

鹰嘴豆 α -低聚半乳糖的稳定性和美拉德反应特性

罗存回^{1,2}, 贺晋艳³, 曾晓雄^{3,*}

(1.湖南省药品检验所, 湖南 长沙 410001; 2.湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128;

3.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要:以鹰嘴豆为原料,通过提取与活性炭-硅藻土柱层析分离纯化,制备得到低聚半乳糖含量为85%的 α -低聚半乳糖样品(α -GOS),然后对其热稳定性、酸稳定性及美拉德反应特性进行研究。结果表明:鹰嘴豆 α -GOS对热处理具有较好的稳定性,当加热温度为100℃时,鹰嘴豆 α -GOS的残留率为94.27%,而同样条件下蔗糖的残留率就比较低。在酸处理的情况下,鹰嘴豆 α -GOS的稳定性也较好,当pH值为3.0时,鹰嘴豆 α -GOS的残留率为94.95%。鹰嘴豆 α -GOS比葡萄糖的美拉德反应程度要差,当反应时间为3h时,相同条件下鹰嘴豆 α -GOS的褐变程度相对于葡萄糖的70.65%。

关键词:鹰嘴豆; α -低聚半乳糖; 高效液相色谱法; 稳定性; 美拉德反应

Stability and Maillard Reactivity of Alpha-Galactooligosaccharides from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seeds

LUO Cun-hui^{1,2}, HE Jin-yan³, ZENG Xiao-xiong^{3,*}

(1. Hunan Provincial Institute for Drug Control, Changsha 410001, China;

2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: An alpha-galactooligosaccharides (α -GOS) sample with a purity of 85%, as determined by HPLC, was prepared from chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds by ethanol extraction and activated carbon-celite column chromatographic purification. Its thermal stability, acid stability and Maillard reactivity were investigated. The results showed that the sample had good stability at high temperature. After 30 min of heating at 100 °C, the residual rate of α -GOS was 94.27%, while that of sucrose was lower. Chickpea α -GOS also showed good stability under acidic conditions. At pH 3.0, the residual rate was 94.95%. In addition, the Maillard reaction degree of chickpea α -GOS was lower than that of glucose. Under the same conditions, the browning level of chickpea α -GOS after 3 h of reaction was 70.65% of that of glucose.

Key words: chickpea; α -galactooligosaccharide; high performance liquid chromatography(HPLC); stability; Maillard reaction

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0091-05

低聚糖又称寡糖,是由2~10个单糖通过糖苷键连接形成直链或支链的低度聚合糖,按照其能否被人体胃酸和胃酶所降解,以及对人体有无特殊的生理功能,可分为普通低聚糖和功能性低聚糖。人们常用的乳糖、蔗糖等属于普通低聚糖,它们可被机体胃肠内的消化酶所水解并消化吸收,其主要作用是提供人体活动所需的能

量和赋予食品怡人的甜味^[1]。功能性低聚糖指的是不被人体酶解,在小肠中不被吸收的低聚糖,亦即不消化性的低聚糖,但进入大肠后能促进体内双歧杆菌的增殖,即通常所说的双歧因子^[2]。功能性低聚糖由于具有增殖人体消化道内的有益菌群,调节肠道菌群的平衡,促进肠道的蠕动,润肠通便,促进钙质的吸收等功能

收稿日期: 2011-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171750); 中央高校基本科研业务费专项(KYZ201002)

作者简介: 罗存回(1964—),男,高级工程师,学士,研究方向为食品检测与分析。E-mail: 513776113@qq.com

*通信作者: 曾晓雄(1964—),男,教授,博士,研究方向为食品生物技术。E-mail: zengxx@njau.edu.cn

而备受业界的重视,已被广泛应用于食品、畜牧养殖业等领域^[3-5]。

α -低聚半乳糖(α -GOS)是一类低分子质量的可溶性低聚糖^[6],广泛分布于豆科植物中。过去人们认为 α -GOS是抗营养因子,是引起肠胃胀气的主要原因。但随着对低聚糖研究的深入,人们发现一些低聚糖能有效地促进人体肠道内有益菌的增殖,抑制肠道腐败菌的生长,促进肠道内营养物质和矿物质的吸收,提高机体的免疫力^[7-10]。鹰嘴豆是 α -GOS的重要来源^[11],体外厌氧粪样混合培养实验表明鹰嘴豆 α -GOS对肠道有益菌(双歧杆菌、乳酸菌)有较好的增殖作用,而对有害菌(拟杆菌、梭状菌)的生长有一定抑制作用^[12]。研究结果表明鹰嘴豆 α -GOS具有很好的肠道益生功能,显示了鹰嘴豆 α -GOS有良好的开发应用前景。

