

酶法改变大豆皂甙糖基的研究

田 晶 大连理工大学化工学院 大连 116000

苏志国 中科院化工冶金研究所生物工程国家重点实验室 北京 100080

徐龙权 鱼红闪 金凤鸢 大连轻工业学院食品科学与生物工程系 大连 116001

摘 要 研究了用酶水解大豆皂甙分子上的部分糖基,使皂甙部分水解生成低糖、高活性皂甙的方法。探讨了八种霉菌菌株对七种糖苷键及对皂甙糖基的水解能力,得到三种具有较高活性的菌株,用于水解大豆皂甙。它们分别是 *A. niger* 848s, *A. oryzae* 慢 s, *A. oryzae* 39s。并通过 TLC 和 HPLC 分析得到大豆皂甙酶解最佳反应条件为 pH = 5, 温度 40℃, 时间 12h。

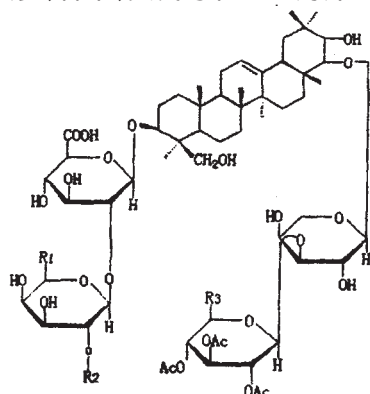
关键词 大豆皂甙 皂甙酶解 低糖大豆皂甙

Abstract The enzymatic hydrolysis of soybean saponin sugar – moiety to produce a new soybean saponin containing low sugar and high activity was studied. To choose good strains, the hydrolysis of seven different glucosides and soybean saponin by enzymes obtained from eight different *Aspergillus* genus strains was examined. The results were three strains such as *A. niger* 848s, *A. oryzae* slows and *A. oryzae* 39s to produce good enzymes to hydrolyze saponin. The optimal reaction conditions of the enzyme hydrolysis of soybean saponin were: pH5 at 40°C for 12 hours in the analysis of the TLC and HPLC . However the chemical structure and physiological activity of new saponin needed further investigation.

Key words Soybean saponin Saponin hydrolysis by enzyme Lower sugar soybean saponin

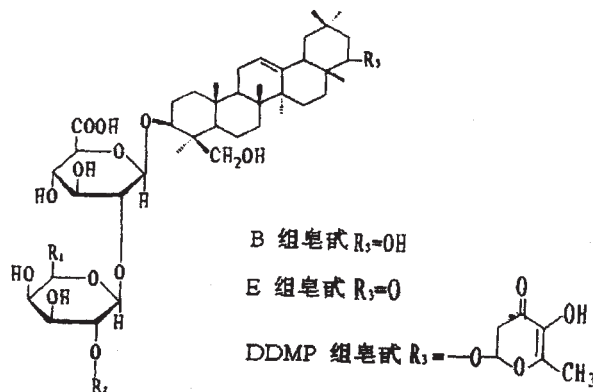
皂甙又名皂苷，是甾族或三萜系化合物的低聚配糖体的总称，因其水溶液能形成持久泡沫，像肥皂一样而得名。在自然界中分布很广，目前人们已经在 100 多种植物如人参、甘草、黄芪等和一些海洋生物如海参中

发现了皂甙。大豆皂甙属于三萜系结构,由非极性的三萜甙元和低聚糖链两部分组成。日本学者北川熏和大久保一良按照甙元的不同,把大豆皂甙分为 A 组、B 组、E 组和 DDMP 组^[1 2 3],结构如图 1、图 2 所示。



	大久保名 (北川名)	R ₁	R ₂	R ₃
大豆皂甙	Aa(A ₄)	CH ₂ OH	β-D-Glc	H
大豆皂甙	Ab(A ₁)	CH ₂ OH	β-D-Glc	CH ₂ OAc
大豆皂甙	Ac	CH ₂ OH	α-L-Rha	CH ₂ OAc
大豆皂甙	Ad	H	β-D-Glc	CH ₂ OAc
大豆皂甙	Ae(A ₅)	CH ₂ OH	H	H
大豆皂甙	Af(A ₂)	CH ₂ OH	H	CH ₂ OAc
大豆皂甙	Ag(A ₆)	H	H	H
大豆皂甙	Ah(A ₃)	H	H	CH ₂ OAc

