

研究论文

纤维素酶对豆粕异黄酮提取的影响

陈庆庆, 夏黎明

(浙江大学化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310027)

摘要: 在常规的醇提工艺前用不同微生物来源的纤维素酶对豆粕进行预处理, 研究结果发现: 细菌纤维素酶能使异黄酮的提取率提高 1.4 倍, 产物以糖苷型异黄酮为主, 与直接醇提得到的产物组成相类似; 来自黑曲霉的纤维素酶对大豆异黄酮的提取率没有影响, 但能将糖苷型异黄酮转化为苷元型异黄酮; 里氏木霉纤维素酶能使醇提液中大豆异黄酮的提取率提高 1.6 倍, 并能把以糖苷型为主的异黄酮转化为具有更高生理活性的苷元型异黄酮。里氏木霉纤维素酶的最适用量为 $15 \text{ FPIU} \cdot (\text{g 豆粕})^{-1}$, 酶作用时间为 36 h。采用弱极性的大孔树脂精制苷元型异黄酮, 效果较好。

关键词: 豆粕; 纤维素酶; 糖苷型异黄酮; 苷元型异黄酮; 大孔树脂

中图分类号: TQ 032.42

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2007) 01-0136-05

Effects of cellulase on extracting isoflavone from soybean residue

CHEN Qingqing, XIA Liming

(Department of Chemical Engineering and Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China)

Abstract: Soybean residue from soybean oil manufacturers can be used to extract isoflavone. Soybean residue was pre-hydrolyzed by cellulase from different microbes, then the hydrolyzate was obtained and the solid residue was extracted by using 70% ethanol. When using the cellulase from *Bacillus* sp ZU-4, the isoflavone yield was 1.4 times as that by normal ethanol extraction and the isoflavone composition was unchanged. When using the cellulase from *Aspergillus niger* ZU-7, the isoflavone yield was not increased but glucoside isoflavones were transformed to aglycones. By pre-hydrolysis with cellulase from *Trichoderma reesei* ZU-5, the isoflavone yield was increased by 1.6 times and at the same time the isoflavone composition was transformed to aglycones with higher physiological activity. The optimal dosage of cellulase from *Trichoderma reesei* ZU-5 was $15 \text{ FPIU (Filter Paper International Units)} \cdot (\text{g soybean residue})^{-1}$ and the treating time was 36 h. When selecting macroporous resin for isoflavones absorption and desorption, the macroporous resin with weak polarity was proper for purifying aglycone isoflavones.

Key words: soybean residue; cellulase; glucoside isoflavone; aglycone isoflavone; macroporous resin

引 言

大豆异黄酮是一类植物雌激素, 它在抗癌防癌、预防心血管疾病、预防骨质疏松和改善妇女更

年期综合征等方面有重要作用^[1-5]。大豆异黄酮主要由 12 种化合物组成, 并可分为游离型的苷元和结合型的糖苷两类, 苷元包括染料木黄酮 (genistein)、黄豆苷元 (daidzein) 和黄豆黄素

(glycitein), 其中黄豆黄素含量极低; 糖苷包括三大类, 为 7-葡萄糖苷、6-*o*-乙酰基葡萄糖苷和 6-*o*-丙二酰基葡萄糖苷。豆粕是食用油加工中产生的副产品, 绝大多数被用作饲料, 而其中的大豆异黄酮留在豆粕中未被利用, 造成豆粕资源的极大浪费。在大豆异黄酮的常规乙醇提取过程中, 由于细胞壁的作用, 有效成分不易溶出, 降低了醇提的效果。而纤维素酶能破坏细胞壁的结构, 从而增加细胞内物质的溶出。大孔吸附树脂是一类新型的非离子型高分子吸附剂, 广泛应用于中草药有效成分的分离和纯化。本文主要探讨了不同微生物来源的纤维素酶的预处理对脱脂豆粕中异黄酮乙醇提取率以及对异黄酮组成成分的影响, 并初步考察了大孔树脂对不同组成的异黄酮吸附和解吸效果, 为纤维素酶在植物中有效成分的提取和分离提供一定的依据。

