

酶解制备苷元型大豆异黄酮

周文红^{1,2}, 郭咪咪¹, 毕艳红², 王朝宇², 段章群¹

(1. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮油加工研究所, 北京 102209;

2. 淮阴工学院 生命科学与食品工程学院, 江苏 淮安 223003)

摘要:以大豆异黄酮糖苷为原料, 酶解制备苷元型大豆异黄酮。以水解率和苷元得率为指标对几种来源的 β -葡萄糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、纤维素酶进行筛选, 确定最适酶解用酶。通过单因素实验对酶添加量、底物质量浓度、酶解温度、pH、酶解时间进行优化。结果表明, 最佳酶解工艺条件为: 采用 β -葡萄糖苷酶(300 U/g), 酶添加量7%, 底物质量浓度1.6 mg/mL, 酶解温度56℃, pH 4.8, 酶解时间6 h。在最佳工艺条件下, 大豆异黄酮糖苷的水解率及苷元得率分别达到96.84%和99.74%。

关键词:大豆异黄酮; 糖苷; 酶解; 苷元

中图分类号: TS201.2; Q814.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)12-0100-05

Preparation of soybean isoflavone aglycones by enzymatic hydrolysis

ZHOU Wenhong^{1,2}, GUO Mimi¹, BI Yanhong², WANG Zhaoyu², DUAN Zhangqun¹

(1. Institute of Cereal & Oil Science and Technology, Academy of National Food and Strategic Reserves

Administration, Beijing 102209, China; 2. College of Life Sciences and Food Engineering,

Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, Jiangsu, China)

Abstract: Using soybean isoflavone glycosides as raw material, the isoflavone aglycones were prepared by enzymatic hydrolysis. With the hydrolysis rate and aglycones yield as the evaluation indexes, the β -glucosidase, β -galactosidase and cellulase from different sources were screened to determine the optimal hydrolysis enzyme. The enzyme dosage, substrate mass concentration, enzymolysis temperature, pH and enzymolysis time were optimized by single factor experiment. The results showed that the optimal enzymolysis conditions were obtained as follows: β -glucosidase (300 U/g), enzyme dosage 7%, substrate mass concentration 1.6 mg/mL, enzymolysis temperature 56℃, pH 4.8, and enzymolysis time 6 h. Under these conditions, the hydrolysis rate of soybean isoflavone glycosides and aglycones yield reached 96.84% and 99.74%, respectively.

Key words: soybean isoflavone; glycoside; enzymatic hydrolysis; aglycone

大豆异黄酮是大豆生长过程中形成的一种次级代谢产物, 以糖苷和游离苷元的形式分布于大豆的子叶和胚轴中。研究表明, 游离型大豆异黄酮具有许多重要的生理功能, 如预防癌症、抗氧化、减缓女性更年期综合征、预防骨质疏松及心血管疾病

等^[1-2]。目前已发现的大豆异黄酮有12种^[3], 分为两大类, 即游离型苷元和结合型糖苷(其结构式如图1所示, 存在形式如表1所示), 游离型苷元包括大豆苷元、染料木素、黄豆黄素3种, 占总量的2%~3%, 结合型糖苷主要以葡萄糖苷、乙酰基葡萄糖苷、丙二酰基葡萄糖苷形式存在, 占总量的97%~98%^[4]。由于人体吸收利用大豆异黄酮苷元的速度及数量远高于大豆异黄酮糖苷^[5-6], 所以游离型大豆异黄酮苷元具有更高的生理活性。近年来, 大豆异黄酮的研究热点也由提取技术开发转变为高效转化进而制备苷元型大豆异黄酮的深加工技术研究^[7-9]。

由糖苷型大豆异黄酮转化为游离型苷元的方法

收稿日期: 2020-02-25; 修回日期: 2020-07-20

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(ZX1905)

作者简介: 周文红(1993), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化工(E-mail) zwh465@126.com。

