

# 储藏温度与时间对大豆子粒中异黄酮含量的影响

孙君明 韩粉霞 丁安林

(中国农业科学院作物育种栽培研究所,农业部作物遗传育种重点开放实验室,北京 100081)

**摘要** 以异黄酮含量显著不同的6个大豆品种为材料,采用高效液相色谱(HPLC)技术研究三种储藏温度(室温、4℃和-10℃)条件下不同储藏时间对大豆异黄酮含量的影响。结果显示,不同大豆种子随着储藏时间的增加异黄酮含量逐渐降低,储藏一年后平均降低57.1%,以丙二酰基异黄酮组分降低为主,且达显著水平。储藏温度对大豆种子中异黄酮含量的影响不显著。常温下储藏的大豆种子异黄酮含量有偏高的趋势,且不同品种的表现有所不同。

**关键词** 大豆(*Glycine max* Merri.);子粒;异黄酮;储藏条件

**中图分类号** S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2004)04-0245-04

大豆异黄酮是大豆体内特别是种子中积累的一类次生代谢产物。早期发现它是引起大豆食品苦涩味的主要因子之一<sup>[1]</sup>,但最近研究证实它又具有特殊的生物效能,如:能有效的限制病原微生物的生长<sup>[2]</sup>、抗虫害<sup>[3]</sup>、诱导大豆结瘤<sup>[4]</sup>、抑制人和动物肿瘤细胞的繁殖<sup>[5]</sup>等重要的活性,其广泛的应用前景受到人们的普遍关注。由此可见,深入研究大豆种子中异黄酮的含量变化,为有目的控制异黄酮含量,具有十分重要的意义。

大豆异黄酮在不同大豆品种中含量显著不同。在大豆种子中的总含量变化范围为0.4%~5%,在下胚轴中含量相当丰富,子叶中相对较低,种皮中的含量最低<sup>[6]</sup>;在发育的幼苗中,以子叶中的含量最高,叶片和根中含量很低<sup>[7]</sup>。大豆异黄酮在种子中的积累受多种内外因素的影响:包括光、温、水分、地理环境<sup>[8]</sup>等。Tsukamoto(1995)对2个不同纬度条件下的大豆品种的异黄酮含量变化进行了研究,指出温度影响种子中异黄酮的积累<sup>[9]</sup>。本文以异黄酮含量显著不同的大豆品种为材料,研究大豆种子在不同储藏条件下异黄酮含量的变化关系,为异黄酮含量调控提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

试验选用的异黄酮含量有显著差异的6个大豆(*Glycine max* (L) Merri.)品种,包括异黄酮水平较低的品种3个(楚秀、灌县穿心绿和南汇早黑豆)和异黄酮水平较高的3个(中豆27、张家口黑豆和鲁黑2号)。其中中豆27是中国农科院作物育种与栽培研究所培育,南汇早黑豆、淮豆1号、鲁黑2号、吉林3号和张家口黑豆由中国农科院作物品种资源研究所提供,楚秀引自江苏淮阴地区农科所。

### 1.2 试验方法

将大豆种子分别放置于三种温度(常温、4℃和-10℃)条件下,每温度下设置二种储藏时间(半年和一年),每处理三重复。在储藏开始、半年和一年时分别测定各品种子粒中异黄酮含量。

### 1.2 异黄酮提取及含量测定

异黄酮提取:将大豆种子研磨成粉末,按4ml/100mg的比例加入80%的乙醇提取,室温混匀静置1-2h,转入1.5ml离心管中,4℃下16000g离心15min,将上清液移入液谱专用小瓶中封口,4℃下保存待测。

· 收稿日期:2004-03-20

基金项目:国家“863”计划(2001AA241061,2001AA211041)和国家自然科学基金资助项目(30000107)

作者简介:孙君明(1972-),男,在职博士,副研究员,研究方向大豆优质基因分子标记及辅助育种。Tel:010-68918780;Fax:010-68975212;E-mail:sunjm@mail.caas.net.cn

**异黄酮检测:**用岛津高效液相色谱仪(LC-6A)系统定性定量测定样品中的异黄酮。分析条件包括:色谱柱:150mm×4.9mm C18 HICHROM 316A-LOK(UK);流动相:含5%乙酸的25%的甲醇水溶液;流速:1ml/min;检测波长:254nm;柱温:50℃;进样量:10ml;分析时间:20min/样品。

