

黑豆豆芽中大豆异黄酮微波提取工艺研究

郭 婕, 胡利宗, 李俐俐, 盛东峰

(周口师范学院 生命科学与农学院, 河南 周口 466001)

**摘 要:**以黑豆为原料,按照一定条件萌发处理。利用微波辅助提取法,通过对料液比、乙醇浓度、微波处理时间、微波功率进行单因素和正交试验,探讨黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响因素,并优化筛选其最佳提取工艺条件。结果表明:影响大豆异黄酮提取率的因素顺序为:微波处理时间 > 料液比 > 微波功率 > 乙醇浓度。黑豆豆芽中大豆异黄酮的最佳微波提取工艺为:料液比 1:25、乙醇浓度 50%、微波处理 4 min、微波功率为 450 W。在此条件下,黑豆豆芽中大豆异黄酮的提取率为 0.595%。

**关键词:**黑豆; 豆芽; 大豆异黄酮; 微波提取

**中图分类号:**TS214;TQ28      **文献标识码:**A      **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.03.0493

Extraction Technology of Soybean Isoflavones from Black Soybean Sprouts Using Microwave-assisted Extraction

GUO Jie, HU Li-zong, LI Li-li, SHENG Dong-feng  
(College of Life Science and Agronomy, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

**Abstract:** Black soybeans was pre-treated under certain conditions being soaked at 30℃ for 15 h and germination at 25℃ for 72 h. The influence factors impacting extraction yield of soybean isoflavones from black soybean sprouts were explored, and the optimal extraction conditions using microwave-assisted extraction were optimized by single factor and orthogonal experiment, which included solid-liquid ratio, ethanol concentration, microwave-heating time and microwave power. The results showed that the order of different influence factors on yield was microwave-heating time > solid-liquid ratio > microwave power > ethanol concentration. The optimal conditions were as follows: the 1:25 ratio of solid-liquid, 50% ethanol, extracting for 4 min, microwave power was 450 W. The yield of soybean isoflavones was up to 0.595% under those conditions.

**Keywords:** Black soybean; Soybean sprouts; Soybean isoflavones; Microwave-assisted extraction

黑豆为豆科植物大豆的黑色种子,味甘性平。黑豆营养丰富,含有蛋白质、脂肪、维生素、微量元素等多种营养成分,具有防老抗衰、抗氧化等多种功能,药食俱佳。其药用机理与所含有的多种生物活性物质有关,异黄酮的作用尤为突出<sup>[1]</sup>。黑豆芽具有黑豆的各种营养成分,且黑豆在发芽过程中能够提高大豆异黄酮的生理活性。

微波辅助技术具有提取时间短、提取率高、操作方便等优点<sup>[2]</sup>,由于其特殊的加热模式,在植物有效成分的提取中,利用微波辅助已是研究的热点。我国具有丰富的黑豆资源,加工制备黑豆制品具有丰富的原料,为此,本试验将黑豆在适宜条件下萌发,以大豆异黄酮含量为指标,利用微波辅助法,通过单因素试验分析料液比、乙醇浓度、微波处理时间、微波功率对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响,并在此基础上进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验优化筛选黑豆豆芽中异黄酮的最佳提取工艺条件。旨在为黑豆豆芽的药用研究及综合开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料为市售黑豆。试剂主要有染料木素(上海

金穗生物科技有限公司, HPLC ≥ 98%)、无水乙醇、正己烷、次氯酸钠,均为分析纯。

1.2 主要仪器

UV-5100 型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);实验室微波炉(南京杰全微波设备有限公司);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);高速万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.3 原料的处理

挑选成熟饱满未破损的黑豆,10% 次氯酸钠消毒处理 5 min,蒸馏水清洗 4 次,30℃ 恒温培养箱中浸泡 15 h,转移至底部铺有 3 层纱布的培养皿中,加入适量的蒸馏水,在 25℃ 的恒温培养箱中培养萌发 72 h,去种皮,低温烘干<sup>[3]</sup>。

1.4 黑豆豆芽中大豆异黄酮的提取及含量测定

1.4.1 黑豆豆芽中大豆异黄酮提取工艺流程 低温干燥的黑豆豆芽,粉碎,称重→正己烷脱脂(料液比 1:3)2 次→低温干燥,粉碎,过 80 目筛→准确称取 2 g→加入乙醇,室温浸泡 1 h,微波提取 2 次→抽滤→合并提取液→定容至一定体积→260 nm 处测

收稿日期:2014-07-05  
基金项目:周口师范学院大学生科研创新基金项目(ZKNUDXS2014-021);河南省高等学校重点科研项目(15A180065)。  
第一作者简介:郭婕(1984-),女,硕士,讲师,主要从事天然药物化学的研究与开发。E-mail: guojie-1023@163.com。