1 材料与方 法

1.1 原料和试剂

不同微生物来源的纤维素酶由本实验室自制。由细菌 (*Bacillus* sp ZU-4) 液体发酵制成的纤维素酶制剂^[6], 经硫酸铵沉淀后制成粗酶粉, 其内切型- β -葡聚糖酶活力为 $8.3 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 未测出滤纸酶活和 β -葡萄糖苷酶酶活; 由黑曲霉 (*Aspergillus niger* ZU-7) 固态发酵制备而成的纤维素酶制剂^[7], 每克干酶曲含 β -葡萄糖苷酶活力为 432IU, 未测出滤纸酶活和内切型- β -葡聚糖酶酶活; 由里氏木霉 (*Trichoderma reesei* ZU-5) 固态发酵制备而成的纤维素酶^[8], 每克干酶曲含 146 个滤纸酶活力国际单位 (FPIU), CMC 活力为 $1.6 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, β -葡萄糖苷酶活力为 $22 \text{ IU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

脱脂豆粕购于山东。大孔树脂 NKA-9、AB-8 和 S-8 购于南开大学化工厂, HZ-816 和 HZ-801 由上海华震科技有限公司赠送, SD-200 由杭州增光树脂厂赠送。标准品染料木黄酮 (genistein, Ge)、黄豆苷元 (daidzein, De)、染料木苷 (genistin, G) 和黄豆苷 (daidzin, D) 购于上海同田生化技术有限公司。乙醇为分析纯, HPLC 分析用流动相乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈瓶装纯净水。

1.2 纤维素酶的活力测定

纤维素酶总活力 (滤纸酶活) 和 β -葡萄糖苷酶按 Ghose^[9] 方法测定: 一个滤纸酶活力国际单位

(FPIU) 等于酶促反应中每分钟生成 $1.0 \mu\text{mol}$ 葡萄糖 (以还原糖表示) 的酶量; 一个 β -葡萄糖苷酶活力国际单位等于标准酶促反应条件下每分钟生成 $2.0 \mu\text{mol}$ 葡萄糖的酶量, 以 $\text{IU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 表示, 用纤维二糖作为底物; 内切型- β -葡聚糖酶活力单位定义为在酶促反应中每小时生成 1 mg 还原糖所需要的酶量 (以葡萄糖量表示), 以 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 表示, 用羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 作为底物^[6]。

1.3 酶对脱脂豆粕的预处理和常规的乙醇提取工艺

称取 10 g 脱脂豆粕, 加入适量的经稀释的不同微生物来源的纤维素酶液, 使豆粕的底物浓度为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 调 pH 值为 4.8 (细菌纤维素酶的为 9.5), 50°C 反应。作用一定时间后, 离心, 得上清液 (酶解液), 用 HPLC 法测定上清液中的异黄酮含量和组分, 离心残渣加入 95% 乙醇 100 ml , 50°C 水浴振荡 4.5 h , 过滤, 用紫外分光光度法测定醇提液中的异黄酮含量, 并用 HPLC 法分析溶液中各异黄酮成分。

1.4 不同大孔树脂对异黄酮吸附和解吸效果的影响

称取 6 种大孔树脂 (表 1) 各 10 g 于三角瓶中, 分别加入经酶预处理和未经酶预处理的 100 ml 浓度为 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的大豆异黄酮醇提浓缩液, 25°C 振荡 24 h (振荡频率为每分钟 90 次)。过滤, 保留滤液, 用蒸馏水洗涤树脂, 再将树脂浸泡在 100 ml 95% 的乙醇中, 25°C 振荡解吸 24 h , 用紫外分光光度法测定滤液即吸附上清液和解吸液中异黄酮的浓度。吸附率和解吸率分别为

$$\text{树脂吸附率} = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%$$

$$\text{树脂解吸率} = C_2 / (C_0 - C_1) \times 100\%$$

式中 C_0 为吸附前样液中异黄酮的浓度, $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; C_1 为吸附后上清液中异黄酮的浓度, $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; C_2 为解吸液中异黄酮的浓度, $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

1.5 大豆异黄酮总含量测定

采用 751GW 紫外分光光度计 (上海分析仪器厂)。大豆异黄酮的总含量测定按张玉梅等^[10] 的方法测定, 以其中的染料木黄酮作为标准品, 在其最大紫外吸收峰 259 nm 处测定。

