

果糖与羟脯氨酸美拉德反应条件的优化

程传玲, 杨艳勤, 宋 辉, 王建民

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为确定果糖与羟脯氨酸进行美拉德反应的最佳条件, 以美拉德反应产物在 420 nm 下的吸光值为评价指标, 通过单因素试验和正交试验, 研究了反应温度、反应时间、初始 pH 值、外加水分、糖氨比对果糖与羟脯氨酸美拉德反应产物质量的影响。结果表明, 最佳反应条件为: 反应温度 160 °C、反应时间 3 h、初始 pH 值 8、糖氨摩尔比 1 : 3、外加水分 0, 该条件下美拉德反应产物的吸光值为 0.835。对美拉德反应产物进行 GC-MS 分析, 鉴定出 15 种挥发性香气成分, 其主要为吡嗪、吡咯、呋喃等杂环化合物, 表明果糖与羟脯氨酸的美拉德反应产物具烟草增香作用。

关键词: 果糖; 羟脯氨酸; 美拉德反应; 气相色谱-质谱分析

中图分类号: TS201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)04-0147-05

Optimization of Maillard Reaction Conditions of Fructose and Hydroxyproline

CHENG Chuan-ling, YANG Yan-qin, SONG Hui, WANG Jian-min

(School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Using absorbance value of Maillard reaction products in 420 nm as the evaluation index, through the single factor experiment and orthogonal test, the effects were studied of reaction temperature, reaction time, initial pH value, additional water and sugar ammonia ratio on the product quality of fructose and hydroxyproline Maillard reaction. The results showed that the optimal reaction condition was; reaction temperature of 160 °C, reaction time of 3 h, initial pH value of 8, sugar ammonia molar ratio of 1 : 3, without moisture. Under the best condition the absorption value of Maillard reaction products was 0.835. GC-MS analysis of Maillard reaction products identified 15 kinds of volatile aroma components, and the main components were pyrazine, pyrrole, furan and other heterocyclic compounds. The results showed that the Maillard reaction products of fructose and hydroxyproline could improve the flavor of tobacco.

Key words: fructose; hydroxyproline; Maillard reaction; GC-MS

美拉德反应(Maillard reaction)又称非酶棕色化反应, 指还原糖和氨基酸经过缩合、脱水、降解、聚合等一系列复杂的反应而生成类黑素的过程。1912年, 法国化学家美拉德发现, 把葡萄糖和甘氨酸在水中加热一段时间, 形成褐色的类黑精。1953年 Hodge^[1]把这个反应正式命名为美拉德反应。

随着人们生活水平的提高, 卷烟的安全性及吸食舒适感也越来越受到重视。除品种、气候条件、栽培技术^[2-4]外, 调制方法和质体色素的降解对烟叶质

量也有重要影响^[5-6]。美拉德反应是烟草特征香味形成的重要反应, 其产物中含有许多香味成分, 且大部分与烟香协调, 因此, 美拉德反应产物在卷烟增香方面的应用研究备受青睐^[7-13]。脯氨酸和羟脯氨酸是烤烟和香料烟中含量最多的 2 种氨基酸^[14], 而羟脯氨酸比脯氨酸多 1 个羟基, 两者结构非常类似。以往关于美拉德反应的研究多采用脯氨酸^[15-18], 而采用羟脯氨酸进行美拉德反应却鲜有报道。鉴于此, 本试验以果糖和羟脯氨酸为原料, 通过单因素试验和正交试

收稿日期: 2013-10-17

基金项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A550018)

作者简介: 程传玲(1977-), 女, 河南唐河人, 副教授, 博士, 主要从事烟草化学和烟气分析研究。

E-mail: chuanlingcheng@163.com

验对美拉德反应条件进行优化,并采用 GC-MS 对产物进行分离鉴定,以期开发出新型的烟用香料。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:D-果糖、L-羟脯氨酸(生化试剂,北京中生瑞泰科技有限公司);1,2-丙二醇、丙三醇、无水硫酸钠、乙醚(分析纯,天津市德恩化学试剂有限公司)。

