

文章编号: 1001-7453(1999)03-0047-05

酶法回收胆固醇 β -环糊精包合物中的胆固醇

陈翠华, 王 勤, 王 璋, 许时婴

(无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 霉菌淀粉酶能有效地水解制备低胆固醇蛋制品时所生成的副产物胆固醇 β -环糊精包合物中的 α -1,4糖苷键。霉菌淀粉酶水解胆固醇 β -环糊精包合物的最佳条件为底物质量浓度15 g/dL, 水解时间3 h, 水解温度56 $^{\circ}$ C, pH 5.2。采用酶法技术从2 kg干基胆固醇 β -环糊精包合物中回收制得胆固醇质量分数为89.5%的制品, 胆固醇回收率达72%。

关键词: 胆固醇; 胆固醇 β -环糊精包合物; 淀粉酶水解

中图分类号: TS201

文献标识码: A

胆固醇 (Cholesterol) 是最常见的甾族化合物, 它是高等动物体内的主要甾醇, 在所有的动物体内组织中存在。在人体内, 胆固醇具有一系列重要的生理功能, 如调节消化道中膳食脂肪的吸收, 参与胆汁酸、类固醇激素和维生素 D 的生物合成^[1,2]。体内多数的胆固醇在肝脏中合成, 但也有一部分从膳食中获取。商业制备的胆固醇可作为药用辅料, 如制备性激素雄甾酮等。

蛋黄是富含胆固醇的天然食品原料, 蛋黄中的胆固醇质量分数在1.0%~1.2%之间, 如以干基计算, 则可达到2.0%~2.4%。鸡蛋是公认的易被人体消化吸收且营养丰富的食品, 但由于其存在的胆固醇可能危害人体健康, 因此制备低胆固醇蛋制品成为食品科学界普遍关注的课题。当用 β -环糊精包合法包含蛋黄中的胆固醇, 制成低胆固醇蛋制品时, 生成了副产物胆固醇 β -环糊精包合物, 该包合物富含胆固醇, 是制备胆固醇制品的良好来源。如果不加以利用, 一则对环境造成一定程度的污染, 二则从经济角度考虑是一种浪费。胆固醇 β -环糊精包合物因其特殊的结构, 一般的萃取脂肪的方法很难萃取其中的胆固醇。要想提取胆固醇 β -环糊精包合物中包含着的胆固醇, 首先必须破坏胆固醇 β -环糊精包合物的空腔状结构, 将胆固醇从包合物中释放出来。酸虽能使胆固醇 β -环糊精包合物彻底水解, 但因水解反应比较剧烈, 影响了胆固醇的回收率, 为此采用水解条件较为温和的酶法技术回收该包合物中的胆固醇。

收稿日期: 1999-01-13; 修订日期: 1999-03-21

作者简介: 陈翠华 (1968年7月生), 女, 浙江温岭人, 硕士研究生, 工程师。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

胆固醇 β -环糊精包合物 无锡轻工大学食品科学实验室制;
胆固醇(分析纯) 上海长城生化制药厂提供.

1.2 实验方法

1.2.1 低胆固醇蛋制品的制备工艺流程 该流程中的固体残渣即胆固醇 β -环糊精包合物,是制备胆固醇制品的实验材料.见图 1.