1.6 HPLC 测定大豆异黄酮成分组成

高效液相色谱仪来自于美国 syltech 公司 Model 500G 型的高压梯度系统。该系统包括: 两个蠕动泵, 紫外检测器, 7725i 手动进样阀, 微孔

滤膜过滤器, 超声波脱气机, 柱温箱。分析用柱子为 YMC 公司的反相 C₁₈ 柱 (φ4.6 mm×150 mm)。测定条件如下: 进样量 20 μl, 检测波长 254 nm, 柱温 40℃, 流速 1.0 ml·min⁻¹。溶剂 A: 10% 乙腈 (含 0.1% 三氯乙酸), 溶剂 B: 90% 乙腈 (含 0.1% 三氯乙酸), 梯度: 在 30 min 内溶剂 A 从 100% 下降到 30%。上样前用溶剂 A 平衡 10 min。

采用浙江大学智达信息工程有限公司的 N2000 色谱工作站, 以外标法计算大豆异黄酮含量。

表 1 大孔树脂的物理性质和类型

Table 1 Physical properties and types of macroporous resins

Resin types	Radius/mm	Surface area /m ² ·g ⁻¹	Average diameter/nm	Polarity
AB-8	0.4—0.6	500—600	130—140	weak
NKA-9	0.6—0.8	870	17	strong
S-8	0.5—0.6	600—700	—	strong
HZ-801	0.4—0.6	500—600	—	weak
HZ816	0.6—0.8	600—700	—	none
SD-200	0.5—0.6	600—800	—	strong

2 结果与讨论

2.1 *Aspergillus niger* ZU-7 纤维素酶对豆粕异黄酮提取的影响

由表 2 可以看出, 经酶作用 24 h 后, 黑曲霉纤维素酶对异黄酮提取得率没有促进作用, 但能把糖苷型为主的异黄酮转化为以苷元型为主的异黄酮。这是因为黑曲霉纤维素酶中以 β-葡萄糖苷酶为主, 而滤纸酶活和内切型-β-葡聚糖酶活未测出, 因此对豆粕细胞壁的破坏作用很小, 对提高通透性作用有限; 而 β-葡萄糖苷酶能把糖苷型的异黄酮切掉葡萄糖基, 变成游离的苷元型异黄酮。

表 2 *Aspergillus niger* ZU-7 纤维素酶对豆粕异黄酮提取的影响

Table 2 Effects of cellulase from *Aspergillus niger* ZU-7 on isoflavone extraction of soybean residue

Enzyme /mg	Total isoflavone content /mg·g ⁻¹	Isoflavone composition/%	
		Glucoside (D+G)	Aglycone (De+Ge)
0	2.394	90.34	9.66
92.5	2.423	4.01	95.99
185	2.387	3.58	96.42
278	2.256	4.23	95.77

2.2 *Bacillus sp* ZU-4 纤维素酶对豆粕异黄酮提取的影响

由表 3 可以发现, 经酶作用 24 h 后, 随着酶用量的增加, 总异黄酮含量也提高, 这是因为细菌纤维素酶以内切型-β-葡聚糖酶酶活为主, 但是未测出滤纸酶活, 所以能在一定程度上破坏细胞壁的结构, 提高通透性, 从而提高提取率。当酶用量为 1.44 g 和 1.92 g 时, 醇提液中异黄酮含量已接近。说明增加酶量已不能进一步提高总异黄酮提取率。另外, 由于 β-葡萄糖苷酶活性未测出, 因此经细菌纤维素酶作用后, 异黄酮结构组成基本没有发生变化。

表 3 *Bacillus sp* ZU-4 纤维素酶对豆粕异黄酮提取的影响
Table 3 Effects of cellulase from *Bacillus sp* ZU-4 on isoflavone extraction of soybean residue

Enzyme /mg	Total isoflavone content /mg·g ⁻¹	Isoflavone composition/%	
		Glucoside (D+G)	Aglycone (De+Ge)
0	2.394	90.34	9.66
0.96	2.864	91.04	8.96
1.44	3.357	89.68	10.32
1.92	3.412	90.58	9.42

