

文章编号:1673-1689(2005)03-0008-04

丹贝异黄酮生物活性增强的机理研究

徐德平^{1,2}, 江汉湖²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要:以少孢根霉 RT-3 孢子接种在含高浓度的大豆异黄酮提取物制成的发酵基质中, 发酵 36 h 后大豆异黄酮被部分水解成相应的苷元。用从丹贝中分离的 β -葡萄糖苷酶与标准品染料木素糖苷和大豆苷元的糖苷作用 10 min, 染料木素糖苷和大豆苷元的糖苷被水解成相应的苷元。结果表明: 丹贝异黄酮生物活性增强是发酵剂 RT-3 孢子分泌的 β -葡萄糖苷酶将异黄酮由糖苷水解成苷元, 而苷元比糖苷有更强的活性。

关键词: 丹贝; 异黄酮; β -葡萄糖苷酶; 水解

中图分类号: O 623.52

文献标识码: A

Machanism of Activity Enchancement of Tempe Isoflavone

XU De-ping^{1,2}, JIANG Han-hu²

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The culture medium containing extraction of soybean isoflavone was inoculated with spore of RT-3. After 36 h fermentation, the some of soybean isoflavones were hydrolyzized to isoflavone aglycones. Genistin and daidzin were reacted with β -Glucosidases, respectively, for 10 minutes, genistin and daidzin were then hydrolyzied to genistein and daidzein. The reason of activity enhancement of tempe isoflavones was because that, soybean isoflavones were hydrolyzied to isoflavones aglycones, and isoflavone aglycone have a stronger activity than soybean isoflavones.

Key words: Tempe; isoflavone; β -Glucosidases; hydrolysis

丹贝 (Tempeh) 是印尼的一种传统发酵食品, 通常以大豆或豆粕为原料, 经预处理后接入少孢根霉 (*Rhizopus oligosporus* Sotto) 经短期固态发酵而成。据报道, 丹贝中的异黄酮比未发酵的大豆异黄酮生物活性有较大提高。目前, 国内外学者普遍认为这种活性增强的原因是大豆在发酵过程中异黄酮由糖苷水解成苷元所致^[1,2], 这种水解作用是由少孢根霉产生的 β -葡萄糖苷酶引起的, 日本学者

Matsuura^[3,4] 从大豆中分离出 β -葡萄糖苷酶, 并证实该酶能水解异黄酮糖苷成苷元, 但很少见从丹贝中分离到该酶的报道。作者用大豆异黄酮的粗提物制成发酵基质, 接种 RT-3 孢子, 经 36 h 发酵以证实微生物对大豆异黄酮的水解作用, 同时用从液体发酵的丹贝中分离到的 β -葡萄糖苷酶与标准品染料木素和大豆苷元的糖苷作用, 进一步证实丹贝异黄酮生物活性增强是由于丹贝发酵过程中 RT-3 产

收稿日期: 2004-07-05; 修回日期: 2004-10-25.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39470610) 资助课题.

作者简介: 徐德平 (1965-), 男, 安徽宣城人, 副教授, 博士后。
万方数据

生的 β -葡萄糖苷酶水解异黄酮糖苷成苷元的推论。

1 实验材料

大豆,“菜豆5号”品种;南京农业大学国家大豆品种改良中心提供。

试剂:乙醇、正己烷、正丁醇、二甲基亚砜(DMSO)、冰醋酸、磷酸、柠檬酸、硫酸铵等皆为分析纯,乙腈为色谱纯,HPLC分析用水为重蒸水。

发酵基质:黄豆芽100 g,异黄酮粗提物200 g,葡萄糖30 g,加水至1 000 mL,pH=4.5。

标准品:染料木素和大豆苷元的糖苷由作者分离纯化,标准品 β -葡萄糖苷酶购自Sigma公司,丹贝 β -葡萄糖苷酶由作者从液体发酵的丹贝中分离纯化。

仪器:主机,Waters 717 plus Autosampler;泵,Waters 510 HPLC Plum;检测器,Waters 486 Tunable Absorbance;梯度控制器,Waters Automated Gradient Controller Detector;柱,ODS柱(150 mm \times 6.0 mm, ID 5 μ m)。

