

# 大豆异黄酮提取条件和大豆蛋白质分离工艺研究<sup>\*</sup>

胡卫新<sup>1</sup> 王晓磊<sup>2\*</sup> 张 洁<sup>3</sup>

(1. 中国矿业大学化工学院, 江苏 徐州 221008; 2. 上海旭龙农业科技有限公司, 上海 200063;  
3. 中国矿业大学环测学院, 江苏 徐州 221008)

**摘要** 以豆粕为原料,以总大豆异黄酮为目标产物,用正交试验设计研究了用乙醇提取大豆异黄酮的较优条件,70%(V/V)乙醇,固液比(豆粕:溶剂)1:10(W/V),70℃下提取3次,每次回流时间1.5h。在室温下,采用盐析和等电点沉淀工艺分离除去提取液中的大豆蛋白质。试验表明,pH值在 $4.1\pm 0.1$ 下,加入3.0%(m/v)的 $ZnCl_2$ ,大豆蛋白质的分离除去率最高。

**关键词** 豆粕;大豆异黄酮;蛋白质;HPLC

中图分类号 R 151.3 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)01-0026-04

大豆异黄酮(soybean isoflavones ISO)是大豆生长过程中形成的一类次生代谢产物。研究表明,大豆异黄酮与生物体内天然雌激素和雌激素抗体结构相似,能够竞争性地结合到雌激素受体上,有效调节人体内雌激素水平,降低与雌激素有关的疾病如癌症、骨质疏松症、心血管疾病和女性更年期综合症等,是一种很有前途的保健药和中药<sup>[1,2]</sup>。

大豆异黄酮是一类生物类黄酮,主要是指以3-苯并呋喃酮为母核的化合物。目前发现大豆中的异黄酮共有12种,分为游离型的甙元(Aglycone)(占总量2%-3%)和结合型的糖甙(Gluconside)(占总量97%-98%)两类<sup>[3]</sup>,后者经酸或 $\beta$ -葡萄糖苷酶催化水解能转化成游离型的甙元而发挥生理活性功能<sup>[2]</sup>。

我国大豆资源丰富,为大豆异黄酮的开发利用提供了自然条件,但是由于异黄酮在大豆中的相对含量很低(0.1%-0.5%),而大豆中蛋白质的含量较高(>40%),使大豆异黄酮的分离纯化较困难。本文以总大豆异黄酮为目标产物,以豆粕为原料,研究大豆异黄酮的提取和大豆蛋白质的分离条件,并对其分离机理进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆豆粕,徐州市丰裕科技饲料有限公司;Daidzin、Glycitin、Genistin、Daidzein、Glycitein 和 Genistein 对照品,中国药品生物制品鉴定所;化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

Shimadzu LC-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津);旋转蒸发器(RE-52,上海亚荣生化仪器厂);800型离心沉淀器(4000r/min);Orion828型pH测试仪;Elementar Vario EL元素分析仪等。

### 1.3 大豆异黄酮的提取

将200g干燥豆粕装入1000mL三口烧瓶,以体积分数为70%-90%乙醇为溶剂,在索氏提取器中60℃~70℃下重复提取3次,乙醇用量为浸没豆粕,每次提取时间1.0h~2.0h。提取液过滤,合并混匀滤液。在室温和pH $4.5\pm 0.1$ 下,加入无机盐,静置分层,使大豆蛋白质盐析沉淀除去。分层后的上清液在4000r/min下离心15min。上机测定大豆异黄酮和大豆蛋白质的量。

### 1.4 分析方法

1.4.1 大豆异黄酮测定:HPLC法。

1.4.2 蛋白质(N $\times 6.25$ )测定<sup>[4]</sup>:凯氏定氮法;(N)元素分析法,用水溶性氮指数(NSI)表征。

1.4.3 碳水化合物测定:费林氏定容法<sup>[5]</sup>(以转化糖计)。

1.4.4 脂肪测定:索氏抽提法<sup>[5]</sup>。

\* 收稿日期:2004-06-03

作者简介:胡卫新(1977-),男,硕士研究生,主要从事精细化学品分离的研究。电话:0516-2874282;E-mail:hwx97@163.com

1.5 色谱条件

色谱柱, Hypersil ODS2(150mm×4.6mm ID, 5 $\mu$ m); 流动相, 甲醇 : 水 : 乙酸体积比为 45 : 54 : 1; 检测器, SPD - 10A, 波长 263nm; 流速, 1.0mL / min; 进样量, 10 $\mu$ L。

