

于丽颖,成乐琴. 柠檬酸催化大豆异黄酮糖苷水解苷元的工艺研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):294-296.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.105

柠檬酸催化大豆异黄酮糖苷水解苷元的工艺研究

于丽颖,成乐琴

(吉林化工学院化学与制药工程学院,吉林 132022)

摘要:以水解前后大豆异黄酮糖苷含量变化计算水解率为评价指标,采用单因素和正交试验法对水解的工艺条件进行优化。结果表明,柠檬酸催化大豆异黄酮糖苷水解苷元最佳工艺为:反应温度 127 ℃,反应时间为 1.8 h,柠檬酸水溶液浓度为 1.6 mol/L,水解率达到 90% 以上。

关键词:大豆异黄酮糖苷;大豆异黄酮苷元;水解;柠檬酸;正交试验

中图分类号: O629.13 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0294-03

大豆异黄酮的健康功效多种多样,可以预防多种疾病和改善骨健康状况^[1]。大豆中天然存在的异黄酮包括大豆异黄酮糖苷和大豆异黄酮苷元 2 类,其中,大豆异黄酮糖苷占到了总异黄酮含量的 80%~95%,糖苷型大豆异黄酮由于分子较大,食用后不能被人体直接吸收,一般是在体内消化酶作用下转化为苷元被人体吸收,因此大豆异黄酮的生物活性主要是苷元,而不是糖苷,但目前各种类型保健品大豆异黄酮主要成分是糖苷,资料显示,体内消化酶一般水解率在 20%~40%,产品功效较低^[2-3]。另外,每个人肠道消化酶不太一样,即使食用同样的大豆异黄酮,个体间效果相差很大。因此体外水解工艺开发就具有实际意义。

目前,大豆异黄酮糖苷转化苷元的方法最常用的是酸催化法、碱催化法、酶催化法^[4-6]。酸水解法是大豆异黄酮糖苷水解中使用最多的一种方法。酸水解通常用盐酸、硫酸作催化剂,强酸条件下水解会影响大豆异黄酮苷元的稳定性。糖

苷键具有缩醛结构,对碱较稳定,异黄酮糖苷键具有酯苷性质,可用碱水解为大豆异黄酮苷元和葡萄糖,碱催化产物苷元容易降解,应用受到很大限制。酶水解法具有水解条件温和,产物稳定性好,纯度高等特点,但酶生产成本很高,而且酶不容易重复利用。工业生产中还需要进一步寻找廉价又高效能够水解大豆异黄酮的 β -葡萄糖苷酶,并进一步研究低成本酶固化技术。

柠檬酸是人体内部循环的重要中间产物,易被人体吸收,因此作为性能优异的食品添加剂和功能性食品广泛应用于食品、化妆品、医疗和保健品等领域。用柠檬酸做催化剂来催化大豆异黄酮糖苷的水解,避免目前工业上采用酸、碱等水解方法对设备的腐蚀,水解产物无需分离直接用于功能性食品,能够将无效或低效成分大豆异黄酮糖苷变为有效和高效成分大豆异黄酮苷元,增强了大豆异黄酮的生物活性,弥补了现有大豆异黄酮转化苷元工艺中选用盐酸催化、碱催化 and 酶催化等技术缺陷,因此是一条应用价值较高工艺路线。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆异黄酮糖苷标样:大豆苷,黄豆黄苷、染料木苷(天津马克生物有限公司),含量超过 98%。糖苷型大豆异

质。另一方面,通过 HACCP 体系的规范化管理,可以建立产品溯源体系,提高产品的商品价值。

参考文献:

- [1] 施文正,朱孔辉,汪之和. 鱿鱼丝产品色变的研究[J]. 江苏农业科学,2010(3):366-367.
- [2] Kafetzopoulos D P, Psomas E L, Kafetzopoulos P D. Measuring the effectiveness of the HACCP food safety management system[J]. Food Control,2013,33(2):505-513.
- [3] 吴少杰,朱强,吕玲玲,等. 鱿鱼丝不同包装条件下细菌学研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(7):4034-4036.
- [4] 李俐俐,严登秀,赵永富,等. 出口冷冻虾仁辐照技术研究[J]. 江苏农业科学,2009(6):332-333.
- [5] 赵永富,刘春泉,冯敏,等. γ 辐照降解氯霉素的研究[J]. 江苏农业学报,2006,22(3):289-292.

