

黑豆发芽条件及其异黄酮提取物特性研究

翟玮玮

(江苏食品职业技术学院, 江苏 淮安 223003)

摘 要: 对黑豆发芽条件及其中异黄酮提取物特性进行了探讨。结果表明: 黑豆最佳发芽条件为浸泡温度 38℃、浸泡时间 15h、发芽温度 32℃、发芽时间 50h; 发芽黑豆中的异黄酮具有较高的清除羟自由基能力、清除超氧阴离子自由基能力和很好的抗油脂氧化能力; 通过对异黄酮组分的测定可知, 发芽后以葡糖苷(IFG)形式存在的异黄酮含量降低, 以甙元(IFA)形式存在的异黄酮含量增加。

关键词: 异黄酮; 黑豆; 发芽

Study on Germination Conditions of Black Bean and Antioxidant Activity of Its Isoflavones Extract

ZHAI Wei-wei

(Jiangsu Food Science College, Huaian 223003, China)

Abstract: In this study, the experimental results showed that under the conditions of black bean being soaked at 38 °C for 15 h and germinating at 32 °C for 50 h, the isoflavones content in black bean reaches maximum; The isoflavones extracted from the germinated black bean possess hydroxyl radical and superoxide radical scavenging activities and inhibitory effect on lipid peroxidation; The isoflavone aglycones (IFA) content in germinated black bean is higher than that in native one, but the isoflavone glycosides (IFG) content is lower.

Key words: isoflavone; black bean; germination

中图分类号: O632.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0186-04

黑豆又名黑小豆、马料豆、乌豆等, 是大豆豆类的黑色种子^[1]。它含有丰富的蛋白质、脂肪、氨基酸等营养物质, 并富含异黄酮、多糖、色素等活性物质。其中异黄酮主要以葡糖苷(IFG)和相应的甙元(IFA)形式存在。代表性的异黄酮葡糖苷是染料木苷(genistin)和黄豆苷(daidzin), 甙元有染料木素(genistein)和大豆黄素(daidzein)^[2]。

近年来的研究表明异黄酮甙元比异黄酮葡糖苷更容易被人体吸收, 抗氧化能力也较大, 即异黄酮甙元比其葡糖苷具有更高的生物利用率^[3]。但在天然豆类籽粒中 90% 以上的异黄酮以葡糖苷形式存在, 只有少量以甙元形式存在, 这就大大降低了异黄酮的生物效力。豆类种子在发芽过程中 β - 葡糖酶(β -glucosidase)被激活, 会将异黄酮葡糖苷上的葡糖苷去除形成甙元, 进而增加大豆异黄酮的生理活性^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑豆 江苏省沛县湖西农场 2006 年收, 原料干燥后

4℃条件下储藏。

染料木素、大豆甙元、染料木甙和大豆甙 美国 Sigma 公司; 活性氧测试盒、超氧阴离子自由基测试盒 北京三博远志生物有限责任公司; 正己烷、乙醇等分析试剂 国药集团上海试剂公司。

1.2 仪器与设备

SHO45B 型恒定湿热试验箱 泉州万达实验仪器设备有限公司; 722 分光光度计 南京凯迪高速分析仪器有限公司; DH-203BS 型恒定湿热试验箱 上海群尚仪器仪表有限公司; HH-2 型数显恒温水浴锅 金坛市科兴仪器厂; LC-2010HT 型岛津高效液相色谱仪 岛津制作所。

1.3 方法

1.3.1 发芽黑豆制备工艺^[5]

黑豆 → 筛选 → 精选 → 消毒 → 清洗 → 浸泡 → 发芽 → 清洗 → 终止活性 → 干燥

将精选后的黑豆用 0.5% 的次氯酸钠溶液浸泡 5min, 自来水冲洗, 置于已恒温(30~40℃)的烧杯中浸泡, 然后从烧杯中取出沥干, 转移到培养皿中, 用培养液在

收稿日期: 2008-04-21

作者简介: 翟玮玮(1968-), 女, 副教授, 硕士, 主要从事食品加工及保健食品的开发研究。E-mail: zaiww6810@126.com

一定温度的恒定湿热试验箱中进行培养发芽。发芽结束后,清洗,终止活性,再在烘箱中干燥一定时间,取出即可。

1.3.2 发芽黑豆中异黄酮提取工艺^[6]

