

从大豆糖蜜中分离大豆低聚糖的研究

张丽丽,杨薇薇,张永忠*

(东北农业大学理学院应用化学系,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:以大豆糖蜜为原料,通过单因素考察及正交实验优化了醇沉法提取大豆低聚糖的实验条件,再利用超滤技术除去大豆低聚糖粗提物中大豆乳清蛋白,得到了纯度较高的大豆低聚糖。结果表明:液料比为 30:1,提取温度为 50℃,乙醇浓度为 95%,乙醇浸提时间为 2h,低聚糖粗提物得率为 55.0%,得到低聚糖产品的纯度为 66.3%;超滤纯化低聚糖粗提物后得到低聚糖的纯度为 72.2%。

关键词:大豆糖蜜,大豆低聚糖,提取

Study on soybean oligosaccharide separated from soy molasses

ZHANG Li-li, YANG Wei-wei, ZHANG Yong-zhong*

(College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To extract soybean oligosaccharides from soy molasses, the best culture medium of extracted soybean oligosaccharides was confirmed by investigated the single factor and orthogonal experiments. To obtain the best purity of soybean oligosaccharides, ultrafiltration was used to eliminate soybean whey of soybean oligosaccharides. The results showed: the ratio of samples to solvent was 30:1 (mL/g), the temperature of extraction was 50℃, the concentration of ethanol was 95%, the time of ethanol extraction was 2h. The extraction rate of this method was 55.0%, the yield of the production was 66.3%, the purity of soybean oligosaccharides by ultrafiltration was 72.2%.

Key words: soy molasses; soybean oligosaccharides; extract

中图分类号:TS241

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2009)04-0258-04

大豆糖蜜(Soy molasses)是醇法生产大豆浓缩蛋白的副产物,大豆糖蜜性状黏稠,色泽较深。脱水大豆糖蜜中一般含有 6%~8% 粗蛋白(脂蛋白、糖蛋白、胰蛋白酶抑制剂)、5%~8% 的脂类物质(包括甘油酯、磷脂和植物甾醇)、7%~9% 的灰分、6%~15% 的大豆皂苷、1.5%~2.5% 的大豆异黄酮、4%~6% 的酚酸以及果胶质、阿拉伯半乳糖等,其中大豆低聚糖为其主要成分,约含有 59%~62%。大豆低聚糖是大豆中可溶性糖的总称,主要包括蔗糖、棉子糖和水苏糖,其中单糖和蔗糖占 65%,棉子糖占 5%~7%,水苏糖占 30%~32%。棉子糖和水苏糖为功能性低聚糖,具有增殖双歧杆菌的作用^[1]。据统计国内的大豆加工企业平均每生产 4t 醇法大豆浓缩蛋白就会有 1t 大豆糖蜜生成,全国每年大约会产生 3~5 万 t 大豆浓缩蛋白的副产物——大豆糖蜜。由于大豆糖蜜性状黏稠非常难处理,大多作为废液排放或以低廉的价格(每吨约几百元)作为饲料或发酵工业的原料出售。若能将大豆糖蜜加以综合开发利用,对于降低企业生产成本,“变废为宝”,减少环境污染等都具有重要意义^[2]。超滤是一种压力驱动膜分离过程,它是根据高分子溶质之间或高分子与小分子溶质之间分子量

的差别进行分离的方法^[3,4]。具有被分离成分稳定、能耗低、无二次污染等优点,目前被广泛应用于化工、食品、医药卫生及废水处理等领域^[5]。大豆低聚糖是多羟基的醛或酮,可溶于水,但是在低聚糖水溶液中加入乙醇会破坏低聚糖与水形成的氢键,从而降低低聚糖在水中的溶解度,使低聚糖以沉淀的形式析出。这可能是乙醇更易与水形成氢键的缘故。利用低聚糖溶于水而不溶于高浓度乙醇的性质可使低聚糖沉淀出来得到大豆低聚糖粗提物。通过单因素实验和正交实验确定其最佳醇沉工艺条件,再用超滤技术纯化大豆低聚糖粗提物,得到纯度更高的大豆低聚糖^[8]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆糖蜜 固形物含量 69.5%,黑龙江省粮食研究所提供;95% 乙醇、氢氧化钠、盐酸、葡萄糖、葱酮、硫脲、考马斯亮蓝 G-250、85% 浓磷酸、浓硫酸、牛血清蛋白等 分析纯。

pHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁厂;DZS-6032 型真空干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;BS124S 型电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;TU1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;ZFQ85A 型旋转蒸发仪 上海医械专机厂;SMB-20 型超滤器 中国科学院上海

收稿日期:2008-09-01 * 通讯联系人

作者简介:张丽丽(1981-),女,在读硕士研究生,研究方向:食品科学。

原子核研究所; ZT60-600 蠕动泵 保定兰格恒流泵有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 总糖含量的测定^[6]

1.2.1.1 蒽酮试剂的配制 称取 0.2g 蒽酮和 1g 硫脲置于烧杯中,慢慢加入 100mL 浓硫酸,边加边搅拌,溶解后呈黄色透明溶液。

1.2.1.2 葡萄糖标准溶液 先配成 1g · L⁻¹ 的葡萄糖溶液,然后分别吸取 1、2、4、6、8 和 10mL,分别置于 100mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,可得 10、20、40、60、80 和 100mg · L⁻¹ 的葡萄糖系列浓度溶液。

1.2.1.3 测定 吸取样液,系列标准糖液、蒸馏水各 1mL,分别置于八支试管中,沿壁各加入 5mL 冷的蒽酮试剂,混匀,于试管口盖上玻璃盖,在沸水浴中加热 10min,取出在流水中冷却 20min 后,在 620nm 波长下,以试剂空白调零,测定吸光值,作标准曲线。与标准对照,求出样品含糖量。

1.2.2 蛋白质含量的测定^[7]

1.2.2.1 考马斯亮蓝 G-250 试剂的配制 精密称取考马斯亮蓝 G-250 100.00mg 加入 95% 乙醇 50mL,再加入 85% 磷酸 100mL,最后用蒸馏水定容至 1000mL,最终试剂含 0.01% 考马斯亮蓝 G-250,4.7% 乙醇,8.5% 磷酸,置于棕色瓶中备用。

1.2.2.2 牛血清白蛋白标准溶液 精确称取牛血清白蛋白 10.00mg,用少量蒸馏水溶解定容至 100mL,即为 0.1mg/mL 蛋白质标准液。

1.2.2.3 测定 吸取样液 0.1mL,5mL 考马斯亮蓝 G-250,分别置于八支试管中,显色 10min,在 595nm 波长下,以试剂空白调零,测定吸光值,作标准曲线。与标准对照,求出样品蛋白质含量。

1.2.3 水分含量的测定 采用 100~105℃ 烘干法 (GB5512-1985)。

1.2.4 灰分的测定 采用灼烧法 (GB5009.4-85)。

1.2.5 低聚糖粗提物得率及纯度的测定 准确称取大豆糖蜜 1.0000g 于圆底烧瓶中,加入定量不同浓度的乙醇溶液,在不同条件下搅拌提取,将沉淀物放入真空干燥箱中,在 50℃ 下干燥 5h 后取出放入干燥器中,冷却至室温后进行称重,得到大豆低聚糖粗提物。按下列公式计算大豆低聚糖粗提物的得率及大豆低聚糖的纯度:

大豆低聚糖粗提物得率 (%)

$$= \frac{\text{沉淀的质量 (mg)}}{\text{原料的质量 (mg)}} \times 100\%$$

大豆低聚糖纯度 (%)

$$= \frac{\text{产品中低聚糖质量 (mg)}}{\text{产品质量 (mg)}} \times 100\%$$

1.2.6 超滤法纯化低聚糖粗提物实验 将大豆低聚糖粗提物以液料比为 50:1,应用截留相对分子量为 5000Da 的膜,室温下进行超滤^[2],将透过液减压浓缩,真空干燥,得大豆低聚糖产品。

