

# 酶法提高豆浆中大豆异黄酮苷元浓度的工艺研究

苟贇, 赵石磊, 刘石生

(热带多糖资源利用教育部工程研究中心, 海南大学食品学院, 海南海口 570228)

**摘要:** 试验利用黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶对豆浆进行水解处理, 将结合型大豆异黄酮糖苷转化为游离型苷元。选大豆为原料, 以单因素实验为基础, 考察加酶量、反应时间、反应温度三个因素对豆浆中大豆异黄酮糖苷水解的影响; 根据 Box-Behnken 实验设计原理, 选取不同加酶量、反应时间、反应温度 3 因素 3 水平进行中心组合实验, 建立豆浆中大豆异黄酮苷元含量的多项式回归预测模型, 确定了最佳工艺参数。结果表明, 最佳水解工艺条件为: 加酶量 0.028 U/5 mL, 反应时间 1.64 h, 反应温度 53.82 °C, 在此条件下制得豆浆大豆异黄酮苷元含量明显提高。测得大豆苷元 (De)、黄豆黄素 (Gle)、染料木素 (Ge) 的浓度分别为 39.434±1.410  $\mu\text{g/mL}$ 、4.626±0.462  $\mu\text{g/mL}$ 、45.851±2.098  $\mu\text{g/mL}$ 。而大豆苷元 (De)、黄豆黄素 (Gle)、染料木素 (Ge) 浓度的响应面预测值分别为 40.905  $\mu\text{g/mL}$ 、4.263  $\mu\text{g/mL}$ 、48.441  $\mu\text{g/mL}$ , 测定值与模拟值接近。优化后的工艺条件合理、可行, 能明显提高豆浆中大豆异黄酮苷元的含量。

**关键词:** 黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 水解; 大豆异黄酮

文章编号: 1673-9078(2019)06-154-160

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.020

## Increasing the Concentrations of Soybean Isoflavone Aglycones in Soymilk by an Enzymatic Method

GOU Yun, ZHAO Shi-lei, LIU Shi-sheng

(Engineering Research Center of Utilization of Tropical Polysaccharide Resources, Ministry of Education, College of Food, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** The soybean was hydrolyzed by the *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase to convert the bound soy isoflavone glycosides into a free aglycone. Using soybean as the raw material, the influence of three factors (enzyme dose for addition, reaction time, reaction temperature) on the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides in soy milk was first investigated in single factor experiments. According to the Box-Behnken center-united experimental design principles, three factors and three levels were adopted based on the combinations of different enzyme doses, reaction times and reaction temperatures to establish polynomial regression prediction models for the isoflavone aglycone content in soy milk and determine the optimal process parameters. The results showed that optimal hydrolysis conditions were as follows: the enzyme dose, 0.028 U/5 mL; reaction time, 1.64 h; reaction temperature, 53.82 °C. Under these conditions, the content of isoflavone aglycone in soy milk was significantly improved, with the concentrations of daidzein (De), glycitein (Gle) and genistein (Ge) being 39.434±1.410, 4.626±0.462, 45.851±2.098  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The response surface prediction values of De, Gle and Ge were 40.905, 4.263, and 48.441  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, indicating that the measured values were close to the predicted values. The optimized process conditions are reasonable and feasible, and can allow a significant increase in the contents of isoflavone aglycones in soy milk.

**Key words:** *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase; hydrolysis; soybean isoflavones

豆浆是中国传统植物饮料, 是一种老少皆宜的营养食品, 甚至被誉为“植物奶”, 深受消费者的喜爱。豆浆营养价值高, 不仅含有丰富的蛋白质和磷脂, 还含有大豆异黄酮等生物活性物质。大豆异黄酮是黄酮

收稿日期: 2019-01-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460407)

作者简介: 苟贇 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与贮藏工程

通讯作者: 刘石生 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然植物资源开发与利用

类化合物, 是大豆生长中形成的一类次级代谢产物, 是一种生物活性物质。由于是从植物中提取, 与雌激素有相似结构, 因此大豆异黄酮又称植物雌激素。大豆异黄酮的雌激素作用影响到激素分泌、代谢生物学活性、蛋白质合成、生长因子活性, 是天然的癌症化学预防剂。有研究表明, 大豆异黄酮具有抗氧化<sup>[1]</sup>、防癌<sup>[2,3]</sup>、防动脉硬化<sup>[4]</sup>、防骨质疏松<sup>[5]</sup>、抵抗神经退化疾病和保护神经系统<sup>[6]</sup>、防治女性更年期综合症<sup>[7]</sup>等保健作用。天然大豆异黄酮主要以结合型糖苷和游离型苷元两种形式存在, 结合型糖苷是天然大豆异黄

