

网络出版时间:2016-06-08 16:21

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.07.028

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160608.1621.056.html>

发酵处理对毛豆异黄酮苷元含量及其 乙醇提取物抗氧化活性的影响

李 爽,郑毅男,韩佳彤,丁传波,刘文丛

(吉林农业大学 中药材学院 吉林 长春 130118)

【摘 要】 【目的】测定毛豆、发酵处理毛豆和大豆中的大豆苷元、黄豆黄素与染料木素 3 种异黄酮苷元以及多酚类化合物的总含量,并分析其乙醇提取物的抗氧化活性。【方法】利用回流法酸水解样品中的大豆异黄酮,通过高效液相色谱法测定大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的含量;利用福林酚法测定 3 种样品中的多酚类物质总含量,并通过测定清除 DPPH 自由基、ABTS 自由基和还原力比较样品乙醇提取物的抗氧化活性。【结果】毛豆、发酵处理毛豆和大豆的大豆苷元含量分别为 255.96、286.04 和 358.08 $\mu\text{g/g}$,黄豆黄素含量分别为 57.96、65.51 和 59.73 $\mu\text{g/g}$,染料木素含量分别为 12.88、26.40 和 4.62 $\mu\text{g/g}$ 。发酵处理毛豆中染料木素含量增加明显,分别为毛豆和大豆染料木素含量的 2.05 和 5.71 倍。发酵处理毛豆、大豆、毛豆中的多酚类化合物总含量分别为 $(3.31 \pm 0.138) \text{ mg/g}$ 、 $(1.148 \pm 0.028) \text{ mg/g}$ 和 $(2.69 \pm 0.011) \text{ mg/g}$,发酵处理毛豆的多酚类化合物含量约是大豆和毛豆的 2.9 和 1.2 倍。抗氧化活性比较表明,发酵处理毛豆清除 ABTS 自由基与 DPPH 自由基的能力优于大豆和毛豆。发酵处理毛豆、大豆和毛豆还原力大小依次表现为发酵处理毛豆>毛豆>大豆。【结论】经过发酵处理后,毛豆中的 3 种异黄酮含量均有所增加,但以染料木素的增加最为明显;发酵处理毛豆中多酚类化合物总含量升高,自由基清除活性增强。

【关键词】 毛豆;发酵处理;大豆异黄酮苷元;多酚;抗氧化活性

【中图分类号】 S565.109.9

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)07-0202-07

Effect of fermentation on isoflavone aglycone contents in edamame and antioxidant activity of ethanol extracts

LI Shuang,ZHENG Yinan,HAN Jiatong,DING Chuanbo,LIU Wencong

(College of Chinese Medicinal Materials,Jilin Agricultural University,Changchun,Jilin 130118,China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to determine the contents of daidzein,glycitein,genistein,and total polyphenols in edamame, fermented edamame and soybean and analyze the antioxidant activities of ethanol extracts.【Method】 Soybean isoflavones in samples were hydrolyzed by acid reflux,and daidzein, glycitein and genistein were quantified by high-performance liquid chromatography. The total polyphenols in edamame,fermented edamame and soybean were determined by Folin-Ciocalteu colorimetric. The antioxidant activities of ethanol extracts were compared by scavenging of DPPH and ABTS radicals and testing reducing power.【Result】 The contents of daidzein in edamame,fermented edamame and soybean were 255.96,286.04 and 358.08 $\mu\text{g/g}$,the contents of glycitein were 57.96,65.51 and 59.73 $\mu\text{g/g}$,and the contents of genistein were 12.88,26.40 and 4.62 $\mu\text{g/g}$,respectively. The content of genistein increased significantly after fermentation and was 2.05 and 5.71 times of those in edamame and soybean,respectively. The

〔收稿日期〕 2011-11-21

〔基金项目〕 吉林省科技发展计划项目(YYZX201135)

〔作者简介〕 李 爽(1988—),女,吉林松原人,在读硕士,主要从事天然药物研究。E-mail:shuangli_0407@163.com

〔通信作者〕 刘文丛(1968—),男,吉林长春人,教授,硕士生导师,主要从事天然药物研究。E-mail:jwlv6803@126.com

total contents of polyphenolic compounds in fermented edamame, soybean and edamame were (3.31 ± 0.138) mg/g, (2.69 ± 0.011) mg/g, and (1.148 ± 0.028) mg/g. The content in fermented edamame was about 2.9 and 1.2 times of those in soybean and edamame. Ethanol extracts from fermented edamame had stronger antioxidant activity in scavenging of DPPH and ABTS radicals than those from edamame and soybeans. The reducing power was in a decreasing order of fermented edamame > edamame > soybean. 【Conclusion】 After fermentation, the contents of three isoflavone aglycone in edamame increased, and genistein increased the most. The total content of phenolic compounds in fermented edamame was higher than edamame and radical scavenging activity was increased.