主要仪器:98-3 型数显磁力搅拌器(郑州凯鹏实验仪器有限公司)、PL-203 型电子天平(奥豪斯国际贸易上海公司)、6890-5973 型 GC-MS 仪(安捷伦公司)。

1.2 方法

1.2.1 影响美拉德反应的单因素试验

1.2.1.1 反应温度 精确称取果糖 18.0 mg 和羟脯氨酸 13.1 mg(二者摩尔比为 1:1),置于 50 mL 的圆底三口烧瓶中(该烧瓶装有温度计、回流冷凝管和磁子),加入 20 mL 的丙二醇,用 10% 的 NaOH 溶液调节 pH 值为 8,加热搅拌,于 30 min 内加热至设定的温度(80、100、120、140、160 °C)后,回流反应 2 h。

1.2.1.2 反应时间 精确称取果糖 18.0 mg 和羟脯氨酸 13.1 mg(二者摩尔比为 1:1),置于 50 mL 的圆底三口烧瓶中(该烧瓶装有温度计、回流冷凝管和磁子),加入 20 mL 的丙二醇,用 10% 的 NaOH 溶液调节 pH 值为 8,加热搅拌,于 30 min 内加热至 140 °C,回流反应至设定的时间(1、2、3、4、5 h)。

1.2.1.3 初始 pH 值 精确称取果糖 18.0 mg 和羟脯氨酸 13.1 mg(二者摩尔比为 1:1),置于 50 mL 的圆底三口烧瓶中(该烧瓶装有温度计、回流冷凝管和磁子),加入 20 mL 的丙二醇,用 10% 的 NaOH 溶液或者 6 mol/L HCl 调节至设定的 pH 值(6、7、8、9、10),加热搅拌,于 30 min 内加热至 140 °C,回流反应 3 h。

1.2.1.4 外加水分 精确称取果糖 18.0 mg 和羟脯氨酸 13.1 mg(二者摩尔比为 1:1),置于 50 mL 的圆底三口烧瓶中(该烧瓶装有温度计、回流冷凝管和磁子),加入 20 mL 丙二醇与外加水(外加水的体积分数分别为 0、2%、4%、6%、8%)的混合溶剂,用 10% 的 NaOH 溶液调节 pH 值为 10,加热搅拌,于 30 min 内加热至 140 °C,回流反应 3 h。

1.2.1.5 糖氨配比 分别精确称取果糖 27.0 mg 和羟脯氨酸 6.6 mg(二者摩尔比为 3:1)、果糖 18.0 mg 和羟脯氨酸 6.6 mg(摩尔比为 2:1)、果糖 13.5 mg 和羟脯氨酸 9.8 mg(摩尔比为 1:1)、果糖

9.0 mg 和羟脯氨酸 13.1 mg(摩尔比为 1:2)、果糖 7.2 mg 和羟脯氨酸 15.7 mg(摩尔比为 1:3),置于 50 mL 的圆底三口烧瓶中(该烧瓶装有温度计、回流冷凝管和磁子),加入 18.8 mL 的丙二醇和 1.2 mL 的蒸馏水,用 10% 的 NaOH 溶液调节 pH 值为 10,加热搅拌,于 30 min 内加热至 140 °C,回流反应 3 h。

以上各反应进行之后,各取 1 mL 美拉德反应产物溶于 10 mL 的蒸馏水中,以蒸馏水为参比,在 T6 新世纪紫外分光光度计上于 420 nm 波长下测定其紫外吸收值。吸光度的大小反映了美拉德反应进行的程度及速度,也即确定了美拉德反应产物质量的好坏。在一定范围内,吸光度(颜色强度)越大说明反应程度越深,反应速度越快,美拉德反应产物的质量越好^[19]。

1.2.2 影响美拉德反应的正交试验 在单因素试验的基础上,以反应温度、反应时间、初始 pH 值、外加水分、糖氨配比为考察因素,以 420 nm 处的紫外吸收值(A_{420})为考察指标,采用 $L_{25}(5^6)$ 标准正交表进行正交试验,试验因素水平设置见表 1。采用极差分析的方法对试验结果进行处理,确定各因素的主次顺序和优劣水平以及各因素的最优水平组合。