吸光度。

1.4.2 大豆异黄酮标准曲线的绘制 分别移取 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 mL 浓度为  $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的染料木素标准溶液, 置于各试管中, 加 70% 乙醇定容至 10 mL, 摇匀, 以 70% 乙醇调零, 在 260 nm 处测定吸光度<sup>[4]</sup>。以待测试管中染料木素的浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线, 并作回归处理, 得回归方程  $Y=0.116\ 6X-0.001\ 5$ ,  $R^2=0.998\ 8$ 。

1.4.3 黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的测定 从稀释的样品提取液中各取 1 mL, 置于 10 mL 的试管中, 依照上述方法处理, 于波长 260 nm 处测定吸光度。按照以下公式计算黑豆豆芽异黄酮的提取率。

黑豆豆芽异黄酮的提取率(%) =  $cVK\times10^{-4}/W$   
式中:  $c$  为测量液中异黄酮的浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ );  $V$  为提取液的体积 (mL);  $K$  为提取液稀释的倍数;  $W$  为原料的干重 (g)。

1.4.4 单因素试验 料液比的筛选: 以 70% 乙醇为提取剂, 微波功率 450 W, 微波处理 2 min, 研究不同料液比对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响。乙醇浓度的筛选: 在料液比 1:25, 微波功率为 450 W, 微波处理 2 min 条件下, 研究不同乙醇浓度对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响。微波处理时间的筛选: 以 50% 乙醇为提取剂, 料液比 1:25, 微波功率为 450 W, 研究不同微波处理时间对黑豆豆芽

中大豆异黄酮提取率的影响。微波功率的筛选: 以 50% 乙醇为提取剂, 料液比 1:25, 微波处理 3 min, 研究不同微波功率对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比的选择 由图 1 可知, 料液比从 1:15 增至 1:25 时, 大豆异黄酮提取率随着料液比增加而增加, 在料液比为 1:25 时, 黑豆豆芽中大豆异黄酮的提取率达到最高为 0.446%, 随后提取率逐渐下降。当提取剂过少时, 固液相中有效成分的浓度差偏小<sup>[5]</sup>, 大豆异黄酮不能充分溶入液相中; 而料液比继续增加, 溶剂对微波能量的吸收增加, 细胞对微波能量的吸收减少, 细胞壁破裂程度相对减少, 大豆异黄酮从细胞中溶出量减少<sup>[6]</sup>。故初步选择料液比为 1:25。

2.1.2 乙醇浓度的选择 由图 2 可知, 乙醇浓度从 30% 增至 50% 时, 黑豆豆芽中大豆异黄酮的提取率随之升高, 乙醇浓度至 50% 时, 提取率达到最高为 0.457%; 之后随乙醇浓度增加, 大豆异黄酮提取率呈下降趋势。大豆异黄酮溶解性与结构有关, 乙醇浓度过低或过高对大豆异黄酮的提取均有不同程度的抑制作用<sup>[7]</sup>, 故初步选择乙醇浓度为 50%。

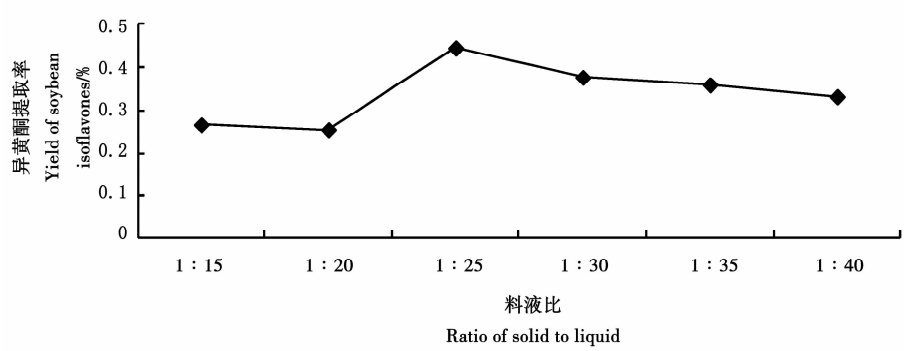


图 1 料液比对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响  
Fig. 1 Effect of solid to liquid ratio on the extraction yield of soybean isoflavones

