

酸酶性质与外加的 5'-磷酸二酯酶(麦芽根核酸酶)的性质的比较,发现由于外加的 5'-磷酸二酯酶的稳定性比酵母核酸酶的要高,因此外加 5'-磷酸二酯酶不能显著提高自溶法制备的酵母提取物中呈味核苷酸的含量的原因,并不在于外加的 5'-磷酸二酯酶本身的性质。而是另有其它原因。

参考文献:

- [1] 李刚.啤酒酵母抽提物提取的生产工艺[J].食品科技,2000,3: 63.
- [2] Hiroshi, Sugimoto. Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of baker's yeast for preparing food-grade yeast extracts[J]. Journal of food science, 1974, 39: 939.
- [3] Tony Godfrey, Jon Reichelt. Industry enzymology The application of enzymes in industry Chapter 4.24 M. Kelly Yeast extract[M]. New York: The nature press, 1983.
- [4] 萧凤歧.酵母精的调味效能[J].食品科学,1986,6: 4-10.
- [5] J K Shetty, R C weaver, J E Kinsella. Ribonuclease isolated from yeast (*Saccharomyces carlsbergensis*): Characterization and Properties[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1981, (2): 952-964.
- [6] Cavit Akin, Rose M. Murphy US Patent 4285976, 1981.
- [7] E Orban, G B Quaglia, I Casini. Effect of temperature and yeast concentration on the autolysis of *Kluyveromyces fragilis* grown on lactose-based media[J]. Journal of food engineering, 1994, 21: 245-261.
- [8] Johannes F M, De Rooij, M J J Hakkaart. UK Patent, GB2171585A, 1985.
- [9] George J, Prokopakis, Lee-Cheng Liu. Monte carlo simulation of the enzymatic lysis of yeast[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 53(3).
- [10] 钟文辉, 吴小荣, 等. 利用废弃啤酒酵母研制营养调味品—酵母精[J]. 食品科学, 1996, 17(2): 15-21.
- [11] 冯霖. 啤酒废酵母菌体变温法自溶的研究[J]. 酿酒科技, 1996, (1): 63-64.
- [12] 沈国惠, 刘扬岷, 施翔, 等. 啤酒酵母自溶条件的优化及其抽提物的挥发性风味成分[J]. 食品与发酵工业, 1991, (3): 8-17.
- [13] N Prentice. Characterization of a nuclease from malted barley roots[J]. Journal of Cereal Science, 1987, (5): 175-187.
- [14] 陈洁, 王璋. 麦芽根核酸酶的提取及制备[J]. 食品工业科技, 2000, (1).
- [15] 陈洁, 王璋. 麦芽根中核酸酶的分离纯化及性质研究[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, (5).

大豆异黄酮类物质的提取、抗氧化性及稳定性研究

汪海波¹, 刘大川¹, 余珠花¹, 汪海婴²

(1. 武汉工业学院食品系, 湖北 武汉 430022; 2. 同济医科大学基础部, 湖北 武汉 430022)

摘 要: 对乙醇浸提法、酸水解法及超临界二氧化碳流体萃取法提取大豆异黄酮的提取效果进行了比较, 并通过测定还原能力、清除·OH能力和抑制猪油氧化能力比较了大豆异黄酮甙和甙元的抗氧化性能及热稳定性。

关键词: 大豆异黄酮; 提取; 抗氧化性; 稳定性

The Study on Extracting Antioxidative Activity and Stability of Soy Isoflavone

WANG Hai-bo¹, LIU Da-chuan¹, SHE Zhu-hua^{1,2}, WANG Hai-ying²

(1. Department of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430022, China;

2. Basic Department, Tong Ji Medicine University, Wuhan 430022, China)

Abstract: The soy isoflavone was extracted by ethanol extracting methods, acid hydrolysis extracting method and supercritical fluids CO₂ extracting method, and the extracting efficiency of the three extracting methods were compared. The antioxidant capacity

收稿日期: 2003-04-10

作者简介: 汪海波(1971-), 男, 博士研究生, 研究方向为食品化学。

and stability of soy isoflavone and soy isoflavone aglycone were compared too by the the experiments of mensurating the ability of scavenging $\cdot\text{OH}$, reducing power and antioxidant activity to lard.