通信作者: 段章群, 副研究员(E-mail) dzq@chinagrains.org。

主要包括酸水解法、碱水解法和酶解法^[10],其中酸、碱水解工艺副反应多,限制了后续的研究利用,酶法催化工艺过程简单、反应条件温和、产物稳定性好。

因此,本文重点研究酶催化糖苷型大豆异黄酮转化为苷元型大豆异黄酮,以期为大豆异黄酮苷元的开发应用提供理论基础。

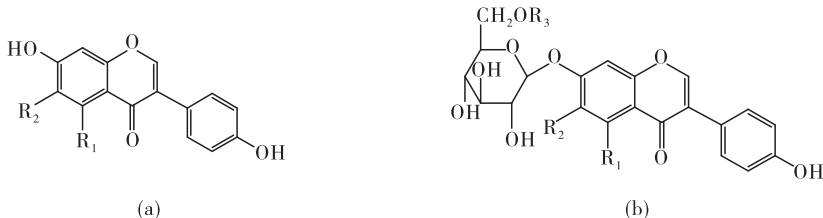


图1 大豆异黄酮苷元型(a)和糖苷型(b)结构式

表1 12种大豆异黄酮的存在形式

形式	异黄酮种类	R ₁	R ₂	R ₃
游离型	大豆苷元	H	H	-
	黄豆黄素	H	OCH ₃	-
	染料木素	OH	H	-
葡萄糖苷型	大豆苷	H	H	H
	黄豆黄苷	H	OCH ₃	H
	染料木苷	OH	H	H
乙酰基葡萄糖苷型	乙酰基大豆苷	H	H	COCH ₃
	乙酰基黄豆黄苷	H	OCH ₃	COCH ₃
	乙酰基染料木苷	OH	H	COCH ₃
丙二酰基葡萄糖苷型	丙二酰基大豆苷	H	H	COCH ₂ COOH
	丙二酰基黄豆黄苷	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH
	丙二酰基染料木苷	OH	H	COCH ₂ COOH

1 材料与方法

1.1 实验材料

大豆异黄酮糖苷(90%),国药集团化学试剂有限公司;大豆苷(D)、黄豆黄苷(GI)、染料木苷(G)、大豆苷元(De)、黄豆黄素(Gle)、染料木素(Ge)标准品,上海源叶生物科技有限公司;甲醇、乙酸为色谱纯,美国Fisher公司; β -葡萄糖苷酶(100 U/g)、 β -葡萄糖苷酶(300 U/g)、 β -半乳糖苷酶(10 000 U/g),上海源叶生物科技有限公司;纤维素酶(10 000 U/g),上海麦克林生化科技有限公司;纤维素酶(3 000 U/g),北京索莱宝科技有限公司。

EClasscal 3100 高效液相色谱仪,大连依利特分析仪器有限公司;IKA KS 4000 摇床;AB204-S 分析天平;KQ5200DE 超声波器。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆异黄酮糖苷的酶解

分别称取大豆异黄酮糖苷 100.0 mg 至不同的 100 mL 三角瓶中,然后分别加入一定量一定 pH 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,超声 10 min,再向不同三角瓶中加入酶,充分混匀后置于一定温度下摇床反应一段时间。反应结束时按照酶解液与 80% 乙醇体积比 1:9 对大豆异黄酮进行提取,得大豆异黄

酮苷元提取液。

1.2.2 高效液相色谱检测大豆异黄酮的条件

色谱柱为 Symmetry 300TM C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m);流动相 A 为 0.1% 乙酸水溶液、B 为 0.1% 乙酸-甲醇溶液,流速 1 mL/min;进样量 20 μ L;检测波长 260 nm;柱温 40 $^{\circ}$ C;流动相梯度洗脱程序如表 2 所示。

表2 流动相梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%	时间/min	A/%	B/%
0	90	10	30	40	60
12	75	25	32	0	100
16	70	30	34	0	100
21	60	40	36	90	10
25	50	50	45	90	10

1.2.3 大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率计算^[11]

准确称取大豆异黄酮标准品各 1.00 mg,以 60% 甲醇溶液溶解并定容至 10 mL,作为标准储备液,再用 10% 甲醇溶液稀释配制成不同质量浓度的混合标准品溶液。过 0.45 μ m 滤膜,按 1.2.2 条件进行高效液相色谱分析。以大豆异黄酮各组分的质量浓度为横坐标,大豆异黄酮各组分的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程和相关系数(R^2)如表 3 所示。

