

固态发酵法制备大豆异黄酮苷元

蒋大海¹, 田娟娟^{2,*}, 白志明^{1,2}

(1. 黑龙江省粮食科学研究所, 黑龙江 哈尔滨 150001;

2. 黑龙江双河松嫩大豆生物工程有限责任公司, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: 研究了一种能分泌 β -葡萄糖苷酶的黑曲霉作为菌种对大豆异黄酮粉进行发酵生产大豆异黄酮苷元的方法, 通过单因素及正交试验确立了产 β -葡萄糖苷酶的最优培养基配比和水解大豆异黄酮粉的最佳工艺条件, 为实现大豆异黄酮苷元的产业化生产提供了参考。

关键词: 黑曲霉; 固态发酵法; β -葡萄糖苷酶; 制备; 大豆异黄酮苷元

Study on Solid Fermentation in Producing of Soybean Isoflavone Glycoside

JIANG Da-hai¹, TIAN Juan-juan^{2,*}, BAI ZHI-ming^{1,2}

(1. Cereals and Oils Institute of Heilongjiang Province, Harbin 150001, China

2. Heilongjiang Shuanghe Songnen Soybean Bioengineering Co. Ltd., Harbin 150001, China)

Abstract: The study worked a new method that experiment adopted *Aspergillus niger* as experimental species, which secrete β -glucosidase, to produce the soybean isoflavone glycoside by solid fermentation. Study, through a single-element and cross-experiment, selected and decided the optimum medium ratio to produce β -glucosidase and technological conditions for hydrolyzing soybean isoflavone flour, which provide a reliable references to realize the industrialization of soybean isoflavone glycoside.

Key words *Aspergillus niger*; solid fermentation; β -glucosidase; produce soybean isoflavone glycoside

中图分类号: S188

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0163-04

大豆异黄酮有12种存在形式, 其中近98%以 β -葡萄糖苷形式存在的糖苷及其衍生物, 只有1%~2%左右为游离型苷元, 主要是染料木素(genistein)和大豆苷元(daidzein), 大豆异黄酮苷及其衍生物的生物活性比较低, 很难被人体吸收, 只有水解成相应的苷元后, 才具有较高的生理功能作用^[1]。大豆异黄酮提取工艺中所提取得到的大部分是异黄酮苷, 异黄酮苷元只占很小的比例, 经过产 β -葡萄糖苷酶的微生物固态发酵可以使大豆异黄酮糖苷水解成相应的苷元, 它们是大豆异黄酮中起主要生物活性的成分。在国外, 评价异黄酮产品的品质是以染料木素含量的高低为标准^[2]。大豆异黄酮苷的水解可分为三步: 第一步是丙二酰基葡萄糖苷水解为乙酰基葡萄糖苷; 第二步是乙酰基葡萄糖苷水解成 β -葡萄糖苷; 第三步是 β -葡萄糖苷水解为大豆异黄酮苷元。前两步水解很容易进行, 高温、弱酸性和弱碱性条件都可使其水解, 而第三步就需要较高的条件。通

常是采用高温低pH值或用酶水解两个途径来实现^[3]。

大豆异黄酮苷虽然可在酸性条件下水解成相应的苷元和葡萄糖, 但碱水解所得到的大豆异黄酮苷元很不稳定, 容易降解。酸水解效率虽高, 但工业化生产条件要求严格, 增加了基础建设的投资。相对而言酶水解条件比较温和, 所用的酶范围较广, 如 β -葡萄糖苷酶、葡萄糖酸酶、 α -半乳糖苷酶、乳糖酶和真菌乳糖酶等, 但单纯通过应用工业酶法生产苷元的成本都很昂贵。 β -葡萄糖苷酶是广泛存在于人的消化道、植物和400多种微生物中的一种酶, 可以水解异黄酮成为苷元。大豆自身也含有 β -葡萄糖苷酶, 但水解活性不强, 水解效率只有22%~29%。但利用微生物发酵的方法可以提高大豆自身 β -葡萄糖苷酶的活性, 发酵不影响总异黄酮含量同时直接产生苷元, 该法可大幅度降低成本, 为工业化生产提供便利条件^[4]。