2 结果与讨论

2.1 豆粕主要成分含量分析结果见表 1。

用溶剂提取异黄酮时, 一方面异黄酮的提取率要高; 另一方面蛋白质、糖类等可溶物的提取率要低。因为“杂质”特别是蛋白质的存在不利于提取液的浓缩和异黄酮的分离纯化。浓缩时大量的蛋白质起泡溢出, 混入流出液中, 致使浓缩无法进行。用吸附柱分离异黄酮时, 蛋白质的絮凝引起上柱速度慢, 柱的吸附性能降低和柱堵塞等现象。用溶剂萃取分

表 1 豆粕主要成分含量表( W<sub>B</sub> / % )

Table 1 The main ingredient content of soybean meal			
水分	蛋白质	碳水化合物	油
Water	Protein	Carbohydrate	Oil
13.0	47.0	24.1	2.0

表 3 正交试验安排与试验结果

Table 3 Arrange of regression orthogonal experiment designed and the results

No.	列号			ISO 相对量(%)			No.	列号			ISO 相对量(%)		
	Rank number			ISO - quality				Rank number			ISO - quality		
	A	B	C	误差 Error	compa ratively	( 10 <sup>-4</sup> )		A	B	C	误差 Error	compa ratively	( 10 <sup>-4</sup> )
1	1	1	1	1	44.3	2.26	6	2	3	1	2	78.6	1.57
2	1	2	2	2	57.4	2.41	7	3	1	3	2	27.1	0.50
3	1	3	3	3	51.3	0.90	8	3	2	1	3	35.3	0.35
4	2	1	2	3	86.5	2.05	9	3	3	2	1	24.7	0.64
5	2	2	3	1	100	1.23							

表 4 ISO 相对提取量的方差分析

Table 4 Effects of the factors on ISO extraction quantity

因素	A	B	C	误差
Factor				Error
K <sub>1</sub>	153	157.9	158.2	169
K <sub>2</sub>	265.1	192.7	168.6	163.1
K <sub>3</sub>	87.1	154.6	178.4	173.1
极差	178	38.1	20.2	10
离差	5399.2	297.1	68.0	16.8
均方差	2699.6	148.6	34.0	8.4
F 值	320.6	17.6	4.1	
显著性	*	*	*	

注: F<sub>0.10</sub>( 2, 2 ) = 9, F<sub>0.05</sub>( 2, 2 ) = 19, F<sub>0.01</sub>( 2, 2 ) = 99

由表 4、5 可知, 乙醇浓度和提取温度对异黄酮的提取量有显著性影响; 乙醇浓度对蛋白质的提取

离异黄酮时, 大豆蛋白质分散成微粒, 呈胶体状态, 能在界面上形成强烈的乳化( W / O 型), 导致异黄酮和溶剂的损耗。因此必须尽量降低提取液中蛋白质的量。

2.2 异黄酮提取条件的确定

在单因素试验的基础上, 选择乙醇的体积百分比浓度; 提取温度和时间为考察的三因素, 制定各因素的水平表, 见表 2。豆粕与乙醇的体积比为 1 : 10 ( W / V )。

表 2 各因素水平表

Table 2 Level values of each factor

水平	A( V / V % )	B( °C ) 温度	C( h ) 时间
Level	乙醇浓度 Alcohol concentration	Temperature	Time
1	70	60	2
2	80	70	1.5
3	90	80	1

采用 L<sub>9</sub> 3<sup>4</sup> 正交设计表进行试验, 并对结果进行方差分析和显著性检验, 确定异黄酮的较优提取条件。试验安排和结果见表 3。方差分析结果分别见表 4 和表 5。

表 5 Pr. 质量的方差分析

Table 5 Effects of the factors on Pr. extraction quality

因素	A	B	C	误差
Factor				Error
K <sub>1</sub>	5.57	4.81	4.18	4.13
K <sub>2</sub>	4.85	3.99	5.1	4.48
K <sub>3</sub>	1.49	3.11	2.63	3.3
极差	4.08	1.7	1.55	1.18
离差	3.16	0.48	1.04	0.25
均方差	1.58	0.24	0.52	0.13
F 值	11.29	1.72	3.7	
显著性	*			

量有显著性影响; 而提取时间对两者的影响均不显著。

随着乙醇浓度的升高,异黄酮的提取量有最高值,因为乙醇浓度太高或太低,都与异黄酮的极性不一致,不利于其溶出;提取液中蛋白质的含量逐渐下降,因为在高浓度乙醇作用下蛋白质发生醇变性,溶解度降低。综合两种因素,以 70% 的乙醇为最好。

