

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

李伟¹, 杜洁^{1,2}, 张小英¹, 戴伟杰³, 黄早成³, 郭大弟¹, 曹庸¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642) (2. 广州蓓而泰生物科技有限公司, 广东广州 511356) (3. 广东惠尔泰生物科技有限公司, 广东广州 511356)

摘要: 为进一步研究酱油渣来源大豆异黄酮苷元物质组成和生理活性, 试验对不同来源酱油渣脱脂前后大豆异黄酮苷元进行成分分析, 并以 RAW264.7 巨噬细胞模型评价其抗炎活性。结果表明不同来源酱油渣脱脂前后不影响大豆异黄酮苷元种类 ($p > 0.05$), 且公司②酱油渣大豆异黄酮苷元总量显著高于其他公司 ($p < 0.01$)。经水洗、乙酸乙酯萃取以及中性氧化铝吸附后, 公司②酱油渣大豆异黄酮苷元含量达到 $30.35\% \pm 1.34\%$ 。纯化后公司 II 大豆异黄酮苷元能显著降低脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生的 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6, 最高抑制率分别为 80.65%、75.94%、78.52% 和 85.84% ($p < 0.01$), 具有极显著抗炎效果。本项目初步研究不同来源酱油渣大豆异黄酮苷元组成和抗炎活性, 对酱油渣大豆异黄酮苷元资源的进一步开发和利用提供理论基础。

关键词: 酱油渣; 大豆异黄酮; 苷元; 抗炎

文章编号: 1673-9078(2019)05-52-58

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.008

Composition and Anti-inflammatory Activity of Soy Isoflavone Aglycones in the Soy Sauce Residues of Different Sources

LI Wei¹, DU Jie^{1,2}, ZHANG Xiao-ying¹, DAI Wei-jie³, HUANG Zao-cheng³, GUO Da-di¹, CAO Yong¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangdong Research Center for Engineering Technology in Bioactive Natural Products, Guangzhou 510642, China) (2. Guangzhou Beiertai Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 511356, China) (3. Guangdong Huiertai Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 511356, China)

Abstract: In order to further study the composition and physiological activity of soy isoflavone aglycones from soy sauce residue, compositional analysis of soy isoflavone aglycones was performed before and after soy sauce residue of different sources being defatted, and their anti-inflammatory activities were evaluated using a RAW264.7 macrophage model. The results showed that defatting did not affect the type of isoflavone aglycones in the soy sauce residues of different sources ($p > 0.05$), and the total amount of soy isoflavone aglycones in the soy sauce residue from company ② was significantly higher than those for other companies ($p < 0.01$). After washing with water, extraction with ethyl acetate and adsorption by neutral alumina, the content of soy isoflavone aglycones in the soy sauce residue from company ② reached $30.35\% \pm 1.34\%$. After purification, the soybean isoflavone aglycones from Company ② significantly reduced NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 macrophages ($p < 0.01$), with the highest inhibitory rates as 80.65%, 75.94%, 78.52% and 85.84%, respectively ($p < 0.01$), thus possessing extremely significant anti-inflammatory activities. In this research, the composition and anti-inflammatory activity of soy isoflavone aglycones in the soy sauce residues of different sources were preliminarily studied, which provided a theoretical basis for further development and utilization of soybean isoflavone aglycone resources.

Key words: soy sauce residue; soy isoflavones; aglycones; anti-inflammation

收稿日期: 2018-11-27

基金项目: 广东省科技计划项目 (2015B020230008); 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目 (2016LM2151); 国家自然科学基金项目 (31700501)

作者简介: 李伟 (1991-), 男, 博士研究生, 研究方向: 天然活性物提取、分离、鉴定及活性评价; 共同第一作者: 杜洁 (1990-), 男, 中级工程师, 研究方向: 食品加工与安全

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物提取、分离、鉴定及活性评价

酱油作为我国传统的发酵食品,在人们的日常饮食生活中发挥着不可替代的作用,而在生产酱油过程中会产生大量的酱油渣。酱油渣一般是指酿造酱油原料经发酵、抽油或淋油后产生的固体残渣^[1],酱油渣中存在大量生物活性物质,例如大豆异黄酮、膳食纤维等,具有极大的回收利用价值;尤其是副产物大豆异黄酮,主要以苷元形式存在,具有优异生理活性。因水分大、盐分高以及运输困难等问题而难以被利用^[2]。目前,酱油渣大多被用作低值饲料,既造成了资源浪费,又会因处理不当而造成环境污染。

