

# 植物乳杆菌 58 发酵豆乳 产大豆异黄酮苷元条件的优化

黄玉军, 周帆, 李颖华, 于俊娟, 顾瑞霞

(扬州大学江苏乳品生物技术与安全控制重点实验室, 江苏扬州 225127)

**摘要:** 本研究通过测定植物乳杆菌 58 在不同碳源中的生长和产  $\beta$ -葡萄糖苷酶情况, 筛选菌株的最适碳源, 并确定接种至豆乳的最佳时间。在接种量、糖含量、发酵时间和发酵温度等单因素实验基础上, 根据 Box-Behnken 中心组合原理进行响应面实验设计, 以大豆异黄酮苷元含量为指标, 进一步优化菌株 58 发酵豆乳产大豆异黄酮苷元条件。结果显示, 植物乳杆菌 58 生长和产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适碳源为乳糖, 酶活达 0.66 U/mL, 显著高于果糖、蔗糖、葡萄糖和麦芽糖 ( $p < 0.05$ )。菌株在乳糖碳源中培养 18 h 产酶活力最佳, 达 0.75 U/mL, 且生长情况良好。响应面优化实验得出发酵豆乳大豆异黄酮最佳转化条件为: 接种量 3.80%, 糖含量 5.80%, 发酵温度 38.10 °C, 发酵时间 9.80 h。此条件下, 大豆异黄酮苷元含量预测值达 68.63 mg/L, 与实验值 68.16 mg/L 相比差异不显著, 表明构建二次模型的科学性和准确性, 与优化前 (59.64 mg/L) 相比提高 15.07%, 有助于乳酸菌发酵豆乳中大豆异黄酮糖苷向高生物活性和利用度大豆异黄酮苷元的转化。

**关键词:** 植物乳杆菌;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 大豆异黄酮; 发酵豆乳; 响应面分析

文章编号: 1673-9078(2021)02-183-190

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0796

## Optimization of Soy Isoflavone Aglycone Production from Soybean Milk Fermented by *Lactobacillus plantarum* 58

HUANG Yu-jun, ZHOU Fan, LI Ying-hua, YU Jun-juan, GU Rui-xia

(Key Lab of Dairy Biological Technology and Safety Control, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

**Abstract:** In this work, the growth and  $\beta$ -glucosidase production of *Lactobacillus plantarum* 58 in different carbon sources were analyzed to optimize carbon source of the strain, and then the best time for inoculation to soymilk was obtained. On the basis of single-factor experiments (such as inoculation amount, sugar content, fermentation time, and fermentation temperature), the response surface experiment was designed according to the Box-Behnken central combination principle. The soy isoflavone aglycone content was used as an indicator to further optimize the fermentation conditions of soybean milk by *Lactobacillus plantarum* 58. The results showed that the optimal carbon source for the growth and  $\beta$ -glucosidase production of *Lactobacillus plantarum* 58 was lactose, and the enzyme activity reached 0.66 U/mL, which was significantly higher than that of fructose, sucrose, glucose and maltose ( $p < 0.05$ ). The strain cultured in a lactose carbon source for 18 h could produce the best enzyme activity (0.75 U/mL), and the growth was good. Results of response surface optimization experiments showed that the optimal conversion condition of soy isoflavones was as follows: inoculum amount of 3.80%, sugar content of 5.80%, fermentation temperature of 38.10 °C, fermentation time of 9.80 h. Under this condition, the predicted value of soy isoflavone aglycone content reached 68.63 mg/L, which was not significantly different from the experimental value 68.16 mg/L, indicating that the construction of the secondary model was scientific and accurate. Compared with the soy isoflavone aglycone content (59.64 mg/L) before optimization, it increased by 15.07%. The results of this

引文格式:

黄玉军,周帆,李颖华,等.植物乳杆菌 58 发酵豆乳产大豆异黄酮苷元条件的优化[J].现代食品科技,2020,37(2):183-190

HUANG Yu-jun, ZHOU Fan, LI Ying-hua, et al. Optimization of soy isoflavone aglycone production from soybean milk fermented by *Lactobacillus plantarum* 58 [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 183-190

收稿日期: 2020-08-25

基金项目: 国家重点研发计划专项 (2019YFF0217602)

作者简介: 黄玉军 (1972-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 乳酸菌功能和安全性分析

通讯作者: 顾瑞霞 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 乳品科学

work could be helpful to the conversion of soy isoflavone glycosides in lactic acid bacteria fermented soymilk to high bioactivity and availability of soy isoflavone aglycones.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum*;  $\beta$ -glucosidase; soy isoflavone; fermented soybean milk; response surface analysis

豆乳除了作为摄入乳酸菌的载体,相较于牛乳制品还具有许多营养功效,如低胆固醇、低饱和脂肪以及不含乳糖等<sup>[1]</sup>。此外,豆乳富含大豆异黄酮,大豆异黄酮是大豆在生长过程中形成的一种次级代谢产物,其结构和功能跟人类雌激素雌二醇相似,可以抗抑郁,预防心血管疾病、骨质疏松症、乳腺癌和前列腺癌,缓解更年期综合征,具有神经保护作用等<sup>[2-6]</sup>。大豆异黄酮的形态结构是决定其生理活性和生物利用率的关键因素,苷元生理活性比相应糖苷更高,能被小肠上皮细胞直接吸收,是人体能有效利用的形式,但90%以上大豆异黄酮以糖苷形式存在。

