

酶法水解大豆异黄酮*

谢明杰¹ 石姗姗² 卢明春³ 刘英新³ 刘长江¹ 金凤燮³

(沈阳农业大学食品学院, 沈阳 110161) (辽宁师范大学生命科学学院, 大连, 116029)

(大连轻工业学院食品工程与生物工程学院, 大连, 116001)

摘 要 利用 *Absidia* sp.R 菌株,通过液体发酵,得到了一种高活性的大豆异黄酮糖苷水解酶,该酶水解糖苷型大豆异黄酮的最适底物浓度为 7.5 mg/mL,最适反应时间为 1.5 h,该酶在温度为 20 ~ 50℃、pH 为 4.0 ~ 7.0 范围内相对稳定,最适酶解反应温度为 40℃,最适 pH 值为 5.0,金属离子对该酶活力的影响不显著,其中 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 对该酶有激活作用, Ag^{+} 、 Cu^{2+} 对该酶有抑制作用, Fe^{3+} 浓度 < 50 mmol/L 时,对该酶有促进作用,当离子浓度 > 50 mmol/L 时,则有抑制作用。利用实验获得的最适酶解条件反应,可使染料木苷生成染料木素的转化率达到 100%。

关键词 大豆异黄酮苷,酶解,染料木苷,染料木素

大豆中含有的大豆异黄酮是一类重要的生理活性物质,具有较强的生理功能^[1,2]。迄今为止,已知大豆异黄酮共有 12 种异构体,分为游离型的苷元 (aglycon) 和结合型的糖苷 (glucosides) 2 类,其中苷元占总量的 2% ~ 3%,糖苷占总量的 97% ~ 98%。近年来的研究结果表明,天然苷类的分子结构并不是活性的最佳状态,糖苷须在大豆异黄酮糖苷水解酶的作用下转化成 aglycon 形式才能被吸收,因此获得高活性的大豆异黄酮糖苷水解酶对开发富含大豆异黄酮苷元的保健食品意义重大。目前获得该酶主要有 2 种途径,一是从植物中直接提取^[2],二是通过微生物发酵。文中利用 *Absidia* sp.R 菌株,通过液体发酵的方法,获得较高活性的大豆异黄酮糖苷水解酶,并以染料木苷 (genistin) 为底物,对该酶水解 genistin 的最佳反应条件进行研究。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

Absidia sp.R 由大连轻工业学院食品发酵菌种保藏所提供。

1.1.2 固体斜面培养基

5°麦芽汁中加入 2% 琼脂。

1.1.3 液体发酵培养基

500 mL 三角瓶中加入 100 mL 5°麦汁和 2 mL 30% 槐花汁(150 g 槐花粉加水 500 mL,煮沸 1 h,过滤,反复提取 3 次,减压蒸馏并定容至 500 mL),混匀,121℃灭菌 20 min 备用。

1.1.4 染料木苷 (genistin) 和染料木素 (gen) 标准品

购于美国 Sigama 公司,纯度为 99.99%。

1.1.5 genistin 底物

购于营口渤海天然食品有限公司,纯度为 80%。

1.1.6 薄层层析板

硅胶板 Kieselgel 60 F-254,德国 Merck 公司。

1.2 方 法

1.2.1 发酵方法

取 2 ~ 3 环活化好的菌种接种于液体发酵培养基中,于 30℃ 恒温摇床中 (160 r/min) 培养 4 d。

1.2.2 大豆异黄酮糖苷酶液提取

将上述液体发酵培养基在 8 000 r/min 下离

第一作者:博士研究生。

* 国家自然科学基金资助项目 (No.20076007)

收稿时间 2003-09-29

心 10 min 除去菌体 ,上清液用 60% 饱和度的硫酸铵盐析 ,离心 ,用少量 20 mmol/L 的 pH5.0 HAc-NaAc 缓冲液溶解沉淀 ,于透析袋中充分透析 ,离心 ,得到的上清液即为酶液。