热处理是食品加工中最重要的一环之一,目前国内对低聚糖的研究报道多集中在功能性低聚糖的提取制备、低聚糖的功能性评价等方面,而对加工过程特别是热处理过程对功能性低聚糖稳定性的影响缺少研究报道。因此,本研究拟以鹰嘴豆 α -GOS为材料,探讨其热稳定性、酸稳定性以及相对于葡萄糖的美拉德反应程度,旨在为其应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鹰嘴豆由南京农业大学农学院种子检测中心提供,收获自新疆;鹰嘴豆糖醇和毛蕊花糖标样根据向小丽等^[11]报道的方法分别以鹰嘴豆和蚕豆为原料制备得到。

蔗糖、果糖 瑞士Fluka公司;棉子糖 德国Merck公司;麦芽糖、水苏糖、活性炭、硅藻土 美国Sigma公司;无水乙醇、石油醚(均为分析纯) 上海国药集团化学试剂有限公司;乙腈(色谱纯,进口分装) 江苏汉邦科技公司。

1.2 仪器与设备

Büchi中压色谱仪 瑞士Büchi公司;Laborota 4000真空旋转蒸发仪 德国Heidolph公司;FreeZone 4.5 Benchtop冷冻干燥机 英国Labconco公司;Agilent 1100高效液相色谱系统(G1328B手动进样器、G1311A四元泵、G1379A真空脱气机、G1316A柱温箱和G1362A示差检测器(RID)) 美国安捷伦公司;AY-120电子精密天平、BL-220H分析天平 日本Shimadzu公司;Anke TDL-5低速离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 鹰嘴豆 α -GOS的制备

参照文献^[12]报道的方法:称取适量鹰嘴豆于三角

瓶中,按料液比1:10加入体积分数50%的乙醇水溶液,于50℃提取两次,每次40min,离心、收集上清液。上清液浓缩并经0.45 μ m滤膜过滤,滤液上活性炭-硅藻土(质量比为1:1)中压层析柱(3.0cm \times 30cm)。层析柱用一系列线性梯度的乙醇溶液(0~50%)进行洗脱,收集洗脱液(30mL/管),利用苯酚-硫酸法^[13]和HPLC法分析洗脱液的糖含量与组成,合并合适的组分,浓缩与冷冻干燥,制备得到鹰嘴豆 α -GOS样品,经HPLC分析其 α -GOS含量。

1.3.2 低聚糖含量的测定

采用HPLC外标法测定各样品中的低聚糖含量^[11,14]。色谱柱: Sugar-D(250mm \times 4.6mm, 5 μ m);检测器: RID;柱温: 40℃;流动相: 乙腈、水的体积比75:25;流速: 1.0mL/min;进样量: 20L。

糖标准曲线的制备:准确称取果糖、蔗糖、棉子糖、鹰嘴豆糖醇、水苏糖、毛蕊花糖的标准样品,用水溶解后,加入等量的乙腈,配制成一系列不同浓度梯度的标准溶液,经0.45 μ m滤膜过滤后,进行HPLC分析。

1.3.3 α -GOS的热稳定性实验

参照Courtin等^[15]、McIlvaine等^[16]报道的方法进行。准确称取一定量的 α -GOS样品,加入到20mmol/L pH7.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中,于漩涡混合器上混合均匀,配制成质量浓度为10g/100mL的样品溶液,然后置于水浴锅中于不同的温度条件下加热30min,加热结束后迅速冷却,用1mol/L的HCl或NaOH调节溶液的pH值至7.0。对每一个样品取样,将其稀释合适倍数后用HPLC分析,并根据糖标准曲线的回归方程进行含量测定,计算出总的 α -GOS含量,并计算 α -GOS的残留率。实验中设置对照组(温度为20℃),4个样品组加热温度分别为70、80、90℃和100℃,每组重复3次。

$$\alpha\text{-GOS 残留率}/\% = \frac{\text{样品组 } \alpha\text{-GOS 含量}}{\text{对照组 } \alpha\text{-GOS 含量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 酸性条件下 α -GOS的稳定性实验