发芽黑豆→粉碎→称量→脱脂→醇提→离心→过滤→浓缩→测定

取正己烷按 W:V=1:3 对发芽黑豆粉进行脱脂 2 次,然后准确称量脱脂发芽黑豆粉,按照 1:5 的料液比加入 70% 的乙醇,置 50℃ 恒温水浴锅中浸提 1h, 2000r/min 离心 10min, 上清液保留,沉淀物按上述方法浸提 2 次,合并 3 次提取液,记录提取液总体积。

1.3.3 异黄酮含量的测定

1.3.3.1 标准曲线的测定^[7]

准确称取染料木素 0.01g, 用 70% 乙醇溶解后转移到 100ml 的容量瓶中, 定容, 摇匀。准确吸取标准样品溶液 0.00、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00、1.20、1.40ml 分别置于 50ml 比色管中, 用 70% 乙醇定容, 静置 10min 后, 以 0 管调零, 在 260nm 处测定吸光度, 根据所获得的吸光度绘制标准曲线。

1.3.3.2 样品的测定^[8]

准确量取提取液 1ml 置于 100ml 容量瓶中, 用 70% 乙醇定容, 摇匀后从中吸取一定量体积的提取液, 稀释至标准曲线范围内, 在 260nm 处测定吸光度, 根据标准曲线回归方程, 计算大豆异黄酮的提取率。

大豆异黄酮提取率(%)=(提取液中大豆异黄酮总量/所用脱脂发芽黑豆质量)×100

1.3.4 发芽条件对异黄酮含量的影响

通过考察浸泡温度、浸泡时间、发芽温度、发芽时间等单因素对发芽黑豆中异黄酮含量的影响, 确定影响较大的因素水平范围, 然后进行正交试验确定最佳发芽条件。评价指标是异黄酮含量。

1.3.5 发芽黑豆中异黄酮抗氧化特性研究^[9]

1.3.5.1 清除羟自由基能力的测定

本实验采用活性氧测试盒法对不同浓度异黄酮提取液清除羟自由基能力进行测定, 并与同浓度 VC 进行比较。以每毫升提取液在 37℃ 下反应 1min 清除的羟自由基量相当于 5mg/L VC 清除的羟自由基时为一个活力单位, 用 U/ml 表示。

1.3.5.2 清除超氧阴离子自由基的测定

本实验采用超氧阴离子自由基测试盒法对不同浓度异黄酮提取液清除超氧阴离子能力进行测定, 并与同浓度 VC 进行比较。以每毫升提取液在 37℃ 反应 40min 所抑制的超氧阴离子自由基相当于 5mg/LVC 抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位, 用 U/ml 表示。

1.3.5.3 抗油脂氧化作用

向 20g 已经测定油脂过氧化值(POV)的猪油中添加不

同浓度异黄酮提取液, 充分振摇后, 置 65℃ 恒温箱 120h 后取出, 按中华人民共和国国家标准 GB/T5538—2005 的方法测定 POV 值, 考察异黄酮提取液抗油脂氧化作用效果, 并与同浓度 VC 进行比较。

1.3.6 发芽过程中黑豆异黄酮组分变化规律研究

1.3.6.1 色谱条件^[11]

色谱柱: C₁₈ODS(4.6mm×50mm); 流动相: 甲醇: 水:冰乙酸=35:65:0.9, 流速: 1.0ml/min, 检测波长: 322nm; 进样量: 10μl; 柱温: 25℃。

1.3.6.2 标准曲线的制备

准确称取染料木苷、黄豆苷、染料木素、大豆黄素标准品各 1.0mg 分别放于 4 个 10ml 容量瓶内, 甲醇定容, 然后配制浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mg/ml 溶液, 取样用岛津高效液相色谱仪进行定量分析。以溶液浓度为自变量 x, 峰面积为因变量 y, 通过回归分析可以得到四种异黄酮的回归方程为:

$$y_{\text{染料木苷}} = 1342 + 3.4532 \times 10^5 x, \text{ 相关系数 } r = 0.99928;$$

$$y_{\text{黄豆苷}} = 874 + 3.1352 \times 10^5 x, \text{ 相关系数 } r = 0.99945;$$

$$y_{\text{染料木素}} = 679 + 6.6538 \times 10^5 x, \text{ 相关系数 } r = 0.99923;$$

$$y_{\text{大豆黄素}} = 6538 + 3.652 \times 10^5 x, \text{ 相关系数 } r = 0.99942.$$

1.3.6.3 提取液中黄酮组分的测定

取发芽前后脱脂黑豆粉, 按照 1.3.2 操作对异黄酮进行提取, 纯化后用氮气吹干, 取 1ml 放于 10ml 容量瓶内, 甲醇定容, 0.45mm 过滤器过滤, 取 5ml 滤液进行液相色谱分析, 根据峰面积和对应的标准曲线求出四种异黄酮含量。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮标准曲线的绘制

