

两步法制备大豆异黄酮操作单元研究

吴定¹, 刘常金², 高瑀琰¹, 周建新¹, 姚明兰¹, 迟媛¹, 高霞¹

(1.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省粮油食品深加工和品质控制重点实验室,

江苏南京 210003; 2.天津科技大学食品工程学院, 天津 300022)

摘要: 麸皮、玉米粉等成分, 按 1:1 加矿泉水, 灭菌后接种 3% 菌种, 30℃ 发酵 5d, 用缓冲液提取 β -葡萄糖糖苷酶。常用氮源和 2.5% 乳酸对菌种产酶无影响。纯化的 β -葡萄糖糖苷酶最适 pH 为 4.4~4.8, 最适催化温度 60℃, 最适催化时间 30min。用含 2% CaCO_3 的 60% 乙醇在 50℃ 提取豆粕中苷类物质, 用石油醚、氯仿去除杂后, 再用正丁醇精提豆粕中苷类。用特制硅胶柱分离正丁醇液, 用丙酮等洗脱获高纯度大豆异黄酮糖苷。用 β -葡萄糖糖苷酶水解异黄酮糖苷, 经超滤、固定化细胞等处理, 制备高纯度大豆异黄酮甙元。

关键词: 大豆异黄酮甙元; 两步制备法; 操作单元

Study on Combined Operations of Soybean Isoflavones with Two Steps Method

WU Ding¹, LIU Chang-jin², GAO Yu-long¹, ZHOU Jiang-xin¹, YAO Ming-lan¹, CHI Yuan¹, GAO Xia¹

(1.School of Food Science and Engineering, Nanjing University of Financial and Economical, Jiangsu Province

Key Laboratory of Quality Control and Deep-Utilization of Grain and Oils, Nanjing 210003, China;

2.School of Food Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300022, China)

Abstract: Wheat bran, maize flour and water(1:1)were mixed into the solid medium, and then sterilized (121℃,30min). The solid medium was inoculated in 3% WD201 strain, fermented at 30℃ for 5days, while β -glucosidase in the fermented medium was extracted with buffer liquid. The common nitrogen elements and 2.5% lactate had no effect on metabolism of WD201 strain which secreted β -glucosidase. The purified β -glucosidase showed the optimum catalysis conditions were: 30℃ and pH4.4~4.8 for 30min. The soybean isoflavone glucoside in soybean bran was extracted with 60% alcohol contained 2% CaCO_3 at 50℃, then the interferential constituents were extracted with petroleum ether and chloroform, and the isoflavone glucoside in water phase were extracted with butanol. The isoflavone glucoside in butanol in special silica gel column were eluted again with acetone. The isoflavone glucoside was hydrolyzed into pure isoflavones with β -glucosidase at the optimum enzyme conditions, and protein and glucose were extracted through superfilter and processed by immobilized cell fermentation.

Key words: soybean isoflavones; two steps operation; operation unit

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0132-03

大豆异黄酮是大豆中具有生物学活性保健功能因子, 在大豆及豆粕中, 主要以大豆异黄酮糖苷形式存在^[1]。经实验证实, 脱去糖基的大豆异黄酮才能发挥抗癌、抗氧化等相应生物学功能^[2]。通过实验表明, 豆粕经产 β -葡萄糖糖苷酶的菌种固态发酵, 能脱去异黄酮糖苷中的糖基, 但菌种最适宜生长温度与 β -葡萄糖糖苷酶最适宜水解温度存在差异^[3]。基于这些特征, 我们分别优化菌种固态发酵生产 β -葡萄糖糖苷酶工艺和酶水解大豆异黄酮糖苷工艺, 开展两步法生产大豆异黄酮甙元操作单元课题研究。

1 材料与仪器

1.1 材料

豆粕 南京市农贸市场; 产 β -葡萄糖糖苷酶菌种(WD201) 南京财经大学食品科学与工程学院微生物室分离、鉴定; 0.5% 水杨苷; 3, 5-二硝基水杨酸(DNS)试剂(6.3g DNS、262ml 2mol/L NaOH、含 182g 酒石酸钾钠热水、5g 苯酚、5g 亚硫酸钠); 1000 $\mu\text{g/ml}$ 葡萄糖标准液; 特型硅胶; 固定化细胞 自制。

1.1.1 仪器

收稿日期: 2004-12-02

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金课题(KJS03012); 江苏省重点实验室课题(03KJD550002)

作者简介: 吴定(1962-), 男, 教授, 硕士, 主要从事食品生物工程教学与研究工作。

722 型分光光度计 上海第三分析厂; UV-2401PC 型紫外可见分光光度计(Shimadzu); 超滤系统 Labscale TFF 美国。

1.1.2 母种培养制备

黄豆芽 100g, 加水 1000ml, 煮沸 30min, 纱布过滤, 滤液加一定量麸皮, 分装三角瓶, 121℃灭菌 30min, 冷却后接种培养, 制备发酵用母种。

