酱油渣异黄酮抗氧化功效成分纯化研究

黄福气[1]，于志成[1]，刘步青[1]，许 宙[1]，焦 叶[1]，
崔 波[2]，邹飞雪[2]，藏庆佳[3]，程云辉[*1,2]

（1. 长沙理工大学 化学与食品工程学院，湖南 长沙 410114；2. 齐鲁工业大学（山东省科学院）食品科学与工程学院，山东 济南 250353；3. 烟台双塔食品股份有限公司，山东 烟台 265404）

摘要：以酱油渣为原料，采用乙醇提取法提取酱油渣中大豆异黄酮，对提取条件进行了优化。比较了醇沉法、等电点沉淀法、浓缩离心法、正丁醇法、二氯甲烷法、乙酸乙酯萃取法等 6 种方法对异黄酮粗提物的纯化效果。通过高效液相鉴定了纯化产物的异黄酮单体组成，并采用邻苯三酚氧化法和 DPPH 法评价了异黄酮纯化物的体外抗氧化活性。结果表明：优化条件下提取的异黄酮粗提物中异黄酮质量分数为 1.21%、提取率为(85.36±0.09)%。6 种纯化方法中，浓缩离心法所得异黄酮产物中异黄酮纯度为 7.75%，去除蛋白质效果最佳；二氯甲烷萃取法所得异黄酮产物中异黄酮纯度为 27.74%，去除总糖和灰分效果最佳；两者联用后所得纯化产物的异黄酮纯度为 44.88%，其主要由染料木素、大豆黄素和大豆素组成，质量分数分别为 67.37%、9.33%、23.30%。在质量浓度为 1 mg/mL 时，异黄酮纯化物对超氧阴离子、DPPH 自由基的清除率分别为 67.65%、89.18%，显著高于异黄酮粗提物（$P<0.05$），其 IC_{50} 分别为 0.34、0.26 mg/mL，说明异黄酮纯化物具有一定的抗氧化活性，有望作为一种潜在的天然抗氧化剂应用于功能性食品中。

关键词：大豆异黄酮；提取；纯化；酱油渣；抗氧化活性

中图分类号：TS 210.9　**文章编号：**1673-1689(2020)10-0082-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.10.011

Purification of Isoflavones from Soy Sauce Residue and Characterization of Antioxidant Components

HUANG Fuqi[1]，*YU Zhicheng*[1]，*LIU Buqing*[1]，*XU Zhou*[1]，*JIAO Ye*[1]，
CUI Bo[2]，*ZOU Feixue*[2]，*ZANG Qinjia*[3]，*CHENG Yunhui*[*1,2]

（1. School of Chemical and Food Engineering , Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China; 2. School of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, China; 3. Yantai Shuangta Food Co. Ltd, Yantai 265404, China）

Abstract: The soybean isoflavone was firstly extract from soy sauce residue by ethanol extraction method, and the extraction conditions were optimized. The crude isoflavone extract was further purified by 6 methods including alcohol precipitation, isoelectric precipitation, concentrated centrifugation, n-butanol, dichloromethane, and ethyl acetate extraction. Finally, the composition of isoflavone monomer after purification was identified by high performance liquid phase, and its in

收稿日期：2020-02-21

基金项目：国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFD0400405)。

*通信作者：程云辉(1964—)，女，博士，教授，主要从事功能性食品研究。E-mail：chengyh6488@sina.com

vitro antioxidation was evaluated by the pyrogallol oxidation and DPPH methods. The optimized extraction of crude isoflavone yielded the isoflavone content of 1.21% and the extraction rate of (85.36 ±0.09)% . Among the 6 purification methods, the isoflavone content obtained by the concentrated centrifugation method was 7.75% with best removal of protein. The isoflavone content obtained by the dichloromethane extraction method was 27.74% with best removal of total sugar and ash. The purity of the isoflavone was 44.88% when the two methods combined, and it was composed by genistein, glycintein and daidzein, accounting for 67.37% and 9.33%, 23.30%, respectively. The scavenging rates of purified isoflavones (1 mg/mL) to superoxide and DPPH free radicals were 67.65% and 89.18%, which were significantly higher than isoflavones crude extracts (P<0.05). And their IC_{50} were 0.34 and 0.26 mg/mL. The isoflavone purified products achieve certain antioxidant activity, expected to be used as potential natural antioxidants in functional foods.

Keywords: soy isoflavones, extraction, purification, soy sauce residue, antioxidant activity

酱油发酵后经淋油或抽油产生的剩余残渣即为酱油渣[1]。据中国调味品协会统计，仅 2017 年我国酱油产量接近 860 万吨[2]，按照每生产 1 吨酱油产生 0.67 吨酱油渣计算[3]，酱油渣年产生量可达 580 万吨。酱油渣中不仅含有蛋白质、脂肪、糖类等营养成分[4]，还含有大量的大豆异黄酮、皂苷、低聚糖、膳食纤维、磷脂等生物活性物质，是一种廉价的生物资源，尤其是其中的大豆异黄酮，它主要以苷元形式存在，具有很好的生物活性[5]。然而，国内大多将酱油渣用作价格低廉的饲料或肥料，甚至当作废渣丢弃，造成了严重的资源浪费和环境污染[6]。因此，酱油渣中异黄酮类化合物提取工艺及纯化方法的研究具有非常重要的意义。