通过相关分析可知, 大豆异黄酮浓度和吸光度的回归方程为 $y = 0.3102x + 0.0069$, $R^2 = 0.9987$, 大豆异黄酮在 260nm 下浓度与吸光度有较好的线性关系。

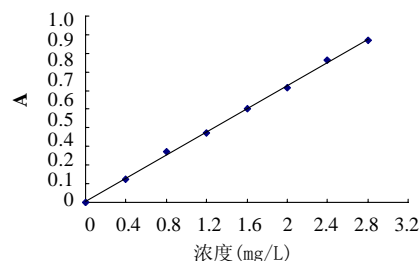


图1 大豆异黄酮标准曲线

Fig. 1 Standard curve of isoflavones

2.2 发芽条件对异黄酮含量的影响

2.2.1 单因素试验

2.2.1.1 浸泡温度对异黄酮含量的影响

由表 1 可看出, 随着浸泡温度的增加, 异黄酮含量先缓慢增加, 当温度达到 35~40℃ 之间时达到最大, 但

温度超过 45℃ 后, 异黄酮含量急剧降低, 因此, 选择 35℃ 作为最优水平。

表 1 浸泡温度对异黄酮含量的影响

Table 1 Effects of soaking temperature on isoflavones content

浸泡温度(℃)	25	30	35	40	45
异黄酮含量(mg/g)	3.083	3.321	3.511	3.524	2.813

2.2.1.2 浸泡时间对异黄酮含量的影响

由表 2 可看出, 随着浸泡时间的增加, 异黄酮含量发生先升高后降低的趋势, 浸泡时间为 15h 时异黄酮含量最大, 在 20h 时的异黄酮含量次之, 当浸泡时间超过 20h 时, 异黄酮含量出现下降趋势, 可能是因为浸泡将可溶性大豆甙溶解。因此选择 15h 的浸泡时间作为最优水平。

表 2 浸泡时间对异黄酮含量的影响

Table 2 Effects of soaking time on isoflavones content

浸泡时间(h)	0	5	10	15	20	25
异黄酮含量(mg/g)	2.543	2.983	3.129	3.402	3.304	3.306

2.2.1.3 发芽温度对异黄酮含量的影响

发芽温度是影响种子发芽最重要的因素之一。温度过低, 种子发芽缓慢; 温度过高抑制芽苗生长, 甚至会杀死芽苗。由表 3 也可以得到相同的结果: 当发芽温度逐渐增加时, 异黄酮含量也随之增加, 当温度为 30℃ 时到达最高点, 随后随着温度的增加, 异黄酮含量降低。

表 3 发芽温度对异黄酮含量的影响

Table 3 Effects of germination temperature on isoflavones content

发芽温度(℃)	25	30	35	40	45
异黄酮含量(mg/g)	2.892	3.621	3.411	3.224	2.913

2.2.1.4 发芽时间对异黄酮含量的影响

发芽的实质是在一定的生理活化条件下, 其所含有大量酶如淀粉酶、蛋白酶、植酸酶等被激活和释放, 并从结合态转化为游离态的酶解过程, 是一个缓慢的植物生理过程。由表 4 可知, 发芽过程中, 异黄酮含量先增加, 后减少。当发芽 3d 时异黄酮含量最高。因此选择 3d 作为最优水平。

表 4 发芽时间对异黄酮含量的影响

Table 4 Effect of germination time on yield of isoflavone

发芽温度(℃)	25	30	35	40	45
异黄酮含量(mg/g)	2.892	3.621	3.411	3.224	2.913

2.2.2 黑豆发芽最优条件的确定

以浸泡温度、浸泡时间、发芽温度及发芽时间为因素, 以异黄酮含量为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计分析各种发芽条件对异黄酮含量的影响。正交试验因素水平见表 5。采用极差法对正交试验结果进行分析, 结果见表 6。

