

# 葡萄糖苷酶酶解香草兰的工艺条件优化研究

康林芝, 王娜, 秦艳, 唐惠奇, 云帆\* (广州市澳键丰泽生物科技有限公司, 广东广州 510760)

**摘要** [目的]优化葡萄糖苷酶酶解香草兰的工艺条件。[方法]以香草兰为材料,研究葡萄糖苷酶酶解提取香兰素的工艺。在单因素试验的基础上选取试验因素与水平,设计3因素3水平的响应面分析法,依据回归分析确定工艺条件的影响因素,以香兰素含量为响应值作响应面分析试验。[结果]葡萄糖苷酶酶解香草兰的最佳工艺条件为:反应温度44℃,料液比1:14 g/mL,加酶量16 U/g,香兰素含量实际得率为17.80 mg/g。[结论]葡萄糖苷酶可水解香兰素的前体物质,释放出香草兰中潜在的香气成分,从而大幅度提高香气成分含量。

**关键词** 葡萄糖苷酶;香草兰;香兰素;酶解

中图分类号 S573 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)25-058-04

## Optimization of the Technology Condition of Vanilla Enzyme Digestion by Glycosidase

KANG Lin-zhi, WANG Na, QIN Yan, YUN Fan\* et al (Guangzhou Alchemy Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510760)

**Abstract** [Objective] To optimize the technology condition of vanilla enzyme digestion by glycosidase. [Method] With vanilla as the material, we researched the extraction technology of vanillin by glycosidase enzymolysis. Test factor and level were selected based on single factor test. Response Surface Analysis was designed based on three factors and three levels. According to the regression analysis, influencing factor of technology condition was determined. With vanillin content as the response value, response surface analysis was carried out. [Result] The optimal technology condition of vanilla enzyme digestion by glycosidase was as follows: 44℃ reaction temperature, 1:14 g/mL solid-liquid ratio, and 16 U/g enzyme volume. Under this condition, the extraction rate of vanillin content was 17.80 mg/g. [Conclusion] Glycosidase can hydrolyse the precursor of vanillin, release the potential components of vanilla aroma, and greatly improve the aroma composition.

**Key words** Glycosidase enzyme; Vanilla; Vanillin; Enzymolysis

香草兰原产墨西哥,是高级食用香料,有“食用香料之王”之称,广泛用于食品工业、烟、酒和高级化妆品<sup>[1-2]</sup>。香兰素是香草兰豆荚中最主要的生香物质,但刚成熟的香草兰豆荚并不具有特征香气,其豆荚经过生香加工后才具有浓郁的香味<sup>[3]</sup>。香草兰豆荚加工过程中生香的原因主要是因为豆荚中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶会催化香兰素葡萄糖苷分解形成香兰素和葡萄糖,生成的香兰素赋予香草兰香味。江明等<sup>[4]</sup>研究了香草兰果荚内源 $\beta$ -葡萄糖苷酶在不同加工条件下的活性变化,结果表明,香草兰在经过杀青及干燥处理后, $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性有所升高。但是香草兰自身含有的葡萄糖苷酶非常有限,导致香草兰的传统生香周期长达1年,耗费大量的人力物力<sup>[5]</sup>。Ranadive<sup>[6]</sup>及浦帆等<sup>[7]</sup>在成熟香草兰果荚中添加外源 $\beta$ -葡萄糖苷酶,研究发现豆荚中的香兰素含量明显提高,证明 $\beta$ -葡萄糖苷酶在香草兰的生香过程中起着重要的作用,同时也证明了酶促生香的可行性。笔者采用响应面优化了利用葡萄糖苷酶酶解香草兰原料的工艺条件,为工业化高效生产纯天然香兰素奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 香草兰,产地海南,海南兴科兴隆热带植物园开发有限公司。 $\beta$ -葡萄糖苷酶:酶活力5.5 U/mg,上海Sigma试剂公司。标准产物香兰素,分析纯,购买于上海生物工程有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 香草兰中香气成分的提取方法。**香草兰豆荚低温干

燥、粉碎,取20 g粉末置于500 mL三角烧瓶中,然后在粉碎豆荚中加入20单位的葡萄糖苷酶,置于37℃恒温水浴中反应18 h,之后进行熟化。取酶解后的样品用95%的乙醇索式抽提16 h,提取物定容至100 mL,然后进行紫外分光光度测定。