收稿日期:2014-01-27

基金项目:吉林省吉林市科技项目(编号:201122306)。

作者简介:于丽颖(1967—),女,吉林省吉林市人,硕士,教授,主要研究方向为天然产物转化及精细化学品加工。E-mail:liyinyu0000@126.com。

4 鱿鱼丝 HACCP 监控记录

即食鱿鱼丝加工过程 HACCP 是由一系列记录来体现的,包括原料检验、去杂清洗、成品检验等关键工序记录以及 CCP 出现失控时的内容、场所、时间、原因及处理方法记录。此外还应包括车间设备器具消毒、清洁的频率及过程,用时、当事人以及工人卫生状况等一般管理记录。HACCP 记录至少保留 3 年。

5 结论与讨论

在即食鱿鱼丝加工过程中引入 HACCP 质量管理体系,能够有效提高鱿鱼丝产品的质量安全水平。一方面通过对鱿鱼丝加工各环节进行预防控制可以大大减少各种生物危害、物理危害、化学危害的发生概率,提高鱿鱼丝产品的质量品

黄酮提取物(西安金绿生物工程公司),含量为 91.3%。甲醇为色谱纯,柠檬酸(AR),乙醚(AR)。

1.2 主要仪器

高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司);分析天平(北京医用天平厂);CS101-3 型电热鼓风干燥箱(重庆实验设备厂);KQ-250VDE 型双频数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 试验步骤

称取大豆异黄酮糖苷 50 mg 置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入一定浓度柠檬酸水溶液 10 mL,超声水浴 1 h,超声频率 45 kHz,水浴温度 75 ℃。反应液转移到高压釜中,反应温度为 110 ~ 130 ℃,反应时间为 0.5 ~ 2 h,反应结束后,冷却反应液至室温。取一定量反应液用饱和碳酸钠水溶液中和至 pH 值=7,用乙酸乙酯萃取,取酯层,在硅胶板上点样,放入展开剂(乙酸乙酯:三氯甲烷:甲醇=5:5:2)中展开,紫外灯下观察水解程度;另取一定量反应液用甲醇稀释到 100 mg/L,过 0.45 μm 滤膜后上机,用 HPLC 定性和定量检测反应液中糖苷的含量。

1.4 高效液相色谱法(HPLC)测定糖苷及其苷元的含量

1.4.1 色谱条件 色谱柱:Shimadzu VP-ODS C₁₈ 柱,150 mm×4.6 mm,5 μm;流动相:A 为 0.4% 磷酸水溶液,B 为甲醇;梯度洗脱程序:0~10 min,30%~35% B;10~20 min,35%~40% B;20~30 min,40%~55% B;30~40 min,55%~65% B;流速:1 mL/min;检测波长为:260 nm,测定温度为 30 ℃;进样量:20 μL。

根据糖苷和苷元化学性质的不同,从色谱柱中流出的先后顺序不同,经紫外检测器测定,通过与标准品比较,以保留时间定性,峰面积定量,外标法计算。

大豆异黄酮糖苷水解率=水解前后大豆异黄酮糖苷含量之差/水解前大豆异黄酮糖苷含量×100%。

1.4.2 标准曲线的绘制 精确称取一定量大豆异黄酮糖苷标准品于 100 mL 的容量瓶中,用甲醇超声溶解 30 min,再用甲醇定容至刻度线,摇匀,分别精确吸取上述标准溶液 1、2、3、4、5 mL,用甲醇定容至 25 mL,配制成 10、20、30、40、50 μg/mL 的系列标准溶液,摇匀,备用。

用 HPLC 法分别测定配制的系列标准溶液,进样量 20 μL,每个浓度平行测定 3 次。以峰面积平均值为纵坐标,浓度为横坐标,峰面积 A 对浓度 C (μg/mL) 进行回归分析,得到线性方程。

回归方程分别为:

大豆苷: $A = 78.576C + 39.121, r = 0.9999$;

黄豆苷元: $A = 69.321C + 33.867, r = 0.9998$;

染料木苷: $A = 99.671C + 35.586, r = 0.9999$ 。

式中: A 为大豆异黄酮的峰面积; C 为大豆异黄酮的浓度,μg/mL,线性范围是 10~50 μg/mL。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 不同反应温度对大豆异黄酮水解率的影响 固定大豆异黄酮糖苷的量为 50 mg,柠檬酸催化剂浓度为 1.6 mol/L,溶剂用量为 10 mL,反应时间为 2 h,改变反应温度,探索不同

