

高产大豆异黄酮糖苷水解酶菌株的发酵工艺研究^{*}

谢明杰^{1,2} 徐春华¹ 刘长江² 卢明春³ 金凤燮³

(辽宁师范大学生物系 大连 116029)¹ (沈阳农业大学食品学院 沈阳 110161)²

(大连轻工业学院食品工程与生物工程学院 大连 116001)³

摘要: *Absidia* sp. R 是从酒曲中分离出的一株产大豆异黄酮糖苷水解酶活性较高的菌株。该菌最佳产酶条件为: 2.5% 的麦麸为碳源, 1% 的硝酸钠为氮源, 培养基起始 pH 为 7.0, 瓶装量为 40 mL/250 mL, 接种量 8%, 培养温度为 30℃, 转速为 160 r/min, 培养时间为 84 h, 其酶活力可达到 82 U/mL。除 Cu²⁺ 对该菌产酶有较强的抑制作用外, 金属离子对产酶影响不大。

关键词: 大豆异黄酮糖苷水解酶, 发酵条件, *Absidia* sp. R 菌株

中图分类号: Q556.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0041-04

Fermentative technology of Soybean Isoflavone Glucoside Hydrolase-Producing Strain

Xie Ming-jie¹ XU Chun-Hua² LIU Chang-Jiang LU Ming-Chun³ JIN Feng-Xie³

(Department of Biology Liaoning Normal University, Dalian 116029)¹

(College of Food, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161)²

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

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (NO. 20076007)

Project Granted by Chinese National Science Fund (NO. 20076007)

收稿日期: 2003-07-28, 修回日期: 2003-11-20

Abstract: A high active soybean isoflavone glucoside hydrolase-producing mould strain was isolated from spirit qu. Its optimal hydrolase-producing conditions were as follows: 2.5% wheat bran as carbon source, 1% NaNO_3 as nitrogen source, initial pH 7.0, culture medium volume 40 mL/250 mL, inoculating quantity 8%, culture temperature 30°C, revolutions 160 r/min and culture time 84 h. The enzyme activity reached 82 U/mL. Cu^{2+} can inhibit *Absidia* sp. R strain from producing the hydrolase, the influence of other metal ions was not remarkable on it.

Key words: Soybean isoflavone glucoside hydrolase, Fermentation conditions, *Absidia* sp. R strain

大豆异黄酮因具有明显的生物学活性已越来越引起社会和学术界的普遍关注,是近年来世界各国科学家研究的热点。近期的研究表明,大豆异黄酮与人类健康密切相关,具有许多生理功能,如抗肿瘤作用;对血管的防护作用;类似女性雌激素作用以及抗激素作用;预防骨质疏松症;较强的抗氧化活性和抗真菌活性等^[1,2]。迄今为止,已知大豆中的异黄酮共有12种异构体,分为游离型的苷元(Aglycon)和结合型的糖苷(Glucosides)两类,其中苷元占总量的2%~3%,糖苷占总量的97%~98%。但天然糖苷类的分子结构并不是活性的最佳状态,具有生理活性的成分主要是大豆异黄酮苷元^[3,4]。目前国外获得大豆异黄酮苷元的方法主要有酸解法和酶解法,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],而酶法由于具有反应条件温和,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。但目前国外高活性大豆异黄酮糖苷水解酶正在研制阶段,还没有进行工业化生产^[6]。本文利用从酒曲中筛选出的一种高产大豆异黄酮糖苷水解酶的菌株,对其产酶的发酵工艺条件进行了研究,旨在为工业化生产提供参考。

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 染料木苷(Genistin)和染料木素(Gen)标准品:购自美国Sigma公司,含量为99.999%。

1.1.3 染料木苷底物:购于营口渤海天然食品有限公司(含量为80%)

1.1.4 固体斜面培养基:5°麦芽汁1 L,琼脂18 g。

1.1.5 液体发酵培养基:麦麸10 g,蛋白胨10 g,水1 L, pH 7。

1.1.6 薄层层析板:硅胶板 Kieselgel 60 F-254,德国Merck公司生产。

1.2 方法

1.2.1 发酵方法:采用摇瓶发酵法,在250 mL三角瓶中加入60 mL液体培养基,接种量为1%(菌悬液中孢子含量为 10^6 /mL),于30°C,160 r/min培养84 h。