Key words: edamame; fermentation; soybean isoflavone aglycone; polyphenols; antioxidant activity

毛豆是豆科植物大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)在鼓荚后采收的嫩青大豆,作蔬菜用时又名菜用大豆。毛豆具有很好的食疗作用,中国古代药学著作《滇南本草》第二卷记载:“毛豆,味平。治脾胃虚弱,小儿疳积。能开胃健脾。”最近研究表明,毛豆豆浆对2-型糖尿病有很好的降血糖、降血脂作用^[1]。毛豆在风味、质地及用于煮食方面均优于普通大豆^[2],在营养品质上毛豆较大豆更有不可小觑的优势,例如毛豆中的胰脂肪酶抑制水平较低,不易消化的低聚糖较少且含有更多的维生素,高植酸含量使毛豆更加柔软且更易烹饪^[3];毛豆中游离氨基酸含量较大豆高出1倍,此外毛豆还含有Ca、Fe、Mg等矿物质,油分中不饱和脂肪酸高达84.43%^[4]。在经济效益上,毛豆具有较强的消费优势,其市场需求日渐增加,且正从亚洲市场逐渐进入欧美市场^[4]。因此,毛豆这一项新兴的大豆产业具有非常大的发展潜力和国际市场竞争力。

发酵可以增加食品的有效营养成分,因此发酵处理方法在食品的多样化发展中发挥着越来越重要的作用。张晓玲等^[5]发现,利用微生物发酵法提取大豆异黄酮苷元的效率较高。目前对发酵豆制品包括发酵豆乳的研究越来越多,表明豆制品加工及发展正逐步走向多样化。发酵豆乳具有良好的降血压、调节血脂等保健功效^[6]。田三德等^[7-8]发现,发酵豆乳可以调节动物血脂,改善胃肠道消化功能。吴非等^[9]发现,发酵豆制品较非发酵豆制品抗氧化活性高。乳酸菌(Lactic Acid Bacteria)在人类消化系统中广泛存在,用其发酵可以提高食品的营养价值,改善食品风味,提高食品保藏值和附加值^[10]。徐寅等^[11]对豆乳进行多菌种发酵试验,发现乳酸菌对发酵豆乳的风味有重要影响,可以使之获得较好的感官评价,是发酵豆乳的优选菌种。目前关于毛豆发酵的相关研究较少,毛豆制品的开发与利用度尚待提高。为此,本试验对毛豆进行乳酸菌发酵处

理,并与大豆及未发酵处理的毛豆进行比较,分析各样品中大豆苷元、黄豆黄素及染料木素3种大豆异黄酮苷元及总多酚类化合物含量的变化,比较3种样品乙醇提取物对ABTS和DPPH自由基的清除能力及还原力,以期市场中毛豆类保健食品的多样性开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验材料 大豆,购自吉林珲春农贸市场;毛豆8月下旬采自珲春,经吉林农业大学中药材学院郑毅男教授鉴定为豆科(Leguminosae)大豆属毛豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)

1.1.2 仪器与试剂 LC-20A型高效液相色谱仪,搭载有SPD-20A紫外检测器,日本岛津;超声波清洗器,KQ-250DB,昆山超声仪器有限公司;BP211D电子天平,德国Sartorius公司;SZ-93自动双重纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂;SpectraMax Plus384连续光谱扫描式酶标仪,美国分子仪器公司;电热恒温智能型水浴锅,DK-98-II A,天津泰斯特科技有限公司;冷冻干燥机,FD-1D-50,北京博医康实验仪器有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,BXM-30R,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

福林酚试剂,货号PRLB09500,上海荔达生物科技有限公司;大豆苷元对照品(纯度>98%,批号:MUST-12042606)、黄豆黄素对照品(纯度>98%,批号:MUST-12021301)、染料木素对照品(纯度>98%,批号:MUST-12010801),3种异黄酮苷元均购自成都曼思特生物科技有限公司;乳酸菌冻干粉(乳酸杆菌与嗜热链球菌混合冻干菌粉),北京川秀科技有限公司;2,2'-二氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),购自Sigma公司;2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT),购自西亚试剂公司;甲醇(色谱纯),购自美

国 Fisher 公司;乙醇(分析纯),北京化工厂生产;铁氰化钾、三氯化铁、三氯乙酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和碳酸钠,均为北京化工厂产品;纯水,杭州娃哈哈有限公司产品。其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 样品处理

1.2.1 毛豆样品的制备 将毛豆煮熟后冻干,磨成粉末待用。

1.2.2 发酵处理毛豆样品的制备 取上述毛豆粉末按 1:4 比例加双蒸水于高压灭菌器中灭菌,后加入乳酸菌粉,控制温度在 42 ℃ 条件下发酵 8 h,制得发酵毛豆乳。将发酵毛豆乳冻干,得发酵处理毛豆粉末,待用;

1.2.3 大豆样品的制备 将大豆冻干处理,磨成粉末待用。

1.3 毛豆、发酵处理毛豆和大豆中大豆苷元、黄豆黄素与染料木素含量的测定

1.3.1 异黄酮苷元混合对照品溶液的制备 准确称取大豆苷元 1.38 mg、黄豆黄素 0.97 mg、染料木素 0.67 mg,置于 50 mL 容量瓶中,用体积分数 70%乙醇定容,混匀。用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即可制得质量浓度为 19.40,13.40 和 27.60 μg/mL 的大豆苷元、黄豆黄素和染料木素异黄酮苷元混合标准品溶液。

取上述制备的混合标准品溶液 2,1,0.5,0.25,0.125 mL,计为混合对照品溶液 I、II、III、IV、V,分别用体积分数 70%乙醇定容于 2 mL 离心管中,摇匀,进行 HPLC 检测。用外标法计算峰面积,以标准品溶液质量浓度(mg/mL)为横坐标,峰面积为纵坐标建立标准曲线,以异黄酮苷元含量为自变量(X)、峰面积为因变量(Y)求回归方程,用于测定大豆、毛豆及发酵毛豆中的 3 种异黄酮苷元含量。