**异黄酮标样:**大豆甙(daidzin)和染料木甙(genistin)由日本筑波农研中心喜多村(Kitamura)博士提供,其他标样购自Sigma公司。样品根据标样的保留时间定性,根据标准峰面积定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆子粒中异黄酮主要组分分布

利用HPLC技术对6个大豆品种进行异黄酮含量检测,均可清晰洗脱出6种不同异黄酮组分峰型,分别为daidzin(D)、glycitin(GL)、genistin(G)、malonyldaidzin(MGD)、malonylglycitin(MGL)和malonylgenistin(MGG)。各组分中以丙二酰基

(Malonyl)异黄酮含量最高,占总含量的67.8%—84.4%,而以异黄酮甙形式存在的较少(15.6%—32.2%),且不同品种其组分含量分布有所不同。如:在常温储藏半年条件下,高异黄酮含量的鲁黑豆2号丙二酰基异黄酮含量占总含量的80.6%,而低异黄酮含量的南汇早黑豆丙二酰基异黄酮含量仅占67.8%。

### 2.2 储藏温度对异黄酮总含量的影响

储藏温度对大豆种子中异黄酮总含量的影响差别不显著(表1)。在储藏半年情况下,常温储藏条件下的大豆种子平均异黄酮总含量最高,-10℃条件下次之,4℃条件下最低;在储藏一年情况下,同样是常温下大豆种子平均异黄酮总含量最高,而在4℃和-10℃条件下异黄酮总含量降低幅度相当;但不同品种的表现有所不同,如:鲁黑豆2号和南汇早黑豆在常温下储藏半年后,异黄酮总含量高于低温(4℃和-10℃)下;而储藏一年后,低温条件下的异黄酮总含量高于常温下。总体上常温储藏条件下的大豆种子异黄酮总含量有偏高的趋势。

表1 不同储藏温度对不同品种异黄酮总含量的影响

Table 1 Effect of various temperatures on the isoflavone content in different soybean varieties

品种 Cultivars	储藏前		储藏半年		储藏一年		
	Before storage		Half year after storage		One year after storage		
	常温 RT*	常温 RT	4℃	-10℃	常温 RT	4℃	-10℃
楚秀 Chuxiu	3686.3	3610.6	3477.0	3353.9	1581.8	1384.5	1593.4
南汇早黑豆 Nanhuizaohaidou	2512.2	2564.7	1746.4	2204.9	856.1	929.0	1372.9
灌县穿心绿 Guanxiancuanxinlu	2172.6	1684.9	1593.8	1841.3	981.6	838.7	916.4
张家口黑豆 Zhangjiakouhaidou	5771.3	4091.9	3470.8	3980.4	2563.3	2144.7	2213.7
中豆 27 Zhongdou No. 27	5368.8	3550.3	3903.9	3709.4	2430.6	2191.4	1919.7
鲁黑豆 2号 Luheidou No. 2	6750.2	6125.6	5526.2	5503.2	3095.5	3512.1	2963.2
平均含量 Average content	4376.9a#	3604.7ab	3286.4ab	3432.2ab	1918.2b	1833.4b	1829.9b

注: \* RT表示常温; # 0.05显著水平。

Note: \* RT represented the room temperature. # Significant level of 0.05

### 2.3 储藏时间对异黄酮总含量的影响

在常温储藏条件下,大豆种子随着储藏时间的增加异黄酮总含量逐渐降低,储藏一年后平均降低57.1%(图1)。但各品种的降低幅度各不相同,低含量水平的3个大豆品种降低幅度较大(59.3%),尤以南汇早黑豆降低的最大(65.9%);高含量水平的降低较小(54.8%),鲁黑豆2号降低的最小(54.1%)。另外,储藏时间不同异黄酮总含量的降低的速度也不同,储藏半年的大豆种子中的异黄酮总含量降低较少,平均仅为12.9%,且以低含量水平的降低最少;而储藏一年的大豆异黄酮总含量平均降低达57.1%,且达到了显著水平(表1)。

### 2.4 储藏过程中异黄酮主要组分含量的变化

在储藏过程中各品种异黄酮组分含量变化是不同的,以丙二酰基异黄酮组分(MGD、MGL和MGG)含量降低的幅度最大,储藏一年后平均降低达60.6%,而异黄酮甙(D、GL和G)组分含量降低幅度较小,仅为46.2%(图2)。不同品种各组分降低幅度也是不同的,如:在-10℃条件下储藏一年以后,高异黄酮含量的中豆27的丙二酰基异黄酮组分总含量降低幅度达67.3%,而异黄酮甙降低仅47.7%;低异黄酮含量的南汇早黑豆的丙二酰基异黄酮组分总含量降低幅度为47.1%,而异黄酮甙降低仅38.4%。