**1.2.2 香兰素含量的定量分析方法。**利用紫外分光光度法分析酶促生香样品中香兰素的含量<sup>[8]</sup>。

**1.2.2.1 标准溶液的配制。**称取0.01 g香兰素于10 mL容量瓶中,加无水乙醇溶解后定容至刻度,备用。其浓度为1.0 mg/mL。

**1.2.2.2 试样液的制备。**准确称取试样约0.01 g,制备方法与上述标准溶液的制备相同。取上述各溶液分别放入1 cm石英池中,在最大吸收波长约308 nm处测定吸光度,计算香兰素含量。

**1.2.3 香草兰的酶促生香研究<sup>[9]</sup>。**根据酶促反应动力学可知,香草兰酶促生香过程中各项影响酶促反应的参数均将影响酶促反应的速度与强度,从而影响香草兰酶促生香的加工时间长短以及产品中香兰素含量。酶促生香加工以产品中香兰素含量为指标,对提取物进行紫外分光光度法测定分析。由于反应温度、时间、体系pH等工艺参数是影响酶促反应的主要因素。因此,该试验从加酶量、酶解温度、酶解时间、料液比等方面研究 $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶解作用对香草兰中香兰素含量的影响,并以传统生香方法生香的香草兰豆荚提取物作为对照。

**1.2.3.1 不同反应温度对香草兰酶促生香研究的影响。**取杀青后的香草兰豆荚50 g切碎至均匀大小,加入pH 5.0的磷酸盐缓冲液200 mL进行匀浆。在匀浆液中加入20 U/g的 $\beta$ -葡萄糖苷酶,在35、40、45、50、55℃的酶解温度下,搅拌

**作者简介** 康林芝(1988-),女,山东菏泽人,工程师,博士,从事食品生物技术研究。\*通讯作者,工程师,硕士,从事食品生物技术研究。

**收稿日期** 2016-06-29

酶解 18 h 后进行熟化。熟化完全的香草兰豆荚利用“1.2.1”方法提取,对香兰素进行紫外分光光度计测定分析。

**1.2.3.2 不同反应时间对香草兰酶促生香研究的影响。**取杀青后的香草兰豆荚 50 g 切碎至均匀大小,加入 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液 200 mL 进行匀浆。在匀浆液中加入 20 U/g 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶,在 35 °C 的酶解温度下,搅拌酶解 4、12、18、24、32 h 后进行熟化。熟化完全的香草兰豆荚利用“1.2.1”方法提取,对香兰素进行紫外分光光度计测定分析。

**1.2.3.3 不同料液比对香草兰酶促生香研究的影响。**取杀青后的香草兰豆荚 50 g 切碎至均匀大小,加入 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液 200、300、400、500、600、700 mL (料液比依次为 1:4、1:6、1:8、1:10、1:12、1:14 g/mL) 进行匀浆。在匀浆液中加入 20 U/g 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶,在 35 °C 的酶解温度下,搅拌酶解 18 h 后进行熟化。熟化完全的香草兰豆荚利用“1.2.1”方法提取,对香兰素进行紫外分光光度计测定分析。

**1.2.3.4 不同加酶量对香草兰酶促生香研究的影响。**取杀青后的香草兰豆荚 50 g 切碎至均匀大小,加入 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液 200 mL 进行匀浆。在匀浆液中加入 15、20、25、30、35 U/g 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶,在 35 °C 的酶解温度下,搅拌酶解 18 h 后进行熟化。熟化完全的香草兰豆荚利用“1.2.1”方法提取,对香兰素进行紫外分光光度计测定分析。

**1.2.4  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶解香草兰的工艺条件优化。**通过对加酶量、酶解温度、酶解时间、料液比等方面进行了单因素试验考察,采用响应面法在 3 因子 3 水平上对  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶解香草兰工艺条件进行优化。选取酶解温度、料液比和加酶量作为响应面试验设计的分析因子,同样条件下制备一个不加酶的空白对照,之后进行熟化,熟化完全的香草兰豆荚以产品中香兰素含量为指标对提取物进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同单因素对香兰素含量的影响