反应温度对大豆异黄酮糖苷水解苷元水解率的影响。试验结果(表 1)表明,随着温度增加,水解率逐渐增加。当反应温度为 125 ℃,水解率达到 90.5%,一般大豆异黄酮糖苷在人体消化酶作用下,水解率为 20% 左右,大豆异黄酮糖苷水解率达到 90% 更具有实际意义。因此,在单因素水解反应试验中,适宜温度为 125 ℃。为了进一步考察反应温度对大豆异黄酮糖苷水解率的影响,选择反应温度分别为 123、125、127 ℃ 进行正交试验。

表 1 不同反应温度对水解率的影响

反应温度 (℃)	催化剂浓度 (mol/L)	反应时间 (h)	溶剂用量 (mL)	水解率 (%)
110	1.6	2	10	78.3
115	1.6	2	10	80.6
120	1.6	2	10	87.5
125	1.6	2	10	90.5
130	1.6	2	10	93.4

2.1.2 不同柠檬酸水溶液浓度对大豆异黄酮糖苷水解率的影响 固定大豆异黄酮糖苷的量为 50 mg,反应温度为 125 ℃,反应时间为 2 h,溶剂用量为 10 mL,改变催化剂柠檬酸水溶液的浓度,探索催化剂浓度对大豆异黄酮糖苷水解苷元水解率的影响。试验结果(表 2)表明,随催化剂柠檬酸水溶液浓度的增加,水解率逐渐增加;当柠檬酸浓度为 1.6 mol/L 时,水解率为 90.5%。再增加酸浓度,水解率有所降低,可能的原因,柠檬酸为有机弱酸,适宜的浓度酸性较强,浓度过大会抑制其电离,从而减弱酸性,所以适宜的柠檬酸浓度为 1.6 mol/L。为了进一步考察催化剂浓度对大豆异黄酮糖苷水解率的影响,选择柠檬酸浓度分别为 1.4、1.6、1.8 mol/L 进行正交试验。

表 2 不同催化剂柠檬酸水溶液浓度对水解率的影响

催化剂浓度 (mol/L)	反应温度 (℃)	溶剂用量 (mL)	反应时间 (h)	水解率 (%)
0.5	125	10	1.6	52.3
1.0	125	10	1.6	78.3
1.3	125	10	1.6	80.4
1.6	125	10	1.6	90.5
1.8	125	10	1.6	89.6
2.0	125	10	1.6	85.7

2.1.3 不同反应时间对大豆异黄酮糖苷水解率的影响 固定大豆异黄酮糖苷的量为 50 mg,催化剂浓度为 1.8 mol/L,反应温度为 125 ℃,溶剂用量为 10 mL,改变反应时间,探索不同反应时间对大豆异黄酮糖苷水解苷元水解率的影响。试验结果(表 3)表明,随反应时间增加,水解率也逐渐增加;当反应时间为 1.6 h,水解率接近 90%,延长时间,水解率变化不大。为了进一步考察反应时间对大豆异黄酮糖苷水解率的影响,选择反应时间分别为 1.4、1.6、1.8 h 进行正交试验。

2.2 正交试验

根据单因素试验结果,大豆异黄酮糖苷水解苷元主要影响因素包括催化剂浓度、反应时间和反应温度,根据正交试验影响因素构建正交试验表进一步确立水解反应的最佳工艺条件。

2.2.1 因素及水平的考察 在单因素试验的基础上,采用正交试验方法,优化大豆异黄酮糖苷水解苷元的工艺。以水

表 3 不同反应时间对水解率的影响

反应时间 (h)	反应温度 (℃)	溶剂用量 (mL)	催化剂浓度 (mol/L)	水解率 (%)
0.5	125	10	1.6	57.5
1.0	125	10	1.6	68.2
1.2	125	10	1.6	73.4
1.4	125	10	1.6	82.9
1.6	125	10	1.6	89.2
1.8	125	10	1.6	89.7
2.0	125	10	1.6	90.5

