فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، سال چهارم، شماره ۱۶، صفحه ۱۰۷-۹۳، تابستان ۱۳۹۶

استخراج چند مرحله‌ای ایزوفلاونوئیدهای پروتئین سویا

انور شلماشی[1*] ، فرشته گل محمد[2]، زین العابدین بشیری صدر [3]

1. دانشیار، گروه صنایع شیمیایی آلی و دارویی، پژوهشکده فناوری‌های نوین شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران
2. استادیار، گروه صنایع شیمیایی آلی و دارویی، پژوهشکده فناوری‌های نوین شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران
3. مربی پژوهشی، گروه صنایع شیمیایی آلی و دارویی، پژوهشکده فناوری‌های نوین شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران

(تاریخ دریافت: 95/5/11، تاریخ پذیرش: 95/12/11)

چکیده

سویا با نام علمی *Glycine max* از غنی‌ترین منابع فیتو استروژن با نام ایزوفلاونوئیدها است. ایزوفلاونوئیدها دارای ساختار و عملکرد مشابه استروژن‌ها هستند که تأثیر مثبت آن‌ها در کاهش علائم یائسگی به اثبات رسیده است. در طرح حاضر استخراج ایزوفلاونوئیدها از پروتئین سویا (کنجاله روغن‌گیری شده دانه سویا) توسط اتانول 96٪ و به چهار روش شامل سوکسله، استخراج چند مرحله‌ای با حلال، استخراج چند مرحله‌ای با حلال از نمونه‌های پیش فرایند شده با امواج فراصوت و استخراج چند مرحله‌ای با حلال از نمونه‌های پیش فرایند شده با امواج مایکروویو انجام شد و در هر روش پارامترهای مؤثر در استخراج بررسی و بهینه سازی شد. نتایج نشان داد که در روش سوکسله و استخراج 50 g نمونه با 150 ml اتانول 96٪ طی مدت زمان 6 h می‌توان به حداکثر بازدهی در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به‌ترتیب 68/62٪ و 62/02٪ رسید. در استخراج چند مرحله‌ای با حلال طی سه بار فرایند استخراج با نسبت مواد جامد به حلال 3/10 g/ml، دمای 45 °C و مدت زمان 60 min (در هر بار از استخراج) می‌توان به بازدهی حاصل با روش سوکسله رسید. در استخراج چند مرحله‌ای با حلال طی سه بار استخراج در دمای 40 °C، زمان 15 min و نسبت مواد جامد به حلال 3/10 g/ml از نمونه‌های پیش فرایند شده با امواج فراصوت به مدت زمان 40 min در سیکل 1 و دامنه امواج 80٪ و نمونه‌های پیش فرایند شده با امواج مایکروویو در مدت زمان خیساندن 120 min و در مدت تابش دهی 5 min می‌توان به بازدهی حاصل با روش سوکسله دست یافت. آنالیز کمی و کیفی ترکیبات فلاونوئیدی جنیستئین و دایدزئین موجود در عصاره خشک الکلی نیز با دستگاه HPLC اندازه گیری و تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: فیتو استروژن، ایزوفلاونوئیدها، پروتئین سویا، استخراج چند مرحله‌ای با حلال، امواج فراصوت، امواج مایکروویو.

* نویسنده مسئول: shalmashi@irost.ir

1- مقدمه

فیتواستروال‌ها یا فیتواستروژن‌ها (استروژن‌های گیاهی) مواد فعال بیولوژی می‌باشند. این ترکیبات از نظر ساختمان و عملکرد، شبیه 17-بتا- استرول (استرادیول) می‌باشند و اثراتی شبیه استروژن را ایجاد می‌نمایند. فیتواستروژن‌ها در بسیاری از غذاها وجود دارند و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها در حیوانات در مطالعات متعددی به اثبات رسیده‌است[1-3]. با توجه به عوارض هورمون درمانی با داروهای شیمیایی در جلوگیری از بروز علائم آزار دهنده یائسگی تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهی با فعالیت بیولوژیکی مناسب و مؤثر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. سویا با نام علمی *Glycine max* از غنی‌ترین منابع فیتواستروژن‌ها با نام ایزوفلاونوئیدها است. این مواد دارای ساختار و عملکرد مشابه استروژن‌ها می‌باشند و می‌توانند روی گیرنده‌های استروژن اثر کنند. دانه سویا ماده غذایی است که حاوی فیبر، اسیدهای چرب غیراشباع و ایزوفلاون‌ها می‌باشد. روغن موجود در سویا حاوی 52% لینولئیک اسید، 22٪ اولئیک اسید، 10٪ پالمیتیک اسید و 8% لینولنیک اسید است[4، 5].

در هر گرم از دانه سویا در حدود mgGAL/g 6/4-81/7 ترکیبات فنولی و mgQE/g 3/5-44/6 ایزوفلاون وجود دارد[6].

ایزوفلاون‌ها در دانه سویا اغلب به‌صورت گلیکوزید ایزوفلاون (فرم باند شده β-گلیکوزید) وجود دارند. ایزوفلاون‌ها در دانه سویا شامل دو بخش گلیکوزیدی[1] و آگلیکون[2] هستند شکل(1). سه فرم آگلیکون از ایزوفلاون موجود در سویا عبارت است از: جنیستئین[3]، دایدزئین[4] و گلیسیتئین[5]. این سه ایزوفلاون در فرم کانژوگه با گلوکز به‌صورت مالونیل گلوکز[6] (مالونیل جنیستین[7]، مالونیل دایدزین[8] و مالونیل گلیسین[9]) و هم‌چنین در فرم کانژوگه به‌صورت آستیل گلوکز[10] (آستیل جنیستین[11]، آستیل دایدزین[12] و آستیل گلیسین[13]) وجود دارند. 93٪ از ایزوفلاون‌ها به‌صورت گلیکوزید وجود دارد. یک گرم دانه سویا حاوی حدود 800 µg دایدزئین و بیش از 500 µg جنیستئین است[7].

فرایند صنعتی استخراج ترکیبات فعال گیاهان دارویی با استفاده از تکنیک‌های مختلف انجام می‌شوند. استخراج این ترکیبات با استفاده از حلال‌های مناسب و گزینش پذیر توسط فرایندهای استاندارد صورت می‌گیرد.

چنین حلال‌هایی در واقع ترکیبات گیاهی قابل انحلال را استخراج می‌کند و باقی ترکیبات غیرقابل انحلال را باقی می‌گذارد. انواع روش‌های استخراج گیاهان دارویی شامل خیساندن[1]، دم کردن[2]، تراوش[3]، جوشاندن[4]، استخراج با حلال داغ[5]، استخراج با جریان متقابل[6]، استخراج به کمک مایکروویو، استخراج با کمک اولتراسوند[7]، استخراج با سیال فوق بحرانی و استخراج فیتونیکس[8] با حلال‌های هیدروفلوئوروکربن می‌باشند.

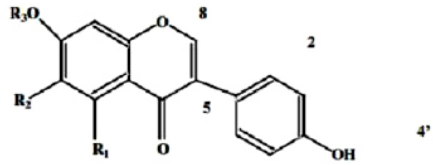
تاکنون محققان روش‌ها و حلال‌های مختلفی را برای استخراج ایزوفلاون‌ها از سویا مورد بررسی قرار داده‌اند. این روش‌ها شامل روش هم زدن، اولتراسوند، آب فوق گرم [8، 9]، سیال فوق بحرانی[10]، حلال‌های متانول، اتانول. استونیتریل همراه با آب با pH اسیدی و غیر اسیدی [11] و سونوسوکسله [12] در منابع ذکرشده است.

بازدهی استخراج در تکنیک‌های جدید استخراج بسیار بیش‌تر از تکنیک‌های قدیمی استخراج است. در تکنیک‌های قدیمی استخراج مانند رفلاکس، سوکسله، تراوش در شرایط سرد و تراوش در شرایط داغ استخراج بر اساس پدیده انتشار از دیواره سلولی اتفاق می‌افتد و در تکنیک‌های جدید برای استخراج آسان، سریع در دمای کم و در مدت زمان کوتاه با بازدهی بالا و کیفیت بالا از شکستن دیواره سلولی مانند روش فراصوت و مایکروویو استفاده می‌شود.