1.3.2 毛豆、发酵处理毛豆和大豆样品溶液的配制

称取 2 g 毛豆粉末置于 250 mL 烧瓶中,加入 70 mL 体积分数 70%乙醇和 8 mL 浓盐酸,85 ℃ 回流 2 h,过滤后挥干。用体积分数 70%乙醇将挥干后的混合物定容于 10 mL 容量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得毛豆乙醇盐酸水解提取物溶液。将发酵处理毛豆样品和大豆样品用同样方式处理,得到发酵毛豆及大豆乙醇盐酸水解提取物溶液。将以上 3 种样品溶液用于 HPLC 测定。

1.3.3 HPLC 测定 HPLC 条件:色谱柱为大连依利特 Hypersil ODS2(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇-体积分数 0.3%磷酸溶液(V(甲醇):V(体积分数 0.3%磷酸)=48:52);柱温 25 ℃;流速

0.7 mL/min;检测波长 260 nm;进样量 20 μL。

1.4 大豆、毛豆及发酵处理毛豆中多酚类化合物总含量的测定

1.4.1 没食子酸标准曲线的制作 精确称取没食子酸 10.00 mg 于 100 mL 容量瓶中,加 70 mL 体积分数 80%的乙醇溶解后再定容至 100 mL,配成质量浓度为 0.1 mg/mL 的没食子酸溶液。分别移取 0,0.2,0.4,0.8,1.6 和 3.2 mL 没食子酸溶液于 10 mL 具塞试管中,每个试管加入 1.5 mL 福林酚试剂,混匀放置 1 min,再加入 2 mL 质量分数 10%的 NaCO₃ 溶液,混匀,用双蒸水定容至 10 mL,放置 1 h 后在波长 760 nm 下测定吸光度^[12]。以没食子酸质量浓度(mg/mL)为横坐标、吸光度为纵坐标建立标准曲线,并以质量浓度为自变量(X)、吸光度为因变量(Y)求回归方程,用于测定大豆、毛豆及发酵处理毛豆中多酚类化合物的总含量。

1.4.2 毛豆、发酵处理毛豆和大豆中多酚类化合物总含量的测定 分别称取毛豆、发酵处理毛豆和大豆冻干粉末 2.0 g,按料(g)液(mL)比 1:30 加入体积分数 80%的乙醇,室温下于 100 Hz、250 W 微波作用条件下提取 30 min,提取 3 次,合并提取液。减压浓缩后用体积分数 80%乙醇定容于 50 mL 容量瓶中。测定样品在 760 nm 下的吸光度,计算多酚类化合物总含量,试验平行测定 3 次取平均值。多酚类化合物总含量的计算公式为:

$$W=(C \times V \times N)/(M \times 1\,000)。$$

式中:W 为多酚类化合物总含量(μg/mL),C 为没食子酸质量浓度(μg/mL),V 为提取液体积(mL),N 为稀释倍数,M 为取样量(g)。

1.5 毛豆、发酵处理毛豆和大豆乙醇提取物的抗氧化活性测定

1.5.1 毛豆、发酵处理毛豆和大豆乙醇提取物的制备 分别称取上述 3 种样品的冻干粉 10 g,按料液比 1:10 加入体积分数 70%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并滤液后挥干,即得 3 种样品的乙醇提取物。将 3 种样品的乙醇提取物与阳性对照品 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT))配制成不同质量浓度(0.1,0.5,1.0,2.0,4.0 和 8.0 mg/mL)的溶液,备用。

1.5.2 DPPH 自由基清除活性的测定 配制 200 μmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液,利用 96 孔板测定其吸光度值。其中样品测定孔:将 80 μL DPPH 溶液加入到 80 μL 不同质量浓度的提取液中;样品对照孔:将 80 μL 体积分数 70%乙醇溶液加入到 80 μL 不同质量浓度的提取液中;空白孔:加入 160 μL

体积分数 70%乙醇;空白对照孔:将 80 μL DPPH 加入到 80 μL 体积分数 70%乙醇中。混匀,室温避光静置 30 min 后,在 517 nm 下用酶标仪测定其吸光度。DPPH 自由基清除率的计算公式为:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [A_3 - (A_1 - A_2)] / A_3 \times 100\%$$

式中: A_1 为样品在 517 nm 处的吸光度; A_2 为样品对照在 517 nm 处的吸光度; A_3 为空白对照在 517 nm 处的吸光度。

试验重复 3 次,取平均值作图,利用 SPSS 19.0 中的 Probit 分析软件进行数据处理,分析其半数清除率。

1.5.3 ABTS 自由基清除活性的测定 配制 7 mmol/L ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液,取 5 mL 过硫酸钾溶液加入到 15 mL ABTS 溶液中,室温下置于黑暗避光处反应 16 h,形成 ABTS 自由基储备液。测定时,将 ABTS 自由基储备液进行稀释,使之在 734 nm 处的吸光度为 0.70 ± 0.05 ,备用。利用 96 孔板测定其吸光度值,其中样品测定孔:将 200 μL ABTS 自由基储备液与 50 μL 不同质量浓度样品及阳性对照品混合;空白孔:加入 250 μL 体积分数 70%乙醇;空白对照孔:加入 200 μL ABTS 溶液与 50 μL 体积分数 70%乙醇,混合。室