大豆异黄酮是一类具有多酚结构混合物的统称,是大豆生长过程中的产物,属于植物次级代谢产物^[3],同时,大豆异黄酮也是一种天然植物雌激素,具有多种生理活性。已有研究^[4]指出大豆异黄酮是酱油渣中的主要抗氧化物质,同时其还具有抗炎^[5,6]、抗肿瘤^[7]、抗菌^[8,9]、改善骨质疏松^[10]等作用。大豆异黄酮主要分为游离型苷元和结合型糖苷两种;迄今已有 12 种异黄酮被鉴定出来,包括 3 种苷元和 9 种糖苷,而结合型大豆异黄酮糖苷需要通过酶解等方式降解成游离型苷元才能更好地被机体吸收^[11]。现代研究表明经过发酵的酱油渣中大豆异黄酮苷元含量显著提高,具有抗炎、抗心律失常、抑菌等作用。为了提高酱油渣的综合利用附加值,拟通过本实验室自主知识产权低温连续相变萃取技术萃取油脂后,再进行大豆异黄酮苷元的提取,筛选最佳酱油渣大豆异黄酮苷元原料。本文对不同来源酱油渣脱脂前后大豆异黄酮苷元种类和含量进行分析,并评价初步纯化后大豆异黄酮苷元的抗炎活性,旨在为酱油渣来源大豆异黄酮的开发利用提供研究数据。

1 材料与设备

1.1 材料与仪器

酱油渣由公司①、公司②和公司③分别提供,存放于 4℃冷库中;大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素标准品(含量≥98%)购于美国 Sigma 公司。

小鼠腹腔 RAW 264.7 巨噬细胞购于中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库;余甘子由无限极(中国)有限公司提供;脂多糖 LPS、地塞米松、噻唑蓝 MTT 购于美国 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基购于美国 Hyclone 公司;四季青胎牛血清购于浙江天杭生物科技股份有限公司;NO 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;IL-1 β , IL-6, TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)购于欣博盛公司;乙腈,乙酸,乙醇等均为

分析纯或色谱级。

高效液相色谱仪(LC-10AT_{VP plus}),日本岛津公司;AL104 万分之一电子天平, Mettler; KQ-500B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FW100 型高速万能粉碎机, 天津市华鑫仪器厂; R204B3 型旋转蒸发器, 上海申生科技; LDZX-40B 型立式自控电热蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; SMZ-T4 连续变倍体视显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; SWCJ-A 超净工作台, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司; EnSpire 酶标仪, PerkinElmer 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

未脱脂酱油渣大豆异黄酮苷元提取: 称取不同来源的样品 0.5 g (精确到 0.001 g) 于 10 mL 容量瓶中, 用 85%乙醇定容至 10 mL, 超声 20 min, 5000 r/min 离心 15 min 后取上清, 萃取三次, 将上清液合并后过 0.22 μ m 有机滤膜, 滤液进液相分析。

脱脂酱油渣大豆异黄酮苷元提取: 酱油渣中油脂含量高, 将油脂提取后再进行大豆异黄酮苷元的提取有利于提高酱油渣综合利用率。采用实验室自主知识产权低温连续相变装置对酱油渣进行脱脂处理, 再称取脱脂酱油渣 0.5 g (精确到 0.001 g) 于 10 mL 容量瓶中, 用 85%乙醇定容至 10 mL, 超声 20 min, 5000 r/min 离心 15 min 后取上清, 萃取三次, 将上清液合并后过 0.22 μ m 有机滤膜, 滤液进液相分析。

大豆异黄酮苷元纯化: 将乙醇提取物按照 10 倍体积蒸馏水萃取三次, 离心后去除上清液; 再将下层料渣以 2 倍体积乙酸乙酯萃取三次, 合并上清液; 最后以料液比 1:10 加入中性氧化铝吸附后可制得大豆异黄酮苷元, 再进行抗炎活性评价。

表 1 高效液相色谱洗脱程序表

Table 1 High performance liquid chromatography elution schedule

时间/min	有机相浓度/%
0	10
10	18
23	24
30	30
50	30
55	85
60	85
61	10
70	10

大豆异黄酮标准品: 称取六种大豆异黄酮标准品

各 5 mg, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用 85%乙醇定容至刻度线, 超声处理 20 min。配成浓度为 500 mg/L 的标准储备液, 分别吸取 200 μ L、400 μ L、600 μ L、800 μ L、1000 μ L 的六种标准母液, 用 85%乙醇稀释定容到 10 mL 容量瓶中, 4 $^{\circ}$ C 冷藏避光保存。