表 1 影响美拉德反应的正交试验因素水平

水平	因素				
	反应温度 (A)/°C	反应时间 (B)/h	初始 pH 值(C)	外加水分 (D)/%	糖氨配 比(E)
1	80	1	6	0	3:1
2	100	2	7	2	2:1
3	120	3	8	4	1:1
4	140	4	9	6	1:2
5	160	5	10	8	1:3

1.2.3 验证试验 对正交试验得出的最优水平组合进行试验,以验证结果的准确性。

1.2.4 条件优化后美拉德反应产物的 GC-MS 分析 取最佳反应条件下的美拉德反应产物体系 10 mL,放入 125 mL 的分液漏斗中,加入 15 mL 饱和 NaCl 溶液,用 25 mL 的乙醚萃取 3 次,合并 3 次萃取液,用无水硫酸钠干燥过夜,过滤后滤液倒入具有刻度的浓缩瓶里,常压浓缩至 1 mL,然后进行 GC-MS 分析。

GC-MS 分析条件为色谱柱:HP-5MS 弹性石英毛细管柱(60 m×250 μ m×0.25 μ m);程序升温:50 °C 保持 2 min,以 5 °C/min 升温至 280 °C,保持 20 min;进样口温度:270 °C;进样量:1.0 μ L;分流比:5:1;载气:氦气;流速:1 mL/min;检测器温度:270 °C;溶剂延迟 6.5 min;EI 源电子能量:70 eV;离子源温度:230 °C;四级杆温度:150 °C;质量扫描范围:30~550 amu。采用 NIST11 标准谱库检索定

性,峰面积归一化法定量。

2 结果与分析

2.1 影响美拉德反应的单因素试验结果

2.1.1 反应温度 温度是影响美拉德反应的最重要因素。由图1可知,温度较低时,美拉德反应进行很慢。当温度大于100℃,反应明显加快。在100~160℃,随着温度的升高,美拉德反应产物的颜色强度逐渐增大。

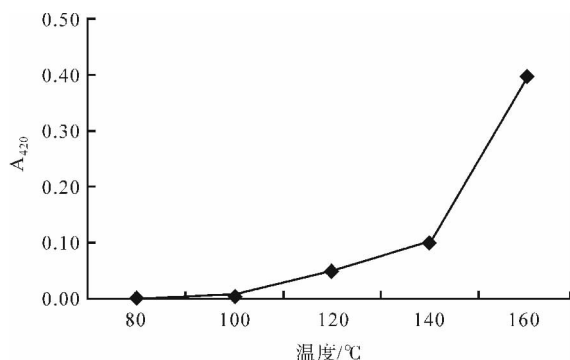


图1 温度对美拉德产物颜色强度的影响

2.1.2 反应时间 图2表明,随着反应时间的延长,产物的颜色强度呈减小—增大—减小—增大的规律,这说明反应时间和反应产物吸光度之间的关联并非线性的,产物的吸光度随着反应时间的延长呈一定的波动性。其中,反应3h和反应5h吸光度较大,说明反应速度较快,反应程度较深,由于反应3h与反应5h产物的吸光度相差不大,因此,选定反应时间为3h。

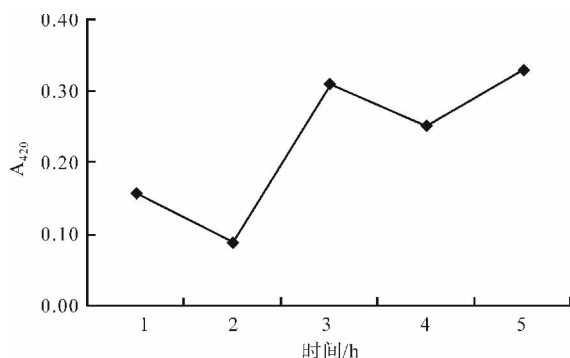


图2 时间对美拉德产物颜色强度的影响

2.1.3 初始pH值 在反应温度140℃、反应时间3h、外加水分为0、糖氨配比为1:1的固定条件下,研究不同的初始pH值对美拉德反应产物质量的影响,结果如图3所示。由图3可见,初始pH值不同,对美拉德反应产物的影响程度也不同。在初始pH值为6~10时,随着pH值的增大,产物的颜色强度先减小后逐渐增大。在碱性条件下,初始pH值越

