

不同加工条件下大豆异黄酮组分稳定性的研究现状^{*}

张 晨¹ 杨晓泉² 孔慧清¹ 卢秋雁¹ 李 雄¹ 刘美玲¹

(1. 广东天辰生物技术有限公司, 广州 510070;

2. 华南理工大学食品与生物工程学院食物蛋白工程中心, 广州 510640)

摘要 大豆异黄酮是大豆的主要活性成分, 研究发现, 不同存在形式的异黄酮稳定性和生理活性有较大的差别。本文综述了大豆异黄酮组分在不同加工条件下的稳定性; 该研究对于制备高纯度、高生理活性的异黄酮具有一定的理论指导意义。

关键词 大豆异黄酮; 生理活性; 稳定性; 加工条件

中图分类号 S 565. 101 **文献标识码** A **文章编号** 1000 - 9841(2006)01 - 0073 - 04

0 前言

大豆异黄酮是大豆生长过程中形成的一类次生代谢物质。很多研究表明, 大豆异黄酮具有植物雌激素功能, 可以降低人体多种雌激素依赖型疾病的发病率, 而且在防癌抗癌、防治心血管疾病、预防骨质疏松症、治疗妇女更年期综合症等方面有重要作用^[1, 2], 大豆异黄酮成为了学术界乃至全世界关注的焦点。

目前已经从大豆中分离鉴定出有 12 种异黄酮化合物, 其中 3 种为苷元结构(Genistein、Daidzein、Glycitein), 其余 9 种为糖苷结构^[4]。在 9 种糖苷结构中: 3 种为葡萄糖苷结构(Isoflavone glucosides), 3 种为乙酰基葡萄糖苷结构(Acetyl Isoflavone Glucosides), 3 种为丙二酰基葡萄糖苷结构^[4](Malonyl Isoflavone Glycosides)。本文主要对大豆异黄酮稳定性方面的研究进展综述如下。

1 不同加工条件下异黄酮稳定性的研究进展

1.1 热处理对异黄酮稳定性的影响

在众多加工过程中, 热处理是最常见的。因

此, 研究异黄酮各组分在较高的温度下的转化是非常必要的。在全大豆中, 丙二酰糖苷约占总异黄酮含量的 69%~72%(w/w, 以下同), 而在大豆胚芽中, 丙二酰糖苷占总异黄酮含量的 64%~69%^[5], 由此对丙二酰糖苷热稳定性的研究显得尤其重要。Coward 等^[6] 研究发现, 在较高的温度下, 丙二酰基染料木苷和乙酰基染料木苷可产生脱酯化作用从而生成丙二酸甲酯、乙酸甲酯和染料木苷; Pand jaitan 等^[7] 在此基础上进一步研究指出, 其最佳的转化温度为 50℃。此外, Patricia 等^[8] 还发现: 在水存在下加热, 丙二酰形式转化为糖苷形式, 在没有水存在时加热, 丙二酰主要转化为乙酰形式。由于丙二酰糖苷是大豆中天然存在的异黄酮形式, 以上的研究有助于我们更全面地分析异黄酮组分的稳定性。越来越多的研究表明, 异黄酮的糖苷和苷元组分对热也不稳定。Eisen 等^[9] 研究发现, 染料木苷(Genistin)和大豆甙(Daidzin)在高温下将产生热降解, 在豆奶的储藏过程中, 环境温度的升高将直接导致 genistin 和 daidzein 衍生物的损失; 实验中, 无菌包装的豆奶样品分别储藏在环境温度(15、25、37℃)和升高后的温度(70、80、90℃)下, 定期(7、14、21、28、35、42d)后用高效液相色谱法(HPLC)对样品中残余的异黄酮浓度进行检测^[9], 色谱条件为: 反相 C18(25cm×4.6mm) Supelcosil

^{*} 收稿日期: 2005 - 01 - 07

基金项目: 广东省“十五”攻关农产品加工重大专项资助项目(No. A20301)

作者简介: 张晨(1980 -), 男, 工程师, 研究方向为功能性大豆食品。

柱,流动相 (A) 25% (v/v) 甲醇、(B) 柠檬酸 (pH 3.5) 0%~50% (w/v) 进行梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,分析波长为 254 nm、262 nm,进样量 10 μ L,灵敏度 0.02 AUFS^[9]。并进行热力学分析得出速率常数(Rate Constant),如表 1 所示。

表 1 豆奶中染料木苷热降解的动力学常数^[9]