表3 大豆异黄酮组分标准曲线的回归方程及相关系数

大豆异黄酮组分	回归方程	R^2
D	$Y_1 = 98.695X_1 - 3.2383$	0.9999
Gl	$Y_2 = 82.12X_2 - 1.7478$	0.9999
G	$Y_3 = 112.82X_3 - 2.8125$	0.9999
De	$Y_4 = 113.24X_4 + 0.5810$	0.9907
Gle	$Y_5 = 165.54X_5 - 0.2022$	0.9991
Ge	$Y_6 = 159.47X_6 - 0.3034$	0.9999

取一定量 1.2.1 制备的大豆异黄酮苷元提取液,用 10% 的甲醇溶液稀释 10 倍,过 0.45 μm 滤膜,按 1.2.2 条件进行高效液相色谱分析。以保留时间定性,峰面积代入回归方程计算各组分含量,再分别计算大豆异黄酮糖苷水解率和苷元得率。大豆异黄酮糖苷水解率 = (酶解前大豆异黄酮糖苷总量 - 酶解后大豆异黄酮糖苷总量) / 酶解前大豆异黄酮糖苷总量 $\times 100\%$ 。大豆异黄酮苷元得率 = (酶解后大豆异黄酮苷元总量 - 酶解前大豆异黄酮苷元总量) / 大豆异黄酮糖苷完全酶解应得到的苷元总量 $\times 100\%$ 。

1.2.4 数据处理

数据采用 Origin 8.5 软件进行分析与作图,每组实验做 3 次平行,数据结果采用“平均值 \pm 标准偏差”表示。

2 结果与分析

2.1 不同酶对大豆异黄酮糖苷酶解的影响

本实验选取 3 种类型的酶进行筛选,根据不同的酶活力一共有 5 种酶,分别是 β -葡萄糖苷酶(100 U/g)、 β -葡萄糖苷酶(300 U/g)、纤维素酶(10 000 U/g)、纤维素酶(3 000 U/g)、 β -半乳糖苷酶(10 000 U/g)。在酶解温度 48 $^{\circ}\text{C}$ 、底物质量浓度 2 mg/mL、酶添加量 10%、pH 4.8 条件下酶解,研究不同酶对大豆异黄酮糖苷水解率和苷元得率的影响,结果如表 4 所示。

表4 不同酶对大豆异黄酮糖苷酶解效果的影响

酶	水解率/%	苷元得率/%
酶 1	70.45	50.27
酶 2	64.63	40.88
酶 3	36.37	26.97
酶 4	49.84	41.17
酶 5	8.18	1.68

注:酶 1、酶 2、酶 3、酶 4、酶 5 分别代表 β -葡萄糖苷酶(100 U/g)、 β -葡萄糖苷酶(300 U/g)、纤维素酶(10 000 U/g)、纤维素酶(3 000 U/g)、 β -半乳糖苷酶(10 000 U/g),各酶达到最优酶解效果的时间分别是 6、6、4、6、10 h。

由表 4 可知, β -葡萄糖苷酶和纤维素酶都能够酶解大豆异黄酮糖苷,二者相比, β -葡萄糖苷酶的

酶解效果更好,而 β -半乳糖苷酶对大豆异黄酮糖苷几乎没有酶解作用。对于两种活性的 β -葡萄糖苷酶,二者达到最优催化效果的时间都在 6 h,而 β -葡萄糖苷酶(100 U/g)催化效果优于 β -葡萄糖苷酶(300 U/g),与文献[12-13]报道的结果相吻合,黑曲霉来源的 β -葡萄糖苷酶对大豆异黄酮糖苷的转化具有较好的催化效果。 β -葡萄糖苷酶(100 U/g)的价格是 β -葡萄糖苷酶(300 U/g)的 5 倍。因此,综合考虑选取 β -葡萄糖苷酶(300 U/g)进行大豆异黄酮糖苷的酶解实验。

2.2 单因素实验

2.2.1 酶添加量对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

在酶解温度 48 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 4.8、底物质量浓度 1 mg/mL 条件下摇床反应 6 h,研究不同酶添加量对大豆异黄酮糖苷水解率和苷元得率的影响,结果如图 2 所示。