大豆异黄酮属于黄酮类化合物中的异黄酮类，是大豆生长过程中的主要次级代谢产物之一[7-10]，同时还是一种天然植物雌激素，具有多种生物活性作用。大豆异黄酮除具有抗氧化作用外[11]，还有改善妇女更年期综合征[12-13]、预防心血管疾病、预防骨质疏松[14]、抗癌[15]、抗炎[16-17]、抗菌[18]等作用，在保健品、医药、化妆品等领域被广泛应用。有研究表明酱油渣中异黄酮抗氧化活性高于大豆[19]，而且异黄酮不溶于水的特点使其在酱油酿造过程中仅有小部分异黄酮流失，大部分异黄酮仍残存于酱油渣中[20]。因此，采用合适的提取纯化方法从酱油渣中提取异黄酮，可使酱油渣资源得到更高值化利用。沈春华[21]利用超声波结合乙醇提取法从酱油渣中提取大豆异黄酮，所获得的异黄酮粗提物中异黄酮质量分数为 1.09%。何隽婷等[22]采用 NKA9 树脂对酱油渣中大豆异黄酮进行纯化，所得到的产品纯度可达到 32%，但仍然不能满足商品化异黄酮纯度不低于 40%的市场要求。

作者以酱油渣为原料，拟采用乙醇溶剂提取法，通过单因素试验优化提取条件；从 6 种方法中筛选出效果较佳的方法进行联用，以提高异黄酮产品纯度。同时通过对超氧阴离子和 DPPH 自由基清除能力的考察对其抗氧化性能进行评价，为进一步开发利用酱油渣资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

酱油渣由加加酱油集团提供；大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木素、大豆黄素、大豆黄苷（纯度均大于 98%）：中国科学院成都生物研究所产品；乙腈（色谱纯）、甲酸（色谱纯）、乙酸乙酯（分析纯）、二氯甲烷（分析纯）、正丁醇（分析纯）：国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 仪器与设备

FA2004N 电子分析天平：上海精密科学仪器有限公司产品；HH 数显恒温水浴锅：金城国胜实验仪器厂产品；旋转蒸发仪：上海常豫仪器有限公司产品；LGJ-18C 冷冻干燥机：北京四环科学仪器厂有限公司产品；TDL-5-A 离心机：上海安亭科学仪器有限公司产品；TG16-WS 台式高速离心机：湘仪离心机仪器有限公司产品；UV1800 紫外可见分光光度计：日本岛津公司产品；Waters 2695 高效液相色谱仪：美国 Waters 公司产品；KQ5200B 型超声波清

洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;新型密封式粉碎机:上海烨昌食品机械有限公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 酱油渣的预处理 将酱油渣在 60 ℃烘箱中烘干,再用粉碎机将其粉碎(过 60 目筛),脱脂,干燥备用。

1.3.2 酱油渣中基本成分的测定 水分质量分数的测定:参考《GB 5009.3-2016》恒重法;蛋白质质量分数的测定:参考《GB/T 6432-2018》的凯氏定氮法;脂肪质量分数的测定:参考《GB 5009.6-2016》的索氏提取法;灰分质量分数的测定:参考《GB 5009.4-2016》的干法灰化;总糖质量分数的测定:参考《GB/T 15672-2009》的苯酚硫酸法。

1.3.3 大豆异黄酮含量的测定

1)HPLC 测定条件 参考文献[23],稍有修改。色谱柱:XBridge® C18;流动相:体积分数 0.1%甲酸溶液(A)、乙腈(B);流量:0.3 mL/min;检测波长:260 nm;进样量:10 μL;柱温:30 ℃;梯度洗脱:0~3 min,流动相 B:体积分数 5%;3~10 min,流动相 B:15%;10~12 min,流动相 B:32.5%;12~13 min,流动相 B:100%;13~15 min,流动相 B:5%;15~22 min,流动相 B:5%。

2) 标准曲线的制作 分别取适量大豆异黄酮标准品和酱油渣样品用体积分数 80%甲醇定容至 10 mL,用 0.45 μm 的膜过滤标准品溶液和样品溶液,进行 HPLC 分析,以峰面积(Y)为纵坐标,标准品质量浓度(X,mg/L)为横坐标,分别绘制标准曲线,得到大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素 6 种异黄酮单体的标准曲线及回归方程。6 种大豆异黄酮在质量浓度 8~40 mg/L 范围内均呈良好线性关系。

酱油渣中大豆异黄酮主要由染料木素、大豆素、黄豆黄素、染料木苷组成。作者以染料木素、大豆素、黄豆黄素、染料木苷 4 种大豆异黄酮单体的总和来表示酱油渣大豆异黄酮的总量。

1.3.4 大豆异黄酮提取条件优化 称取 5 g 酱油渣,液料体积质量比 12 mL:1 g,加入体积分数为 70%的乙醇溶液,在 70 ℃条件下提取 4 h。选取乙醇体积分数、提取温度、提取时间、液料体积质量比为考察因素,其中,乙醇体积分数分别为 50%、60%、70%、80%、90%、95%,提取温度分别为 30、40、50、60、70、80 ℃,提取时间分别为 1、2、3、4、5、6 h,液料体积质量比分别为 4、6、8、10、12、14、16 mL/g。提取完成后,将提取液离心(3 500 r/min,10 min),取上清液定容,过 0.45 μm 微孔滤膜后进行 HPLC 分析,计算酱油渣中大豆异黄酮的提取率,计算公式如下:

$$Y=\frac{CV}{M}\times 100 \quad (1)$$

式中:Y 为大豆异黄酮提取率(%);C 为定容后异黄酮提取液中总大豆异黄酮质量浓度 (mg/L);V 为异黄酮提取液经离心、定容后的体积(L);M 为所用 5 g 酱油渣中大豆异黄酮总质量(mg)。

