

豆科牧草中活性物质的 制备与应用研究

朱宇旌 张 勇 著



中国农业科学技术出版社

豆科牧草中活性物质的 制备与应用研究

张明强 张 强 著



中国农业大学出版社 北京

豆科牧草中活性物质的 制备与应用研究

朱宇旌 张 勇 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

豆科牧草中活性物质的制备与应用研究 / 朱宇旌, 张勇著. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2011. 10

ISBN 978 - 7 - 5116 - 0655 - 6

I. ①豆… II. ①朱…②张… III. ①豆科牧草—研究 IV. ①S54

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 180559 号

责任编辑 徐 毅

责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市海淀区中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82106631 (编辑室) (010) 82109704 (发行部)

(010) 82109709 (读者服务部)

传 真 (010) 82106631

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京华忠兴业印刷有限公司

开 本 787 mm × 1 092 mm 1/16

印 张 18.75

字 数 250 千字

版 次 2011 年 10 月第 1 版 2011 年 10 月第 1 次印刷

定 价 42.00 元

——版权所有·翻印必究——



序 言

随着我国加入 WTO 以及国民生活水平的不断提高,人们对绿色食品和畜产品的要求愈加迫切。而从资源丰富的天然植物中提取分离活性物质,并进行结构分析及功能鉴定则被认为是生产绿色保健品及饲料添加剂的一种安全有效方法。

豆科牧草尤其是紫花苜蓿和红三叶以其品质好、产草量高、适口性好、营养丰富、易于家畜消化、适应性强等特点在世界各地广泛种植。紫花苜蓿和红三叶的茎、叶中含有包括矿物营养素在内的多种活性物质及未知生长因子,由于其种植广泛、产量高、全株都可利用,因此对其进行深加工,必然能大大提升牧草的附加值,有效提高草的利用效率,同时还可减少环境污染。

传统的牧草产品利用结构中,以家畜饲料为主,作为天然保健食品和饲料添加剂的研究及应用较少。20 世纪 80 年代以来,美国、英国、澳大利亚、俄罗斯等国家十分重视从栽培牧草中提取有效物质的技术研究和产品开发,对苜蓿等牧草进行多层次加工和综合利用,用于饲料业、食品业和医药业中,取得了较高的经济效益。我国目前的草产品,多以草捆、草块、草颗粒、草粉等初级产品为主,技术含量低,加工量不足 5%,产销一体化程度低,还没有形成市场竞争力强的品牌产品,也无精加工产品,亟待使资源优势变为商品优势。因此,对重要豆科牧草如紫花苜蓿和红三叶进行



深入系统的研究，具有重要的生产意义。

本书是对本课题组近年来在牧草深加工方面所作工作的汇总，主要包括五章，第一章介绍了紫花苜蓿异黄酮的提取、纯化、体外抗氧化功能及其对小鼠生长、免疫和抗氧化功能的影响；第二章介绍了紫花苜蓿叶蛋白的提取、肽制剂的制备及苜蓿肽制剂对小鼠生长和免疫功能的影响；第三章介绍了紫花苜蓿多糖的提取、分离纯化、结构组成、理化性质及其对小鼠生长、免疫和抗氧化功能的影响；第四章介绍了红三叶异黄酮的提取，纯化，体外抗氧化功能，对小鼠生长、免疫和抗氧化功能的影响及其对肉仔鸡生长、免疫、抗氧化功能、蛋白代谢、脂类代谢、屠宰性能和肉品质等方面的影响；第五章介绍了红三叶叶蛋白的提取、肽制剂的制备及红三叶肽制剂对小鼠免疫功能的影响。

这本书得以出版，任慧玲硕士、王海东硕士、宋执磊硕士、纪鹏博士、刘勇硕士、田书音硕士、王纯刚硕士、冯冲硕士以及王翀硕士等都付出了大量的劳动，对于他们作出的贡献，作者一并表示深切的感谢。