2.3 *Trichoderma reesei* ZU-5 纤维素酶对豆粕异黄酮提取的影响

里氏木霉纤维素酶酶系比较齐全, 包括内切型-β-葡聚糖酶 (EC3.2.1.4), 外切型-β-葡聚糖酶 (EC3.2.1.91) 和 β-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21), 它们不仅能协同降解纤维素, 破坏细胞壁的结构, 提高通透性, 而且由于 β-葡萄糖苷酶的作用, 可以增加苷元型异黄酮含量。下面主要研究里氏木霉纤维素酶的不同酶用量和处理时间对豆粕异黄酮提取和组成的影响。

2.3.1 酶水解液中异黄酮含量和组成的变化情况
由图 1 (a) 的 HPLC 图谱可以看出, 在酶水解液中, 染料木黄酮 (genistein)、黄豆苷元 (daidzein)、染料木苷 (genistin) 和黄豆苷 (daidzin) 含量都很低, 这是由于它们在水溶液中的溶解度比较低, 因此, 在紫外分光光度法中表现出来的吸收可能为丙酰基或乙酰基糖苷型大豆异黄酮, 因为它们在水溶液中溶解度良好。当然, 也有可能是别的在 254 nm 处有光吸收的物质, 这有待于进一步研究。

2.3.2 乙醇提取液中异黄酮含量和组成的变化情况
豆粕经里氏木霉纤维素酶预处理后, 按照常规

工艺进行乙醇提取 4.5 h。醇提液中异黄酮的含量变化情况见表 4。

表 4 纤维素酶预处理对乙醇提取液中异黄酮含量的影响
Table 4 Effects of pretreatment by cellulase on yield of isoflavone in ethanol extract of soybean residue/mg

Treating time/h	Enzyme dosage/FPIU · (g soybean residue) ⁻¹				
	0	5	10	15	20
3	13.91	15.16	18.00	17.38	20.08
6	14.20	16.09	18.17	20.66	22.21
12	14.78	18.01	19.36	21.95	23.23
18	14.45	20.57	22.10	23.43	23.63
24	16.08	20.22	22.49	24.09	24.47
30	15.57	19.60	21.42	24.52	25.81
36	16.93	21.42	23.12	26.60	26.64
48	16.58	21.84	21.85	23.73	26.41

从表 4 可以看出，经里氏木霉纤维素酶预处理，再经相同时间的乙醇提取，大豆异黄酮的含量有一定程度的提高，这说明纤维素酶对细胞壁的降解破坏对醇提有促进作用。且可以看出，经 36 h

不同剂量酶预处理后，对醇提的促进效果最明显，其中，15 FPIU · (g 豆粕)⁻¹ 的酶剂量和 20 FPIU · (g 豆粕)⁻¹ 的酶剂量的促进效果已基本一致，和不经纤维素酶预处理相比，增加 1.6 倍。而且，经过酶的处理，糖苷型异黄酮已经转化为苷元型异黄酮 [见图 1 (c)]。而越来越多的研究表明，异黄酮以游离的苷元型在体内发挥作用，而且苷元型异黄酮和糖苷型异黄酮相比，具有更高的生物利用度^[11-14]。所以，在大豆异黄酮的分离提取过程中，不仅要关注总的异黄酮含量，更要注意其结构形式。因此，经过里氏木霉纤维素酶的预处理，不仅能提高醇提的效果，而且能改变异黄酮成分的组成，使其以苷元型为主，从而提高其生理活性，增加了附加值，这一点具有十分重要的意义。