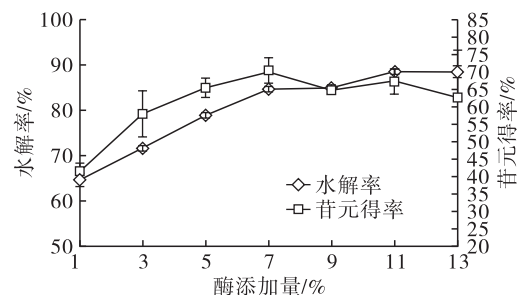


图2 酶添加量对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

由图 2 可知,当酶添加量从 1% 增加到 7% 时,大豆异黄酮糖苷水解率和苷元得率显著上升,水解率由 64.63% 增加到 84.80%,苷元得率由 40.65% 增加到 68.15%。当酶添加量超过 7% 时,随酶添加量增加,水解率逐渐趋于平稳,说明在底物浓度确定的情况下,酶分子已经能够充分地与底物接触反应,再增加酶添加量仅增加了经济成本;苷元得率整体略有降低。综合考虑,选择酶添加量为 7%。

2.2.2 底物质量浓度对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

在酶解温度 48 $^{\circ}\text{C}$ 、酶添加量 7%、pH 4.8 条件下摇床反应 6 h,研究不同底物质量浓度对大豆异黄酮糖苷水解率和苷元得率的影响,结果如图 3 所示。由图 3 可知,底物质量浓度越高,底物水解率越低,与之相应的产物得率也越低,这是因为在酶酶解底物生成产物的过程中,当产物质量浓度达到一定程度时,对酶产生了抑制作用。研究表明,酶解生成的葡萄糖对葡萄糖苷酶有抑制作用,随着酶解反应进行体系中会产生游离糖基和游离苷元,在达到一定

质量浓度时,会抑制酶对底物的酶解能力^[14-15]。另外, β -葡萄糖苷酶是一种可逆酶,在底物质量浓度增加的同时,即使产物得率较低,但产物质量浓度已经比较高,反应逆向进行,导致底物水解率和产物得率降低^[16]。较低的底物质量浓度时大豆异黄酮糖苷的水解率及苷元得率较高,但是获得的苷元总量较少。因此,为了能够保证在较高水解率的情况下获得尽可能多的苷元产物,选择底物质量浓度为1.6 mg/mL。

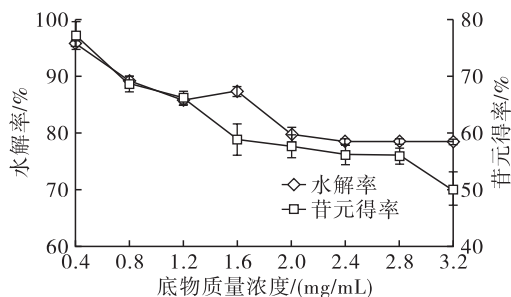


图3 底物质量浓度对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

2.2.3 酶解温度对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

在pH 4.8、酶添加量7%、底物质量浓度1.6 mg/mL条件下摇床反应6 h,研究不同酶解温度对大豆异黄酮糖苷水解率和苷元得率的影响,结果如图4所示。

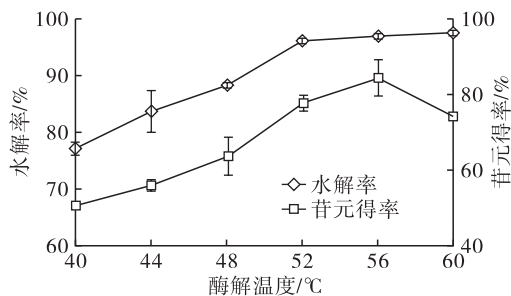


图4 酶解温度对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

由图4可知,随着酶解温度的升高,大豆异黄酮糖苷的水解率不断提高,当酶解温度超过52℃时水解率开始趋于平衡,维持在96%以上。苷元得率随着酶解温度升高先上升后下降,在56℃时苷元得率达到最大值87.25%。综合考虑,选择酶解温度56℃。