در استخراج با سیال فوق بحرانی و هم‌چنین در استخراج توسط سیال بحرانی از سیال‌های غیرسمی مانند آب و دی‌اکسید کربن برای استخراج استفاده می‌شود. این دو روش

1. Glycoside
2. Aglycone
3. Genistein
4. Daidzein
5. Glycitein
6. Malonyl Glucose
7. Malonyl Genistein
8. Malonyl Daidzein
9. Malonyl Glycitein
10. Acetyl Glucose
11. Acetyl Genistein
12. Acetyl Daidzein
13. Acetyl Glysitin

1. Maceration
2. Infusion
3. Percolation
4. Decoction
5. Soxhlet
6. Counter-current
7. Sonication
8. Phytonics



Name	R_1	R_2	R_3
Daidzein	H	H	H
Glycitein	H	OCH_3	H
Genistein	OH	H	H
Daidzin	H	H	Glu
Glycitin	H	OCH_3	Glu
Genistin	OH	H	Glu
Acetyldaidzin	H	H	Glu-$COCH_3$
Acetylglycitin	H	OCH_3	Glu-$COCH_3$
Acetylgenistin	OH	H	Glu-$COCH_3$
Malonyldaidzin	H	H	Glu-$COCH_2COOH$
Malonylglycitin	H	OCH_3	Glu-$COCH_2COOH$
Malonylgenistin	OH	H	Glu-$COCH_2COOH$

شکل (1) نمایش آگلیکون‌ها و گلیکوزیدهای موجود در سویا [14]

استخراج در دما و فشار بالا انجام می‌شود. بنابراین مناسب ترکیباتی است که در دمای بالا آسیب نمی‌بینند. در این دو روش با توجه به فشار بالا در طی فرایند استخراج نفوذ حلال به درون سلول‌های گیاهی سریع‌تر و مؤثرتر صورت می‌گیرد. نتایج نشان می‌دهد بالاترین میزان بازدهی با استفاده از تکنیک سیال بحرانی و بعد از آن با روش فراصوت به‌دست آمده است.

انتخاب روش استخراج علاوه‌بر کارایی تکنیک، استخراج عصاره با کیفیت و کمیت مناسب، مقرون به صرفه بودن روش، به مسائلی چون سهولت کار کردن و در دسترس بودن تجهیزات نیز بستگی دارد[13-16].

در طرح حاضر استخراج ایزوفلاونوئیدها از پروتئین سویا (کنجاله روغن‌گیری شده دانه سویا) با تلفیقی از روش‌های متداول و مدرن استخراج شامل سوکسله، استخراج چند مرحله‌ای با حلال، استخراج چند مرحله‌ای با حلال از نمونه‌های پیش فرایند شده با امواج فراصوت و استخراج چند مرحله‌ای با حلال از نمونه‌های پیش فرایند شده با امواج مایکروویو مورد بررسی قرار گرفته است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

منبع اصلی مورد استفاده پروتئین سویا (کنجاله روغن‌گیری شده سویا) می‌باشد که از بازار محلی تهیه شده است. سایر مواد شیمیایی و استانداردهای مورد نیاز نیز با خلوص دلخواه شامل اتانول 96٪، اتانول مطلق، اسید گالیک، معرف فولین سیوکالتو، نیترات سدیم، کلرید آلومینیوم و سود همگی با مارک مرک، جنیستئین و دایدزئین با مارک Sigma Aldirich، کوئرستین از برند سیگما و کربنات کلسیم با مارک LOBA Chemie از شرکت‌های مربوط تهیه شده‌اند.

2-2-تجهیزات

جهت استخراج به روش سوکسله از یک دستگاه سوکسله کلاسیک با حجم 100 ml استفاده شد. استخراج چند مرحله‌ای توسط حلال در 3 ارلن با حجم 50 ml انجام شد.

استخراج با روش امواج فراصوت با استفاده از یک دستگاه اولتراسوند مدل UP 200H از شرکت dr.Hielscher GmbH ساخت کشور آلمان با توان ثابت 200 W و فرکانس ثابت 24 kHz و در ارلن با حجم 50 ml انجام شد. بزرگی دامنه امواج[1] و سیکل انتشار امواج فراصوت در این دستگاه قابل تنظیم است. در استخراج با امواج مایکروویو از یک دستگاه آون مایکروویو خانگی ال جی مدل MOD 8084WR ساخت کشور کره جنوبی با توان 900 W استفاده شد. در تمامی روش‌ها جداسازی حلال عصاره بعد از فرایند استخراج با کمک دستگاه روتاری مدل BUCHI Rotavapor R-114 ساخت کشور آلمان تحت خلاء در 40 °C انجام شد.

از دستگاه HPLC مدل Waters ساخت کشور آمریکا مجهز به ستون فاز معکوس C18 برای آنالیز کیفی و کمی اجزاء ایزوفلاونوئیدها استخراج شده ازعصاره خشک الکلی استفاده شد.

1. Ampilitude

2-3-روش‌ها

2-3-1- روش آماده سازی نمونه

در طرح حاضر از پروتئین سویا به‌عنوان یکی از غنی‌ترین منابع فیتواستروژن استفاده شد. پروتئین سویا، کنجاله روغن‌گیری شده دانه سویا است. پروتئین سویا به مدت دو روز در نور غیرمستقیم آفتاب قرار داده شد تا خشک شود. مقدار رطوبت دانه سویا به روش وزن سنجی (اندازه گیری وزن مقدار مشخصی از پودر سویا قبل و بعد از خشک شدن) 0/5±0% تعیین شد. پروتئین سویا با یک دستگاه آسیاب خانگی پودر (با اندازه ذرات 1-0/5 mm) شد و تا زمان مصرف در کیسه پلی اتیلنی در دسیکاتور نگه داشته شد.

2-3-2- روش استخراج با سوکسله

جهت استخراج به روش سوکسله، 50 g از نمونه در یک کاغذ صافی (واتمن شماره 1) در سوکسله قرار گرفت و استخراج با 150 ml اتانول 96٪ انجام شد. کاغذ صافی (واتمن شماره 1) در سوکسله قرار گرفت و استخراج با 150 ml اتانول 96٪ انجام شد.

2-3-3- استخراج متوالی با حلال

استخراج در این روش توسط سه ارلن با حجم 50 ml انجام شد. 3 g نمونه پودر شده همراه با 10 ml حلال اتانول 96٪ با استفاده از همزن در دور 500 rpm همزده شده سپس حلال حاوی مواد استخراج شده از ارلن 1 به ارلن 2 و سپس به ارلن 3 منتقل شد و به نمونه در ارلن 1، اتانول تازه اضافه شد و این پروسه از ارلن 1 به ارلن 3 سه دفعه با افزایش حلال تازه به ارلن 1 تکرار شد. عصاره حاصل از استخراج از ارلن 3 طی سه بار استخراج در یک ظرف واحد جمع آوری شد و بعد از فیلتراسیون حجم آن توسط روتاری به 10 ml رسانده شد و برای انجام آنالیز در دمای صفر درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

2-3-4- استخراج متوالی با حلال از نمونه پیش فرایند شده با امواج فراصوت

در این روش ابتدا نمونه‌ها به میزان 3 g به همراه 10 ml اتانول 96٪ در ارلن در دمای محیط تحت انتشار امواج فراصوت قرار گرفت، سپس حجم حلال در هر ارلن با افزایش اتانول 96٪ به مقدار دلخواه 25 ml رسانده شد و روش استخراج متوالی با حلال در مورد آن‌ها انجام شد.

2-3-5- استخراج متوالی با حلال از نمونه پیش فرایند شده با امواج مایکروویو

در این روش ابتدا نمونه‌ها به میزان 3 g، به همراه 10 ml اتانول 96٪ در ارلن با فواصل زمانی 30 s تحت تابش امواج مایکروویو قرار گرفتند، سپس حجم حلال در هر ارلن با افزایش اتانول 96٪ به مقدار دلخواه 25 ml رسانده شد و روش استخراج متوالی با حلال بر روی آن‌ها انجام شد.

2-4- آنالیزها

2-4-1- اندازه گیری ترکیبات فنولی به روش فولین سیو کالتو

برای انجام این آزمایش پنج محلول استاندارد از اسید گالیک تهیه شد و جذب آن‌ها در طول موج 760 nm اندازه گیری شد و سپس نمودار کالیبراسیون جذب بر هر حسب غلظت اسید گالیک رسم شد.

