

基于微生物固态发酵豆粕转化大豆异黄酮的研究

杨守凤, 徐建雄

(上海交通大学农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

摘要: 大豆异黄酮具有较高的营养价值和生理保健功能, 现已广泛应用到食品、饲料和医药等领域中。为了研究 EM 菌、枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 和植物乳酸杆菌 ATCC 8014 单独和混合发酵对大豆异黄酮 (Soybean isoflavones, SIF) 转化效率的研究, 本实验将接种量的接种水平全部考虑进去建立微生物固态发酵和菌种组合的方法, 通过真空密封发酵和高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 分析方法研究大豆异黄酮中糖苷转化为苷元的效率, 此外, 还研究了饲料发酵后的干物质含量和在优化条件下样品的重复性研究。结果表明, 三种微生物的单独发酵都比混合发酵的效果好, 在 7 d 后枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 单独发酵的效果最好, 其苷元含量占大豆异黄酮的比例达到 64.56%, 且样品重复性和稳定性较高, 从而为工业化发酵转化 SIF 提供一定的理论基础和参考依据。

关键词: 枯草芽孢杆菌 ATCC 6633; EM 菌; 大豆异黄酮; 大豆苷元

文章编号: 1673-9078(2013)8-1867-1871

Biotransformation of Soybean Isoflavone by Microbial Solid-state Fermentation

YANG Shou-feng, XU Jian-xiong

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Key Laboratory of Veterinary Bio-tech, Shanghai, 200240)

Abstract: Soybean isoflavones (SIF) are rich in nutritional value and healthy benefit, which had been widely applied in various fields including food, feed, medicine and so on. To extend the application of SIF for industrialization production, the efficacy of biotransformation of SIF by microbial solid-state fermentation was studied using EM strains, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Lactobacillus planetarium* ATCC 8014 for single and mixed fermentation. Effects of combined strains and incubation size were investigated for improve the biotransformation efficiency of SIF through vacuum sealed fermentation. The repeatability of the samples was also investigated under the optimized fermentation conditions. The results demonstrated that the single strain-mediated fermentation resulted in higher biotransformation efficacy than that with mixed strains, and the ratio of aglycone in total SIF content reached 64.56% after 7 d by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* ATCC 6633. The fermentation had high repeatability and stability.

Key words: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; EM strain; soybean isoflavones; aglycone

我国是大豆产量比较多的国家之一, 2013 年的大豆产量达到 1400 万吨左右, 大豆含丰富的植物蛋白、低聚糖、大豆异黄酮 (Soybean isoflavones, SIF) 和卵磷脂等营养成分已被逐渐应用到食品和医药等领域中^[1-2]。其中, 大豆中 SIF 的含量比较高, 豆粕是大豆压榨后的固体残留物, 是动物饲料的重要来源之一。因为 SIF 人体内不能自身合成, 必须通过水解或

收稿日期: 2013-05-03

基金项目: 国家自然科学基金 (30972103)

作者简介: 杨守凤 (1990-), 女, 研究生, 研究方向: 微生物发酵和大豆异黄酮的提取和转化

通讯作者: 徐建雄 (1962-), 男, 教授, 研究方向: 饲料科学、分子营养学和分子免疫

微生物发酵转化 SIF 才能被人或动物体吸收和利用^[3]。

大豆中天然存在的 SIF 主要可分为染料木素 (Genistein) 类、大豆苷元 (Daidzein) 类和黄豆黄素 (Glycitein) 等 3 大类^[4]。SIF 主要以 SIF 苷元和 SIF 糖苷两种形式存在^[5], 后者只有通过酶解或酸水解将其转化为苷元, 才能提高 SIF 的活性^[6]。在亚洲, SIF 的摄入量大约为 50~70 mg/d^[7]。研究表明, 摄入一定量的 SIF 可有效降低老年患骨质疏松症、妇女更年期综合症、高胆固醇、心血管疾病和癌症等风险^[8]。

目前, 转化 SIF 的方法主要有酸水解法和酶处理等方法^[9-10], 但这些方法存在产量低、成本高、反应条件苛刻和对人体健康有害等弊端, 不能进行大规模推广应用。近年来, 因微生物发酵具有无污染、酶活高和