Table 1 Kinetic constance for genistin degradation in soy milk ^[9]			
温度(℃) Temperature	速率常数 (10 ³ day) Rate constant	相关系数 r ²	显著性 p ^a
15	0.437	0.025	0.095
25	1.111	0.392	<0.001
37	3.871	0.433	<0.001
70	61.055	0.833	<0.001
80	77.845	0.919	<0.001
90	109.162	0.944	<0.001

在异黄酮各组分中,尽管苷元的含量仅占 2%~3%,但却具有较强的生理活性,因此苷元的热稳定性也是人们所关注的话题。Ungar 等^[10]研究了加

热条件下, Genistein 和 Daidzein 的分解情况,用 HPLC 法对残余成分进行检测,色谱条件同上;并采用 DSC 法进行微热量计稳定性测试。结果发现, Genistein 和 Daidzein 的热分解均为明显的一级动力学反应,并且在有氧、无氧条件下反应的活化能和机理有明显区别^[10]。两者在碱性条件下均较为不稳定。数据表明 90℃时, Genistein 在碱性 (pH=9) 下的分解速率常数 k 为 0.222 (1/day) (p<0.001),而在中性 (pH=7) 下 k 仅为 0.030 (1/day) (p<0.001);而 Daidzein 在碱性 (pH=9) 下的分解速率常数 k 为 0.547 (1/day) (p<0.001),中性 (pH=7) 下仅为 0.262 (1/day) (p<0.001)。此与 70、80℃下所得数据规律性完全相同,但在 120℃下存在少量偏差 (Daidzein 在中性较碱性条件下具有更大的分解速率)^[10],如图 1 所示。可以证明,在相同热反应条件下, Daidzein 较 Genistein 更易发生降解,具有较低的反应活化能 (E_a),因此在食品加工储藏过程中应该特别注意。

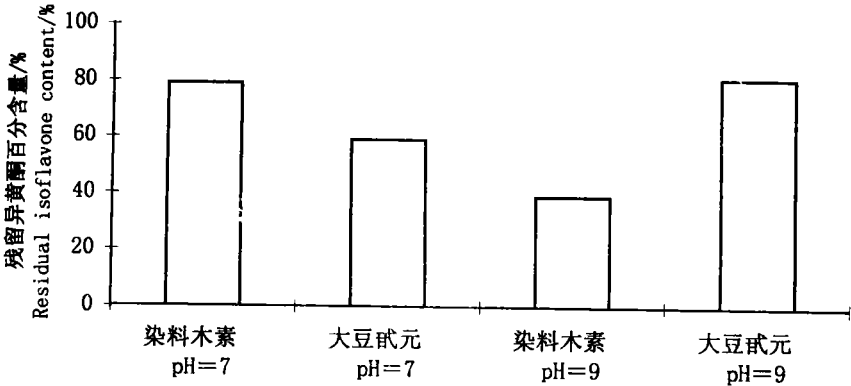


图 1 120℃热处理 20 分钟样品溶液中剩余异黄酮含量 (样品标准偏差<1%)
Fig 1 Residual isoflavone content in model solutions following thermal treatment at 120℃ for 20min. standard deviation was<1% for all samples

以上较为全面地综述了热处理对不同大豆异黄酮组分稳定性的影响,作者在研究中还发现,以天然形式存在的丙二酰糖苷具有较重的豆腥、苦涩等不良风味,不利于其在食品、保健品等行业中的应用;可利用其热稳定性较差的特性,通过对提取原料(脱脂豆粕、大豆胚芽等)进行加热预处理,能明显改善异黄酮提取物的风味,最大限度去除了豆腥、苦涩味,使之具有怡人的焦香和甘甜味。作者认为,对于异黄酮的热稳定性,目前国内外的研究已经较为详尽,尚有少量工作需进一步完善,如何利用异黄酮各组分之间热稳定性的差异制备出口感好、生理活性

高、能广泛应用于食品、保健品等行业的异黄酮制品将是今后应着重完善的工作。

1.2 酸、酶对异黄酮稳定性的影响

在酸、酶水解和催化作用的影响下,糖苷型的异黄酮极易发生水解而转变成成为苷元。研究发现,浸泡后大豆中 Genistein 的含量要比未浸泡前增高^[11],据分析是由于大豆中内源 β -葡萄糖苷酶可促进 Genistin 发生水解作用生成 Genistein,而此酶具有较强的亲水性,水浸泡有利于其活性的表现。此外, Pandjaitan 等^[7]选用酵母-葡萄糖苷酶作为外源酶催化糖苷向苷元的转化,效果良好;由于内源