温下避光反应 30 min 后,在 734 nm 处测定其吸光度。ABTS 自由基清除率的计算公式为:

$$\text{ABTS 自由基清除率} = (A_c - A_s) / A_c \times 100\%$$

式中: A_c 为空白对照在 734 nm 处的吸光度值; A_s 为样品或阳性对照品在 734 nm 处的吸光度值。

试验重复 3 次,取平均值作图,利用 SPSS 19.0 中的 Probit 分析软件进行数据处理,分析其半数清除率。

1.5.4 还原力的测定 配制 pH=6.6 的磷酸盐缓冲溶液,将 200 μL 磷酸盐缓冲溶液、200 μL 质量分数 1%铁氰化钾溶液与 200 μL 样品或阳性对照品混合,在 50 ℃下水浴 20 min,迅速冷却,后加入 200 μL 体积分数 10%三氯乙酸,在 2 000 r/min 条件下离心 10 min。取上清液 100 μL,加入 100 μL 双蒸水和 20 μL 质量分数 0.1%的三氯化铁溶液。利用 96 孔板于 700 nm 处测定其吸光度。测得的吸光度值越高,说明其还原力越强。

2 结果与分析

2.1 毛豆、发酵处理毛豆和大豆中异黄酮苷元含量的测定

2.1.1 混合对照品溶液中各成分含量的测定 大豆苷元、黄豆黄素、染料木素混合对照品溶液 I、II、III、IV、V 中各异黄酮苷元成分含量的测定结果见表 1。

表 1 混合对照品中大豆苷元、黄豆黄素、染料木素含量的测定

Table 1 Contents of daidzein, glycitein and genistein in control sample μg/g

混合对照品溶液 Control sample	大豆苷元 Daidzein	黄豆黄素 Glycitein	染料木素 Genistein
I	19.40	13.40	27.60
II	9.70	6.70	13.80
III	4.85	3.35	6.90
IV	2.43	1.68	3.45
V	1.21	0.84	1.73

经分析,标准品峰面积(Y)与其含量(X)的回归方程分别为:

大豆苷元: $Y = 1.0 \times 10^8 X - 7\,285.7, R^2 = 1.000\,0 (n=5);$

黄豆黄素: $Y = 1.0 \times 10^8 X - 8\,053.8, R^2 = 0.999\,9 (n=5);$

染料木素: $Y = 2.0 \times 10^8 X - 7\,124.2, R^2 = 1.000\,0 (n=5)。$

上述结果表明,大豆苷元、黄豆黄素与染料木素的质量浓度分别在 1.21~19.40, 0.84~13.40, 1.73~27.60 μg/mL 时与峰面积呈现出较好的线性关系。

2.1.2 毛豆、发酵处理毛豆及大豆样品中异黄酮苷元含量的测定 异黄酮苷元混合对照品、发酵处理

毛豆、毛豆及大豆样品的 HPLC 分析结果如图 1 所示。经测算,毛豆、发酵处理毛豆和大豆中 3 种异黄酮苷元的含量如表 2 所示。由表 2 可知,发酵处理毛豆中染料木素含量明显增加,其含量分别是毛豆和大豆的 2.05 和 5.71 倍。

2.2 毛豆、发酵处理毛豆和大豆中多酚类化合物总含量的测定

没食子酸质量浓度(X)与 760 nm 下吸光度(Y)的回归方程为: $Y = 0.077\,6X - 0.012\,7, R^2 = 0.998\,7$ 。在 0~32 μg/mL 内,没食子酸的质量浓度与其吸光度呈良好的线性关系。

测算结果表明:毛豆、发酵处理毛豆和大豆中多酚类化合物总含量分别为 (2.69 ± 0.011) mg/g、 (3.31 ± 0.138) mg/g 和 (1.148 ± 0.028) mg/g。可