色谱条件: 色谱柱为 Agelapromosil C18 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 柱温 36 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L; 流动相为 0.1%乙酸水溶液和乙腈(B 泵); 流速 1 mL/min; 检测波长为 260 nm(UV)。洗脱程序如表 1。

1.2.2 大豆异黄酮苷元抗炎活性评价

1.2.2.1 细胞培养方法

所用细胞为小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞系, 于含 10%的 FBS、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 完全培养基中, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中传代培养。细胞生长至 70%~80%融合后进行传代, 1~2 d 换一次培养液, 4~6 d 传代一次。所有操作均为无菌操作。

1.2.2.2 MTT 法检测 RAW264.7 细胞活力

取对数生长期的 RAW 264.7 细胞, 用 DMEM 培养基调整细胞浓度为 5 \times 10⁴ 个/mL, 接种到 96 孔板, 每孔体积 200 μ L。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 更换培养基, 加入不同浓度的大豆异黄酮苷元共同培养 24 h。培养结束后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 试剂 20 μ L 继续孵育 4 h, 弃上清后每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min 溶解沉淀。酶标仪 570 nm 波长处测定各孔吸光值(OD 值), 以无细胞仅含培养基的孔作为空白, 以正常细胞孔为对照, 以含样品的孔为样品组, 通过以下公式计算得到相对活性:

$$\text{细胞活性}\% = \frac{\text{样品 OD} - \text{空白 OD}}{\text{对照 OD} - \text{空白 OD}} \times 100\%$$

1.2.2.3 大豆异黄酮苷元对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞分泌 NO 的影响

于 96 孔板中, 每孔加 RAW 264.7 细胞悬液 (5.0 \times 10⁴ 个/mL)200 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱孵育 4 h, 弃去培养液, 加入 100 μ L 终浓度为 1 μ g/mL LPS 的完全培养液(空白对照加完全培养基)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 弃去上清液并用 PBS 清洗三遍, 加入含不同浓度药物的新鲜完全培养液 200 μ L (阴性对照加完全培养基)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 将细胞上清液转移至另一 96 孔细胞培养板, 各孔加入 Griess A 和 Griess B 混合试剂 (1:1) 100 μ L, 暗处避光反应 10 min, 于 550 nm 处测定 OD 值。根据标准曲线计算待测样品中 NO 含量。

1.2.2.4 大豆异黄酮苷元对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞

分泌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的影响

ELISA 法检测 RAW264.7 细胞培养上清中的细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 的水平。将对数生长期 RAW 264.7 细胞以 5 \times 10⁴ 个/孔的浓度接种于 96 孔板, 每孔体积 200 μ L。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 将 RAW 264.7 细胞分为对照组、LPS 组(1 μ g/mL, 模型组)、大豆异黄酮苷元(25、50、100 mg/mL), 继续培养 24 h 后收集细胞培养上清液, 依小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 ELISA 试剂盒说明书测定含量。参照 ELISA 试剂盒测定步骤检测细胞因子。

1.2.3 数据分析与统计

数据用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析, 差异显著者进行 Duncan's 多重比较。结果用平均值 \pm 标准误差表示, 显著水平设置为 $p=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮六种标准品标准曲线

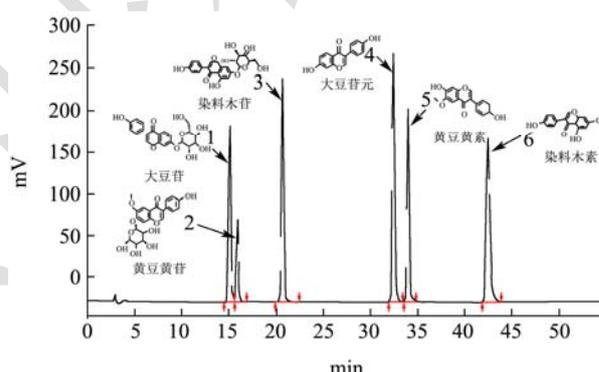


图 1 大豆异黄酮标准品高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatogram of soy isoflavones standards

通过对大豆异黄酮六种标准品进行高效液相色谱分析, 以外标法定量方式建立大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素标准曲线, 其中大豆苷元、黄豆黄素、染料木素为苷元型大豆异黄酮, 具体见表 2。