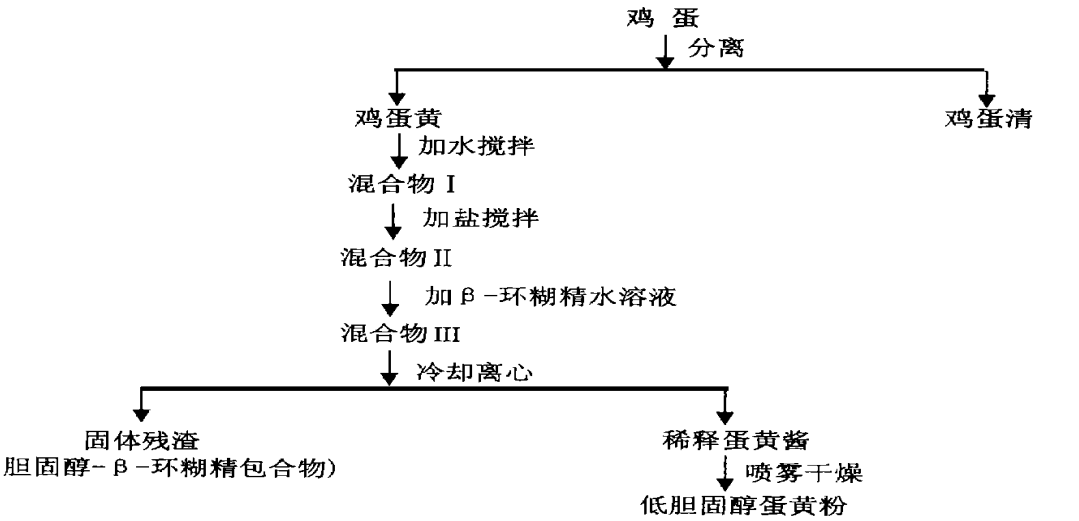


图 1 低胆固醇蛋制品的制备

1.2.2 酶法水解 胆固醇 β -环糊精包合物实验方法 称取一定量的胆固醇 β -环糊精包合物样品,加水调节包合物(酶反应底物)的浓度,调节酸碱度,添加缓冲液,在一定温度条件下加酶水解数小时.反应结束后称量反应液的质量,用 3,5- 二硝基水杨酸比色定糖法测定还原糖量,确定每克干基胆固醇 β -环糊精包合物经酶水解后所产生的还原糖量.

1.2.3 酶法水解胆固醇 β -环糊精包合物正交实验设计 本正交实验采用 $L_9(3^4)$ 正交表,正交反应的因素水平如表 所示.实验考察指标为胆固醇 β -环糊精包合物中的 α -1,4糖苷键打断率.

表 1 酶法水解包合物中 α -1,4糖苷键因素水平表

水平	因 素			
	A底物质量浓度 / (g / dL)	B温度 / $^{\circ}$ C	C反应时间 / h	D pH
1	15	50	3.0	4.8
2	20	53	3.5	5.0
3	25	56	4.0	5.2

胆固醇 β -环糊精包合物的 α -1,4糖苷键的打断率等于酶法水解每克干基胆固醇 β -环糊精包合物所产生的还原糖量(以葡萄糖计)除以酸法完全水解每克干基胆固醇 β -环糊精包合物所产生的还原糖量(以葡萄糖计).

酸法完全水解胆固醇 β -环糊精包合物所产生的还原糖量(以葡萄糖计)即 1 g干基胆固醇 β -环糊精包合物在 1 mol / L的 HCl溶液中煮沸 2 h后所产生的还原糖量.

1.2.4 酶法回收 胆固醇 β -环糊精包合物中胆固醇的工艺流程 见图 2

1.2.5 还原糖的测定方法 采用 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法^[3].