朱宇旌 张 勇

2011 年 8 月于沈阳



目 录

绪论	(1)
第一章 紫花苜蓿异黄酮的提取、纯化及功能	(42)
第一节 紫花苜蓿异黄酮的提取	(42)
第二节 紫花苜蓿异黄酮的纯化	(50)
第三节 紫花苜蓿异黄酮的体外抗氧化功能	(62)
第四节 紫花苜蓿异黄酮对小鼠生长和免疫功能的影响	(68)
第五节 紫花苜蓿异黄酮对小鼠抗氧化功能的影响	(76)
第二章 紫花苜蓿肽制剂的制备及功能	(83)
第一节 紫花苜蓿干草中叶蛋白的提取及质量分析	(83)
第二节 酶解法制备苜蓿肽制剂的工艺	(97)
第三节 苜蓿肽制剂对小鼠生长和免疫功能的影响	(116)
第四节 紫花苜蓿肽制剂的氨基酸利用率	(124)
第三章 紫花苜蓿多糖的提取、纯化及功能	(131)
第一节 紫花苜蓿多糖的提取	(131)
第二节 紫花苜蓿多糖的纯化	(138)
第三节 紫花苜蓿多糖的理化性质及结构组成	(149)
第四节 紫花苜蓿多糖对小鼠的生长和免疫功能的影响	(159)
第五节 紫花苜蓿多糖对小鼠抗氧化功能的影响	(169)



第四章 红三叶异黄酮的提取、纯化及功能	(176)
第一节 红三叶异黄酮的提取	(176)
第二节 红三叶异黄酮的纯化	(183)
第三节 红三叶异黄酮的体外抗氧化功能	(198)
第四节 红三叶异黄酮对小鼠生长和免疫功能的影响	(205)
第五节 红三叶异黄酮对小鼠抗氧化功能的影响	(213)
第六节 红三叶异黄酮对肉鸡生长性能的影响	(221)
第七节 红三叶异黄酮对肉鸡免疫功能和抗氧化性能的影响	(232)
第八节 红三叶异黄酮对肉鸡屠宰性能及肌肉品质的影响	(242)
第五章 红三叶肽制剂的制备及其功能	(253)
第一节 红三叶干草中叶蛋白的提取	(253)
第二节 酶解法制备红三叶肽制剂的工艺	(263)
第三节 红三叶肽制剂对小鼠免疫功能的影响	(277)
主要参考文献	(288)



绪 论

一、紫花苜蓿和红三叶的基本特性

(一) 紫花苜蓿

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 系豆科苜蓿属多年生草本植物, 原产于伊朗, 现分布世界各国, 从南纬 40°至北纬 60°的广大地区均有栽培, 是世界上栽培最早、种植最广的牧草。在我国东北、华北、西北地区已普遍种植, 南方也有栽培。目前全世界苜蓿种植面积为 3 300 万 hm^2 , 苜蓿在美国种植业中已成为仅次于小麦、玉米和水稻的第四大农作物, 种植面积近 1 000 万 hm^2 , 目前我国苜蓿栽培面积 150 万 hm^2 , 居世界第六位, 而且越来越成为一种重要的饲料作物进入到了人们的日常生活当中。它以产量高、营养丰富、适口性好而享有“牧草之王”的美誉。

紫花苜蓿系中寿牧草, 一般第二至第四年生长最茂盛, 第五年后生产力逐渐下降。紫花苜蓿根系发达, 主根粗大, 有较强的耐寒、抗旱和再生能力, 根瘤发达。茎直立、光滑, 多分枝, 绿色或带紫色, 可用于扦插, 再生力强。三出羽状复叶, 倒卵圆形, 基部较窄, 先端较阔, 有锯齿。叶量多, 全株叶片占鲜草重量的 46% ~ 55%。紫色总状花序, 蝶形花、异花受粉植物。荚果螺旋形, 2 ~ 4 回, 不开裂, 每荚有种子 2 ~ 8 粒。种子肾形, 黄色, 直径约 1mm, 千粒重 2g 左右。



紫花苜蓿喜温凉、半干旱的气候，生长最适宜的温度在 25℃ 左右。年降水量 300 ~ 800mm、无霜期在 100 天以上地区都可以种植。5 ~ 6℃ 即可发芽，能耐受 -6 ~ -5℃ 的寒冷。成年植物能耐 -20℃ 左右低温，在雪被覆盖下可耐 -44℃ 严寒。

紫花苜蓿可粉碎、打浆后饲喂单胃动物和幼畜。每日饲喂蛋鸡 50 ~ 100g，可使其生长速度快、少发病、蛋黄鲜黄，商品价值提高。用于喂猪，育肥效果最好，使其生长快肉质好；饲喂母猪泌乳多，仔猪生长快，发病少。同时，紫花苜蓿是鸭、鹅等家禽的优质饲料，也是食草鱼类喜食的饲料。