برای اندازه گیری غلظت ترکیبات فنولی، به 0/5 ml از محلول عصاره در اتانول 96٪، 2/5 ml معرف فولین اضافه شد. بعد از گذشت 5 min، 2 ml محلول کربنات سدیم (7/5% وزنی/حجمی) به آن اضافه شد بعد از هم زدن نمونه درون حمام با دمای 40°C و پس از گذشت 30 min جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 760 nm خوانده شد. مقدار ترکیبات فنولی در نمونه‌ها با استفاده از مقدار جذب خوانده شده و با استفاده از معادله نمودار کالیبراسیون رسم شده با گالیک اسید معادله (1) به‌دست آمد.

$$Y= 0/005x + 0/ 039 \quad (1)$$

2-4-2- اندازه گیری فلاونوئیدها

برای انجام این تست چهار محلول استاندارد از کوئرستین با غلظت‌های مشخص ساخته شد و جذب آن‌ها در طول موج 510 nm گرفته شد و سپس نمودار کالیبراسیون جذب بر هر حسب غلظت کوئرستین رسم شد.

برای اندازه‌گیری غلظت ایزوفلاونوئیدها در این روش، 1 ml از محلول عصاره به درون بشر حاوی 4 ml آب مقطر ریخته شد،

0/3 ml نیترات سدیم 5٪ به آن اضافه شد و بعد از 5 min 0/3 ml کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) 10٪ به آن اضافه شد. بعد از 3 min، 2 ml محلول 1 M NaOH به آن اضافه شد و حجم کل نمونه با افزایش آب مقطر به 10 ml رسانده شد. جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 510 nm خوانده شد. مقدار ترکیبات ایزوفلاونوئیدی در نمونه‌ها با استفاده از مقدار جذب خوانده شده و با استفاده از معادله نمودار کالیبراسیون رسم شده با کوئرستین معادله (2) به‌دست آمد.

$$Y= 0/1063x + 0/ 0205 \qquad (2)$$

2-4-3-آنالیز کیفی و کمی

آنالیز کیفی و کمی عصاره الکلی خشک شده سویا با دستگاه HPLC مجهز به ستون فاز معکو C18 (10 µm، M Bondapak)، با فاز متحرک اسید فسفریک 0/01٪ و متانول در دمای ستون 40 °C، حجم تزریق 20 µl، سرعت جریان فاز متحرک 1 ml/min و دتکتورUV با طول موج 255 nm انجام شد. از دو ترکیب جنیستئین و دایدزئین به‌عنوان استاندارد استفاده و طیف نمونه‌ها در زمان ماند 0-40 min گرفته شد. همان‌طور که در شکل‌های (2-5) نشان داده شده است پیک دایدزئین در نمونه‌ها در زمان ماند 30 min و پیک جنیستئین در زمان ماند 40 min قابل رویت می باشد. زمان بازداری ترکیبات فلاونوئیدی با استفاده از روش کروماتوگرافی HPLC با نمونه‌های استاندارد مطابقت نشان داد. بر اساس سطح زیر پیک طیف‌های نشان داده شده در شکل‌های (4-5) مقادیر نمونه‌های جنیستئین و دایدزئین در عصاره خشک الکلی نیز اندازه‌گیری و به‌ترتیب 0/07 و 0/12% تعیین شد [14].

2-3-5-تعیین بازدهی عصاره خشک

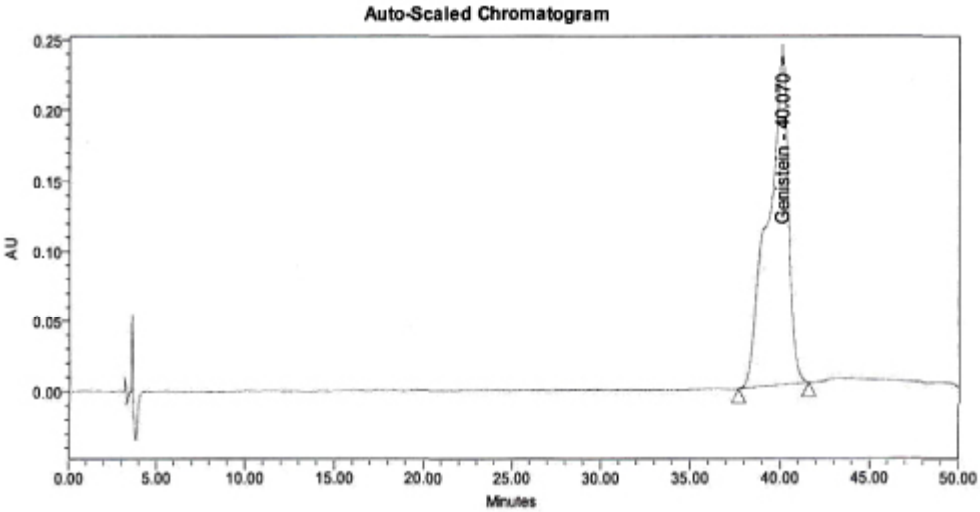
بازدهی استخراج عصاره خشک (OEY٪) به روش وزنی (گرم عصاره خشک استخراج شده در 100 g از نمونه خشک) از طریق فرمول(3) به‌دست آمد. در این معادله OEY٪ درصد استخراج عصاره، C_1 وزن عصاره خشک استخراج شده و C_0 وزن نمونه خشک اولیه است.

$$OEY\% = \frac{C_1}{C_0} \times 100 \qquad (3)$$

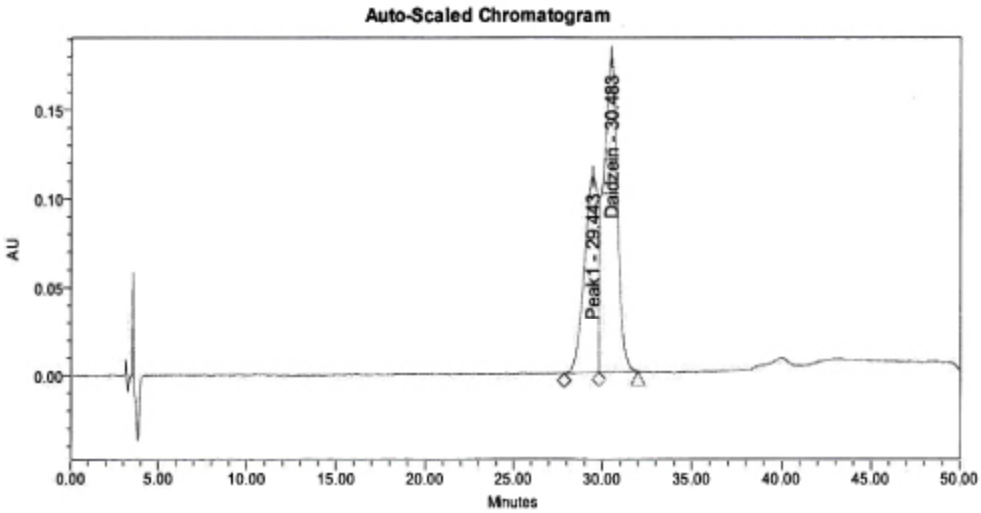
3-نتایج و بحث

3-1- نتایج استخراج با روش سوکسله

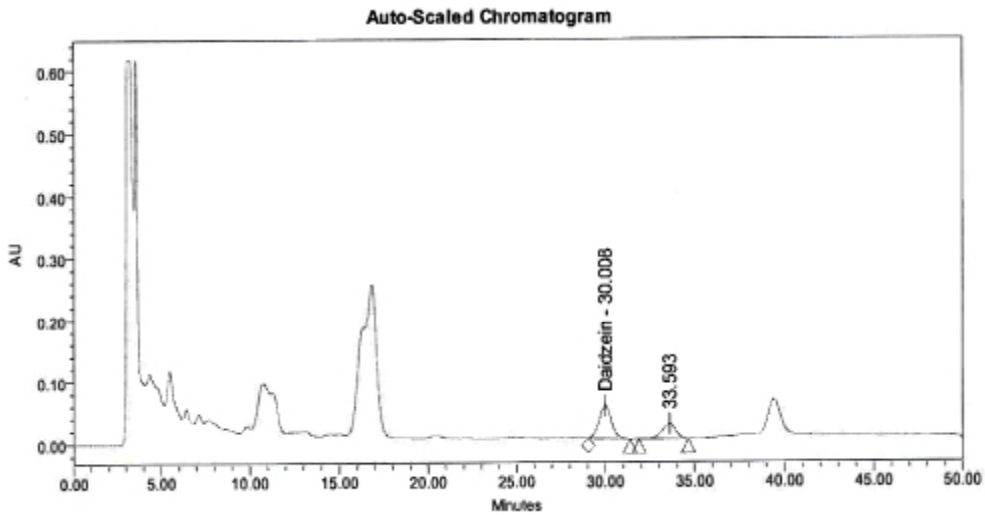
نتایج استخراج توسط سوکسله، نشان داد که در این روش، استخراج مؤثر ترکیبات فنولی از پروتئین سویا در مدت زمان 6 h حاصل می‌شود شکل (6). نتایج نشان داد از هر گرم پروتئین سویا 116 mg عصاره خشک به‌دست می‌آید که 68/62 mg آن ترکیبات فنولی و 62/02 mg آن ترکیبات فلاونوئیدی است.