准确称取一定量的 α -GOS样品,加入到20mmol/L的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中,缓冲液的pH值分别为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0,于漩涡混合器上混合均匀,配制成10g/100mL的样品溶液,然后于室温条件下放置24h。之后用1mol/L的HCl或NaOH调节溶液的pH值至7.0。对每一个样品取样,将其稀释合适倍数后用HPLC分析,并根据糖标准曲线的回归方程进行含量测定,计算出总 α -GOS含量,并根据实验组与对照组的 α -GOS含量计算残留率。实验中设置对照组(pH7.0),样品组

pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0，每组重复 3 次。 α -GOS 残留率计算方法采用式(1)。

1.3.5 美拉德反应实验

准确称取一定量的 α -GOS 样品，加入到含有 1g/100mL 甘氨酸的 20mmol/L pH7.0 的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液中，于漩涡混合器上混合均匀，配制成 10g/100mL 的样品溶液，然后将样品置于 80℃ 水浴锅中加热，并于 0、1、2、3h 分别取样，冷却后于 420nm 波长处测其吸光度。以 10g/100mL 的葡萄糖作对照，并计算出 α -GOS 相对于葡萄糖的褐变程度。

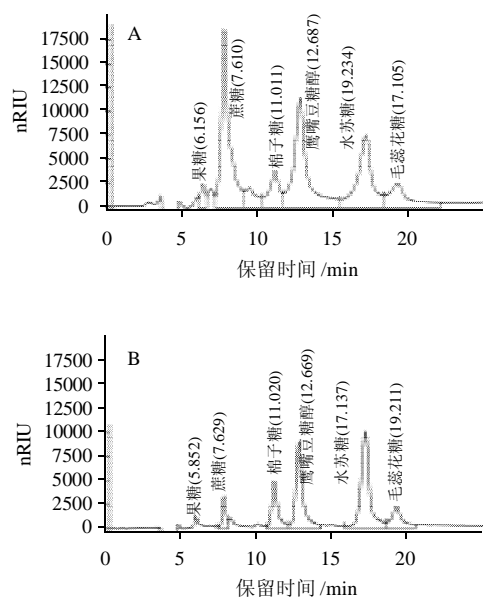
$$\text{相对褐变程度} / \% = \frac{A_1}{A_2} \times 100 \quad (2)$$

式中： A_1 为取样时样品的吸光度； A_2 为反应终点葡萄糖的吸光度。

2 结果与分析

2.1 鹰嘴豆 α -GOS 含量测定及标准曲线的制备

按 1.3.1 节方法制备得到鹰嘴豆 α -GOS 样品，采用 HPLC 法测定纯化前后的样品中 α -GOS 含量(图 1)。以各种糖的质量浓度(x /(mg/mL))为横坐标，峰面积(y)为纵坐标，绘制标准曲线回归方程，所得相关系数(R^2)及检出限见表 1。根据标准曲线回归方程，计算得到鹰嘴豆 α -GOS 含量为 85%。因此，将 α -GOS 含量 85% 的鹰嘴豆 α -GOS 样品作为以下实验的材料。



A. 纯化前鹰嘴豆 α -GOS 样品；B. 纯化后鹰嘴豆 α -GOS 样品。

图 1 鹰嘴豆 α -GOS 的 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatograms of chickpea α -galactooligosaccharides

表 1 糖的标准曲线回归方程、相关系数及其检出限

Table 1 Regression equations, correlation coefficient (R^2) and detection limit of standard sugars

| 组分 | 回归方程 | 相关系数(R^2) | 检出限/(mg/mL) |
|-------|--------------------|---------------|-------------|
| 果糖 | $y=182570x-470.74$ | 0.9992 | 0.26 |
| 蔗糖 | $y=146035x-76387$ | 0.9974 | 0.25 |
| 棉子糖 | $y=169030x-1628.1$ | 0.9993 | 0.02 |
| 鹰嘴豆糖醇 | $y=125847x-8025.8$ | 0.9992 | 0.03 |
| 水苏糖 | $y=138206x+1472.8$ | 0.9953 | 0.06 |
| 毛蕊花糖 | $y=118300x-63964$ | 0.9949 | 0.15 |