$\beta$ -葡萄糖苷酶可水解大豆异黄酮的糖苷结构,向生理活性和生物利用度更高的苷元结构转化,大豆本身也存在 $\beta$ -葡萄糖苷酶,但其水解效率低,仅为20%左右。酶水解大豆异黄酮反应条件温和,具有很强的专一性,但成本较高<sup>[7,8]</sup>。乳酸菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活较高的有干酪乳杆菌、加式乳杆菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和植物乳杆菌等,乳酸菌繁殖周期不长,可以实现工业化,降低高额酶成本<sup>[9]</sup>。利用乳酸菌发酵豆乳后既能发挥大豆的营养和功能特性,又能发挥乳酸菌的益生作用,产生许多大豆中原本没有的营养物质,提高大豆异黄酮的生理活性和生物利用率。

本研究利用江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室前期筛选的高转化大豆异黄酮植物乳杆菌58为研究菌株发酵豆乳,以大豆异黄酮苷元含量为考察指标,选取豆乳发酵关键操作点为单因素设计实验,在此基础上结合响应面法确定大豆异黄酮苷元的最佳转化条件,以增加发酵豆乳大豆异黄酮苷元含量,提高生物活性和利用度,为研制富含功能活性物质的发酵豆乳提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 发酵菌株

植物乳杆菌58,由江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室保存。

#### 1.1.2 主要材料

大豆,购于扬州市邗江区永辉超市。

#### 1.1.3 主要试剂

对硝基苯酚购于上海麦克林生化科技有限公司;

对硝基苯- $\beta$ -D-葡萄糖苷、二甲亚砜等购于生工生物工程(上海)股份有限公司;染料木素、大豆苷元等标准品购于上海源叶生物科技有限公司;甲醇、磷酸、乙腈等购于国药集团化学试剂有限公司;甲醇、乙腈等为色谱纯,其余生化试剂均为分析纯。

#### 1.1.4 仪器设备

恒温培养箱(DNP-9272型),上海精宏实验设备有限公司;高压均质机(APV1000型),美国SPX集团;离心机(H1650-W型),湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;酶标仪(1510型),美国Thermo公司;超声波清洗机(KH5200E型),昆山禾创超声仪器有限公司;超纯水系统(milli-Q direct 8型),法国Millipore公司;高效液相色谱仪(1260 Infinity型),美国Agilent Technologies公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶活测定

#### 1.2.1.1 样品处理

取菌液5 mL,在4 °C下5000 r/min离心10 min得菌体和上清。菌体用生理盐水洗涤2遍,重新悬浮于1 mL生理盐水,混匀作为粗酶液。取100  $\mu$ L粗酶液加入1.8 mL乙酸-乙酸钠缓冲液,在37 °C下水浴5 min,然后加入100  $\mu$ L预热的底物对硝基苯- $\beta$ -D-葡萄糖苷(pNPG)(20 mmol/L),空白组改用100  $\mu$ L缓冲液替代粗酶液。37 °C下反应10 min之后,加入1 mL的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液(1 mol/L)终止反应,400 nm下测量紫外吸收<sup>[10,11]</sup>。酶单位:上述条件下,1 mL粗酶液1 min催化生成1  $\mu$ mol对硝基苯酚(pNP)所需酶量即为1个酶活力单位,以U/mL表示,计算方法见公式1。

$$\text{酶活}/(\text{U}/\text{mL}) = 0.003 \times X \times N / (10 \times V) \quad (1)$$

注: X-对硝基苯酚浓度,  $\mu$ mol/L; N-稀释倍数; V-样品体积, mL。

#### 1.2.1.2 标准曲线

将pNP配制成0、5、10、20、30、40、50、60  $\mu$ mol/L浓度的溶液,取不同浓度pNP溶液2 mL,加入1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液(1 mol/L)混匀,于400 nm处测其紫外吸收。以pNP浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

### 1.2.2 豆乳发酵工艺流程

除杂→清洗→浸泡(干豆:水=1:3, 4 °C, 14 h)→热烫(0.5% NaHCO<sub>3</sub>溶液, 6 min)→磨浆(湿豆:水=1:7)→过滤(120目)

→煮沸→调浆→均质(20 MPa)→灭菌(105 ℃, 15 min)→冷却(40 ℃)→接种→发酵→冷藏(4 ℃, 24 h)。

### 1.2.3 大豆异黄酮最佳转化条件

#### 1.2.3.1 大豆异黄酮测定

(1) 样品处理: 取发酵豆乳 5 mL 于 50 mL 容量瓶中, 加入 80% 甲醇溶液至接近刻度。超声波萃取 20 min, 用 80% 甲醇定容, 摇匀取样品溶液置于离心管中, 8000 r/min 离心 15 min。取上清过 0.45 μm 滤膜, 收集滤液进高效液相色谱系统测定<sup>[12]</sup>。