成本低等优点, 已被广泛应用于转化SIF的研究中^[11]。豆奶发酵过程中β-葡萄糖苷酶转化大豆异黄酮糖苷配基、丙二酰、乙酰和β-葡萄糖糖苷同分异构体的化学结构如图1所示^[4]。因此, 筛选转化SIF转化效率较高的菌株、优化培养条件和微生物法制备SIF苷元并将其进行产业化生产, 将有较大的经济效益和应用价值。

本实验首先选用高效转化 SIF 的 3 株菌株, 通过单独发酵和复合发酵豆粕粉的试验比较, 采用微生物固态发酵和菌种组合方法, 最后用高效液相色谱法研究 SIF 中苷元的转化效率。本实验可为大规模生产和产业化制备 SIF 苷元提供一定的参考依据, 具有广阔的应用前景。

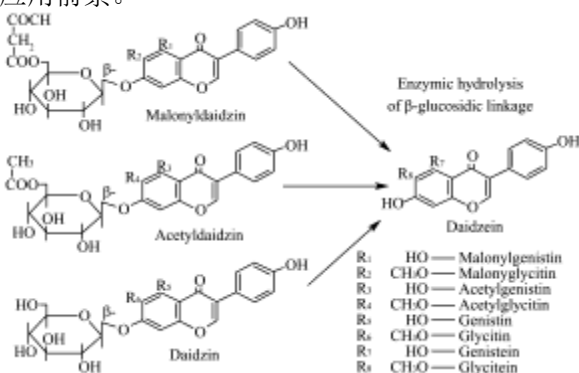


图 1 豆奶发酵过程中 β-葡萄糖苷酶转化大豆异黄酮糖苷配基、丙二酰、乙酰和 β-葡萄糖糖苷同分异构体的化学结构^[4]

Fig.1 Chemical structures of malonyl-, acetyl- and β-glucoside isoflavone isomers and the biotransformation into isoflavone aglycone configuration caused by bacterial β-glucosidase during fermentation of soymilk^[4]

注: 丙二酰染料木甙 (Malonylglycitin); 丙二酰黄豆甙 (Malonylglycitin); 乙酰染料木甙 (Acetylglycitin); 乙酰黄豆甙 (Acetylglycitin); 染料木苷 (Genistin); 黄豆黄苷 (Glycitin); 染料木素 (genistein); 黄豆黄素 (Glycitein); 丙二酰大豆黄甙 (Malonyldaidzin); 乙酰大豆黄甙 (Acetyldaidzin); 异黄酮苷 (Daidzin); 黄豆苷元 (Daidzein)。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

大豆异黄酮标准品, 纯度 99%, Sigma 公司; 豆粕、EM 菌种和锡箔自封袋, 上海创博现代自然农业集团惠赠; 植物乳酸杆菌 ATCC 8014 和枯草芽孢杆菌 ATCC 6633, 上海艾研生物科技有限公司; MRS 培养基和 LB 培养基, 上海艾研生物科技有限公司; 二甲基亚砜、甲醇 (色谱纯) 和磷酸等试剂均购于上海医药集团上海化学试剂公司, 实验用水均为二次蒸

馏水。溶液的 pH 调节液为 0.1 N HCL 和 NaOH 溶液。

台式高速离心机, 北京医用离心机厂; 超细粉碎机 CM-010, 上海唯唯粉碎机有限公司; 高效液相色谱仪 (Thermo Surveyor), 美国 Thermo 公司, SB-80 超声波仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 恒温干燥箱 BPN-150CW (上海一恒仪器有限公司); 十万分之一分析天平 (美国 Thermo 公司); 酸度计, 上海精科实业有限公司; 超净工作台, 上海荣翔实验室设备有限公司; 封口机, 上海三联包装机械有限公司。