大,颜色强度也越大。因此,选定初始pH值为10。

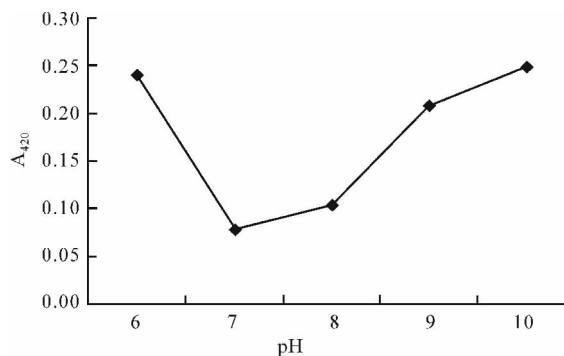


图3 初始pH值对美拉德产物颜色强度的影响

2.1.4 外加水分 在反应温度140℃、反应时间3h、pH值为10、糖氨配比为1:1的固定条件下,研究外加水分对美拉德反应产物质量的影响,结果如图4所示。图4表明,随着外加水分的增加,产物的颜色强度逐渐减小,两者之间具有明显的线性负相关关系。因此,选定外加水分分为0。

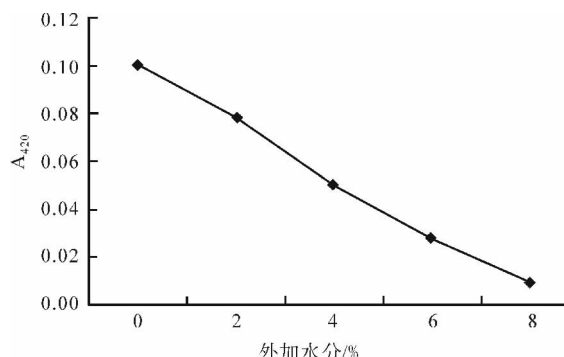


图4 外加水分对美拉德产物颜色强度的影响

2.1.5 糖氨配比 在反应温度140℃、反应时间3h、外加水分为0、初始pH值为10的固定条件下,研究不同的糖氨比对美拉德反应产物质量的影响,结果如图5所示。由图5可见,糖氨比对美拉德反应产物也有一定的影响。随着糖氨配比的减小,产物的颜色强度逐渐增大。因此,选定果糖与羟脯氨酸配比为1:3。

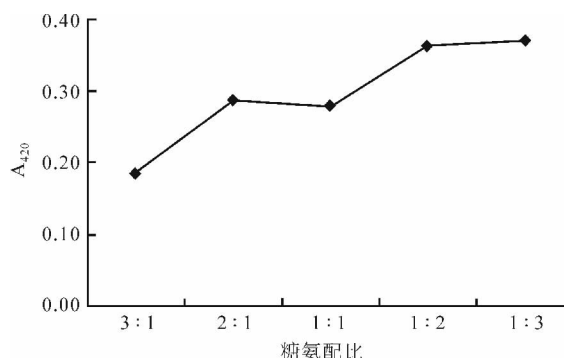


图5 不同的糖氨比对美拉德产物颜色强度的影响

2.2 影响美拉德反应的正交试验结果

为了确定较优的反应条件,在前面单因素试验的基础上采用 $L_{25}(5^6)$ 标准表进行正交试验,结果见表 2。极差分析结果表明,影响颜色强度的主要因素是反应温度,其余依次为外加水分、糖氨配比、反应时间和初始 pH 值。根据以上单因素试验结果和正交试验结果,综合认为,美拉德反应的最优条件为 $A_5B_3C_3D_1E_5$,即反应温度 160 ℃、反应时间 3 h、pH 值 8、外加水分 0、糖氨配比 1:3。