(2) 色谱条件: 色谱柱: C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈; 磷酸水溶液 (pH=3.0); 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 260 nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 ℃。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Conditions of gradient elution

时间/min	0	10	23	30	50	55	56	60
乙腈/%	12	18	24	30	30	80	12	12
磷酸水溶液/%	88	82	76	70	70	20	88	88

(3) 标准曲线: 分别将大豆苷元、染料木素标准品配制成 1、2、4、8、16 mg/L 浓度的溶液, 制作以峰面积为纵坐标, 标准品溶液浓度为横坐标的标准曲线。

#### 1.2.3.2 单因素试验设计

(1) 接种量: 豆乳添加 6% 的乳糖, 灭菌后分别接种 1%、2%、3%、4%、5% 的乳酸菌, 于 37 ℃ 恒温发酵 12 h;

(2) 糖含量: 豆乳分别添加 2%、4%、6%、8%、10% 的乳糖, 灭菌后接种 3% 乳酸菌, 于 37 ℃ 恒温发酵 12 h;

(3) 发酵时间: 豆乳添加 6% 的乳糖, 灭菌后接种 3% 乳酸菌, 分别于 37 ℃ 恒温发酵 9、12、15、18、21 h;

(4) 发酵温度: 豆乳添加 6% 的乳糖, 灭菌后接种 3% 乳酸菌, 分别于 27、32、37、42、47 ℃ 恒温发酵 12 h, 分别测定四个条件下发酵后大豆异黄酮苷元的含量。

#### 1.2.3.3 响应面试验设计

根据单因素试验结果, 以大豆异黄酮苷元总量为响应值 (Y), 接种量、糖含量、发酵温度、发酵时间 4 个因素进行响应面试验。每个自变量的低、中、高 3 个试验水平分别以 -1、0、1 进行编码, 利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对试验数据进行回归分析, 得到多元二次回归方程, 分析各因素的主效应和交互效应, 从而确定最佳转化条件。

### 1.2.4 数据分析

同一样品平行测定 3 次, 试验结果为 3 次平行试样测定结果平均值, 并进行统计学分析。数据处理采用 SPSS 19.0 软件, 绘图采用 Origin 2018 软件, 响应面和模型建立采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株最适碳源

不同碳源会影响乳酸菌的生长代谢, 由于大豆的碳氮比对于乳酸菌的营养需求并不是最合适的, 所以在发酵初向豆乳中加入合适碳源, 可以促进菌株生长。分别以果糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖取代葡萄糖配制 MRS 液体培养基, 植物乳杆菌 58 的生长情况和 β-葡萄糖苷酶活见图 1。由图 1 可知, 植物乳杆菌 58 在麦芽糖碳源中生长情况最好, 乳糖和葡萄糖次之, 果糖碳源中菌浓度最低, OD<sub>600</sub> 低于 1.00。另外, 以乳糖作为碳源的菌株产酶活力最高, 约 0.66 U/mL, 葡萄糖和麦芽糖碳源中菌株产酶活力显著低于乳糖, 分别为 0.20 U/mL 和 0.19 U/mL, 果糖极低, 仅 0.10 U/mL。Tsangalis 等<sup>[13]</sup>采用双歧杆菌发酵豆乳, 加入 1% 葡萄糖辅助, 可明显增加大豆异黄酮苷元含量。综合考察, 乳糖为菌株 58 最适碳源, 选择生长及产酶活力俱佳的乳糖作为后续豆乳发酵碳源的补充。

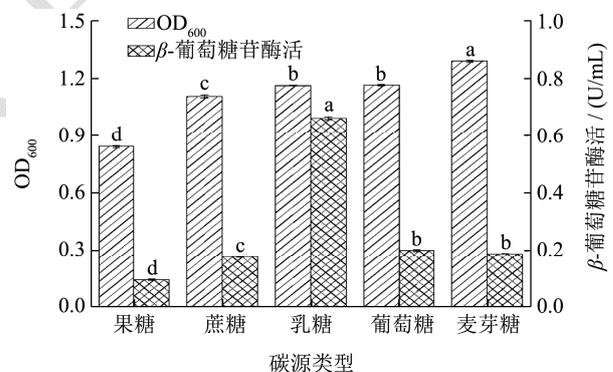


图 1 不同碳源中菌株生长和产酶情况

Fig.1 Growth and enzyme production of strains in different carbon sources

注: 图中不同小写字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

### 2.2 最佳接种时间

植物乳杆菌 58 在乳糖碳源中生长和酶活随时间的变化见图 2, 如图 2 所示, 58 的延迟期很短暂, 然后 2~18 h 进入对数生长期, 时间较长, 约 20 h 达到峰值。菌株的 β-葡萄糖苷酶活变化与生长曲线大致相似, 0~14 h 酶活呈大幅上升趋势, 14 h 后趋于平缓, 在 18 h 产酶活力达到最大, 约 0.75 U/mL。万振堂等<sup>[14]</sup>发现植物乳杆菌 KLDS1.0320 在 MRS 培养基或者