1.3.5 酱油渣中大豆异黄酮的纯化方法

1)醇沉法[24](简称 EP) 称取酱油渣 100 g,按 1.3.4 的最佳提取条件得到大豆异黄酮粗提液,将所得到的异黄酮粗提液经旋转蒸发浓缩去除乙醇溶剂后冷冻干燥,得到异黄酮粗提物,取之加入 1 000 mL 的纯乙醇,4 ℃静置 5 h 后过滤,通过旋转蒸发,浓缩,将浓缩液冷冻干燥获得醇沉法大豆异黄酮纯化产物。

2)等电点沉淀法[25](简称 IS) 称取酱油渣 100 g,按 1.3.4 的最佳提取条件得到大豆异黄酮粗提液,将粗取液 pH 调至 4.5,置于 4 ℃的冰箱中放置 48 h 后,3 500 r/min 离心 20 min,取上清液浓缩、冷冻干燥,得到大豆异黄酮纯化产物。

3)浓缩离心法[26](简称 CCF) 称取酱油渣 100 g,按 1.3.4 的最佳提取条件得到大豆异黄酮粗提液,将粗提液至于浓缩至原体积的 1/4,然后将浓缩液在 4 000 r/min 条件下离心,离心后快速倒出上清液,而沉淀中加入 100 mL 冷水,均匀搅拌混合 20 min,再次离心,倒出水洗液,得到沉淀,将异黄酮沉淀冷冻干燥,得到浓缩离心法大豆异黄酮纯化产物。

4)溶剂萃取法[27] 分别准确称取 3 份酱油渣 100 g,按 1.3.4 的最佳提取条件得到大豆异黄酮粗提液,将粗取液浓缩回收乙醇,将浓缩液倒入锥形瓶中,分别加入等体积的乙酸乙酯、正丁醇、二氯甲烷,500 r/min 下搅拌 0.5 h 后,转移至分液漏斗中静止 1 h,分液,萃取 3 次,合并 3 次萃取的有机溶剂相,对其进行真空浓缩,回收有机溶剂,并用适量的蒸馏水洗涤浓缩液,将浓缩液冷冻干燥,从而获得大豆异黄酮纯化产物。

5) 浓缩离心法与二氯甲烷萃取法联用 (简称 CCF-DCM):首先称取酱油渣 100 g,按 1.3.4 的最佳提取条件得到大豆异黄酮粗提液,然后按照 1.3.5.3

中(2)的方法获得浓缩离心法大豆异黄酮产物,再将所得产物加入适量水使其分散于水中,用二氯甲烷萃取法进行处理,从而得到浓缩离心法与二氯甲烷萃取法联用大豆异黄酮纯化物(文中简称“异黄酮纯化物”)。

1.3.6 大豆异黄酮的纯度及回收率计算

$$大豆异黄酮纯度(\%)=\frac{M_1}{M_2}\times100\% \quad (2)$$

$$大豆异黄酮回收率(\%)=\frac{M_1}{C_1V_1}\times100\% \quad (3)$$

式中:M_1 为经纯化后所得纯化产物总异黄酮质量,(mg);M_2 为经纯化后所得纯化产物总质量,(mg);C_1 为 100 g 酱油渣经提取后所得异黄酮粗提液中异黄酮质量浓度,(mg/L);V_1 为 100 g 酱油渣经提取后所得异黄酮粗提液的总体积,(L)。

1.3.7 超氧阴离子清除能力的测定 采用邻苯三酚氧化法[28]测定。

1.3.8 DPPH 自由基清除能力的测定 采用 DPPH 法[29]测定。

2 结果与讨论

2.1 酱油渣成分分析

对原料酱油渣中的水分、蛋白质、脂肪、灰分、总糖等各项指标进行了测定,酱油渣原料(干基)中含有质量分数 0.35%的大豆异黄酮,而大豆中的质量分数在 0.2%左右[26],相比于大豆,酱油渣原料(干基)中大豆异黄酮的含量更高,这主要是因为大豆异黄酮难溶于水,因此在抽取酱油后,仍然有大量大豆异黄酮残留在酱油渣中。然而,酱油渣原料(干基)中还含有较多的杂质,其蛋白质质量分数高达 32.57%,脂肪质量分数达 8.48%,灰分及总糖质量分数达 26.53%,此分析结果可为异黄酮提取纯化方法的选用提供依据。

2.2 酱油渣大豆异黄酮的提取

2.2.1 大豆异黄酮提取条件的优化 基于操作流程简单、提取率高、毒性小及容易回收溶剂等优点,作者采用乙醇提取酱油渣中大豆异黄酮。分别考察了乙醇体积分数、提取温度、提取时间、液料体积质量比对异黄酮提取率的影响,结果如图 1 所示。当乙醇体积分数大于 90%时,提取率显著下降,而乙醇体积分数为 70%的提取率与体积分数 80%、90%的提取率没有显著性差异,见图 1(a);此变化趋势和沈春华等研究得到的结果相类似[21]。这可能是由于体积分数为 70%、80%、90%乙醇溶液的极性与大豆异黄酮的极性更相近,依据相似相容的原理,有较多的大豆异黄酮溶于乙醇溶液中。当提取温度超过 70 ℃时,大豆异黄酮的提取率显著下降,见图 1(b);出现此现象可能是由于温度过高,导致乙醇挥发和大豆异黄酮裂解,从而使得提取率下降。在 4 h 时提取率达到最大值,之后随着时间延长而显著下降,结果见图 1(c)。这可能是由于提取时间过长、高温导致大豆异黄酮氧化、降解,因此提取时间不宜过长。液料体积质量比在 4~12 mL/g 范围内,提取率增加显著,料液体积质量比达到 12 mL/g 之后,大豆异黄酮提取率无明显改变,见图 1(d)。这是因为在其他提取条件不变的情况下,相对大量的提取溶剂能够溶出更多的目标产物,当溶解达到平衡时,提取溶剂的量对大异黄酮的提取率影响不大,同时还会造成提取溶剂的浪费产生更多的成本。