见发酵处理毛豆中的多酚类化合物总含量最大,分别为毛豆和大豆多酚类化合物总含量的 1.2 和 2.9 倍。

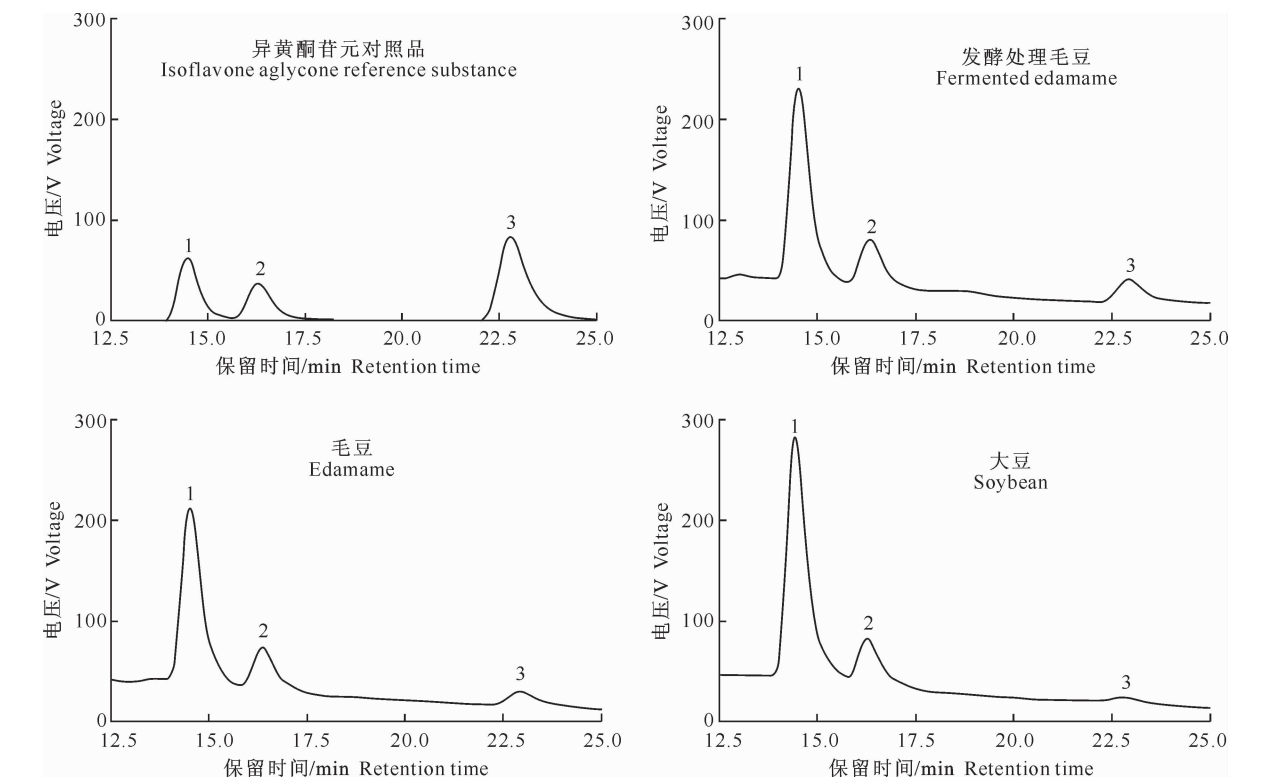


图 1 异黄酮苷元对照品及发酵处理毛豆、毛豆、大豆异黄酮苷元的 HPLC 色谱分析
1. 大豆苷元;2. 黄豆黄素;3. 染料木素

Fig. 1 HPLC chromatograms of isoflavone aglycone reference substance,fermented edamame,edamame and soybean
1. Daidzein;2. Glycitein;3. Genistein

表 2 3 种大豆样品中异黄酮苷元的平均含量

Table 2 Average content of soybean isoflavone in edamame μg/g

样品 Sample	大豆苷元 Daidzein	黄豆黄素 Glycitein	染料木素 Genistein
发酵处理毛豆 Fermented edamame	286.04	65.51	26.40
毛豆 Edamame	255.96	57.96	12.88
大豆 Soybean	358.08	59.73	4.62

2.3 毛豆、发酵处理毛豆和大豆乙醇提取物抗氧化活性的比较

2.3.1 DPPH 自由基清除能力 由图 2 可以看出,随着各样品质量浓度的增加,样品对 DPPH 自由基的清除作用均有所增强。当质量浓度为 0.5 mg/mL 时,阳性对照(BHT)对 DPPH 自由基的清除率为 81.91%,之后趋于稳定,表明 DPPH 自由基基本被清除。

经计算,发酵毛豆乙醇提取物对 DPPH 自由基的半数清除率(IC₅₀)为 4.974 mg/mL,毛豆、大豆乙醇提取物对 DPPH 自由基的半数清除率(IC₅₀)分别为 7.944 和 12.533 mg/mL。因此,发酵毛豆乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除能力优于毛豆和大豆乙醇提取物。

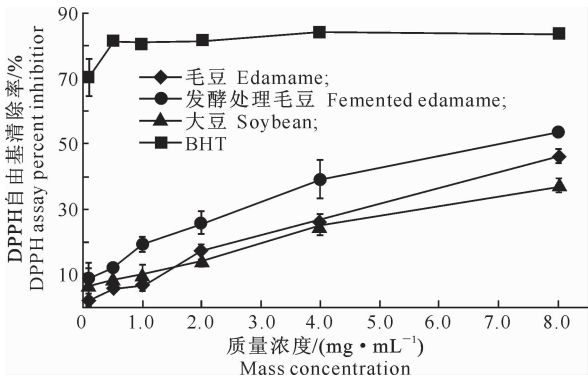


图 2 毛豆、发酵处理毛豆和大豆乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除活性

Fig. 2 Scavenging rate of DPPH radical by ethanol extracts from edamame,fermented edamame and soybean

2.3.2 ABTS 自由基清除能力 由图 3 可以看出,

随着样品质量浓度的增加,毛豆、发酵处理毛豆和大豆乙醇提取物对 ABTS 自由基的清除作用均有所增强。在质量浓度为 0.1 mg/mL 时,阳性对照(BHT)对 ABTS 自由基的清除率为 87.33%,之后趋于稳定,表明 ABTS 自由基基本被清除。毛豆、发酵处理毛豆和大豆乙醇提取物对 ABTS 自由基具有较强的清除效果。经计算,发酵处理毛豆乙醇提取物对 ABTS 自由基的半数清除率(IC_{50})为 0.455 mg/mL<0.5 mg/mL,而毛豆、大豆乙醇提取物对 ABTS 自由基的半数清除率(IC_{50})分别为 1.033 和 0.964 mg/mL。与毛豆和大豆的乙醇提取物相比,发酵处理毛豆乙醇提取物的 ABTS 自由基

