

发酵-酶解耦合法大豆苷元转化工艺

李笑梅, 向世新, 杨春华, 马慧玲, 张 娜

(哈尔滨商业大学 黑龙江省高校食品科学与工程重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150076)

摘 要:以市售大豆异黄酮粉为样品, 选用产 β -葡萄糖苷酶 LJ-Q2 菌种与优化后的固定化 β -葡萄糖苷酶进行耦合发酵, 采用单因素、响应曲面法对耦合发酵条件进行优化, 高效液相法 (HPLC) 测定大豆异黄酮苷元, 考察耦合发酵条件对大豆苷元转化率的影响。研究结果如下: 最优条件为温度 54 $^{\circ}\text{C}$, 耦合时间 3 h, 初始 pH7, 固定化酶添加量 7%; 大豆异黄酮苷元绝对质量 13.76 mg, 大豆异黄酮苷元转化率为 76.8%。对大豆苷制备应用技术开发有参考价值。

关键词:固定化, 耦合发酵, 大豆苷元, 转化率

Fermentation-enzymatic coupling method for daidzein transformation

LI Xiao-mei, XIANG Shi-xin, YANG Chun-hua, MA Hui-ling, ZHANG Na

(Key Laboratory of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: The commercially available soybean isoflavone powder was used as sample, LJ-Q2 strain with β -glucosidase was selected and coupled with optimized immobilized β -glucosidase. The coupling conditions were optimized by single factor and response surface method. The content of soybean isoflavone glycoside was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The effects of coupled fermentation conditions on the conversion of daidzein were investigated. The results of optimal conditions were as follows: temperature 54 $^{\circ}\text{C}$, coupling time 3 h, initial pH7, immobilized enzyme addition amount 7%. The absolute quality of soybean isoflavone aglycon was 13.76 mg, the conversion rate of soybean isoflavone aglycon was 76.8%, application of technology development for soybeans glycosides had reference value.

Key words: immobilization; coupled fermentation; daidzein; conversion rate

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)19-0118-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.023

大豆异黄酮 (Soybean Isoflavone, SI) 主要存在于大豆种皮、子叶、胚轴中^[1]。是大豆生长过程形成的次级代谢产物, 被称为“植物雌激素”, 是大豆中一类重要的生理活性物质^[2]。分为游离型和结合型两种, 也称苷元和糖苷。现在已知的大豆异黄酮的同分异构体一共有 12 种^[3]。游离型苷元又称非糖部分 (大豆异黄酮配基), 有 3 种: 大豆素 (Daidzein)、黄豆黄素 (Glycitein)、染料木素 (Genistein), 以及对应的 9 种结合型糖苷: 葡萄糖苷型 3 种、乙酰基葡萄糖苷型 3 种和丙二酰基葡萄糖苷型 3 种^[4-5]。在天然的大豆异黄酮产品中, 具有生物活性的大豆异黄酮苷元易被人体吸收^[6-8], 仅占总量的 2%~3%, 剩余的是不易被人体吸收的结合型糖苷, 占 97%~98%^[9]。大豆异黄酮具有重要的生物学活性, 在类雌激素、抗肿瘤、预防骨质疏松和心血管疾病等方面有确切作用^[10]。

国内外研究表明, 游离型生物活性高于结合型^[11-13], 糖苷型的大豆异黄酮不能被小肠壁吸收, 必须经水解去除糖基转化为游离型的苷元才可被小肠吸收^[14], 所以要将结合型糖苷转化成游离型苷元, 关键技术是提高大豆苷元转化率, 开发出大豆

苷元转化新途径、新工艺。大豆苷元转化技术主要有酸碱水解法; 酶水解法^[15], 最主要的酶有 β -葡萄糖苷酶、葡萄糖苷酶、 α -半乳糖苷酶、乳糖酶、真菌乳糖酶和乳糖酶 F 等^[16]; 微生物降解法, 对产 β -葡萄糖苷酶的菌种研究主要集中在酵母、曲霉、木霉以及细菌内^[17]。韩慧^[18]得出微波、炒制、烘箱干燥有利于大豆异黄酮苷元转化。关于苷元转化工艺的相关研究多半侧重于单一技术, 耦合方法少见报道。

综合目前的相关研究, 存在的问题是, 大豆苷元的提取率和转化率都比较低, 市售的大豆异黄酮产品总黄酮含量在 30%~80%, 而且其中苷元绝对质量也很低。另外, 作为工业原料的市售大豆异黄酮主要是结合型, 但游离型含量较高的产品价格相对较高。因此, 开发大豆苷元转化新途径非常有意义。据此, 在前期研究工作基础上将产 β -葡萄糖苷酶 LJ-Q2 肠道菌种与优化后的固定化 β -葡萄糖苷酶进行耦合发酵大豆异黄酮粉, 旨在开发大豆苷元转化的新工艺, 优化耦合工艺条件参数, 更好的提高苷元转化率, 为促进大豆异黄酮的利用率以及苷元制备技术开发提供参考依据。

收稿日期: 2017-03-24

作者简介: 李笑梅 (1960-), 女, 大学本科, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: lixm0451@163.com。

