

超声波酸水解法 提取豆渣中异黄酮条件优化

徐 渐,江连洲,穆 莹

(东北农业大学食品学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:目的:对水酶法提取大豆油后的副产物进行研究,提取其生理活性物质大豆异黄酮。方法:采用超声方法和酸水解方法相结合对水酶法提取大豆油副产物进行异黄酮提取,在此基础上进行响应面优化,确定最佳提取工艺。结果:分析了影响异黄酮提取的各种因素,并予以优化。优化后工艺条件为:料液比为1:12.54,乙醇浓度为70.28%,盐酸浓度为2.6mol/L,水解提取时间为30min,提取温度为30℃。结论:超声波和酸水解的方法适用于水酶法提取油后豆渣中大豆异黄酮的提取,在加入酸水解后大豆异黄酮总提取量较单纯70%乙醇提取法提高42.55%。

关键词:水酶法提取豆渣,大豆异黄酮,超声,酸水解

Optimization of soybean isoflavone extraction from okara by ultrasonic and acid hydrolysis

XU Jian,JIANG Lian-zhou,MU Ying

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

Abstract: Objective: In this research, the by-products obtained after extracting oil by enzymatic hydrolysis was studied, aiming at recycling the resources and producing isoflavones. Results: The optimal technological conditions of extracting isoflavone from oil by-products using enzymatic hydrolysis were determined: material fluid ratio was 1:12.54, alcohol concentration was 70.28%, hydrochloric acid concentration was 2.6mol/L, hydration time was 30min, hydration temperature was 30℃. Conclusions: The method of ultrasonic and acid hydrolysis was applied for soybean isoflavone extraction from okara of enzymatic hydrolysis. The content of soybean isoflavone with acid hydrolysis was 42.55% higher than that with 70% ethanol extraction.

Key words: okara of enzymatic hydrolysis; soybean isoflavone; ultrasonic; acid hydrolysis

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)13-0253-04

大豆是豆科植物中营养最为丰富且容易消化吸收的食物,但由于提取油脂后的豆渣中蛋白变性严重,现阶段生产工艺水平难以开发为可食用蛋白,而造成巨大的资源浪费。水酶法提取大豆中油脂是大豆加工的一种新方法。水酶法提油比一般传统方法温和,且油料中蛋白的性能几乎不发生变化,可以在水相中直接加工利用,或是回收分离蛋白再利用,其效果都十分理想。现阶段还未对从水酶法提油后产生的豆渣中提取生物活性物质的方法进行研究。大豆异黄酮是大豆豆渣中的重要生物活性物质^[1],其与人

类的健康息息相关,具有多种已知生理功能,如抗肿瘤作用、对脑血管的保护作用、抗氧化作用等^[2-5],并且价格较昂贵,对其进行研究具有很高的经济价值^[6]。大豆异黄酮是大豆在生长过程中产生的一类次生代谢产物,天然存在的大豆异黄酮总共有12种,分为游离型的苷元(Aglycon)和结合型的糖苷(Glycosides)。大豆中的大豆异黄酮97%以上以糖苷的形式存在,苷元只占总量的2%~3%^[7-10]。近年来异黄酮作为一类有重要药理活性的物质,其提取及纯化方法受到人们广泛关注,较为常见的提取和纯化方法有溶剂萃取、超声萃取、CO₂超临界法、有机溶剂沉淀、层析法、超滤膜法等^[11]。本文采用酸水解与超声结合的方法对水酶法提油后产生的豆渣进行处理,获得最佳的提取条件,达到食品加工的目的。

收稿日期:2011-06-30

作者简介:徐渐(1980-),女,硕士,研究方向:大豆加工,功能性食品。

食品与生物,2008(5):6-7.

[10] 林秀椿,高刚峰,陈美高,等.油茶饼粕蛋白提取及抗氧化酶解产物的制备[J].食品工业科技,2011,32(1):219-221.