图 1 A 组皂甙结构图



	B 组	E 组	DDMP 组	R ₁	R ₂
大豆皂甙	Ba	Bd	Ag	CH ₂ OH	β-D-Glc
大豆皂甙	Bb	Be	Bg	CH ₂ OH	α-L-Rha
大豆皂甙	Bc		Ba	H	α-L-Rha
大豆皂甙	Bb'		Γg	CH ₂ OH	H
大豆皂甙	Bc'		γa	H	H

图 2 B 组、E 组和 DDMP 组皂甙的结构图

许多研究表明大豆皂甙具有多种生理活性和良好的药理作用,如抗癌、调节免疫功能、防治心血管疾病、降血压、抗菌、抗病毒、抗过敏、护肝、降低血清中胆固醇含量,以及抗血栓等作用。除了用作药物外,皂甙还在化妆品和食品工业中具有广泛的应用,以及作为表面活性剂应用于化学工业^[4~7]。近年来,人们对皂甙生理活性和药用价值研究的同时,注意到皂甙中的糖链与其生物活性之间有着密切的联系,许多事实已证实糖链在皂甙的生物活性方面起着重要作用^[8]。人参皂甙研究表明,二元醇皂甙中带有五个糖分子的皂甙 Ra_1 , Ra_2 , Ra_3 等活性很低,带四个糖分子的皂甙 Rh_2 等具有很强的抗癌活性,也就是说皂甙糖分子数越少,其活性越高。同样,大豆皂甙每分子皂甙所带的糖分子数越少,其豆腥味越弱,其生理活性越高。有人曾利用水解去除大豆皂甙的糖基,发现不仅去除了豆制品的豆腥味,还产生抗氧化、抗血脂等特殊功效。但有关其糖链的研究报道极少。因此,我们设想通过大豆皂甙结构的改变—去除大豆皂甙中的部分糖基,使皂甙水解成低糖的无豆腥味的高活性皂甙,来实现提高其生物活性的目的。希望改变了结构的大豆皂甙也能象其它的三萜类皂甙一样,具有比原来活性高出几倍甚至更高的生理功能,以用作药物或一些添加剂;同时,找到合适的霉菌使之在大豆制品发酵过程中能够将皂甙部分水解成低糖的高活性皂甙,提高大豆发酵食品的生理功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料及设备

实验药品及试剂:米曲霉(*Aspergillus oryzae*):快s,慢s,39s,42s,00s;黑曲霉(*Aspergillus niger*):48s,848s,92s,由大连轻工业学院菌种保藏所提供;对硝基苯酚基- β -D-葡萄糖苷,对硝基苯酚基- α -D-半乳糖苷,对硝基苯酚基- β -D-木糖苷,对硝基苯酚基- α -L-阿拉伯糖苷,对硝基苯酚基- β -D-葡萄糖醛酸,对硝基苯酚基- β -D-半乳糖苷和对硝基苯酚基- α -L-鼠李糖苷等七种糖苷均为Sigma公司产品;豆粕、麦麸:大连调味食品厂提供;乙腈、正丁醇为色谱纯,其余均为分析纯。

实验设备:GL-20B 高速冷冻离心机:上海安亭科学仪器厂;HH-11、500-S 电热恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂;UV-240 型紫外可见分光光度计:日本岛津;薄层层析板 SILICA GEL60-F254:德国MERCK公司;510 型高效液相色谱仪,日本 Waters 公

司;色谱柱:Nova-Pak C-18,大连依利特科学仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的斜面培养

麦芽汁培养基:取麦芽汁(5°),2%琼脂适量放入500ml锥形瓶中加热至溶,分别倒入10ml试管约1/4处,塞上棉塞,灭菌后以15~25度角斜放,制成斜面培养基。

察氏培养基:取蔗糖15g,NaNO₃1.5g,MsSO₄·7H₂O0.25g,KCl0.25g,FeSO₄·4·H₂O0.005g,K₂HPO₄0.5g,琼脂6.5g,蒸馏水500ml放入500ml锥形瓶中加热至溶,同上方法制成斜面培养基。

接菌:用察氏培养基培养黑曲霉三种:A.niger92,A.niger848,A.nigerUV-48;用麦芽汁培养基培养米曲霉五种:A.oryzae3800,A.oryzae沪酿3042,A.oryzae快,A.oryzae慢,A.oryzaeNo.39。