2 实验方法

2.1 大豆异黄酮粗提物的提取

2.5 kg大豆经粉碎后加入2倍体积的体积分数为90%的乙醇,在80 $^{\circ}$ C回流提取2 h,过滤取滤液,滤渣再加入乙醇反复提取2次,合并乙醇液浓缩至干,用正己烷脱脂,余下部分加入适量水后用水饱和的正丁醇抽提,直至正丁醇相无色为止,合并正丁醇液浓缩至干即为大豆异黄酮粗提物。

2.2 丹贝 β -葡萄糖苷酶分离纯化

将液态发酵的丹贝液经3 000 g离心,取上清液并调整pH至5.0,缓慢加入硫酸铵至35%饱和度,静置冰箱中(5 $^{\circ}$ C)过夜,5 000 g离心取上清液,再缓慢加入硫酸铵到70%饱和度,冰箱中(5 $^{\circ}$ C)静置过夜,8 000 g离心后弃上清液,沉淀用少量浓度为0.1 mol/L、pH 5.0的磷酸-柠檬酸缓冲液溶解,并在相同的缓冲液中透析,经BaCl₂检测无沉淀时止,取出后用聚乙二醇浓缩到20 mL,浓缩的样品上Sephadex G-100柱,用0.1 mol/L、pH 5.0的磷酸-柠檬酸缓冲液洗脱,每管收集6 mL,流量30 mL/h,直至无蛋白质洗出为止。将以上收集的含酶活力的洗脱液用聚乙二醇浓缩至20 mL,再上Sephadex G-100柱,仍然用0.1 mol/L、pH 5.0的磷酸-柠檬酸缓冲液洗脱,流速10 mL/h,每管收集4.0 mL。在这一步柱层析时酶活力峰与蛋白质峰完全重合,且峰形基本对称,说明酶得到纯化。

2.3 RT-3 孢子产酶对大豆异黄酮粗提物的水解

将含有大豆异黄酮粗提物的液体发酵基质分装10瓶,250 mL三角瓶每瓶100 mL,经115 $^{\circ}$ C灭菌30 min,冷却后接种RT-3孢子,其中2瓶不接种作对照,在35 $^{\circ}$ C,转速100 r/min的摇床上,培养36 h后取出,将接种孢子的合并,两瓶对照的合并,浓缩至干,加入体积分数80%甲醇提取2次,分别合并后蒸干,再移入小容量瓶中定容,接种孢子的为20 mL,对照为5 mL。

2.4 β -葡萄糖苷酶对标准品异黄酮糖苷的水解

将染料木素糖苷和大豆苷元糖苷5 mg,分别用少量的DMSO(二甲基亚砜)溶解,再加0.1 mol/L、pH 4.0的磷酸-柠檬酸缓冲液至2 mL体积,在50 $^{\circ}$ C水浴中预热后分别加入350 μ L标准 β -葡萄糖苷酶和提取的丹贝 β -葡萄糖苷酶,反应10 min后,加入甲醇至5 mL,振荡10 min并灭酶,过滤后进行HPLC检测。

2.5 HPLC 检测

流动相:A(质量分数0.1%冰醋酸+乙腈),B(质量分数0.1%冰醋酸+水);梯度洗脱:50 min内A从体积分数15%增加到35%;体积流量1.0 mL/min,柱温25 $^{\circ}$ C,检测波长254 nm,每次进样量为10 μ L^[5]。

3 实验结果

3.1 含异黄酮糖苷的发酵基质接种RT-3 孢子的水解结果

将RT-3孢子接种到含异黄酮糖苷的发酵基质中经12 h发酵后菌丝开始生长,36 h布满整个发酵基质,此时发酵基质变得澄清透明并呈浅黄色,而对照仍为不透明的粘稠状液体。从表1可知,经36 h发酵的大豆苷元糖苷下降了0.354 mg/mL,大豆苷元上升了1.546 mg/mL,染料木素糖苷下降了0.24 mg/mL,染料木素上升了0.232 mg/mL,而对照外观未见变化,异黄酮的含量也没有变化。