[11] 王永忠.改进国标法测粗蛋白的探讨[J].江西饲料,2004(4):23-24.

[12] Kalil S J, Maugeri F, Rodriguesm I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization [J]. Process Biochem, 2000(35): 539-550.

[13] 谢定,钟海雁,崔涛,等.响应面法优化水晶梨果醋发酵工艺条件[J].中国食品学报,2009,9(2):95-97.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

磷酸、无水乙醇、盐酸 分析纯;乙腈、甲醇、二甲基亚砜 色谱纯;水酶法提油后大豆残渣,超纯水。

Agilent1100高效液相色谱仪 美国安捷伦公司;KQ-100DV型数控超声波仪 昆山市超声仪器有限公司;ALC-210.4万分之一天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆异黄酮的测定方法 参照国标GB/T 23788-2009《保健食品中大豆异黄酮的测定方法》。

1.2.2 标准品的配制 取大豆苷(Daidzin)、大豆黄苷(Glycitin)、染料木苷(Genistin)、大豆素(Daizein)、大豆黄素(Glycitein)和染料木素(Genistein)(纯度均为98%以上)各4mg,分别置于10mL容量瓶,加入二甲基亚砜超声处理后定容制成标准储备液。吸取6种储备液各0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL加入等体积水,用50%二甲基亚砜溶液定容,分别制成8.0、16、24、32、40mg/L标准溶液。

1.2.3 实验条件筛选

1.2.3.1 原料的预处理 水酶法提油后的残渣60℃烘干,粉碎后备用(以下称“豆渣”)。

1.2.3.2 提取条件初选 准确称取5g豆渣,加入乙醇浓度为70%、盐酸浓度为1.67mol/L,料液比1:16,提取温度40℃,分别提取40min,超声功率200w,频率40kHz,使用液相色谱测定提取液中大豆异黄酮含量。研究提取剂浓度、提取时间、提取温度、料液比等因素对豆渣中总异黄酮提取量的影响。

1.2.3.3 Box-Behnken响应面设计 通过单因素实验结果确定3因素3水平的中心组合实验,实验设计如表1所示。

表1 因素水平表

Table 1 Factors and level value of response surface analysis

因素	水平		
	低水平(-1)	中间水平(0)	高水平(+1)
X ₁ 料液比	1:10	1:12	1:14
X ₂ 乙醇浓度(%)	68	70	72
X ₃ 盐酸浓度(mol/L)	2	2.5	3

2 结果与amp;讨论

2.1 影响总异黄酮提取量的单因素分析

2.1.1 乙醇浓度对总异黄酮提取量的影响 由图1

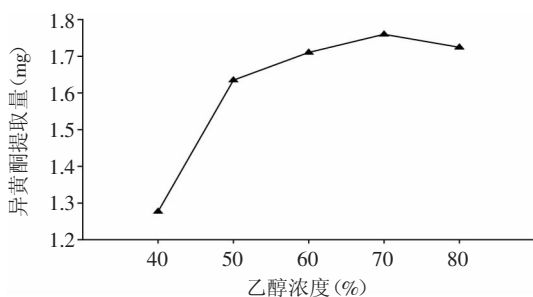


图1 乙醇浓度对总异黄酮提取量的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on extraction yield of isoflavone

可知,在乙醇浓度低于70%时,总异黄酮的提取量随着乙醇浓度的增大而提高,当乙醇浓度大于70%时,其总异黄酮的提取量随乙醇浓度增大而略减小。即当乙醇浓度到一定程度时,增大乙醇浓度,含量趋于稳定,乙醇较佳浓度为70%。图中异黄酮的提取量为5g豆渣中提取的大豆异黄酮总量。

2.1.2 盐酸浓度对总异黄酮提取量的影响 由图2可知,在乙醇中盐酸浓度低于2.5mol/L时,总异黄酮的提取量随着盐酸浓度的增大而提高,当乙醇浓度大于2.5mol/L时,其总异黄酮的提取量随盐酸浓度增大而减小,原因可能是盐酸浓度过高导致异黄酮结构遭到破坏,导致提取量降低。盐酸较佳浓度为2.5mol/L。