1.2 检测大豆异黄酮标准曲线的建立

本实验采用混表法建立 SIF 的标准曲线, 准确称取大豆苷 (Daidzin)、染料木苷 (Genistin)、大豆苷元 (Daidzein) 和染料木素 (Genistein) 各 4 mg, 分别加入二甲基亚砜于 10 mL 的容量瓶中, 超声 0.5 h 之后, 定容至 10 mL, 摇匀备用。各标准溶液的终浓度均为 400 mg/L。分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mL 的标准溶液于 10 mL 的容量瓶中, 加入等体积的水, 用二甲基亚砜定容到 10 mL, SIF 的混合标准溶液的终浓度为 4、8、16、24、32、40 和 48 mg/L。

改进国标中保健食品中 SIF 的高效液相色谱的检测条件^[12]: C¹⁸, 4.6×150 mm, 粒度 5 μm 不锈钢色谱柱; 流动相为流动相 A (色谱纯乙腈) 和流动相 B (pH 3.0, 0.02 mol/L 磷酸溶液); 流速为 1.0 mL/min; 波长 260 nm; 进样量为 10 μL; 柱温 30 °C; 梯度洗脱条件如表 1 所示。

表 1 高效液相色谱法检测大豆异黄酮的梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions for the determination of soy isoflavone by HPLC

时间/min	0	10	20	25	35	40	42
流动相 A/%	12	18	24	30	80	12	12
流动相 B/%	88	82	76	70	20	88	88

1.3 EM 菌、植物乳酸杆菌 ATCC 8014 和枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 菌种的扩培

EM 菌种为上海创博现代自然农业集团惠赠, 无需扩培即可使用, 将保存在安瓿管中的植物乳酸杆菌 ATCC 8014 和枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 菌株转移到 100 mL 的 MRS 培养基和 LB 培养基中 37 °C 培养 48 h (200 r/min)。按 4% 的接种量, 从上述的菌液中吸取 8 mL 转移到 100 mL 的 MRS 培养基和 LB 培养基中 37 °C 培养 48 h (200 r/min)。扩培后菌液浓度为 10⁹

CFU/mL 的菌落形成单位。

1.4 EM菌、植物乳酸杆菌ATCC 8014和枯草芽

孢杆菌ATCC 6633的生长曲线的绘制

将扩培后的菌液在 1、2、3、4、5、6、7、8、9 d 时在 600 nm 波长下测定菌种的比浊度，绘制 EM 菌、植物乳酸杆菌 ATCC 8014 和枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 的生长曲线。

1.5 基于三种微生物固态发酵转化大豆异黄酮的试验方法建立

将风干豆粕粉碎过 40 目筛，灭菌后在超净台中称取 100 g，按照表 2 的接种量进行接种，搅拌均匀，然后装入锡箔自封袋中，用封口机密封。在 30 °C 的恒温培养箱中培养 7 d。发酵后，肉眼能够观察到锡箔自封袋中会产生大量气体，并有扑鼻的香味。

准确称取 0.5 g 样品，用 80% 的甲醇溶液溶解，在超声波振荡器中振荡 20 min，然后用 80% 甲醇定容至 50 mL，离心机离心 15 min (10000 r/min)，取上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤，吸取 2 mL 上述滤液于色谱瓶中备用。

表 2 基于微生物固态发酵从豆粕转化大豆异黄酮的实验设计

Table 2 Experimental design for the biotransformation of soybean meal into isoflavone by microbial solid-state fermentation

组别	EM 菌种	枯草芽孢杆菌	植物乳酸杆菌
	/mL	ATCC 6633 /mL	ATCC 8014 /mL
1	1	3	2
2	1	2	3
3	2	1	3
4	2	3	1
5	3	2	1
6	3	1	2
7	6	0	0
8	0	6	0
9	0	0	6

对照组是已灭菌未发酵的豆粕，样品的处理方法同上。我们前期使用 4%、5%、6%、7%、8% 的接种量对 EM 菌、植物乳酸杆菌 ATCC 8014 和枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 三株菌种进行转化 SIF 的实验研究，结果发现 6% 的接种量转化 SIF 的效率最高。因此，我们就采用 6% 的接种量进行接种和微生物固态发酵。我们把单一菌种和复合菌种的接种量的接种水平全部考虑进去所建立的菌种组合方法（表 2 所示）。根据 1.2 所建立的色