2.2 不同温度条件下 α -GOS 的热稳定性

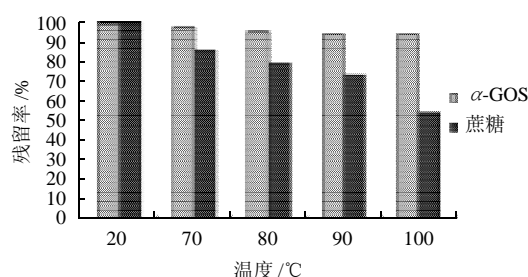


图 2 温度对鹰嘴豆 α -GOS 稳定性的影响

Fig.2 Effect of temperature on the stability of chickpea α -galactooligosaccharides

为了更好的说明其稳定性，实验中选取了蔗糖进行对比。由图 2 可知，在不同的加热温度下，鹰嘴豆 α -GOS 样品加热 30min 后，基本没有被分解，其残留率依然较高。当加热温度为 70℃ 时， α -GOS 样品的残留率为 98.03%；当加热温度为 80℃ 时， α -GOS 样品的含量为 95.69%；当加热温度升至 90℃ 时， α -GOS 样品依然有 94.41% 的保留；当加热温度继续升高至 100℃ 时，此时 α -GOS 样品的残留率依然高达 94.27%。而对于蔗糖来说，当加热温度为 70℃ 时，蔗糖已有 14% 被分解为葡萄糖和果糖；当加热温度为 80℃，蔗糖的残留率为 80%；当加热温度为 90℃ 时，蔗糖的残留率为 73.55%；当加热温度继续升高到 100℃，此时约有一半的蔗糖被分解。因此，从鹰嘴豆中提取并经过纯化的 α -GOS 样品对高温具有较好的热稳定性。

2.3 酸性条件下 α -GOS 的稳定性

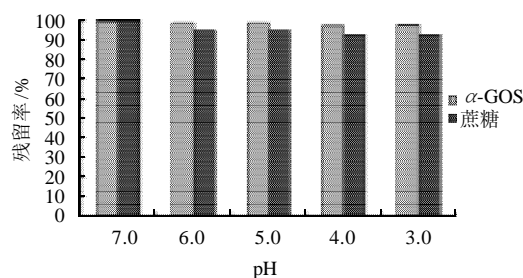


图 3 鹰嘴豆 α -低聚半乳糖在酸性条件下的稳定性

Fig.3 Acid stability of chickpea α -galactooligosaccharides

除了在食品加工过程中的酸性条件, α -GOS 作为益生元的一种, 要发挥对人体选择性的刺激有益菌生长的作用, 必须在被人体摄入后保持稳定, 一方面要保证它不会被胃酸的弱酸性环境所分解, 另一方面还要保持化学结构的稳定性, 这样才能确保它不会使一些不利于人体的菌群大量增殖。为了比较, 同样选择了蔗糖作为对照。由图 3 可知, 当 pH6.0 时, 鹰嘴豆 α -GOS 的残留率为 99.16%, 基本没有被分解; 当环境条件为 pH5.0 时, 鹰嘴豆 α -GOS 的残留率为 95.27%; 当环境的 pH 值为 3.0 时, 鹰嘴豆中 α -GOS 的残留率依然大于 90%(为 94.95%)。这表明鹰嘴豆 α -GOS 对酸具有较好的稳定性。同时可知, 蔗糖的稳定性也较好, 但略低于鹰嘴豆 α -GOS 样品。