综合考虑大豆异黄酮的提取率和提取成本,选取最佳提取条件为:乙醇体积分数 70 %、温度 70 ℃、时间 4 h、液料体积质量比 12 mL/g,以此条件进行 3 次平行试验得到大豆异黄酮提取率为(85.36±0.09)%,所得到的异黄酮粗提液经旋转蒸发浓缩去除乙醇溶剂后冷冻干燥,即可获得酱油渣大豆异黄酮粗提物(简称“异黄酮粗提物”)。

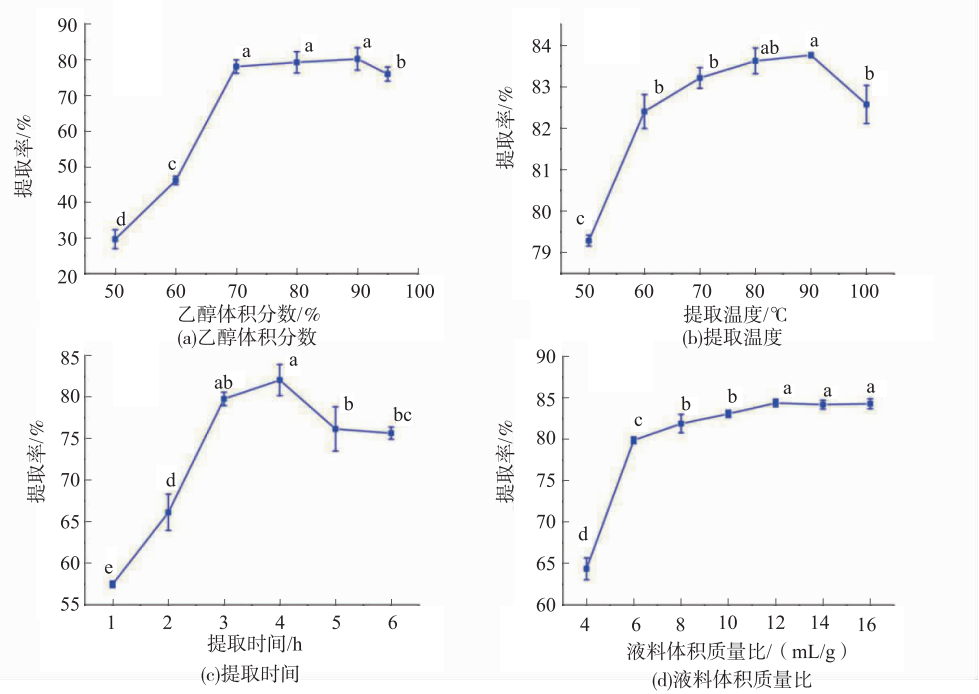
2.2.2 异黄酮粗提物基本成分分析 对异黄酮粗提物的基本成分进行测定,异黄酮粗提物中蛋白质、灰分、糖分的质量分数比较高,分别达到 27.97%、42.75%、8.28%,而异黄酮质量分数只有 1.21%,没有达到商品化异黄酮纯度的要求。因此,需对异黄酮粗提物进行除蛋白、灰分、总糖的处理,以提高大豆异黄酮的纯度。

2.3 酱油渣大豆异黄酮粗提物的纯化

据文献报道[24-27],醇沉法、等电点沉淀法、浓缩离心法能有效去除豆粉异黄酮粗提物和酱油渣异黄酮粗提物中的蛋白质,而二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取法具有去除豆粕、酱油渣异黄酮粗提液中灰分、糖分的效果。因此,作者选用这 6 种方法对异黄酮粗提物进行纯化处理。

2.3.1 6 种异黄酮纯化产物中的蛋白质、灰分、总糖质量分数的分析

1)6 种异黄酮纯化产物中蛋白质含量分析 比较了异黄酮粗提物和 6 种异黄酮纯化产物中蛋白



其中字母 a、b、c、d、e 之间有显著性差异。

图 1　乙醇体积分数、提取温度、提取时间、液料体积质量比对异黄酮提取率的影响

Fig. 1　Effect of ethanol concentration, extraction temperature, extraction time and liquid-solid ratio on extraction rate of isoflavones

质质量分数的变化情况，结果如图 2(a)所示。与蛋白质质量分数 27.97%的粗提物相比，浓缩离心法所得异黄酮产物中蛋白质质量分数下降到 10.84%，蛋白质去除率达 61.24%，在 6 种纯化方法中除蛋白质效果最好。这是由于异黄酮粗提液中的蛋白质主要以小分子蛋白质或肽类形式存在，而肽类的水溶性较好，大豆异黄酮水溶性较差，浓缩离心法水洗离心时可以沉淀大豆异黄酮，上清液可以溶解小分子蛋白质或多肽[30]。其他 5 种纯化方法所得异黄酮产物中蛋白质质量分数与粗提物相当，去除蛋白质效果差。因此，浓缩离心法可获得低蛋白质质量分数的异黄酮产物，合适用于去除蛋白质。

