

# 用清除有机自由基 DPPH 法评价市售 腐乳提取物的抗氧化能力

汪立君<sup>1</sup>, 李里特<sup>1</sup>, 范俊峰<sup>1</sup>, 齐藤昌义<sup>2</sup>

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 日本国际农林水产业研究中心, 筑波市 茨城县 305-8686, 日本)

**摘要:** 用清除 1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)自由基能力表示腐乳提取物的抗氧化能力,并以抗氧化剂( $\alpha$ -生育酚)为当量浓度表示抗氧化的能力大小。中国市售 14 种腐乳的水提取物的抗氧化活性为 2.03~11.93 $\mu$ g  $\alpha$ -生育酚/mg, 50%乙醇提取物的抗氧化活性为 0.75~4.94 $\mu$ g  $\alpha$ -生育酚/mg。14 种腐乳提取物的总抗氧化活性为 2.91~16.87 $\mu$ g  $\alpha$ -生育酚/mg)。贵州的“老干爹”和福建的“米酱豆腐乳”均显出最大的活性。

**关键词:** 1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH); 腐乳; 抗氧化性

## Antioxidative Activity Evaluation Study on Fermented Tofu Extracts by Scavenging DPPH

WANG Li-jun<sup>1</sup>, LI Li-te<sup>1</sup>, FAN Jun-feng<sup>1</sup>, Qi<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Japan International Agriculture Forest Research Center, Cicheng 305-86, Japan)

**Abstract:** The antioxidative activity of fermented tofu extracts was determined by the capacity of scavenging 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical, and the evaluated unit was expressed as the equivalent concentration of  $\alpha$ -tocopherol. After extraction, the antioxidative activities of 14 brands of fermented tofu from the markets were determined. The antioxidative activity units of water extracts from the 14 brands were from 2.03 to 11.93 $\mu$ g  $\alpha$ -tocopherol/mg, and those of 50% ethanol extracts were from 0.75 to 4.94 $\mu$ g  $\alpha$ -tocopherol/mg. The antioxidative activity units of total extracts from the 14 brands were from 2.91 to 16.87 $\mu$ g  $\alpha$ -tocopherol/mg. The brand of LaoGanDie from Guizhou and the brand of MiJiangFuRu from Fujian showed the highest activity units in all samples.

**Key words:** 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); fermented tofu antioxidative activity

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)09-0169-04

收稿日期: 2004-02-18

作者简介: 汪立君(1975-), 女, 讲师, 博士生, 研究方向为食品科学与营养。

料作为职业劳保物质加以推广应用。

### 参考文献:

- [1] 刘刚, 陆劲松. 茶多酚对肿瘤防治作用的研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2002, 12(3): 265-268.
- [2] 那常筠, 陈力, 王秀玲. 镍冶炼工人肺癌流行病学研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1993, 11(5): 261-264.
- [3] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Experimental Cell Research, 1988, 175: 184-191.
- [4] Sunderman FW, Morgan LG, Andersen A, et al. Histopathology of sinonasal and lung cancers in nickel refinery worker[J]. Ann Clin Lab Sci, 1989, 19(1): 44-51.
- [5] 周晓. 镍化合物的致癌机制[J]. 国外医学卫生学分册, 1996, 23(3): 129-132.
- [6] Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cell[J]. Biophys Res Commun, 1984, 123: 291-298.
- [7] Nie GJ, Jin CF, Cao YL, et al. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Arch Biochem Biophys, 2002; 397: 84-90.