CMRS 培养基中生长到稳定期前期时粗酶液的酶活达到最大, 在稳定期前期  $\beta$ -葡萄糖苷酶产量最高。18 h 后, 酶活略有小幅度下降趋势, 可能由于随着培养基中乳酸菌的生长, 培养基中 pH 的下降, 影响  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的表达<sup>[15,16]</sup>。因此, 采取在乳糖碳源中生长和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活均到达最高的 18 h 作为植物乳杆菌 58 接种到豆乳的最佳时间。

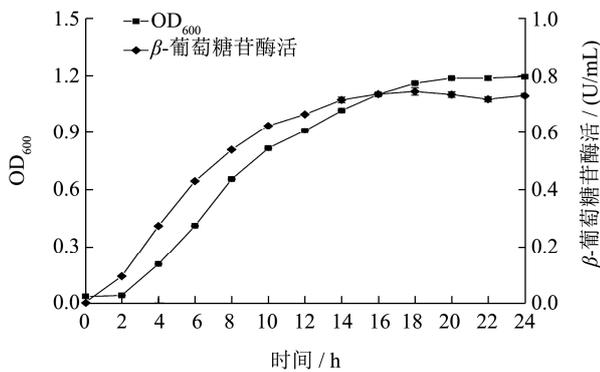


图2 菌株生长曲线和酶活变化

Fig.2 Growth curve and enzyme activity of strain

### 2.3 单因素试验结果

乳酸杆菌产  $\beta$ -葡萄糖苷酶能力的高低与发酵温度、时间、菌种、接种量和培养基等有密切关系。因此, 研究乳酸杆菌产  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 并应用于转化大豆异黄酮苷元需考虑各种影响因素。对接种量、糖含量、发酵温度和发酵时间 4 种发酵条件进行单因素试验, 使豆乳中大豆异黄酮苷元总量提高, 以大豆异黄酮苷元总量为指标, 4 种单因素试验见图 3~6。

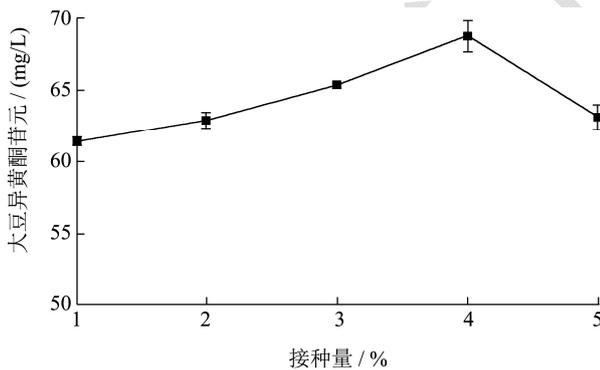


图3 接种量对大豆异黄酮苷元的影响

Fig.3 Effect of inoculation amount on isoflavone aglycone

如图 3 所示, 当接种量较小时, 豆乳中大豆异黄酮苷元总量随接种量的增加而上升, 接种量在 4% 附近时, 大豆异黄酮苷元总量达到最高, 而接入菌液过多时, 大豆异黄酮苷元总量急剧降低, 可能由于植物乳杆菌 58 生长代谢过程中产生大量乳酸等酸性物质, 低 pH 的环境影响糖苷型结构向苷元型的转换, 因此, 确定 3~5% 为适宜的接种量。

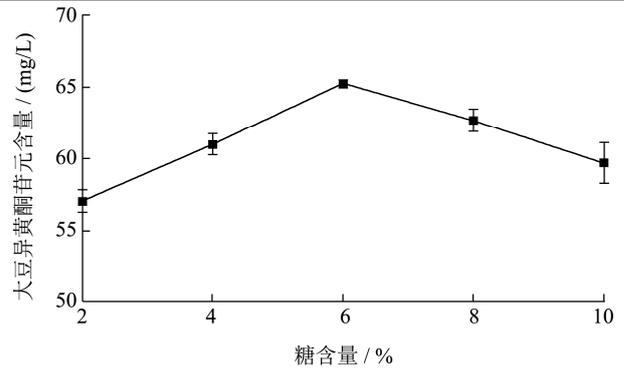


图4 糖含量对大豆异黄酮苷元的影响

Fig.4 Effect of sugar addition on isoflavone aglycone

如图 4 所示, 发酵豆乳中大豆异黄酮苷元在豆乳糖含量为 6% 时, 达到最大值, 接着豆乳糖含量的增高而直线下降, 可能少量的乳糖提高了发酵初期豆乳的碳氮比, 使乳酸菌活力增强, 更适合在豆乳基质中生长, 促进  $\beta$ -葡萄糖苷酶活, 大豆异黄酮转化效率更高。而随糖含量进一步增高, 植物乳杆菌 58 代谢乳糖产酸能力增加。李晓东等<sup>[17]</sup>研究了黑曲霉的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶学特性, 发现在 pH 为 4~6 的缓冲液中稳定性较好, 其中 pH 为 5 最好。Mesas 等<sup>[18]</sup>从分离自葡萄酒的酒明串珠菌 ST81 粗提物中纯化出  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 发现在 pH 为 5 条件下稳定。可能低 pH 也会抑制  $\beta$ -葡萄糖苷酶活, 使转化反应减慢。