表 2 正交试验方案及结果分析

试验号	因素					A_{420}
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	0.002
2	1	2	2	2	2	0.000
3	1	3	3	3	3	0.005
4	1	4	4	4	4	0.017
5	1	5	5	5	5	0.010
6	2	1	2	3	4	0.001
7	2	2	3	4	5	0.007
8	2	3	4	5	1	0.019
9	2	4	5	1	2	0.032
10	2	5	1	2	3	0.000
11	3	1	3	5	2	0.009
12	3	2	4	1	3	0.056
13	3	3	5	2	4	0.104
14	3	4	1	3	5	0.098
15	3	5	2	4	1	0.056
16	4	1	4	2	5	0.102
17	4	2	5	3	1	0.114
18	4	3	1	4	2	0.079
19	4	4	2	5	3	0.058
20	4	5	3	1	4	0.491
21	5	1	5	4	3	0.070
22	5	2	1	5	4	0.072
23	5	3	2	1	5	0.772
24	5	4	3	2	1	0.385
25	5	5	4	3	2	0.317
K_1	0.034	0.184	0.251	1.353	0.576	
K_2	0.059	0.249	0.887	0.591	0.437	
K_3	0.323	0.979	0.897	0.535	0.189	
K_4	0.844	0.590	0.511	0.229	0.685	
K_5	1.616	0.874	0.330	0.168	0.989	
R	1.528	0.795	0.646	1.185	0.800	

2.3 验证试验结果

根据正交试验得出的最优水平组合进行试验,即反应温度 160 ℃、反应时间 3 h、糖氨配比 1:3、初始 pH 值 8、外加水分 0,美拉德反应产物的吸光度为 0.835,大于正交试验中各组合的最大吸光度,美拉德产物的质量最好,表明根据正交试验得出的最优水平组合所确定的反应条件为最佳条件。

2.4 美拉德产物的 GC-MS 分析

利用气-质联用仪对果糖与羟脯氨酸最佳反应条件下美拉德反应产物的醚溶性香味成分进行分离、鉴定,并利用峰面积归一化法测定各成分的质量分数,结果见表 3。由表 3 可知,鉴定出 15 种物质成分,主要致香成分为吡嗪、吡咯、呋喃等杂环化合物,这些物质是卷烟中的重要香气成分,但含量相对微小,其中吡嗪相对比较突出。吡嗪类物质产生烘烤香,可以显著增加卷烟香气,同时降低刺激性,在改善卷烟的感官品质方面有着重要的应用价值。

表 3 美拉德反应产物主要的醚溶性成分

序号	保留时间/min	名称	含量/%
1	8.80	乙基吡咯	0.15
2	10.37	对二甲苯	0.04
3	11.17	对氨基苯酚	0.08
4	14.10	3-氨基吡啶	0.04
5	15.11	吡嗪	2.41
6	15.73	嘧啶	0.07
7	15.85	1-(3-氨基苯基)-乙醇	0.07
8	18.12	2,3-二氢-吡啶	0.02
9	18.18	2-甲基吡咯	0.06
10	18.77	1-(3-吡啶基)-1-丁酮	0.03
11	20.07	1-糠基吡咯	0.03
12	22.26	7-甲基吡啶	0.04
13	25.60	吡嗪	0.13
14	26.07	3-乙基吡咯	0.02
15	31.53	3-甲基-2-甲基乙烯基-苯并呋喃	0.10

3 结论

通过单因素试验和正交试验,确定果糖与羟脯氨酸美拉德反应的最佳条件:反应温度 160 ℃、反应时间 3 h、pH 值 8、糖氨配比 1:3、外加水分 0。利用气-质联用仪对果糖与羟脯氨酸的美拉德反应产物进行 GC-MS 分析,检测到吡嗪、吡咯、呋喃等卷烟重要致香成分,且大部分与烟香谐调,在烟草增香中起着重要作用,这与前人的研究结果^[17]相一致,说明果糖与羟脯氨酸的美拉德反应产物在烟草中具有增香效果,可以作为烟用香料用于卷烟加香。

参考文献:

- [1] Hodge J E. Chemistry of browning reaction in model systems[J]. Agric Food Chem, 1953, 1: 928-943.
- [2] 杨义良, 吴峰, 杨通隆, 等. 不同品种对特色烟叶形成的影响研究[J]. 天津农业科学, 2010, 16(16): 28-31.
- [3] 扈英磊, 常保强, 严玉彬, 等. 气候条件对烟草生长的影响分析[J]. 现代农业科技, 2009(4): 204.
- [4] 卢剑, 王龙, 孙曙光, 等. 不同钾肥种类对烤烟品质的影响[J]. 山西农业科学, 2012, 40(12): 1277-1281.
- [5] 过伟民, 尹启生, 宋纪真. 烟草质体色素及其降解产物影响因素研究进展[J]. 华北农学报, 2008, 23(增刊): 358-362.
- [6] 孟智勇, 张保占, 马浩波, 等. 密集烘烤转火时间对烤烟中性致香物质和评吸质量的影响[J]. 河南农业科学, 2010(9): 31-34.
- [7] 刘立全, 王月霞. 美拉德反应在烟草增香中的应用研究进展[J]. 烟草科技, 1994(6): 21-24.
- [8] 许萍, 宁敏. 非酶棕色化反应在烟草增香中的应用研究[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 1997, 20(4): 140-145.
- [9] 郭俊成, 张悠金, 舒俊生, 等. 烟用美拉德反应香料研究[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(1): 95-99.
- [10] 冯大炎. 美拉德反应及系列香料的合成[J]. 食品科

学, 1993(7): 3-7.

- [11] 方百盈, 冯大炎. Maillard 反应与烟用香料的开发[J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 1997, 20(3): 253-256.
- [12] 吴冬梅, 殷广明. 棕色化反应产物的制备研究在烟草方面的应用[J]. 克山师专学报, 2000(3): 40-42.
- [13] 王育水, 陈京才. 梅拉德反应与反应香料[J]. 河南教育学院学报: 自然科学版, 2000, 9(4): 33-35.
- [14] 赵田, 史宏志, 姬小明, 等. 不同类型烟草游离氨基酸组成和含量的差异分析[J]. 中国烟草学报, 2011, 17(2): 13-17.
- [15] 祖海道, 宋焕禄, 李大明, 等. 脯氨酸与木糖反应产物抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 67-69.
- [16] 刘志华, 毕莉莎, 刘春波, 等. 脯氨酸与葡萄糖美拉德反应模型产物抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(8): 104-107.
- [17] 赵国玲, 杨华武, 钟科军, 等. 葡萄干提取物与脯氨酸的梅拉德反应[J]. 烟草科技, 2011(11): 44-49.
- [18] 魏明杰, 张弘涛, 朱智志, 等. 果糖与脯氨酸的 Maillard 反应及其在烟草中应用研究[J]. 安徽农学通报, 2009(2): 26-28.
- [19] 王莹. 美拉德反应的工艺条件优化及其产物的 GC-MS 鉴定、卷烟加香应用研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.

(上接第 140 页) 酶解糖化比生物糖化产糖量略高。然而, 从成本考虑, 目前纤维素酶的价格仍然很高, 这也是利用纤维素生产乙醇成本居高不下的一个重要因素。而微生物直接降解糖化木质纤维素, 相对商品化酶, 成本较低, 而且动态生长的微生物可以充分渗透到秸秆结构内部, 同时能不断产生纤维素酶, 避免了由于长时间反应而导致的酶失活现象, 因此, 建议采用生物糖化法。

参考文献:

- [1] 张百良. 农村能源技术与经济管理[M]. 北京: 中国农业出

版社, 1995.

- [2] 贾朋君, 张仲欣, 任广跃, 等. 专用发酵剂降解玉米秸秆饲料的工艺优化[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2013, 34(2): 70-74.
- [3] 焦小丽. 秸秆饲料加工利用技术的研究进展[J]. 四川畜牧兽医, 2007, 34(7): 34-35, 37.
- [4] 高小朋, 任龙辉, 孙中锋, 等. 玉米秸秆酸解产糖条件的优化[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(16): 3361-3364.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法与技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [6] 何珣, 缪冶炼, 陈介余, 等. 纤维素酶用量和底物浓度对玉米秸秆酶解的影响[J]. 食品科技, 2010, 35(2): 47-58.