谱方法进行检测。

2 结果和讨论

2.1 大豆异黄酮标准曲线的建立

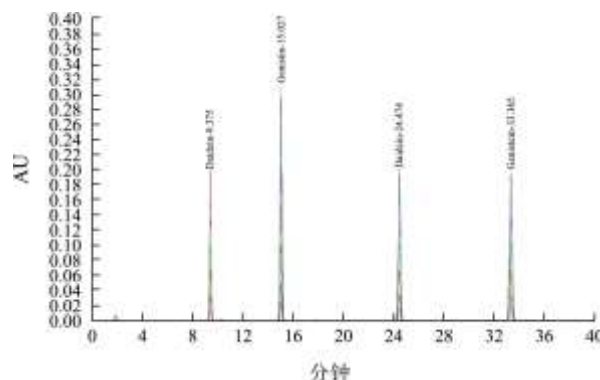


图 2 高效液相色谱检测大豆异黄酮的响应曲线

Fig.2 HPLC chromatogram of soy isoflavone

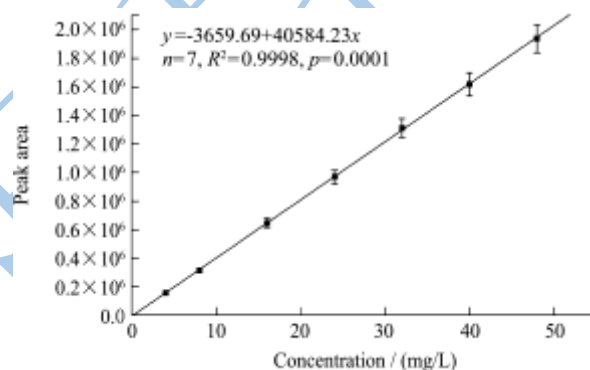


图 3 高效液相色谱检测大豆异黄酮的标准曲线

Fig.3 Calibration curve of soy isoflavone

在同等梯度洗脱的条件下，高效液相色谱检测 SIF 的时间响应曲线如图 2 所示。具体的色谱检测条件见 1.2。大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素的出峰时间分别在 9.40、15.03、24.45 和 33.36 min。大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素的峰值随着浓度的增加而不断增大。大豆异黄酮的混合标准溶液的标准曲线如图 3 所示。采用高效液相色谱检测 SIF 的标准曲线回归方程为 $y = -3659.69 + 40584.23X$ ($R = 0.9998$), $n = 7$, $P < 0.0001$ ，在 4~48 mg/L 的范围内具有良好的线性关系。

2.2 EM 菌、植物乳酸杆菌 ATCC 8014 和枯

草芽孢杆菌 ATCC 6633 生长曲线

EM 菌、植物乳酸杆菌 ATCC 8014 和枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 的生长曲线如图 4 所示，与植物乳酸杆菌 ATCC 8014 和枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 相比，EM 菌种在 1 d 时生长速度比较慢，但 5 d 后，EM 菌的生

长速度大于其它两种菌,这可能是因为EM菌是复合菌种,前期EM菌由于受到营养物质和生存的竞争,生长较为缓慢,后期优势菌群的生长速度比较快。三种菌都在5d时生长速度最快,5d以后生长速度达到平衡。

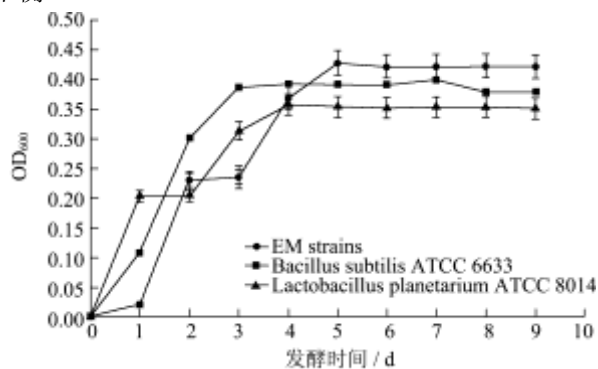


图4 EM菌、植物乳酸杆菌 ATCC 8014 和枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 生长曲线

Fig.4 Growth curve of EM strains, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Lactobacillus planetarium* ATCC 8014