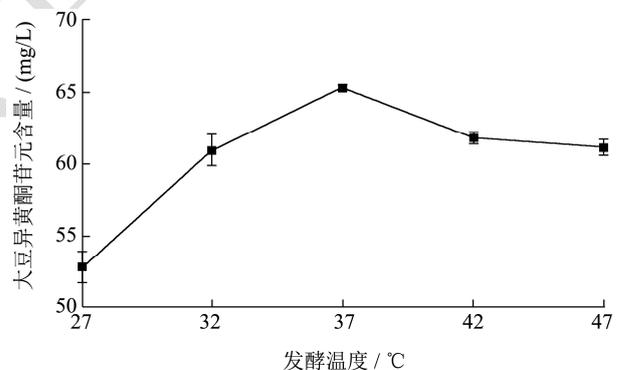


图5 发酵温度对大豆异黄酮苷元的影响

Fig.5 Effect of fermentation temperature on isoflavone aglycone

如图 5 所示, 发酵温度在 27~37 °C 时, 发酵豆乳中大豆异黄酮苷元总量随温度的上升而增加。当温度为 37 °C 左右时大豆异黄酮苷元总量达到最高, 温度继续升高, 含量反而降低。曾子逸等<sup>[19]</sup>研究了几株植物乳杆菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶特性, 发现有 4 株最适温度为 30 °C, 1 株最适温度为 37 °C。钱超等<sup>[20]</sup>研究了 3 株高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶乳酸菌的最适温度, 发现哈尔滨乳杆菌 M12 与 M24 产酶的最适温度均为 37 °C, 戊糖片球菌 J28 为 44 °C。可能由于过高的温度已不适合植物乳杆菌 58 生长,  $\beta$ -葡萄糖苷酶活受到抑制, 因此确定

32~42 °C为适宜的发酵温度。

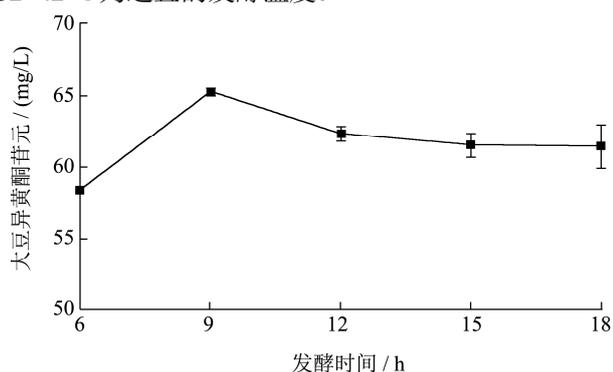


图6 发酵时间对大豆异黄酮苷元的影响

Fig.6 Effect of fermentation time on isoflavone aglycone

如图6所示,豆乳发酵的6~9 h,大豆异黄酮苷元总量急剧增加,可能由于植物乳杆菌58在豆乳中生长迅速,繁殖能力快,菌落数增加,β-葡萄糖苷酶活高,转化效率也高,实现大豆异黄酮苷元的积累。9 h后,大豆异黄酮苷元呈现下降趋势,可能发酵后期,植物乳杆菌58将大豆异黄酮苷元代谢,代谢速率大于转化速率,同时豆乳中营养物质被消耗,没有充足的

营养可供生长,菌活力下降,β-葡萄糖苷酶活降低,大豆异黄酮苷元总量不再上升。

## 2.4 响应面试验结果

### 2.4.1 因素水平表和试验方案

根据单因素试验结果,豆乳接种量、糖含量、发酵温度和时间均对大豆异黄酮苷元转化有较大影响。以大豆异黄酮苷元总量为响应值(Y),接种量、糖含量、发酵温度、发酵时间4个因素进行响应面试验。每个自变量低、中、高3个试验水平分别以-1、0、1编码,因素水平编码见表2,响应面试验方案见表3。

表2 因素水平编码表

Table 2 The coded values of variables in Box-Behnken design

实验因素	编码水平		
	-1	0	1
A: 接种量/%	3	4	5
B: 糖含量/%	4	6	8
C: 发酵温度/°C	32	37	42
D: 发酵时间/h	6	9	12

表3 响应面试验设计

Table 3 The results of Box-Behnken design

序号	A: 接种量/%	B: 糖含量/%	C: 发酵温度/°C	D: 发酵时间/h	试验值/(mg/L)
1	3	4	37	9	62.60
2	5	4	37	9	58.12
3	3	8	37	9	60.32
4	5	8	37	9	57.98
5	4	6	32	6	58.67
6	4	6	42	6	59.45
7	4	6	32	12	61.13
8	4	6	42	12	64.56
9	3	6	37	6	58.31
10	5	6	37	6	55.48
11	3	6	37	12	62.97
12	5	6	37	12	59.78
13	4	4	32	9	61.37
14	4	8	32	9	60.16
15	4	4	42	9	63.45
16	4	8	42	9	61.62
17	3	6	32	9	60.14
18	5	6	32	9	57.38
19	3	6	42	9	63.23
20	5	6	42	9	60.15
21	4	4	37	6	59.16
22	4	8	37	6	57.57