1 材料与方法

收稿日期: 2006-06-05

基金项目: 农业科技成果转化基金项目(国科发农社字[2003]293号)

作者简介: 蒋大海(1968-), 男, 工程师, 主要从事大豆深加工研究。E-mail: tianjj2007@sina.com

*通讯作者: 田娟娟(1978-), 女, 工程师, 主要从事植物制剂提取及大豆深加工研究。E-mail: tianjj2007@sina.com

1.1 材料

1.1.1 原料

麦麸、大麦芽、大豆浓缩蛋白、大豆异黄酮粉 黑龙江双河松嫩大豆生物工程有限责任公司；大豆苷元(daidzein, 98%)、染料木素(genistein, 99%)、大豆苷(daidzin, 98%)、大豆黄苷(glycitin, 99%)、染料木苷(genistin, 97%) 美国Sigma公司。

1.1.2 试剂

蛋白胨、硫酸铵、磷酸二氢钾、醋酸钠、硫酸镁、琼脂、无水乙醇、氯化钙、氯化钠 均为分析纯。

1.1.3 菌种

黑曲霉 中科院微生物所菌种保藏中心。

1.1.4 仪器

101-0A 型电热鼓风干燥箱, TG-328 光学读数分析天平, 马头牌架盘药物天平, HH-S112 电热恒温水浴锅, LD5-10 离心机, F80 型高速万能粉碎机, 78-1 磁力加热搅拌器, KQ-100 型超声波清洗器, FZ102 巨轮牌植物粉碎机, HY-35 隔水式电热恒温培养箱, LC-10A 高效液相色谱仪, YXQ-SG46-280 型电热手提式压力蒸汽消毒器。

1.2 方法

1.2.1 大豆异黄酮含量检测

依据企标 Q/HSS01—2002 方法测定。

1.2.2 β -葡萄糖苷酶酶活测定

1.2.2.1 酶活定义

每毫升粗酶液作用于底物大豆异黄酮时, 每小时产生 1 微克异黄酮苷元所需的酶量为一个酶活单位。

1.2.2.2 酶活测定

取 100mg 大豆异黄酮粗粉, 加入 20ml 上清粗酶液, 50℃条件下保温 60min, 取出煮沸灭酶活, 滤纸过滤, 取滤液 2ml 加入 8ml 无水乙醇处理定容至 10ml, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后液相检测其大豆异黄酮含量, 计算酶活。

1.2.2.3 苷元转化率计算公式

$$\text{苷元转化率}(\%) = \frac{\text{染料木素的生成量}}{\text{底物中染料木素量} + \text{染料木苷}} \times 100$$

(以染料木素计)

2 结果与分析

2.1 微生物发酵法制备 β -葡萄糖苷酶

2.1.1 菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger* 3.4303)。

2.1.2 斜面培养基

5° 麦芽汁琼脂培养基。

2.1.3 锥形瓶种子培养基

5° 麦芽汁琼脂培养基。

2.1.4 实验产酶发酵培养基

2.1.4.1 培养基组成

麦麸、大豆浓缩蛋白、水。

2.1.4.2 最佳培养基组成实验

(1) 培养基加水量对产酶的影响

取麦麸与大豆浓缩蛋白的质量比 1:1, 混合均匀后, 分别加入 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5 倍量水, 搅拌均匀后, 分装于锥形瓶中, 加塞、灭菌、放冷至室温, 接种, 25℃培养 48h, 将培养基取出, 60℃干燥, 挥干水分, 中止代谢, 测定酶活力见表 1。

表 1 培养基加水量对产酶的影响

Table 1 Effects of producing enzyme on additive water in substrate

加水量(倍)	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
酶活(U/g)	88.62	99.41	121.25	143.50	163.38	151.75

从表 1 可知, 培养基加水量为 1.4 倍时, 产酶效果最好, 水分过少, 不能满足菌丝生长的需要, 水分过多, 会导致培养基中氧气缺乏, 抑制菌丝生长。加水量为 1.4 倍时, 既能满足水分的需求, 又能保证氧气的供应, 使菌丝生长较好。