表 2 大豆异黄酮标准曲线

Table 2 Standard curve of soy isoflavone standard

项目	标准曲线	相关系数
大豆苷	$y = 32633032.43x - 12674.51$	$R^2 = 0.99$
黄豆黄苷	$y = 19034064.86x - 11435.02$	$R^2 = 0.99$
染料木苷	$y = 46481550.30x - 7762.63$	$R^2 = 0.99$
大豆苷元	$y = 55511488.18x - 27288.39$	$R^2 = 0.99$
黄豆黄素	$y = 17243089.56x - 11549.72$	$R^2 = 0.99$
染料木素	$y = 74217365.20x - 31601.28$	$R^2 = 0.99$

2.2 不同来源酱油渣脱脂前后大豆异黄酮苷元分析

表 3 不同来源酱油渣脱脂前大豆异黄酮苷元分析

Table 3 Soy isoflavone aglycon analysis from different sources of soy sauce residue before degreasing

项目	公司①/‰	公司②/‰	公司③/‰
大豆苷元	1.09±0.10 ^b	1.26±0.01 ^a	0.25±0.02 ^c
黄豆黄素	0.34±0.05 ^{ab}	0.31±0.01 ^a	0.14±0.00 ^c
染料木素	1.44±0.10 ^b	1.77±0.03 ^a	0.56±0.05 ^c
总苷元	2.87±0.25 ^b	3.34±0.06 ^a	0.94±0.07 ^c

由表 3 可知, 三种来源的酱油渣均未检出大豆苷元和黄豆黄素, 大豆异黄酮种类以游离型苷元(大豆苷元、黄豆黄素、染料木素)为主要成分。公司②酱油渣中大豆异黄酮总苷元为 3.34‰±0.06‰, 其含量比公司①酱油渣、公司③酱油渣显著高 16.27%、256.51% ($p<0.01$); 同时, 公司②酱油渣中大豆苷元及染料木素含量均显著高于其他两组 ($p<0.01$)。在三组酱油渣中, 公司③酱油渣中的总苷元及各项苷元单体化合物含量均显著低于其他两组 ($p<0.01$)。

表 4 不同来源酱油渣脱脂后大豆异黄酮苷元分析

Table 4 Soy isoflavone aglycon analysis from different sources of soy sauce residue after degreasing

项目	公司①/‰	公司②/‰	公司③/‰
大豆苷元	0.89±0.01 ^b	1.19±0.01 ^a	0.21±0.00 ^c
黄豆黄素	0.27±0.03 ^{ab}	0.31±0.00 ^a	0.13±0.00 ^c
染料木素	1.61±0.14 ^b	1.66±0.02 ^a	0.46±0.02 ^c
总苷元	2.33±0.28 ^b	3.17±0.03 ^a	0.80±0.03 ^c

由表 4 可得, 公司②酱油渣中大豆异黄酮总苷元为 3.17‰±0.03‰, 其含量比公司①酱油渣、公司③酱油渣显著高 35.66%、294.64% ($p<0.01$)。同时, 公司②酱油渣中大豆苷元及染料木素含量均显著高于其他各组 ($p<0.01$)。在三组酱油渣中, 公司③酱油渣中的总苷元及各项苷元单体化合物含量均显著低于其他两组 ($p<0.01$)。

酱油渣中因油脂含量高而造成提取异黄酮苷元效率不高, 脱脂处理后实际提取异黄酮苷元溶剂损耗量和萃取时间均大大降低。由表 3 和表 4 可得, 酱油渣脱脂前后并不影响异黄酮苷元种类, 而实际提取效率大大提高, 酱油渣资源得到充分利用。结果指出公司②酱油渣来源的大豆异黄酮总苷元含量最高, 主要以大豆苷元、黄豆黄素和染料木素三种游离型苷元形式存在。综合考虑各公司实际酱油渣生产情况和总苷元含量, 后续实验以公司②脱脂后酱油渣作为大豆异黄