紫花苜蓿可切碎或整喂反刍动物及马、驴、骡等草食动物。用于饲喂乳牛，可使泌乳量提高，且乳脂好、味道香。若切成 10 ~ 15cm 的草段与青贮玉米、精料混合饲喂，还节约精料，促进生长发育。

紫花苜蓿也可用于调制青贮饲料。窖贮时，多与禾本科牧草、作物秸秆等混贮；半干青贮时先将水分降至 45% ~ 50%，采用塑料袋抽真空压紧贮存，或用机械包紧至真空状；也可添加 0.5% 乙酸，使 pH 值很快达到 4，可以明显减少干物质、蛋白质的损失，保证青贮质量。

紫花苜蓿也可经自然风干或机械烘干后制成草粉、草块、草捆贮藏。是草食动物冬春季节的主要饲草，通常与其他粗饲料混合饲喂，用以提高粗饲料的营养价值及适口性。1kg 优质的苜蓿干草粉，可代替 0.8kg 精料，苜蓿可消化总养分的含量为大麦的 55%。我国紫花苜蓿重点产区的产量相当高，按其粗蛋白质占干草重的 20% 左右计算，每亩产蛋白质约 150kg。苜蓿干物质消化率一般为 60% (55% ~ 64%)。经二次压缩后的干草捆是我国苜蓿出口的主要产品形式。另外，草粉可作为配合饲料的原料之一，开发潜力较大，今后将会对我国饲料工业发展起良好的促进作用。

紫花苜蓿还含有人体所需的多种营养元素，其中 L-肉碱、生物活性钙、各种必需氨基酸、维生素 E、维生素 C 等含量较其他植物高 2 ~ 3 倍，



特别是各种维生素的含量丰富，同时还含有未知促进生长因子。因此，苜蓿草可加工成为具有营养功能和特殊保健功能的保健品。苜蓿的茎、叶、花粉以及提取物可以为人们提供日常所需的钙、磷等矿质元素和多种维生素，其高蛋白、低脂肪和低糖的特点，更是糖尿病、高血压以及心血管病患者的理想保健食品。

近几年，随着西部大开发中的退耕还林，我国苜蓿的生产及加工利用研究也有了蓬勃的发展，苜蓿生物技术、组织培养及转基因技术的研究也已经开展起来，苜蓿产品的深加工研究，成为目前苜蓿研究的重要发展方向。多年来，我国对苜蓿的利用主要是将其加工成草捆、草粉、草颗粒、草块等初级产品，技术含量低，营养转化效率差，浪费现象十分严重。据估算，苜蓿直接用作饲料利用率只有 20% ~ 30%，若用于深加工利用率可达 65% ~ 80%，相当于每加工 1 万 t 鲜苜蓿可生产叶蛋白 300t，膳食纤维 240t，干草饼 2 000t，苜蓿绿素油 0.3t，总价值近 900 万元，是原料售价的 7 倍。欧盟利用特殊的榨汁、逐级提纯和分离技术设备，每吨鲜苜蓿提取 3kg 以上的高品质蛋白质，按当地价格计算售价高出原料价格 6 倍以上。随着养殖业和畜牧业的发展，以及人们生活水平的不断提高，对苜蓿进行深加工利用已成为一个必然的趋势。

紫花苜蓿叶片中含粗蛋白可高达 22.3% ~ 27.6%，氨基酸配比合理，是提取叶蛋白的最佳原料。20 世纪 80 年代，法国建立了世界上饲用叶蛋白生产规模最大的苜蓿公司，此后，英国、丹麦、澳大利亚、新西兰等国也成立了规模较大的叶蛋白生产工厂，其产品供国内和出口所需。我国叶蛋白的研究工作起步较晚，主要集中在 20 世纪 90 年代。

叶蛋白 (Leaf protein concentrates, 简称 LPC)，是从绿色植物茎叶中提取出来的一种蛋白质，主要由细胞质蛋白和叶绿体基质蛋白组成，是牧草深加工的主要产品。目前，用于生产 LPC 的原料主要是苜蓿，其 LPC 粗蛋白质含量一般为 43% ~ 60%，有时含量高达 70%。苜蓿 LPC 产量高、凝聚