2.3 微生物发酵转化大豆异黄酮的实验研究

前期我们研究了三种菌种在1、2、3、4、5、6、7、8、9和10d时单独发酵豆粕转化SIF的实验,研究表明发酵后SIF的苷元所占比例在7d时最高,7d以后逐渐平衡。因此,我们选择7d用豆粕进行固态密封发酵。

为了研究微生物单独和混合发酵转化SIF的效率,按照菌种的接种量进行组合设计,对照组和3种菌在发酵7d后的高效液相色谱图如图5所示,对照组的大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素分别为1227.31、1814.84、58.78和73.31 mg/kg(表3所示)。枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 在发酵7d后大豆苷,染料木苷,大豆苷元和染料木素分别为590.95、783.55、1241.93和1261.59 mg/kg,苷元所占比例达到64.56%。EM菌在发酵7d后大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素分别为842.71、1003.77、947.23和1063.53 mg/kg,苷元所占比例达到52.13%。植物乳酸杆菌 ATCC 8014 在发酵7d后大豆苷、染料木苷、大豆苷元和染料木素分别为1080.73、1205.05、753.85和826.28 mg/kg,苷元所占比例为40.87%,混合菌种的苷元所占比例为42.51~47.20%。结果发现枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 在发酵7d时转化SIF的效果最好。对于不同处理组糖苷和苷元的总量有所差异,这有可能是微生物在发酵的过程中,糖苷或苷元转化为其它物质,或者有其它物质转化为苷元,具体的机理还有待于进一步研究。