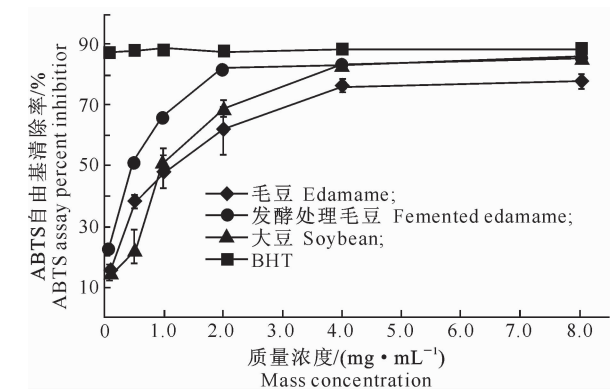


图 3 毛豆、发酵处理毛豆和大豆乙醇提取物对 ABTS 自由基的清除活性

Fig. 3 Scavenging rate of ABTS radical by ethanol extracts from edamame, fermented edamame and soybean

3 讨 论

大豆异黄酮(Soybean Isoflavones)是大豆生长中形成的一类次级代谢产物,具有很强的抗氧化能力。张炳文等^[13]发现,大豆食品经过发酵处理后,游离型大豆异黄酮含量增高,糖苷型大豆异黄酮含量降低。Wei 等^[14]指出,大豆异黄酮组分中能够产生生理活性的是游离苷元,而不是结合糖苷。大豆异黄酮的抗氧化活性大小与其构效关系很大,其中染料木素为主要抗氧化作用组分,大豆苷元抗氧化作用不大^[15]。在化学结构上,羟基化程度和羟基位置是黄酮类化合物具有抗氧化活性的主要原因之一,染料木素在 C-5、C-7 和 C-4' 位共有 3 个羟基,而大豆苷元只在 C-7 和 C-4' 有 2 个羟基,从羟基数目上看,染料木素较大豆苷元多 1 个羟基,其抗氧化效果优于大豆苷元;从羟基结构上看,由于异黄酮结构中 B 环 C-4' 位羟基的存在, A 环 C-5 上有羟基会使抗氧化活性增强,这种结构对异黄酮的抗氧化活性强弱起重要的作用^[14]。而大豆苷元缺少 C-5 位羟

清除能力更强。

2.3.3 乙醇提取物还原力的比较 图 4 表明,随着样品质量浓度的增加,各样品的还原力均有所增强。在质量浓度为 0.1 mg/mL 时,阳性对照(BHT)、毛豆、发酵毛豆和大豆乙醇提取物在 700 nm 处的吸光度分别为 0.299,0.009,0.110 和 0.060。在样品质量浓度为 0.1~8.0 mg/mL 时,毛豆、发酵处理毛豆和大豆乙醇提取物的还原力与其质量浓度呈量效关系,即还原力随着样品质量浓度的增大而增强。同时还可以看出,发酵处理毛豆乙醇提取物的还原力较毛豆与大豆乙醇提取物高。

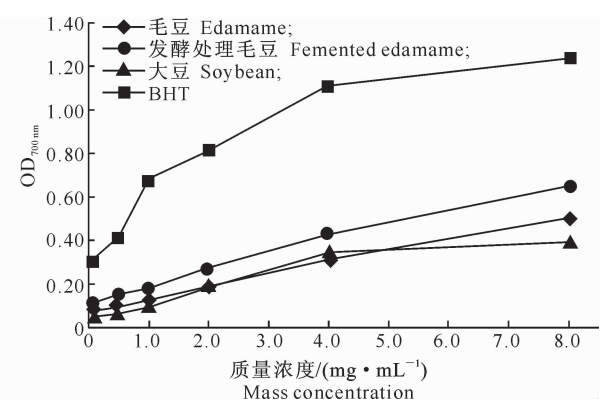


图 4 毛豆、发酵毛豆和大豆乙醇提取物的还原力比较
Fig. 4 Reducing power of ethanol extracts from edamame, fermented edamame and soybean

基,所以大豆苷元的抗氧化活性更加弱于染料木素。关于这 2 种大豆异黄酮抗氧化活性的大小,荣玉芝等^[16]通过密度泛函 B3LYP 理论方法,研究表明分子前线轨道能隙值较小的染料木素更容易发生电子转移反应,与大豆苷元相比其更容易发生脱氢反应生成酚氧自由基,因此其抗氧化活性更强。毛豆发酵后染料木素含量增多,这在一定程度上增强了其抗氧化活性。

膳食中富含一些植物化学物质如植物多酚等,能够清除自由基而保护机体。多酚类化合物(Polyphenol)是植物中一组化学物质的统称,是植物代谢过程中的次生产物,因含有多酚羟基而得名。多酚中的单体物质包含各种黄酮类化合物,其广泛存在于蔬菜水果中,是人们日常摄入最多的抗氧化物质^[17]。肖洪等^[18]的研究表明,合适菌种及菌种合理搭配发酵法可以增加桑叶茶中的多酚类物质含量。本试验发现,发酵处理毛豆中的多酚类物质有所增加。毛豆中所含的抗氧化成分中包含有维生素 C。蔡梦珊等^[19]比较了毛豆、大豆中的维生素 C 含