我国传统的大豆制品包括经微生物发酵制成的各种发酵制品,如酱油、豆酱、豆豉、腐乳和发酵豆乳饮料等。这些发酵豆制品不仅营养丰富,而且还含有许多具有生理功能作用的活性物质。现代研究表明大豆发酵食品具有抗癌、溶解血栓、降血压、抗氧化、抗菌等生理功能。最近,食品的生理保健功能越来越受到重视,特别是食品的抗氧化功能。大豆及大豆制品中含有多种抗氧化成分,除少量的生育酚和维生素C外,大豆中含有的黄酮类和酚酸类化合物,以及在发酵过程中产生的多肽类和褐色色素类物质等都具有抗氧化的活性。

许多的研究证明,大豆发酵制品比没发酵之前显示更强的抗氧化活性<sup>[1]</sup>。Joan-Hwa Yang et al.<sup>[2]</sup> (2000) 研究表明发酵的大豆汁 (Fermented Soybean Broth) 比没发酵的显示更强的对1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)自由基的清除作用。Esaki.H<sup>[3]</sup> (1994) 报告了日本豆酱(miso)、纳豆(natto)和天贝(tempeh)在发酵过程中产生了抗氧化的成分。而对我国的发酵大豆制品的抗氧化活性的研究还很少。

腐乳是我国具有民族特色的传统大豆发酵制品,是由豆腐坯经微生物(霉菌或细菌)发酵而成的。各地人民依据自己的不同口味,形成了各具地方特色的传统产品。

根据腐乳的分类和产地,调查了中国具有代表性的腐乳14种,用清除有机自由基1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH)法,对它们的抗氧化活性进行了评价。通过本项研究,可以揭示腐乳作为功能性食品深度利用的可能性,也有助于改善其加工过程,进而生产高生理活性的腐乳,也有望从腐乳中开发高活性物质。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料和试剂

14种的腐乳样品分别购于各地超市(品牌,产地见表2)。有机自由基1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH),美国Sigma公司;抗氧化剂 $\alpha$ -生育酚( $\alpha$ -Tocopherol),日本Wako公司;2-(N-吗啉代)乙基磺酸(MES),美国Sigma公司;

其他试剂为分析纯。

### 1.2 实验仪器

紫外可见分光光度计(1240) 日本Shimadzu公司;多用振荡器(MS-1) 日本Shimadzu公司;台式离心机(TCL-16C) 上海安亭仪器厂。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品的预处理

将购得的腐乳样品,分别去除汤汁和外表面,取腐乳块中间固体状部分,真空冷冻干燥、磨碎、用正己烷脱脂后,置于瓶中密闭备用。

#### 1.3.2 提取液的制备

取上述处理过的样品各0.24g加入6ml(40mg样品/ml)的蒸馏水,在室温下浸提1h,并间歇振荡。将其在3000r/min下,离心10min,上清液过滤(0.45 $\mu$ m)后,作为提取液备用。将沉淀再加入6ml,50%的乙醇,重复上述步骤,得到上清液备用。

#### 1.3.3 抗氧化活性的测定

有机自由基DPPH消去能力的测定参照须田郁夫<sup>[5]</sup>的方法进行修改。利用DPPH溶液的特征紫红色团的吸收峰,以分光光度法测定加入不同浓度的抗氧化剂或待测样品后OD<sub>520</sub>吸收的下降表示其对有机自由基的清除能力。

待测样品溶液的配制:取上述各样品的提取液1.5ml,加入1.5ml 0.2mol/L MES缓冲液和3.0ml乙醇混合作为待测样品;200 $\mu$ mol/L DPPH溶液的配制:400 $\mu$ mol/L DPPH/无水乙醇溶液和0.2mol/L MES缓冲液(pH6.0)混合;按表1进行加样,混合均匀,于室温下放置20min,然后在520nm下测定其吸光值。每一吸光值平行测三次,取其平均值。

以抗氧化剂 $\alpha$ -生育酚为标准,按表1的添加量做出标准曲线。样品的抗氧化活性以清除有机自由基DPPH的能力的当量浓度表示为 $\mu$ g  $\alpha$ -生育酚/mg样品。