2.4 美拉德反应特性

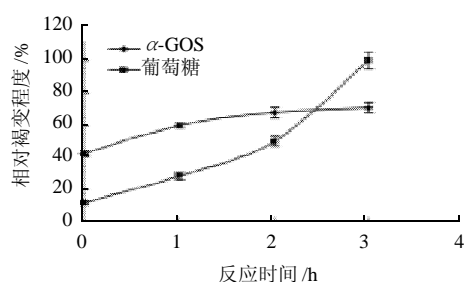


图4 鹰嘴豆 α -GOS 的相对褐变程度

Fig.4 Browning of chickpea α -galactooligosaccharides and glucose

在相同条件下, 鹰嘴豆 α -GOS 相对于葡萄糖的褐变程度如图 4 所示。随着反应时间的延长, 鹰嘴豆 α -GOS 和葡萄糖的褐变程度逐渐加深。在反应开始时, 鹰嘴豆 α -GOS 的美拉德反应程度大于葡萄糖的美拉德反应程度。当反应时间为 1h 时, 鹰嘴豆 α -GOS 的褐变程度相对于葡萄糖反应 3h(褐变程度定为 100%)的 59.78%, 此时葡萄糖的褐变程度相对于其反应 3h 的 28.14%; 当反应时间为 2h 时, 鹰嘴豆 α -GOS 的褐变程度相对于葡萄糖反应 3h 的 67.39%, 此时葡萄糖的相对褐变程度达到了 49.62%; 当反应 3h 后, 鹰嘴豆 α -GOS 样品相对于葡萄糖的褐变程度为 70.65%, 而此时葡萄糖的相对褐变程度为 100%。因此当反应时间为 3h 时, 相对于葡萄糖来说, 在相同条件下鹰嘴豆 α -GOS 样品的褐变程度要稍弱一些。

美拉德反应的程度与加热温度、加热时间、糖和氨基酸的组分以及体系 pH 值等条件有关。当美拉德反应温度提高或加热时间延长时, 表现为色度增加, 碳氮比、不饱和度、化学芳香性也随之增加。吴惠玲等^[17]在对葡萄糖与赖氨酸的美拉德反应研究中发现, 不同温度加热

相同时间的吸光度不同, 当加热温度低于 80℃ 时颜色反应不明显, 高于 100℃ 时反应速度明显加快。总体来说, 吸光度随温度的升高而增加, 随加热时间的延长而增加。在本研究中, 从鹰嘴豆 α -GOS 与氨基酸的美拉德反应可以得出, 在相同的加热温度下, 随着反应时间的延长吸光度增加, 褐变程度变深。同时, 吴惠玲等^[17]研究了不同的 pH 值条件对葡萄糖与赖氨酸的美拉德反应的影响发现, 在 pH 值为 5.0~7.0 时, 其吸光度趋于零, 所以在 pH5.0~7.0 的酸性范围内美拉德反应的色值趋于零; 当 pH > 7.0 时, 吸光度明显增加, 在 pH8.0 和 pH10.0 时出现两个突变点, 而 pH9.0~10.0 相对变化较小, pH11.0~12.0 趋于稳定。说明环境的 pH 值对美拉德反应的影响较大, 由于羰胺缩合反应是一个可逆的过程, 可能在酸性条件下, 羰胺缩合产物很容易水解, 羰胺缩合过程中封闭了游离的氨基, 反应体系的 pH 值就下降, 所以酸性条件不利于反应的继续进行。因此, 在酸性条件下美拉德反应不显著, 而碱性条件有利于美拉德反应的进行。

本研究中, 鹰嘴豆 α -GOS 与甘氨酸的美拉德反应是在中性环境下发生的, 对于不同的美拉德反应来说, 获得最高色度值的环境 pH 值可能不一样, 因此可以通过调节体系的 pH 值来控制美拉德反应的程度。在实际的应用中, 可以根据所期望的产品的色泽来选择美拉德反应的程度。此外, 糖的种类以及氨基酸的种类也会影响美拉德反应的程度, 一般来说, 在单糖中, 五碳糖(如核糖)比六碳糖(如葡萄糖)更容易发生美拉德反应; 而单糖比双糖(如乳糖)较容易反应^[18]。鹰嘴豆 α -GOS 主要成分为鹰嘴豆糖醇、水苏糖、棉子糖以及少量的蔗糖和毛蕊花糖, 单糖的含量非常少, 因此与葡萄糖相比, α -GOS 样品的褐变程度稍低, 反应时间为 3h 后, 鹰嘴豆 α -GOS 的褐变程度相对于葡萄糖的 70.65%, 可能是由于碳链的增长使得碳架的空间位阻效应增大, 因此活性较低。在所有的氨基酸中, 赖氨酸参与美拉德反应, 可获得更深的色泽。而半胱氨酸反应, 获得最浅的色泽。此外, 美拉德反应时的水分活度、参与美拉德反应的糖类与氨基酸化合物的比例变化也会影响色泽的变化。尽管褐变会使食品的营养价值部分降低, 但是美拉德反应仍能为加工食品提供良好的色泽和风味, 这在食品生产上具有特殊的意义。