转下页

接上页

23	4	4	37	12	63.56
24	4	8	37	12	61.78
25	4	6	37	9	67.73
26	4	6	37	9	68.07
27	4	6	37	9	68.31
28	4	6	37	9	67.92
29	4	6	37	9	68.12

表4 二次模型的方差分析

Table 4 ANOVA for the evaluation of the quadratic model

来源	平方和	自由度	方差	F值	P值	显著性
模型	365.07	14	26.08	256.59	<0.0001	**
A-接种量	29.08	1	29.08	286.13	<0.0001	**
B-糖含量	6.50	1	6.50	63.93	<0.0001	**
C-发酵温度	15.44	1	15.44	15.44	<0.0001	**
D-发酵时间	52.67	1	52.67	52.67	<0.0001	**
AB	1.14	1	1.14	11.27	0.0047	**
AC	0.026	1	0.026	0.25	0.6235	-
AD	0.032	1	0.032	0.32	0.5813	-
BC	0.096	1	0.096	0.95	0.3473	-
BD	9.025E-003	1	9.025E-003	0.089	0.7701	-
CD	1.76	1	1.76	17.28	0.0010	**
A <sup>2</sup>	151.32	1	151.32	1489.00	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	76.15	1	76.15	749.27	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	57.36	1	57.36	564.43	<0.0001	**
D <sup>2</sup>	108.24	1	108.24	1065.09	<0.0001	**
残差	1.42	14	0.10			
失拟项	1.23	10	0.12	2.59	0.1859	-
纯误差	0.19	4	0.048			
总和	366.49	28				

注：“-”不显著；“\*”显著 ( $p<0.05$ )；“\*\*”极显著 ( $p<0.01$ )。

#### 2.4.2 模型建立和显著性分析

利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对表3的试验数据进行多元回归分析, 获得大豆异黄酮苷元含量与4因素拟合方程, 见公式2:

$$Y=68.03-1.56A-0.74B+1.13C+2.10D+0.53AB-0.08AC-0.09AD-0.16BC-0.048BD+0.66CD-4.83A^2-3.43B^2-2.97C^2-4.08D^2 \quad (2)$$

模型方程回归方差分析见表4, 结果表明该模型回归极显著 ( $p<0.0001$ ), 失拟项不显著 ( $p=0.1859$ ), 并且该模型的  $R^2=0.9961$ ,  $R_{Adj}^2=0.9922$ , 说明回归方程的拟合程度良好, 具有较高的可靠性, 自变量和响应值之间的线性关系高度显著, 可以用于发酵豆乳大豆异黄酮苷元总量的预测。

#### 2.4.3 模型等高线和3D图分析

根据回归分析结果, 模型的等高线和3D图见图7、8。如图7所示, 糖含量和接种量对大豆异黄酮苷元含量的影响均是先增加后减少, 且变化幅度较大, 接种量对大豆异黄酮苷元含量的影响较糖含量更为显著。当糖含量固定在6.00%时, 接种量在3.70%~4.00%左右, 大豆异黄酮苷元含量达到最高的阶段68.00 mg/L以上。接种量高于4.00%后, 下降趋势明显。模型方程回归方差分析显著性结果显示, 糖含量和接种量对大豆异黄酮苷元含量的影响达极显著水平。

如图8所示, 发酵时间和温度对大豆异黄酮苷元含量的影响均是先大幅增加, 而后有小幅下降, 发酵时间对大豆异黄酮苷元含量的影响较温度更为显著。当发酵温度固定在36.00℃, 随着时间的延长, 大豆异黄酮苷元含量上升趋势明显, 时间在9.00~10.50 h

左右,大豆异黄酮苷元含量达到最高阶段 68.00 mg/L 以上。时间超过 10.50 h 后,大豆异黄酮苷元含量开始下降,但趋势并不明显。模型方程回归方差分析显著性结果显示,发酵时间和温度对大豆异黄酮苷元含量的影响达极显著水平。