1.2.3 酶法水解染料木苷

用 20 mmol/L 的 pH5.0 HAc-NaAc 缓冲液配成 15 mg/mL 的底物溶液(由于 genistin 的溶解性较小 ,可加适量乙醇助溶)。取粗酶液和底物溶液按照 1:1 的体积比混合 ,40℃ 下反应 2 h 后 ,加 2 倍体积的乙酸乙酯萃取 1 h ,取萃取物 10 μ L 作薄层层析(TLC)。展开剂为 V(CCl₄):V(丁酮):V(甲醇):V(水)=10:7:1:1 ,展开约 6 cm ,挥干溶剂 ,用双波长薄层扫描仪扫描 ,根据斑点面积的积分值计算染料木苷生成 gen 的转化率。

1.2.4 以染料木苷为底物 ,以染料木素为产物的转化率的测定方法

染料木苷的转化率的测定方法按照 1.2.3 的方法进行。

$$\text{转化率}/\% = \frac{\text{gen 的生成量}}{\text{gen} + \text{genistin 的量}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 酶法水解染料木苷生成染料木素的实验结果

大豆异黄酮糖苷水解酶将染料木苷水解为染料木素的反应式见图 1。取 0.1 mL 酶液加入等体积染料木苷底物溶液 ,40℃ 反应 2 h 后向反应体系加入 0.4 mL 乙酸乙酯萃取 1 h ,取乙酸乙酯相作薄层层析(TLC) ,得到的结果见图 2。

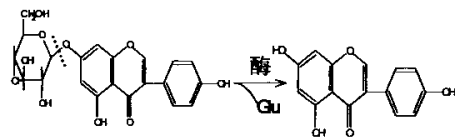
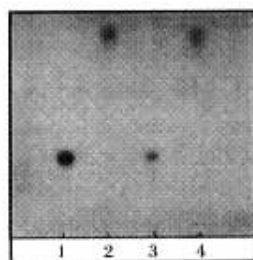


图 1 染料木苷生成染料木素的酶解反应

2.2 酶水解染料木苷生成染料木素的反应条件的确定

2.2.1 酶解反应底物浓度的确定

将染料木苷分别配制成浓度为 5、10、15、20 和 25 mg/mL 的底物溶液 ,按照 1.2.3 的方法 ,



1 - 染料木苷标准品 2 - 染料木素标准品 ;
3 - 底物 4 - 产物

展开剂 :V(CCl₄):V(丁酮):V(甲醇):V(水)=10:7:1:1

图 2 酶解染料木苷转化成染料木素的 TLC 图谱

测定酶解反应的最适底物浓度 ,结果见图 3。由于酶与底物的加量为体积比 1:1 ,因此底物浓度分别为 2.5、5、7.5、10、12.5 mg/mL。从图 3 可以看出 ,当底物浓度为 7.5 mg/mL 时 ,染料木苷的转化率高 ,故酶解反应的最佳底物浓度为 7.5 mg/mL。

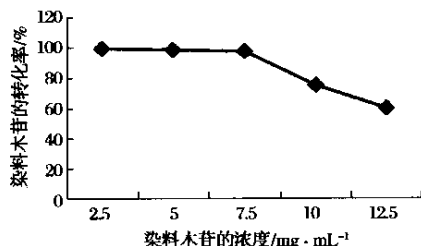


图 3 底物浓度对酶解反应的影响

2.2.2 酶解反应时间的测定

在最佳底物浓度的基础上 ,按照 1.2.3 的方法反应 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h ,测定酶解反应的最适时间 ,结果见图 4。从图 4 可以看出 ,在酶反应初期 ,反应速率很快 ,gen 的转化率逐渐增加 ,反应 1.5 h 后 ,产物得率达到最大。随着时间的延长 ,产物得率反而下降 ,究其原因 ,该酶是可逆酶 ,反应一定时间后 ,向逆反应进行 ,因此 ,最适的酶解时间为 1.5 h。

2.2.3 酶解反应温度的确定

在底物浓度和反应时间确定后 ,按照 1.2.3 的方法 ,分别在 20、30、40、50、60、70℃ 进行酶反应 ,测定酶解反应的最适温度 ,结果见图 5。由图 5 可知 ,酶反应温度在 40~50℃ 时 ,产物得率较高 ,40℃ 时最大 ,因此该酶最适反应温度为 40℃。