酶与外源酶的作用条件与机理不尽相同, 选用催化效率高的专一性酶, 确定酶解的最佳条件仍需要在今后的研究加以完善。也有研究发现, 除了 β -葡萄糖苷酶外, 酸性条件也是促进异黄酮糖苷水解的原因之一^[12]; 现采用酸水解法来提取异黄酮苷元的方法已经被广泛应用, 汪海波等^[13]已研究出从脱脂大豆粕中酸水解提取 Genistein 和 Daidzein 的工艺, 其效果较有机溶剂法提取有很大的改善。

1.3 消化过程中异黄酮的稳定性

除了以上方面, 近两年来国外有研究报道消化过程中大豆异黄酮的稳定性^[14], 实验以大豆面包 (Soybean Bread, 以下简称为 SB) 作为研究模型, 通过模拟口腔、胃和小肠消化机理对其中异黄酮组分的稳定性进行了深入研究, 消化物水相部分用离心的方法从消化物中分离出来, 样品用高效液相色谱 (HPLC) 分析。结果表明: 在口腔、胃的消化过程中, 来自 SB 中的 Daidzein、Genistein、以及它们相应的 β -葡萄糖苷和黄豆黄素 (Glycitein) 均保持稳定, 回收率为原料的 95% 以上^[14]。在小肠消化过程中, 胆汁的浓度能显著地影响水相部分中的苷元、乙酰基 Genistin 和丙二酰基 Genistin 的区分度 ($P < 0.01$)。而胆汁的缺乏将导致在消化物的水相部分中无法检测出 Genistein 以及总量超过 60% 的 Daidzein、Glycitein 和乙酰基 Genistin。在消化阶段, Genistein 及对应的 β -葡萄糖苷的稳定性符合以往的研究结果: 即在酸性环境中培养 4h, 这类特殊的异黄酮保持稳定^[15]。丙二酰基 Daidzin 和丙二酰基 Glycitin 的减少与 Daidzein 和 Glycitein 消化过程中各自数量上的增加有关。这说明在消化过程中一些结合态的糖苷衍生物能转变为相应的苷元。由于在 SB 制作过程中, Glycitin 及其衍生物损失严重, 因此在任何模拟消化阶段之后都没能检测到 Glycitin 和乙酰基 Glycitin。研究还指出, 在小肠消化阶段中, 胶束化作用提高了异黄酮苷元的生物利用率, 尤其是 Genistein; 而摄食含蛋白质和类脂物的食物能有效的减少胆汁释放到十二指肠, 相应地提高了胆汁的分泌^[16]。因此, 很可能来自含脂质和蛋白质食品中的异黄酮的生物利用率超过了非食物的异黄酮补给物。作者认为, 从上述消化实验中得到的解释和结论具有一定的价值, 但研究中采用模拟人体消化道的环境不具有很强的说服力, 还需要在人体实验中加以证实。

2 应用稳定性研究制备异黄酮的方法

2.1 丙二酰基异黄酮糖苷的制备^[17, 18]

称取去壳、脱脂的大豆胚芽 3.0kg (Perikan 公司提供), 经碾碎后 (过 80 目), 用 30L 的去离子水 (料液比为 1:10, s/l) 在 50℃ 条件下提取 2h, 期间调节溶液的 pH 值为 8.0, 得到滤液约为 (25L), 用 1M 盐酸调节 pH 值为 4.0, 室温下静置 2h 后收集上层清液用于离心 (4000rpm、15min), 澄清液过 Sephadex HP-20 凝胶柱, 采用乙醇-水溶液梯度洗脱, 乙醇浓度由 5%~50% (v/v), 分别得到天然组分 6'-O-Malonyldaidzin (1) 和 6''-O-Malonylgenistin (2)。组分 (1) 调节其 pH 值为 8.0, 浓缩后残留物进 Octadecyl Silica (ODS) 凝胶柱, 采用乙醇-水溶液洗脱 (1:9, v/v) 得到纯净组分 (1), 经冷冻干燥后得粉末 1.15g; 同样的方法得到 (2) 粉末为 1.36g。且经 ¹H-或 ¹³C-NMR 检验产物与之相符。

2.2 乙酰基异黄酮糖苷的制备^[17]

将纯净组分 (1) (15.00g, 0.03mol) 加入 300mL 的二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中, 溶液于 60℃ 的恒温条件下静置 3h, 高效液相色谱显示反应已经安全进行。溶液浓缩后残留物进 Octadecyl Silica (ODS) 凝胶柱, 采用乙醇-水溶液洗脱 (1:4, v/v), 得到天然组分 6'-O-Acetyldaidzin (3), 从甲醇中重结晶得到理论上的纯净组分 (3) (5.24g, 46%)。而纯净组分 (2) (6.00g, 0.01mol) 采用上述方法可得到组分 6'-O-Acetylgenistin (4) (2.62g, 57%)。经 ¹H-或 ¹³C-NMR 检验与之相符。