شکل (2) نمونه استاندارد جنیستئین



شکل(3) نمونه استاندارد دایدزئین



شکل (4) ایزوفلاونوئیدها در نمونه عصاره خشک سویا برای اندازه گیری دایدزئین

2-3- نتایج استخراج چند مرحله‌ای با حلال

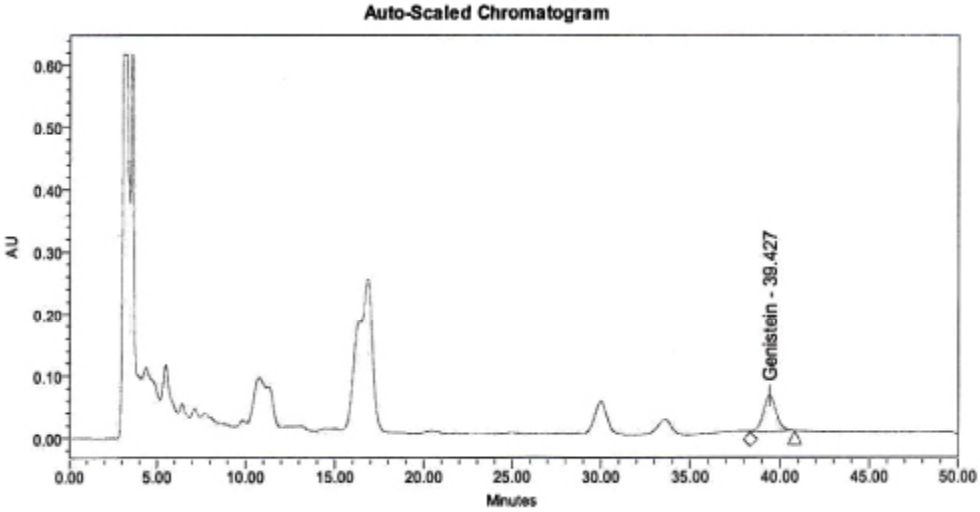
در استخراج چند مرحله‌ای با حلال سه پارامتر شامل دما، زمان، نسبت مواد جامد به حلال به روش تک متغیر مورد بررسی قرار گرفت. تعداد دفعات استخراج در این روش سه بار در نظر گرفته شد.

1-2-3- نتایج بررسی دما در استخراج چند مرحله‌ای با حلال

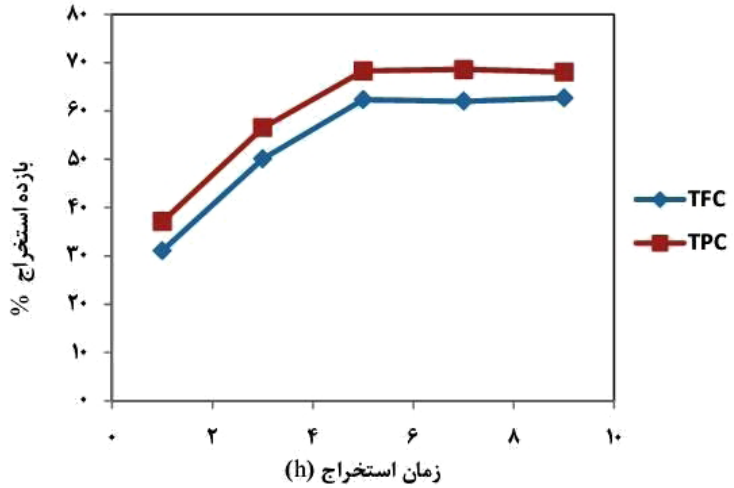
کلیه آزمایش‌ها در این بخش با نسبت حلال به مواد جامد 3/10 g/ml و زمان هر مرحله استخراج 15 min انجام شد.

همان‌طور که نتایج روند تغییرات میزان بازدهی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت به تغییرات دمای استخراج در شکل (7) آورده شده است می‌توان دید که در استخراج چند مرحله‌ای با حلال، با افزایش دما میزان بازدهی افزایش می‌یابد.

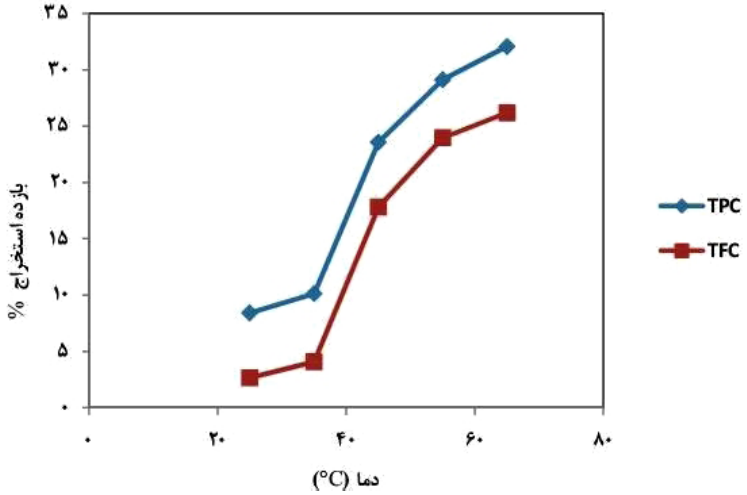
تأثیر مثبت افزایش دما بر میزان بازدهی در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از پروتئین سویا به علت کاهش ویسکوزیته حلال و تأمین آنتالپی انحلال است. در این روش مانند سایر روش‌های متداول، استخراج بر پایه نفوذ و انتشار حلال از طریق منافذ سلول صورت می‌گیرد. به این معنی که



شکل (5) ایزوفلاونوئیدها در نمونه عصاره خشک سویا برای اندازه گیری جنیستئین



شکل(6) بازدهی استخراج ترکیبات فنولی (TPC) و فلاونوئیدی (TFC) در روش سوکسله با زمان



شکل(7) بازدهی استخراج ترکیبات فنولی (TPC) و فلاونوئیدی (TFC) در روش استخراج متوالی با حلال با دما

حلال از طریق منافذ سلول گیاهی وارد آن می‌شود و پس از حل کردن ترکیبات قابل انحلال در سلول دوباره در اثر پدیده اسمز از منافذ سلول به داخل حلال وارد می‌شود. بنابراین هرچه ویسکوزیته حلال کم‌تر باشد نفوذ و انتشار آن از طریق منافذ سلول‌های گیاهی با سهولت بیش‌تری انجام می‌شود و هم‌چنین با افزایش دما با تأمین آنتالپی انحلال میزان بیش‌تری از ترکیبات در حلال حل می‌شوند و به این ترتیب افزایش دما سبب افزایش بازدهی استخراج می‌شود.

با توجه به این‌که انجام فرایند استخراج در دمای بالا هزینه فرایند را افزایش می‌دهد و در مقیاس صنعتی ایمنی کار را پایین می‌آورد و هم‌چنین استفاده از دستگاه‌های تهویه بزرگ را نیاز دارد، در نتیجه در مقیاس صنعتی، انجام فرایندها در دماهای پایین‌تر ترجیح داده می‌شود. در این بررسی نیز برای ادامه بررسی‌ها دمای 45 °C انتخاب شد.