(2) 培养基碳源与氮源的比值对产酶的影响

分取麦麸(碳源)与大豆浓缩蛋白(氮源)质量比为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5 混合均匀后, 加入 1.4 倍量水, 搅拌均匀后, 分装于锥形瓶中, 加塞, 灭菌, 放冷至室温, 接种, 25℃培养 48h 后, 将培养基取出, 60℃干燥, 挥干水分, 中止代谢, 测定酶活力, 见表 2。

表 2 培养基碳源与氮源的比值对产酶的影响

Table 2 Effects of producing enzyme on ratio of carbonaceous and nitrogenous in substrate

C:N 比	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
酶活(U/g)	95.93	102.92	108.10	117.26	121.13

从表 2 可知, 随着 C:N 比值的减小, β -葡萄糖苷酶酶活力增大, C:N 比为 5:5 时, 产酶效果最好, 但由于大豆浓缩蛋白的增加, 培养基持水性好, 致使培养基成球形大颗粒团状物, 氧气供应不足, 易使菌丝生长不均匀, 选择 C:N 比为 6:4 为最佳配比。

(3) 培养基诱导物添加量对产酶的影响

取麦麸与大豆浓缩蛋白质量比为 6:4, 分别添加 0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 的大豆异黄酮粉作为诱导剂, 诱导 β -葡萄糖苷酶系产生, 混合均匀, 加 1.4 倍量水, 搅拌均匀, 分装于锥形瓶中, 加塞, 灭菌, 待放冷后

表3 诱导物添加量对产酶的影响

Table 3 Effects of producing enzyme on revulsant's additive quantity

诱导物添加量(%)	0.1	0.2	0.3	0.4
酶活(U/g)	37.29	38.98	39.51	42.53

接种, 25℃培养48h后, 将培养基取出, 60℃干燥, 挥干水分, 中止代谢, 测定酶活力, 见表3。

从表3可知, 随着诱导物添加量的增加, β -葡萄糖苷酶的酶活力增大, 但诱导物的添加抑制了菌丝生长, 同样培养48h, 酶活下降约60%, 因此, 最佳实验产酶培养基为C:N比为6:4, 加水量1.4倍, 不添加诱导物, 下面实验均用最佳培养基配比产 β -葡萄糖苷酶系。

2.2 β -葡萄糖苷酶系粗酶提取

取最佳配比实验产酶发酵培养基、加塞、灭菌后放冷至室温接种、25℃培养48h, 培养基布满白色菌丝而未产生分生孢子时, 将培养基取出, 60℃干燥、粉碎、取一定量培养基干粉, 加10倍量水, 40℃水浴浸提3h, 3000r/min, 5min离心, 上清液即为粗酶液。

2.3 β -葡萄糖苷酶系粗酶精制

目前, 酶液精制的方法有饱和硫酸铵沉淀法, 凝胶色谱分离法, Seavage法以及透析法等, 饱和硫酸铵沉淀法精制的酶, 酶液中有少量盐残留, 不利于液相色谱检测; 凝胶色谱分离法分离速度较慢, 耗时较长; Seavage法有溶剂残留, 而用透析法透析酶液可去除小分子糖类等杂质, 使酶液纯度提高, 见表4。

表4 粗酶精制方法对照

Table 4 Method of refined contrast on thick enzyme

使用方法	未透析	透析
酶活(U/g)	125.88	447.84

从表4可知, 粗酶液经过透析袋透析后, 酶活显著提高, 实验选用透析法对 β -葡萄糖苷酶系粗酶精制。

2.4 酶水解大豆异黄酮粉条件优化

2.4.1 酶水解底物、大豆异黄酮粉含量

结果见表5。

表5 大豆异黄酮粉含量分布

Table 5 Soybean isoflavone powder content distributing

组分名称	大豆苷	大豆黄苷	染料木苷	大豆苷元	染料木素	大豆异黄酮总量	异黄酮苷元占总异黄酮的量
含量(%)	6.99	1.37	9.23	0.56	1.37	19.52	9.89