因此，里氏木霉纤维素酶对豆粕异黄酮有双重功能，一是破坏细胞壁，提高乙醇提取率；二是转化异黄酮，使异黄酮具有更高生理活性。

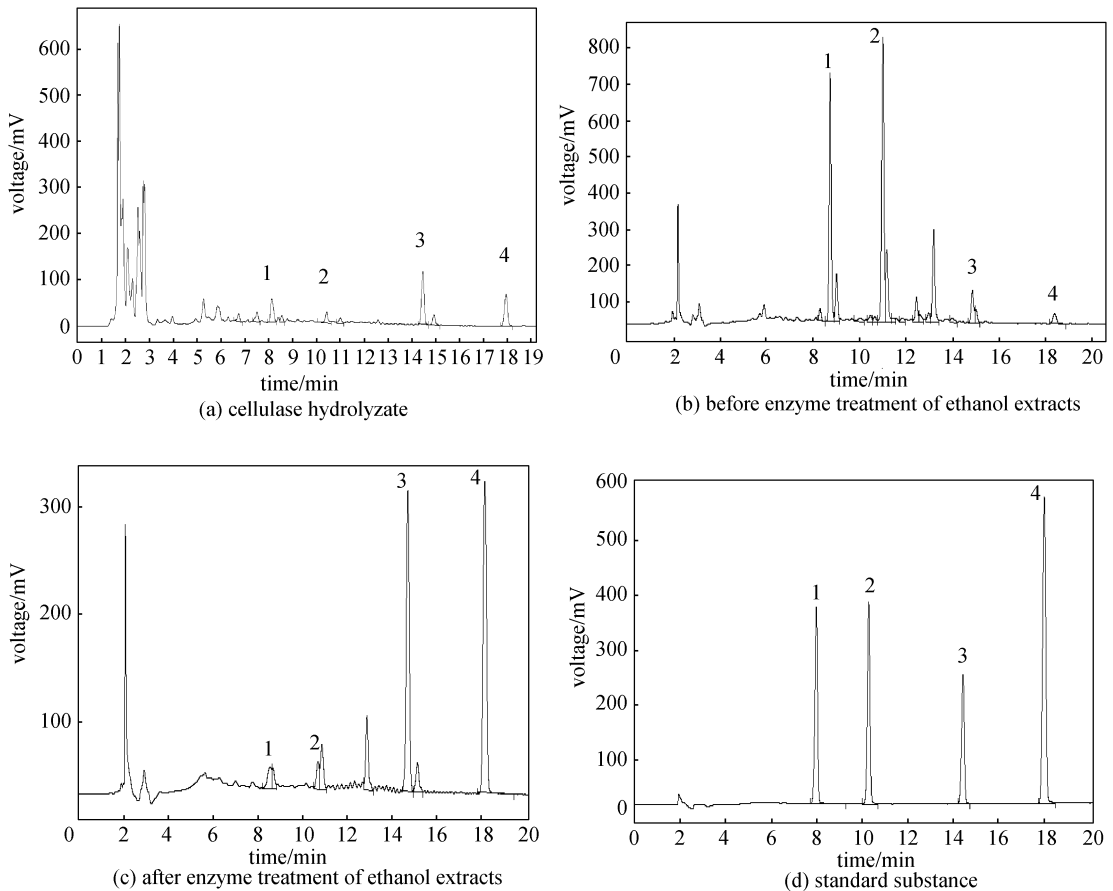


图 1 *Trichoderma reesei* ZU-5 纤维素酶处理前后的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of before/after cellulase treatment from *Trichoderma reesei* ZU-5

1—genistin; 2—daidzin; 3—genistein; 4—dadzein

2.4 不同大孔树脂对异黄酮吸附和解吸效果的影响

由表 5 可以看出, 不同大孔树脂对苷元型异黄酮和糖苷型异黄酮的吸附和解吸作用是不同的。对于苷元型为主的异黄酮, AB-8 和 HZ-801 具有良好的精制效果, 而对于以糖苷型为主的异黄酮, HZ-816 和 SD200 具有较好的精制效果。这是由于苷元型异黄酮失去葡萄糖基而极性较小, 从而容易被弱极性的大孔树脂吸附和解吸, 而糖苷型异黄酮由于葡萄糖基的作用, 具有一定的极性, 因此极性的 SD200 大孔树脂对其精制效果较好, 对于 HZ-816, 虽然为非极性树脂, 但是由于其比表面积较大, 而大孔树脂吸附以物理吸附为主, 因而吸附效果也较好。在已发表的有关大孔树脂精制大豆异黄酮的文献中, 一般都以总异黄酮含量作为指标, 很少关注异黄酮的结构组成, 从而造成大孔树脂吸附效果的差别。因此, 在使用大孔树脂精制大豆异黄酮时, 必须首先考察异黄酮的具体组成成分, 这样才能有针对性地筛选出精制效果良好的大孔树脂。

表 5 不同大孔树脂对异黄酮吸附和解吸的影响

Table 5 Effects of different macroporous resin on isoflavone absorption and desorption