2)6 种异黄酮纯化产物中灰分质量分数的分析　比较了异黄酮粗提物和 6 种异黄酮纯化产物中灰分质量分数的变化情况，结果如图 2(b)所示。在 6 种纯化方法中，二氯甲烷萃取法所得的异黄酮产物中灰分质量分数最低，灰分去除率达到 87.23%，而醇沉法和等电点沉淀法所得异黄酮产物中灰分质量分数几乎没有变化。此外，浓缩离心法异黄酮产物中灰分质量分数下降到 11.72%，仅次于二氯甲烷萃取法，结合图 2(a)结果可知，浓缩离心法能同时去除蛋白质和灰分，可能因为在进行浓缩离心处理时粗提液的盐分也溶于上清液中，从而导致灰分质量分数下降。

3)6 种异黄酮纯化产物中总糖质量分数的分析　从图 2(c)可知，6 种纯化方法中浓缩离心法所得异黄酮产物中总糖质量分数最高，除糖效果最差。二氯甲烷萃取法所得异黄酮产物中总糖质量分数最低，仅有 3.15%，总糖去除率达到 61.91%，去除效果佳。此外，从图 2(b)可知，二氯甲烷萃取法去除灰分效果相对也是最好的，这可能是由于二氯甲烷溶液与大豆异黄酮皆属于弱极性物质，依据相似相容的原理，大部分的大豆异黄酮能溶于二氯甲烷溶液中[31]，而灰分、糖分等杂质仍然保留在浓缩粗提液中。

2.3.2　不同纯化方法所得大豆异黄酮纯化物的纯度及回收率分析　比较了酱油渣、异黄酮粗提物、6 种不同纯化方法和 CCF-DCM 联用法所得异黄酮纯化产物中异黄酮纯度及回收率变化情况，结果如图 3 所示。酱油渣和异黄酮粗提物的纯度为 0.35%和 1.21%，与之相比，6 种纯化方法所得异黄酮纯化产

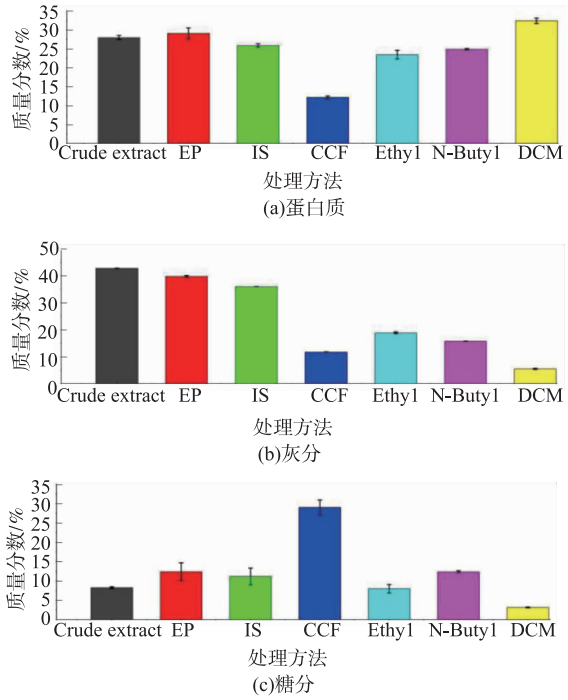


图 2　异黄酮粗提物和 6 种纯化产物中蛋白质、灰分、糖分的比较

Fig. 2　Comparison of protein content, ash content and sugar content in isoflavone crude extracts and 6 purified products

物中异黄酮纯度皆有不同程度提高,其中采用浓缩离心法所得纯化产物异黄酮的纯度达到 7.75%,二氯甲烷萃取法所得异黄酮纯化产物中异黄酮纯度最高,为 27.74%。因此,作者将浓缩离心法与二氯甲烷萃取法联用(CCF-DCM)对异黄酮粗提物进行纯化处理,联用后所得异黄酮纯化产物中的异黄酮纯度及回收率分别达到 44.88%和 53.36%,比异黄酮粗提物和酱油渣的异黄酮纯度分别提高 37 和 128 倍。CCF-DCM 联用法所得纯化物中异黄酮纯度及回收率高于董玲燕等采用 AB-8 型树脂纯化所得的酱油渣异黄酮纯化产物中异黄酮纯度(41.98%)及回收率(41.84%)的报道[25]。

比较了异黄酮粗提物和 CCF-DCM 联用测定异黄酮纯化物中灰分、总糖、蛋白质质量分数变化,结果如图 4 所示。与异黄酮粗提物相比,经 CCF-DCM 处理得到的异黄酮纯化产物中灰分、总糖、蛋白质质量分数分别从 42.75%、8.27%、27.97%下降到 0.88%、4.03%、4.99%,说明浓缩离心法与二氯甲烷萃取法联用后纯化效果更好,不仅操作简单,且所用二氯甲烷溶剂还能回收利用。

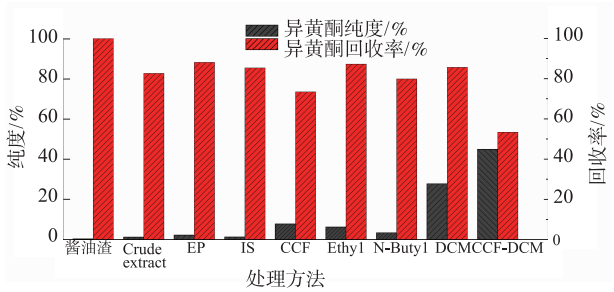


图 3　异黄酮粗提物、异黄酮纯化物和 6 种异黄酮纯化产物中异黄酮纯度及回收率的比较

Fig. 3　Comparison of purity and recovery of isoflavones in isoflavone crude extracts, isoflavone purified products and 6 isoflavone purified products