基金项目: 黑龙江省科技厅应用技术创新项目 (GC13B203); 黑龙江省高校科技创新团队建设计划项目 (2010td04)。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆异黄酮粉(含量 30%) 河南众信生物科技有限公司;大豆素标准品 Daidzein(纯度 99%)、大豆黄素标准品 Glycitein(纯度 99%)、染料木素标准品 Genistein(纯度 99%)、大豆苷标准品 Daidzin(纯度 99%)、大豆黄苷标准品 Glycitin(纯度 99%)、染料木苷标准品 Genistin(纯度 99%) 西安市天园生物制药厂;LJ-Q2 肠道菌 自素食者粪便分离鉴定;黑曲霉 β -葡萄糖苷酶 南京生利德生物技术有限公司;壳聚糖 国药集团化学试剂有限公司;海藻酸钠 天津市福晨化学试剂厂;脑心浸出液肉汤培养基(BHI)培养基 青岛海博生物技术有限公司;甲醇 美国天地公司,色谱纯;柠檬酸 天津市光复精细化工研究所,分析纯;磷酸氢二钾天津市化学试剂一厂,分析纯;氯化钙 吉林宏久试剂厂,分析纯;硫酸铵、硫酸镁、硫酸亚铁、氯化锌 天津市天新精细化工开发,分析纯;吐温-80 邢台蓝星助剂厂。

YQX-II 型厌氧培养箱 上海新苗医疗器械有限公司;SW-CJ-1 超净工作台 北京东联仪器制造有限公司;LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;Agilent 1200LC 高效液相色谱 美国安捷伦公司;TU-1901 双光束紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;SHZ-D3 循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司;AS3120A 超声波 天津奥特赛恩斯仪器有限公司;PHS-3C 型 pH 计 上海精密仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化 β -葡萄糖苷酶的制备 采用海藻酸钠-壳聚糖法将 β -葡萄糖苷酶固定化^[19]。吸取稀释酶液与质量分数 2% 的海藻酸钠水溶液混合均匀。用注射器缓慢滴到 2% 的壳聚糖-醋酸溶液和 2% 的 CaCl_2 溶液混合溶液,形成微胶囊。然后置于冰箱在恒温层 4 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下硬化 2 h,抽滤。在 0.2% 的戊二醛中,40 $^{\circ}\text{C}$ 下、交联 1 h^[20]。洗涤,得到固定化酶,置于冰箱恒温层储存备用。

1.2.2 六种大豆异黄酮定性定量方法 称取一定量大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素标准品,用 80% 甲醇溶解超声 30 min 后定容,配制成六种单标液,各浓度为 0.4 mg/mL。再用上述六种标液以相同比例分别配制成 0.048、0.096、0.144、0.192、0.240 mg/mL 系列浓度大豆异黄酮混和标液^[21]。

用 0.048 mg/mL 混标在双光束紫外分光光度计中进行全波长扫描,确定最大吸收波长。

采用高效液相色谱法进行定性定量检测,固定相为 Agilent 1200LC C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μm),以甲醇、水为流动相,以甲醇:(水+甲醇)=20%~60% 的比例进行梯度洗脱,流速为 1.2 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,检测波长为确定的最大吸收波长。将各单标过 0.45 μm 微孔滤膜于进样瓶中,依次进样,各组分别保留时间作为样品的定性依据。用配置好的混合标液进样,得到六种标准品的标准曲线及回归方程。

按公式(1)分别计算每种大豆异黄酮含量,游离

型大豆异黄酮总量由三种游离型大豆异黄酮相加得出,结合型大豆异黄酮总量由三种结合型大豆异黄酮相加得出。

$$m = c \times V \times 10^{-3} \quad \text{式(1)}$$

式(1)中: c —由各类型大豆异黄酮回归方程得出其浓度, $\mu\text{g/mL}$; V —定容体积, mL。

按公式(2)计算游离型大豆异黄酮转化率。

$$\text{游离型大豆异黄酮转化率}(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m_3} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式(2)中: m —每种大豆异黄酮绝对质量, mg; m_1 —样品中游离型异黄酮绝对质量, mg; m_2 —耦合发酵后游离型异黄酮绝对质量, mg; m_3 —样品中结合型异黄酮绝对质量, mg。

1.2.3 耦合发酵工艺 用于发酵的 LJ-Q2 肠道菌是前期工作自素食者肠道分离得到的革兰氏阳性球菌,为厌氧型,与黑曲霉相比较,在发酵时间短于 64 h 时 LJ-G1、LJ-Q2 产酶能力高于黑曲霉^[22],产 β -葡萄糖苷酶^[23]。配置 50 mL 脑心浸出液培养基(BHI),将活化后的 LJ-Q2 肠道菌接种于 BHI 液体培养基中,接菌量(体积分数)5%、培养基 pH8、培养温度 38 $^{\circ}\text{C}$ 、培养时间 38 h。将大豆异黄酮粉原料进行发酵,待发酵时间剩余 3 h 时,添加固定化酶于发酵液中,进行耦合酶解发酵,初始 pH 为 7、耦合时间为 3 h,固定化酶添加量为 5%,温度 40 $^{\circ}\text{C}$,然后在空气摇床中发酵,得酶解发酵液。

1.2.4 耦合发酵工艺单因素实验 单因素实验主要考察耦合温度、耦合时间、初始 pH、固定化酶添加量四个因素,以未经耦合发酵的经炒制后的大豆异黄酮原料为对照组,采用 HPLC 进行检测,以游离型大豆异黄酮苷元绝对质量为评价指标,各组实验重复三次。