随着温度的升高,异黄酮的提取率逐渐升高到最高值,而后再逐渐下降。因为 mal-daidzin 和 mal-genistin 不稳定,其分子中的丙二酸基团可以先脱去一个羧基,再脱去乙酰基生成 daidzein 和 genistin;此外,异黄酮还可以分解成其他物质,且这种转变和分解均随着温度的升高而加剧<sup>[6]</sup>。而蛋白质高温下容易变性,且温度越高越容易变性,致使蛋白质在提取液中含量随温度的升高而急剧下降,因此提取温度以 70℃ 为好。

提取时间以 1.5h 为宜。提取时间不足 1.5h,不能将原料中异黄酮全部提取出来;超过 1.5h,异黄酮的得率反而降低,因为异黄酮不稳定,随时间的延长而逐步分解;同时,蛋白质的提取量会随时间的继续而快速增加。

综上所述,以 70% 的乙醇-水体系 70℃ 下重复提取豆粕 3 次,每次 1.5h,可以使总大豆异黄酮的提取率最高,而蛋白质的提取率较低。

2.3 大豆蛋白质的醇变性机理

蛋白质变性的实质是由于维持蛋白质二、三、四级结构的次级键(主要是盐键和氢键)遭到破坏,引起蛋白质分子空间构象的改变。其中盐键是带有相反电荷的两个离子基团之间的静电吸引力作用。静电吸引力(F)与电荷电量(Q<sub>1</sub>、Q<sub>2</sub>)及电荷质点间的距离(R)之间的关系式为:

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\epsilon R^2}$$
 式中  $\epsilon$  为溶液的介电常数。

用乙醇萃取豆粕时,由于乙醇的极性作用,使溶液的  $\epsilon$  增大,导致静电吸引力减弱,破坏了维持蛋白质结构的盐键。同时,由于乙醇的亲水性极强,能与蛋白质分子中的氢受体或氢供体竞争形成强氢键,从而破坏或减弱蛋白质分子内氢键的作用。另外,乙醇的强脱水性,使蛋白质分子表面的水化层破坏,进一步削弱蛋白质结构状态的稳定性,最终导致蛋白质分子空间构象发生变化而变性,溶解度降低。实验发现乙醇浓度由低到高,其介电常数  $\epsilon$  值由小到大,蛋白质的溶解度就随之下降。这个理论分析与实验结论是相吻合的。

2.4 提取液中大豆蛋白质的分离

虽然大豆蛋白发生醇变性引起其溶解度显著降低,但在提取液中仍有一定的蛋白质,其含量约占

提取物干基重量的 13%。

实现蛋白的有效分离必须降低蛋白质周围的水化层和双电层厚度(即  $\xi$  电位)。

2.4.1 等电点沉淀工艺分离蛋白质:

向提取液中滴加 10% 的盐酸,蛋白质的未沉淀率随 pH 值的变化见图 1。

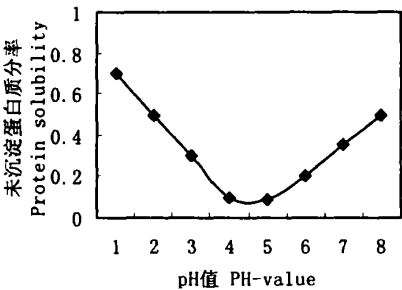


图 1 蛋白质溶解度与 pH 值的关系

Fig. 1 The relation of protein solubility and pH

蛋白质是两性高分子电解质,其分子中包含大量的酸性基团和碱性基团。这些可解离基团在特定的 pH 值范围内解离而产生带正电荷或负电荷的基团。从图中可以看出,pH 值为 4.5±0.1 处,未沉淀蛋白质分率达到最低值 8.0%,而 pH 值 4.5 恰好是蛋白质的等电点(pI=4.5±0.1),此时,分子所带正负电荷相等(净电荷为零), $\xi$  电位为零,蛋白质分子间静电排斥力最小,溶解度降至最低。同时异黄酮的保留率为 91.0%。

2.4.2 盐析沉淀工艺分离蛋白质:

考察 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、NaCl 和 ZnCl<sub>2</sub> 对大豆蛋白质的沉淀率。

根据 Cohn 经验方程,蛋白质的溶解度(S, g/dm<sup>3</sup>)与溶液的离子强度(I, mol/dm<sup>3</sup>)呈线性关系: logS=β-KSI 其中 β、KS 为常数。

在室温, pH 为 4.5±0.1, 相同离子强度下,五种无机盐对大豆蛋白质的沉淀率(平均值)如表 6 所示(分别取 10 个 I 值,每个值试验 10 批)。

表 6 无机盐的种类对 Pr. 沉淀率的影响  
Tab 6 Effects of inorganic-salt on the precipitation quotient of protein