3-2-2- نتایج بررسی نسبت مواد جامد به حلال در استخراج چند مرحله‌ای با حلال

کلیه آزمایش‌ها در این بخش در تعداد استخراج 3 نوبت، دما 45 °C، زمان 15 min انجام شد.

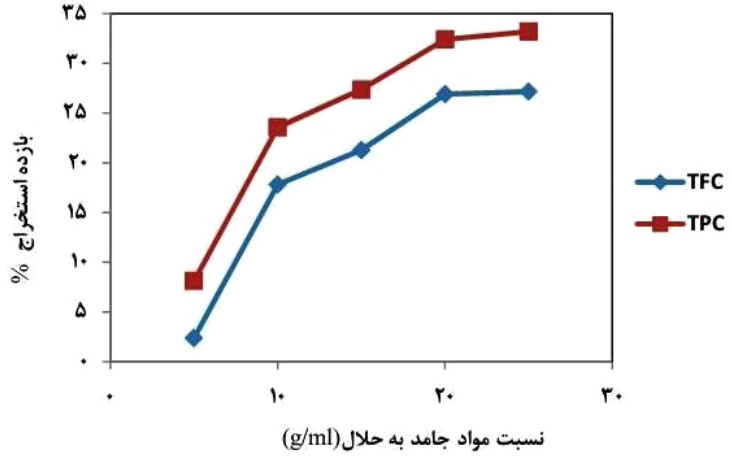
همان‌طور که نتایج روند تغییرات میزان بازدهی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت به تغییرات نسبت مواد جامد به حلال در شکل (8) رسم شده است می‌توان دید که در استخراج چند مرحله‌ای با حلال، با کاهش نسبت مواد جامد به حلال میزان بازدهی افزایش می‌یابد.

تأثیر مثبت کاهش نسبت مواد جامد به حلال در افزایش بازدهی به علت ظرفیت بیش‌تر برای انحلال است. در مواردی که میزان مواد قابل انحلال در حلال در نمونه زیاد باشد برای استخراج مؤثر، مناسب بودن نسبت حلال به مواد جامد دارای اهمیت بسیاری است. اگر این نسبت کم باشد استخراج مؤثر انجام نمی‌شود و اگر هم این نسبت بیش‌تر از مقدار لازم باشد، هزینه فرایند افزایش می‌یابد. نتایج این بررسی نشان داد که میزان بازدهی استخراج با کاهش نسبت مواد جامد به حلال از 3 به 5 تا 3 به 20 با شیب زیاد و از نسبت 3 به 20 تا نسبت 3 به 25 با شیب کم‌تر سبب افزایش میزان بازدهی می‌شود. همان‌طور که نتایج در این آزمایش‌ها نشان داد با کاهش نسبت مواد جامد به حلال میزان بازدهی در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به مقدار زیادی افزایش پیدا می‌کند، ولی با توجه به این‌که افزایش مقدار حلال هزینه فرایند را به لحاظ مصرف بیش‌تر حلال و هزینه جداسازی حلال از عصاره را افزایش می‌دهد، در نتیجه برای ادامه آزمایش‌ها نسبت 3 به 10 انتخاب شد.

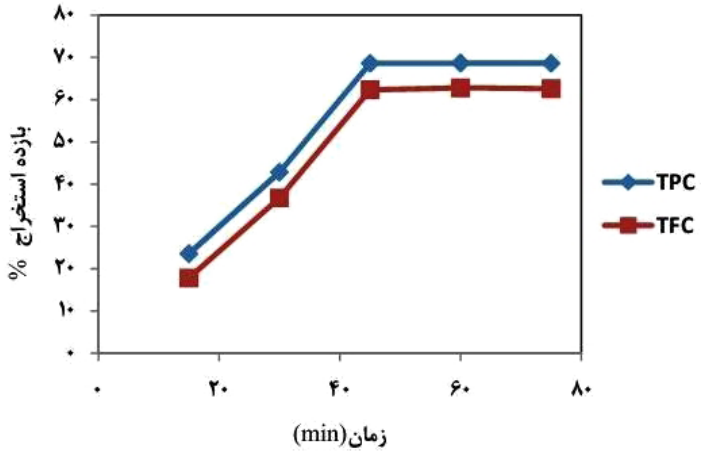
3-2-3- نتایج بررسی زمان در استخراج چند مرحله‌ای با حلال

کلیه آزمایش‌ها با نسبت مواد جامد به حلال 3/10 g/ml و دمای 45 °C انجام شد.

همان‌طور که نتایج روند تغییرات میزان بازدهی استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت به تغییرات زمان استخراج در شکل (9) آورده شده است می‌توان دید که در استخراج چند مرحله‌ای با حلال، با افزایش زمان استخراج میزان بازدهی



شکل(8) بازدهی استخراج ترکیبات فنولی (TPC) و فلاونوئیدی (TFC) در روش استخراج متوالی با حلال با نسبت مواد جامد به حلال



شکل(9) بازدهی استخراج ترکیبات فنولی (TPC) و فلاونوئیدی (TFC) در روش استخراج متوالی با حلال با زمان

افزایش می‌یابد.

تأثیر مثبت افزایش زمان بر میزان بازدهی در این روش به‌طور کامل قابل توجیه است. همان‌طور که بیان شد در این روش استخراج بر پایه نفوذ و انتشار حلال از طریق منافذ سلول صورت می‌گیرد که فرایندی بسیار زمان بر است. نتایج نشان داد در این روش با نسبت حلال به مواد جامد 3 g به 10 ml و در دمای متوسط 45 °C می‌توان در مدت زمان 45 تا 60 min در هر نوبت از استخراج به استخراج حداکثری رسید.

همان‌طور که بیان شد مکانیسم استخراج مواد مؤثره از بافت‌های گیاهی در روش سوکسله و استخراج متوالی با حلال بر اساس پدیده نفوذ حلال به داخل بافت‌های گیاهی و انتشار حلال به همراه مواد حل شده در آن از بافت گیاهی به داخل حلال صورت می‌گیرد. بنابراین اگرچه این روش‌های استخراج از روش‌های متداول و قدیمی استخراج می‌باشند، ولی با توجه به مکانیسم استخراج در این روش‌ها انتظار می رود که برای رسیدن به یک بازدهی خوب به زمان طولانی و دمای بالا نیاز باشد که البته نتایج حاصل آزمایش‌ها نیز تأیید کننده این مطلب بود.

با توجه به طولانی بودن زمان استخراج و بالا بودن دمای بهینه به‌دست آمده برای استخراج ایزوفلاون‌ها از سویا به روش متداول استخراج با سوکسله و استخراج چند مرحله‌ای با حلال، پیش فرایند نمودن نمونه‌ها با دو روش مایکروویو و اولتراسوند قبل از استخراج چند مرحله‌ای با حلال بررسی شد. قابل ذکر است که استخراج ایزوفلاون‌ها از سویا به روش مایکروویو و اولتراسوند قبلاً صورت گرفته است، ولی در طرح حاضر این دو روش مدرن استخراج، به‌عنوان مرحله پیش فرایند نمونه قبل از استخراج متوالی با حلال استفاده شدند.

3-3- استخراج متوالی با حلال از نمونه پیش فرایند شده با امواج فراصوت

امواج فراصوت از امواج مکانیکی با فرکانس حدود 20-25 kHz می‌باشند. تأثیر مثبت این امواج در فرایند استخراج ترکیبات مؤثره از سلول‌های گیاهی از طریق پدیده حباب زایی در محلول اتفاق می‌افتد.

در این بخش پیش فرایند کردن نمونه‌ها در 10 ml اتانول 96٪ توسط امواج فراصوت مورد بررسی قرار گرفت. هر نمونه بعد از پیش فرایند سازی، با روش استخراج متوالی با حلال در دمای 40°C، نسبت مواد جامد به حلال 3/10 g/ml مدت زمان 15 min مورد استخراج قرار گرفت. در این بخش تأثیر سه پارامتر بر بهبود فرایند استخراج شامل مدت زمان، سیکل و دامنه امواج فراصوت مورد بررسی قرار گرفت.