量,结果显示每 100 g 毛豆中的维生素 C 含量为 36.7 mg,而大豆中并不含有维生素 C。同时米书梅等^[20]的研究发现,果蔬的抗氧化性与其含有的多酚类物质的相关性较强,与维生素 C 的相关性较弱。说明多酚对果蔬抗氧化能力的影响强于维生素 C,多酚类物质对果蔬抗氧化能力的贡献较大。

本试验测定了发酵处理毛豆、大豆及未发酵处理毛豆样品乙醇提取物的抗氧化活性,表明发酵处理毛豆的 ABTS 自由基与 DPPH 自由基清除能力均优于大豆和毛豆,发酵处理毛豆、大豆和毛豆三者还原力的大小顺序为发酵处理毛豆>毛豆>大豆。这可能与毛豆发酵过程中染料木素及多酚类化合物的增加有关,但其具体机理还有待进一步研究。

4 结 论

本研究采用酸水解回流提取结合 HPLC 法测定了毛豆、大豆及发酵处理毛豆的异黄酮苷元含量,结果表明发酵处理毛豆中的染料木素含量(26.40 μg/g)约为未发酵毛豆(12.88 μg/g)和大豆(4.62 μg/g)的 2.05 和 5.71 倍;多酚类物质总含量的测定结果表明,发酵处理毛豆中的多酚类化合物总含量((3.31±0.138) mg/g)分别是未发酵处理毛豆((2.69±0.011) mg/g)和大豆((1.148±0.028) mg/g)的 1.2 和 2.9 倍。对发酵处理毛豆、大豆及未发酵处理毛豆乙醇提取物的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力及还原力试验表明,发酵处理毛豆具有较强的抗氧化活性及较高的还原力。上述研究结果提示,发酵处理是新兴大豆产业——毛豆类保健食品开发与利用的一种好途径。

志 谢:中国珥春华瑞参业生物工程有限公司为本研究提供了毛豆和大豆试验样品,在此深表谢忱。

[参考文献]

[1] 王洲婷,刘璐璐,李佳琪,等. 毛豆对 2 型糖尿病小鼠血糖及血脂影响 [J]. 食品工业科技,2014,35(4):334-337.
Wang Z T,Liu L L,Li J Q,et al. Effects of edamame on blood glucose and blood lipid in type 2 diabetic mellitus mice [J]. Science and Technology of Food Industry,2014,35(4):334-337.

[2] 李文称. 保健蔬菜:菜用大豆 [J]. 中国种业,2011(8):87-88.
Li W C. Care vegetables:vegetable soybean [J]. China Seed Industry,2011(8):87-88.

[3] John K,Thomas A L,Deam M. Edamame:the vegetable soybean [M]. Binghamton:Haworth Press,1994:173-181.

[4] 田艺心,高 会,汪自强. 菜用大豆生产及产业化前景 [J]. 世界农业,2008 (10):57-64.
Tian Y X,Gao H,Wang Z Q. Vegetable soybean production

and industrial prospects [J]. World Agriculture,2008(10):57-64.

[5] 张晓玲,惠芸华,杨 桥. 微生物发酵产大豆异黄酮苷元的连续超声波提取工艺及其定量分析研究 [J]. 食品科学,2011,35 (5):239-243.
Zhang X L,Hui Y H,Yang Q. Continuous ultrasonic extraction and quantitative analysis of isoflavone aglycones produced by microbial fermentation [J]. Food Science,2011,35 (5):239-243.

[6] 董喜梅,包 艳,张 勇,等. 国内外发酵豆乳研究发展现状 [J]. 大豆科学,2010,29(5):883-888.
Dong X M,Bao Y,Zhang Y,et al. Research progress on domestic and international fermented soymilk [J]. Soybean Science,2010,29(5):883-888.

[7] 田三德,刘 平,谢成杰,等. 发酵豆乳调节动物血脂的功能研究 [J]. 陕西科技大学学报,2004,22(1):53-56.
Tian S D,Liu P,Xie C J,et al. Functional research of regulatory animal's serum-lipin by fermented soybean milk [J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology,2004,22(1):53-56.

[8] 田三德,刘爱香,杨大庆,等. 发酵豆乳改善胃肠道消化功能的研究 [J]. 陕西科技大学学报,2004,22(2):35-38.
Tian S D,Liu A X,Yang D Q,et al. Research for improve function of stomach-intestines tract (Alimentary tract) by fermented soybean-milk [J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology,2004,22(2):35-38.

[9] 吴 菲,刘丽平,曾 婷. 发酵豆制品的抗氧化活性研究 [J]. 食品与发酵工程,2008,34(11):53-56.
Wu F,Liu L P,Zeng T. Study on anti-oxidative activities of fermented soybean products [J]. Food and Fermentation Industries,2008,34(11):53-56.

[10] 赵玲艳,邓放明,杨抚林. 乳酸菌的生理功能及其在发酵果蔬中的应用 [J]. 中国食品添加剂,2004(5):77-80.
Zhao L Y,Deng F M,Yang F L. Characters of lactobacillus and its application in fermented fruits and vegetables [J]. China Food Additives,2004(5):77-80.