1.2.2 酶液的提取:上述液体发酵培养基在8,000 r/min下离心10 min,除去菌体,得到的上清液即为粗酶液。

1.2.3 酶液水解糖苷型大豆异黄酮试验:用0.02 mol/L, pH 5.0 HAc-NaAc缓冲液将Genistin配成浓度为10 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的比例混合,40°C下反应2 h后,加2倍体积的乙酸乙酯进行萃取,取萃取物10 μ L作薄层层析(TLC)。展开剂为氯仿:丁酮:甲醇: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酶活力。

1.2.4 酶活的测定:以 Genistin 为底物,以 Gen 为产物的酶活力和相对酶活力的测定按照 1.2.3 的方法进行。酶活力单位的定义是在上述测定条件下,每小时释放 1 nmol Gen 的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{酶活力 (U/mL)} = \frac{W}{M \times t \times V} \times 10^3$$

式中 W: 产物的生成量 (μg); M: 产物的分子量; t: 酶反应时间 (h); V: 酶液体积 (mL)

$$\text{相对酶活力 (\%)} = \frac{\text{Gen 的生成量}}{\text{Gen + Genistin 的量}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 培养基对产酶的影响

2.1.1 碳源对产酶的影响:以液体发酵培养基为基础,分别加入 7% 麦芽汁、1% 葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、麦麸作为碳源,1% 蛋白胨为氮源,按照 1.2.1 的发酵方法进行培养,84 h 后测定其酶活力。结果显示,以麦麸为碳源其产酶活性最高。

2.1.2 氮源对产酶的影响:以 1% 麦麸为碳源,分别以 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、蛋白胨、酵母膏和牛肉膏为氮源,按照 1.2.1 的发酵方法进行培养,84 h 后测定其酶活力。结果表明:无机氮源中以硝酸钠的酶活力高;有机氮源中以蛋白胨产酶活力高。

2.1.3 金属离子对产酶的影响:以 1% 麦麸为碳源,以硝酸钠和蛋白胨各 0.5% 为氮源,在液体发酵培养基中分别加入 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ag^+ ,以不加金属离子为空白,按照 1.2.1 的发酵方法进行培养,84 h 后测定其酶活力。测定结果显示:除 Cu^{2+} 对该菌产酶有较强的抑制作用外,其它金属离子对产酶影响不大,因此在以后的实验中不再考虑。

2.1.4 最佳培养基的筛选:在筛选出的培养基组分的基础上,选择 $L_9 (3^4)$ 正交表,考察硝酸钠、麦麸、蛋白胨和接种量对产酶的影响。经极差分析得出,对产酶影响最大的是接种量,其次为硝酸钠、麦麸和蛋白胨。培养基的最佳组成为:麦麸为 2.5%;硝酸钠 1%;接种量为 8%。

2.2 发酵条件对产酶的影响

2.2.1 不同装液量对产酶的影响:在 250 mL 三角瓶中分别装入不同量的上述培养基,接种量为 8%,其它条件同上,测定酶活力的结果见图 1。由图可知,最适的瓶装量为 40 mL/250 mL 三角瓶。

2.2.2 温度对产酶的影响:按照上述筛选出的最佳产酶条件,将培养基分别置于 26℃, 28℃, 30℃, 32℃ 和 34℃, 160 r/min 摇床中培养 84 h,然后测其酶活力,表明,温度在 26℃ ~ 34℃ 范围内对产酶量的影响不大,温度为 30℃ 时产酶量最高。

2.2.3 摇瓶转数对产酶的影响:在上述最佳条件的基础上,将培养基分别置于 140, 160, 180, 200 和 220 r/min 的摇床中培养,考查摇瓶转数对产酶的影响,实验结果见图 2。结果显示,转数低于 140 r/min,由于通氧性差,菌体生长不好,影响产酶量;但转数高于 200 r/min,会对菌丝体剪切过大,也不利于产酶;故选择转数为 160 r/min。