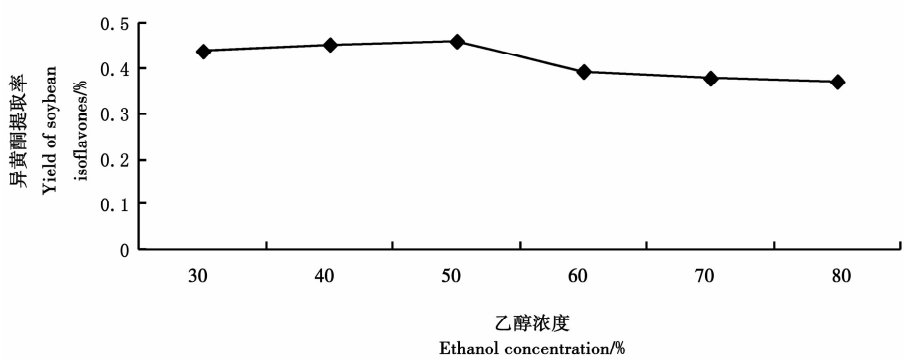


图 2 乙醇浓度对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响  
Fig. 2 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of soybean isoflavones

2.1.3 微波处理时间的选择 由图3可知,微波时间在3 min内,黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率随时间增加而升高,当微波处理3 min时,提取率达到最高为0.49%。但随着微波时间延长,异黄酮提取率下降,原因是异黄酮不稳定易分解。故初步选择微波时间为3 min。

2.1.4 微波功率的选择 由图4可知,随着微波功

率从150 W增至750 W,黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率逐渐增大后有所下降,在300 W时,提取率达到最高为0.543%。其原因是微波功率过低时,细胞壁破坏的效果不显著,大豆异黄酮提取量低;随着微波功率增大,细胞膜破坏程度加大。但微波功率太大时,温度过高,容易破坏有效成分的分子结构<sup>[8]</sup>,使提取率下降。初步选择微波功率为300 W。

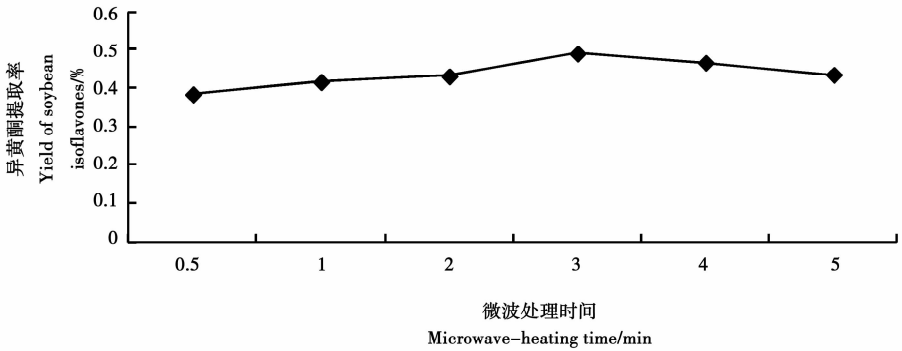


图3 微波处理时间对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响  
Fig.3 Effect of microwave-heating time on the extraction yield of soybean isoflavones

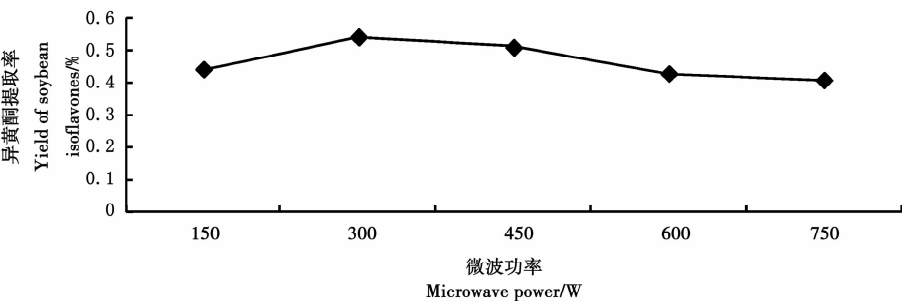


图4 微波功率对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响  
Fig.4 Effect of microwave power on the extraction yield of soybean isoflavones

2.2 正交试验优化

2.2.1 正交试验优化 在单因素试验的基础上采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表对以上四因素进行正交试验进一步优化,确定黑豆豆芽中大豆异黄酮的最佳提取工艺条件。因素水平安排见表1。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test				
水平 Level	因素 Factors			
	A 料液比	B 乙醇浓度	C 微波时间	D 微波功率
	Solid to liquid ratio	Ethanol concentration/%	Microwave-heating time/min	Microwave power/W
1	1:20	40	2	150
2	1:25	50	3	300
3	1:30	60	4	450

2.2.2 正交试验结果 正交试验结果表2显示,通过正交试验结果极差分析,影响黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的顺序为:微波处理时间>料液比>微波功率>乙醇浓度。方差分析表3显示各因素对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率均有一定影响,其中微波处理时间对黑豆豆芽中大豆异黄酮的提取率影响表现显著(P<0.05)。综合方差和极差分析得出最佳组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即黑豆豆芽中大豆异黄酮的最佳提取工艺为:料液比1:25、50%乙醇、微波处理4 min、微波功率为450 W。为进一步验证上述结果,按照最佳提取工艺条件组合,重复3次,进行验证性试验,所得黑豆豆芽中大豆异黄酮的提取率分别为0.568%、0.641%、0.577%。故最佳提取工艺条件下,黑豆豆芽中大豆异黄酮的提取率为0.595%。