1.2.7 醇沉法提取低聚糖粗提物的单因素及正交实验设计 本研究通过考察醇沉法提取工艺中乙醇浓度、液料比、浸提温度、浸提时间等影响低聚糖粗提物得率的因素,进行单因素及正交实验,确定最佳的

工艺参数。

表 1 正交实验因素水平表

水平	因素			
	A 液料比 (mL/g)	B 提取温度 (℃)	C 乙醇浓度 (%)	D 提取时间 (h)
1	20:1	50	85	1.0
2	25:1	60	90	1.5
3	30:1	70	95	2.0

2 结果与分析

2.1 原料分析结果

蒽酮法测定总糖含量的标准曲线见图 1,考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量的标准曲线见图 2,大豆糖蜜中一些成分的含量见表 2。

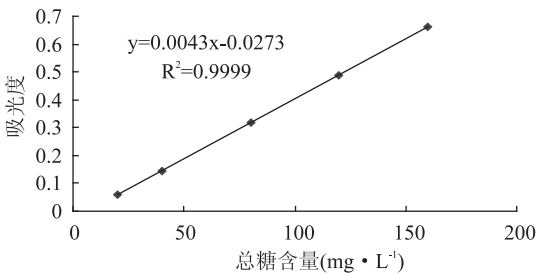


图 1 蒽酮法测定总糖含量的标准曲线

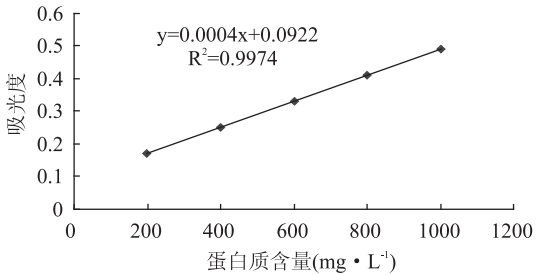


图 2 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量的标准曲线

表 2 大豆糖蜜中一些成分含量的测定结果 (%)

成分	水分	灰分	总糖	蛋白质
含量	30.50	2.32	56.00	5.000

2.2 醇沉法提取低聚糖粗提物的单因素实验结果与分析

2.2.1 乙醇浓度对低聚糖粗提物得率的影响 在液料比 20:1,浸提温度 40℃,浸提时间 1.5h 条件下,选取乙醇溶剂浓度 75%、80%、85%、90%、95% 进行浸提实验,结果如图 3 所示。

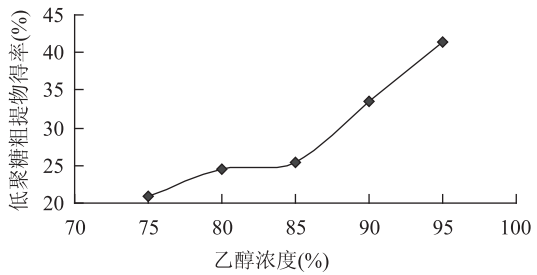


图 3 乙醇浓度对低聚糖提取效果的影响

由图 3 可以看出,随着乙醇浓度的增加,低聚糖粗提物得率逐渐增加,当乙醇浓度达到 95% 时,低聚糖粗提物得率达到最大,考虑到经济成本和后续工

艺,选择了95%的乙醇浓度。

2.2.2 浸提温度对低聚糖粗提物得率的影响 在液料比20:1,浸提时间1.5h,乙醇浓度95%条件下,选取浸提温度40、50、60、70、80℃进行浸提实验,结果如图4所示。