1.2.4.1 初始 pH 对苷元绝对质量的影响 在其他条件不变的情况下,考察初始 pH4、5、6、7、8,耦合温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,耦合时间为 3 h,酶添加量为 5%。对耦合发酵大豆异黄酮苷元绝对质量的影响。

1.2.4.2 耦合温度对苷元绝对质量的影响 在其他条件不变的情况下,考察耦合温度 20、30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$,初始 pH7,耦合时间为 3 h,酶添加量为 5%。对耦合发酵大豆异黄酮苷元绝对质量的影响。

1.2.4.3 耦合时间对苷元绝对质量的影响 在其他条件不变的情况下,考察耦合时间 1、3、5、7、9 h,初始 pH7,耦合温度 40 $^{\circ}\text{C}$,酶添加量为 5%。对耦合发酵大豆异黄酮苷元绝对质量的影响。

1.2.4.4 酶添加量对苷元绝对质量的影响 在其他条件不变的情况下,考察酶添加量 1%、3%、5%、7%、9%,初始 pH7,耦合温度 40 $^{\circ}\text{C}$,耦合时间 3 h。对耦合发酵大豆异黄酮苷元绝对质量的影响。

1.2.5 响应面法优化耦合发酵工艺条件 采用 Box-Behnken 模型,以温度、时间、初始 pH 和酶添加量四个单因素为耦合发酵大豆异黄酮苷元绝对质量影响的主要考察因子(自变量),分别以 A、B、C、D 表示,并以 -1、0、+1 分别代表自变量的低、中、高水平对自变量进行编码。因子编码及水平见表 1。并采用多元回归分析,拟合二次多项式回归模型的 Box -

Behnken 设计实验^[24],进行结果分析,得到固定化酶水解大豆异黄酮粉优化工艺条件,在此基础上,做验证实验。

表1 Box-Behnken 实验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels table of Box-Behnken design

水平	因素			
	A 温度 (℃)	B 时间 (h)	C pH	D 酶添加量 (%)
-1	40	1	6	5
0	50	3	7	7
1	60	5	8	9

1.3 数据处理

实验操作重复三次,采用 SPSS 19.0 软件进行单因素显著性分析,采用 Design-Expert 8.05b 软件设计响应面实验方案、建立数学模型并进行多元回归分析。

2 结果与分析

2.1 六种大豆异黄酮标样定性检测

2.1.1 大豆异黄酮最大吸收波长 由紫外扫描图可以看出,确定 259 nm 为最大吸收波长,作为液相的测定条件。

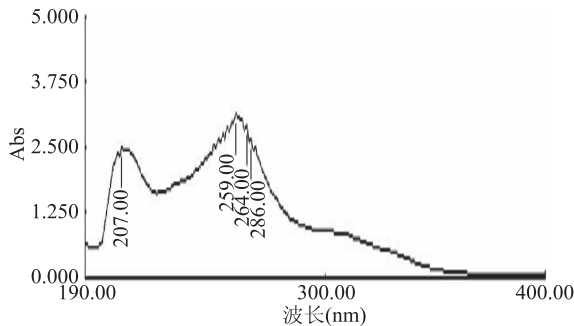


图1 大豆异黄酮紫外全波长扫描图

Fig.1 Soy isoflavones full wavelength ultraviolet scan

2.1.2 游离大豆异黄酮的标准曲线 用 HPLC 法分别测定配制的系列标准溶液,进样量 20 μL , $n = 3$ 。以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。

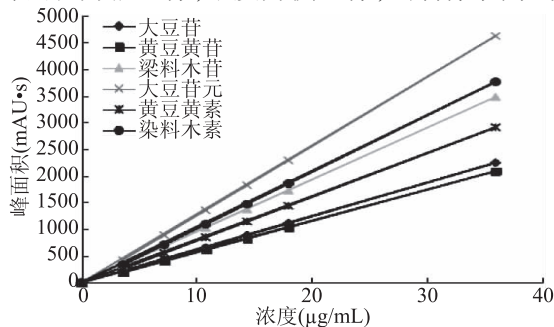


图2 六种大豆异黄酮标准曲线

Fig.2 Standard curve of six soybean isoflavones

峰面积 y 对浓度 x ($\mu\text{g/mL}$) 进行回归分析,回归方程分别为:

大豆素: $y = 129.55x - 43.855$, $r = 0.9996$; 大豆黄素: $y = 61.151x - 53.554$, $r = 0.998$;

染料木素: $y = 105.85x - 50.178$, $r = 0.9991$; 大豆苷: $y = 53.574x - 34.498$, $r = 0.9987$;

大豆黄苷: $y = 60.494x - 43.071$, $r = 0.9986$; 染料木苷: $y = 71.444x - 27.151$, $r = 0.9990$ 。

式中: y 为大豆异黄酮的峰面积; x 为大豆异黄酮的浓度, $\mu\text{g/mL}$, 线性范围是 0~40 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.3 大豆异黄酮的定性