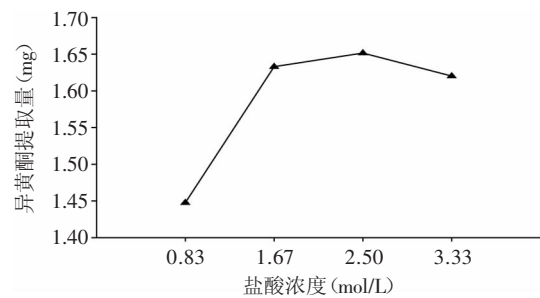


图2 盐酸浓度对总异黄酮提取量的影响

Fig.2 Effect of hydrochloric acid concentration on extraction yield of isoflavone

2.1.3 水解提取时间对总异黄酮提取量的影响 由图3可知,水解提取时间低于40min时,总异黄酮的提取量随着水解提取时间的延长而提高,当水解提取时间长于40min时,其总异黄酮的提取量随水解提取时间延长而迅速减小。水解提取40min比水解提取30min的总异黄酮提取量仅仅提高1%,从成本和效率方面考虑,较佳水解提取时间为30min。

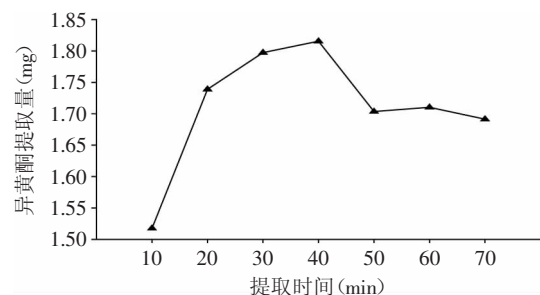


图3 水解提取时间异黄酮提取量的影响

Fig.3 Effect of time on extraction yield of isoflavone

2.1.4 水解提取温度对总异黄酮提取量的影响 由图4可知,水解提取温度低于30℃时,总异黄酮的提取量随着水解提取温度的升高而增大,当水解提取温度高于30℃时,其总异黄酮的提取量随水解提取温度提高而减小,而且提取液的颜色逐渐加深,这是由于黄酮类物质被氧化破坏,而导致总异黄酮提取量不再增加甚至可能下降^[2],因此较佳水解提取温度为30℃。

2.1.5 料液比对总异黄酮提取量的影响 由图5可知,提取料液比低于1:12时,总异黄酮的提取量随着料液比的增大而提高,当提取料液比高于1:12时,其

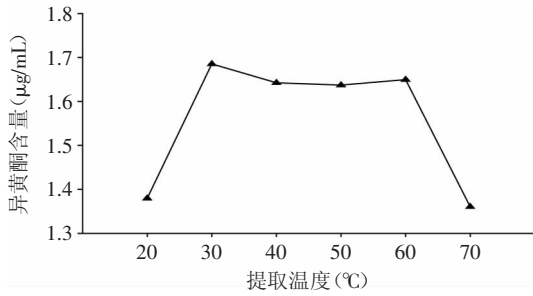


图4 水解提取温度对总异黄酮提取量的影响

Fig.4 Effect of temperature on extraction yield of isoflavone

总异黄酮的提取量随料液比提高而迅速减小,通常认为溶剂用量越大总异黄酮提取量越大,最后达到平衡,由于使用盐酸进行水解,随着料液比增大,盐酸的量相对物料提高,部分异黄酮遭到破坏,导致总异黄酮提取量下降,因此较佳料液比为1:12。

