

大豆皂苷的微波辅助提取工艺及对酪氨酸酶活性影响的研究

李雅晶, 吴建阳, 郑雅婷

(浙江经贸职业技术学院 应用工程系, 浙江 杭州 310018)

摘要:通过正交实验考察了微波提取温度、微波提取时间、料液比、提取次数对大豆皂苷得率的影响,并研究了大豆皂苷对酪氨酸酶活性的影响。结果表明:微波辅助提取大豆皂苷的较佳工艺为:微波处理时间 30 min,微波处理温度 40℃,料液比 1:5,提取 3 次。在上述条件下测得大豆皂苷得率 8.11%;大豆皂苷对酪氨酸酶活性具有抑制作用,且随浓度的增加,抑制作用增强,其 IC_{50} 值为 $222.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

关键词:大豆皂苷;微波辅助提取;酪氨酸酶活性

中图分类号:TS214.2

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)01-0112-03

Technology for Microwave-assistant Extraction of Soyasaponins from Bean Dregs and Its Effects on Tyrosinase Activity

LI Ya-jing, WU Jian-yang, ZHENG Ya-ting

(Department of Applied Engineering, Zhejiang Economic & Trade Polytechnic, Hangzhou 310018, Zhejiang, China)

Abstract: Microwave-assistant extraction technology was used to obtain soyasaponins from bean dregs and the optimum technology parameters were determined by orthogonal experiment. Tyrosinase activity was determined by the dopachrome method using L-DOPA as the substrate and the amount of dopachrome in the reaction mixture was measured by spectrophotometer. The optimum technological parameters for soyasaponins extraction were obtained as follow: microwave extraction temperature at 40℃, microwave extraction for 30 min, the solid-liquid ratio 1:5 and extracted for 3 times. Under above conditions, the soyasaponins content in bean dregs was 8.11%. Soyasaponins had an appreciable antityrosinase activity and the inhibitory effect was enhanced with the concentration increasing, the value of half inhibitory concentration (IC_{50}) was $222.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Key words: Soyasaponin; Microwave-assisted extraction; Tyrosinase activity

大豆皂苷是一种具有广泛应用价值的天然生物活性物质,由齐墩果酸三萜和低聚糖连接而成,属于五环三萜类皂苷,主要分布在大豆胚轴中。大豆皂苷具有多种药理学活性,如抗癌、调节免疫功能、降低血清中胆固醇含量、防治心血管疾病、抗菌、抗病毒、护肝、减肥等^[1-3]。除用作药物外,大豆皂苷还可以作为高级化妆品、食品添加剂及表面活性剂^[4]。中国是大豆生产和消费大国,每年用于加工豆制品和榨油所消耗的大豆数量巨大,而存在于副产品中的大豆皂苷由于综合加工利用率不高,常常被丢弃,造成资源的浪费。

酪氨酸酶广泛存在于各种生物体内,是生物体内黑色素形成的关键酶。其抑制剂在医药、化妆品、食品工业及农业领域均有着广阔的应用前景。近年来,从植物中提取安全而有效的天然酪氨酸酶抑制剂成为关注焦点。目前认为有酪氨酸酶抑制

活性的植物化合物包括:黄酮类化合物、酚类化合物、醛类化合物、皂苷及某些多肽等^[5-8]。作为大豆中的重要生物学活性成分之一,大豆皂苷对酪氨酸酶活性的影响鲜有报道。

因此,对大豆皂苷的提取工艺及其可能具有的酪氨酸酶抑制活性进行评价具有重要的研究意义。微波提取是利用微波来提高萃取率的一种新技术,能够选择性的加热组分,从而使被萃取物质从基体中分离,进入到介电常数较小、微波吸收能力相对差的萃取剂中。鉴于微波提取技术在天然植物成分提取当中具有设备简单、快速、高效等优势。该文利用微波辅助提取技术对豆渣中的大豆皂苷进行提取,对其工艺参数进行了优化,并对大豆皂苷对酪氨酸酶活性的影响进行了研究,以期为大豆产品的多元化开发利用、大豆皂苷生物学活性的深入研究提供依据。