**2.1.1 不同反应温度对香兰素含量的影响。**在酶解温度不同的条件下提取香兰素,其他条件(料液比 1:12 g/mL,反应时间 18 h,加酶量为 20 U/g) 相同,计算不同酶解温度条件下香兰素含量。

对 50 g 香草兰豆荚进行酶解温度的单因素试验,分别测定各处理组中的香兰素含量。由图 1 可以看出,酶解温度处于 50 °C 时,提取的香兰素相对含量达到最大值。在 50 °C 之前,随着温度的升高,酶的水解效果不断提高;但在 50 °C 以后,香兰素含量开始下降。因此,该试验采用 50 °C 的酶解温度。

**2.1.2 不同反应时间对香兰素含量的影响。**在酶解时间不同的条件下提取香兰素,其他条件(料液比 1:12 g/mL,反应温度 45 °C,加酶量为 20 U/g) 相同,计算不同酶解时间条件下香兰素含量。

对 50 g 香草兰豆荚进行酶解时间的单因素试验,分别测定各处理组中的香兰素含量。由图 2 可以看出,随着酶解时间的不断增加,香兰素含量逐步增加,当酶解时间达到 24 h 时,提取的香兰素相对含量达到最大值。但在 24 h 之后,香兰素含量又随着酶解时间的增加而降低,这是因为随着时间

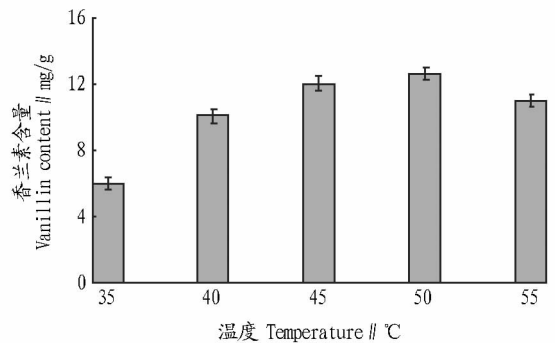


图 1 酶解温度对香兰素含量的影响

Fig. 1 Effects of enzymolysis temperature on the vanillin content

的不断延长,一些香气成分挥发造成测到的香兰素有所降低。因此,该试验采用 24 h 为最佳酶解时间。

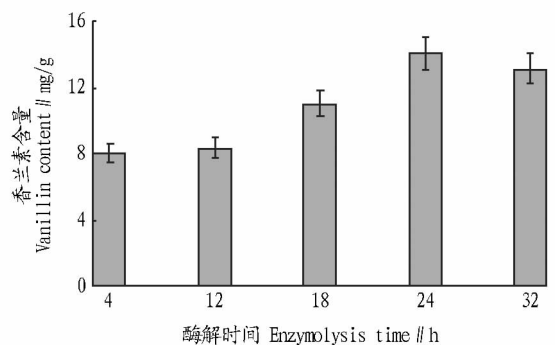


图 2 酶解时间对香兰素含量的影响

Fig. 2 Effects of enzymolysis time on the vanillin content

**2.1.3 不同料液比对香兰素含量的影响。**在料液比不同的条件下提取香兰素,其他条件(反应时间 18 h,反应温度 45 °C,加酶量为 20 U/g) 相同,计算不同料液比条件下香兰素含量。

对 50 g 香草兰豆荚进行料液比的单因素试验,分别测定各处理组中的香兰素含量。由图 3 可以看出,随着料液比中溶剂用量的提高,香兰素含量逐步增加,当料液比为 1:12 g/mL 时,提取的香兰素相对含量达到最大值;料液比中溶剂用量继续增加时,香兰素含量没有随之增加。因此,该试验采用 1:12 g/mL 为最佳料液比。

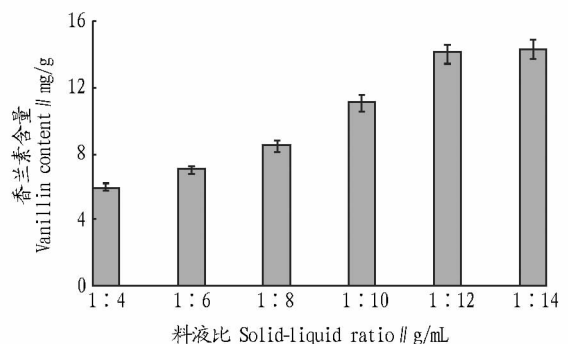


图 3 料液比对香兰素含量的影响

Fig. 3 Effects of solid-liquid ratio on the vanillin content

**2.1.4 不同加酶量对香兰素含量的影响。**在加酶量不同的条件下提取香兰素,其他条件(反应时间 18 h,反应温度

45℃,料液比1:12(g/mL)相同,计算不同加酶量条件下香兰素含量。

对50g香草兰豆荚进行加酶量的单因素试验,分别测定各处理组中的香兰素含量。由图4可以看出,随着加酶量的增加,香兰素含量逐步增加,当加酶量为20U/g时,提取的香兰素相对含量达到最大值;加酶量继续增加时,香兰素含量没有明显增加。因此,该试验采用20U/g为最佳加酶量。