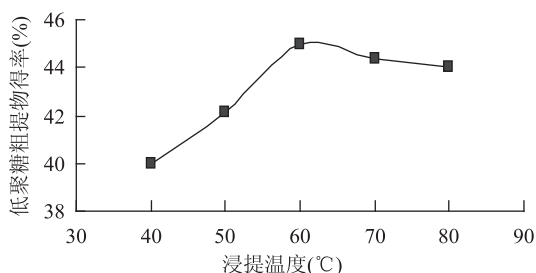


图4 浸提温度对低聚糖提取效果的影响

由图4可以看出,随着浸提温度的升高,低聚糖粗提物得率增加,60℃时低聚糖的提取率最高。这可能是因为加入乙醇破坏了低聚糖与大豆糖蜜中的水形成的氢键,使低聚糖以沉淀的形式析出。随着温度的上升,分子运动速度加快,加速了破坏低聚糖水溶液中氢键的趋势,因此出现了随着温度的升高低聚糖粗提物得率增加的现象。当浸提温度升高到60℃以上时,低聚糖粗提物得率呈缓慢下降趋势,这可能是因为大豆糖蜜中有些物质在温度升高时,更易溶于醇溶液中,导致了沉淀的减少,最终导致低聚糖粗提物得率的减少。

2.2.3 浸提时间对低聚糖粗提物得率的影响 在液料比20:1,浸提温度60℃,乙醇浓度95%条件下,选取浸提时间1、1.5、2、3、4h进行浸提实验,结果如图5所示。

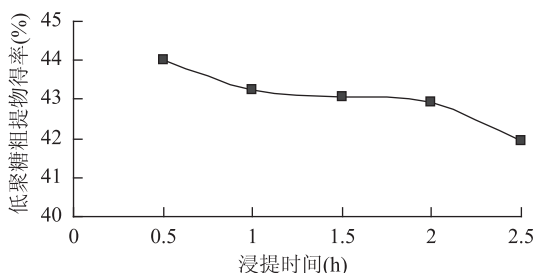


图5 浸提时间对低聚糖提取效果的影响

由图5可以看出,在1.5h时,固液二相之间达到了传质平衡,再延长浸提时间得率会呈下降趋势。这可能是因为增加浸提时间,大豆糖蜜中某些物质可能会分解生成某些更易溶于乙醇的物质。因此确定最佳提取时间为1.5h。

2.2.4 液料比对低聚糖粗提物得率的影响 在浸提温度60℃,浸提时间1.5h,乙醇浓度95%条件下,选取液料比10:1、15:1、20:1、25:1、30:1进行浸提实验,结果如图6所示。

由图6可以看出,随着液料比的增加,低聚糖粗提物得率呈下降趋势,当液料比达到25:1与30:1时低聚糖粗提物得率基本保持不变,产生此现象的原因是随着乙醇量的增加,大豆糖蜜中的醇溶性物质充分溶入乙醇中,导致沉淀量的减少,当醇溶性物质达到了由固相到液相间的传质平衡时,沉淀量就会保持不变。

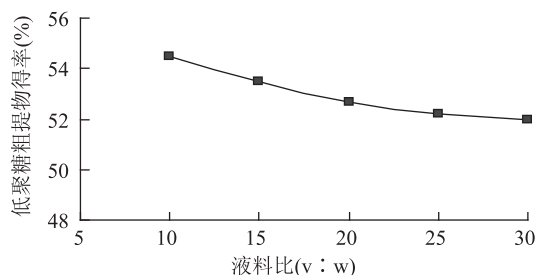


图6 液料比对低聚糖提取效果的影响

2.3 醇沉法提取低聚糖粗提物的正交实验

在单因素实验的基础上,对影响低聚糖粗提物得率效果的因素进行正交实验,并对实验结果进行统计分析,结果如表3所示。

表3 正交实验设计与结果

实验号	A	B	C	D	低聚糖粗提物得率(%)
1	1	1	1	1	21.85
2	1	2	2	2	34.76
3	1	3	3	3	41.40
4	2	1	2	3	41.88
5	2	2	3	1	45.59
6	2	3	1	2	23.67
7	3	1	3	2	47.21
8	3	2	1	3	54.96
9	3	3	2	1	30.66
K ₁	98.01	110.94	71.61	98.10	
K ₂	111.14	106.44	107.10	105.64	
K ₃	111.78	95.73	136.06	109.37	
k ₁	32.67	36.98	23.87	32.70	
k ₂	37.05	35.48	35.70	35.21	
k ₃	37.26	31.91	45.35	36.46	
R	4.59	5.07	21.48	3.76	