酮苷元来源。

2.3 大豆异黄酮苷元分离纯化

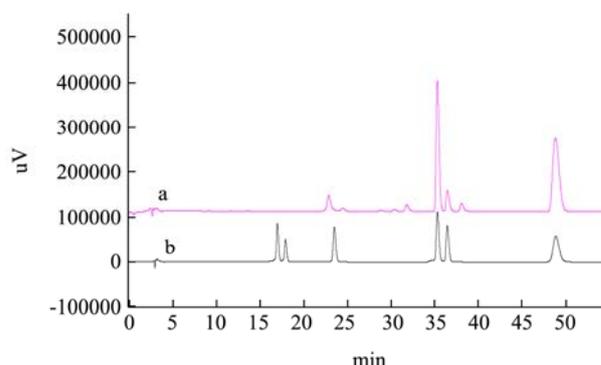


图 2 纯化后大豆异黄酮苷元高效液相色谱图

Fig.2 High performance liquid chromatography of purified soy isoflavone aglycon

注: a: 纯化后大豆异黄酮苷元样品; b: 大豆异黄酮标准品。

为提高酱油渣综合利用价值, 对大豆异黄酮苷元提取物进行分离纯化以获得最佳纯度的大豆异黄酮苷元。以公司②酱油渣为最佳大豆异黄酮苷元来源, 提取脱脂后酱油渣中大豆异黄酮苷元, 按照方法 1.2.1 中方法分离纯化大豆异黄酮苷元, 以大豆异黄酮苷元标准品定量其含量, 最终得到纯度 30.35%±1.34% 的大豆异黄酮苷元。后续实验将以上述大豆异黄酮苷元为研究对象, 重点研究其对 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞产生炎症反应的影响。这既符合工业化生产的需求, 又结合科学的分离纯化方法, 再从研究的角度系统阐述大豆异黄酮苷元的生理活性, 有助于科学研究和产业化的有机结合。

2.4 大豆异黄酮苷元抗炎活性评价

2.4.1 大豆异黄酮苷元对细胞活性的影响

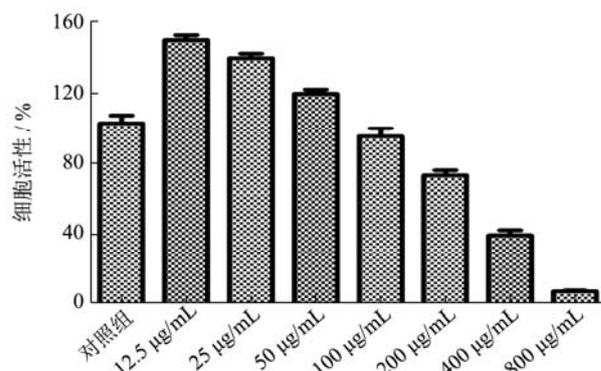


图 3 大豆异黄酮苷元对 RAW 264.7 巨噬细胞活性的影响

Fig.3 Effects of soy isoflavone aglycon proliferation of RAW264.7 cells

实验以上述酱油渣大豆异黄酮苷元为原料, 采用

MTT 法检测研究其对 RAW 264.7 巨噬细胞活性的影响。图 3 结果表明：大豆异黄酮苷元在样品浓度 12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 对细胞无明显毒性 ($p>0.05$)，样品浓度在 200~800 $\mu\text{g/mL}$ 内具有显著细胞毒性 ($p<0.05$)。后续实验以 25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 为给药浓度梯度，进行大豆异黄酮苷元抗炎活性实验。

2.4.2 大豆异黄酮苷元对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞释放炎症介质 NO 的影响

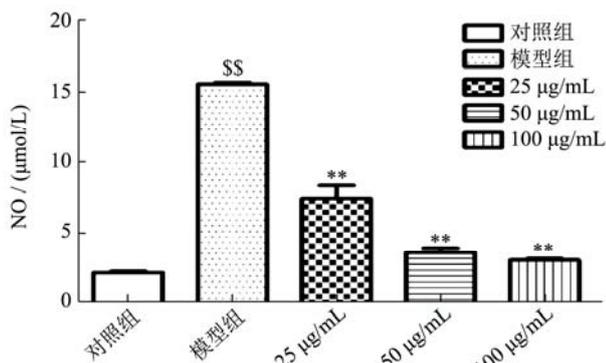


图 4 大豆异黄酮苷元对 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞释放炎症介质 NO 的影响

Fig.4 Effects of soy isoflavone aglycon on NO release in LPS-stimulated RAW264.7 cells

注：对照组和模型组对比： $^{\$}p<0.05$ ， $^{\$\$}p<0.01$ ；样品组和模型组对比： $^*p<0.05$ ， $^{**}p<0.01$ 。

NO 是一种非常重要的炎症介质，在生理和病理条件下参与调节机体急慢性炎症，其保持一定程度的平衡对机体尤其重要^[12]。如图 4 所示，对照组炎症介质 NO 的分泌水平为 $2.16 \pm 0.13 \text{ mol/L}$ ，1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理 RAW 264.7 巨噬细胞后，炎症介质 NO 的分泌水平为 $15.53 \pm 0.20 \mu\text{mol/L}$ ，二者之间 NO 的含量具有极显著差异 ($p<0.01$)，说明造模成功。相比于模型组，25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 大豆异黄酮苷元组 NO 分泌量显著降低 52.26%、77.42%、80.65% ($p<0.01$)，抗炎效果呈浓度梯度依赖型。NO 是由 NO 合酶催化 L-精氨酸合成而来，以原生型和诱导型两种形式存在。病理情况下，RAW 264.7 巨噬细胞产生大量 NO，造成细胞持续处于炎症状态。大豆异黄酮苷元显著抑制 NO 生成，调节其在细胞中分泌量以达到抗炎的作用。