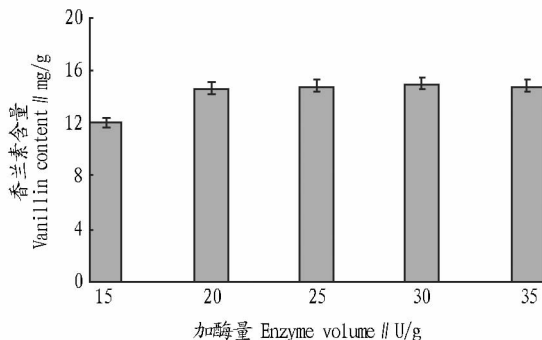


图4 加酶量对香兰素含量的影响

Fig. 4 Effects of enzyme volume on the vanillin content

**2.2 提取香兰素工艺的响应面优化试验** 响应面分析法已经广泛应用于食品工业、化工、生物技术等方面,其目的是在现有的试验基础上找到到试验范围上的因素的最佳组合和响应值的最优值,以确定最佳提取工艺参数<sup>[13]</sup>。

**2.2.1 响应面优化试验设计。**根据单因素试验对不同反应温度、不同反应时间、不同料液比、加酶量进行综合考虑,采用3因素3水平,根据Box-Behnken Design(BBD)设计法设计香兰素提取的响应面试验,试验因素与水平设计见表1,共20个试验点,设计方案所得的试验结果见表2。

表1 响应面3因素3水平试验设计

Table 1 Three factors and three levels test design of response surface analysis

水平 Level	因素 Factor		
	反应温度(A) Reaction temperature//℃	料液比(B) Solid-liquid ratio g/mL	加酶量(C) Enzyme volume//U/g
-1	40	1:10	10
0	45	1:12	15
1	50	1:14	20

**2.2.2 响应面试验数学模型的建立。**按照Design Expert软件中的Box-Behnken Design模型对表2的数据进行多元回归拟合,得到香兰素含量对反应温度(A)、料液比(B)、加酶量(C)的二次多项回归模型为: $Y = 17.29 - 0.15A + 0.3B + 0.95C - 0.53AB + 0.076AC + 0.4BC - 1.78A^2 + 0.36B^2 - 2.33C^2$ 。对回归模型进行方差分析,结果得出: $F_A = 0.32, P_A = 0.5864; F_B = 1.28, P_B = 0.2841; F_C = 12.91, P_C = 0.0049; F_{A^2} = 12.54, P_{A^2} = 0.0053; F_{B^2} = 0.52, P_{B^2} = 0.4876; F_{C^2} = 21.50, P_{C^2} = 0.0009; F_{AB} = 3.26, P_{AB} = 0.1013; F_{AC} = 0.067, P_{AC} = 0.8009; F_{BC} = 1.88, P_{BC} = 0.2002; F_{模型} = 11.73, P_{模型} = 0.0003^{***}; F_{失拟} = 4.04, P_{失拟} = 0.0758$ 。由此可以看出,模型显著性水平 $P < 0.01$ ,表明二次方程模型达到极显著水平;失

拟项 $P = 0.0758 > 0.05$ ,即模型差异不显著,说明模型残差均由随机误差引起。

表2 Box-Behnken 设计方案及其响应值

Table 2 Box-Behnken designing scheme and its response value

试验号 Test No.	因素 Factor			香兰素含量 Vanillin content mg/g
	反应温度(A) Reaction temperature//℃	料液比(B) Solid-liquid ratio//g/mL	加酶量(C) Enzyme volume//U/g	
1	45	1:12	15	16.68
2	45	1:12	10	13.16
3	40	1:10	20	13.06
4	40	1:12	15	15.38
5	50	1:14	20	14.56
6	45	1:12	15	17.98
7	45	1:12	20	15.37
8	40	1:14	10	13.09
9	40	1:14	20	16.12
10	40	1:10	10	12.77
11	50	1:14	10	12.35
12	50	1:12	15	14.25
13	45	1:12	15	17.96
14	45	1:12	15	17.95
15	50	1:10	10	13.03
16	50	1:10	20	14.75
17	45	1:10	15	16.72
18	45	1:12	15	17.98
19	45	1:12	15	17.95
20	45	1:14	15	17.19