颗粒大、易分离、品质好。Mautoba (1996) 的分析结果表明, 苜蓿 LPC 所含各种必需氨基酸的比例与干脱脂乳蛋白相近; 苜蓿 LPC 中粗脂肪、无氮浸出物、粗纤维和粗灰分含量都较高, 可消化率为 65% ~ 78%; 苜蓿叶蛋白还含有丰富的维生素和矿物质, 并含有促进生长和繁殖的未知因子; 苜蓿叶蛋白作为食用蛋白质, 其营养品质按 WHO 推荐的蛋白质标准, 与鸡蛋、牛乳相当, 比牛肉还好, 8 种必需氨基酸的比例符合人体需要, 属全价蛋白, 具有高度可消化性, 消化吸收率在 92% 以上, 且没有动物性蛋白质的副作用, 如引发肥胖症、心血管病等。

叶蛋白还可用作鸡、猪等畜禽的蛋白质和维生素补充饲料。国内外的许多试验证明, 用叶蛋白取代猪、家禽日粮中的部分乃至全部的蛋白质来源, 或取代哺乳犊牛的部分全乳代用品时, 都能取得良好的饲养效果。由叶蛋白提供仔鸡日粮蛋白的 25%、猪日粮蛋白的 100%, 所得的饲养效果都比较好。叶蛋白饲料是鸡的良好蛋白源, 且对鸡有一定的助生长作用。苜蓿叶蛋白 31.5% 左右粗蛋白质为家禽所必须的氨基酸。用苜蓿叶蛋白代替鱼粉和大豆蛋白喂肉鸡的试验表明, 出肉率、鸡肉品质及肉中干物质、粗蛋白质、粗脂肪和氨基酸的含量与对照组没有明显的差异。用 2% 的苜蓿叶蛋白代替蛋鸡全价日粮中 3% 的豆饼, 可使产蛋率由原来的 82.5% 增加到 85.5%; 平均蛋重由 55.8g 提高到 57.7g; 料蛋比由 2.34 降为 2.23; 蛋黄中的 β -胡萝卜素含量由原来的 33.8 μ g/g 提高到 47.6 μ g/g; 蛋黄中的叶黄素积累多, 色泽等级高。据报道, 哺乳仔猪每头日喂 2g 的叶蛋白饲料, 断奶体重可增加 2 ~ 2.5kg。用苜蓿叶蛋白饲喂 61 ~ 105 日龄的仔猪, 可取代日粮中蛋白质饲料的 80% 以上, 而不致影响仔猪增重。如用来饲喂 79kg 的生长肥育猪, 叶蛋白则可代替全部鱼粉。用叶蛋白代替种公猪日粮中 50% ~ 100% 的肉骨粉, 可提高其精液的品质; 由鱼粉、肉骨粉和不同添加量的叶蛋白混合作为种公猪日粮中的蛋白源, 并不影响种公猪的种用价值。

苜蓿 LPC 的社会经济成本远远低于动物性蛋白, 按每生产 1kg 蛋白质



社会平均耗能 (MJ/kg) 计算, LPC40、小麦蛋白 55、大米蛋白 155、鸡肉蛋白 330、牛奶蛋白 585。而 LPC 的生产成本比瘦猪肉低 40%。同时, 苜蓿叶蛋白制品具有防腐作用, 是优良的食品添加剂, 还有治病、强身、防衰老等多种生理功能。基于苜蓿叶蛋白的优良品质, 以其为原料将有利于制备出理想的肽制剂产品。

另外, 紫花苜蓿中还含有皂甙、多糖、异黄酮、绿原酸以及天然色素等多种生物活性物质等生物活性成分, 它们对人类保健和动物生产同样具有重要意义。目前, 紫花苜蓿活性成分在人类保健和动物生产中的实际应用还处于研究和探索阶段, 但是这些活性成分对提高动物的生产性能, 提高机体的免疫功能, 改善人类和动物的健康状况具有重要作用。

(二) 红三叶

红三叶草 (*Trifolium pretense* L.), 为豆科三叶草多年生草本植物, 又名红车轴草、红荷兰翘。红三叶草原产于小亚细亚和西南欧, 在欧洲各国及俄罗斯、澳大利亚、新西兰、美国等海洋性气候区均有大面积种植, 是世界上最重要的栽培牧草之一, 在美国它的种植面积在豆科牧草中仅次于苜蓿, 在我国分布广泛, 新疆、吉林、云贵高原、湖北等地区均有分布, 且已开始大面积推广利用。我国经全国牧草品种审定委员会定名的红三叶有 3 种, 即巴东红三叶、岷山红三叶和巫溪红三叶。巴东红三叶是 100 多年前由比利时引入在湖北鄂西地长期栽培, 驯化而成的地方品种。巫溪红三叶是 1953 年从美国引入少量种子、逐渐繁衍, 为野生种, 后采集到的部分种子, 经栽培驯化而成的地方品种。两个品种均适宜在海拔 800m 以上的山地及云贵高原地区种植, 气候湿润的丘陵、岗地、平原亦可种植, 供作短期利用。岷山红三叶在岷县种植始于 1994 年, 因生长快、产量高、质量好, 1998 年被国家牧草草种委员会命名为岷山红三叶, 是优良的豆科牧草。