从极差分析结果得出影响低聚糖粗提物得率的因素主次顺序为C>B>A>D,即:浓度、提取温度、液料比、提取时间。最佳组合为A₃B₁C₃D₃,即液料比为30:1,提取温度为50℃,乙醇浓度为95%,提取时间为2h,因最佳组合不在实验设计中,需做验证实验。

2.4 验证实验

按上面优选工艺A₃B₁C₃D₃,平行提取3次,低聚糖粗提物得率为55.0%,得到低聚糖产品的纯度为66.3%。在截留相对分子量为5000Da、室温下进行超滤纯化后得到的大豆低聚糖纯度为72.2%,结果表明实验所确定的最佳工艺为较优工艺。

2.5 超滤纯化实验

应用最佳工艺条件获得了大豆低聚糖粗提物。由于选用了醇沉淀的方法除去了大豆糖蜜中的水、异黄酮、皂苷、醇溶性蛋白等醇溶性物质,得到杂质含量较少的低聚糖粗提物。由于大豆糖蜜粗提物中还含有水溶性大豆蛋白,除去后可以进一步提高产品纯度。在室温下,选择截留相对分子量为5000Da的膜进行超滤纯化,得到了纯度较高的大豆低聚糖产品。产品纯度由粗提物的66.3%提高到了72.2%。由于我们先用醇沉法除去了大量的醇溶性物质,这样大大减少了超滤膜的负荷,对于减轻超滤膜的污染,延长超滤膜的使用寿命具有重要意义。

(下转第263页)

表3 正交实验结果

实验号	A	B	C	多肽得率 (%)	水解度 (%)
1	1	1	1	78.40	44.07
2	1	2	2	80.39	34.37
3	1	3	3	79.78	30.32
4	2	1	2	81.68	33.40
5	2	2	3	80.77	36.42
6	2	3	1	80.64	45.43
7	3	1	3	81.19	35.06
8	3	2	1	82.21	44.48
9	3	3	2	84.38	41.93
K ₁	79.52	80.42	80.41		
K ₂	81.03	81.12	82.15		
K ₃	82.59	81.60	80.58		
R	3.07	1.18	1.74		
K' ₁	36.25	37.51	44.66		
K' ₂	38.42	38.42	36.57		
K' ₃	40.49	39.23	33.93		
R'	4.24	1.72	10.73		

注:K₁、K₂、K₃ 为多肽得率的分析数据;K'₁、K'₂、K'₃ 为水解度的分析数据。

2.4 胶原多肽的傅里叶变换红外光谱分析

图4 红外光谱分析可知,3200~3500cm⁻¹之间3246.87cm⁻¹的强吸收归属于酰胺 A 带的 N-H 的伸缩振动(氢键)峰;3066cm⁻¹处的弱吸收为酰胺 B 带的 C-N 伸缩振动引起的特征吸收峰。一般认为在3080cm⁻¹附近是多肽(-CONH-)的特征吸收,而2962.31cm⁻¹出现的吸收峰恰好说明胶原多肽具有多肽特征^[5]。1641.14cm⁻¹的强吸收峰属于酰胺 I 带,是由蛋白多肽骨架的 C=O 伸缩振动所引起的。1455.24cm⁻¹属于胶原多肽氨基酸残基的侧链基团,应是苯环骨架振动造成的,说明有苯环存在。由于胶原多肽的甘氨酸和特征氨基酸羟脯氨酸和脯氨酸含量高,且形成独特的(Gly-Pro-Hyp)_n序列,这使得胶原多肽在1200~1400cm⁻¹光谱范围内具有其他蛋白质所没有的红外光谱特征,1244.03cm⁻¹和1338.15cm⁻¹归属于酰胺Ⅲ带,是由 C-N 伸缩振动和