3 结 论

鹰嘴豆 α -GOS 对热处理具有较好的稳定性, 当加热温度为 100℃ 时, α -GOS 样品的残留率为 94.27%, 而同样条件下蔗糖的残留率就比较低。在酸处理的情况下, 鹰嘴豆 α -GOS 的稳定性也较好, 当环境的 pH 值为 3.0 时, α -GOS 样品的残留率为 94.95%。在对其美

拉德反应的研究中发现,在相同条件下鹰嘴豆 α -GOS比葡萄糖的美拉德反应程度要差一些,当反应时间为3h,其相对于葡萄糖褐变程度的70.65%。因此,鹰嘴豆 α -GOS具有较好的热稳定性、酸稳定性和美拉德反应特性。

参考文献:

- [1] 尤新. 功能性低聚糖发展动向及前景[J]. 中国食品添加剂, 2008(3): 45-49.
- [2] 黄德娟, 谈华平. 功能性低聚糖[J]. 生物学通报, 2005, 40(12): 19-21.
- [3] WANG Yanbo. Prebiotics: present and future in food science and technology[J]. Food Research International, 2009, 42(1): 8-12.
- [4] 李文芹, 张志国, 王立军. 低聚糖的生理功能及在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2008(2): 69-72.
- [5] YUAN Xiaoping, WANG Jing, YAO Huiyuan. Feruloyl oligosaccharides stimulate the growth of *Bifidobacterium bifidum*[J]. Anaerobe, 2005, 11(4): 225-229.
- [6] MARTÍNEZ-VILLALUENGA C, FRIAS J, VIDAL-VALVERDE C. α -Galactosides: antinutritional factors or functional ingredients?[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, 48(4): 301-316.
- [7] 刘祥, 余倩, 裴晓芳, 等. 大豆低聚糖对肠道菌群结构调节的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2003, 15(1): 10-12.
- [8] BANG M H, CHIO O S, KIM W K. Soyoligosaccharide increases fecal bifidobacteria counts, short-chain fatty acids, and fecal lipid concentrations in young Korean women[J]. Journal of Medicinal Food, 2007, 10(2): 366-370.
- [9] 于治中, 丁长河, 李里特. 大豆低聚糖的生产、生理功能及其应用[J]. 中国食品添加剂, 2007(1): 159-163.
- [10] 杨秀芳, 陈梅, 马养民. 大豆低聚糖功能及其应用[J]. 粮食与油脂, 2010(5): 8-11.
- [11] 向小丽, 杨立怡, 华双, 等. 不同品种鹰嘴豆中 α -低聚半乳糖与蔗糖的含量分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(9): 2762-2768.
- [12] 贺晋艳, 张芸, 李伟, 等. 鹰嘴豆 α -低聚半乳糖的肠道益生功能研究[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 94-98.
- [13] ZENG Xiaoxiong, YOSHINO R, MURATA T, et al. Regioselective synthesis of *p*-nitrophenyl glycosides of β -D-galactopyranosyl-disaccharides by transglycosylation with β -D-galactosidase[J]. Carbohydrate Research, 2000, 325(2): 120-131.
- [14] 向小丽, 杨立怡, 孙怡, 等. 高效液相色谱法分析大豆和大豆低聚糖浆中糖的组成与含量[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 412-415.
- [15] COURTIN C M, SWENNEN K, VERIJANS P. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxyloligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides[J]. Food Chemistry, 2009, 112(4): 831-837.
- [16] McILVAINE T C. A buffer solution for colorimetric comparison[J]. Journal of Biological Chemistry, 1921, 49: 183-186.
- [17] 吴惠玲, 王志强, 韩春, 等. 影响美拉德反应的几种因素研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 440-444.
- [18] FRIEDMAN M. Food browning and its prevention: an overview[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(3): 631-648.