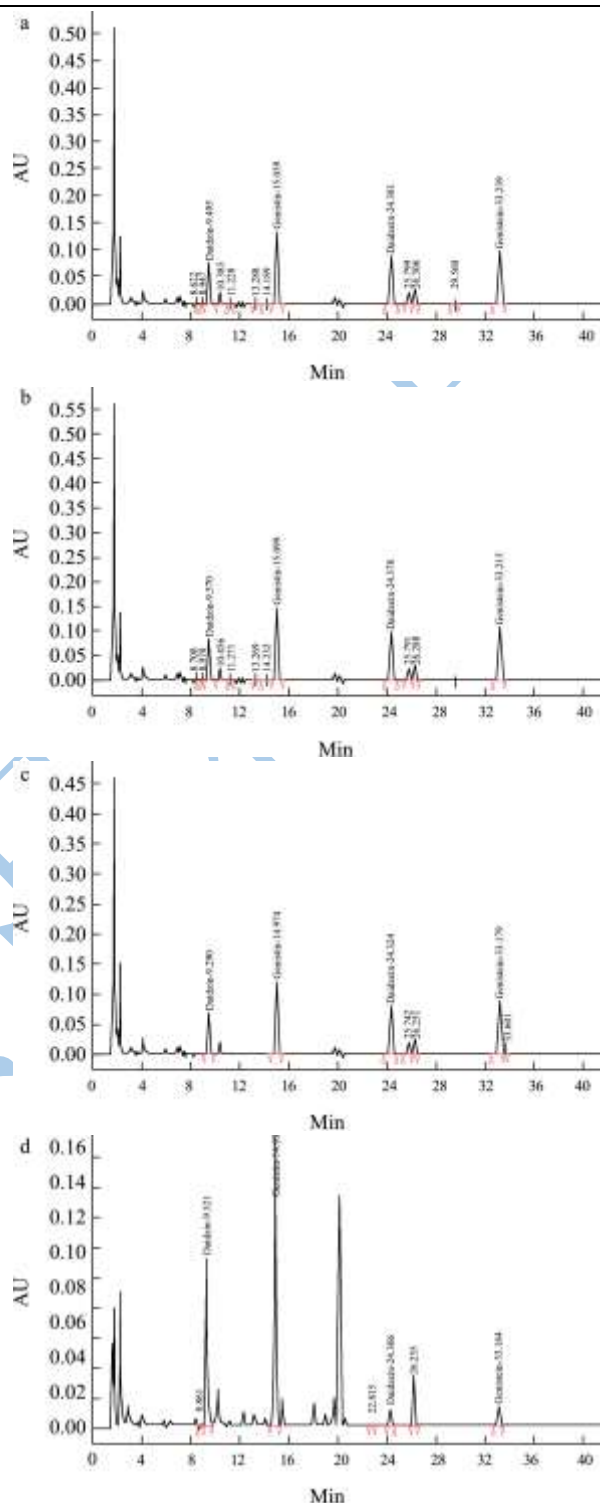


图5 植物乳酸杆菌 ATCC 8014、枯草芽孢杆菌 ATCC 6633、EM菌发酵7d转化大豆异黄酮的色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of the fermentation of SIF by *Lactobacillus planetarium* ATCC 8014, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and EM strains after 7 days

注: a: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; b: EM strains fermentation; c: *Lactobacillus planetarium* ATCC 8014; d: Control group.

研究表明,只有游离型的苷元才具有生物学活性

[13-14], 因此SIF糖苷只有通过酶解或酸水解转化成游离型的苷元才能被动物体或人体所吸收[15]。所以, 枯草芽孢杆菌7 d后单独发酵豆粕的效果最好, 目前国内还未见枯草芽孢杆菌发酵豆粕转化SIF的报道。因此, 本实验采用枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 7 d发酵转化SIF的效率有显著优点, 对提高苷元转化效率有较高的应用价值。

2.4 样品的重复性研究

采用 1.2 建立的高效液相色谱对枯草芽孢杆菌 7 d单独发酵后SIF的检测, 3次检测后测得的结果, 其相对标准差(RSD)小于4.2%。因此, 本实验采用的枯草芽孢杆菌7d发酵转化SIF的实验具有重复性好、稳定性高等优点, 具有较高的应用和推广价值。

表3 基于微生物发酵7 d后转化大豆异黄酮的苷元和糖苷含量

Table 3 Contents of aglycone and glucoside in fermented soybean isoflavones after a 7-day fermentation

处理组	大豆苷/(mg/kg)	染料木苷/(mg/kg)	大豆苷元/(mg/kg)	染料木素/(mg/kg)	糖苷总量/(mg/kg)	苷元总量/(mg/kg)	糖苷和苷元总量/(mg/kg)	苷元所占比例/%
1	883.70±0.071 ^b	988.98±7.54 ^{ab}	688.53±10.24 ^{bc}	748.92±9.99 ^{bc}	1867.30±0.14 ^b	1437.45±20.24 ^{bc}	3290.47±0.11 ^{ab}	43.68
2	870.07±63.24 ^b	946.71±77.22 ^b	656.06±50.61 ^b	700.43±60.36 ^b	1816.78±140.46 ^b	1356.49±110.97 ^b	3173.26±251.43 ^a	42.75
3	827.82±21.63 ^b	966.50±23.05 ^b	710.06±20.06 ^{bc}	779.25±20.74 ^c	1794.32±44.67 ^b	1489.31±40.80 ^{bc}	3283.63±85.47 ^{ab}	45.36
4	988.73±0.21 ^c	1109.78±0.11 ^{cd}	736.19±0.036 ^c	815.42±0.036 ^c	2098.67±0.11 ^c	1551.53±0.18 ^c	3649.40±1.42 ^{bc}	42.51
5	808.20±5.83 ^b	958.70±5.83 ^b	748.62±1.39 ^c	830.76±0.67 ^c	1766.90±11.67 ^b	1579.38±0.71 ^c	3346.28±12.38 ^{ab}	47.2
6	1131.76±40.44 ^d	1277.52±44.82 ^e	857.45±32.79 ^d	965.87±36.60 ^d	2409.28±85.26 ^d	1823.31±69.39 ^d	4232.59±154.65 ^d	43.08
7	842.71±29.81 ^b	1003.77±39.27 ^{ab}	947.23±40.41 ^e	1063.53±44.25 ^e	1846.48±69.07 ^b	2010.76±84.65 ^e	3857.24±153.72 ^c	52.13
8	590.95±4.41 ^a	783.55±0.85 ^a	1241.93±3.66 ^f	1261.59±3.16 ^f	1374.50±5.26 ^a	2503.52±6.83 ^f	3878.02±12.09 ^c	64.56
9	1080.73±17.36 ^d	1205.05±15.33 ^{de}	753.85±12.34 ^c	826.28±11.27 ^c	2285.79±32.69 ^d	1580.13±23.62 ^c	3865.92±56.30 ^c	40.87
0	1227.31±65.59 ^e	1814.84±95.47 ^f	58.78±1.32 ^a	73.31±3.02 ^a	3041.85±161.05 ^e	132.09±4.34 ^a	3173.94±165.39 ^a	4.16