酮的主要形式, 所占比例为 97%~98%<sup>[8]</sup>, 而游离型苷元是大豆异黄酮发挥生物学功能的主要形式, 糖苷形式的大豆异黄酮只有在肠道微生物的作用下水解为相应的苷元, 才能被机体吸收并发挥其相关生物学功能。微生物对糖苷型大豆异黄酮的降解作用较弱, 造成了大豆异黄酮资源的浪费<sup>[9]</sup>, 降低了豆浆的营养价值, 因此亟待寻找一种提高豆浆中大豆异黄酮苷元浓度的方法, 尽可能保证豆浆中大豆异黄酮被人体吸收, 使营养成分的流失率降低。有研究发现  $\beta$ -葡萄糖苷酶能够水解大豆异黄酮糖苷<sup>[10-16]</sup>, 将结合型糖苷转化为游离性苷元, 本试验研究了黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶对豆浆中大豆异黄酮糖苷的水解工艺, 有利于提高豆浆中大豆异黄酮苷元的浓度, 从而提升豆浆的营养价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大豆, 本地超市 (产地: 东北); 黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 上海源叶生物科技有限公司。

无水甲醇 (分析纯)、磷酸、乙腈 (色谱纯)、大豆苷 (daidzin)、黄豆黄苷 (glycitin)、染料木苷 (genistin)、大豆苷元 (daidzein)、黄豆黄素 (glycitein)、染料木素 (genistein), 上海源叶生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

电子天平 (BS124S); 超声波清洗机 (XO-5200TDT); 小型台式离心机 (1-14); 恒温水浴锅 (HH-S26S); Joyoung 豆浆机 (DJ13B-N620SG); 离心机 (TG16G); 高效液相色谱仪 (安捷伦 1260)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 高效液相测定色谱条件

表 1 流动相洗脱程序表

Table 1 Elution program of mobile phase

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	12	88
10	18	82
23	24	76
30	30	70
50	30	70
55	80	20
56	12	88
60	12	88

色谱柱: Agilent TC-C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); 保护柱芯: ZORBAX Eclipse Plus, (12.5 mm×4.6

mm, 5  $\mu$ m); 检测波长 260 nm; 柱温 30  $^{\circ}$ C; 进样量 10  $\mu$ L; 流动相: A, 磷酸水溶液 (pH=3); B, 乙腈; 后运行时间 5 min; 洗脱程序见表 1。

#### 1.3.2 大豆异黄酮标准曲线的建立

精确称取大豆苷元、黄豆黄素、染料木素、大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷标准样品各 5.0 mg, 以 80% 甲醇溶液溶解并定容, 作为标准溶液。精确吸取不同体积的标准溶液, 配成不同浓度的混合标准样品溶液, 用 0.45  $\mu$ m 有机系滤膜过滤, 将滤液装入进样瓶中, 进行 HPLC 分析, 测定各组分的峰面积。以大豆异黄酮浓度 (X) 为横坐标, 大豆异黄酮各组分的峰面积 (Y) 为纵坐标, 进行回归分析, 计算大豆苷元、大豆苷、黄豆黄素、黄豆黄苷、染料木素、染料木苷的标准曲线。

大豆异黄酮浓度计算公式如下:

$$\text{样品浓度} = (\text{样品峰面积} / \text{标样峰面积}) \times \text{标样浓度} \times \text{稀释倍数}$$

#### 1.3.3 豆浆的制备方法

称取 100 g 大豆, 置于烧杯中, 加入 500 g 蒸馏水于室温浸泡 8~10 h, 加蒸馏水定量至 1000 g, 在豆浆机中制成豆浆 (干/湿模式), 滤去豆渣, 收集豆浆, 冷却, 4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。

#### 1.3.4 样品的制备

取 5 mL 豆浆至 25 mL 具塞试管中, 以适当比例稀释黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 取适量稀释酶液加入试管中, 以不同温度在水浴锅中反应一定时间, 结束后沸水浴 5 min, 冷却至室温。吸取 2 mL 反应液于 10 mL 容量瓶中, 加入 80% 甲醇溶液, 50  $^{\circ}$ C 条件下在超声波清洗器中超声 30 min, 结束后冷却至室温, 用 80% 甲醇定容至刻度, 摇匀。取样品溶液置于离心管中, 12000 r/min 离心 15 min, 用一次性注射器吸取上清液, 并用 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤, 收集滤液于 HPLC 进样瓶中, 4  $^{\circ}$ C 冷藏待用。