表1 RT-3孢子对大豆异黄酮粗提物的水解

Tab.1 Hydrolysis effect of soybean isoflavone by spore of

	RT-3 (mg/mL)			
	大豆苷元糖苷	大豆苷元	染料木素糖苷	染料木素
发酵前	7.122	1.552	10.140	1.704
发酵后	6.768	3.098	9.900	1.936
变化	-0.354	+1.546	-0.240	+0.232

糖苷的减少和苷元的增加是因为接种RT-3孢

子引起的,即接种 RT-3 孢子产生的酶所引起的。

3.2 标准 β -葡萄糖苷酶与染料木素糖苷和大豆苷元糖苷标准品的作用

从表 2 可知,标准品染料木素糖苷与 β -葡萄糖苷酶反应 10 min,糖苷几乎全部转化为苷元。同样标准品大豆苷元糖苷与 β -葡萄糖苷酶反应在 10 min 内糖苷也几乎全部转化成苷元。表明染料木素糖苷和大豆苷元糖苷是 β -葡萄糖苷酶的良好底物。

表 2 β -葡萄糖苷酶与染料木素糖苷和大豆苷元糖苷的标准品作用

	染料木素糖苷	染料木素	大豆苷元糖苷	大豆苷元
反应前	2.358	0	2.445	0
反应后	0	2.359	0	2.444

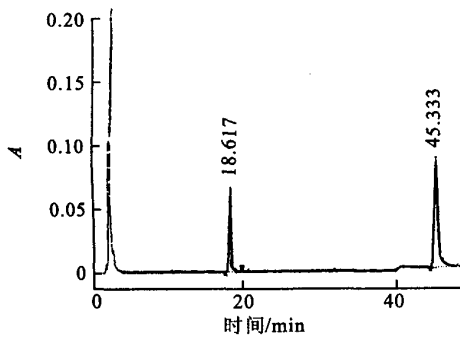
3.3 丹贝 β -葡萄糖苷酶与染料木素糖苷和大豆苷元糖苷标准品的作用

由表 3 可得,提取的丹贝 β -葡萄糖苷酶与标准品染料木素糖苷反应 10 min,有 79.05% 的染料木素糖苷转化成苷元,丹贝 β -葡萄糖苷酶与染料木素糖苷反应的 HPLC 色谱图见图 1(a)。

提取的丹贝 β -葡萄糖苷酶与标准品大豆苷元糖苷反应 10 min,有 95.4% 的糖苷转化为苷元,丹贝 β -葡萄糖苷酶与大豆苷元糖苷反应的 HPLC 色谱图见图 1(b)。

表 3 β -葡萄糖苷酶对染料木素糖苷的水解作用

	染料木素糖苷	染料木素	大豆苷元糖苷	大豆苷元
反应前	2.358	0	2.445	0
反应后	0.483	1.864	0.112	2.333



(a)

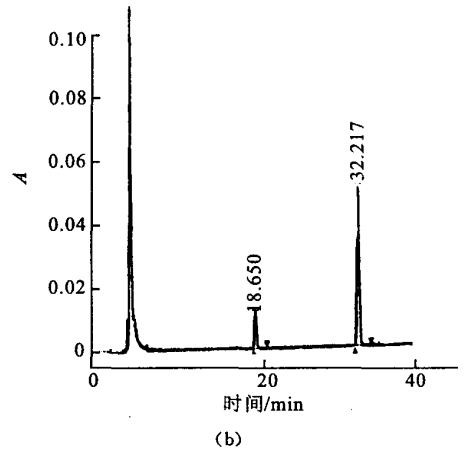


图 1 丹贝 β -葡萄糖苷酶与染料木素糖苷(a)和大豆苷元糖苷(b)作用的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC diagram of hydrolysis effect of genistin and daidzin by β -glucosidases from Tempeh

4 讨论

1) 异黄酮粗提物的发酵基质中接种 RT-3 孢子发酵 36 h 后,与对照相比每 100 mL 发酵液中染料木素糖苷降低 24.0 mg (0.566×10^{-4} mol),染料木素苷元上升了 23.2 mg (0.928×10^{-4} mol),大豆苷元的糖苷减少了 35.4 mg (0.866×10^{-4} mol),大豆苷元增加了 154.6 mg (5.579×10^{-4} mol),这种转化是因为接种 RT-3 孢子引起的,即因为接种 RT-3 孢子产生的酶引起的。苷元增加的摩尔数高于糖苷减少的摩尔数,这是由于大豆中异黄酮除以糖苷形式外还有以乙酰基和丙酰基形式存在,当它们被水解时也成相应的苷元所致。