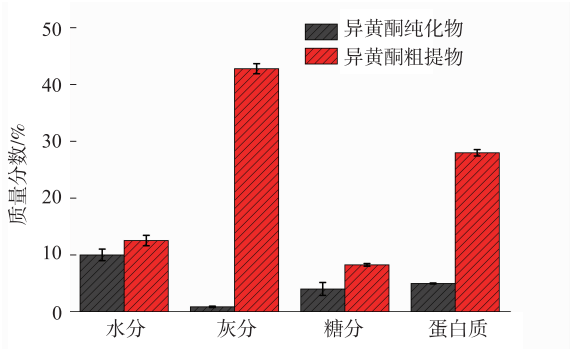


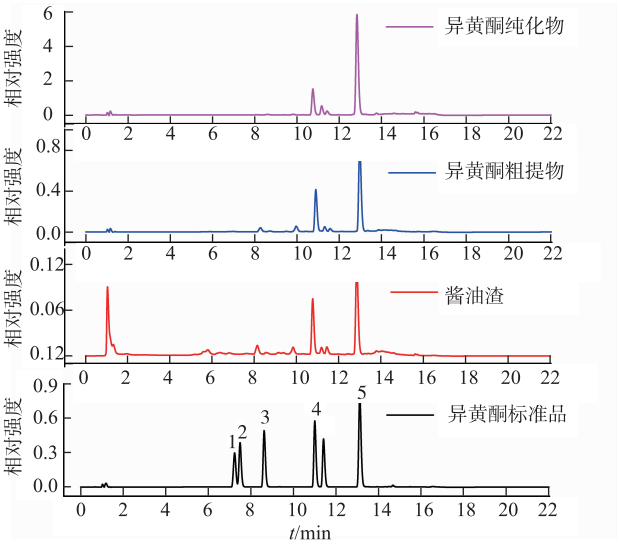
图 4　异黄酮粗提物与异黄酮纯化物中主要成分的比较

Fig. 4　Comparison of main components of isoflavone crude extract and isoflavone purified products

2.3.3　大豆异黄酮纯化物单体成分分析　酱油渣、异黄酮粗提物、CCF-DCM 异黄酮纯化物的 HPLC 色谱图如图 5 所示。纯化后酱油渣、异黄酮粗提物的杂峰被有效去除,CCF-DCM 异黄酮纯化物中异黄酮特征峰变化不大,且 4 种异黄酮单体(大豆素、大豆黄素、染料木素、染料木苷)均被得到很好保留,表明作者采用的乙醇提取、CCF-DCM 联用分离纯化酱油渣中异黄酮的方法可行。

酱油渣中的异黄酮主要由大豆素(1.45 mg/g)、大豆黄素(0.20 mg/g)、染料木素(1.69 mg/g)、染料木苷(0.02 mg/g)组成;异黄酮粗提物中异黄酮单体大豆素、大豆黄素、染料木素、染料木苷质量分数分别为5.06、0.57、5.96、0.52 mg/g;CCF-DCM 异黄酮纯化物中的异黄酮单体主要以糖苷配基型为主,大豆素、大豆黄素、染料木素质量分数分别为 104.57、

41.87、302.35 mg/g,均比纯化前显著提高,在总黄酮中所占比例分别为 23.30%、9.33%、67.37%,其中染料木素所占比例较纯化前提高显著(P<0.05),但未检测出染料木苷,这可能是由于纯化过程中糖苷型的染料木苷裂解为糖苷配基型的染料木素所致。



峰 1:大豆苷;峰 2:大豆黄苷;峰 3:染料木苷;峰 4:大豆素;峰 5:大豆黄素;峰 6:染料木素

图 5 酱油渣、异黄酮粗提物、CCF–DCM 异黄酮纯化物的 HPLC 色谱图

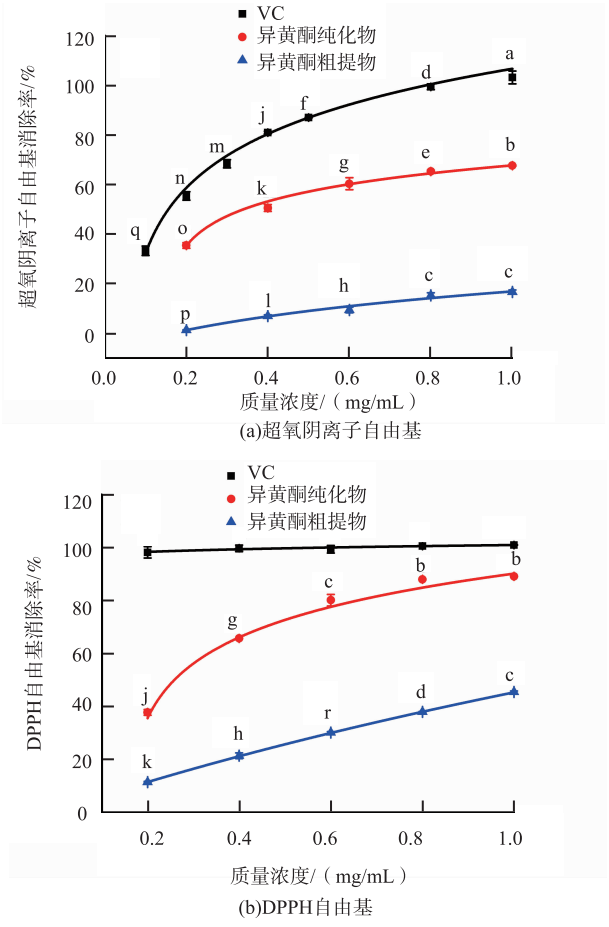
Fig. 5 HPLC chromatogram of soy sauce residue, isoflavone crude extract and CCF –DCM isoflavone purified products