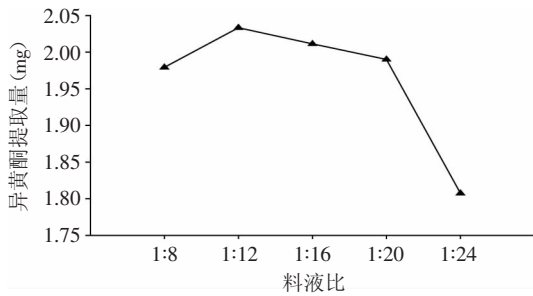


图5 料液比对异黄酮提取量的影响

Fig.5 Effect of ratio of solid to liquid on extraction yield of isoflavone

综上,单因素优化提取参数为:5g豆渣,乙醇浓度70%,盐酸浓度2.5mol/L,提取温度30°C,料液比1:12,提取时间30min,实验得总异黄酮提取量为2.033mg。

2.2 Box-Behnken响应面设计优化提取工艺参数

采用Box-Behnken响应面实验设计确定显著因素的最优水平,研究料液比、乙醇浓度和盐酸浓度对

表2 Box-Behnken响应面实验设计及结果

Table 2 Response surface Box-Behnken design and corresponding response

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y异黄酮含量(mg)
1	1	0	-1	1.743
2	1	-1	0	1.845
3	0	0	0	2.104
4	0	-1	1	1.678
5	0	0	0	2.108
6	-1	-1	0	1.557
7	1	0	1	2.024
8	0	0	0	2.091
9	0	-1	-1	1.666
10	-1	0	-1	1.768
11	0	0	0	2.104
12	1	1	0	1.874
13	-1	1	0	1.765
14	0	1	1	1.890
15	0	1	-1	1.786
16	0	0	0	2.115
17	-1	0	1	1.688

表3 回归模型方差分析表

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.55	9	0.061	131.35	< 0.0001
X ₁	0.063	1	0.063	134.50	< 0.0001
X ₂	0.04	1	0.040	86.87	< 0.0001
X ₃	0.013	1	0.013	29.96	0.0013
X ₁ X ₂	0.008	1	0.008	17.19	0.0043
X ₁ X ₃	0.033	1	0.033	69.94	< 0.0001
X ₂ X ₃	0.002	1	0.002	4.54	0.0602
X ₁ ²	0.091	1	0.091	194.51	< 0.0001
X ₂ ²	0.16	1	0.164	352.37	< 0.0001
X ₃ ²	0.097	1	0.097	208.69	< 0.0001
误差总计	0.00326	7	0.0004		
失拟误差	0.00296	3	0.000985	12.91	0.0159
纯误差	0.0003	4	0		
总计	0.55	16			
			R ₂ =0.9947	R _{2Adj} =0.9878	

总异黄酮提取量的影响,实验设计和结果见表2,系数估计见表3。由Design-Expert 7.1.3软件拟合得到多元回归模型(1)^[13-15]:

$$Y = 2.1 + 0.089X_1 + 0.071X_2 + 0.040X_3 - 0.045X_1X_2 + 0.090X_1X_3 + 0.023X_2X_3 - 0.15X_1^2 - 0.20X_2^2 - 0.15X_3^2 \quad \text{式(1)}$$

结果表明,决定系数R²=0.9854,说明回归方程的拟合较好。模型的F=52.64,该值远远大于0.0001,表明回归方程的F检验显著,所拟合的二次回归方程合适。能解释98.54%响应值的变化,因而该模型拟合程度良好,实验误差小,该模型是合适的,可以用此模型对豆渣中大豆异黄酮的提取进行分析和预测。