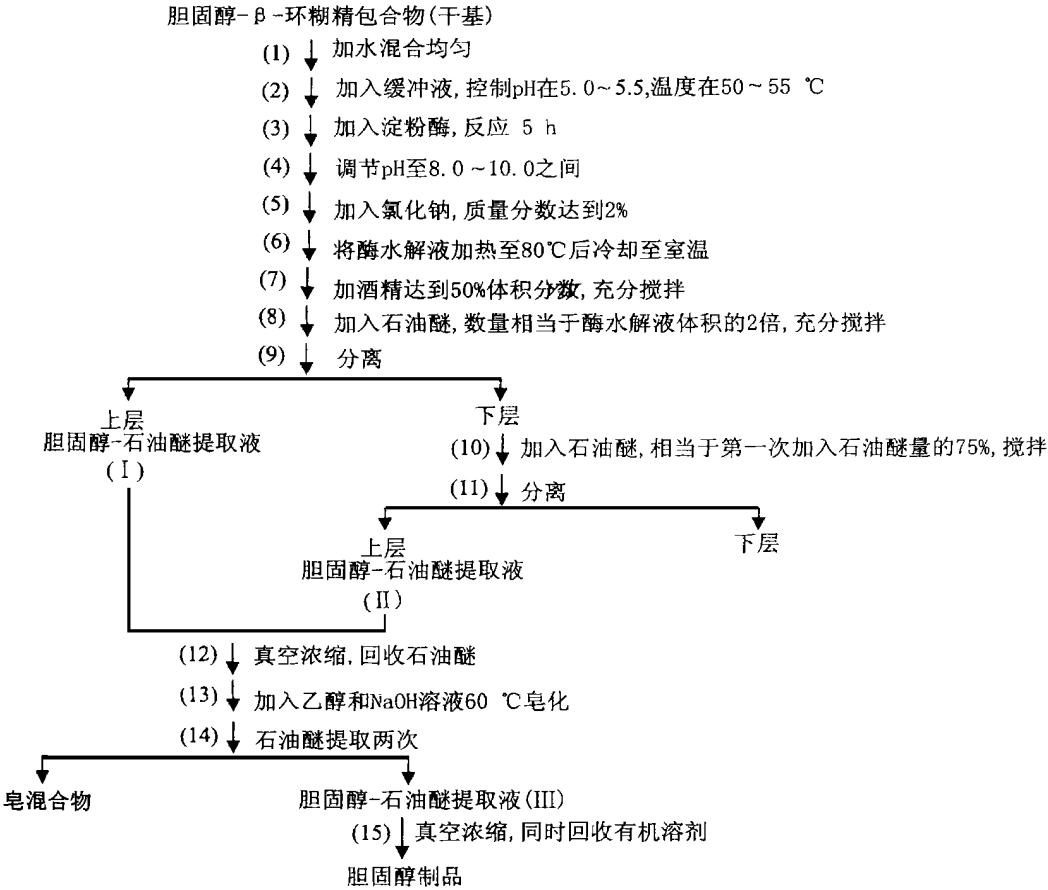


图2 酶法回收包合物中胆固醇的工艺流程

1.2.6 胆固醇的测定方法 比色法测定胆固醇含量^[4].

1) 试剂配制

KOH溶液 (33%): 10 g KOH溶于 20 mL水中.

胆固醇标准溶液 (0.4 mg/mL): 100 mg 胆固醇溶解于无水乙醇中, 定容至 250 mL.

改良 Liebermann-Burchard 试剂: 20体积乙酸酐冷却至 10℃以下, 在具塞玻璃容器中加入 1体积浓 H₂SO₄, 摇匀后冷却 9 min, 加入 10体积冰乙酸, 混合后平衡至室温, 试剂应在 1 h内应用.

2) 测定方法

取适量的样品于加塞试管中, 加入 5 mL 无水乙醇, 加适量的质量分数为 33% 的 KOH 溶液, 摇匀, 于 50℃ 水浴中保温 1 h, 冷却至室温, 先加 10 mL 石油醚摇匀, 再加 5 mL 水摇匀, 剧烈振荡 1 min, 静置至两液面明显分层, 石油醚层的合适等份移入 10 mL 具塞试管中, 在 60℃ 水浴中用氮气吹干, 冷至室温, 用干燥塞塞好, 准备显色反应. 与制作样品同样的方法制作空白.

根据各标样的测定结果, 计算出相当于 1 mg 胆固醇的吸光值 D' , 用来计算样品的胆固醇含量 w (每百克样品中的胆固醇毫克数).

w = \frac{D}{D} \times \frac{10}{V} \times \frac{100}{m}

D——样品吸光值
V——石油醚相体积 /mL
m——样品质量 /g

3) 胆固醇的回收率

样品胆固醇回收率 = \frac{胆固醇制品量 \times 制品胆固醇含量}{胆固醇 \beta 环糊精包合物中胆固醇总量}

2 结果与讨论

根据厂家提供的霉菌淀粉酶的性质及初步的实验 ,采用四因素三水平的正交实验方案进行实验 .

2.1 酶法水解胆固醇 β 环糊精包合物正交实验分析

实验结果如表 2所示 .

表 2 酶法水解胆固醇 β 环糊精包合物正交实验结果分析表

水平	因 素				α-1, 4糖苷键打断率 /%
	A 底物质量浓度 /(g/dL)	B 温度 /℃	C 反应时间 /h	D pH	
1	1(15)	1(50)	1(3. 0)	1(4. 8)	62. 2
2	1	2(53)	2(3. 5)	2(5. 0)	73. 6
3	1	3(56)	3(4. 0)	3(5. 2)	80. 0
4	2(20)	1	2	3	48. 4
5	2	2	3	1	42. 9
6	2	3	1	2	59. 8
7	3(25)	1	3	2	38. 5
8	3	2	1	3	49. 1
9	3	3	2	1	34. 1
k ₁	71. 9	49. 7	57. 0	46. 4	
k ₂	50. 4	55. 2	52. 0	57. 3	
k ₃	40. 6	58. 0	53. 8	59. 2	
极差 R	31. 3	8. 3	5. 0	12. 8	
优水平	A ₁	B ₃	C ₁	D ₃	