表1 DPPH 实验加样表

	0.2mmol/L的 $\alpha$ -生育酚(ml)	50%的乙醇溶液(ml)	200 $\mu$ mol/L DPPH溶液(ml)
标准曲线	0	1.2	1.2
	0.1	1.1	1.2
	0.2	1.0	1.2
	0.4	0.8	1.2
	0.8	0.4	1.2
	待测样品(ml)	50%的乙醇溶液(ml)	200 $\mu$ mol/L DPPH溶液(ml)
待测样品	0	1.2	1.2
	0.1	1.1	1.2
1~14	0.2	1.0	1.2
	0.4	0.8	1.2
	待测样品(ml)	50%的乙醇溶液(ml)	蒸馏水或50%的乙醇溶液(ml)
待测样品	0.1	1.1	1.2
1~14	0.2	1.0	1.2
(对照)	0.4	0.8	1.2

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 标准曲线的建立和抗氧化活性的计算

按表1的 $\alpha$ -生育酚的添加量做出标准曲线,如图1所示。 $\alpha$ -生育酚的浓度和OD<sub>520</sub>值有非常好的线性关系,相关系数R<sup>2</sup>=0.9976,得到的标准曲线方程为:

表2 14种中国市售腐乳提取物的抗氧化能力

腐乳名称及品牌	生产厂家	颜色	μg α - 生育酚/mg		
			水提取物	50% 乙醇提取物	总提取物
云林	云南石林酱菜厂	红色	3.73	2.71	6.44
一条龙风味油卤腐	云南昆明一条龙卤腐厂	红色	3.95	2.71	6.67
红方腐乳(绍兴牌)	浙江绍兴百草园食品有限公司	红色	2.07	1.64	3.72
醉方腐乳(绍兴牌)	浙江绍兴百草园食品有限公司	白色	2.15	0.75	2.91
桂林腐乳(花桥牌)	广西壮族自治区桂林腐乳厂	红色	2.03	1.63	3.67
桂林腐乳(花桥牌)	广西壮族自治区桂林腐乳厂	白色	4.07	2.81	6.88
克东	黑龙江克东腐乳有限公司	红色	5.02	2.77	7.80
香辣腐乳(珍极牌)	河北石家庄珍极酿造集团有限责任公司	红色	5.76	3.01	8.77
大块腐乳(王致和)	北京王致和食品集团有限公司	红色	5.08	2.87	7.95
红油腐乳(老干爹)	贵州老干爹食品有限公司	酱色	7.31	3.99	11.30
米酱豆腐乳(富记牌)	福建省莆田台富食品有限公司	酱色	11.93	4.94	16.87
广合腐乳	广东开平广合腐乳有限公司	白色	4.09	2.95	7.05
腐乳皇(美味源)	广州美味源食品厂	白色	4.36	2.93	7.29
五香(海会寺)	四川成都市大王酿造食品有限公司	白色	2.28	3.12	5.40

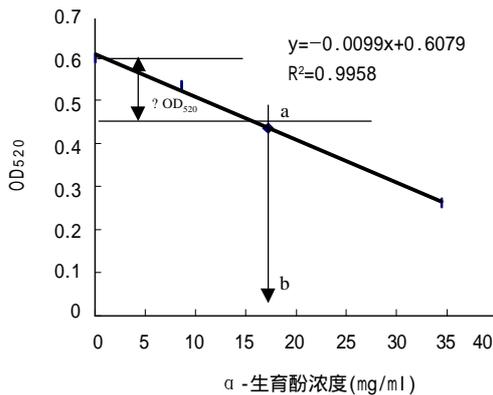


图1 标准曲线(α-生育酚浓度与OD<sub>520</sub>的关系)