TNF- α 是由活化的巨噬细胞产生，直接或间接参与炎症反应，促进花生四烯酸代谢通路而改变炎症反应过程中多种酶的表达，导致过度炎症反应^[13]。如图所示，对照组细胞因子 TNF- α 的分泌水平为 $25.11 \pm 1.89 \text{ pg/mL}$ ，1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理 RAW 264.7 巨噬细胞后，细胞因子 TNF- α 的分泌水平为 $178.79 \pm 9.22 \text{ pg/mL}$ ，二者之间 TNF- α 的含量具有极显著差异

($p<0.01$)，说明 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞模型诱导成功。图 5 可得，相比于模型组，25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 大豆异黄酮苷元组 TNF- α 分泌量显著降低 33.71%、56.17%、75.94%，具有显著抗炎效果。已有研究^[12]指出炎症发生时，伴随有 NF- κB 转录因子进入细胞核、花生四烯酸通路激活等生理生化反应，二萜、三萜及其苷类及黄酮及其苷类等均为已发现的抗炎天然产物活性成分。大豆异黄酮苷元为黄酮类物质，体外实验中显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生的 TNF- α ，与文献报道相一致。

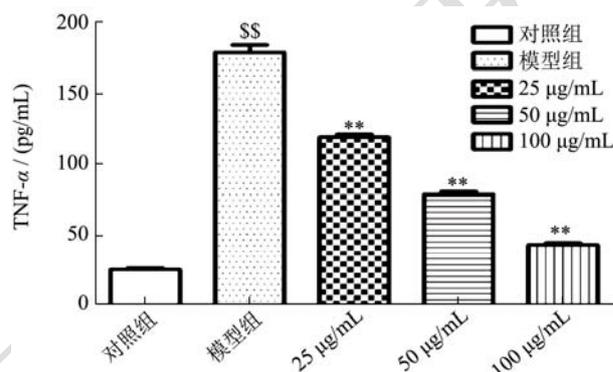


图 5 大豆异黄酮苷元对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞释放炎症介质 TNF- α 的影响

Fig.5 Effects of soy isoflavone aglycon on TNF- α release in LPS-stimulated RAW264.7 cells

注：对照组和模型组对比： $^{\$}p<0.05$ ， $^{\$\$}p<0.01$ ；样品组和模型组对比： $^*p<0.05$ ， $^{**}p<0.01$ 。

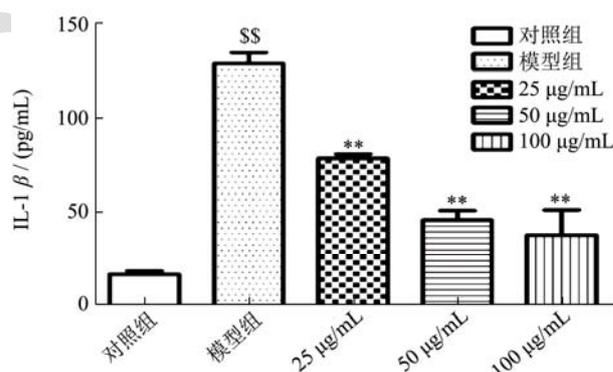


图 6 大豆异黄酮苷元对 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞释放炎症介质 IL-1 β 的影响

Fig.6 Effects of soy isoflavone aglycon on IL-1 β release in LPS-stimulated RAW264.7 cells

注：对照组和模型组对比： $^{\$}p<0.05$ ， $^{\$\$}p<0.01$ ；样品组和模型组对比： $^*p<0.05$ ， $^{**}p<0.01$ 。

如图所示，对照组细胞因子 IL-1 β 的分泌水平为 $16.93 \pm 3.12 \text{ pg/mL}$ ，1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理 RAW 264.7 巨噬细胞后，细胞因子 IL-1 β 的分泌水平为 $129.02 \pm 10.16 \text{ pg/mL}$ ，二者之间 IL-1 β 的含量具有极显著差异 ($p<0.01$)，说明 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞模型

诱导成功。图 6 可得, 相比于模型组, 25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 大豆异黄酮苷元组 IL-1 β 分泌量显著降低 39.30%、64.26%、78.52% ($p < 0.01$), 抗炎效果呈浓度梯度依赖型。