[11] 徐 寅,黄玉军,顾瑞霞,等. 乳酸菌对发酵豆乳风味成分的影响 [J]. 食品与发酵工程,2012,38(5):91-95.
Xu Y,Huang Y J,Gu R X,et al. Influence of lactic acid bacteria on the flavor of fermented soymilk [J]. Food and Fermentation Industries,2012,38(5):91-95.

[12] 詹莉莉,章程辉,常 刚,等. 福林酚比色法测定露兜果实中的总多酚 [J]. 广东农业科学,2013(4):77-80.
Zhan L L,Zhang C H,Chang G,et al. Folin-Ciocalteu colorimetric determination of total polyphenols in *Pandanus tectorius* Sol [J]. Guangdong Agricultural Science,2013(4):77-80.

[13] 张炳文,宋永生,郝征红,等. 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.
Zhang B W,Song Y S,Hao Z H,et al. The effects of fermentation process on total content and type of isoflavones in soybean food [J]. Food and Fermentation Industries,2002,28 (7):6-9.

- Science and Technology Press, 2010: 263.
- [2] 胡佳兴, 楼一层, 王 晨, 等. 复方夏枯草的化学成分研究 [J]. 中国药师, 2010, 13(6): 813-814.
Hu J X, Lou Y C, Wang C, et al. Study on chemical constituents of *Prunella vulgaris* [J]. Chinese Pharmacist, 2010, 13(6): 813-814.
- [3] 吴建章, 郁建平, 赵东亮, 等. 迷迭香酸的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 383-388.
Wu J Z, Yu J P, Zhao D L, et al. Research and development of the research of rosemary acid [J]. Natural Product Research and Development, 2005, 17(3): 383-388.
- [4] 杨 辉, 郭伟英, 赵 咏, 等. 正交实验优选夏枯草提取工艺的研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2505-2506.
Yang H, Guo W Y, Zhao Y, et al. Study on orthogonal test for optimization of extraction process of *Prunella vulgaris* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2007, 18(10): 2505-2506.
- [5] 尹海波, 康廷国, 王 冰, 等. 正交实验法优选葎草的提取工艺 [J]. 中药材, 2005, 28(12): 1112-1113.
Yin H B, Kang T G, Wang B, et al. Orthogonal test for optimization of extraction process of *Humulus scandens* [J]. Chinese Herbal Medicines, 2005, 28(12): 1112-1113.
- [6] 国 蓉, 李剑君, 国 亮, 等. 采用响应曲面法优化甘草饮片中甘草酸的超声提取工艺 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(9): 188-191.
Guo R, Li J J, Guo L, et al. Licorice slices was optimized by using response surface method of ultrasonic extraction technology of glycyrrhizic acid [J]. Journal of Northwest A&F University(Nat Sci Ed), 2006, 34(9): 188-191.
- [7] 王振忠, 武文洁. 野菊花总黄酮提取工艺的响应面设计优化 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 648-650.
Wang Z Z, Wu W J. Wild chrysanthemum flower extraction technology of total flavonoids response surface design optimization [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2007, 18(3): 648-650.
- [8] 何 力, 张国文, 杨 佳, 等. 响应曲面法优化超声提取夏枯草中黄酮的工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 259-264.
He L, Zhang G W, Yang J, et al. The response surface method to optimize the ultrasonic extraction selfheal medium yellow ketone technology research [J]. Journal of Food Industry Science and Technology, 2010, 31(9): 259-264.
- (上接第 208 页)
- [14] Wei H, Cai Q, Rahn R O. Inhibition of UV light-and fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein [J]. Carcinogenesis, 1996, 17: 73-77.
- [15] 刘晓艳. 大豆异黄酮抗氧化活性及构效关系 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(19): 8837-8839.
Liu X Y. Antioxidant activity of soy isoflavones and QSAR [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(19): 8837-8839.
- [16] 荣玉芝, 王正武, 吴金鸿, 等. 两种异黄酮化合物抗氧化活性的理论研究 [J]. 食品与药品, 2012, 14(9): 317-319.
Rong Y Z, Wang Z W, Wu J H, et al. Theoretical study on antioxidant activity of two isoflavones [J]. Food and Drug, 2012, 14(9): 317-319.
- [17] 左 玉. 多酚类化合物研究进展 [J]. 粮食与油脂, 2013, 26(4): 6-10.
Zuo Y. Research progress on polyphenols [J]. Food and Grease, 2013, 26(4): 6-10.
- [18] 肖 洪, 沈以红, 黄先智, 等. 发酵桑叶茶生物活性成分变化研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(19): 176-180.
Xiao H, Shen Y H, Huang X Z, et al. Comparative study of bioactive compounds of mulberry leaf tea fermented by different strains [J]. Food Science, 2013, 34(19): 176-180.
- [19] 蔡梦珊, 李江滨, 林锦琼, 等. 毛豆、黄豆、黄豆芽中蛋白质和 Vc 含量及营养价值评价 [J]. 现代农业科技, 2013(14): 270.
Cai M S, Li J B, Lin J Q, et al. Determination and nutritional value evaluation of protein and vitamin C in edamame, soybeans and bean sprouts [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2013(14): 270.
- [20] 米书梅, 阮 征, 温艳梅, 等. 几种常见果蔬抗氧化活性与多酚和维生素 C 的关系 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 133-136.
Mi S M, Ruan Z, Wen Y M, et al. Study on the antioxidant activity of several common vegetables and fruits and the correlation between the content of polyphenols and Vc and the antioxidant activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(1): 133-136.