Key words: soy isoflavone; extracting; antioxidative activity; stability

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)01-0111-04

大豆异黄酮是大豆中的一种天然植物雌激素,具有多种生物学作用。近年来的流行病学调查、体内体外实验表明,膳食异黄酮对肿瘤、心血管疾病、骨质疏松、绝经期综合症等的预防和治疗具有重要作用^[1~3]。本文分别采用乙醇浸提法、酸水解法及超临界二氧化碳流体萃取法从大豆脱脂粕中提取大豆异黄酮成分,并从提取得率、提取率、粗产品纯度等几个方面比较了这三种提取方法的提取效果。同时,对乙醇浸提法提取的大豆异黄酮甙产品和酸水解法提取的大豆异黄酮甙元产品的抗氧化性及稳定性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 原料

大豆脱脂粕 云梦植物蛋白厂提供

1.2 试剂

染料木黄酮标准品 购于Sigma公司; BHA 武汉工业学院重点实验室提供; 三氯化铁、三氯乙酸、碘化钾、硫代硫酸钠、甲醇、无水乙醇、乙醚、氢氧化钠、盐酸、浓硫酸、抗坏血酸、水杨酸钠等均为分析纯。

1.3 主要实验仪器

TDL-5 离心机、RE5-2CS 旋转蒸发器、LGJO.5-II 型冷冻干燥机、722 分光光度计、WFZ800-D2 型紫外-可见分光光度计、小型超临界二氧化碳萃取装置。

1.4 实验方法

1.4.1 大豆异黄酮的定量测定方法

以染料木黄酮为标样,根据异黄酮类化合物在 250~270nm 紫外区有特征吸收,以其吸收的强弱定量测定^[4]。本实验测定时最大吸收波长为 260nm,工作曲线为 $A=0.112X+0.238$,式中 A 为吸光值, X 为浓度 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.4.2 脱脂大豆粕原料中总黄酮含量的测定

精密称取脱脂大豆粕原料 10g(双样),以甲醇为溶剂回流提取 24h 后定容于 100ml 容量瓶中,按 1.4.1 方法测定其异黄酮总量。

1.4.3 酸水解法提取大豆异黄酮甙元

精密称取一定量粉碎后的脱脂大豆粕原料,加入酸水解溶剂水解,用一定浓度的氢氧化钠溶液中和水解液后加入无水乙醚震荡提取,提取液经 5000r/min 离心 10min 后取上清液转移至分液漏斗中,静置分层,弃去水合乙醚相,取乙醚相,挥干乙醚后固形物分散于蒸馏水中,

冷冻干燥得大豆异黄酮甙元产品。紫外分光光度法测定异黄酮含量并计算提取率、产品得率及产品纯度。

1.4.4 乙醇浸提法提取大豆异黄酮甙

精密称取一定量粉碎后的脱脂大豆粕原料,用含水乙醇为提取溶剂浸提。提取条件:温度 60℃,溶剂浓度 90%,每次提取固液比 1:16,每次提取时间 3h,浸提次数 3 次。合并提取液后过滤,减压回收乙醇后固形物分散于蒸馏水中,冷冻干燥得异黄酮甙产品 I。紫外分光光度法测定异黄酮含量并计算提取率、产品得率及产品纯度。

1.4.5 超临界二氧化碳法提取大豆异黄酮甙

精密称取一定量大豆脱脂粕原料,以无水甲醇为夹带剂,超临界二氧化碳流体萃取。萃取条件:温度 37℃、压力 30MPa、气体流量 35kg/h、萃取时间 3h。收集萃取物,用 1:1 无水乙醇/无水乙醚溶剂溶解萃取物并震荡萃取,静置分层后取乙醇相,减压回收乙醇后固形物分散于蒸馏水中,冷冻干燥得异黄酮甙产品 II。紫外分光光度法测定异黄酮含量并计算提取率、产品得率及产品纯度。