2.4 异黄酮粗提物和 CCF–DCM 异黄酮纯化物的抗氧化活性分析

异黄酮类化合物普遍存在于自然界植物体内,具有多种生理活性,而这些生理活性大都建立在异黄酮化合物具有较强抗氧化活性的基础上[32-33]。因此,以 VC 为对照品,作者考察了异黄酮粗提物和 CCF–DCM 异黄酮纯化物对超氧阴离子自由基、DPPH 自由基的清除效果,结果如图 7 所示。

由图 6(a)可知,随着异黄酮粗提物和异黄酮纯化物质量浓度的提高,超氧阴离子自由基的清除率逐渐提高,且清除率和浓度之间存在一定的量效关系。相同质量浓度下,异黄酮纯化物对超氧阴离子自由基的清除效果显著优于异黄酮粗提物,但与 VC 有一定差距,质量浓度为 1 mg/mL 时,VC、异黄酮纯化物、异黄酮粗提物对超氧阴离子自由基的清除率分别为 99.83%、67.65%、16.75%(P<0.05)。

由图 6(b)可知,DPPH 自由基清除率也随着粗提物和纯化物质量浓度的提高而提高。质量浓度为 1 mg/mL 时,VC、异黄酮纯化物、异黄酮粗提物对 DPPH 自由基的清除率分别为 101.03%、89.18%、45.50%(P<0.05),说明异黄酮纯化物对 DPPH 自由基的清除能力显著优于异黄酮粗提物,稍弱于 VC。



字母 a、b、c、d、e 等之间有显著性差异。

图 6 不同质量浓度样品对超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基的清除率

Fig. 6 Scavenging rates of superoxide radicals and DPPH radicals by different mass concentration samples

同时,异黄酮纯化物超氧阴离子自由基、DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 0.34、0.26 mg/mL,显著低于异黄酮粗提物 IC_{50} 值 9.81、1.13 mg/mL(P<0.05),说明异黄酮粗提物经 CCF–DCM 纯化后具有更强的抗氧化活性。异黄酮纯化物抗氧化活性的提高可能是基于纯化过程中糖苷配基型异黄酮(染料木素)得到有效浓缩,而糖苷配基型异黄酮比其相应的糖苷型异黄酮具有更高的生物活性[34]。

3 结 语

选用乙醇提取法提取大豆异黄酮，最佳条件下获得的异黄酮粗提物中异黄酮质量分数为 1.21%，经浓缩离心法与二氯甲烷萃取法联用纯化处理后，所得异黄酮纯化产物中蛋白质、灰分、总糖质量分数分别从纯化前的 42.75%、8.27%、27.97%下降到 0.88%、4.03%、4.99%，联用纯化方法不仅具有很好的纯化效果，且操作简单、成本低。所得异黄酮纯化物中异黄酮纯度达到 44.88%，比酱油渣和异黄酮粗提物分别提高 128 倍和 37 倍，能满足商品化异黄酮产品对纯度的要求。此外，异黄酮纯化物中的异黄酮单体主要由大豆素、大豆黄素、染料木素组成，染料木素占比最高，为 67.37%。抗氧化活性试验表明异黄酮纯化物对超氧阴离子自由基和 DPPH 自由基皆具较好的清除能力，其 IC_{50} 分别为 0.34、0.26 mg/mL，并且存在剂量效应关系，有望将其作为天然抗氧化剂进一步开发利用。本研究结果可为酱油渣异黄酮的开发利用提供一定的参考。

参考文献：

[1] 李伟，杜洁，张小英，等. 不同来源酱油渣中大豆异黄酮苷元成分分析及抗炎活性研究[J]. 现代食品科技，2019，35(5)：52-58.

[2] 中国调味品协会. 中国酱油、调味酱产业发展概况及未来发展趋势[EB/OL]. http://www.chinacondiment.com/branch/4/23783. 2017-05-09.

[3] 张静. 高盐稀态酱油渣的综合利用[D]. 天津：天津科技大学，2016.

[4] 向程. 酱油渣全组分分离及高值化利用研究[D]. 广州：华南理工大学，2019.

[5] 王丽娟，张永忠，杨薇薇. 从酱渣饼中提取大豆异黄酮的研究[J]. 食品工业科技，2008，(10)：167-170.

[6] 韩王帅，朱新贵，李学伟. 酱油渣中色素及大豆异黄酮的提取研究[J]. 中国酿造，2017，36(05)：46-52.

[7] 刘霞，罗芳，余银，李鑫，高婉茹. 黄酮类化合物与食品成分相互作用研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(10)：1009-1015.

[8] SETCHELL K D R，BROWN N M，ZIMMER-NECHEMIAS L，et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans，supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability[J]. **American Journal of Clinical Nutrition**，2002，(2)：447-453.

[9] WANG H，MURPHY P A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in iowa：effects of variety，crop year，and location[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，1994，(8)：1674-1677.

[10] CARRAO PANIZZI M C，KITAMURA K. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars[J]. **Japanese Journal of Breeding**，1995，45(3)：295-300.