1.2 方法

1.2.1 β-葡糖糖苷酶发酵生产

麸皮、玉米粉等组成固态培养基经 121℃灭菌 30min 后, 冷却, 接种生产母种, 于 30℃培养 5~6d。用 pH4.6 缓冲液振荡提取, 经离心后获取 β-葡糖糖苷酶。

1.2.2 β-葡糖糖苷酶活性测定

1.2.2.1 葡萄糖标准曲线制备

取 50~500μg 葡萄糖, 分别加 0.50ml DNS 液, 混匀后沸水浴加热 5min, 取出冷却, 每管加水至 5ml, 于 540nm 波长测定吸光值。以葡萄糖浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.2.2 β-葡糖糖苷酶活性测定方法

取一定量菌种发酵提取液, 加 0.50ml 0.5% 水杨苷, 于 60℃加热 30min, 加 1.0ml DNS 液, 沸水浴 5min, 冷却水终止反应, 540nm 波长测定吸光值。酶活单位(U): 每分钟每毫升酶液产生 1μg 葡萄糖。

1.2.3 豆粕中大豆异黄酮糖苷提取

豆粕粉碎, 用溶剂热浸提, 蒸发浓缩, 总提取膏状物先用适量热水搅匀, 再加一定量石油醚振荡, 获取水层加适量氯仿, 振荡后水层用正丁醇提取, 收集正丁醇提取液。将正丁醇提取液过特型硅胶柱, 用抽提试剂洗脱, 收集洗脱液真空干燥得大豆异黄酮糖苷。

1.2.4 酶解生产异黄酮甙元

将大豆异黄酮糖苷溶解到醇水液中, 加入一定量 β-葡糖糖苷酶于一定温度保温一定时间, 经超滤、固定化细胞处理, 浓缩蒸干获高纯度大豆异黄酮甙元。

2 结果与讨论

2.1 培养基中水份对菌种产酶影响

一定量的麸皮、玉米粉中分别加入 75%、100% 和 125% 矿泉水水, 混匀后分别装入三角瓶, 121℃灭菌 30min, 冷却后接种培养。实验结果表明, 按 100% 加矿泉水制备固体培养基产酶活性最高(表 1)。

表 1 培养基中水份对菌种产酶影响

Table 1 Effect of water in fermentation media on enzyme yield

	加水量(%)		
	75	100	125
酶活(U)	332.0 ± 2.7	426.6 ± 3.1	266.7 ± 2.9

2.2 碳源对菌种产酶影响

按 1:1 加水的固体培养基中, 分别加入可溶性淀粉、玉米粉、葡萄糖。实验结果表明, 一定量的可溶性淀粉、玉米粉均可增加诱导 β-葡糖糖苷酶的产酶活性, 但玉米粉效果优于可溶性淀粉, 而葡萄糖则抑制菌种产生 β-葡糖糖苷酶(表 2)。根据实验结果, 说明菌种 WD201 分泌 β-葡糖糖苷酶是诱导酶, 在菌种发酵基质中有葡萄糖存在情况下, 菌种优先表达葡萄糖组成酶基因, 利用葡萄糖作为糖原, 同时葡萄糖及分解代谢产物抑制产 β-葡糖糖苷酶基因表达。而且实验证实, 麸皮是本菌种产 β-葡糖糖苷酶较好诱导剂。

表 2 碳源对菌种产酶影响

Table 2 Effect of different carbon source on enzyme yield

	对照	可溶性淀粉(%)		玉米粉(%)		葡萄糖(%)	
		0.5	1	0.5	1	0.5	1
酶活(U)	413.3	480	336.7	560	433.3	167.7	89.6

2.3 不同氮源对产酶影响

发酵固体培养基中分别加入硫酸氨、氯化氨、豆粉、蛋白胨、尿素。实验结果表明, 在所实验的氮源浓度范围内, 氮源对菌种分泌 β-葡糖糖苷酶影响较小(表 3)。实验说明, 用于产酶的麸皮、玉米粉等组成的固体发酵培养基中的氮源已经能够满足菌种生长、代谢要求。

2.4 不同乳酸用量对产酶影响

发酵培养基中分别加入 0~25% 乳酸。实验结果表明, 2.5% 乳酸不影响菌种分泌 β-葡糖糖苷酶, 但当乳酸使用量大于 5% 后, 乳酸能明显降低菌种分泌 β-葡糖糖苷酶(表 4)。在实际粗放固态发酵生产酶过程中, 加入 2% 的乳酸即不影响菌种分泌 β-葡糖糖苷酶, 又能够抑制杂菌的生长。

表 4 不同乳酸用量对产酶影响

Table 4 Effect of different lactic acid concentration on enzyme yield

	乳酸(%)				
	0	2.5	5.0	12.5	25
酶活(U)	568.4	570.1	378.4	212.1	169.6

表 3 不同氮源对产酶影响

Table 3 Effect of different nitrogen source on enzyme yield

	对照	硫酸氨(%)		氯化氨(%)		豆粉(%)		蛋白胨(%)		尿素(%)	
		0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1
酶活(U)	421.7	424.2	419.5	422	418.9	417.6	419.5	420	417.3	416	418