表 5 因素水平表

Table 5 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 浸泡温度(℃)	B 浸泡时间(h)	C 发芽温度(℃)	D 发芽时间(h)
1	32	13	28	40
2	35	15	30	50
3	38	17	32	60

表 6 正交试验结果

Table 6 Results of orthogonal test

试验号	A 浸泡温度(℃)	B 浸泡时间(h)	C 发芽温度(℃)	D 发芽时间(h)	异黄酮含量(mg/g)
1	1	1	1	1	2.31
2	1	2	2	2	3.55
3	1	3	3	3	3.09
4	2	1	2	3	3.05
5	2	2	3	1	3.73
6	2	3	1	2	2.67
7	3	1	3	2	3.65
8	3	2	1	3	2.71
9	3	3	2	1	3.13
K ₁	8.95	9.01	7.69	9.17	T=27.89
K ₂	9.45	9.99	9.72	9.87	
K ₃	9.49	8.89	10.47	8.85	
k ₁	2.98	3	2.56	3.06	X=3.10
k ₂	3.15	3.33	3.24	3.29	
k ₃	3.16	2.96	3.49	2.95	
极差R	0.54	1.1	2.78	1.02	
优水平	A ₃	B ₂	C ₃	D ₂	

由表 6 中 R 值可以看出各因素对结果的影响次序为: C > B > D > A, 即发芽温度对异黄酮含量影响最大, 这也反映出发芽是异黄酮组分和数量发生变化的原因; 浸泡时间次之, 这主要是因为黑豆外壳非常坚硬, 水分不易进入种子之中, 很大程度上阻碍了种子的发芽和生长, 也就影响了异黄酮的含量; 浸泡温度对异黄酮含量影响最小。由表 6 中各水平对应的 k 值可以看出, 本实验的最佳组合 A₃B₂C₃D₂, 即异黄酮含量最高时, 最佳发芽条件为: 浸泡温度 38℃、浸泡时间 15h、发芽温度 32℃、发芽时间 50h。

2.3 发芽黑豆中异黄酮抗氧化特性研究

2.3.1 发芽黑豆中异黄酮清除羟自由基的效果

由图 2 可以看出, 异黄酮和 VC 对羟自由基都具有清除作用, 且清除效果与浓度呈正相关, 即随浓度增加而逐渐增强。相同浓度的异黄酮和 VC 比较, 异黄酮清除羟自由基的活力比 VC 高出 1~2 倍左右。

2.3.2 芽黑豆中异黄酮清除超氧阴离子自由基的效果

由图 3 可以看出, 异黄酮和 VC 都具有明显地清除超氧阴离子自由基的作用, 而且其清除活力都随浓度的增加而逐渐增强。但是同浓度的异黄酮和 VC 比较, 异

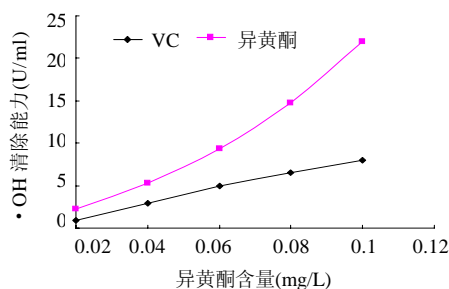


图2 异黄酮浓度对羟自由基清除能力的影响

Fig. 2 Effects of concentration of isoflavones on hydroxyl free radicals scavenging ability

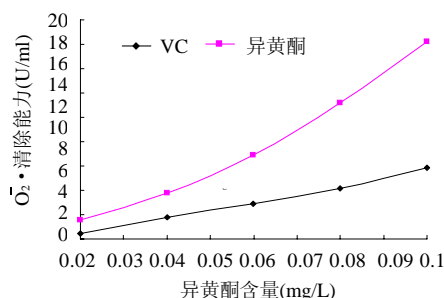


图3 异黄酮浓度对超氧阴离子自由基清除能力的影响

Fig. 3 Effects of concentration of isoflavones on superoxide free radicals scavenging ability

黄酮对超氧阴离子自由基清除效果明显好于 VC。

2.3.3 抑制油脂氧化作用

油脂暴露在空气中易氧化形成自由基, 自由基与空气中的氧反应生成自由基和过氧化物, 自由基的链式反应再使油脂继续氧化。因此, 可以测定油脂的 POV 来评价其氧化程度。POV 越高, 氧化程度越高。图 4 为异黄酮对油脂 POV 的影响测定的结果。