培养:接完菌后的试管放入30℃培养箱中培养,待培养基上孢子大量生成,可以进行菌种的扩培。

1.2.2 菌种的扩培

称取豆粕(20目搅碎)5g,麦麸15g,加入20ml自来水,搅拌均匀,使培养基全部润湿且松散,无结块。在1.2kgf/cm²的压力下杀菌15~20min。待冷却后,接菌,接菌后,于30℃下用250ml三角瓶培养两三天,中间每隔12h摇晃一次,使其保持疏松,有利于菌种均匀生长。

1.2.3 酶液的提取

菌体孢子大量长出时,向其中加入100ml0.02mol/L适当pH值HAc-NaAc缓冲液,浸泡1~2h时用纱布过滤,于9000r/min的转速下离心15min,除去其中部分杂质,即得到粗酶液,体积约80ml。再向其中加入无水乙醇175ml,使其浓度为70%~75%,于冰箱中放置过夜,进行盐析。然后离心,将沉淀用上述缓冲溶液1ml洗下,置于透析袋中用醋酸缓冲液透析1d(其间,每天换水4~5次)。之后,再离心,得到的上清液即为酶液。

1.2.4 酶活的测定

测酶活时所用七种糖苷分别是:对硝基苯酚基- β -葡萄糖苷、对硝基苯酚基- β -半乳糖苷、对硝基苯酚基- β -木糖苷、对硝基苯酚基- α -阿拉伯糖苷、对硝基苯酚基- β -葡萄糖醛酸苷、对硝基苯酚基- β -半乳糖苷、对硝基苯酚基- α -鼠李糖苷。分别取0.4ml糖苷于小离心管中,于40℃下预热5min,再加入0.1ml酶液,在40℃下反应20~30min,然后再加入

表 1 不同菌株的酶活力

菌株		92s	848s	48s	00s	42s	快 s	39s	慢 s
酶活力值 (U/ml)	α-阿拉伯糖苷酶	121.56	138.38	150.49	81.04	67.24	41.09	68.25	41.62
	α-半乳糖苷酶	150.49	150.49	150.49	144.46	144.46	119.15	141.40	138.38
	β-木糖苷酶	126.27	109.41	126.27	119.95	102.05	82.42	73.44	110.26
	β-葡萄糖醛酸苷酶	138.38	138.38	141.40	7.02	1.34	0.98	6.73	1.78
	α-鼠李糖苷酶	150.49	93.52	150.49	124.30	63.62	0	101.00	108.20
	β-半乳糖苷糖	90.50	83.14	89.78	78.15	76.74	38.36	82.78	84.30
	β-葡萄糖苷酶	116.49	105.63	112.10	100.24	97.06	94.92	100.00	100.00

2. 5ml 1mol/LNa₂CO₃ 终止反应 ,在 405nm 下测其吸光度值。以水作为空白 ,加入 0.4ml 底物 ,其余操作同上。

1. 2. 5 大豆皂甙的酶解

取 0.2g 大豆皂甙用醋酸缓冲液配成 2mg/ml 溶液 ,分别取 0.5ml 上述溶液到具塞小离心管中 ,加入 0.5ml 各酶液 ,充分混匀后盖上塞子 ,置于 40℃ 的恒温箱里进行酶解反应。每隔 3h ,取 0.1ml 反应液于小离心管中 ,加入 0.2mL 正丁醇 ,充分摇晃后放置过夜 ,所得上清液即可用作 HPLC 和 TLC 分析。

1. 2. 6 薄层层析(TLC)分析方法

采用硅胶层析板 ,展开剂为 :氯仿: 甲醇: 水 = 65: 35: 10 ,层析板在 110℃ 下活化后时行薄层层析分析 ,用 10% 硫酸溶液 在 110℃ 下加热显色。

1. 2. 7 高效液相色谱(HPLC)分析方法

采用紫外检测器 ,使用波长为 205nm ,流动相为乙睛: 正丁醇: 水: 冰醋酸 = 161: 5: 21: 317: 0.5 ;流速 1.4ml/min 进样量 6μl。