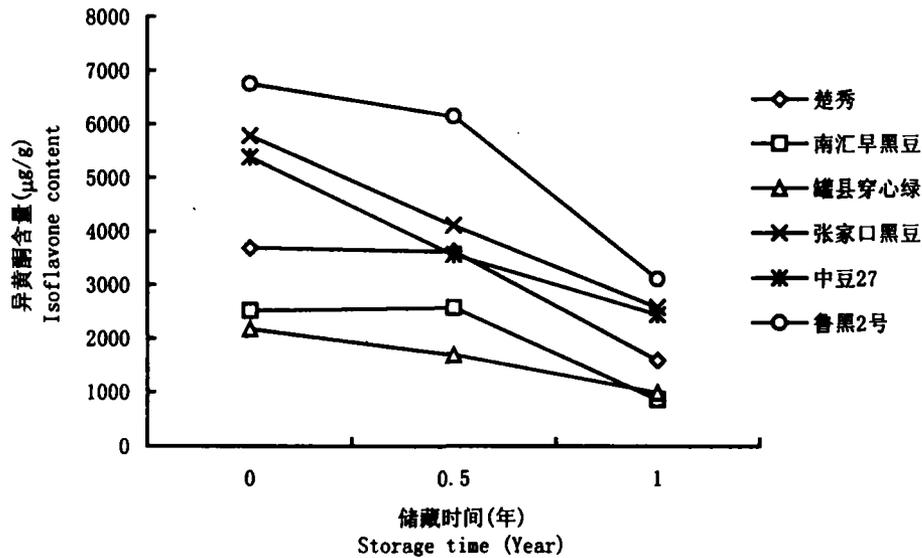


图1 不同大豆品种在常温下的异黄酮总含量的变化

Fig. 1 Change of total isoflavone content at the room temperature in various varieties

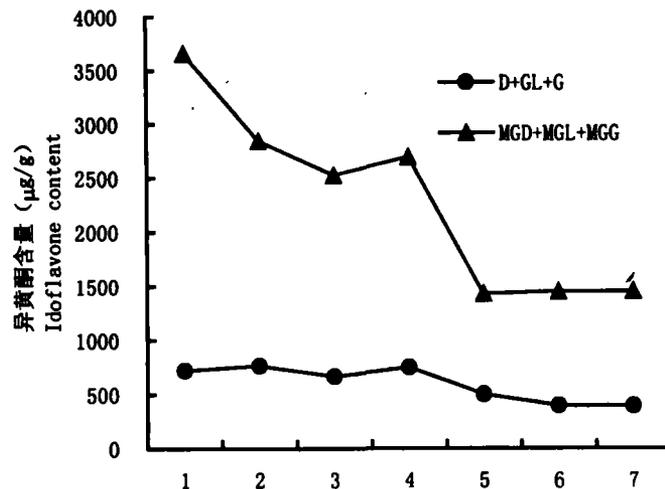


图2 储藏过程中异黄酮组分含量变化

1. 储藏前; 2. 室温储藏半年; 3. 4℃储藏半年; 4. -10℃储藏半年; 5. 室温储藏一年; 6. 4℃储藏一年; 7. -10℃储藏一年;

Fig. 2 The change of isoflavone content of compositions in the storage stage

1. Before storage; 2. Storage at room temperature for half year; 3. Storage at 4℃ for half year; 4. Storage at -10℃ for half year; 5. Storage at room temperature for one year; 6. Storage at 4℃ for one year; 7. Storage at -10℃ for one year.

### 3 讨论

大豆异黄酮是大豆体内积累的一类次生代谢产物。其合成来自前体苯丙氨酸 (phenylalanine), 经苯丙氨酸裂解酶 (PAL)、香豆酸 CoA 连接酶 (4CL)、苯基苯乙烯酮合成酶 (CHS)、苯基苯乙烯酮异构酶 (CHI)、异黄酮还原酶 (IFR) 等酶催化合成异黄酮<sup>[10]</sup>。这些酶的含量和活性受到多种内外因素的调节, 因而引起异黄酮在植物体内的含量和分布相当复杂。本文作者检测了几百份中国大豆种质资源的异黄酮含量, 发现种质间存在遗传差异<sup>[11]</sup>, 且