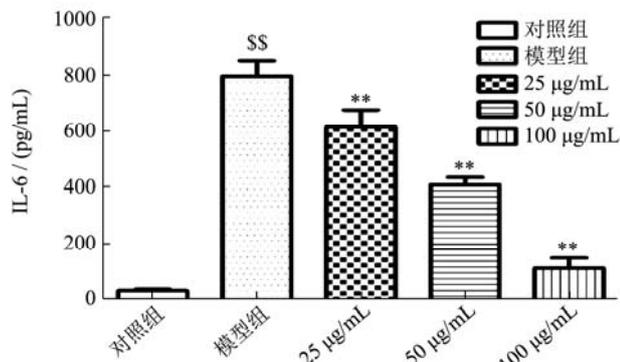


图 7 大豆异黄酮苷元对 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞释放炎症介质 IL-6 的影响

Fig.7 Effects of soy isoflavone aglycon on IL-6 release in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

注: 对照组和模型组对比: $^{\$}p < 0.05$, $^{SS}p < 0.01$; 样品组和模型组对比: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ 。

如图所示, 对照组细胞因子 IL-6 的分泌水平为 32.03 ± 8.04 pg/mL, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 处理 RAW 264.7 巨噬细胞后, 细胞因子 IL-6 的分泌水平为 792.53 ± 92.13 pg/mL, 二者之间 IL-6 的含量具有极显著差异 ($p < 0.01$), 说明 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞模型诱导成功。图 7 可得, 相比于模型组, 25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 大豆异黄酮苷元组 IL-6 分泌量显著降低 22.90%、48.56%、85.84%, 抗炎效果呈浓度梯度依赖型。

3 分析与讨论

酱油渣中异黄酮是另一类极具开发潜力的产品, 现代医学已经证实大豆异黄酮具有预防、改善骨质疏松, 预防乳腺癌、心血管疾病、老年痴呆症, 美容、延缓衰老等众多功用^[1,3,5,6]。原大豆中含有大量的异黄酮类活性物, 但 97%~99% 是以糖苷形式存在, 苷元形式仅为大豆异黄酮总量 1%~3%。人体一般不吸收糖苷形式的大豆异黄酮, 苷元的生理活性也远比其相应的糖苷活性高^[2,14]。在酿造酱油的过程中, 大豆 β -葡萄糖苷酶和微生物的发酵作用使得糖苷形式的异黄酮转化成苷元形式。由于该类物质难溶于水, 所以绝大部分仍残存在酱油渣中。为了充分利用酱油渣资源, 实验选用低温连续相变技术先提取酱油渣中油脂, 再提取残渣中的大豆异黄酮苷元。通过分析不同来源酱油渣中异黄酮苷元, 公司②酱油渣中大豆异黄酮苷元总量、大豆苷元及染料木素在脱脂前后均显著高于其他

两组。发酵后酱油渣中苷元形式的异黄酮更易吸收, 具有有效生理活性^[15]。因初步提取出的大豆异黄酮苷元含量普遍偏低, 通过分离纯化的方式将其含量提高到 30% 左右, 这符合现代工业化和企业的需要, 具有重要的现实意义。

同时, 本试验深入研究酱油渣大豆异黄酮苷元的抗炎活性, 从细胞层面阐述抗炎作用, 为大豆异黄酮苷元在畜禽中增强免疫作用提供科学研究基础。实验发现酱油渣大豆异黄酮苷元能显著抑制 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生的炎症介质 NO 和细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6), 这也揭示大豆异黄酮苷元添加到饲料中有助于改善畜禽免疫能力的部分机制。现代研究指出炎症的发生受多个信号通路介导, 其抗炎作用主要体现在调控细胞因子和炎症介质、抑制诱导型一氧化氮合酶以及环氧合酶等机制^[16-18]。周新^[19]等指出大豆异黄酮显著下调 β 淀粉样肽诱导的大鼠脑组织炎症中白介素-1 β 、诱导型一氧化氮合成酶以及白介素-10 基因和蛋白含量。相似研究成果表明大豆异黄酮同样具有显著降低膳食诱导的肥胖大鼠低度炎症介质中 IL-6 和 TNF- α 的作用^[20]。结合本次实验结果, 可初步得出结论酱油渣大豆异黄酮苷元具有良好的抗炎活性, 体外实验指出其主要体现在对于炎症介质和细胞因子的显著抑制作用。