红三叶寿命为 4~6 年。直根系, 主根入土不深, 侧根发达, 大部分集中在 30cm 的土层里, 并结有较多根瘤, 根茎在土表上; 株高 70~100cm,



分枝能力强，一般达10~15个，茎自根茎处生出，圆形，中空，直立或斜生；托叶大，先端尖锐，膜质，有紫色脉纹；三出掌状复叶，小叶卵形或椭圆形，叶面有灰白色或褐色“V”形斑，茎叶有茸毛；头形总状花序，蝶形花冠，生于茎枝顶端或叶腋处，每个花序有小花50~100朵，花冠淡红色或深红色；荚果小，每荚有种子1粒，种子肾形或椭圆形，棕黄色或紫色，千粒重1.2~2.2g。

红三叶草质柔软，叶量丰富，营养价值高。据测定，红三叶在开花时，干物质中分别含粗蛋白质17.1%，粗脂肪3.6%，粗纤维21.5%，无氮浸出物47.6%，粗灰分10.2%，还有丰富的各种氨基酸及多种维生素，其中钙1.295%，磷0.33%。有结果显示，其干物质含量比白三叶高54.5%，总消化营养高55.3%，脂肪、可溶性碳水化合物、钙等含量均高于白三叶。

在草地畜牧业生产中，红三叶可用于放牧、调制干草和青贮，红三叶适口性好，各种牲畜都喜食，是牛、羊最好的饲料，马、鹿、鹅、鸭、兔、鱼也喜食，猪喜食其青草或草粉，在鸡的预混料中加入5%的草粉，可提高产卵率，并减少疾病发生，促进生长，优质的红三叶干草对牛、羊及猪都有肥育效果，可以节省精料，缩短肥育期，红三叶与多年生黑麦草、鸭茅、猫尾草等禾本科牧草组成的混播草地，可为家畜提供近乎全价营养的饲草，同时在放牧反刍家畜时，也可防止臃胀病的发生。与禾本科牧草混合青贮，效果很好。

该植物除了可作优良饲料和牧草之外，国外民间还将其花序之煎剂用于祛痰、利尿和消炎，治疗感冒和肺结核，外敷治疗脓肿、烧伤和眼疾等，并将其花、种子、根或全株制成浸膏剂、糊剂、煎剂或泡茶饮用，治疗胃溃疡，胃癌、乳腺癌、前列腺癌及肠癌等。我国民间则以红三叶草的花序及带花枝叶入药，用于镇痉，止咳，止喘，另外，还可将其全草制成软膏，治疗局部溃疡。

红三叶主要含有异黄酮类、蛋白质、氨基酸、糖类、维生素、磷脂和



糖脂等多种成分,其中异黄酮类化合物是红三叶中最为主要的化学成分。目前,红三叶的提取物是国际上公认的治疗更年期综合征疗效确切的植物药,其销量在美国多年来一直名列植物药的前10位,是一种极有开发前景的天然药物及保健食品和功能性食品增补剂。1946年 Bennets 首次报道在红三叶草地放牧的母羊,因繁殖机能受干扰而患不孕症,同期从澳大利亚三叶草中发现丰富的黄酮类活性物质。其总异黄酮含量丰富,在豆科植物中总含量最高,如岷山红三叶中异黄酮含量是大豆籽粒中的10倍,可达干基的1.5%~2.5%。红车轴草异黄酮提取物中主要含有大豆苷元(Daidzein)、染料木素(Genistein)、刺芒柄花素(Formononetin)和鹰嘴豆芽素A(Biochanin A)及相应的糖苷等8种主要异黄酮成分,见图0-1和表0-1。国外自20世纪60年代便开始对红三叶草的化学成分进行研究,至今已从中分离鉴定了数十种化合物。