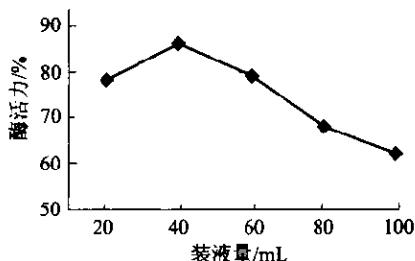


图1 瓶装量对产酶的影响

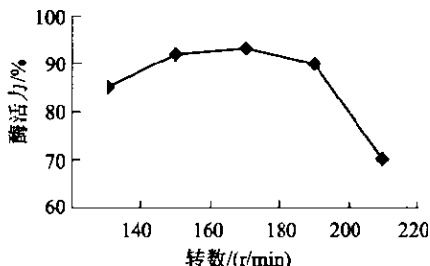


图2 摇瓶转数对产酶的影响

2.2.4 培养时间对产酶的影响: 在 250 mL 三角瓶中加入 40 mL 发酵培养基, 于 30℃、160 r/min 摇床中培养 48 h、60 h、72 h、84 h 和 96 h, 然后测其酶活力, 实验结果见图 3。当发酵培养至 84 h 后, 产酶达到高峰, 继续培养, 酶量增加幅度不大。

2.2.5 起始 pH 对产酶的影响: 在上述最佳培养条件下, 考查起始 pH 对产酶的影响, 结果见图 4。结果表明, 起始 pH 为 7 时, 发酵至 84h 后其酶活力最大。

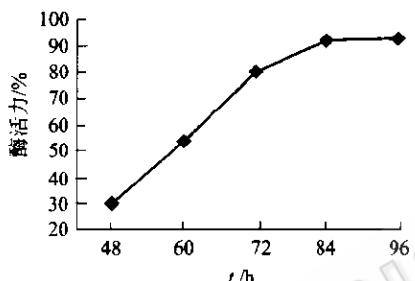


图3 培养时间对产酶的影响

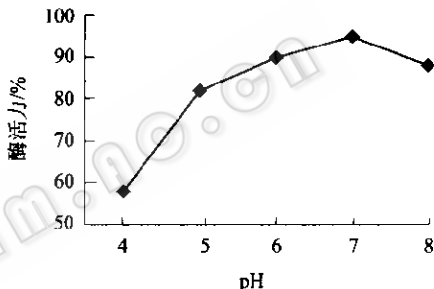


图4 pH对产酶的影响

2.2.6 发酵液酶活测定结果: 按照上述筛选的最佳条件, 即在 250 mL 三角瓶中加入 2.5% 的麦麸, 1% 的硝酸钠, 发酵液装量 40 mL/250mL, 接种量 8%, pH 7.0, 培养温度 30℃, 摇瓶转数 160 r/min, 培养 84 h 时后测定发酵液中的酶活力为 82 U/mL。

3 结论

本研究从酒曲中分离出一株产大豆异黄酮糖苷水解酶活性较高的菌株, 该菌在以 2.5% 的麦麸为碳源, 1% 的硝酸钠为氮源, 培养基起始 pH 7.0, 250 mL 三角瓶装量 40 mL, 接种量 8%, 培养温度 30℃, 摇瓶转数 160 r/min, 培养至 84 h 时产酶活力最高, 其酶活可达到 82 U/mL。

目前的研究已经证明, 大豆异黄酮的生理活性主要是大豆异黄酮苷元的活性, 而大豆中的异黄酮又主要是以结合型的糖苷存在, 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。本研究得到的产酶发酵工艺将为该酶的工业化生产起到一定的指导作用。

参考文献

- [1] Holder C L, Churchwell M I, Daniel R D. J Agric Food Chem, 1999, **47**: 3764~3770.
- [2] Michael N, Benjamin G, Shmuel Z, et al. J Agr food Chem, 1974, **22** (5): 806~810.
- [3] 井乐刚, 张永忠. 微生物学通报, 2003, **30** (2): 86~88.
- [4] 唐传核, 彭志英. 中国油脂, 2000, **25** (4): 44~47.
- [5] Jason L, Leslie J C, Bluck W, et al. Analytical Biochemistry, 1998, **264**: 1~7.
- [6] 孙艳梅, 张永忠. 食品研究与开发, 2002, **23**: 11~13.