注: 采用SPASS软件中的方差分析比较数据之间的显著性差异; 在同一列中, 有相同的上标字母差异是不显著的 (P>0.05)

0: 对照组 (Control group)。

3 结论

本实验首先选用转化SIF的3种菌株, 前期预实验发现, 转化SIF的效率在7天时最高, 因此, 我们将选择7 d将豆粕进行固态密封发酵, 结果表明枯草芽孢杆菌转化SIF的效果最好。近年来, 微生物发酵转化SIF的研究发展较快, 但仍存在一些问题, 如转化SIF的效率和稳定性较低等问题, 我们可通过基因重组技术构建工程菌以提高微生物法转化SIF的效率, 这对其工业化生产SIF具有较高的应用价值。

参考文献

- [1] 潘利华, 罗建平. β-葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803-807
Pan L H, Luo J P. Advance in research and application of β-D-glucosidase [J]. Food Science, 2006, 27 (12): 803-807
- [2] Ewe J A, Wan-abdullah W N, Alias A K, et al. Ultraviolet radiation enhanced growth of lactobacilli and their bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soy milk [J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 50(1): 25-31
- [3] Ewe J A, Wan-abdullah W N, Alias A K, et al. Effects of ultrasound on growth, bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent and subsequent passages of *Lactobacillus fermentum* BT 8633 in biotin-supplemented soy milk [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2012, 19(4): 890-900
- [4] Tsangalis D, Ashton J F, Stojanovska L, et al. Development of an isoflavone aglycone-enriched soy milk using soy germ, soy protein isolate and *bifidobacteria* [J]. Food Research International, 2004, 37(4): 301-312
- [5] Balisteiro D M, Rombaldi C V, Genovese M I. Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and in vitro antioxidant capacities: Comparison among conventionally and organically grown soybeans [J]. Food Research International, 2013, 51(1): 8-14
- [6] Anish R, Rahman M S, Rao M. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 96(1): 48-56
- [7] Nagata C, Takatsuka N, Kurisu Y, et al. Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women [J]. Journal of Nutrition, 1998, 128(2): 209-213
- [8] Setchell K D R, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health [J]. Journal of Nutrition, 2007, 137(1): 14-20

- 1999, 129(3):758S-767S
- [9] Klejdus B, Lojkova L, Plaza M. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(51): 7956-7965
- [10] Anish R, Rahman M S, Rao M. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora sp.* in biopolishing of denims [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96(1): 48-56
- [11] 钱丽丽,左锋,刘志明.微波预处理提取SIF的研究[J].现代食品科技,2007,23(1):38-39
- Qian L L, Zuo F, Liu Z M. Extraction of soybean isoflavones by microwave pretreatment [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(1): 38-39
- [12] 崔岩,邢晓慧,张立刚,等.保健食品中大豆异黄酮的测定方法. 中国,GB/T 23788-2009 [P].2009
- Cui Y, Xing X H, Zhang L G, et al. The detecting method of Soybean isoflavones in health food. China. GB/T 23788-2009 [P]. 2009
- [13] Chun J, Kim J S, Kim J H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella sp.* 4 [J]. *Food Chemistry*, 2008, 109(2): 278-284
- [14] Eweij A, Wan-Abdullah W N, Bhat R, et al. Enhanced growth of lactobacilli and bioconversion of isoflavones in biotin-supplemented soymilk upon ultrasound-treatment [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2012, 19(1):160-173
- [15] Xiao M T, Ye J, Tang X, et al. Determination of soybean isoflavones in soybean meal and fermented soybean meal by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126 (3):1488-1492