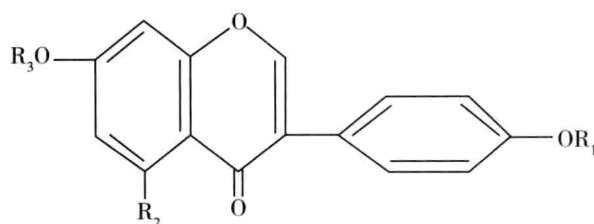


图0-1 红三叶异黄酮结构式

表0-1 红三叶提取物中异黄酮类成分

成 分	R ₁	R ₂	R ₃
大豆苷元 (Daidzein)	H	H	H
大豆黄苷 (Daidzin)	H	H	Glu
染料木素 (Genistein)	H	OH	H



(续表)

成 分	R ₁	R ₂	R ₃
染料木苷 (Genistin)	H	OH	Glu
刺芒柄花素 (Formononetin)	GH ₃	H	H
刺芒柄花苷 (Formononitin)	GH ₃	H	Glu
鹰嘴豆芽素 A (Biochanin A)	GH ₃	OH	H
黄檀苷 (Sissotrin)	GH ₃	OH	Glu

因此,加强功能营养成分的提取分离和产品开发是促进红三叶和紫花苜蓿资源开发及有效成分充分利用的有效途径。

二、异黄酮研究进展

(一) 异黄酮的来源与分布

异黄酮类物质是存在于植物中的天然有机化合物,具有广泛的生理活性,是许多中药材的有效成分之一,并在药典中已有收载。其主要分布在被子植物的豆科、苋科、桑科、蔷薇科、鸢尾科等植物中,其他植物中仅有少量分布,其中大部分都分布于豆科植物的蝶形花亚科,如大豆、三叶草、苜蓿等。一般大豆中含量为 0.05% ~ 0.7%,苜蓿中含量为 0.5% ~ 3.5%。

(二) 异黄酮类化合物的结构、种类与特性

异黄酮具有与雌二醇(E₂)相似的结构,能与雌激素受体结合,具有微弱雌激素活性(为雌二醇的 1/14 000 ~ 1/10 000),又被称为植物雌激素(phyto-estrogen)。是一种含有芳香环的非类固醇化合物,不同种类植物中所含的异黄酮成分不同,其结构亦不尽相同,但其基本结构都是 C₆-C₃-C₆ 构成的三环结构,母体为 3-苯基苯并吡喃酮,如图 0-2 所示。常见豆科植物中的异黄酮主要包括芒柄花黄素(Formononetin)、鸡豆黄素(Biochanina)、



染料木素 (Genistein)、大豆黄素 (Daidzein)、6-甲氧大豆素 (Glycitein) 和香豆雌酚 (Coumestrol) 等 12 种化合物。

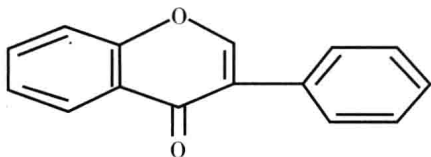


图 0-2 异黄酮母核

这些化合物可分为结合型的糖苷和游离型的苷元 (图 0-3、图 0-4), 不同成分其连接的 R_1 、 R_2 、 R_3 基团不同。一般情况下它们主要以结合型的糖苷存在, 如大豆异黄酮中, 苷元占总量的 2% ~ 3%, 糖苷占总量的 97% ~ 98%。在生物体内游离型的苷元物质发挥着生理活性作用, 糖苷只有在体内经过分解, 将侧链除去变成苷元才能在体内发生作用。

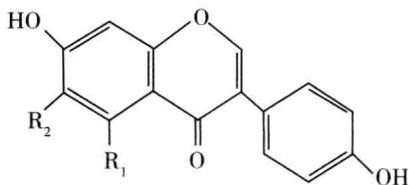


图 0-3 异黄酮苷元

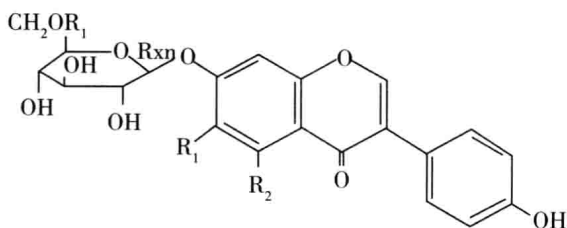


图 0-4 异黄酮葡萄糖苷