收稿日期:2011-09-24

基金项目:浙江省新苗人才计划(2010R441001);浙江经贸职业技术学院创新项目(11CX03)。

第一作者简介:李雅晶(1980-),女,讲师,博士,从事食品中功效成分研究。E-mail:jjcyly@163.com。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆豆渣:取刚榨过豆浆的大豆湿豆渣在 65℃ 条件下干燥至恒重,过 40 目筛,保存备用;齐墩果酸标准品(含量为 99.999%,中国药品生物制品检定所);多巴、酪氨酸酶(Sigma 公司);熊果苷(Aldrich 公司);石油醚、无水乙醇、香草醇、高氯酸、冰醋酸等均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

旋转蒸发仪 RE-52AA,上海亚荣生化仪器厂;循环水式多用真空泵 SHB-III,郑州长城科工贸有限公司;NJL07-3 型实验专用微波炉,南京杰全微波设备有限公司;干燥箱 101A-2 型,上海市实验仪器总

厂;全温恒温振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;电热恒温水浴锅,上海一恒科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大豆皂苷的提取流程 称取 20 g 豆渣,放入索氏抽提器中,用石油醚脱脂干燥后以 70% 乙醇为溶剂进行微波辅助提取,提取物旋转蒸发去除乙醇相,水相上大孔吸附树脂,经双蒸水清洗后,利用硫酸苯酚法^[9]检测大孔吸附树脂是否将乙醇提取物中的糖分去除干净,然后用 70% 乙醇洗脱皂苷,滤液定容至 100 mL,备用大豆皂苷含量。

1.3.2 大豆皂苷提取工艺的优化 对微波处理时间(A)、微波处理温度(B)、豆渣与提取溶剂的料液比(C)、提取次数(D)4 个影响提取的因素进行考察,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验(表 1),确定大豆皂苷最佳提取工艺。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	A 微波处理时间 Microwave extraction time/min	B 微波处理温度 Microwave extraction temperature/℃	C 料液比 Ratio of alcohol to bean dregs	D 提取次数 Extraction times
1	15	30	1:5	1
2	30	35	1:10	2
3	45	40	1:15	3

1.3.3 大豆皂苷含量的测定 采用香草醛-高氯酸法^[10]测定不同提取工艺下大豆皂苷的含量,具体方法为:取齐墩果酸标样溶液 0.1~0.7 mL 于 10 mL 具塞试管中,60℃ 水浴挥干,加 5% 的香草醛冰乙酸溶液 0.2 mL,加入高氯酸 0.8 mL,摇匀,60℃ 水浴加热 15 min,取出后立即用流水冷却,加入 2 mL 冰乙酸稀释,以不加齐墩果酸的平行样为空白,在 546.5 nm 处测定吸光度值,并绘制标准曲线,回归方程为 $C = 0.3368 + 42.126 \times A_{546.5}$, $R^2 = 0.9978$ (式中 C 为大豆皂苷含量)。取 1 mL 大豆皂苷提取物,60℃ 水浴挥干后,按上述步骤测定香草醛-高氯酸法显色后的吸收值,根据回归方程计算大豆皂苷的含量,3 次测定取均值。

1.3.4 大豆皂苷提取验证实验 准确称取大豆渣约 20 g,根据正交实验所得的最佳工艺条件进行大豆皂苷提取,每个样品重复 3 次,取平均值。皂苷提取率(%) = 提取液体积(mL) × 皂苷含量($g \cdot L^{-1}$) / 豆渣总质量(g) × 100。

1.3.5 酪氨酸酶活性抑制率的测定 酪氨酸酶活力的测定按照杜志云等的方法^[11-12]稍加改进。以 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-多巴(L-DOPA)为底物,在 $3 \text{ mL } 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.8)中,分别加入 0.1 mL 100、200、300、400 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大豆皂苷溶液于比色杯中,再加 2.8 mL 预先在 30℃ 恒温水浴保温的底物溶液,然后加 0.1 mL 酪氨酸酶水