2.3 异黄酮苷元的制备^[19~21]

称取去壳、脱脂的大豆粕 1.0kg, 经碾碎后 (过 80 目), 用 70% 乙醇 (料液比为 1:16, s/l), 在 80℃ 条件下回流提取 6h; 提取液经离心分离、精滤后得到异黄酮粗提液; 经大孔树脂柱吸附、去离子水洗去蛋白质、低聚糖等水溶性杂质后, 收集 40%~70% 乙醇洗脱组分; 洗脱液经乙酸乙酯萃取、减压浓缩、冷冻干燥得到异黄酮糖苷提取物。提取物加入 2M 的盐酸-甲醇溶液 (料液比 1:2, s/l)、水解温度 80℃、水解时间 60min, 即可得到纯度较高的大豆异黄酮苷元。样品经高效液相色谱法检验, 水解较为充分; 异黄酮糖苷的转化率高, 已未能检出其存在, 而 Genistein 和 Daidzein 的含量分别达到 23.45% 和 14.01%。

需要说明的是, 由于生产成本较高、工艺复杂, 目前生产高纯度异黄酮单体的技术尚不能广泛应用。国内仅少数几家生化公司具备此能力, 其中上

海同田生化技术有限公司采用高速逆流色谱(HSCCC)技术,已分离出6种异黄酮单体(纯度 $\geq 99\%$),在国内属领先水平。工业制备生理活性较高的异黄酮苷元已经成为现实,采用吸附树脂柱层析和酸水解相结合的工艺,得到了含量约40%(以Genistein计)的苷元提取物^[23]。但由于酸对容器腐蚀性较强、苷元在水解过程中稳定性较差,限制了酸水解在产业上的推广。目前采用 β -葡萄糖苷酶或微生物菌株(黑曲霉、木霉等)发酵产酶,对异黄酮糖苷进行水解,以制备高活性苷元的研究正成为热点。东北农业大学与黑龙江粮食研究所合作,采用 β -葡萄糖苷酶水解工艺制备异黄酮苷元,具有反应条件温和、水解效率高、苷元稳定性好等优点,Genistein(或Daidzein)的含量达到了60%,目前正处于中试阶段。

3 前景展望

从以上的研究中不难看出,对大豆异黄酮组分稳定性的研究是非常必要的,对于工业上大规模制备天然存在的异黄酮具有重要的理论意义。在富含异黄酮食品的加工和储存中,其稳定性的研究有助于避免异黄酮含量的流失和组分之间的不利转化,对于提高食品的生理功能具有积极的作用^[23]。虽然目前国内的研究和国外仍存在较大的差距,但随着生物技术的飞速发展,在不久的将来,异黄酮稳定性的探索研究必将更加深入,提取异黄酮作为具有多种生理功能的优质天然药用食品,势必会有光明的前景。