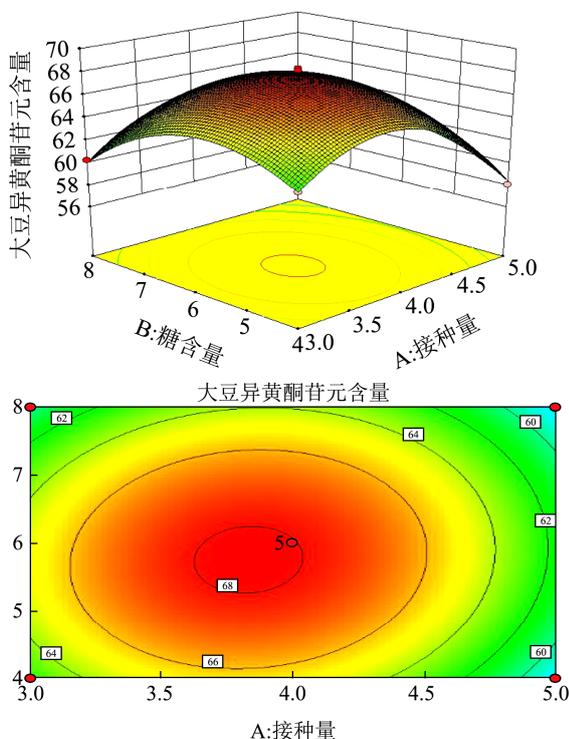


图7 糖含量和接种量对大豆异黄酮苷元的影响

Fig.7 Effects of sugar addition and inoculation amount on soy isoflavone aglycone

### 2.4.4 最佳转化条件验证结果

由软件得出的豆乳大豆异黄酮苷元最佳转化条件为:接种量 3.83%,糖含量 5.75%,发酵温度 38.14 °C,发酵时间 9.83 h。该条件下,植物乳杆菌 58 发酵豆乳样品大豆异黄酮苷元总量根据拟合方程计算得 68.63 mg/L。结合实际操作方便性,将最佳条件调整为:接种量 3.80%,糖含量 5.80%,发酵温度 38.10 °C,发酵时间 9.80 h,该条件下测得的大豆异黄酮苷元含量为 68.16 mg/L,与预测值 68.63 mg/L 相比差异不显著,可见该模型能很好的预测豆乳中大豆异黄酮苷元的最佳转化条件。

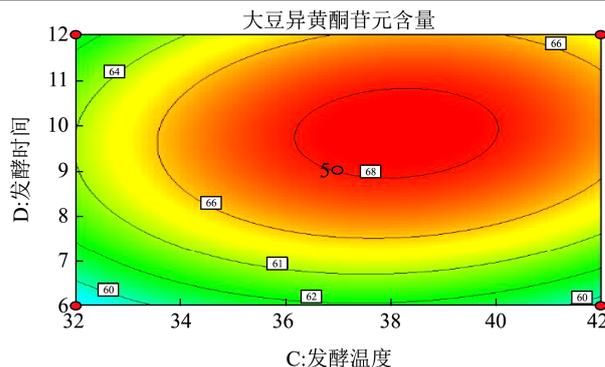
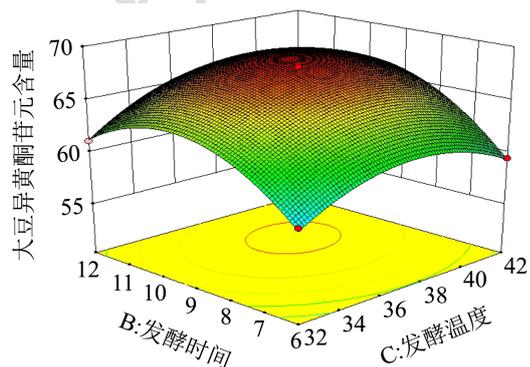


图8 发酵时间和温度对大豆异黄酮苷元的影响

Fig.8 Effects of fermentation time and temperature on soy isoflavone aglycone

## 3 结论

本研究对筛出的高转化大豆异黄酮的植物乳杆菌 58 进行最适碳源的筛选,结合生长和产  $\beta$ -葡萄糖苷酶情况,发现菌株 58 最适碳源为乳糖,酶活达 0.66 U/mL,显著高于果糖、蔗糖、葡萄糖和麦芽糖 ( $p < 0.05$ )。培养 18 h 菌株 58 生长和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活达到最佳,为 0.75 U/mL。以最适碳源乳糖制作发酵豆乳,在单因素试验的基础上,设计响应面试验,得出大豆异黄酮含量与接种量、糖含量、发酵温度、发酵时间的回归模型。结果显示,接种量与糖含量,发酵温度与发酵时间的交互作用对大豆异黄酮苷元含量的影响都极显著 ( $p < 0.01$ )。豆乳中大豆异黄酮苷元的最佳转化条件为:接种量 3.80%,糖含量 5.80%,发酵温度 38.10 °C,发酵时间 9.80 h,此条件下,大豆异黄酮苷元含量为 68.16 mg/L,相较优化前的大豆异黄酮苷元含量(59.64 mg/L)提高 15.07%,与响应面预测值 68.63 mg/L 相比差异不显著,表明构建二次模型的科学性和准确性,可以实现乳酸菌发酵豆乳中大豆异黄酮糖苷向高生物活性和利用度大豆异黄酮苷元的转化,为研制富含功能活性物质的发酵豆乳奠定基础。

## 参考文献

[1] Donkor O, Shah N. Production of  $\beta$ -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk [J]. Journal of Food Science, 2008, 73(1): 15-20

[2] 何凤琴,向全丽,屈庚超,等.大豆异黄酮影响 C57BL/6J 母鼠行为与雌激素受体  $\alpha$  的关系[J].西安文理学院学报(自然科学版),2020,23(1):50-55

HE Feng-qin, XIANG Quan-li, QU Geng-chao, et al. The effect of soy isoflavones on the behavior of C57BL/6J female mice and the relationship between estrogen receptor  $\alpha$  [J].