溶液,立刻混匀,在 30℃ 恒温测定波长为 475 nm 的吸光度值随时间的变化曲线。以熊果苷代替大豆皂苷为阳性对照,以不加大豆皂苷为空白对照,总反应体系为 6 mL。反应体系中酶的浓度为 $33.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。酪氨酸酶抑制率按公式计算:抑制率 = $(A - B) / A \times 100\%$,其中 A 为空白对照的吸光值,B 为加入大豆皂苷或熊果苷后溶液的吸光值。抑制率高表明其对酪氨酸酶活性的抑制强度高。 IC_{50} 值用 Graph Pad prism 软件以大豆皂苷浓度-酪氨酸酶抑制率曲线计算得出, IC_{50} 值越小表示对酶的抑制活性越高。

2 结果与分析

2.1 微波处理提取工艺的优化

由表 2 可知,各因素对大豆皂苷提取率的影响次序为 $A > D > B > C$,各因素的最佳组合水平为 $A_2B_3C_1D_3$,即微波处理时间为 30 min,微波处理温度为 40℃,料液比 1:5,提取 3 次。从正交实验结果分析,在 4 个因素中微波处理时间对大豆皂苷得率的影响最大。这是由微波萃取的特性决定的,在微波场中,由于吸收微波能力的差异使得提取体系中的极性组分被选择性加热,从而使得被提取物质快速从体系中分离,进入到介电常数较小、微波吸收能力相对差的提取剂中,因而较常规提取,微波提

取时间的选择往往具有决定性意义,时间过短提取不充分,过长则会使萃取物破裂,溶解的杂质相应增多,提取物纯度降低。

表2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号 No.	因素 Factors				大豆皂苷得率 Yield of soyasaponins/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	4.99
2	1	2	2	2	5.34
3	1	3	3	3	6.21
4	2	1	2	3	7.39
5	2	2	3	1	7.25
6	2	3	1	2	8.03
7	3	1	3	2	5.73
8	3	2	1	3	6.46
9	3	3	2	1	5.55
k_1	5.513	6.037	6.493	5.930	
k_2	7.557	6.350	6.093	6.367	
k_3	5.913	6.597	6.397	6.687	
极差 R	2.044	0.560	0.400	0.757	
优水平 Selected level	A2	B3	C1	D3	

2.2 验证实验结果

为了验证最佳工艺的稳定性,精确称取豆渣3份,每份20g,按 $A_2B_3C_1D_3$,即微波处理时间为30min,微波处理温度为 40°C ,料液比1:5,提取3次,进行实验。结果获得大豆皂苷平均值为8.11%。综合时间、试剂及效率角度考虑,该研究确定的工艺较为合理。

2.3 大豆皂苷对酪氨酸酶活性的影响

如图1所示,随着时间的增加,各被测样品OD值逐渐增加,到一定时间后OD值趋稳,说明反应达到稳定态,酶活性受到抑制,产物量不再增加。不同浓度的大豆皂苷对体系OD值的影响不同,大豆皂苷浓度越高,开始时体系OD值上升越慢,达到稳定态时的OD值越低,说明大豆皂苷对酪氨酸酶活性具有抑制作用,且浓度越高,抑制效果越明显。大豆皂苷对酪氨酸酶的半数抑制浓度(IC_{50})为 $222.7\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,阳性对照熊果苷的 IC_{50} 值为 $473.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,大豆皂苷对酪氨酸酶的抑制活性高于熊果苷。

3 结论与讨论

大豆皂苷传统的提取工艺,一般以甲醇或乙醇作为提取剂,采用回流法或渗漉法进行提取^[13]。传统工艺虽然设备简单,但提取时间长、提取效率低,不利于大豆皂苷的大规模开发利用。该研究采用微波辅助溶剂提取法,很好的利用了微波能选择性加热的特性,将分子极性大的大豆皂苷成分快速从基质中分离,进入提取溶剂,从而提高了大豆皂苷

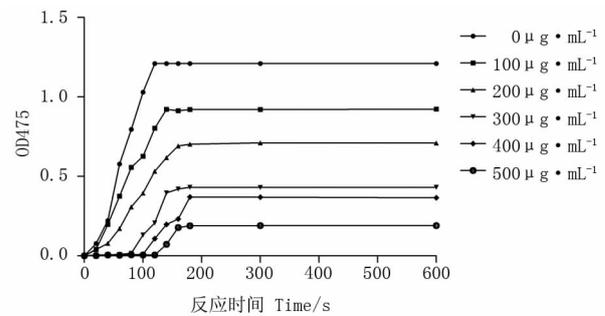


图1 大豆皂苷对酪氨酸酶活性影响的进程曲线

Fig. 1 Progressive curves inhibition of tyrosinase activity by soyasaponins

的提取效率。研究结果显示,微波辅助萃取技术非常适合豆渣中大豆皂苷的提取。较佳提取工艺条件为:微波处理时间为30min,微波处理温度为 40°C ,料液比1:5,提取3次。在上述条件下测得大豆皂苷得率8.11%。