2.1.3.1 混合标样中六种大豆异黄酮定性 根据单标的保留时间对混标色谱图各组分进行定性。由图 3 可知: 19.200 min 是大豆苷, 20.700 min 是大豆黄苷, 24.604 min 是染料木苷, 36.321 min 是大豆素, 38.383 min 是大豆黄素, 41.861 min 是染料木素。

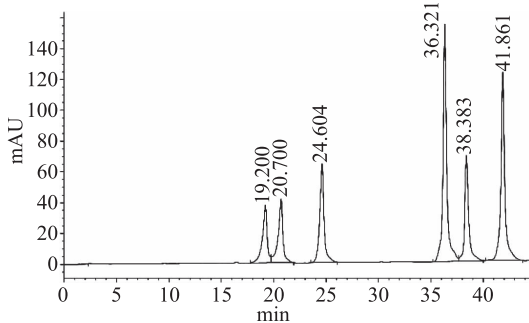


图3 混合标样大豆异黄酮色谱图

Fig.3 The chromatogram of six soy isoflavones in standard substance

2.1.3.2 原料中大豆异黄酮的定性定量 由图 4 可知,原料中各组分大豆异黄酮出峰时间与图 3 混合标样各组分的出峰时间相同,含有上述六种大豆异黄酮。根据相应标准曲线,计算出原料中大豆苷含量为 2.187 mg/g; 大豆黄苷含量为 1.764 mg/g; 染料木苷含量为 1.242 mg/g; 大豆素含量为 3.661 mg/g; 大豆黄素含量为 0.634 mg/g; 染料木素含量为 0.4 mg/g。三种结合型异黄酮总含量为 5.193 mg/g; 三种游离型异黄酮总含量为 4.695 mg/g。

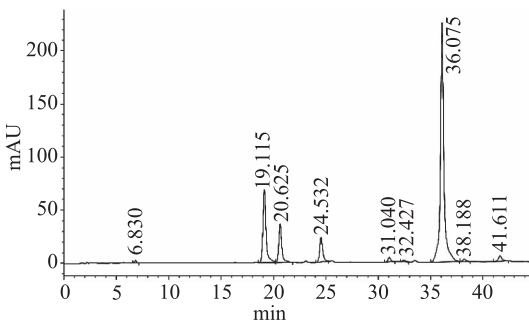


图4 原料未经预处理大豆异黄酮色谱图

Fig.4 The chromatogram of soybean isoflavones without any pretreatment in sample

2.2 单因素实验

2.2.1 初始 pH 对苷元绝对质量的影响结果 如图 5 所示,初始 pH 是 4.0 时大豆异黄酮苷元绝对质量较低,然后随 pH 上升,苷元绝对质量同步增加,初始 pH7,苷元绝对质量达到最高,之后开始下降,经显著性分析, pH6 和 pH7 ($p > 0.05$) 无显著性差异, pH7 和 pH8 ($p > 0.05$) 也无显著性差异。 pH5 和 pH7 ($p < 0.05$) 存在显著性差异,表明适宜的初始 pH 为 6.0~8.0。

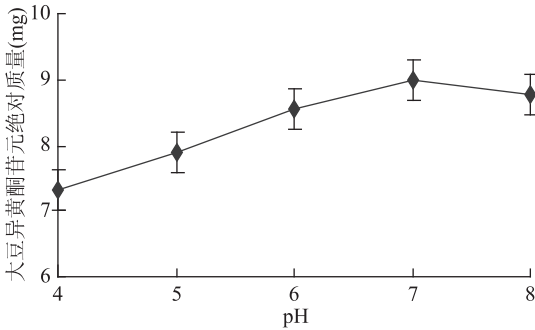


图5 初始 pH 对苷元绝对质量的影响

Fig.5 Effect of initial pH on the absolute quality of aglycone

2.2.2 耦合温度对苷元绝对质量的影响结果 如图6所示,耦合温度为 20 ℃时大豆异黄酮苷元绝对质量较低,然后随温度升高,苷元绝对质量也增加,到 50 ℃时苷元绝对质量最高,之后开始下降,经显著性分析,40 ℃和 50 ℃($p < 0.05$)存在显著性差异,50 ℃和 60 ℃($p < 0.05$)同样存在显著性差异。表明适宜温度为 40~60 ℃。

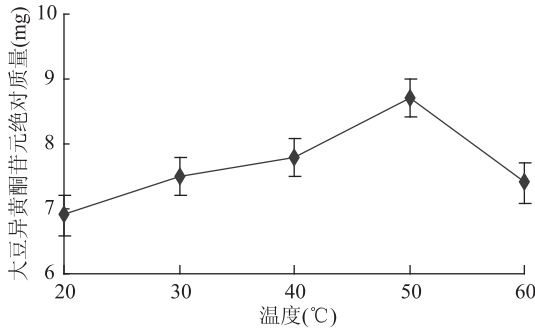


图6 温度对苷元绝对质量的影响

Fig.6 Effect of temperature on the absolute quality of aglycone

2.2.3 耦合时间对苷元绝对质量的影响结果 如图7所示,当耦合时间为 1 h 时大豆异黄酮苷元绝对质量较低,随着耦合时间上升,大豆异黄酮苷元绝对质量升高,耦合时间为 3 h 时苷元酮绝对质量最高,之后绝对质量开始下降,经显著性分析,1 h 和 3 h 存在显著性差异($p < 0.05$),3 h 和 5 h($p > 0.05$)无显著性差异。表明适宜时间为 1~5 h。