由表3方差分析(ANOVA)可以得出, F_{回归}=131.35> F_{0.01(9,4)}=14.66, p_{回归}<0.0001表明模型高度显著,不同处理间的差异极显著(p≤0.01);模型的调整确定系数R²_{Adj}=0.9878,说明该模型能解释98.78%响应值的变化,失拟误差(p=0.0159)不显著,因而该模型拟合程度良好,实验误差小,可以用此模型对实际的提取情况进行分析和预测。从表3回归模型系数显著性检验可知:模型的一次项和二次项极显著(p<0.0001),交互项除X₂X₃项不显著(p=0.0705)外均极其显著(p<0.0001)。因素X₁、X₂和X₃均达到极显著水平,表明料液比、乙醇浓度和盐酸浓度对总异黄酮提取均有极显著影响;影响总异黄酮提取量的3种因子F值的大小为X₁>X₂>X₃,影响总异黄酮提取量的3因素的影响顺序依次为:料液比>乙醇浓度>盐酸浓度。二次项X₁²、X₂²和X₃²也对总异黄酮的提取率有极显著的影响,同时交互项中的X₁X₂、X₁X₃对豆渣中总异黄酮的提取率也有极显著的影响,由此表明,不同条件下,豆渣中总异黄酮的提取率变化复杂,3个因素之间存在着多种交互作用。综上分析,多元回归模型式(1)可以优化为多元回归模型(2):

$$y = 2.1 + 0.089X_1 + 0.071X_2 + 0.040X_3 - 0.045X_1X_2 + 0.090X_1X_3 - 0.15X_1^2 - 0.20X_2^2 - 0.15X_3^2 \quad \text{式(2)}$$

此时多元回归模型R²=0.9908, p_{回归}<0.0001,表明模型高度显著可知模型的优化对模型求最优值没有影响。

2.3 提取最佳条件优化与验证实验

由图6~7可看出, X_1 、 X_2 、 X_3 存在极值点, 料液比、乙醇浓度和盐酸浓度对多元回归模型(2)的Y进行岭分析, 得到Y的最大估计值为2.125569mg。为检验模型预测的准确性, 在优化条件下进行6组提取实验, 并将最优实验结果与单因素实验得出的较优结果进行比较。实验工艺参数和结果如表4所示。

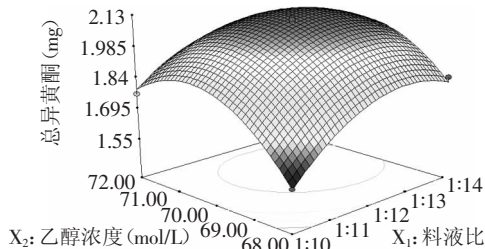


图6 料液比和乙醇浓度对总黄酮提取量的影响

Fig.6 Effect of liquid ratio and ethanol concentration on extraction yield of isoflavone

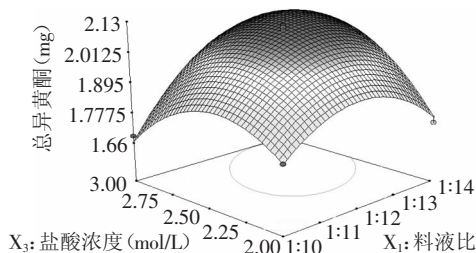


图7 料液比和盐酸浓度对总黄酮提取量的影响

Fig.7 Effect of liquid ratio and hydrochloric acid concentration on extraction yield of isoflavone

表4 回归模型所优化的6组提取参数的验证结果

Table 4 The results of parameter of optimum six groups from regression equation

编号	因素			Y值		相对误差 (%)
	料液比	乙醇浓度 (%)	盐酸浓度 (mol/L)	预测值 (mg)	实验值 (mg)	
1	1:12.54	70.28	2.6	2.129344	2.159	1.37
2	1:12.75	70.15	2.62	2.129174	2.128	0.41
3	1:12.89	70.18	2.62	2.12866	2.103	1.66
4	1:12.82	70.36	2.58	2.128186	2.065	3.06
5	1:12.81	70.51	2.62	2.127906	2.085	2.06
6	1:12.6	70.16	2.56	2.126851	2.091	1.72

从表4可以看出:按照该6组提取参数进行实验, 结果表明当料液比为1:12.54, 乙醇浓度为70.28%, 盐酸浓度为2.6mol/L时的提取参数为最优参数, 总异黄酮提取量为2.159mg, 平均相对误差为1.37%, 该参数提取的总异黄酮的量高于单因素优化组6.17%, 高于单纯使用70%乙醇法(总异黄酮提取量1.5146mg)42.55%, 证明应用响应曲面法(RSM)优化的豆渣中大豆异黄酮提取参数是可行的。