#### 1.3.5 黑曲霉 $\beta$ -葡萄糖苷酶对大豆异黄酮糖苷的水解

将黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶加入豆浆, 并在一定条件下进行反应, 通过控制反应过程的酶量 (A)、时间 (B)、温度 (C), 寻找最适反应条件, 以获得更多的大豆苷元 (De)、黄豆黄素 (Gle)、染料木素 (Ge)。通过预试验, 确定每个因素的反应范围, 以水解后豆浆中大豆苷元 (De)、黄豆黄素 (Gle)、染料木素 (Ge) 的浓度为指标, 建立 3 因素 3 水平的响应面正交试验, 考察各因素对大豆异黄酮苷元浓度的影响。

##### 1.3.5.1 单因素试验设计

加酶量对大豆异黄酮糖苷水解的影响: 在温度为

55 °C时, 反应时间为 1.5 h 的条件下考察不同加酶量 0、0.0064、0.0096、0.016、0.024、0.032、0.004、0.048、0.064、0.08 U/5 mL 对大豆异黄酮糖苷水解的影响, 每组试验重复 3 次。

反应时间对酶水解的影响: 在加酶量为 0.024 U/5 mL, 反应温度为 55 °C 的条件下, 设置反应时间为 0、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3 h 对大豆异黄酮糖苷水解的影响, 每组试验重复 3 次。

反应温度对酶水解的影响: 在加酶量为 0.024 U/5 mL, 反应时间为 1.5 h 时, 分别考察反应温度 35、45、55、65、75 °C 对大豆异黄酮糖苷水解的影响, 每组试验重复 3 次。

### 1.3.5.2 响应面优化试验

表 2 因素水平表

Table 2 Table of factors and levels

水平	A 酶量/(U/5 mL)	B 时间/h	C 温度/°C
-1	0.012	1	45
0	0.024	1.5	55
1	0.036	2	65

表 3 6 种大豆异黄酮标准品的标准曲线

Table 3 Standard curve of soy isoflavone standard

组分简称	出峰时间/min	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/(μg/mL)
D	13.83	Y=23.81X-9.2148	0.9999	1~125
Gl	14.61	Y=40.305X-32.695	1.0000	1~125
G	20.36	Y=40.708X-3.5078	0.9979	1~125
De	32.28	Y=47.716X-9.4359	0.9999	1~125
Gle	33.59	Y=47.211X-4.5303	0.9975	1~125
Ge	43.34	Y=58.567X+2.7463	0.9971	1~125

## 2.2 黑曲霉 β-葡萄糖苷酶对大豆异黄酮糖苷水解影响

### 2.2.1 酶的用量对大豆异黄酮水解的影响

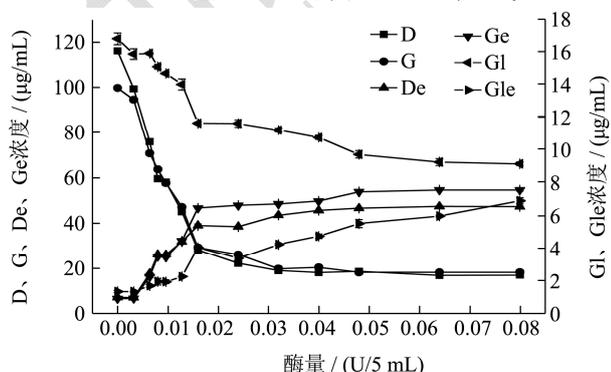


图 1 加酶量对大豆异黄酮糖苷水解的影响

Fig.1 Effect of enzyme amount on hydrolysis of glycosides

在反应温度为 55 °C 时, 改变酶的添加量, 反应

利用响应面优化试验对上述单因素的优选试验结果进一步优化, 以得到更多的大豆异黄酮苷元。其因素水平表见表 2。

### 1.3.6 数据统计分析

试验数据结果取 3 次平行测定结果  $\bar{X} \pm SD$  表示。采用 Excel 2016、DPS 数据处理系统、OriginPro 9.2 及 Design-expert 7.0.0 对数据进行分析及作图处理。用 Design-expert 7.0.0 软件进行显著差异分析,  $p < 0.01$  表示差异极显著,  $p < 0.05$  是差异显著,  $p > 0.05$  为差异不显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆异黄酮各组分标准曲线

HPLC 分别测定不同浓度的混合标准溶液。以大豆异黄酮标准品溶液的浓度为横坐标, 所测峰面积的平均值为纵坐标, 以质量浓度 X (μg/mL) 与峰面积 Y 进行回归分析, 得到线性方程。回归方程如表 3 所示。