解率为考察指标,选择反应时间(1.4、1.6、1.8 h)、反应温度(123、125、127℃)、柠檬酸浓度(1.4、1.6、1.8 mol/L)、作为考察因素,按 3 因素 3 水平进行正交试验设计 $L_9(4^3)$,见表 4,在此条件下对大豆异黄酮糖苷按“1.3”节方法进行水解,按“1.4”节方法,用 HPLC 定性和定量检测反应液糖苷及其苷元的含量,计算水解率,确定大豆异黄酮糖苷水解苷元的最佳工艺。

表 4 大豆异黄酮糖苷水解苷元正交试验因素水平

水平因素	A:反应时间 (h)	B:反应温度 (℃)	C: 酸浓度 (mol/L)
1	1.4	123	1.4
2	1.6	125	1.6
3	1.8	127	1.8

表 6 柠檬酸水解正交试验方差分析

因素	Q	f	MS	F 值	$F_{0.01}$	$F_{0.05}$	$F_{0.10}$	显著性
因素 A	70.2	2	35.1	117.0	99.0	19.0	9.0	**
因素 B	152.4	2	76.2	254.0	99.0	19.0	9.0	**
因素 C	18.5	2	9.25	30.8	99.0	19.0	9.0	*
误差	0.6	2	0.3					

2.3 最佳工艺验证试验

为了考察上述优选工艺的稳定性,按该工艺条件重复提取 3 次,测得大豆异黄酮糖苷的水解率分别为 92.8%、91.3%、92.5%,平均为 92.2%,表明本试验优选的工艺稳定可靠。

3 结论

在单因素试验基础上,通过正交试验优化柠檬酸催化大豆异黄酮糖苷水解苷元的工艺条件,以大豆异黄酮糖苷的水解率作为评价指标,得出各因素对水解效果影响的主次顺序依次为反应温度>反应时间>柠檬酸水溶液浓度。通过极差分析可知,反应温度对水解率影响显著。大豆异黄酮糖苷水解的最佳工艺条件为反应温度 127℃,反应时间 1.8 h,催化剂柠檬酸水溶液浓度 1.6 mol/L,在此条件下所得的大豆异黄酮糖苷水解率达到 90% 以上。

本研究成功探索出一条简便、清洁、成本较低,水解产物无需后处理直接用于功能性食品的绿色合成工艺路线,弥补了现有工艺中的技术缺陷,因此实用性较高。

2.2.2 正交试验结果 正交试验结果见表 5。从表 5 的极差分析结果可知,3 因素对水解率的影响程度依次为 $B > A > C$,3 因素的最佳水平组合为 $A_3B_3C_2$,即柠檬酸催化大豆异黄酮糖苷水解苷元的最佳工艺条件为:反应温度 127℃,反应时间为 1.8 h,柠檬酸水溶液浓度为 1.6 mol/L,水解率达到 90% 以上。表 6 的方差分析结果表明,水解温度和水解时间对大豆异黄酮糖苷的水解效果具有显著影响。

表 5 大豆异黄酮糖苷水解苷元正交试验结果

实验号	因素				总水解率 η (%)
	A:反应 时间(h)	B:反应 温度(℃)	C:酸浓度 (mol/L)	D:误差	
1	1	1	1	1	72.93
2	1	2	2	2	82.62
3	1	3	3	3	83.15
4	2	2	3	1	85.04
5	2	3	1	2	83.66
6	2	1	2	3	76.77
7	3	3	2	1	91.72
8	3	1	3	2	82.16
9	3	2	1	3	87.99
k_1	238.7	231.86	244.58	249.69	
k_2	245.47	255.65	251.11	248.44	
k_3	261.87	258.53	250.35	247.91	
极差	23.17	26.67	6.53	1.78	

参考文献:

[1] Kuo L C, Lee K T. Cloning, Expression, and characterization of two beta - glucosidases from isoflavone glycoside - hydrolyzing *Bacillus subtilis*(natto) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(1):119 - 125.

[2] Kawakami Y, Tsurugasaki W, Nakamura S, et al. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16(4):205 - 212.

[3] Setchell K R, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human healthy [J]. Journal of Nutrition, 1999, 129: 758 - 767.

[4] 高荣海, 郑 艳, 刘长江. 大豆异黄酮糖苷酸法水解工艺的研究 [J]. 粮食加工, 2008, 33(1):54 - 57.

[5] 孙艳梅, 张永忠, 许 晶, 等. 黑曲霉 β - 葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷研究[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(1):9 - 12.

[6] 王林山. 大豆异黄酮的研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2004 (11):18 - 21.