综合以上所述,说明模型拟合程度良好,试验误差小。因此,该模型可较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可利用模型来分析和预测制备香兰素的工艺结果。

**2.2.3 响应面优化与分析。**利用Design Expert 7.1.6软件,绘制各影响因素对香兰素的响应曲面图,分析酶解温度(A)、料液比(B)、加酶量(C)对香兰素含量的影响。响应曲面的坡度平缓说明随着处理条件的变化,响应值的大小不受影响,但是,当曲面坡度陡峭时,则说明响应值对处理条件的改变非常敏感。

比较图5、6、7可知,酶解温度(A)、料液比(B)、加酶量(C)对香兰素含量的影响极为显著,表现为曲面较陡,其中加酶量对香兰素含量的影响最大。

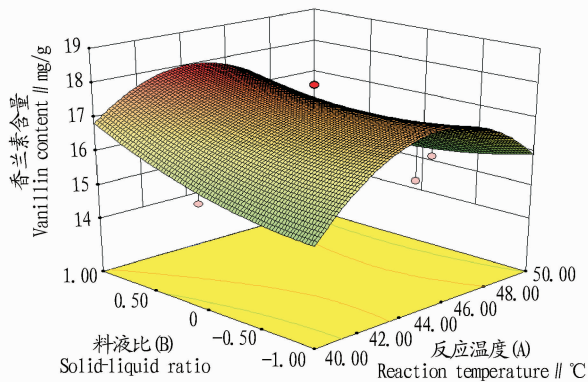


图5 料液比与反应温度对香兰素含量的影响

Fig. 5 Effects solid-liquid ratio and reaction temperature on the vanillin content

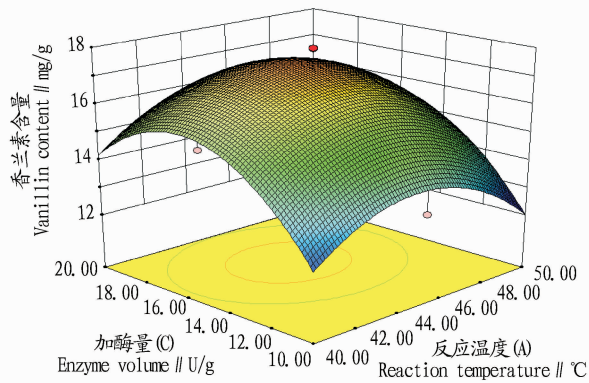


图6 加酶量与反应温度对香草素含量的影响

Fig. 6 Effects enzyme volume and reaction temperature on the vanillin content

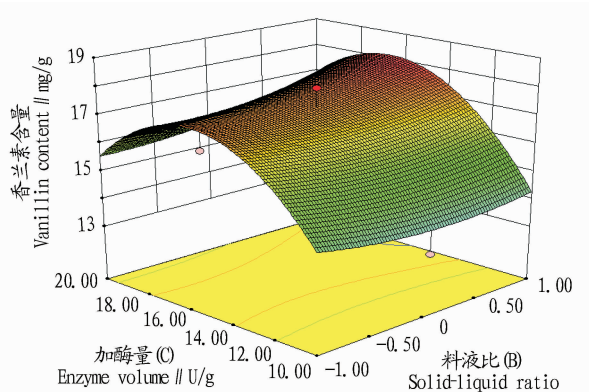


图7 加酶量与料液比对香草素含量的影响

Fig. 7 Effects enzyme volume and solid-liquid ratio on the vanillin content

**2.2.4 优化与验证。**由 SAS 分析得到香草素提取的最佳工艺条件为:反应温度 43.81 °C,料液比 1:13.82 g/mL,加酶量 16.3 U/g,此时的理论得率达到了 18.188 1 mg/g。为了验证

响应面法的可靠性,采用得到的最佳提取工艺条件进行香草素提取的验证试验,同时考虑到实际生产操作的便利性,以反应温度 44 °C,料液比 1:14 g/mL,加酶量 16 U/g 为最佳。3 次平行试验得到的实际平均得率为 17.80 mg/g,与理论值相差 0.02%。因此,通过响应面法优化得到葡萄糖苷酶酶解香草兰豆荚提取工艺条件是可行的,具有实际生产价值。