2.5 不同接种量对产酶影响

发酵培养基中, 分别按 1%~8% 接种。结果表明, 3% 接种量产酶活性最高(表 5)。接种量少, 菌种生产相对较慢, 而接种量过大, 相对营养不足, 最终都影响菌种分泌 β -葡萄糖苷酶。

表 5 不同接种量对产酶影响

Table 5 Effect of different content of inoculation on enzyme yield

	接种量(%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
酶活(U)	308.9	416.3	578.2	514.5	478.1	429.5	410	398.1

2.6 培养温度对产酶影响

分别在 25、30、35℃ 培养。结果表明, 30℃ 培养菌种产酶效果最好, 高于或低于 30℃, 对菌种分泌酶都有明显下降的影响(表 6)。35℃ 菌丝生长很快, 但易衰老, 影响菌种分泌 β -葡萄糖苷酶。因此, 在实际生产过程中, 接种后的培养基可在稍高于 30℃ 条件下培养 2d, 然后再降温至 30℃ 培养, 有利于菌种分泌酶。

表 6 培养温度对产酶影响

Table 6 Effect of different temperature of fermentation on enzyme yield

	培养温度(℃)		
	25	30	35
酶活(U)	416.5	579.1	279.4

2.7 培养时间对产酶影响

分别培养 2~6d。实验结果表明, 随着培养时间的延长, 培养基中酶活性逐渐升高, 培养至 5d 时, 菌种分泌 β -葡萄糖苷酶的活性达到较高水平, 继续培养酶活性几乎不再增加(表 7)。因为当培养基中生物量达到一定水准时, 有限的培养基营养不能连续促进菌种进行无限量代谢。

表 7 培养时间对产酶影响

Table 7 Effect of different inoculation time on enzyme yield

	时间(d)					
	2	3	4	5	6	7
酶活(U)	276.3	398.4	466.5	568.7	572.3	571.1

2.8 纯化 β -葡萄糖苷酶催化性质

菌种在固体培养基发酵后, 用缓冲液提取的 β -葡

萄糖苷酶, 经过饱和硫酸铵纯化、透析的处理, 获得纯化 β -葡萄糖苷酶。经实验显示, 该酶最适宜作用的 pH 为 4.4~4.8, 最适宜催化作用温度为 60℃, 最适酶催化反应时间为 30min。

2.9 豆粕中大豆异黄酮糖苷提取

鉴于大豆异黄酮糖苷是极性较大的成分, 且基本是非结晶性物质。因此, 豆粕经粉碎后, 用 40%~80% 乙醇提取, 结果表明 60% 乙醇在 50℃ 抽提效果较好。为了避免提取过程中苷的水解, 可加入 2% 碳酸钙, 有利于异黄酮糖苷稳定。

从市场购买的豆粕是油厂生产副产物, 但仍有少量油脂残余, 影响后期抽提效果, 所以在操作过程中, 将乙醇水提取物浓缩后, 用一定量石油醚振荡 3 次, 同时也除去了提取物中非极性成分。为了减少脂溶性成分对后期柱处理的影响, 经石油醚处理后的水溶液, 进一步用氯仿振荡 3 次, 收集水层提取液, 加正丁醇振荡 3 次, 合并含苷类正丁醇液。经过此处理还可以清除糖、蛋白质、多肽等杂质影响。

硅胶是常用来分离苷类色谱材料, 但普通硅胶对苷类分离效果差, 于是我们采用特制硅胶制成色谱分离柱, 将正丁醇提取液过柱。由于正丁醇提取液中主要含有异黄酮糖苷和大豆皂苷, 但鉴于大豆皂苷不溶于丙酮, 故用丙酮等混合提取系统洗脱, 经真空干燥处理获得高纯度大豆异黄酮糖苷粉末。

2.10 酶解生产大豆异黄酮甙元

将大豆异黄酮糖苷溶于缓冲液配置的 60% 乙醇中, 加入 β -葡萄糖苷酶于 60℃ 保温 1h, 通过酶水解脱去大豆异黄酮糖苷中葡萄糖, 获得含有酶蛋白、葡萄糖和大豆异黄酮甙元溶液。

混合液经过超滤处理, 可有效除去酶蛋白, 然后将脱蛋白混合液经固定化细胞床发酵, 可去除其中的葡萄糖, 最终获取高纯度大豆异黄酮甙元。

参考文献:

- [1] 吴定, 江汉湖. 竞争 ELISA 法测定丹贝活性成分大豆甙元 [D]. 南京农业大学图书馆, 1995.
- [2] 吴定, 江汉湖. 发酵大豆制品中异黄酮形成及其功能 [J]. 中国调味品, 2001, (6): 3-6.
- [3] 吴定, 袁建. 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): 72-74.

欢迎订阅 2006 年《食品科学》杂志