3-3-1-بررسی زمان

کلیه آزمایش‌ها در این بخش در سیکل 0/7 و دامنه امواج 50 انجام شد. مشاهده گردید که با پیش فرایند کردن نمونه‌ها با امواج فراصوت به مدت 50 min می‌توان در استخراج متوالی با حلال در دمای 40°C، نسبت مواد جامد به حلال 10 g/ml /3 مدت زمان 15 min به میزان بازدهی بالایی در استخراج

ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از پروتئین سویا رسید. در حالی که میزان بازدهی حاصل از نمونه بدون پیش فرایند شده با امواج فراصوت در زمان 15 min بسیار کم است. همان‌طور که تغییرات میزان بازدهی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نسبت به تغییرات زمان تابش دهی با امواج فراصوت در شکل (10) آورده شده است، مشخص شد که با افزایش زمان پیش فرایند کردن با امواج فراصوت از 10 min تا 40 میزان بازدهی با شیب زیاد و از 40 تا 50 min با شیب کم‌تری افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج کسب شده در این بخش مدت زمان 40 min برای پیش فرایند نمودن با امواج فراصوت برای ادامه بررسی انتخاب شد.

3-3-2- بررسی سیکل امواج فراصوت

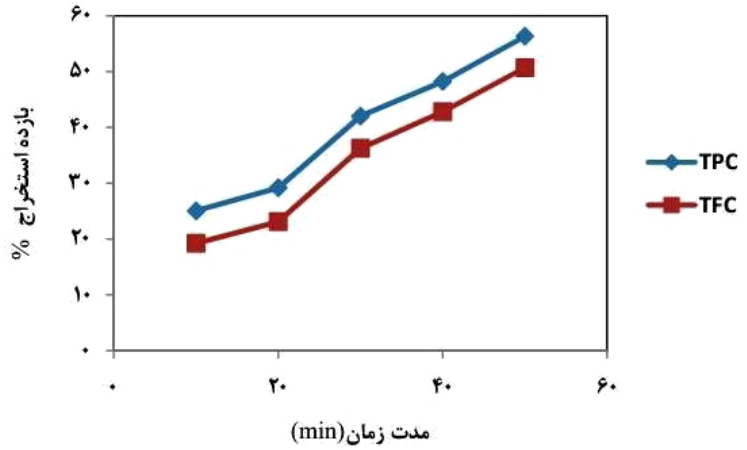
کلیه آزمایش‌ها در این بخش زمان 40 min، دامنه امواج 50 انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش سیکل 1 انتشار امواج فراصوت می‌توان در استخراج متوالی با حلال در دمای 40°C، نسبت مواد جامد به حلال 3/ 10 g/ml و مدت زمان 15 min به میزان بازدهی بالاتری در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از پروتئین سویا نسبت به انجام فرایند پیش فرایند در سیکل‌های کم‌تر از 1 رسید. منظور از سیکل تعداد پالس صوتی فرستاده شده از دستگاه مولد در دقیقه است. در سیکل 1، انتشار امواج از دستگاه مولد به‌طور پیوسته صورت می‌گیرد و در سیکل 0/5 تعداد پالس‌ها از دستگاه مولد در واحد واحد زمان (دقیقه) نصف می‌شود.

با توجه به روند تغییرات میزان بازدهی استخراج نسبت به تغییرات سیکل انتشار امواج فراصوت که در شکل (11) آورده شده است، می‌توان دید که پیش فرایند نمودن نمونه با امواج فراصوت در سیکل 0/3 تأثیری چندانی بر افزایش میزان بازدهی ندارد. زیرا طبق مشاهدات تجربی در این سیکل به‌علت کاهش بسیار زیاد پیوستگی انتشار امواج فراصوت در محلول، حباب‌ها فرصت رشد پیدا نمی‌کنند و در نتیجه ضربه حاصل از ترکیدن حباب‌های بر سطح سلول کم است ولی با افزایش سیکل از 0/3 تا 1 بهبود میزان بازدهی مشاهده می‌شود.

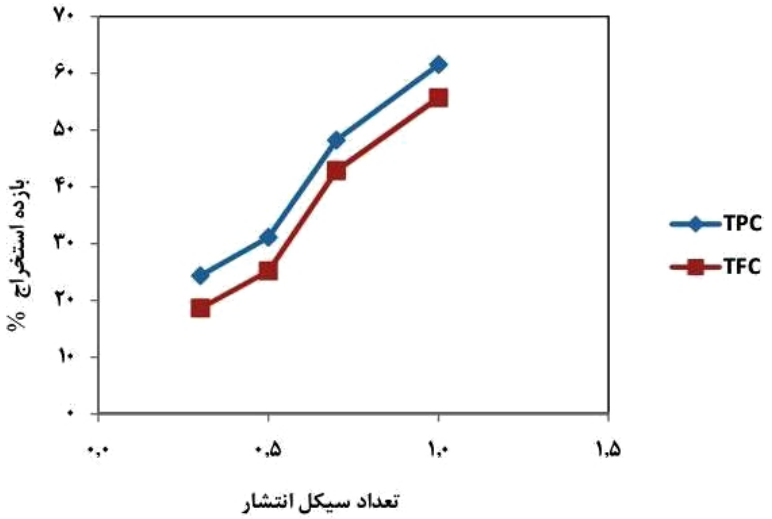
3-3-3- بررسی دامنه امواج فراصوت

کلیه آزمایش‌ها در این بخش زمان 40 min، سیکل 1 انجام شد و روند تغییرات بازدهی استخراج نسبت به دامنه امواج فراصوت در شکل (12) آورده شده است و بر این اساس میزان بازدهی استخراج از نمونه‌ها در فرایند استخراج چند مرحله‌ای با حلال با افزایش دامنه امواج فراصوت از 20 تا 60٪ با شیب بیش‌تر و از 60 تا 80٪ با شیب کم‌تر افزایش می‌یابد.

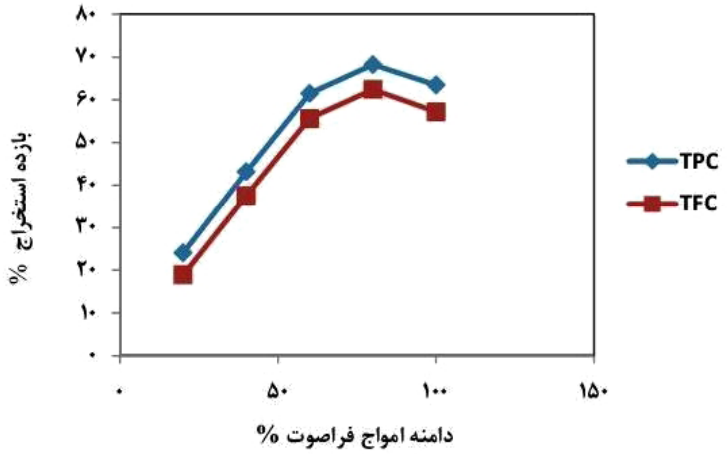
امواج فراصوت با چهار مشخصه توان منبع انتشار، فرکانس، دامنه امواج فراصوت و سیکل انتشار امواج توصیف می‌شوند. دستگاهی که در این طرح مورد استفاده قرار گرفت دارای توان ثابت 200 W و فرکانس ثابت 20 kHz است ولی دامنه امواج فراصوت در آن از 0 تا 100 قابل تنظیم است. نتایج در این مطالعه نشان داد، در دامنه امواج فراصوت پایین پیش فرایند کردن نمونه‌ها با امواج فراصوت تأثیر چندانی بر میزان افزایش بازدهی استخراج ندارد.



شکل(10) بازدهی استخراج ترکیبات فنولی (TPC) و فلاونوئیدی (TFC) در استخراج متوالی با حلال با مدت زمان پیش فرایند کردن با امواج فراصوت



شکل(11) بازدهی استخراج ترکیبات فنولی (TPC) و فلاونوئیدی (TFC) در استخراج متوالی با حلال با سیکل انتشار امواج فراصوت



شکل(12) بازدهی استخراج ترکیبات فنولی (TPC) و فلاونوئیدی (TFC) در استخراج متوالی با حلال با دامنه امواج فراصوت

هم‌چنین نتایج نشان داد در دامنه امواج فراصوت بسیار بالا (بالاتر از 80٪) تأثیر پیش فرایند با امواج فراصوت در افزایش میزان بازدهی استخراج کمی کاهش یافته است. در توجیه این مسئله می‌توان این طور بیان کرد که در دامنه امواج فراصوت بسیار بالا شدت امواج فراصوت در محلول بسیار زیاد می‌شود به این ترتیب حباب‌ها فرصت کم‌تری برای رشد خواهند داشت و به همین علت حداکثر اندازه حباب‌ها کمی کاهش پیدا می‌کند و بنابراین ضربه ناشی از ترکیدن آن‌ها در سطح کاهش و در نتیجه تأثیر آن‌ها در افزایش میزان بازدهی استخراج کمی کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر در دامنه امواج فراصوت بسیار بالا انتشار امواج فراصوت در محلول بیش‌تر از حباب زایی ایجاد آشفتگی و تلاطم می‌کند.