4 结论

本实验分析不同来源酱油渣脱脂前后大豆异黄酮苷元, 这有助于对酱油渣资源的科学分析, 筛选出最优原材料。在此基础上, 深入研究大豆异黄酮苷元抗炎作用, 为大豆异黄酮苷元的应用提供理论基础。但研究酱油渣来源大豆异黄酮苷元依然存在亟待解决的问题, 例如高效萃取酱油渣中大豆异黄酮苷元技术以及快速精制大豆异黄酮等。在研究层面, 如何高效获取苷元形式含量高的大豆异黄酮以及大豆异黄酮抗炎活性机理等科学问题需要进一步探究。总之, 酱油渣来源大豆异黄酮苷元是一种优质且具有良好活性的黄酮类物质, 具有广阔的应用和研究前景。

参考文献

- [1] 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(5): 46-52
WANG Shuai, ZHU Xin-gui, LI Xue-wei. Extraction of melanin and soy isoflavone from soy sauce residue [J]. China Brewing, 2017, 36(5): 46-52
- [2] 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

- DONG Ling-yan. Extraction and purification of soybean isoflavone from soy sauce residue [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [3] 王建华.大豆异黄酮研究进展[J].现代中药研究与实践, 2013,1:85-88
- WANG Jian-hua. Research progress of soybean isoflavone [J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2013,1: 85-88
- [4] 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,2012,14:30-35
- DONG Ling-yan, LI Lin, ZHAO Lei, et al. Extraction and purification of soy isoflavones from soy sauce cake [J]. Food Science, 2012, 14: 30-35
- [5] Mirahmadi S, Shahmohammadi A, Rousta A, 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
- [6] 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- κ B-inflammatory signaling pathways, as well as inhibition of COX-2 activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(23): 5790-5801
- [7] Friedman J, Frye C. 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(3): 164-175
- [8] Naim M, Gestetner B, Zilkah S, et al. Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1974, 22(5): 806-810
- [9] Marin L, Miguelez E M, Villar C J, et al. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties [J]. Biomed Research International, 2015, 905215
- [10] Taku K, Melby M K, Kurzer M S, et al. Effects of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Bone, 2010, 47(2): 413-423
- [11] 巩欣,程永强,纪凤娣,等.酱油渣的再利用研究进展[J].食品工业科技,2013,5:384-387
- GONG Xin, CHENG Yong-qiang, JI Feng-di, et al. Research progress in the comprehensive utilization of soy sauce residue [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 5: 384-387
- [12] 朱华伟,李伟,陈运娇,等.余甘子化学成分及其抗炎作用的研究进展[J].中成药,2018,3:670-674
- ZHU Hua-wei, LI Wei, CHEN Yun-jiao, et al. Study on anti-inflammatory activity of different solvent extracts of *Phyllanthus emblica* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 3: 670-674
- [13] 朱秀美,杨国松,李秀才.中药黄芩抗炎作用机理的研究进展[J].中医临床研究,2013,24:111-112
- ZHU Xiu-mei, YANG Guo-song, LI Xiu-cai. Research review on anti-inflammatory mechanism of action of *scutellaria baicalensis georgi* [J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2013, 24: 111-112
- [14] 何学军,齐德生.大豆异黄酮的营养生理功能研究进展[J].兽药与饲料添加剂,2006,2:23-26
- HE Xue-jun, QI De-sheng. Advances in research on nutritional and physiological functions of soybean isoflavones [J]. Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives, 2006, 2: 23-26
- [15] 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
- CHEN Yuan, ZHANG Zhi-guo. Research progress on effective utilization of residual protein in soy sauce residue [J]. China Condiment, 2016, 41(3): 153-157
- [16] 韩彩静.蓝莓多酚的提取及对巨噬细胞抗炎因子的影响[D].长春:吉林农业大学,2014
- HAN Cai-jing. Effect of polyphenols extracted from blueberries on anti-inflammatory factors in macrophages [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014
- [17] Zhang J, Miao D, Zhu W, et al. Biological activities of phenolics from the fruits of *Phyllanthus emblica* L. (*Euphorbiaceae*) [J]. Chemistry & Biodiversity, 2017, 14(12): e1700404
- [18] Azab A, Nassar A, Azab A. Anti-Inflammatory activity of natural products [J]. Molecules, 2016, 21(10): 1321
- [19] 周新,丁冰杰,肖荣,等.大豆异黄酮对 β 淀粉样肽诱导的大鼠脑组织炎症相关因子表达的影响[J].中国食品卫生杂志, 2012,1:1-4
- ZHOU Xin, DING Bing-jie, XIAO Rong, et al. Effect of soybean isoflavones on the expression of inflammatory mediators in the brain of rats induced by β -amyloid peptides [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2012, 1: 1-4

(下转第 309 页)