2 结果与讨论

2. 1 水解皂甙酶高产菌株的选择

本实验采用八种霉菌菌株 ,对七种不同糖苷键的水解能力进行测定 ,以比较不同菌株酶活力大小。酶活力值列于表 1。

由表 1 可见 :这八种菌株均对 α-半乳糖苷水解酶活力较高 ,其次是 β-木糖苷、β-葡萄糖苷。对 α-阿拉伯糖苷、β-葡萄糖醛酸苷、α-鼠李糖苷、β-半乳糖水解能力则不一致。然后 ,用上述八种酶液对大豆皂甙进行酶解反应 ,利用薄层层析法 ,通过观察大豆皂甙元出现的时间和斑点大小来选择菌株 ,八种霉菌对大豆皂甙酶解情况的 TLC 结果见图 3。

由图 3 可以看出 ,本实验所选的八种霉菌中 ,除 92s 和 48s 只有一个甙元组分出现外 ,其余或多或少

都有两个甙元组分出现。其中 ,菌株 A. oryzae 39s, A. niger 848s, A. oryzae 慢 s 与大豆皂甙反应酶活较高 ,反应较为彻底 ,因此选这三种菌株作进一步研究。

2. 2 酶解反应时间和 pH 值的选择

通过对慢 s 和 848s、39s 在不同 pH 值、不同反应时间样品的 TLC 分析发现 :3h 时 ,甙元开始出现。在 6h 时 ,中间产物增加 ,甙元大量出现。12h 时 ,皂甙彻底水解 ,18h 时的结果与 12h 没有明显区别 ,由此确定酶解反应最佳时间为 12h ;而 pH 影响不大 ,但 pH = 5 时中间产物略多 ,因此 pH = 5 为最佳 pH 值 ,pH = 5 时三种菌株在不同时间下的酶解情况见图 4。

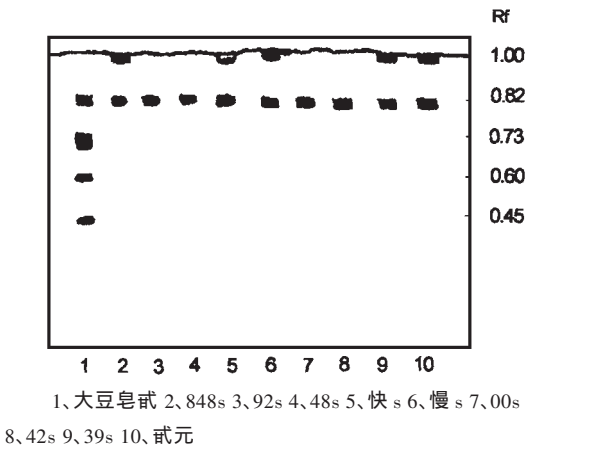


图 3 八种菌株对大豆皂甙酶解的 TLC 图

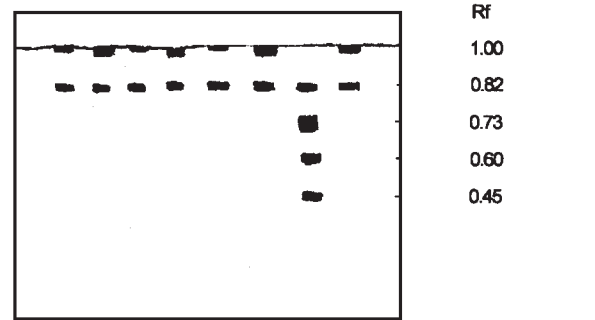


图 4 三种菌株在 pH = 5 ,不同酶解时间时对大豆皂甙酶解的 TLC 图

2. 3 皂甙酶解反应的 HPLC 分析结果

皂甙酶解反应的 HPLC 分析结果见表 2。

表 2 大豆皂甙酶解产物的 HPLC 结果

保留时间(min)		3. 470	3. 676	4. 136	4. 503	4. 963	5. 483	7. 316	7. 416	7. 990
峰面积百分比(%)	大豆皂甙	21. 6	18. 3	14. 3			30. 4		15. 4	
	甙元				28. 1	16. 8		22. 9		32. 2
	484s	3h	41. 1	2. 9	3. 3		48. 2			4. 5
		6h	43. 3	3. 0	3. 6		44. 9			5. 2
		12h	42. 5		3. 8		44. 8			8. 9
	39s	3h	41. 6	2. 1	3. 1		50. 0			3. 2
		6h	41. 2	2. 0	3. 2		49. 6			4. 0
		12h	38. 8		4. 3		52. 4			4. 5
	慢 s	3h	43. 4	2. 7	3. 2		47. 6			3. 1
		6h	44. 4	2. 1	3. 3		46. 6			3. 6
		12h	44. 4		3. 9		47. 0			4. 7