3 结论

通过单因素实验方法, 分别考察了乙醇浓度、盐酸浓度、水解提取时间、提取温度和料液比对水酶法

提油后的豆渣中总异黄酮提取量的影响, 确定了较优的提取条件:5g豆渣, 乙醇浓度70%, 盐酸浓度2.5mol/L, 提取温度30℃, 料液比1:12, 提取时间30min, 总异黄酮提取量为2.033mg。通过Box-Behnken响应面实验设计得出, 各个因素对豆渣中总异黄酮提取率都有重要的影响, 其影响顺序为料液比>乙醇浓度>盐酸浓度, 优化得出超声波水解提取水酶法提油后的豆渣中总异黄酮的最佳工艺条件为:料液比为1:12.54, 乙醇浓度为70.28%, 盐酸浓度为2.6mol/L, 水解提取时间30min, 温度30℃, 超声功率200W, 频率40kHz。采用超声波水解的方法提高了豆渣中总异黄酮的提取效率, 降低了生产成本, 此提取方法简单易行, 溶剂和酸可以循环使用, 可应用于产业化。

参考文献

- [1] 权静, 卢定强, 张筱, 等. 大豆功能性成分研究现状[J]. 大豆通报, 2004(3):27-29.
- [2] 李健. 大豆化学成分和药理作用[J]. 国外医药植物药分册, 2004, 19(16):240-242.
- [3] 刘波静, 陈国良. 大豆异黄酮的提取及其生物学效能的研究[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(2):50-52.
- [4] 许晶, 张永忠, 付茂辉. 大豆异黄酮的研究进展[J]. 山西食品工业, 2005(3):23-25.
- [5] 崔洪斌. 大豆异黄酮活性研究与应用[M]. 北京:科学出版社, 2005:102-105.
- [6] 王志胜, 李里特. 大豆异黄酮及其生理功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2000(1):78-80.
- [7] Kudou S, Fleury Y, Welti D, et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill)[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(9):2227-2233.
- [8] 李文亮, 韩继福, 崔洪斌. 盐酸水解大豆异黄酮工艺研究[J]. 食品科学, 2002(4):73-75.
- [7] 张炳文, 宋永生, 郝征红, 等. 大豆异黄酮酸水解工艺的研究探讨[J]. 中国油脂, 2002(6):44-46, 50.
- [8] 梁敏, 邹东恢. 大豆异黄酮的开发与前景展望[J]. 粮油加工与食品机械, 2005(11):45-47.
- [9] 张博坤, 王文广, 殷广明, 等. 大豆异黄酮提取新工艺的研究[J]. 大豆科技, 2009(4):61-64.
- [10] 井乐刚. 大豆乳清中大豆异黄酮的提取纯化及其生物活性的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2003.
- [11] 郭睿. 一种大豆异黄酮提取工艺研究[J]. 食品科技, 2008, 33(11):140-142.
- [12] 刘锡建. 沙棘果渣总黄酮的提取、精制和抗氧化性能的研究[D]. 北京:北京化工大学, 2004.
- [13] Aghaie E, Pazouki M, Hosseini M R, et al. Response surface methodology (RSM) analysis of organic acid production for Kaolin beneficiation by *Aspergillus niger*[J]. Chemical Engineering Journal, 2009, 147:245-251.
- [14] 罗斌, 孟和毕力格, 冀林立, 等. 响应面法优化 *L. lactis* WH11-1生成GABA的发酵条件[J]. 微生物学杂志, 2009(29):53-58.
- [15] 黄丽金, 陆兆新, 袁勇军, 等. 响应面法优化唾液链球菌嗜热亚种增殖培养基[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(5):27-31.