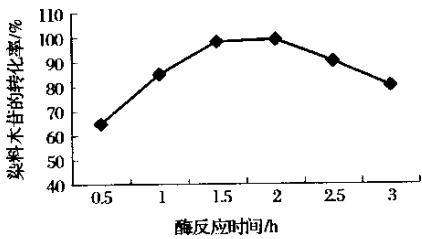


图 4 时间对酶解反应的影响

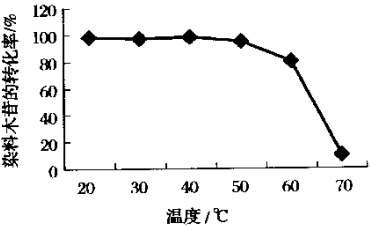


图 5 温度对酶解反应的影响

2.2.4 温度的稳定性

将酶液分别放置于 20、30、40、50、60 和 70℃ 的温箱中保温 1 h,然后按照 1.2.3 的方法反应,测定 genistin 的转化率,结果见图 6。由图可以看出,该酶在 50℃ 以下稳定,超过 50℃ 酶活力明显降低。

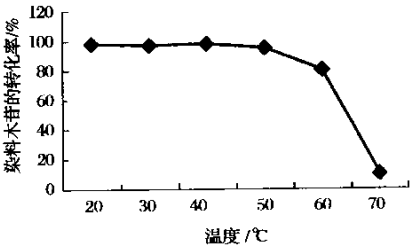


图 6 大豆异黄酮糖苷酶的温度稳定性

2.2.5 酶反应 pH 的测定

分别用 20mmol/L pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的 HAc-NaAc 缓冲液染料木苷配制成 15 mg/mL 的底物溶液,在 40℃ 下反应 1.5 h 后,测定酶解反应的最适 pH,结果见图 7。从图 7 可知,该酶在 pH4~7 的范围内稳定,当 pH 为 5 时,产物的得率最高。因此,酶反应的最适 pH 为 5。

2.2.6 pH 值的稳定性

将酶分别溶于 20 mmol/L,pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的缓冲液中,室温放置 1

h,然后按照 1.2.3 的方法测定 genistin 的转化率,结果见图 8。由图 8 可知,该酶在 pH4~7 稳定,超过或低于此范围,酶活力明显降低。

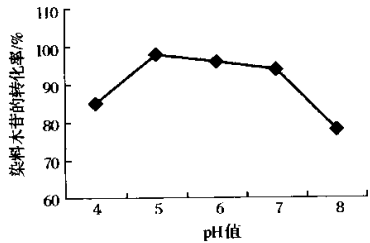


图 7 pH 对酶解反应的影响

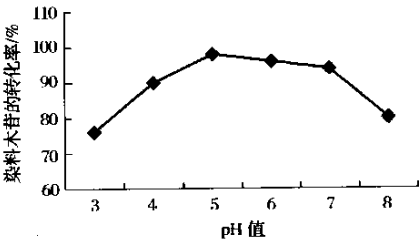


图 8 大豆异黄酮糖苷酶的 pH 稳定性

2.2.7 金属离子对酶反应的影响

于酶反应体系中分别加入不同浓度、不同种类的金属离子,按照 1.2.3 的方法,测定金属离子对酶反应的影响,结果见表 1。表 1 中可以看出,Co²⁺、Zn²⁺ 和 Ca²⁺ 对该酶有激活作用,Ag⁺、Cu²⁺ 对该酶有抑制作用,Fe³⁺ 浓度 < 50 mmol/L 时,对该酶有促进作用,当离子浓度 > 50 mmol/L 时,则有抑制作用。

表 1 金属离子对大豆异黄酮糖苷酶活力的影响

离子浓度 /mmol·L ⁻¹	离子浓度					
	Ca ²⁺	Ag ⁺	Fe ³⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺
0	100	100	100	100	100	100
5	100	90	102	100	101	81
10	101	85	105	100	102	78
50	105	80	109	102	108	74
100	102	78	84	105	109	70