2.4.2 单因素试验

2.4.2.1 温度对水解的影响

精密称取大豆异黄酮粉, 加精制酶液稀释成5mg/ml, 分别在30、40、50、60、70、80℃条件下, 磁力加

热搅拌方式水解2h, 水解结束后, 取出煮沸10min灭酶活后, 置于60℃干燥、粉碎、研细、测定大豆异黄酮苷元的含量, 计算苷元转化率(表6)。

表6 温度对水解的影响

Table 6 Effects of hydrolyzation on temperature

温度(℃)	30	40	50	60	70	80
苷元转化率(%)	70.45	76.65	63.42	58.59	52.62	36.39

从表6可知, 40℃时酶水解效果最好, 温度越高, 水解效果越差, 说明温度高于40℃时, β -葡萄糖苷酶活性开始丧失, 到80℃时, 酶活力已降至40℃时的一半。

2.4.2.2 底物浓度对水解的影响

精密称取大豆异黄酮粉加精制酶液稀释成5、10、15、20、25、30mg/ml的溶液, 40℃时磁力加热搅拌方式水解2h, 水解结束后, 取出煮沸10min灭酶活后, 然后60℃干燥, 粉碎, 研细, 测大豆异黄酮含量, 计算苷元转化率。

表7 底物浓度对水解的影响

Table 7 Effects of hydrolyzation on bottom thickness

底物浓度(mg/ml)	5	10	15	20	25	30
苷元转化率(%)	66.43	68.46	67.06	60.45	57.71	56.43

从表7可知, 底物浓度为10mg/ml时, 水解效果最好, 底物浓度过高, 抑制酶反应的发生, 影响水解效果。

2.4.2.3 水解时间对水解的影响

精密称取大豆异黄酮粉加精制酶液制成10mg/ml的溶液, 在40℃条件下磁力加热搅拌方式水解2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5h, 水解结束后, 取出煮沸10min灭酶活后60℃干燥、粉碎、研细、测定大豆异黄酮苷元含量, 计算苷元转化率。

表8 水解时间对水解的影响

Table 8 Effects of hydrolyzation on hydrolyzed time

时间(h)	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
苷元转化率(%)	69.56	70.58	71.24	71.82	65.84	64.65

从表8可知, 水解3.5h时效果最好, 水解时间过长不仅浪费能源且增长工艺路线, 延长生产周期, 对工业化生产不利。

2.4.2.4 酶液稀释倍数对水解的影响

精密称取大豆异黄酮粉用精制酶液与水比为1:0.5、1:1、1:1.5、1:2的溶液溶解, 制成10mg/ml的溶液, 在40℃条件下用磁力加热搅拌方式水解3.5h, 水解结束后, 取出煮沸10min灭酶活后, 60℃干燥、粉碎、研细、测定大豆异黄酮苷元的含量, 计算苷元转化率。

表9 酶液稀释倍数对水解的影响

Table 9 Effects of hydrolyzation on diluted multiple of enzyme liquid

酶液稀释倍数比	1:0.5	1:1	1:1.5	1:2
苷元转化率(%)	64.43	66.49	64.72	63.26

从表9可知,酶液稀释一倍时,水解效果最好。酶液稀释比的不同,苷元转化率的变化幅度小,说明酶液稀释度对水解效果的影响不大,在生产时无需重点考虑。

2.4.3 正交试验

通过对单因素试验的考察可见,温度、底物浓度、时间及酶液稀释倍数均对实验结果产生了影响,通过 $L_9(3^4)$ 试验,考察各因素的相互影响,并确定最佳试验方案(表10、11)。

表10 因素水平表
Table 10 Factors and levels of test

水平	因素			
	温度(℃)	底物浓度(mg/ml)	时间(h)	酶液:水
1	30	5	2.5	1:0.5
2	40	10	3.0	1:1
3	50	15	3.5	1:1.5