N-H 弯曲振动引起的;胶原多肽的特征氨基酸 Hyp 的特征吸收在1107.38cm⁻¹和847.92cm⁻¹被表征出来,说明胶原多肽具有胶原和蛋白多肽的双重特征。

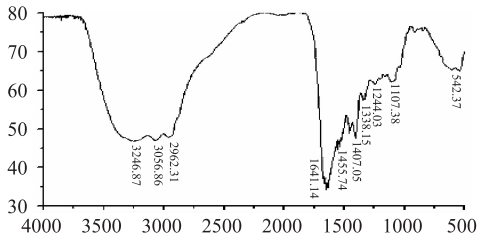


图4 胶原多肽红外图谱

3 小结

本文采用荧光/粘度法和浊度/分光光度法分别测定明胶等电点,最终确定等电点为 pH4.5~4.6。利用木瓜蛋白酶水解明胶制备胶原多肽,最适工艺条件为温度 60℃,明胶浓度 6%,pH7.0 的条件下水解明胶 6h,多肽得率为 85.38%,水解度为 45.87%。傅里叶变换红外光谱分析表明,胶原多肽具有胶原和蛋白多肽的双重特征。与明胶相比,胶原多肽具有良好的溶解性,粘度低,耐酸碱和高温性能好,而且可以在肠道直接被吸收,比氨基酸具有更大的吸收量,是生产功能性食品和化妆品添加剂的良好原料来源。

参考文献:

[1] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京:化学工业出版社, 2006.50~105.
[2] 宋晓燕,高彦祥,袁芳. 水解胶原蛋白的研究进展[J]. 中国食物与营养,2008(2):32~34.
[3] 唐世华,张宁. 荧光光度法研究明胶等电点[J]. 明胶科学与技术,2000,20(6):69~73.
[4] 陆杨. 浊度/分光光度法和毛细管等电点聚焦法测定明胶等电点及其分布的比较研究[J]. 明胶科学与技术,2006, 26(1):44~47.
[5] Nalinanon S et al, Use of pepsin for collagen extraction from the skin of big eye snapper (Priacanthus tayenus) [J]. Food Chemistry, 2006(12):35.

(上接第 260 页)

3 结论

通过单因素实验和正交实验,确定醇沉法提取低聚糖粗提物的最佳工艺参数为:液料比为 30:1,提取温度为 50℃,乙醇浓度为 95%,提取时间为 2h,低聚糖粗提物得率为 55.0%,得到低聚糖产品的纯度为 66.3%,在室温下,选择截留相对分子量为 5000Da 的膜进行超滤纯化后得到的大豆低聚糖纯度为 72.2%。

参考文献:

[1] Cegla.Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof [P].US Patent:6913771,2005.
[2] 蒋丽华,华欲飞. 超滤技术纯化大豆糖蜜中低聚糖的研

究[J]. 中国油脂,2007,32(6):58.
[3] 刘成梅,梁汉荣,刘伟,万婕. 罗非鱼鱼皮多肽的超滤分离及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2008,29(5):227.
[4] 张晓楠,郭立安. 超滤在蛋白质纯化中的应用[J]. 中国生化药物杂志,1999,20(2):97~98.
[5] 华耀祖. 超滤技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
[6] 毕颖,等. 蒽酮比色法测定大豆乳清废水中总糖含量[J]. 大豆通报,2006,1(3):24.
[7] 王文平,等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):115~117.
[8] 李宏燕,樊君. 大枣多糖的水提醇沉工艺研究[J]. 宁夏工程技术,2005,4(3):265~267.