Macroporous resin	Aglycone isoflavone		Glucoside isoflavone	
	Absorption capacity /mg	Desorption capacity /mg	Absorption capacity /mg	Desorption capacity /mg
AB-8	40.0	30.7	37.6	37.0
NKA-9	36.0	27.9	13.2	8.53
HZ-801	38.3	31.8	27.8	26.8
S-8	40.4	28.2	42.0	23.0
SD200	41.1	26.3	42.2	39.8
HZ-816	32.4	19.3	41.6	41.2

3 结 论

对于细菌纤维素酶, 经其预处理后, 异黄酮的提取得率提高 1.2 倍 $[1.44 \text{ g} \cdot (10 \text{ g 底物})^{-1}]$; 而经黑曲霉纤维素酶的预处理后, 大豆异黄酮的提取得率没有改变, 但是却能把以糖苷型为主的异黄酮转化为苷元型异黄酮。而来自里氏木霉的纤维素酶最适用量为 $15 \text{ FPIU} \cdot (\text{g 豆粕})^{-1}$, 经其预处理 36 h 后, 能使醇提液中大豆异黄酮的提取得率提高 1.6 倍, 并能把以糖苷型为主的异黄酮转化为具有更高生理活性的苷元型异黄酮。来自里氏木霉的纤维素酶在大豆异黄酮的提取中具有双重功能。另外, 在吸附和解吸大豆异黄酮时, 要考虑异

黄酮的结构组成, 才能有针对性地筛选大孔树脂, 从而提高提纯效果。采用弱极性的大孔树脂精制苷元型异黄酮, 效果较好。

References

- [1] Song Yongsheng (宋永生), Zhang Bingwen (张炳文), Hao Zhenghong (郝征红), *et al.* Research progress on the soybean isoflavone. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology* (中国食品学报), 2002, **6** (6): 61-68
- [2] Fred Brouns. Soya isoflavones; a new and promising ingredient for the health foods sector. *Food Research International*, 2002, **35**: 187-193
- [3] Paul Nestel. Isoflavones; effects on cardiovascular risk and functions. *International Congress Series*, 2004, **1262**: 317-319
- [4] Alyson L. Huntley, Edzard Ernst. Soy for the treatment of perimenopausal symptoms—a systematic review. *Maturitas*, 2004, **47**: 1-9
- [5] Uzzan M, Labuza T P. Critical issues in R&D of soy isoflavone-enriched foods and dietary supplements. *Journal of Food Science*, 2004, **69** (3): 77-86
- [6] Shen Xuelian (沈雪亮), Xia Liming (夏黎明). Studies on screening of cellulase producing bacteria and enzymatic characteristics thereof. *Chemistry and Industry of Forest Products* (林产化学和工业), 1999, **19** (1): 6-10
- [7] Xia Liming (夏黎明). Cellobiase production by a selected *Aspergillus niger* strain in solid state fermentation. *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业), 1999, **25** (2): 1-5
- [8] Xia Liming, Cen Peilin. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*, 1999, **34** (9): 909-912
- [9] Ghose T K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Appl. Chem.*, 1987, **59** (2): 257-268
- [10] Zhang Yumei (张玉梅), Zhang Xuebin (张学斌), Gao Xunian (高旭年), *et al.* Detection of soybean isoflavone by the method of ultraviolet spectrophotometry. *Chinese Journal of Food Hygiene* (中国食品卫生杂志), 2000, **12** (4): 7-9
- [11] Kenneth D R Setchell, Nadine M Brown, Linda Zimmer-Nechemias, *et al.* Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, **76**: 447-453
- [12] Mariusz K Piskula, Jun Yamakoshi, Yukihiko Iwai. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Letters*, 1999, **447**: 287-291
- [13] Toru Izumi, Mariusz K Piskula, Sachiko Osawa, *et al.* Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *The Journal of Nutrition*, 2000, **130**: 1695-1699
- [14] He Fujin (何福金), Wang Jian (王健), Niu Jianzhao (牛建昭), *et al.* Experimental study on growth inhibition and angiogenesis transplanted tumor caused by genistein *in vivo*. *Chinese Pharmacological Bulletin* (中国药理学通报), 2003, **19** (1): 73-76