نتایج پیش فرایند نمونه پروتئین سویا با امواج فراصوت قبل از انجام استخراج متوالی با حلال نشان داد با پیش فرایند نمونه با امواج فراصوت در شرایط بهینه شامل سیکل 1، دامنه امواج 80٪ و مدت زمان 40 min، رسیدن به بازدهی کامل در استخراج متوالی با حلال در دما و زمان کم‌تری نسبت به زمانی که نمونه پیش فرایند نشده است حاصل می‌شود. در حالت پیش فرایند نشده برای رسیدن به حداکثر بازدهی در استخراج متوالی با حلال، انجام فرایند استخراج در دمای 45°C، نسبت مواد جامد به حلال $3/10\ g/ml^{-1}$ و در مدت زمان 45 min برای هر دفعه از استخراج لازم است در حالی که در در حالت پیش فرایند شده با امواج فراصوت می‌توان در دمای 40 °C، نسبت مواد جامد به حلال $3/10\ g/ml^{-1}$ و در

مدت زمان 15 min برای هر دفعه از استخراج به بازدهی کامل در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی رسید و این به معنای 5 °C کاهش دما و 50 min کاهش در زمان لازم در فرایند استخراج چند مرحله‌ای است.

همان‌طور که بیان شد استخراج ایزوفلاون‌ها از دانه سویا با استفاده از امواج فراصوت قبلاً صورت گرفته بود روستانگو و همکارانش از روش اولتراسوند برای استخراج ایزوفلاون‌ها از دانه استفاده کردند و شرایط بهینه برای استخراج را دمای 60 °C و زمان 20 min به‌دست آوردند[9]. ولی در این طرح، تلفیقی از روش متداول و معمول استخراج متوالی با حلال و روش مدرن امواج فراصوت به‌عنوان یک مرحله پیش فرایند کردن قبل از فرایند استخراج چند مرحله‌ای با حلال استفاده شد. همان‌طور که نتایج آزمایشات نشان داد با این روش تلفیقی، می‌توان فرایند را در دمایی بسیار پایین‌تر از دمایی روش سایر محققان انجام داد. هم‌چنین نتایج در این طرح نشان داد با 40 min پیش فرایند نمودن نمونه در دمای محیط با امواج فراصوت در سیکل 1 و دامنه امواج فراصوت 80٪ می‌توان در طی فرایند استخراج سه مرحله‌ای با حلال در نسبت مواد جامد به حلال 3/10 g/ml در دمای 40°C و در مدت زمان 15 min در هر بار استخراج به حداکثر بازدهی در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از پروتئین سویا رسید.

3-4- استخراج متوالی با حلال از نمونه پیش فرایند شده با امواج مایکروویو

پیش فرایند کردن نمونه‌ها در 10 ml اتانول 96٪ توسط امواج مایکروویو مورد بررسی قرار گرفت. بازدهی استخراج از هر نمونه بعد از پیش فرایند سازی با امواج مایکروویو، با روش استخراج متوالی با حلال در دمای 40°C، نسبت مواد جامد به حلال 3/ 10 g/ml مدت زمان 15 min انجام شد. هم‌چنین تأثیر برخی پارامترها بر بهبود فرایند استخراج شامل مدت خیساندن در حلال و مدت زمان تابش دهی با امواج مایکروویو بررسی شد.

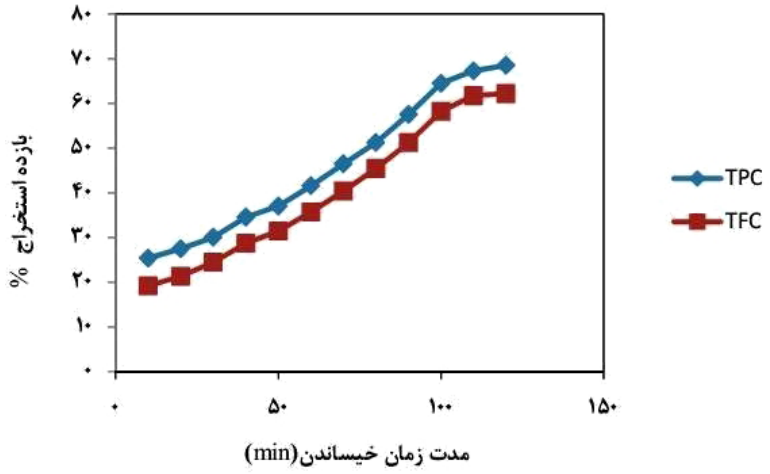
3-4-1- بررسی مدت زمان خیساندن در حلال

کلیه آزمایش‌ها در این بخش در مدت زمان 5 min تابش دهی با امواج مایکروویو انجام شد. نتایج در این بخش نشان داد که روند تغییرات بازدهی استخراج نسبت به مدت زمان خیساندن در حلال در شکل (13) آورده شده است با افزایش مدت زمان خیساندن در حلال (لیچینگ) از 2 تا 120 min میزان بازدهی استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از پروتئین سویا افزایش می‌یابد.

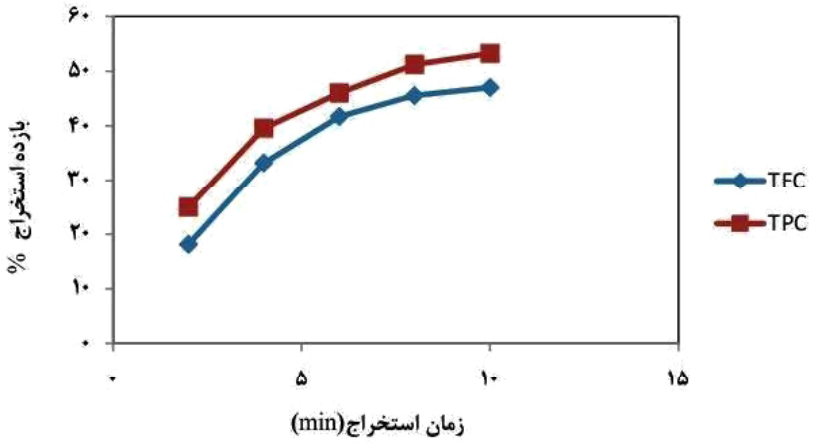
برهمکنش امواج مایکروویو با مولکول‌های قطبی ایجاد گرما می‌کند، افزایش بازدهی استخراج در فرایند لیچینگ یا به عبارتی خیساندن پروتئین سویا در اتانول حلال به علت نفوذ اتانول به داخل سلول‌های گیاهی اتفاق می‌افتد. با تابش دهی نمونه بعد از فرایند لیچینگ، حرارت ایجاد شده ناشی از برهمکنش مولکول‌های اتانول و امواج مایکروویو سبب تبخیر اتانول در سلول و بالا رفتن فشار داخلی سلول و در نهایت موجب ترکیدن و تخریب دیواره سلول می‌شود که در اثر این پدیده مواد داخل سلول به راحتی و با سرعت وارد حلال می‌شوند. بنابراین همان‌طور که نتایج در این بخش نشان می‌دهد با افزایش مدت زمان خیساندن نمونه در اتانول به علت افزایش نفوذ حلال در سلول‌ها میزان بازدهی استخراج افزایش پیدا می‌کند.