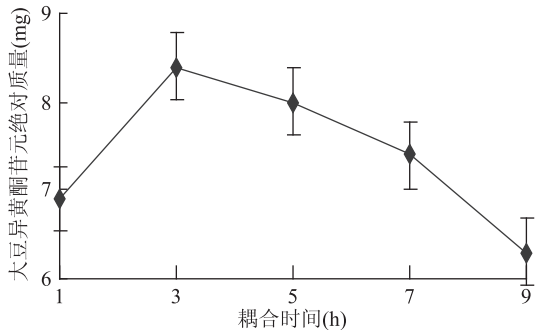


图7 耦合时间对苷元绝对质量的影响

Fig.7 Effect of coupling time on absolute quality of aglycone

2.2.4 酶添加量对苷元绝对质量的影响结果 如图8所示,固定化酶添加量为 1% 时大豆异黄酮苷元绝对质量较低,然后随酶添加量增加,大豆异黄酮苷元绝对质量同步升高,添加量为 7% 时苷元绝对质量最

高,之后开始下降,经显著性分析,5% 和 7% ($p < 0.05$) 有显著性差异,7% 和 9% ($p > 0.05$) 无显著性差异,表明固定化酶适宜添加量为 5%~9%。

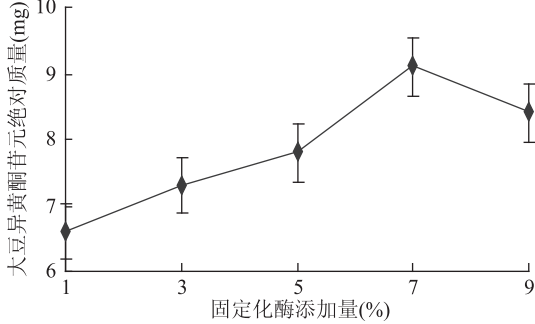


图8 酶添加量对苷元绝对质量的影响

Fig.8 Effect of enzyme addition on the absolute quality of aglycone

2.3 响应面实验

本实验利用 Design-Expert 软件,获得响应面实验结果见表 2。

表2 响应面实验结果
Table 2 Results of response surface experiment

实验号	A	B	C	D	大豆苷元绝对质量(mg)
1	1	1	-1	-1	8.78
2	0	0	0	0	12.42
3	-1	1	-1	-1	8.74
4	0	0	1	0	0.89
5	-1	1	1	1	9.47
6	0	0	0	-1	8.32
7	0	0	0	0	11.45
8	0	-1	0	0	10.23
9	1	1	-1	1	9.24
10	1	-1	1	1	9.53
11	0	0	0	0	12.33
12	0	0	-1	0	11.21
13	0	1	0	0	10.24
14	0	0	0	1	10.77
15	1	1	1	-1	8.5
16	-1	-1	1	-1	8.1
17	-1	1	1	-1	8.1
18	-1	1	-1	1	8.73
19	0	0	0	0	12.3
20	1	0	0	0	12.4
21	0	0	0	0	11.1
22	1	-1	1	-1	8.4
23	-1	-1	1	1	9.3
24	-1	-1	-1	1	8.6
25	-1	0	0	0	10.1
26	1	-1	-1	-1	8.9
27	0	0	0	0	11.5
28	1	1	1	1	9.3
29	-1	-1	-1	-1	7.31
30	1	-1	-1	1	9.45

表3 响应面回归方程系数及显著性检验

Table 3 Significance test and the regression equation of response surface experiment

差异来源	回归系数	自由度	标准误差	F 值	p 值	显著性
模型	11.53	1	0.20	9.70	<0.0001	**
A	0.34	1	0.15	4.90	0.0427	*
B	0.071	1	0.15	0.22	0.6462	
C	0.035	1	0.15	0.053	0.8208	
D	0.51	1	0.15	11.43	0.0041	**
AB	-0.14	1	0.16	0.72	0.4086	
AC	-0.14	1	0.16	0.75	0.4003	
AD	-0.057	1	0.16	0.12	0.7288	
BC	-0.074	1	0.16	0.21	0.6508	
BD	-0.097	1	0.16	0.36	0.5564	
CD	0.14	1	0.16	0.74	0.4045	
A ²	0.031	1	0.40	6.023E-003	0.9392	
B ²	-0.98	1	0.40	6.05	0.0266	*
C ²	-0.17	1	0.40	0.18	0.6788	
D ²	-1.67	1	0.40	17.50	0.0008	**
失拟项	4.62	10	0.46	1.44	0.3601	
纯误差	1.6	5	0.32			
总和	62.56					
$R = 0.9489 \quad R^2 = 0.9005 \quad R^2_{Adj} = 0.8077$						

注: $p < 0.01$, 差异极显著, ** 表示; $p < 0.05$, 差异显著, * 表示。

由表 2 可以看出, 2 组游离型大豆异黄酮绝对质量最高为 12.42 mg。根据表 2 实验结果, 经回归拟合后, 各实验因子对响应值的影响可通过以下回归方程表示:

$$Y = 11.53 + 0.34A + 0.071B + 0.035C + 0.51D - 0.14AB - 0.14AC - 0.057AD - 0.074BC - 0.097BD + 0.14CD + 0.031A^2 - 0.98B^2 - 0.17C^2 - 1.67D^2$$