1.4.6 大豆异黄酮抗氧化性能研究

1.4.6.1 还原能力的测定

参考 Oyaizu 方法^[5,6],取 2.5ml 不同浓度的大豆异黄酮甙元、大豆异黄酮甙及 BHA 的乙醇溶液,加入 0.2mol/L、pH6.6 磷酸钠缓冲溶液 2.5ml 及 1% 赤血盐 2.5ml,50℃ 水浴 20min 后急速冷却,加入 10% 三氯乙酸溶液 2.5ml,于 3000r/min 离心 10min,取上清液 5ml,加蒸馏水 4ml,及 0.1% FeCl₃ 1ml,混匀后 10min 于 700nm 处测定吸光值,吸光值越大则还原能力越强。

1.4.6.2 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的测定

按 Smirnoff 方法改进^[7],用 $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ 产生 $\cdot\text{OH}$,以 $\cdot\text{OH}$ 氧化水杨酸钠所得产物的吸光值表示 $\cdot\text{OH}$ 的多少,吸光值越大则 $\cdot\text{OH}$ 越多。3ml 反应液中含 0.15mol/L FeSO_4 , 6mmol/L H_2O_2 , 2mmol/L 水杨酸钠及不同浓度的 BHA、大豆异黄酮甙元、大豆异黄酮甙,最后加入 H_2O_2 启动反应,37℃ 反应 1h,测定 510nm 处的吸光值,吸光值越大则清除 $\cdot\text{OH}$ 效果越好。按下式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

A_0 为不加样品的对照值, A_i 为加样品后的吸光值, A_{0i} 为样品本身的本底值。

1.4.6.3 抑制猪油氧化能力的测定

分别向 50g 新鲜纯猪油中添加大豆异黄酮甙、异黄酮甙元(0.02%, 0.04%)及 BHA(0.02%), 置于 60℃ 恒温烘箱中, 测定猪油 POV 值的变化情况。

1.4.6.4 协同抗氧化能力

分别向 50g 新鲜纯猪油中添加 ① 大豆异黄酮甙(0.02%)② 异黄酮甙元(0.02%) ③ 抗坏血酸(0.04%) ④ 异黄酮甙元(0.02%)+ 抗坏血酸(0.02%) ⑤ 异黄酮甙(0.02%)+ 抗坏血酸(0.02%), 置于 60℃ 恒温烘箱中, 测定猪油 POV 值的变化情况, 考察大豆异黄酮与抗坏血酸是否具有抗氧化协同效应。

1.4.7 大豆异黄酮热稳定性研究

分取一定量大豆异黄酮甙元产品和大豆异黄酮甙产品置于 120℃ 烘箱中热处理 90min 后取出, 按 1.4.6.1 和 1.4.6.2 方法测定其还原能力和清除 $\cdot\text{OH}$ 能力, 考察大豆异黄酮的热稳定性。

2 结果与讨论

2.1 大豆异黄酮的提取方法比较

大豆异黄酮甙是大豆异黄酮的糖甙结合物也是大豆异黄酮在大豆中的主要的存在形式, 分子极性较强, 易溶解于甲醇、乙醇等极性溶剂中。大豆异黄酮甙元是大豆异黄酮甙脱除葡萄糖基后的产物, 分子极性较弱, 易溶解于乙醚等非极性溶剂中。乙醇浸提法是提取异黄酮甙的常用方法, 该方法利用异黄酮甙在一定浓度的乙醇中具有较高的溶解度而将其萃取出来。酸水解法提取则是利用异黄酮甙和甙元在分子极性上的明显不同, 先用非极性溶剂彻底脱除大豆中的低极性物质后(大豆脱脂粕), 在一定条件下将大豆异黄酮甙水解为甙元, 然后用无水乙醚再次选择性的萃取出低极性的大豆异黄酮甙元产品。超临界二氧化碳流体萃取是一种新的分离方法, 它利用超临界二氧化碳流体作萃取溶剂可以从液体或固体物料中实现萃取、分离和纯化物料。该分离方法工艺简单, 能耗低, 萃取溶剂无毒、易回收, 国外已将此分离方法大量用于食品工业和香料工业。由于超临界二氧化碳流体萃取方法具有如上优点, 该方法如能用于大豆中异黄酮类物质的提取则不仅可以简化提取工艺、降低生产能耗, 而且有可能获得高纯度的异黄酮产品。但是超临界二氧化碳流体多用于油脂、香精等低极性物质的萃取, 对异黄酮甙这样具有一定分子极性物质的提取能力如何, 本文也作了相应的初步研究。分别用以上三种方法提取大豆中异黄酮类成分, 提取效果如表 1。