3-4-2- بررسی مدت زمان تابش دهی با امواج مایکروویو

کلیه آزمایش‌ها در این بخش در مدت زمان 60 min خیساندن در اتانول انجام و نتایج بررسی مدت زمان تابش دهی با امواج مایکروویو بررسی شد. تغییرات بازدهی استخراج نسبت به مدت زمان تابش دهی با امواج مایکروویو در شکل (14) آورده شده است. مشخص گردید با افزایش مدت زمان تابش دهی از 2 تا 10 min میزان بازدهی استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از پروتئین سویا افزایش می‌یابد. همان‌طور که بیان شد در روش مایکروویو ، انتقال گرما از طریق هدایت و یا همرفت صورت نمی‌گیرد، بلکه از طریق عبور امواج الکترومغناطیس از ماده به آن انتقال داده می‌شود. بنابراین سرعت گرم شدن در این شیوه بسیار بالا است و همان‌طور که نتایج در این بخش نشان می‌دهد با افزایش مدت زمان تابش دهی با امواج مایکروویو میزان بازدهی در استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی افزایش می‌یابد. اگرچه میزان



شکل(13) بازدهی استخراج ترکیبات فنولی (TPC) و فلاونوئیدی (TFC) در استخراج متوالی با حلال با مدت زمان خیساندن در حلال قبل از تابش‌دهی با امواج مایکروویو



شکل(14) بازدهی استخراج ترکیبات فنولی (TPC) و فلاونوئیدی (TFC) در استخراج متوالی با حلال با مدت زمان تابش دهی با امواج مایکروویو

بازدهی با افزایش مدت زمان تابش دهی با امواج مایکروویو افزایش یافته است، ولی به میزان بازدهی حاصل در زمانی که مدت زمان خیساندن نمونه‌ها 120 min در مدت زمان 5 min حاصل شد نمی‌رسد. به عبارت دیگر می‌توان گفت که با توجه به مکانیسم امواج مایکروویو در سرعت بخشیدن به فرایند استخراج در این روش هر چه مدت زمان خیساندن در حلال بیش‌تر باشد، تعداد بیش‌تری از سلول‌های گیاهی حداکثر مقدار ممکن آب را در خود جذب کرده‌اند و در ضمن فرایند تابش دهی با امواج مایکروویو تعداد بیش‌تری از سلول‌ها در اثر جذب امواج مایکروویو و تبخیر حلال موجود در آن‌ها دچار شکستگی دیواره سلولی می‌شوند. در حالی که اگر در اثر مدت زمان ناکافی مرحله خیساندن، حلال در همه سلول‌ها به میزان کافی نفوذ نکرده باشد در نتیجه حتی با افزایش مدت زمان تابش‌دهی نمونه با امواج مایکروویو تمامی سلول‌های گیاهی دچار شکستگی دیواره نمی شوند و در نتیجه میزان بازدهی استخراج کاهش می‌یابد.

استخراج ایزوفلاون‌ها از دانه سویا با استفاده از امواج مایکروویو قبلاً صورت گرفته بود موریسیو و همکارانش از روش میکروویو برای استخراج ایزوفلاون‌ها از دانه استفاده کردند و شرایط بهینه شامل دمای 60 °C و زمان 20 min را برای استخراج به‌دست آوردند [17]. ولی در این طرح، تلفیقی از روش متداول و معمول استخراج متوالی با حلال و روش نوین امواج مایکروویو به‌عنوان یک مرحله پیش فرایند کردن قبل از فرایند استخراج چند مرحله‌ای با حلال استفاده شد. همان‌طور

که نتایج در این طرح نشان داد با این روش تلفیقی می‌توان فرایند را در مدت زمان بسیار کم‌تر از زمانی که دیگر محققان برای تابش دهی نمونه با امواج مایکروویو استفاده کرده‌اند انجام داد. نتایج در این طرح نشان داد با 5 min پیش فرایند نمودن نمونه در دمای محیط با امواج مایکروویو در توان 900 w در مدت زمان 120 min خیساندن در حلال، می‌توان در طی فرایند استخراج سه مرحله‌ای با حلال در نسبت مواد جامد به حلال 3/10 g/ml در دمای 40 °C و در مدت زمان 15 min استخراج در هر بار استخراج، به حداکثر بازدهی در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از پروتئین سویا رسید.

4-نتیجه گیری

در طرح حاضر روش تلفیقی شامل استخراج متوالی با حلال از نمونه‌های پیش فرایند شده با امواج فراصوت و استخراج متوالی با حلال از نمونه‌های پیش فرایند شده با امواج مایکروویو مورد بررسی قرار گرفت و برای ارزیابی و مقایسه نتایج حاصل، از روش استخراج سوکسله به‌عنوان یک روش مرجع استفاده شد. نتایج حاصل در این طرح نشان داد استفاده از روش امواج فراصوت و مایکروویو به‌عنوان یک مرحله پیش فرایند قبل از استخراج متوالی با حلال می‌تواند زمان و دمای مورد نیاز در استخراج متوالی با حلال را برای رسیدن به حداکثر بازدهی تا حد بسیار قابل توجهی کاهش دهد که این کاهش منجر به صرفه اقتصادی در انجام فرایند و سهولت و سرعت انجام آن در مقیاس صنعتی در مقایسه با روش استخراج متوالی با حلال می‌شود.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران (INSF) در اجرای پروژه تحقیقاتی " تهیه قرص سوی منوپوز از عصاره غنی از فیتو استروژن استخراج شده از دانه سویا " سپاسگزاری می شود.

منابع

[1] Kwang, P. K. (2014). Isoflavones: Chemistry, Analysis, Functions and Effects on Health and Cancer. *Asian Pac. J. Cancer P.*, 15, 7001-7010.

[2] Shashank K., Pandey A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.*, 1-15.

[3] Hasler, C. M. (1998). Functional Foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol.*, 52,11, 63–70.

[4] Jucky S., Sudar R., et.al. (2013). Fatty Acid Composition of Oil Obtained from Soybeans by Extraction with Supercritical Carbon Dioxide. *Czech J. Food Sci.*, 31, 116–125.

[5] Gunstone, F. (1996). *Fatty Acid Lipid Chem.*, Blackie, London.

[6] Soybean seeds in Pune 2017. URL https://dir.indiamart.com/pune/soybean-seeds.html.Accessed 30.04.16.

[7] Prakash D., Upadhyay G., Brahma N., et al. (2007). Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (Glycine max). *Food Chem.*, 104, 783–790.

[8] Li-Hsun, C., Ya-Chuan, C., Chieh-Ming, C. (2004). Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures. *Food Chem.*, 84, 279–5.

[9] Rostango M.A., Palma M., Barroso C.G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A.*, 1012(2), 119-128.

[10] Zuo Y.B. , Zeng A.W. , Yuan X.G., Yu K.T. (2008). Extraction of soybean isoflavones from soybean meal with aqueous methanol modified supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.*, 89, 384–389.

[11] Lin, F., Giusti, M. M. (2005). Effects of solvent polarity and acidity on the extraction efficiency of isoflavones from soybeans (Glycine max). *J. Agr. Food*

Chem., 53, 3795–3800.

[12] Djenni Z., Pingret D., Mason T. J., Chemat F. (2013). Sono–Soxhlet: In Situ Ultrasound-Assisted Extraction of Food Products. *Food Anal. Methods*., 6, 1229–1233.

[13] Charlet S., Bensaddek L, Raynaud S, Gillet F, Mesnard F, Fliniaux M-A. (2002). An HPLC procedure for the quantification of anhydrosecoisolariciresinol. Application to the evaluation of flax lignan content. *Plant Physiol Biochem.*, 40, 225–229.

[14] Luthria D. L., Biswas R., Natarajan S. (2007). Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. Food Chem., 105, 325–333., and Rostagno, M. A., Villares A, Guillamon E.,Garcia A., Martinez J.A. (2009). Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J. Chromatogr.* A.,1216,2-9.

[15] Zhang E. J., Ming K.,Qianluo K. (2007). Extraction and Purification of Isoflavones from Soybeans and Characterization of Their Estrogenic Activities. *J. Agric. Food Chem*., 55, 6940-6950.

[16] Carra-Panizzi M. C., Favoni S. P. G., Kikuchi A. (2002). Extraction time for soybean isoflavone detrimination. *J. Braz. Arch. Biol. Technol.*, 45,515-518.

[17] Mauricio A., Rostagno, M. A., Carmelo G.B. (2003). Ultrasound assisted extraction of soyflavones. *J. Chromatogr. A.*,1012,119-128.