响应面回归方程及显著性分析见表 3。

由回归方程系数显著性检验结果表 3 可知: 实验所选用的模型极显著 ($p < 0.0001$), 模型的校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.8077$, 说明能解释 80.77% 响应值的变化, 相关系数 $R = 0.9489$, 拟合程度良好, 模型是合适的。从回归方程系数显著性检验可知, 模型一次项 A、D 显著 ($p < 0.05$), C、B 不显著 ($p > 0.05$); 二次项 B²、D² 显著, 交互项都不显著。影响程度主次顺序为: 酶添加量 > 温度 > 耦合时间 > pH。

2.4 耦合发酵法制备大豆异黄酮苷元响应面分析图

由图 9 可知, 温度为 40 ℃, 随温度的上升, 苷元绝对质量逐渐加大, 温度在 54 ℃ 左右, 苷元绝对质量为最大值, 之后又慢慢下降。随水解时间继续增加, 苷元绝对质量增大, 在水解时间 3 h 左右, 大豆异黄酮苷元绝对质量为最大值, 其后呈下降趋势。

由图 10 可知, 温度为 40 ℃, 随温度的上升, 苷元绝对质量逐渐升高, 温度在 54 ℃ 左右, 苷元绝对质量为最大值, 之后又慢慢下降。然后 pH 的增加, 大豆异黄酮苷元绝对质量增大, 在初始 pH 为 7 左右, 大豆异黄酮苷元绝对质量为最大值, 其后呈下降趋势。

由图 11 可知, 随温度的升高, 苷元绝对质量逐

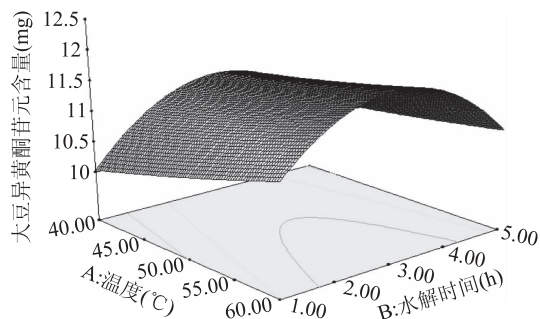


图9 温度和水解时间的交互作用
对大豆异黄酮苷元含量的影响

Fig.9 Effects of temperature and hydrolysis time
on the content of soybean isoflavone glycosides

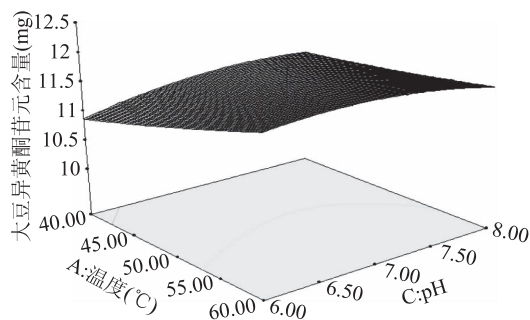


图10 温度和 pH 的交互作用
对大豆异黄酮苷元含量的影响

Fig.10 Effects of temperature and pH interaction
on the content of soybean isoflavone glycosides

渐加大, 温度在 54 ℃ 左右, 苷元绝对质量为最大, 之后又慢慢下降。然后固定化酶添加量的增加, 大豆异黄酮苷元绝对质量增大, 在固定化酶添加量 7% 左

右,大豆异黄酮苷元绝对质量为最大值,其后呈下降趋势。

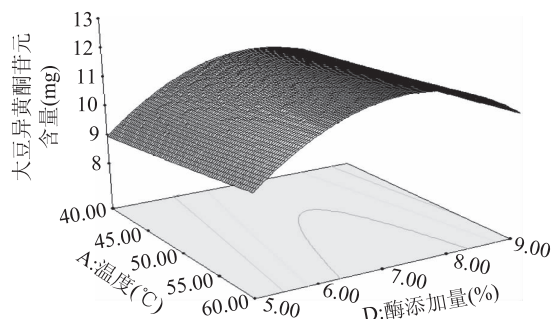


图 11 温度和酶添加量的交互作用
对大豆异黄酮苷元含量的影响

Fig.11 Effects of temperature and enzyme interaction
on the content of soybean isoflavone glycosides

由图 12 可知,水解时间的延长,苷元绝对质量加大,水解时间 3 h 左右,苷元绝对质量为最大,之后又呈下降趋势。当 pH 增加苷元绝对质量增大,在初始 pH 为 7 左右时,大豆异黄酮苷元绝对质量为最大值,其后呈下降趋势。

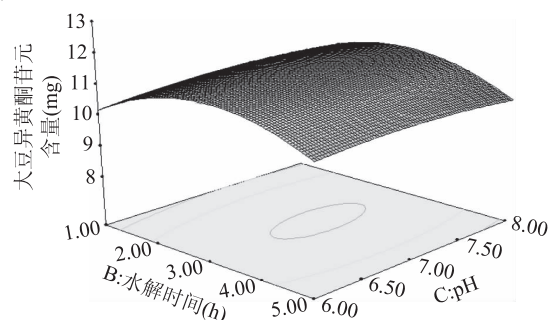


图 12 水解时间和 pH 的交互作用
对大豆异黄酮苷元含量的影响

Fig.12 Effects of hydrolysis time and pH
on the content of soybean isoflavone glycosides