作为我国主要农产品之一的大豆,其营养价值已获得了人们广泛的认同,但有关大豆中的皂苷这一潜在的酪氨酸酶抑制剂研究甚少。该研究发现大豆皂苷具有酪氨酸酶抑制活性,且表现出剂量-效应关系,其 IC_{50} 为 $222.7\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,较阳性对照熊果苷具有更佳的酪氨酸酶抑制效果。因而,大豆皂苷作为酪氨酸酶抑制剂具有良好的开发前景。大豆皂苷的酪氨酸酶抑制类型及抑制机理还需做进一步的研究。

对豆渣中大豆皂苷的微波辅助法提取条件的优化及对大豆皂苷的酪氨酸酶抑制活性的研究,为实现大豆功能的进一步开发和最大化利用提供了依据,对大豆产品的深加工及多元化具有重要意义。

参考文献

- [1] 吴素萍,田立强.大豆皂苷的生理功能及其提取纯化的研究现状[J].大豆科学,2008,27(5):883-887. (Wu S P, Tian L Q. Research status of extraction and purification and physiological functions of soybean saponin[J]. Soybean Science, 2008, 27(5): 883-887.)
- [2] Zhang W, Yeo M C, Tang F Y, et al. Bioactive responses of Hep-G2 cells to soyasaponin extracts differs with respect to extraction conditions[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(9): 2202-2208.
- [3] Hsu C C, Lin T W, Chang W W, et al. Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids[J]. Gynecologic Oncology, 2005, 96(2): 415-422.
- [4] Zhang W, Popovich D G. Chemical and biological characterization of oleanane triterpenoids from soy[J]. Molecules, 2009, 14(8): 2959-2975.

(下转第118页)

正常情况下,血管内皮细胞 iNOS 表达极少,而高糖、高胰岛素及细胞因子(肿瘤坏死因子,白介素等)均可刺激其高表达。iNOS 受刺激表达升高后,可产生大量 NO,且持续时间较长,T2DM 高水平的 NO 主要归因于 iNOS 的过度表达。iNOS 诱导合成的 NO 虽然在早期对糖尿病血管内皮产生过保护,但其大多数时候发挥的还是氧化损伤与细胞毒作用。并且 iNOS/NO 途径还会对 eNOS/NO 途径产生抑制,负反馈调节 eNOS 低表达^[9],参与血管功能紊乱的发生,在 T2DM 早期血管并发症发生、发展中发挥较为重要的作用。实验结果显示,模型组大鼠的 iNOS mRNA 表达明显高于正常组及给药组,说明 T2DM 大鼠血管病变早期存在 iNOS 过度表达的情况,其高 NO 水平也很可能归因于此。经淡豆豉提取物干预后,iNOS mRNA 的表达及 NO 的水平明显下降,说明淡豆豉可抑制 T2DM 大鼠主动脉 iNOS 的过度表达,并可能通过此途径降低 NO 水平。

通过对以上结果的综合分析,推测淡豆豉可能通过降低 T2DM 大鼠的血糖、胰岛素及 TNF- α 水平,抑制 iNOS 过度表达,降低 NO 水平,减轻其过氧化损伤及细胞毒作用,从而对 T2DM 大鼠的大血管产生保护性作用。