表 1 三种提取方法的比较

提取方法	产品得率(%)	提取率(%)	粗提产品纯度(%)
乙醇浸提法	3.5	35.3	3.5
酸水解提取法	1.32	48.9	10.2
超临界流体萃取	0.55	5.3	3

$$\text{大豆异黄酮提取率} \% = \frac{\text{提取液中异黄酮总量}}{\text{脱脂大豆粕中异黄酮总量}} \times 100\%$$

$$\text{产品得率} \% = \frac{\text{提取得干物质总量}}{\text{脱脂大豆粕用量}} \times 100\%$$

实验结果表明, 常规的有机溶剂浸提法虽然具有相对较高的产品得率, 但提取率和粗提产品纯度均低于酸水解提取法。由于大豆异黄酮甙类成分在大豆中与蛋白质、糖类等物质存在着紧密的结合, 因此用乙醇等有机溶剂直接提取大豆异黄酮甙即使是多次浸提也很难获得较高的提取率, 而酸水解处理后有助于大豆异黄酮物质的释放, 因此酸水解法一次提取就可获得较高的提取率。同时由于酸水解法提取的专一性和选择性强, 提取产品的纯度也远远高于有机溶剂浸提法。实验表明, 超临界二氧化碳萃取法虽然是一种较新的提取方法, 但提取的选择性较差, 对大豆异黄酮甙这样具有一定分子极性的成分萃取能力有限, 产品得率、提取率、产品纯度均较低。

2.2 抗氧化性研究

2.2.1 还原能力、清除 $\cdot\text{OH}$ 能力以及抑制猪油氧化能力
以常用抗氧化剂 BHA 为参照, 分别对大豆异黄酮甙元和大豆异黄酮甙的还原能力、清除 $\cdot\text{OH}$ 能力以及抑制猪油氧化能力进行测定, 结果如图 1、2、3。

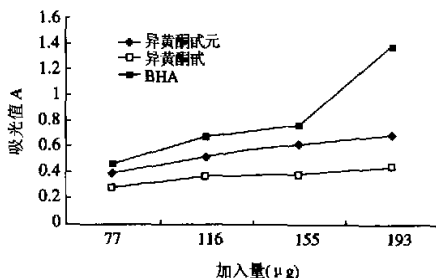


图1 还原能力比较

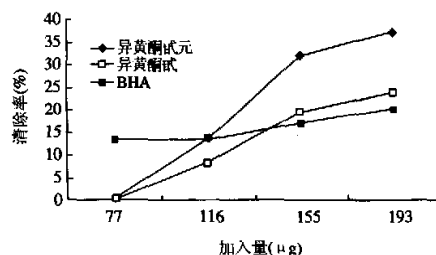


图2 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的比较

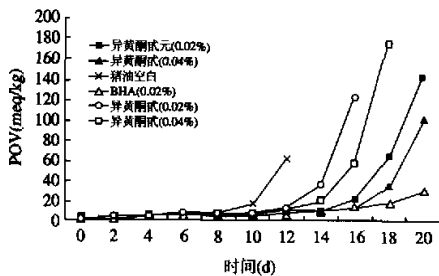


图3 抑制猪油氧化能力测定

实验结果表明,大豆异黄酮甙和甙元均具有一定的还原能力、清除 $\cdot\text{OH}$ 能力和抑制猪油氧化能力,并且甙元的抗氧化能力明显高于异黄酮甙。一般认为多酚类物质上的酚羟基是良好的电子提供者,因此可表现出较好的还原能力、清除自由基能力和中断油脂自动氧化链式反应的能力。大豆异黄酮甙经水解脱除一分子的葡萄糖基后释放出一个游离的酚羟基,因此大豆异黄酮甙元比异黄酮甙表现出更好的抗氧化效能,同时由于甙元为脂溶性成分,在猪油中具有良好的分散性,因此其抑制猪油氧化能力远远高于异黄酮甙。