由图 13 可知,水解时间延长,苷元绝对质量增大,在水解时间 3 h 左右,苷元绝对质量到达最高点,之后又呈下降趋势。随着固定化酶添加量加大,大豆异黄酮苷元绝对质量增大,在固定化酶添加量在 7% 左右,大豆异黄酮苷元绝对质量为最大值,其后呈下降趋势。

由图 14 可知,随 pH 的上升,苷元绝对质量逐渐升高,然后 pH 在 7 左右时苷元绝对质量到达最高点,之后又慢慢下降。随着固定化酶添加量的升高,苷元绝对质量增大,在固定化酶添加量在 7% 左右,苷元绝对质量为最大值,其后呈下降趋势。

由耦合发酵法制备大豆异黄酮苷元响应面分析图得到最优耦合发酵条件温度 54.03 °C,水解时间 3 h,初始 pH7,固定化酶添加量 7.29%。以此优化条件进行验证实验,耦合发酵条件温度 54 °C,水解时间 3 h,初始 pH7,固定化酶添加量 7%,大豆异黄酮苷元绝对质量 13.76 mg,与响应曲面实验中的第 2 组结果 12.42 mg 差异显著 ($p < 0.05$),具有统计学意义。耦合发酵前原料样品中大豆异黄酮苷元绝对质

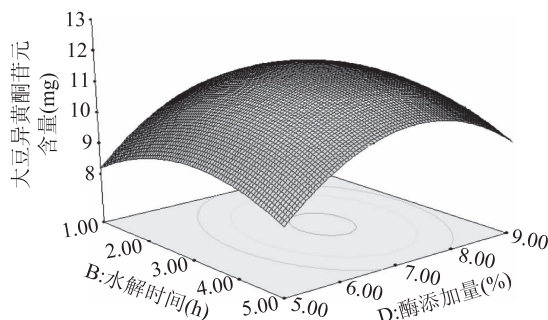


图 13 水解时间和酶添加量的交互作用
对大豆异黄酮苷元含量的影响

Fig.13 Effects of interaction between hydrolysis time
and enzyme content on soybean isoflavone glycoside content

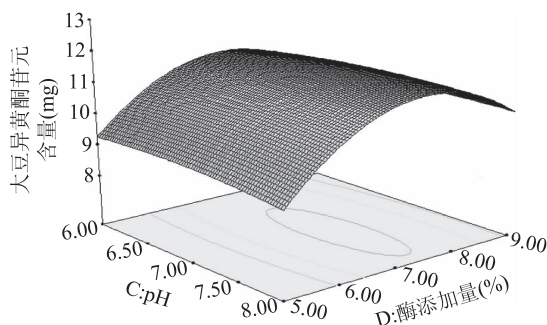


图 14 pH 和酶添加量的交互作用
对大豆异黄酮苷元含量的影响

Fig.14 Effects of the interaction of pH and enzyme content
on the content of soybean isoflavone glycosides

量为 6.695 mg,三种结合型异黄酮总绝对质量为 9.193 mg,根据公式(2)计算出大豆异黄酮苷元转化率 76.8%。

其大豆苷元转化率与近几年相关研究结果相比均有提高,张涛^[25](2008)采用固定化酶 β -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮转化率达到 70%,相比之下转化率增加了 6.8%。素食者粪便分离到的肠道菌 LJ-Q2 具有产 β -葡萄糖苷酶能力^[13],课题前期李笑梅^[22]采用 LJ-Q2 菌株发酵大豆异黄酮转化率达到 39.4%,相比之下转化率增加了 37.4%。与黑曲霉相比产酶能力达到峰值的时间短为 36 h,远短于黑曲霉 108 h。由此认为采用 LJ-Q2 菌- β -葡萄糖苷酶耦合发酵法全程发酵时间明显缩短,且可以提高大豆苷元转化率,具有开发应用前景。

3 结论

在单因素实验的基础上通过响应面实验得到耦合发酵最优条件为温度 54 °C,耦合时间 3 h,初始 pH7,固定化酶添加量 7%,此条件下大豆异黄酮苷元转化率为 76.8%。其大豆苷元转化率与近几年相关研究结果相比均有提高,对大豆苷制备应用技术开发有参考价值。后续工作应进一步讨论另外六种结合型,即丙二酰基葡萄糖苷型和乙酰基葡萄糖苷型的苷元转化,探讨多种产 β -葡萄糖苷酶复合菌种与 β -葡萄糖苷酶耦合发酵途径,多途径提高大豆异黄酮苷元的转化率,开发易于实际生产的应用技术。