[11] AMIT N，NUTAN M，FULZELE D P. Determination of isoflavone content and antioxidant activity in Psoralea corylifolia L callus cultures[J]. **Food Chemistry**，2010，118(1)：128-132.

[12] SARACINO M，RAGGI M. Analysis of soy isoflavone plasma levels using HPLC with coulometric detection in postmenopausal women[J]. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**，2010，53(3)：682-687.

[13] JONATHAN F，CHERYL F. Anti-anxiety，cognitive，and steroid biosynthetic effects of an isoflavone-based dietary supplement are gonad and sex-dependent in rats[J]. **Brain Research**，2011，1379：164-175.

[14] 余强，郭传勇. 大豆异黄酮药理作用及其临床应用[J]. 世界临床药物，2018，39(9)：74-77.

[15] 张怡洁. 酱油的风味及其生理活性的研究[D]. 杭州：浙江工商大学，2012.

[16] MIRAHMADI S，SHAHMOHAMMADI A，ROUSTAA，et al. Soy isoflavone genistein attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairments in the rat via exerting anti-oxidative and anti-inflammatory effects[J]. **Cytokine**，2018，104：151-159.

[17] WU P，DING H，YEN J，et al. Anti-inflammatory activity of 8-hydroxydaidzein in LPS-stimulated BV2 microglial cells via activation of Nrf2-antioxidant and attenuation of Akt/NF-κβ-inflammatory signaling pathways，as well as inhibition of COX-2 activity[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2018，66(23)：5790-5801.

[18] MICHAEL N，BENJAMIN G，SHMUEL Z，et al. Soybean isoflavones. characterization，determination，and antifungal activity[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，1974，22(5)：806-810.

[19] 董玲燕. 酱油渣中大豆异黄酮的分离与纯化[D]. 广州:华南理工大学,2012.
[20] 袁佩佩,王明,王陶. 酱油渣中大豆异黄酮的提取研究进展[J]. 粮油加工,2014,(1):80-83.
[21] 沈春华. 酱油渣中大豆异黄酮的测定与提取研究[D]. 厦门:集美大学,2019.
[22] 何隽婷,梁勇,梁斯,等. 酱油渣中大豆异黄酮的动态逆流提取及分离纯化研究[J]. 华南师范大学学报:自然科学版,2010,(4):80-86.
[23] ZHANG S,ZHENG Z,ZENG M,et al. A novel isoflavone profiling method based on UPLC-PDA-ESI-MS[J]. **Food Chemistry**,2017,219:40-47.
[24] 郭建. 大豆异黄酮提取纯化工艺研究[D]. 天津:天津大学,2012.
[25] 董玲燕,李琳,赵雷等. 酱油渣中大豆异黄酮的提取及纯化工艺[J]. 食品科学,2012,33(14):30-35.
[26] 肖诗英. 从酱油渣中回收制备异黄酮及多肽的工艺研究[D]. 武汉:湖北工业大学,2013.
[27] 李紫微,曹庸,苗建银. 大豆异黄酮及其苷元的研究进展[J]. 食品工业科技,2019,40(20):348-355.
[28] CHENG Y,LUO F,ZENG Z,et al. DFT-based quantitative structure-activity relationship studies for antioxidant peptides[J]. **Structure Chemistry**,2015,26(3):739-747.
[29] 程云辉,王璋,许时婴. 酶解麦胚蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 食品科学,2006,(6):147-151.
[30] 陈媛,张志国. 酱油渣残余蛋白有效利用研究进展[J].中国调味品,2016,41(3):153-157.
[31] CUI Y Y,YANG C X,YANG X D,et al. Zeolitic imidazolate framework-8 for selective extraction of a highlyactive anti-oxidant flflavonoid from Caragana jubata[J]. **Journal of Chromatography A**,2018,1544:8-15.
[32] 杨永涛. 罗布麻总黄酮的提取、分离纯化及其抗氧化性能研究[D]. 广州:华南理工大学,2018.
[33] 朱怡霖,张海生,赵鑫帅,等. 大孔树脂分离纯化横山老黑豆酚类物质[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(9):103-110.
[34] ZHANG E J,NG K M,LUO K Q. Extraction and purification of isoflavones from soybeans and characterization of their estrogenic activities[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2007,55:6940-6950.

科　技　信　息

研究发现去势可改善羊肉风味

近日,中国农业科学院北京畜牧兽医研究所优质功能畜产品团队研究发现去势能够增强羊肉脂肪香味和青草香味,有助于提升羊肉的市场接受度。研究成果为优质羊肉生产提供了理论支持。相关研究成果在线发表在《食品化学(Food Chemistry)》上。

据团队首席张军民研究员介绍,肉品风味是影响消费的主要因素,也是广大消费者关注的热点问题。目前,团队与兰州大学科研团队合作开展"千羊计划",从羊肉品质提升、品质育种及相关饲养技术方面开展相关研究。

该研究针对去势如何影响羊肉风味品质这一科学问题,依托团队建立的肉品质数据平台,通过对不同日龄湖羊去势,利用风味组学技术分析发现:去势显著改变了羊肉中风味氨基酸、5-磷酸核糖、次黄嘌呤等水溶性风味前体物质含量,提高了磷脂和甘油酯等重要脂溶性风味前体物质含量;挥发性物质1-辛烯-3-醇和己醛含量显著增加,羊肉的脂肪香味和青草香味更为明显。

[信息来源]汤超华. 研究发现去势可改善羊肉风味[EB/OL]. (2020-08-6). http://www.caas.cn/xwzx/kyjz/306877.html