比较表 2的 4个因子的极差 R ,按极差的大小决定因素的主次顺序为:

主—————次
A D B C

根据实验结果 ,选择 A₁、D₃、B₃和 C₁ . 综上分析 ,霉菌淀粉酶作用于胆固醇 β 环糊精包合物的优化条件为 :底物质量浓度为 15 g/dL ,pH为 5. 2,反应温度为 56℃ ,反应时间 3 h.

2.2 胆固醇制品的制备

从胆固醇 β 环糊精包合物中萃取胆固醇目前尚未见报道 ,文献报道从牛脊髓或羊毛脂中萃取胆固醇也只简单地提及原料先皂化 ,再加石油醚萃取 .根据胆固醇 β 环糊精包合物物料特殊的性质 ,先将包合物经酶水解 ,得到胆固醇 β 环糊精包合物酶水解液 ,此时胆固醇已从包合物中释放出来 .再提取酶水解液中的油溶性物质 ,然后加碱皂化油溶性物质 ,加石油醚萃取胆固醇 .经一系列工艺流程制得胆固醇制品 ,试验结果见表 3.

表 3 酶法回收包合物中胆固醇试验结果

试验编号	2 kg(干基)包合物 中胆固醇的量 /g	胆固醇制品 的量 /g	胆固醇制品 的纯度 %	胆固醇制品中 胆固醇的量 /g	胆固醇回收率 %
1	94.90	75.94	89.51	67.97	71.62
2	107.03	87.01	90.08	78.38	73.23

从试验数据看,尽管两次扩大试验采用的是不同批次的胆固醇β环糊精包合物,可两次试验制品的胆固醇纯度和胆固醇回收率的试验数据非常接近,说明此工艺流程原料中的胆固醇含量对此影响较小,同时也说明此制备胆固醇的工艺是合理的。

经本工艺制得的胆固醇制品,因含一定的色素杂质,制品外观呈蛋黄色。这些呈色物质主要包括类胡萝卜素、蛋黄素(Lutein)和玉米黄素(Zeaxanthin),均为四萜类化合物。

3 结 论

通过试验,霉菌淀粉酶能有效地作用于胆固醇β环糊精包合物,将包合物环状结构打开,使胆固醇释放出来。霉菌淀粉酶水解胆固醇β环糊精包合物的最佳条件为:胆固醇β环糊精包合物质量浓度 15 g/dL,水解温度 56℃,pH 5.2,水解时间 3 h。利用酶法技术得到的胆固醇,纯度为 90%,回收率达 72%。

参考文献:

[1] SCHLIMME E. Removal of cholesterol from milk fat[J]. European Dairy Magazine, 1990, 4: 12~13
[2] 刘应泉. 油脂与健康[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989.
[3] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1981.
[4] LIESEL A, BETTY B, BERNARD B, et al. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity[J]. Biol Chem, 1952, 195: 357~366
[5] 郑清和. 食品原料[M]. 台南: 傅文书局, 1988.

Recovery of Cholesterol from the Inclusion Compound of Cholesterol andβ-cyclodextrin by Enzymatic Method

CHEN Cui-hua, WANG Qing, WANG Zhang, XU Shi-ying

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract The α-1, 4 glycoside linkage of the inclusion compound of cholesterol andβ-cyclodextrin could be hydrolyzed by mould amylase and the best conditions for mould amylase to hydrolyze the inclusion compound of cholesterol andβ-cyclodextrin were studied and the results were the substrate concentration 15%, pH5.2, temperature 56℃ and hydrolyzing time 3 hours. By enzymatic method 2 000 g inclusion compound of cholesterol andβ-cyclodextrin on dry base was used in the test. The rate of cholesterol recovery was 72% for the crude cholesterol product with 89.5% cholesterol content.

Key words cholesterol; amylase hydrolysis; inclusion compound of cholesterol andβ-cyclodextrin