2.2.4 pH对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

在酶解温度56℃、酶添加量7%、底物质量浓度1.6 mg/mL条件下摇床反应6 h,研究不同pH对大豆异黄酮糖苷水解率和苷元得率的影响,结果如图5所示。

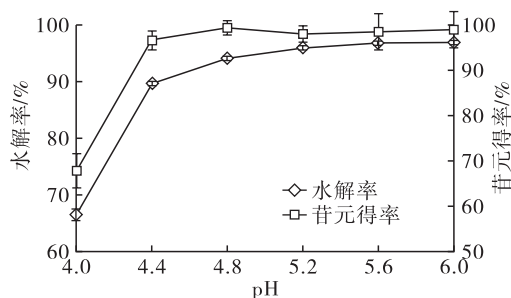


图5 pH对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

由图5可知,当pH由4.0增加到4.8时,大豆异黄酮糖苷的水解率由67.52%提高到94.17%,苷元得率由67.57%提高到99.47%,均明显上升,pH继续增大时,水解率以及苷元得率开始趋于平衡,当pH为4.8时,二者均较高。因此,选择pH为4.8。

2.2.5 酶解时间对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

在酶解温度56℃、酶添加量7%、底物质量浓度1.6 mg/mL、pH 4.8条件下摇床反应一段时间,研究不同酶解时间对大豆异黄酮糖苷水解率和苷元得率的影响,结果如图6所示。

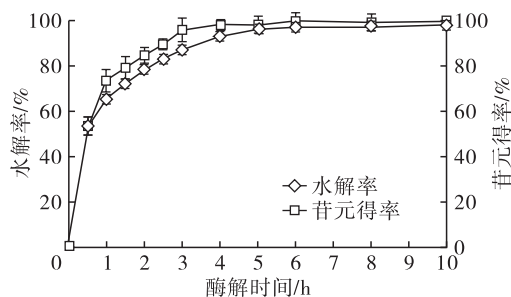


图6 酶解时间对大豆异黄酮糖苷水解率及苷元得率的影响

由图6可知,随着酶解反应的进行,水解率和苷元得率迅速提高,酶解反应超过6 h后,水解率以及苷元得率基本趋于平衡,且均在95%以上。因此,选择酶解时间为6 h。

综上所述,酶解大豆异黄酮糖苷制备苷元型大豆异黄酮的最佳工艺条件为:选择 β -葡萄糖苷酶(300 U/g),酶添加量7%,底物质量浓度1.6 mg/mL,酶解温度56℃,pH 4.8,酶解时间6 h。在最佳工艺条件下,大豆异黄酮糖苷的水解率及苷元得率分别达到96.84%和99.74%。

3 结论

本文优化了酶解大豆异黄酮糖苷制备苷元型大豆异黄酮的工艺。以大豆异黄酮糖苷水解率和苷元型大豆异黄酮得率作为评价指标,确定酶解反应的最佳工艺条件为:采用 β -葡萄糖苷酶(300 U/g),酶添加量7%,底物质量浓度1.6 mg/mL,酶解温度

56 °C, pH 4.8, 酶解时间 6 h。在最佳工艺条件下,大豆异黄酮糖苷的水解率及苷元得率分别达到 96.84% 和 99.74%。大豆异黄酮糖苷酶解制备苷元的反应条件温和、底物水解率及产物得率高、操作简便、绿色环保,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 郭嘉. 大豆异黄酮的营养探究[J]. 现代食品, 2016, 18: 32-33.
- [2] AHUJA V, MIURA K, VISHNU A, et al. Significant inverse association of equol - producer status with coronary artery calcification but not dietary isoflavones in healthy Japanese men[J]. Br J Nutr, 2017, 117: 260-266.
- [3] WANG H, MURPHY P A. Isoflavone content in commercial soybean foods[J]. J Agric Food Chem, 2001, 42(8): 1666-1673.
- [4] 李珊珊. 大豆胚芽中异黄酮提取研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [5] IZUMI T, PISKULA M K, OSAWA S, et al. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans[J]. Brit J Nutr, 2000, 130(7): 1695-1699.
- [6] VILLARES A, ROSTAGNO M A, GARC A A, et al. Content and profile of isoflavones in soy - based foods as a function of the production process[J]. Food Bioproc Tech, 2011, 4(1): 27-38.
- [7] 李紫微, 曹庸, 苗建银. 大豆异黄酮及其苷元的研究进

展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(20): 348-355.

