甘薯热变性蛋白 Alcalase 酶解肽乳化特性影响研究[J]. *核农学报*, 2013, 27(1): 68–74.
- FU T T, MU T H. The effect of high–pressure homogenization on emulsifying properties of enzymatic peptides obtained from sweet potato heat–denatured protein by alcalase[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 27(1): 68–74.
- [15] XIAO J, LU X, HUANG, Q. Double emulsion derived from kafirin nanoparticles stabilized Pickering emulsion: Fabrication, microstructure, stability and *in vitro* digestion profile [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 62: 230–238.
- [16] JIANG Y, ZHANG C, YUAN J H, et al. Exploiting the robust network structure of zein/low–acylgellan gum nanocomplexes to create Pickering emulsion gels with favorable properties[J]. *Food Chemistry*, 2021, 349: 129112.
- [17] XIAO N H, HE W, ZHAO Y, et al. Effect of pH and xanthan gum on emulsifying property of ovalbumin stabilized oil–in water emulsions[J]. *LWT*, 2021, 147: 111621.
- [18] SUN Z, YAN X X, XIAO Y, et al. Pickering emulsions stabilized by colloidal surfactants: Role of solid particles[J]. *Particuology*, 2022, 5: 153–163.
- [19] 李果. 壳聚糖与牛血清白蛋白作用机制及其乳化性研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018.
- LI G. Study on the mechanism of interaction between chitosan and bovine serum albumin its emulsification[J]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2018.
- [20] JAFARI S M, HE Y H, BHANDARI B, et al. Nano–emulsion production by sonication and microfluidization–A comparison[J]. *International Journal of Food Properties*, 2006, 9(3): 475–485.
- [21] LORENA C G, RENATA V T, MIRIAM D H. Effect of homogenization pressure and oil load on the emulsion properties and the oil retention of microencapsulated basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) [J]. *Drying Technology*, 2012, 30(13): 1413–1421.
- [22] MU M, PAN X, YAO P, et al. Acidic solution properties of b–casein–graft–dextran copolymer prepared through Maillard reaction[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, 301: 98–106.
- [23] CHIESA M, GARG J, KANG Y T, et al. Thermal conductivity and viscosity of water–in–oil nanoemulsions[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, 326(1): 67–72.
- [24] PARTHA K, AKANKSHA A, HAARIS M, et al. Stability of oil–in–water macro–emulsion with anionic surfactant: Effect of electrolytes and temperature[J].

- Chemical Engineering Science, 2013, 102: 176–185.
- [25] LEE L, HANCOCKS R, NOBLE I, et al. Production of water-in-oil nanoemulsions using high pressure homogenisation: A study on droplet break-up [J]. Journal of Food Engineering, 2014, 131: 33–37.
- [26] SUN C S, DAI L, LIU F G, et al. Dynamic high pressure microfluidization treatment of zein in aqueous ethanol solution[J]. Food Chemistry, 2016, 210 (1): 388–395.
- [27] TUBESHA Z, BAKAR Z A, ISMAIL M, et al. Characterization and stability evaluation of thymoquinone nanoemulsions prepared by high-pressure homogenization[J]. Journal of Nanomaterials, 2013, 20(3): 1–6.
- [28] JIANG Y, ZHANG C, YUAN J H, et al. Exploiting the robust network structure of zein/low-acyl gellan gum nanocomplexes to create Pickering emulsion gels with favorable properties[J]. Food Chemistry, 2021, 349(1): 129112.
- [29] CAO M N, LIU C Z, SHI J Y, et al. Fabrication and characterization of oil-in-water pickering emulsions stabilized by ZEIN-HTCC nanoparticles as a composite layer[J]. Food Research International, 2021, 148: 110606.

Studies on Process Optimization and Stability of Grape Seed Oil/ Rice Hydrolyzed Protein Composite Emulsion

Duan Fangyu, Wang Yue, Zhang Xu, Zhang Ying, Zhang Hao, Zhao Wei*
(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

Abstract Oil-in-water emulsion was prepared from grape seed oil and rice hydrolyzed protein. The single factor test was carried out by selecting the addition amount of rice hydrolysate protein, oil phase proportion, pH value, high pressure homogenization time and high pressure homogenization pressure. On this basis, the Box-Behnken test design was adopted to carry out response surface analysis test with the emulsion particle size and emulsification stability as response values, and the optimal process parameters were determined as follows: The average grain size was $(0.894 \pm 0.013) \mu\text{m}$ and emulsifying stability was $(18\ 157.7 \pm 137)$ min when the addition amount of rice hydrolyzed protein was 2%, oil phase proportion was 10%, pH value was 7, homogenization time was 5 min, homogenization pressure 50 MPa. Under these conditions, the composite emulsion of grape seed oil/rice hydrolyzed protein was prepared, and the changes of emulsion particle size, emulsification index and microstructure were investigated at 1, 7, 15 d and 30 d, respectively, to evaluate the storage stability of the emulsion. The results showed that the emulsion was oil-in-water type, and the oil phase was evenly dispersed in the water phase. The emulsion appearance did not change significantly within 30 days of storage. The emulsion particle size increased slightly with the increase of the storage time, and the emulsification index decreases gradually.

Keywords grape seed oil; rice hydrolyzed protein; emulsion; stability