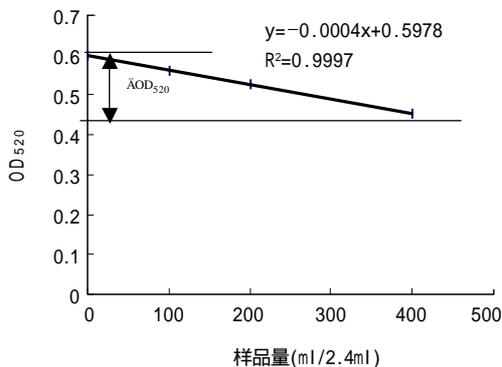


图2 某一样品的不同添加量与吸光值(OD<sub>520</sub>)之间的关系

$y = -0.0099x + 0.6079$ 。这一结果与彭长连<sup>[4]</sup>的研究结果一致, 抗氧化剂的浓度与清除 DPPH 能力呈显著线性相关关系。

样品抗氧化活性的当量浓度换算。采用比色法,

通过溶液颜色的变化, 可了解加入样品后剩余 DPPH 的含量。为了消除待测样品本身的颜色影响, 按表 1, 扣除对照实验。以某一样品为例。按表 1 的样品添加量, 做出图 2, 从图 2 可以看出, 不同的样品添加量(即不同的样品浓度)与吸光值呈很好的线性关系, 同时也表达出样品对 DPPH 自由基消去功能的量效关系。在图 2 上计算出  $\Delta OD_{520}$  值, 在图 1 的标准曲线上找到 a 点, 再相应由标准曲线方程计算出 b 点的值, 将其值表示为  $\mu\text{g } \alpha\text{-生育酚/mg 样品}$ 。

## 2.2 14 种市售腐乳的抗氧化活性及比较

如表 2 中所示, 所有的样品都表现出了抗氧化的活性。各地腐乳的抗氧化活性显示出很大的差别。腐乳的水提取物的抗氧化活性为 2.03~11.93  $\mu\text{g } \alpha\text{-生育酚/mg}$ , 腐乳的 50% 的乙醇提取物的抗氧化活性为 0.75~4.94  $\mu\text{g } \alpha\text{-生育酚/mg}$ 。腐乳提取物的总抗氧化活性为 2.91~16.87  $\mu\text{g } \alpha\text{-生育酚/mg}$ 。在这两种提取物中贵州的“老干爹”和福建的“米酱豆腐乳”均显出最大的活性, 并且这两种腐乳均是酱色。

一些蔬菜和鱼类中含有大量的具有抗氧化和清除自由基的成分。据报导中国卷心菜和大白菜中都显示出较强的清除自由基的活性, 分别相当于 0.75、0.25  $\mu\text{g } \alpha\text{-生育酚/mg}$  (鲜重)<sup>[6,7]</sup>。鱼类大多数的活性范围在 0.25~2  $\mu\text{g } \alpha\text{-生育酚/mg}$  之间(鲜重)<sup>[8]</sup>。因此我们可以认为腐乳提取物中有较强的清除 DPPH 自由基活性的物质。这些活性物质可能是大豆本身所具有的, 有的可能是在腐乳发酵过程中产生的, 例如异黄酮形式的转化, 以及大豆多肽的产生等。

Esaki .H<sup>[9]</sup>(1994)研究结果证明了在日本豆酱(miao)和

天贝 (tempeh) 中起抗氧化作用的主要物质是黄豆甙元 (daidzein) 和染料木黄酮 (genistein)。这两种的异黄酮都是在他们的发酵过程中由相应的糖甙: 大豆甙 (daidzin) 和染料木甙 (genistin) 产生的。张晓峰<sup>[9]</sup> (2002年) 的研究证明, 腐乳在发酵过程中, 大豆异黄酮由糖甙向甙元转化, 在发酵结束时, 几乎所有的糖甙形式转化了甙元的形式。Hirota A<sup>[10]</sup> (2000) 报告在日本豆酱 (miso) 中 8-hydroxydaidein (8-OHD) 和 8-hydroxygenistein (8-OHG) 对 DPPH 自由基的清除作用与维生素 E 相当。由以上的研究可以推测, 在腐乳的发酵过程中, 产生了对 DPPH 自由基清除作用的异黄酮形式。而且, 大豆异黄酮除了甙元的形式溶于水外, 其他的形式大多不溶于水, 而溶于醇类、酯类和酮类等。