参考文献

- [1] 付丽佳,林海,王玉华.大豆异黄酮雌激素样作用的研究进展[J].中国伤残医学,2008(6):134-135.
- [2] 梁晓芳.6种大豆异黄酮单体的分离、纯化及稳定性研究[D].北京:中国农业科学院,2014.
- [3] 王春娥,刘叔义.大豆异黄酮的成分、含量及特性[J].食品科学,1998(4):39-43.
- [4] 李笑梅.复合生物法大豆异黄酮苷元制备技术的研究与开发[R].黑龙江省应用技术与开发计划项目可行性研究报告.2013.
- [5] Wang H J, Murphy P A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects if variety crop year and location[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994(42):1674-1677.
- [6] Kiyosawa I, Matsuyama J, Arai C, et al. Suppressive effects of the methanol extracts from soyabean products on SOS response of Salmonella typhimurium induced by mutagens and their contents of isoflavones[J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 1995, 42(10):835-842.
- [7] Masayoshi Y, Ying H G. Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: The genistein effect is enhanced by zinc [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1998, 178(1-2):377-382.
- [8] Yamaki K, Kim D H, Ryu N, et al. Effects of naturally occurring isoflavones on prostaglandin E2 production[J]. Planta Medica, 2002, 68(2):97-100.
- [9] 周玲,苏黎红.大豆异黄酮研究概况[J].时珍国医国药, 2001, 12(2):157-158.
- [10] 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.
- [11] Kiyosawa I, Matsuyama J, Arai C, et al. Suppressive effects of the methanol extracts from soybean products on SOS response of Salmonella typhimurium induced by mutagens and their absolute quality of isoflavones[J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 1995, 42(10):835-842.
- [12] Masayoshi Y, Ying H G. Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: The genistein effect is enhanced by zinc [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1998, 178(1-2):377-382.
- [13] Yamaki K, Kim D H, Ryu N, et al. Effects of naturally occurring isoflavones on prostaglandin E2 production[J]. Planta Medica, 2002, 68(2):97-100.
- [14] 孙逊,姚文,朱伟云.肠道大豆异黄酮降解菌研究进展[J].世界华人消化杂志,2006,14(10):236-241.
- [15] 李明元,余渝,杜小琴.水解法提取大豆异黄酮苷元工艺研究[J].西南大学学报:自然科学版,2008,30(4):119-122.
- [16] 张晓红,于殿宇,周凤超.制备大豆异黄酮苷的方法[J].食品科学,2006,27(11):583-585.
- [17] 韩婷,程钢. β -葡萄糖苷酶以及益生菌生物转化大豆异黄酮糖苷的研究进展[J].食品科学,2010,31(9):333-337.
- [18] 韩慧,张加玲.热处理与大豆异黄酮苷元的转化分析[J].中国食品卫生杂志.2010,22(3):250-253.
- [19] 马慧玲,李笑梅.响应曲面法优化 β -葡萄糖苷酶固定化的研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2016(3):357-362.
- [20] Chang MY, Juang RS. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of B-glucosidase[J]. Biochem Eng J, 2007(35):93-98.
- [21] Walter E D, et al. J Am Chem Soc, 1941(63):327.
- [22] 李笑梅,马慧玲.两株素食者肠道菌产 β -葡萄糖苷酶考察及产酶条件优化[J].食品科学,2016(7):123-127.
- [23] 李笑梅,贾尧.素食者产雌马酚肠道菌生长条件优化[J].食品科学,2014(23):199-203.
- [24] Bemelmans W J, Broer J, Feskens E J, et al. Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: the Mediterranean alpha-linolenic enriched groningen dietary intervention (MARGARIN) study[J]. Am J Clin Nutr, 2002(75):221-227.
- [25] 张涛,黄哲,林章凇.固定化 β -葡萄糖苷酶双相体系中水解大豆异黄酮[J].化工学报,2008(2):387-392.
- [5] Wang Y, Wehlinghenricks M, Samengo G, et al. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide[J]. Aging Cell, 2015, 14(4):678-688.
- [6] 沈巧艳,李娜,华进联.抗衰老的 GDF11 生物学特征与功能表现[J].中国生物化学与分子生物学报,2016,32(8):872-878.
- [7] Yan Z, Jin S, Zhi W, et al. Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPARgamma[J]. Gene, 2015, 557(2):209-214.
- [8] Sinha M, Jang Y C, Oh J, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle[J]. Science, 2014, 344(6184):649-652.
- [9] Katsimpardi L, Litterman N K, Schein P A, et al. Vascular and Neurogenic Rejuvenation of the Aging Mouse Brain by Young Systemic Factors[J]. Science, 2014, 344(6184):630-634.
- [10] Loffredo F S, Steinhauser M L, Jay S M, et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy[J]. Cell, 2013, 153(4):828-839.
- [11] 肖硕,洪华珠,彭建新.基因工程菌中重组质粒的稳定性研究进展[J].生物技术通报,2008,15(4):9-12.
- [12] 赵先萍.遗传工程中重组载体的构建及稳定性问题[J].农业开发与装备,2015,40(10):64.
- [13] 郭云萍,陶凌,李刚,等.重组人硫氧还蛋白工程菌生物学特性稳定性的检测[J].微生物学通报,2013,40(8):1457-1461.
- [15] 王宏华,凌红丽,侯竹美,等.鸡 γ -干扰素基因重组质粒在工程菌株中的稳定性研究[J].微生物学通报,2008,35(7):1055-1058.
- [16] 翟成一,徐岩,聂尧,等.产普鲁兰酶重组大肠杆菌质粒稳定性的研究[J].工业微生物,2015,45(2):13-20.
- [17] 陈悦,李环,韦萍.产乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶基因工程菌的构建及遗传稳定性研究[J].工业微生物,2008,38(2):23-27.

(上接第117页)