- Journal of Xi'an University of Arts and Science (Nature Science Edition), 2020, 23(1): 50-55
- [3] 王燕, 补蔚萍, 谢宏, 等. 大豆异黄酮对过氧化氢及脂多糖诱导的血管内皮细胞损伤保护机制的实验研究[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2): 150-155  
WANG Yan, BU Wei-ping, XIE Hong, et al. Experimental study on the protective mechanism of soy isoflavones against hydrogen peroxide and lipopolysaccharide induced injury of vascular endothelial cells [J]. Chinese Journal of Cardiology, 2014, 42(2): 150-155
- [4] Lin I C, Yamashita S, Murata M, et al. Equol suppresses inflammatory response and bone erosion due to rheumatoid arthritis in mice [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2016, 32: 101-106
- [5] 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]. British Journal of Nutrition, 2017, 117(2): 260-266
- [6] 蔡标, 叶树, 王艳, 等. 染料木素对 A $\beta$ 25-35 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用及 CaM-CaMKIV 信号通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 571-576  
CAI Biao, YE Shu, WANG Yan, et al. Protective effect of genistein on PC12 cell injury induced by A $\beta$ 25-35 and effect of CaM-CaMKIV signal pathway [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(3): 571-576
- [7] 梁文欧, 赵力超, 方祥, 等. 大豆异黄酮与肠道微生物相互作用研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 283-289  
LIANG Wen-ou, ZHAO Li-chao, FANG Xiang, et al. Research progress on interaction between soy isoflavones and intestinal microorganisms [J]. Food Science, 2019, 40(9): 283-289
- [8] 于丽颖, 成乐琴. 苹果酸催化大豆异黄酮糖苷水解苷元的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 288-290  
YU Li-ying, CHENG Le-qin. Study on hydrolysis technology of soy isoflavone glycosides catalyzed by malic acid [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(20): 288-290
- [9] Choi Y B, Kim K S, Rhee J S. Hydrolysis of soybean isoflavone glucosides by lactic acid bacteria [J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(24): 2113-2116
- [10] Dong M, Fan M, Zhang Z, et al. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Oenococcus oeni* 31MBR [J]. European Food Research and Technology, 2014, 239(6): 995-1001
- [11] Li Y H, Fan M T, Zhang G Q, et al. Assessment of  $\beta$ -glucosidase activity from two typical strains of the lactic acid bacteria, *Oenococcus oeni*, in China [J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2016, 33(2): 144-149
- [12] GB/T 23788-2009, 保健食品中大豆异黄酮的测定方法[S]  
GB/T 23788-2009, Determination method of soy isoflavone in health food [S]
- [13] Tsangalis D, Ashton J, McGill A, et al. Biotransformation of isoflavones by bifidobacteria in fermented soymilk supplemented with D-glucose and L-cysteine [J]. Journal of Food Science, 2010, 68(2): 623-631
- [14] 万振堂, 杨丽杰. 产胞外  $\beta$ -葡萄糖苷酶乳酸菌的筛选及其酶学性质的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 4: 28-32  
WAN Zhen-tang, YANG Li-jie. Screening of lactic acid bacteria producing extracellular  $\beta$ -glucosidase and preliminary study on enzyme properties [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 4: 28-32
- [15] Spano G, Rinaldi A, Ugliano M, et al. A  $\beta$ -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 98(4): 855-861
- [16] Garro M S, Aguirre L, Giori G S D. Biological activity of *Bifidobacterium longum* in response to environmental pH [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(5): 612-617
- [17] 李晓东, 周明, 杨丽娜, 等. 黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶学特性研究[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(3): 14-18  
LI Xiao-dong, ZHOU Ming, YANG Li-na, et al. Study on enzymatic characteristics of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* [J]. Journal of Microbiology, 2014, 34(3): 14-18
- [18] Mesas J M, M C Rodríguez, Alegre M T. Basic characterization and partial purification of  $\beta$ -glucosidase from cell-free extracts of *Oenococcus oeni* ST81 [J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(3): 247-255
- [19] 曾子毅, 丁诗瑶, 卢向阳, 等. 几株植物乳杆菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶的特性研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(1): 82-86  
ZENG Zi-yi, DING Shi-yao, LU Xiang-yang, et al. Characterization of  $\beta$ -glucosidase from several *Lactobacillus plantarum* strains [J]. China Brewing, 2019, 38(1): 82-86
- [20] 钱超, 杨文丹, 张宾乐, 等. 高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的乳酸菌在葡萄汁酸面团面包中的应用[J]. 食品与机械, 2017, 33(5): 14-20  
QIAN Chao, YANG Wen-dan, ZHANG Bin-le, et al. Application of lactic acid bacteria with high  $\beta$ -glucosidase production in sourdough bread with grape juice [J]. Food Machinery, 2017, 33(5): 14-20