2.2.2 抗氧化协同效应

大豆异黄酮甙、大豆异黄酮甙元及它们与抗坏血酸的混合物的抑制猪油氧化能力测定结果如图4。

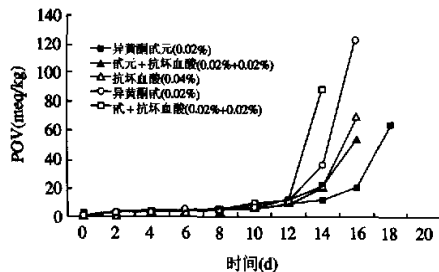


图4 协同抗氧化效应

抗坏血酸是一种常用的抗氧化剂增效剂,其与多种抗氧化剂有协同抗氧化作用。但本实验研究表明,在抑制猪油氧化中,抗坏血酸与大豆异黄酮甙及甙元均没有表现出明显的协同抗氧化效应,相反表现出一定的促氧化作用,具体原因有待进一步研究。

2.3 大豆异黄酮热稳定性研究

表2 热处理前后异黄酮还原能力的比较(吸光值)

异黄酮	添加量(μg)			
	77	116	155	193
异黄酮甙元	0.396	0.526	0.617	0.689
异黄酮甙元(烘)	0.421	0.525	0.610	0.690
异黄酮甙	0.272	0.363	0.385	0.443
异黄酮甙(烘)	0.300	0.379	0.388	0.412

表3 热处理前后异黄酮清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的比较(清除率)

异黄酮	添加量(μg)			
	77	116	155	193
异黄酮甙元	0.95	13.9	32.3	37.4
异黄酮甙元(烘)	1.2	5.6	8.9	15.6
异黄酮甙	0.08	8.4	19.7	23.9
异黄酮甙(烘)	0	3.3	5.0	8.3

大豆异黄酮甙及甙元经 120°C 热处理前后还原能力、清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的比较如表2、3。

结果表明,经 120°C 热处理后,大豆异黄酮甙及甙元的还原能力并无明显变化,而清除 $\cdot\text{OH}$ 能力均有不同程度的下降,说明该温度条件下的热处理对大豆异黄酮的稳定性有一定影响。

3 结论

通过对比乙醇浸提法、酸水解法及超临界二氧化碳流体萃取法提取大豆中异黄酮类物质的提取效果,发现酸水解法由于具有较强的提取专一性和选择性因而提取效果明显好于乙醇浸提法,而超临界二氧化碳流体对大豆异黄酮的提取能力非常有限。同时,酸水解法提取的大豆异黄酮以甙元的形式存在,是易于被人体吸收利用的存在形式^[8],因此该提取方法比常规的有机溶剂浸提法具有更大的实用价值。对大豆异黄酮抗氧化性能的研究表明,大豆异黄酮甙和甙元均具有一定的还原能力、清除 $\cdot\text{OH}$ 能力和较强的抑制猪油氧化能力,并且甙元的抗氧化效果好于异黄酮甙的效果,这与其分子结构的不同有关。热处理对大豆异黄酮的稳定性有一定影响,但异黄酮甙和甙元的稳定性无明显差异。

参考文献:

- [1] 刘颖,等.膳食异黄酮的研究进展[J].解放军预防医学杂志,2000,18(5):384.
- [2] Messina M J, et al. Nutr Cancer, 1994, 21: 113.
- [3] Herman C J. Nutr, 1995, 125: 757.
- [4] 刘大川,汪海波.大豆胚芽中皂甙和异黄酮甙提取工艺研究[J].食品科学,2000,(10).
- [5] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Jpn J Nutr, 1986, 44: 307.
- [6] 翁瑞光. 萝藦甙萃取物于模式系统之抗氧化性[J]. 食品科学(台), 1998, 25(3): 268.
- [7] Smirnov N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. J Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [8] 张玉梅. 大豆异黄酮的生物利用度[J]. 国外医学(卫生学分册), 2001, 28(2).