Yasuda<sup>[11]</sup> 的研究认为在日本腐乳主要由大豆蛋白的 11S 碱性亚基和分子量在 11~15kDa 的多肽组成。而范俊峰<sup>[12]</sup> 的研究证明用胃蛋白酶水解的大豆分离蛋白, 得到的多肽混合物具有很强的清除 DPPH 自由基作用, 达到 3.21 μg α-生育酚 /mg 大豆分离蛋白。我们已经证明腐乳中的多肽具有清除 DPPH 自由基作用<sup>[13]</sup>。因此在腐乳发酵过程中产生的多肽具有一定的抗氧化的作用。

生产工艺的不同有可能是造成腐乳抗氧化活性不同的主要原因。腐乳提取物中起抗氧化活性的物质可能是异黄酮和多肽。对提取物中起抗氧化活性的物质还有待进一步的分离和鉴定, 从而改善腐乳的加工工艺, 生产出高抗氧化活性的腐乳。

#### 参考文献:

- [1] Fukushima D. Recent progress in research and technology on soybean [J]. Food Sci Technol Res, 2001, (7): 8-16.
- [2] Yang JH, Mau JL, Ko PT. Antioxidant properties of fermented soybean broth [J]. Food Chemistry, 2000, 71: 249-254.
- [3] Esaki H, Onozaki H, Osawa T. Antioxidative activity of fermented soybean products [C]. Food Phytochemicals for Cancer Prevention I Acs Symposium Series, 1994, 546: 353-360.
- [4] 彭长连, 陈少薇, 林植芳, 等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 658-661.
- [5] Shinohara K, Suzuki T, Kaminogaw S. The methods of food functions analysis [M]. Korin, Japan, 2000. 218-220.
- [6] Bors W, Saran M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants [J]. Free Radical Res Commun, 1987, (2): 289-294.
- [7] Hertog, MGL, Feskens, et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study [J]. Lancet, 1993, 342: 1007-1011.
- [8] Khanum MN, Yamaguchi T, Hiroishi, S, et al. Radical-scavenging activity of fish and fishery products [J]. Food Sci Technol Res, 1999, 5(2): 193-199.
- [9] 张晓峰, 李里特, 李再贵, 等. 腐乳发酵过程中大豆异黄酮变化的研究 [J]. 中国酿造, 2002, 122(6): 17-20.
- [10] Hirota A, Taki S, Kawaii S, et al. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell lines [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2000, 64(5): 1038-1040.
- [11] Yasuda M, Matsumoto T, Sakaguchi M, et al. Changes in protein and nitrogen compounds of tofuyo prepared by *Aspergillus oryzae* during fermentation [J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1994, 41(3): 184-190.
- [12] 范俊峰. 大豆蛋白抗氧化多肽及降血压多肽的研究 [D]. 北京: 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 2003. 14.
- [13] Wang L, J Saito, M Tatsumi, et al. Antioxidative and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of sufu (fermented tofu) extracts [J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2003, 37, 129-132.



## 俄罗斯市场蘑菇需求量增加

作为俄罗斯人喜爱的传统食品, 目前蘑菇在俄罗斯市场上的需求量正快速增加。

俄罗斯居民认为, 蘑菇含有多种矿物质、维生素和植物性营养素, 是最容易被人体吸收的蛋白质来源, 有助于提高人体免疫力和增加抗病能力。

目前俄罗斯市场上 80% 的蘑菇产品依靠进口, 货源主要来自波兰、比利时、荷兰和中国。近 5 年来, 俄国已经开始人工蘑菇培植, 产量也增加了将近 40%, 但仍然跟不上快速上升的需求。

据统计, 2003 年俄罗斯的蘑菇需求量为 50 万吨, 冷冻蘑菇的消费量为 1.5 万吨。