参考文献

- [1] 牛丽颖,常淑凤,刘娇,等. 淡豆豉正丁醇提取物对糖尿病大鼠血糖及糖耐量的影响[J]. 时珍国医国药,2008,19(6):1398-1399. (Niu L Y, Chang S F, Liu J, et al. Effect of n-butanol extracts from Semen Sojae Praeparatum on blood glucose and glucose tolerance in diabetic rats [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 19(6):1398-1399.)
- [2] 白霞,牛丽颖,刘娇,等. 淡豆豉防治早期动脉粥样硬化大鼠血管损伤的机制研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(1):170-171. (Bai X, Niu L Y, Liu J, et al. Effect and mechanism of Semen Sojae Praeparatum on vascular injury in early atherosclerosis rats [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2008, 19(1):170-171.)
- [3] 牛丽颖,刘娇,崔力剑,等. 淡豆豉对早期动脉粥样硬化大鼠血管内皮损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2007,23(5):120-122. (Niu L Y, Liu J, Cui L J, et al. The protective effect of Semen Sojae Praeparatum on vascular injury in early atherosclerosis rats [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Material Medica, 2007, 23(5):120-122.)
- [4] Kanbak G, Akalin A, Dokumacioglu A, et al. Cardiovascular risk assessment in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome: role of biomarkers [J]. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 2011, 5:7-11.
- [5] Makino N, Maeda T, Sugano M, et al. High serum TNF- α level in type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells [J]. Journal of Diabetes and its Complication, 2005, 19:347-355.
- [6] Kobayashi T, Kamata K. Effect of chronic insulin treatment on NO production and endothelium-dependent relaxation in aortae from established STZ-induced diabetic rats [J]. Atherosclerosis, 2001, 155:313-320.
- [7] 赵怀兵,党瑜华. 诱导型一氧化氮合酶对大鼠心肌梗死后心室重构的影响[J]. 中国临床康复,2006,10(16):46-48. (Zhao H B, Dang Y H. Effect of inducible nitric oxide synthase on ventricular remodeling in rats after myocardial infarction [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(16):46-48.)
- [8] 何敏,徐济良,吴锋. 2 型糖尿病大鼠主动脉内皮细胞氧化损伤及缬沙坦的保护作用[J]. 中国药理学通报,2007,23(3):354-358. (He M, Xu J L, Wu F. Aortic endothelial cells injury induced by oxidative stress in type 2 diabetes rats and the protective effect of valsartan [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007, 23(3):354-358.)
- [9] Malvshev E, Poirel O, Moreau R. Interaction between eNOS and iNOS in aortas and superior mesenteric arteries in portal hypertensive rats [J]. De Biologie Vasculaire, 2003, 38:63.
- [5] Ye Y, Chou G X, Mu D D, et al. Screening of Chinese herbal medicines for antityrosinase activity in a cell free system and B16 cells [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 129(3):387-390.
- [6] Yoon K N, Alam N, Lee K R, et al. Antioxidant and antityrosinase activities of various extracts from the fruiting bodies of *Lentinus lepideus* [J]. Molecules, 2011, 16(3):2334-2347.
- [7] Chang L W, Juang L J, Wang B S, et al. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(4):785-790.
- [8] Zhu Y J, Song K K, Li Z C, et al. Antityrosinase and antimicrobial activities of trans-cinnamaldehyde thiosemicarbazone [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(12):5518-5523.
- [9] 徐光域,颜军,郭晓强,等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学,2005,26(8):342-346. (Xu G Y, Yan J, Guo X Q, et al. The betterment and apply of phenol-sulphate acid method [J]. Food Science, 2005, 26(8):342-346.)
- [10] 李华. 大豆残渣中大豆皂苷含量的分析方法[J]. 分析实验室, 2008, 27(S1):333-334. (Li H. Analysis methods of soyasaponin in soya bean leavings [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2008, 27(S1):333-334.)
- [11] Chen Q X, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by Quercetin [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, 50(14):4108-4112.
- [12] 杜志云,徐学涛,潘文龙,等. 姜黄素类化合物及姜黄素衍生物对酪氨酸酶抑制作用的研究[J]. 日用化学工业,2008,38(3):172-175. (Du Z Y, Xu X T, Pan W L, et al. Study of inhibition of curcuminoids and curcumin derivatives on tyrosinase [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2008, 38(3):172-175.)
- [13] 陈燕军,张毅贞,卢汝梅,等. 正交试验法优选从豆制品下脚料中提取大豆皂苷的工艺[J]. 中草药,2001,32(7):602-604. (Chen Y J, Zhang Y Z, Lu R M, et al. Optimization of processes for recovery of soyasaponins from bean product waste by orthogonal design [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2001, 32(7):602-604.)

(上接第 114 页)