2) 大豆苷元的糖苷和染料木素糖苷与标准品 β -葡萄糖苷酶反应时,在 10 min 内几乎全部水解成苷元;与丹贝 β -葡萄糖苷酶作用时,对大豆苷元糖苷的转化率为 95.4%,而对染料木素糖苷的转化率为 79.05%,这种差异表现为 β -葡萄糖苷酶对大豆苷元糖苷有更高的亲和力,对染料木素糖苷的亲和力较低。这一点与丹贝发酵过程中异黄酮的变化相一致,即发酵结束时染料木素糖苷比大豆苷元糖苷的浓度高,染料木素糖苷的转化率为 78.54%,大豆苷元糖苷的转化率为 90.1%。丹贝 β -葡萄糖苷酶不能全部水解糖苷成苷元可能是加入的酶量较少,反应不完全的原因^[6]。

3) 少孢根霉 RT-3 能分泌 β -葡萄糖苷酶,以染料木素糖苷和大豆苷元糖苷作底物时,该酶能很好地水解它们成相应的苷元,由此证实丹贝异黄酮生物活性增强是由于大豆中异黄酮被水解成苷元,而苷元比糖苷的活性更强所致。

参考文献:

- [1] Ikehata H, Wakaizumi M, Murata K. Antioxidant and antihemolytic activity of a new isoflavone, "Factor 2" isolated from tempeh[J]. *Agric Biol Chem*, 1968, 32(6):740-746.
- [2] 徐德平, 江汉湖, 庞自洁, 等. 丹贝异黄酮的提取分离与结构鉴定 [J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(3):1-4.
- [3] Matsuura M, Obata A, Fukushima D. Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control[J]. *J Food Science*, 1989, 54(3):602-605.
- [4] Matsuura M, Akio Obata. β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin[J]. *J Food Science*, 1993, 58(1):144-147.
- [5] WANG Hui-ju, Murphy A. Isoflavone content in commercial soybean food[J]. *J Agric Biol Chem*, 1994, 42:1666-1673.
- [6] 徐德平, 潘福生, 江汉湖等. 丹贝发酵过程中异黄酮组分和含量的变化[J]. *植物资源与环境学报*, 2001, 3:63-65.

(责任编辑:朱明)

(上接第7页)

- [4] 江南大学食品科学教研组. 食品酶学实验讲义[Z]. 无锡:江南大学, 2002.
- [5] 张富新, 田程瑞. 木瓜蛋白酶凝乳特性的研究[J]. *西北农业大学学报*, 1997, 25(2):102-105.
- [6] 钟芳. 大豆蛋白质的酶促速凝[J]. *无锡轻工大学学报*, 2002, 21(6):559-563.
- [7] 钟芳. 大豆蛋白速凝特性研究 I—热处理条件对大豆蛋白速凝特性的影响[J]. *中国粮油学报*, 2001, 16(4):47-50.
- [8] Jens Adler-Nissen. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1979, 27(6):1256-1262.
- [9] 巫庆华. 木瓜蛋白酶凝固大豆蛋白质机理[J]. *乳业科学与技术*, 2002, (98):6-9.
- [10] Kaoru Kohyama, Yoh Sano, Etsushiro Doi. Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu(soybean curd) [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1995, 43(7):1808-1812.
- [11] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉:武汉大学出版社, 1994.
- [12] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999.
- [13] Lee Kah Hui, Azhar Mat Easa, Noryati Ismail. Effects of thermal treatments on texture of soy protein isolate tofu[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2000, 24:275-286.
- [14] Fuke Y, Masakatsu S, Matsuoka H. Nature of stem bromelain treatments on the aggregation and gelation of soybean proteins[J]. *Journal of Food Science*, 1985, 50:1283-1288.

(责任编辑:杨萌)