表11 正交试验结果表
Table 11 Results of orthogonal test

试验号	因素				苷元转化率(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	91.28
2	1	2	2	2	90.36
3	1	3	3	3	93.06
4	2	1	2	3	94.63
5	2	2	3	1	93.51
6	2	3	1	2	95.72
7	3	1	3	2	96.38
8	3	2	1	3	97.81
9	3	3	2	1	96.40
I	274.70	282.29	284.81	281.19	
II	283.86	281.68	281.39	282.46	
III	290.59	285.18	282.95	285.50	
I _j	91.57	94.10	94.94	93.73	
II _j	94.62	93.89	93.80	94.15	
III _j	96.86	95.06	94.32	95.17	
R _j	5.29	1.17	1.14	1.44	

从表11可知, $\overline{\text{III}}_jA > \overline{\text{II}}_jA > \overline{\text{I}}_jA$, 表明因素A时取 A_3 平均苷元转化率最高; $\overline{\text{III}}_jB > \overline{\text{I}}_jB > \overline{\text{II}}_jB$, 表明因素B取 B_3 时, 平均苷元转化率最高; $\overline{\text{I}}_jC > \overline{\text{III}}_jC > \overline{\text{II}}_jC$ 表明因素C取 C_1 时平均苷元转化率最高, $\overline{\text{III}}_jD > \overline{\text{II}}_jD > \overline{\text{I}}_jD$, 表明因素D取 D_3 时平均苷元转化率最高, 综合以上最佳工艺条件为 $A_3B_3C_1D_3$ 。异黄酮粉的HPLC

图谱见图1, 酶水解大豆异黄酮粉的HPLC图谱见图2。

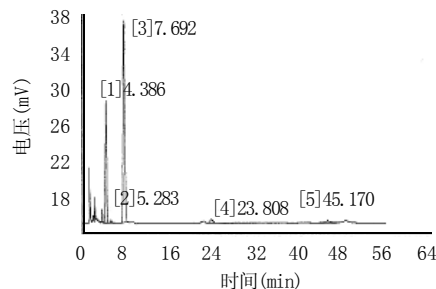


图1 水解前 HPLC 图谱

Fig.1 Soybean isoflavone powder before Hydrolyzation HPLC picture

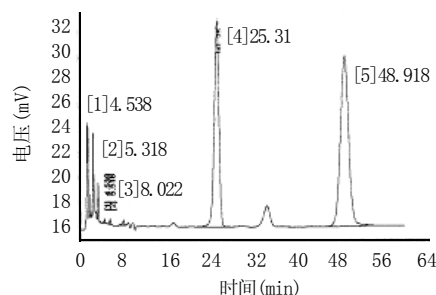


图2 水解后 HPLC 图谱

Fig.2 Soybean isoflavone powder after Hydrolyzation HPLC picture

3 结论

本实验通过单因素试验及正交试验优选出黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶系的最佳产酶的发酵培养基及水解大豆异黄酮苷的最佳工艺条件, 从实验中可以看出水解温度是影响苷元转化率的主要因素, 水解时间对苷元转化率影响最小, 综合生产角度考虑选择C:N比为6:4、加水量1.4倍, 培养基中不添加诱导物; 水解大豆异黄酮粉的最佳条件为水解温度为50℃、底物浓度为15mg/ml、水解时间为2.5h, 酶液稀释倍数为1:1, 实验所得到的大豆异黄酮苷元占总异黄酮含量的90.22%, 与水解前相比异黄酮苷元含量提高了10倍左右, 通过实验证明用微生物发酵法水解大豆异黄酮粉是可行的。

参考文献:

- [1] KUDOU S, SHIMOYAMADA M, IMURA T, A new isoflavone glycoside in soybean: Seeds (Glycine max Merriu), glycitein, T-O- β -D-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside[J]. J Agric Biol Chem, 1991, 55:859-860.
- [2] GYORGY P, MURATA K, IKEHATA H. Antioxidants isolated from fermented soybeans. (tempeh) [J]. Nature, 1964, 203: 870-872.
- [3] 井乐刚, 张永忠. 微生物发酵制备大豆异黄酮的研究进展[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 86-88.
- [4] 孙艳梅, 张永忠. 水解制备大豆异黄酮苷元研究进展[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(3): 11-13.
- [5] 吴定, 袁建, 周建新, 等. 固态发酵豆粕生产大豆异黄酮研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(2): 72-78.