受环境因素影响也较大<sup>[8]</sup>。本文研究了 6 个不同大豆品种在储藏期间的异黄酮含量变化, 同样发现品种间异黄酮含量与分布的差异。

大豆在储藏过程中随着储藏时间的增加, 种子的活性将逐渐降低, 特别是一年以后种子的生活力将明显降低, 到达第二年后种子的发芽率大大受影响<sup>[12]</sup>。大豆异黄酮在种子中的含量变化规律与其相似, 种子在储藏半年时, 其异黄酮含量降低较少, 而储藏一年时, 其异黄酮含量大大降低, 这可能说明种子中的异黄酮含量与种子的活力有关, 有待于进一步的研究加以证实。

本研究中无论大豆种子储藏半年还是一年时其

异黄酮含量总体上表现为在常温下比低温(4℃和-10℃)下降低较少,这可能因异黄酮作为植物体内的防御因子,在逆境条件下分解相应的异黄酮产生抗寒反应所致。另外,在各单一组分中以丙二酰基异黄酮含量随储藏时间增加而降低幅度较大,而异黄酮甙降低幅度较小,这可能因丙二酰基异黄酮不稳定,易于分解成异黄酮甙或配糖体形式所致<sup>[13]</sup>,以上推论需经进一步研究证实。

## 参 考 文 献

- 1 Huang AS, Hsieh OAL, Chang SS. Characterization of the non-volatile minor constituents responsible for the objectionable taste of defatted soybean flour [J]. J. of Food Sci. 1981,47,19-23
- 2 Liu SH, Norris DM, Hartwig EE et al. Inducible phytoalexins in juvenile soybean genotypes predict soybean looper resistance in the fully developed plants [J]. Plant Physiol. 1992,100,1479-1485
- 3 Morris PF, Savard ME, Ward EWB. Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophthora megasperma f. sp. glycines* [J]. Physiol. Mol. Plant Pathol., 1991,39,229-244
- 4 Kossiak RM, Bookland R, Barkei J. et al. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common in nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max* [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987,84,7428-7432
- 5 Coward L, Barnes NC, Setchell KDR. et al. Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates, antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets[J]. J. Agric. Food Chem. 1993,41,1961-1967
- 6 Kudou S, Fleury Y, Welte, D. et al. Malonyl isoflavone glucosides in soybean seeds (*Glycine max* Merri) [J]. Agric. Biol. Chem. 1991, 55(9), 2227-2233
- 7 孙君明,丁安林.光照对大豆幼苗组织中异黄酮含量和分布的影响[J].植物学报, 1998, 40(11),1015-1021
- 8 孙君明,丁安林.地理环境对大豆种子中异黄酮积累的影响趋势[J].大豆科学,1997,16(4),298-303
- 9 Tsukamoto C, Shimada S, Igita K. et al. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds; Changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperature during seed development [J].J. Agric. Food. Chem. 1995,43,1184-1192
- 10 Cosio EG, Weissenböck G, McClure JW. Acifliorfen - induced isoflavonoids and enzymes of their biosynthesis in mature soybean Leaves. Plant Physiol. 1985, 78, 14-19
- 11 孙君明,丁安林,常汝镇,等.中国大豆异黄酮含量的初步分析[J].中国粮油学报,1995,10(4),51-54
- 12 考德威尔 BE,大豆的改良生产和利用[C].吉林省农业科学院等译 1982,242-246
- 13 孙君明,丁安林,东惠茹.高效液相色谱(HPLC)技术检测大豆异黄酮含量[J].大豆科学,2000,19(1),15-20

## EFFECT OF STORAGE TEMPERATURE AND TIME ON THE ISOFLAVONE CONTENT IN SOYBEAN SEEDS

Sun Junming Han Fenxia Ding Anlin

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Beijing, 100081)

**Abstract** Six soybean varieties with different isoflavone content were studied in various storage temperature (Room Temperature, 4℃ and -10℃) and storage time (Half year and one year) for the change of isoflavone content in this study. Results showed that the isoflavone content was gradually decreasing with the increase of storage time, decreased 57.1% of total content at average level after one-year storage, which the malonyl isoflavone was mainly decreased, and reached significant level. The change of isoflavone content was also affected by storage temperature, but not reached significant level. There was an increasing trend of isoflavone content at the storage condition of room temperature, and the performance of isoflavone content was different in various varieties.

**Key words** Soybean (*Glycine max* Merri.); Seeds; Isoflavone; Storage condition