参 考 文 献

- 1 Brouns F. Soy isoflavones; a new and promising ingredient for the health foods sector[J]. Food research International, 2002, 35: 187-193
- 2 王兆梅,李琳,郭祀远. 大豆异黄酮分离特性及其检测的初步探讨[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(7): 66-69
- 3 王兆梅,李琳,郭祀远. 大豆异黄酮结构及其活性分析[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 14(3): 70-74
- 4 蔡秋声. 大豆异黄酮生理功能及其开发利用[J]. 粮食与油脂, 1999, (2): 31-36
- 5 董怀海,谷文英. 高效液相色谱-质谱法在大豆异黄酮测定中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2002, (5): 48-50
- 6 Coward L, Smith M, Kirk M et al. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing[J]. Am. J. Clin. Nutr, 1998, 68(Suppl.): 1486-1491
- 7 Pandjaitan N. Enrichment of Genistein in Soy protein Concentrate[J]. J. food. Sci., 2000, 65: 399-402
- 8 Wang. H. J. Patricia. Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effect of Variety, Crop Year, and Location[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 1674-1677
- 9 Eisen B, Ungar Y, Shimoni E. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperature[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 2212-2215
- 10 Ungar Y, Oluwatoyin F, Shimoni E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 4394-4399
- 11 张炳文,宋永生. 发酵处理对大豆制品中异黄酮含量与组分的影响[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(7): 6-9
- 12 Aussenac T, Lacombe S, Dayde J. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment[J]. Am. J. Clin. Nutr, 1998, 68: 480-485
- 13 汪海波,刘大川,李永明,等. 酸水解法提取大豆异黄酮甙元工艺研究[J]. 食品科学, 2004, 24(4): 98-101
- 14 Kelly R, Zhang. Y. C, Vodovotz Y. Stability and bioaccessibility of isoflavones from soybread during in vitro digestion[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 4603-4609
- 15 Coldham N, Darby C, Hows M et al. Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism[J]. Xenobiotica, 2002, 32: 45-62
- 16 Wiseman H. The bioavailability of nonnutrient plant factors: dietary flavonoids and phyto-oestrogens[J]. Proc. Nutr. Soc, 1999, 58: 139-146
- 17 Izumi T, Nasu A, Kataoka S. An Efficient preparation of acetyl isoflavone glucoside[J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45: 1593-1595
- 18 Kudou S, Fleury Y, Welti D. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds[J]. Agric Biol. Chem, 1991, 55(9): 2227-2233
- 19 张炳文,宋永生. 糖苷型大豆异黄酮酸水解工艺的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(6): 75-78
- 20 冯建光,谷文英. 大孔树脂对大豆异黄酮的吸附与洗脱性能[J]. 无锡轻工业大学学报, 2003, 22(1): 82-85
- 21 文瑞芝,杨明生. 萃取-酸水解法提取纯化豆粕中大豆异黄酮苷元[J]. 光谱实验室, 2004, 21(5): 925-928
- 22 全吉淑,尹学哲,工藤重光. C18柱层析法提取大豆胚轴中异黄酮苷元[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 136-138
- 23 Rijke E. de, Gomez. A. Z, Ariese F et al. Determination of isoflavone glucoside malonates in Trifolium pratense L. (Red Clover) extracts: quantification and stability studies[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 932: 55-64

(下转第80页)

过去巴西没有转基因大豆研究和生产, 由于邻近阿根廷地方的农民私自从阿根廷引入转基因大豆进行种植、转基因大豆在巴西开始发展。目前已有15%~20%为转基因大豆。育种上已开展转基因大豆品种研究, 但与非转基因育种是分开的, 在大豆育种中心转基因育种材料用蓝色布袋, 非转基因育种材料用白色布袋, 以示区别。育种家进行与转基因研究和育种, 主要还是利用孟山都公司抗草甘膦的CP4-EPSPS基因, 育种研究不付专利费, 种子公司出售转基因大豆种子要付专利费。目前大豆研究中心和孟山都公司有合同和合作关系, 也从日本公司

引进抗旱基因, 拟转入大豆。他们利用基因枪导入外源基因, 转化成功率20%左右, 有5%~20%可以得到小植株。除转基因的相关研究外, 也进行分子标记方面的工作, 如利用Davis(感)×FT-2(抗)组合进行抗大豆锈病基因的分子标记研究, 该组合有116个F_{2:6}重组近交系, 利用38个SSR标记进行分析, 找到的标记和Satt460的遗传距离为24.3cm; 和Satt307的遗传距离为13.5cM。大豆锈病是巴西大豆的重要病害。最近报道, 大豆锈病登陆美国, 看来大豆锈病研究将受到重视。

SOYBEAN BREEDING PROCEDURE OF EMBRAPA IN BRAZIL

Wei Liqing¹ Tao Mei¹ Chang Ruzheng¹

(1. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Beijing 100081)

Abstract From the very beginning, on April 26, 1973, Embrapa has played an important role for Brazilian agriculture. Embrapa totally has 39 Research Centers, now it is present in almost all the states of the Union, each with its own ecological conditions. Embrapa Soybean was located in the southern city Londrina, which is 1000 km south away from Brasilia. Embrapa Soybean was a world reference center for the cultivation of soybean in the tropics. Its activities also involve genetics and improvement of soybean.

Key words *Glycine max*; Breeding Procedure; Brazil

(上接第76页)

CURRENT STUDIES ON STABILITY OF SOYBEAN ISOFLAVONES
IN DIFFERENT PROCESS CONDITIONS

Zhang Chen¹ Yang Xiaoquan² Kong Huiqing¹ Lu Qiuyan¹ Li Xiong¹ Liu Meiling¹

(1. Guangdong Tianchen Biotechnology Co., LTD. Guangzhou 510070; 2. Engineering Center of Food Protein, College of Food and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract Soybean isoflavones are the primary active ingredient in soybean, Studies show that different isoflavone components have great distinction in its physiological activity and stability. This paper reviewed the studies on the stability of isoflavones in different process conditions, and reported the significance to the preparations of high purity, high bioactivity isoflavones.

Key words Soybean isoflavones; Physiological activity; Stability; Process conditions