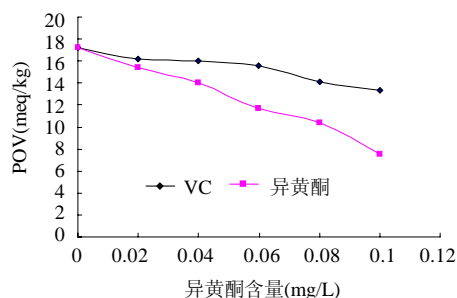


图4 异黄酮浓度对猪油氧化的抑制效应

Fig. 4 Antioxidant effects of concentration of isoflavones on lard

由图 4 可知, VC 添加量在 0.08mg/L 时才有较为明显的抗油脂氧化作用, 而发芽黑豆异黄酮只需添加 0.04mg/L 即可, 可见发芽黑豆提取物的抗氧化能力较为明显, 且高于 VC, 随着异黄酮含量增大 POV 数值降低, 即抗氧化能力越大。

2.4 发芽前后黑豆异黄酮组分测定结果

由图 5 可知, 发芽前黑豆中异黄酮多以黄豆苷、染

料木苷等葡萄糖苷形式存在, 仅有少量的甙元形式异黄酮。当黑豆种子发芽后, 葡萄糖苷形式的异黄酮含量大大减少, 而甙元形式的异黄酮含量大大增加, 说明种子发芽后 β -葡萄糖被激活, 将葡萄糖苷形式的异黄酮转化成甙元, 进而增加了大豆异黄酮的生理活性功能。

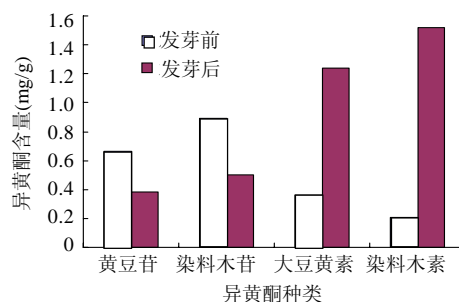


图5 发芽前后黑豆异黄酮组分测定结果

Fig. 5 Effects of germination on composition of isoflavones

3 结 论

3.1 以异黄酮含量为指标得到黑豆最佳发芽条件为: 浸泡温度 38℃、浸泡时间 15h、发芽温度 32℃、发芽时间 50h; 发芽温度对异黄酮含量影响最大, 浸泡时间次之, 浸泡温度对异黄酮含量影响最小。

3.2 通过抗氧化性能测试可知, 提取物中的异黄酮具有较高的清除羟自由基、超氧阴离子自由基能力和很好的抗油脂氧化能力, 可以作为抗氧化剂应用于食品之中。

3.3 通过液相色谱分析发芽前后黑豆中异黄酮组分变化可知, 发芽前黑豆中异黄酮多以葡萄糖苷形式存在, 发芽后葡萄糖苷异黄酮含量降低, 甙元异黄酮含量大大增加。

参考文献:

- [1] 王寅, 张冲, 赵晋. 黑豆的营养价值及在食品中的开发应用[J]. 中国食品添加剂, 2007(6): 132-135.
- [2] 郝青南, 马超, 马兵钢. 大豆异黄酮的生理功能及其分离检测方法研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2007(10): 383-386.
- [3] 殷丽君, 李里特, 李再贵. 大豆异黄酮的研究近况与展望[J]. 食品科学, 2002, 23(4): 152-154.
- [4] MATSUURA M, OBATA A. β -Glucosidase from soybeans hydrolyze daidzein and genistein[J]. Food Sci, 1993, 50(1): 144-147.
- [5] 黄迪芳, 陈正行, 邵瑜. 糙米发芽工艺的研究[J]. 食品科技, 2004(11): 7-9.
- [6] 毛慧玲, 彭娟, 孙少发, 等. 大豆异黄酮提取工艺条件的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(2): 274-278.
- [7] 顾建明, 潘春云. 大豆异黄酮的测定方法及其评价[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2007, 13(6): 742-745.
- [8] 钱丽丽, 左锋, 刘志明. 微波预处理提取大豆异黄酮的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(1): 38-39.
- [9] 毕见洲, 王长泉. 一品红花色苷抗氧化性能的研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 521-525.
- [10] 廖律, 周明达, 肖劲, 等. 米糠中阿魏酸的提取及高效液相色谱法测定[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 217-219.