由表 2 可以得出 :原皂甙共有五个色谱峰 ,保留时间分别为 3. 470、3. 676、4. 136、5. 483、7. 416min ;纯甙元有四个色谱峰 ,保留时间分别为 4. 503、4. 963、7. 316、7. 990min。对于 39s 和 848s 来说 ,保留时间(Rt)为 3. 470、4. 136、5. 483min 的峰随时间增加 ,峰面积逐渐减小。其中 Rt 为 4. 136min 的峰 ,到 12h 已经消失 ,说明 12h 皂甙组分已被全部分解。其中 Rt 为 3. 676min 和 Rt 为 7. 416min 的峰在 3h ,6h 和 12h 均不存在 ,我们认为其在 3h 内已分解完全。另外 ,从 3h 开始 ,新增加两个峰 ,Rt 分别为 4. 503 和 7. 990min ,且这两个峰随时间增加 ,峰面积也增加 ,经和甙元色谱图对比 ,发现这两个峰均为甙元组分 ,这也证明了从 3h 开始 ,酶解反应就可以将皂甙分解 ,得到甙元。对于慢 s ,除 Rt 为 3. 470 和 5. 483min 的峰随时间增加而增加外 ,其它峰的变化情况与 39s 和 848s 相同 ,这与 TLC 结果是一致的。

3 结 论

3. 1 测定了八种霉菌对七种糖苷键的水解能力 ,这八种菌株均对 α - 半乳糖苷水解酶活力较高 ,其次是 β - 木糖甙、β - 葡萄糖苷 ,对 α - 阿拉伯糖甙、β - 葡萄糖醛酸苷、α - 鼠李糖苷、β - 半乳糖苷等水解能力则不一致。
3. 2 在八种霉菌中通过 TLC 分析 ,筛选出三种对皂甙糖苷水解活力强的菌株 ,分别为 A. niger 848s, A. oryzae 39s, A. oryzae 慢 s ,用这三种菌株在不同时间和不同 pH 值与皂甙反应 ,通过 TLC 和 HPLC 分析 ,确定酶解最佳时间为 12h ,最佳 pH 值为 5。
3. 3 A. niger 848s, A. oryzae 慢 s , A. oryzae 39s 菌株

所生成的酶对皂甙糖基水解 ,经 TLC 分析和 HPLC 分析证明 :上述三种酶液均能水解皂甙变成低糖皂甙产物及甙元 ,对于所得低糖皂甙分子结构及其生物活性有待于进一步研究。

参考文献

1 Shiraiwa M ,Kudou S, Shimoyamada M et al. Composition and Structure of "Group A Saponin" in Soybean Seed. Agric. Biol Chem, 1991, 55(2): 315 ~ 322.

2 Shiraiwa M, Harada K, Okubo K. Composition and structure of "Group B Saponin" in soybean seed. Agric. Biol. Chem, 1991, 55(4): 911 ~ 917.

3 Kitagawa I, Yoshikama, M, Wang H. K et al. Revised structure of soyasapogenols A, B and E, oleanene - sapogenol from soybean. Chem. Pharm. Bull, 1982, 30(6): 2294 ~ 2297.

4 Kitagawa I, Saito M, Taniyama T et al. Saponin and sapogenol. XXXIX. Structure of Soyasaponin A1, a Bidesmoside of Soyasapogenol A, from Soybean, THE Seeds of Glycine max Merrill. Chem. Pharm. Bull, 1985, 33(3): 1069 ~ 1076.

5 Kitagawa I, Wang H K, Taniyama T et al. Saponin and Sapogenol. XLI. Reinvestigation of the Structures of Soyasapogenols A, B, and E, Oleanene - Sapogenols from Soybean. Structures of Soyasaponins I, II and III. Chem. Pharm. Bull, 1988, 36(1): 153 ~ 161.

6 Burrows J. C, Price K. R. Fenwick G R. Soyasaponin IV, an Additional Monodesmosidic Saponin Isolated from Soyabean. Phytochemistry, 1987, 26(4): 1214 ~ 1215.

7 Matimoto Y. Shgyokhin no Busei (JNP). Tokyo: Japan ShyokhinShizai Institute Press, 1987, 1 ~ 6.

8 刘美正 郭忠武 惠永正 . 皂甙研究 - 糖链的作用 . 有机化学 ,1997 ,17 307 ~ 318.