### 3 结论

通过响应面试验优化了葡萄糖苷酶对香草兰进行酶解的工艺,葡萄糖苷酶酶解香草兰的最佳工艺条件为:反应温度 44 °C,料液比 1:14 g/mL,加酶量 16 U/g,此条件下香草素含量实际得率 17.80 mg/g。结果表明,经葡萄糖苷酶处理后得到的香草兰提取物,其中的香草素含量明显提高,其香气也更加浓郁,说明葡萄糖苷酶可以将香草素前体物质香草素葡萄糖苷分解形成香草素和葡萄糖,生成的香草素赋予香草兰香味。

### 参考文献

- [1] WALTON N J, MAYER M J, NARBAD A. Molecules of interest vanillin [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63 (5): 505 - 515.
- [2] WALISZEWSKI K N, PARDIO V T, OVANDO S L. A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract [J]. *Food chemistry*, 2007, 101 (3): 1059 - 1062.
- [3] 韩秀山. 我国香草素发展概况 [J]. *四川化工与腐蚀控制*, 2002, 5 (1): 36 - 37.
- [4] 江明, 刘涛, 杨祖武, 等. 不同加工处理条件下香荚兰荚果中二种内源酶的活性变化 [J]. *云南植物研究*, 2005, 27 (3): 310 - 314.
- [5] 宋刚, 曹劲松, 彭志英. 香草素的生物合成 [J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27 (7): 72 - 74.
- [6] RANADIVE A S. Vanillin and related flavour compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1992, 40 (10): 1922 - 1924.
- [7] 浦帆, 江明, 张正居, 等. 香荚兰酶促生香的研究 [J]. *云南植物研究*, 1998, 20 (3): 355 - 361.
- [8] 韦寿莲, 赵建芬. 紫外分光光度法测定食品中香草素的含量 [J]. *肇庆学院学报*, 2008, 29 (5): 31 - 33.
- [9] 孙海彦, 王茜, 彭明. 利用黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶催化香草素葡萄糖苷水解 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2011, 30 (6): 687 - 690.

(上接第 45 页)

- [19] 李诗言, 张海琪, 郑重莺, 等. 高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法筛查中华鳖中 42 种兽药残留 [J]. *中国渔业质量与标准*, 2015, 5 (1): 43 - 51.
- [20] 李晓雯, 迟秋池, 夏苏捷, 等. 高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法检测猪肉中 22 种磺胺类兽药残留 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6 (5): 1735 - 1742.
- [21] 李丽莉, 罗轶, 何颂华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉中 8 种喹诺酮类药物的残留量 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2012, 24 (1): 37 - 38.
- [22] 文一, 姚瑞华, 孙宏亮, 等. 超高效液相色谱-质谱联用法同时测定地下水中的 23 种药物残留 [J]. *环境科学学报*, 2015, 35 (7): 2127 - 2135.

- [23] 付体鹏, 张峰, 刘力, 等. 高效液相色谱-电喷雾-iFunnel-串联质谱法同时测定猪尿液中 20 种禁用兽药残留 [J]. *分析测试学报*, 2013, 32 (10): 1153 - 1159.
- [24] 沈虎琴, 檀华容, 祁克宗, 等. 畜禽粪便中的氟喹诺酮类与四环素类兽药残留同时提取的方法研究 [J]. *分析测试学报*, 2012, 31 (3): 302 - 306.
- [25] 卜明楠, 石志红, 康健, 等. QuEChERS 结合-LC-MS/MS 同时测定虾肉中 72 种兽药残留 [J]. *分析测试学报*, 2012, 31 (5): 552 - 558.
- [26] 曲斌. QuEChERS 在动物源性食品兽药残留检测中的研究进展 [J]. *食品科学*, 2013, 34 (5): 327 - 331.
- [27] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展 [J]. *质谱学报*, 2011, 32 (6): 321 - 332.