名称 Name	沉淀率 (%) Precipitation quotient	保留率 (%) ISO
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	85.3	87.6
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	80.7	91.0
NH <sub>4</sub> Cl	75.8	90.5
NaCl	88.4	92.4
ZnCl <sub>2</sub>	92.7	91.3

实验发现,在相同的离子强度下,ZnCl<sub>2</sub> 对大豆蛋白质的沉淀率最高,而大豆异黄酮的保留率差别

不大。此时,  $\text{ZnCl}_2$  的加入量为  $3.0\%(\text{m}/\text{v})$ 。

固定  $\text{ZnCl}_2$  加入量( $3.0\%$ ), 考察 pH 值对大豆蛋白质沉淀率的影响, 结果见表 7。

表 7 pH 值对 Pr. 沉淀率的影响

Table 7 Effects of pH on the precipitation quotient of protein

pH 值	沉淀率 (%)	保留率 (%)
pH - value	Precipitation quotient	ISO
3.8	92.2	93.6
4.0	95.4	93.1
4.2	96.7	94.4
4.4	90.1	95.0
4.6	87.4	92.5

试验表明, pH 值在  $4.1 \pm 0.1$  下, 大豆蛋白质的分离除去率最高( $96.05\%$ )。由于蛋白质分子中的某些解离基团可以与中性盐中的阳离子或阴离子相结合<sup>[7]</sup>, 致使蛋白质溶解度最低的溶液 pH 略小于蛋白质的等电点。

总之, pH 值在  $4.1 \pm 0.1$  下, 加入  $3.0\%(\text{m}/\text{v})$   $\text{ZnCl}_2$ , 大豆蛋白质的分离除去率最高( $96.05\%$ ), 异黄酮的平均保留率为  $93.8\%$ 。

3 结论

3.1 实验确定了大豆异黄酮的较优提取条件为

STUDY ON THE CONDITIONS OF EXTRACTING SOYBEAN ISOFLAVONES AND SEPARATING PROTEIN

Hu Weixin<sup>1</sup> Wang Xiaolei<sup>2\*</sup> Zhang Jie<sup>3</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Technology, CUMT, Xuzhou, 221008;  
2. Shanghai Xulong Agriculture - technology Ltd. Shanghai 200063; 3. School of  
Environment Science and Spatial Informatics, CUMT, Xuzhou, 221008)

**Abstract** The conditions of extracting soybean isoflavones from soybean meal with ethanol was proposed and investigated in this paper. On the purpose to get the yield of total soybean isoflavones as high as possible, with orthogonal experimental methodology, the optimum parameters of extracting isoflavones were obtained, i. e.  $70\%(\text{V}/\text{V})$  ethanol, soybean meal weight to solvent volume at  $1:10$ , temperature  $70^\circ\text{C}$ , time 1.5h and 3 times repeat. The protein was separated from the pre - extracting liquid with salting - out and isoelectric precipitation at room temperature. The results indicated that the separation quotiety of protein was the highest with the  $\text{ZnCl}_2(3.0\%, \text{m}/\text{v})$  at pH  $4.1 \pm 0.1$ .

**Key words** Soybean meal; Soybean isoflavones; Protein; HPLC

$70\%(\text{V}/\text{V})$ 乙醇, 豆粕质量与乙醇体积比  $1:10(\text{W}/\text{V})$ ,  $70^\circ\text{C}$ 下对豆粕重复提取 3 次, 每次 1.5h, 异黄酮的提取率达到最高值, 而蛋白质的提取率则较低。

3.2 pH 值为  $4.1 \pm 0.1$ , 向提取液中加入  $3.0\%(\text{m}/\text{v})$   $\text{ZnCl}_2$ , 大豆蛋白质的分离除去率最高( $96.05\%$ ), 异黄酮的平均保留率为  $93.8\%$

参 考 文 献

1 Michael Naim, Shmuel Zilkah. Soybean Isoflavones. Characterization, Determination and Antifungal Activity[ J ]. Food Chem, 1994, 22( 5): 806 - 810.  
2 郑高利. 大豆异黄酮的药理作用[ J ]. 中国现代应用药学, 1998, 15( 1): 4 - 11.  
3 K. R. 马卡姆. 黄酮类化合物结构鉴定技术[ M ]. 北京: 科技出版社, 1990. 21 - 30.  
4 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[ M ]. 北京: 高等教育出版社, 1981, 55 - 59.  
5 黄伟坤. 食品分析与检验[ M ]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989. 45.  
6 Waggle Recovery of isoflavones from soy molasses [ P ]. US00591919921A.  
7 沈同, 王镜言. 生物化学( 上册, 第二版)[ M ]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 197.