- [8] CHENG Q B, ZHANG L W. Highly efficient enzymatic preparation of daidzein in deep eutectic solvents[J/OL]. Molecules, 2017, 22(1): 186[2020-02-25]. <https://www.doc88.com/p-0768675690691.html>.
- [9] 郭天赐, 赵石磊, 刘石生. 苦杏仁 β -葡萄糖苷酶水解豆浆中大豆异黄酮的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019(12): 82-88.
- [10] 周文红, 郭咪咪, 李秀娟, 等. 大豆异黄酮提取及其生物转化的研究进展[J]. 粮油食品科技, 2019(5): 37-42.
- [11] 周文红, 郭咪咪, 毕艳红, 等. 大豆豆脐中异黄酮的提取工艺优化[J]. 现代食品科技, 2020(2): 224-229.
- [12] 孙艳梅. β -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷的研究[D]. 沈阳: 东北农业大学, 2003.
- [13] MITSUO M, KOJI T, HIDEO A. Biotransformation of isoflavones by *Aspergillus niger* as biocatalyst[J]. J Chem Technol Biot, 2006, 81(4): 674-678.
- [14] 夏伟, 石鹏君, 柏映国, 等. 真菌来源第 3 家族 β -葡萄糖苷酶催化机理初步研究[R]. 江苏 镇江: 中国酶工程与糖生物工程学术研讨会, 2015.
- [15] 原野, 胡彦波, 周义发. 糖苷水解酶——生物转化制备活性糖苷与苷元的有效工具[J]. 微生物学报, 2017(8): 93-108.
- [16] 王金虎. 葡萄糖苷酶催化机理及几类新型药物作用机制的理论研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.

(上接第 70 页)

参考文献:

- [1] 金惠娟, 殷宁, 彭黎旭, 等. 海南红厚壳花浸膏、精油的提取及化学成分分析[J]. 精细化工, 2007(1): 60-63.
- [2] 中国油脂植物编写委员会. 中国油脂植物[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 387-388.
- [3] 郑联合, 赵阔, 王涛. 琼崖海棠籽油的理化性质及脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2011, 36(9): 60-63.
- [4] KILHAM C. Tamanu oil; a tropical topical remedy[J]. Herbalgram, 2004, 63: 26-31.
- [5] CRANE S, AURORE G, JOSEPH H, et al. Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in *Calophyllum calaba* L. oil from Guadeloupe [J]. Phytochemistry, 2005, 66(15): 1825-1831.
- [6] IINUMA M, ITO T, TOSA H, et al. Prenylated xanthonoids from *Calophyllum apetalum* [J]. Phytochemistry, 1997, 46(8): 1423-1429.
- [7] 韩淑云, 韩长日. 海南红厚壳中生物碱的提取与含量测定[J]. 应用化工, 2010, 39(9): 1419-1421.
- [8] 食品安全国家标准 急性经口毒性试验: GB 15193.3—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

- [9] 郑联合, 钟文权, 邹易, 等. 琼崖海棠籽油急性毒性的评价[J]. 食品科技, 2020(5): 17-21.
- [10] 食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验: GB 15193.5—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [11] 小鼠精子畸形试验: GB 15193.7—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [12] 食品安全国家标准 细菌回复突变试验: GB 15193.4—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [13] 刘玉明, 蒋定文, 李珂娴, 等. 银参胶囊遗传毒性研究[J]. 中国药业, 2020, 27(3): 17-19.
- [14] 赵毓梅, 郑定仙, 黄业宇, 等. 鲨鱼肝油胶丸毒理学安全性评价[J]. 中国公共卫生, 2002(3): 46-48.
- [15] OODYKE D L. Monographs on fragrance raw materials [J]. Food Cosmet Toxicol, 1974, 12(3): 385-405.
- [16] 沈建忠. 动物毒理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 83-97.
- [17] 孔令雷, 胡金凤, 陈乃宏. 香豆素化合物药理和毒理作用的研究进展[J]. 中国药理学报, 2012, 28(2): 165-168.
- [18] 中国营养学会. 中国居民膳食指南(2016)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.