表 2 正交试验结果  
Table 2 Results of orthogonal test

试验号 No.	因素 Factors				
	A 料液比 Solid to liquid ratio	B 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	C 微波时间 Microwave-heating time/min	D 微波功率 Microwave power/W	提取率 Extraction yield/%
1	1(1:20)	1(40)	1(2)	1(150)	0.401
2	1	2(50)	2(3)	2(300)	0.355
3	1	3(60)	3(4)	3(450)	0.498
4	2(1:25)	1	2	3	0.445
5	2	2	3	1	0.549
6	2	3	1	2	0.398
7	3(1:30)	1	3	2	0.428
8	3	2	1	3	0.421
9	3	3	2	1	0.339
k1	0.418	0.425	0.407	0.430	
k2	0.464	0.442	0.380	0.394	
k3	0.396	0.412	0.492	0.455	
极差 R	0.068	0.03	0.112	0.061	

表 3 提取率方差分析

Table 3 Variance analysis of the extraction yield

因素 Factor	偏差平方和 Sum of deviation square	自由度 Freedom	F 比 Ratio	F 临界值 Critical value	显著性 Significance
A	0.007	2	7.000	19.000	
B	0.001	2	1.000	19.000	
C	0.020	2	20.000	19.000	$P < 0.05$
D	0.006	2	6.000	19.000	
误差 Error	0.00	2			

3 结 论

试验采用微波辅助法,以大豆异黄酮为指标,利用紫外分光光度法测定黑豆豆芽中大豆异黄酮的含量。通过单因素试验,分析料液比、乙醇浓度、微波处理时间和微波功率对黑豆豆芽中大豆异黄酮提取率的影响,并利用正交试验优化最佳提取工艺条件。结果显示,微波处理时间对大豆异黄酮的提取率影响显著。其最佳提取工艺是:料液比1:25、50%乙醇、微波处理 4 min、微波功率为 450 W。在此条件下黑豆豆芽中大豆异黄酮的提取率最高,为 0.595%。微波辅助提取法与常规的溶剂提取法相比,在提高大豆异黄酮的提取率、节省时间等方面体现出了明显的优势,可为黑豆豆芽大豆异黄酮的开发应用及工业化生产提供理论基础。

参考文献

[1] 张花利,冯进,董晓娜,等. 黑豆皮中黄酮提取及粗提物抑菌效果研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 497-501. (Zhang H

L, Feng J, Dong X N, et al. Extraction of flavonoids from the peel of black bean and bacteriostatic effect of crude extractings[J]. Soybean Science, 2011, 30(3): 497-501. )  
[2] 高岐,刘宏文. 洋葱中总黄酮的微波提取法[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 218-219. (Gao Q, Liu H W. Study on microwave extraction of total flavonoids from allium cepa[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(1): 218-219. )  
[3] 翟玮玮. 黑豆发芽条件及其异黄酮提取物特性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 186-189. (Zhai W W. Study on germination conditions of black bean and antioxidant activity of its isoflavones extract[J]. Food Science, 2008, 29(9): 186-189. )  
[4] 顾建明,潘春云. 大豆异黄酮的测定方法及其评价[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2007, 13(6): 741-745. (Gu J M, Pan C Y. Analytical approach of soybean isoflavones and its evaluation[J]. Journal of Shanghai University (Natural Science), 2007, 13(6): 741-745. )  
[5] 上官新晨,陈木森,蒋艳,等. 微波提取青钱柳多糖的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(5): 6-9. (Shangguan X C, Chen M S, Jiang Y, et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal) *ljinskaja* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(5): 6-9. )  
[6] 仇燕. 菜芙蓉花中总黄酮微波提取的研究[J]. 中药材, 2006, 29(4): 387-390. (Qiu Y. Study of microwave-assisted extraction on total flavones content in *Hibiscus manihot* L. flower [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2006, 29(4): 387-390. )  
[7] 何恩铭,李惠华,常强,等. 超声波法提取豆渣中大豆异黄酮的工艺研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(4): 680-682. (He E M, Li H H, Chang Q, et al. A preliminary study on extraction of soybean isoflavones from soybean dregs by ultrasound method[J]. Soybean Science, 2011, 30(4): 680-682. )  
[8] 田成,程超. 鸭跖草水溶性多糖的微波辅助提取[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(8): 98-100. (Tian C, Cheng C. The microwave-assistance extraction technology of water-soluble polysaccharide of common dayflower[J]. Food Research and Development, 2007, 28(8): 98-100. )