3 结 论

由 *Absidia* sp.R 菌株通过液体发酵的方法得到的大豆异黄酮糖苷水解酶酶,其水解糖苷型大豆异黄酮的最适底物浓度为 7.5 mg/mL,最适反应时间为 1.5 h,该酶在温度为 20~50℃、

pH 为 4.0 ~ 7.0 范围内相对稳定 ,最适酶解反应温度为 40℃ ,最适 pH 值为 5.0 ;金属离子对该酶活力的影响是 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 对该酶有激活作用 , Ag^{+} 、 Cu^{2+} 对该酶有抑制作用 , Fe^{3+} 浓度 $< 50 \text{ mmol/L}$ 时 ,对该酶有促进作用 ,当离子浓度 $> 50 \text{ mmol/L}$ 时 ,则有抑制作用。利用实验获得的最适酶解条件反应 ,可使染料木苷生成染料木素的转化率达到 100% 以上。

研究已经证明 ,大豆异黄酮的生理活性主要是大豆异黄酮苷元的活性 ,在大豆异黄酮的 3 种苷元中 ,染料木素的保健作用又最为突出^[4]。目前获得大豆异黄酮苷元的方法主要是通过酸解法 ,但是人们对酸解条件下得到的大豆异黄酮苷元的稳定性表示怀疑^[5]。由于酶解法具有反应条件温和 ,大豆异黄酮苷元不易变性等优点 ,因此是制备大豆异黄酮苷元的最佳

途径。

参 考 文 献

- 1 Holder C Lee ,Churchwell Mona I ,Daniel R Doerge. Quantification of soy isoflavones , genistein and daidzein , and conjugates in rat blood using LCIES-MS[J]. J Agric Food Chem ,1999 47 3764 ~ 3770
- 2 Michael Naim ,Benjamin Gestetner. Soybean isoflavones characterization , determination , and antifungal activity [J]. J Agric Food Chem ,1974 22(5) 806 ~ 810
- 3 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
- 4 唐传核 ,彭志英 . 大豆功能性成分的开发现状 . 中国油脂 ,2000 25(4) :44 ~ 47
- 5 Jason Liggins , Leslie J C , Bluck W et al. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food[J]. Analytical Biochemistry ,1998 264 :1 ~ 7

Enzymolysis Condition of Soybean Isoflavone Glucoside

Xie Mingjie¹ Shi Shanshan² Lu Mingchun³
Liu Yingxin³ Liu Changjiang¹ Jin Fengxie³

1(College of Food , Shenyang Agriculture University , Shenyang , 110161)

2(College of Life Science , Liaoning Normal University , Dalian , 116029)

3(College of Food and Fermentation Technology , Dalian Institute of Light Industry , Dalian , 116001)

ABSTRACT A high active hydrolase on soybean isoflavone glucoside had been obtained from *Absidia* sp.R. The optimal reaction conditions of the enzymolysis were 7.5 mg/mL genistin for 1.5 h at temperature 40℃ ,the pH was 5.0. The isons of Co^{2+} and Zn^{2+} increased the enzyme activity while Ag^{+} and Cu^{2+} inhibited the enzyme activity. When the Fe^{3+} concentration was less than 50 mmol/L , it increased the enzyme activity. Under the optimal condition ,the genistin hydrolysis by enzyme reached almost 100% .

Key words soybean isoflavone , enzymic hydrolysis , genistin , gen



日本从蛋黄中生产出有利于脑健康的食品

日本科研人员通过从鸡蛋黄中提取出胆碱和 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 并且把它们组合在一起 ,生产出了一种可改善脑功能的营养食品。据介绍 ,乙酰胆碱的减少是导致老年痴呆症的原因之一 ,患者通过食用鸡蛋黄或大豆等食品可以补充这种成分。鸡蛋黄中含有的胆碱要比大豆多 ,并且易于被人体吸收 , $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 则是把胆碱合成为乙酰胆碱所必需的营养素。基于此 ,这家公司决定利用从蛋黄中提取的胆碱和 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 生产脑营养品 ,并申请了专利。据悉 ,QP 公司还将以这种蛋黄胆碱加 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 为基础 ,添加银杏叶和柿子肉等植物提取物生产其他保健新产品。