1.5 h 后, 制备样品, HPLC 检测大豆异黄酮 6 种组分的浓度变化, 结果见图 1。

随着黑曲霉 β-葡萄糖苷酶用量的增加, 大豆苷 (D)、黄豆苷 (Gl) 和染料木苷 (G) 的浓度呈下降趋势, 而大豆苷元 (De)、黄豆黄素 (Gle) 和染料木素 (Ge) 的浓度呈上升趋势。当加酶量大于 0.024 U/5 mL 时, 随着酶量的增加, 所测大豆异黄酮 D、Gl、G、De、Gle、Ge 的浓度趋于恒定, 表明反应达到平衡状态。这是因为刚加入 β-葡萄糖苷酶时, 酶的含量较低, 大豆异黄酮糖苷 D、Gl、G 的含量相对较高, 底物浓度过高, 反应速率不受底物浓度的限制, 此时反应速率与酶的浓度呈正相关, 当酶量增加时, 反应速率加快, 大豆异黄酮糖苷 D、Gl、G 的浓度逐渐下降, 大豆异黄酮苷元 De、Gle、Ge 的浓度逐渐升高, 此时酶的添加量是影响大豆异黄酮各组分含量的决定因素。随着酶量的增加, 产物浓度增高, 底物浓度降低, 此时影响大豆异黄酮各组分含量的决定性因素是底物

含量,此时再增加酶的用量对大豆异黄酮糖苷的水解作用影响不大。为了降低生产成本,必须合理且高效地使用酶,因此选择最优加酶量为 0.024 U/5 mL。

### 2.2.2 反应时间对大豆异黄酮水解的影响

当加酶量为 0.024 U/5 mL 时,在 55 °C 水浴锅中反应不同时间,制备样品,HPLC 检测大豆异黄酮 6 种组分的浓度变化,结果见图 2。

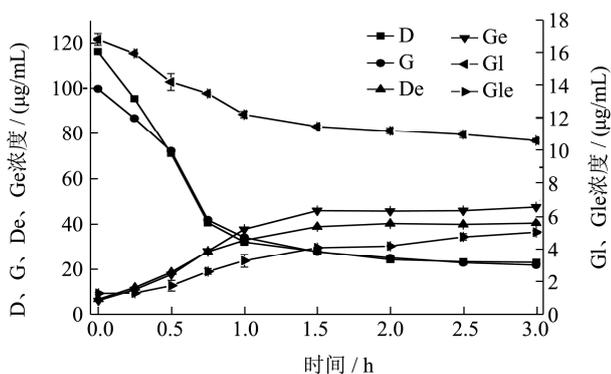


图 2 时间对大豆异黄酮糖苷水解的影响

Fig.2 Effect of time on hydrolysis of glycosides

随着反应时间的增加,大豆苷(D)、黄豆苷(Gl)和染料木苷(G)的浓度呈现下降的趋势,而大豆苷元(De)、黄豆黄素(Gle)和染料木素(Ge)的浓度不断增加。当反应时间达到 1.5 h 后,随着反应时间的增加,大豆异黄酮 6 种组分 D、Gl、G、De、Gle、Ge 的浓度变化较为平缓,表明酶解反应达到了平衡状态。这是因为刚加入黑曲霉 β-葡萄糖苷酶时,酶与底物作用的时间太短,只能部分水解大豆异黄酮糖苷。随着时间的增加,酶与底物作用的产物不断积累,大豆异黄酮糖苷的含量会逐渐降低,大豆异黄酮苷元的含量会逐渐增加。随着底物浓度的降低,反应达到平衡,大豆异黄酮各组分的含量趋于恒定。因此选择水解的最佳时间为 1.5 h。

### 2.2.3 反应温度对大豆异黄酮水解的影响

当加酶量为 0.024 U/5 mL 时,在不同的温度下水浴反应 1.5 h,制备样品,HPLC 检测大豆异黄酮 6 种组分的浓度变化,结果见图 3。

当反应温度低于 55 °C 时,大豆苷元(De)、黄豆黄素(Gle)和染料木素(Ge)的含量会随温度的增加而不断上升,当温度高于 55 °C 时,大豆异黄酮苷元 De、Gle、Ge 的含量又出现下降的趋势。与之相反,当反应温度低于 55 °C 时,大豆苷(D)、黄豆苷(Gl)和染料木苷(G)的浓度会随着温度的升高而呈现下降的趋势,当温度高于 55 °C 时,大豆异黄酮糖苷 D、Gl、G 的浓度随着温度的升高呈现上升趋势。在温度较低时,温度对分子碰撞概率的影响比较大,温度升高可以加快分子运动速率,提高分子碰撞概率,

酶与底物的碰撞概率增加,从而使反应速率加快。当温度高于 55 °C 时,酶的部分蛋白质开始变形,空间结构发生改变,当温度逐渐升高,酶蛋白的变形作用更加严重,导致酶的活力降低,水解的反应速率下降,大豆异黄酮糖苷 D、Gl、G 的含量会逐渐增加,大豆异黄酮苷元 De、Gle、Ge 的含量逐渐下降。因此选择水解的最佳温度为 55 °C。

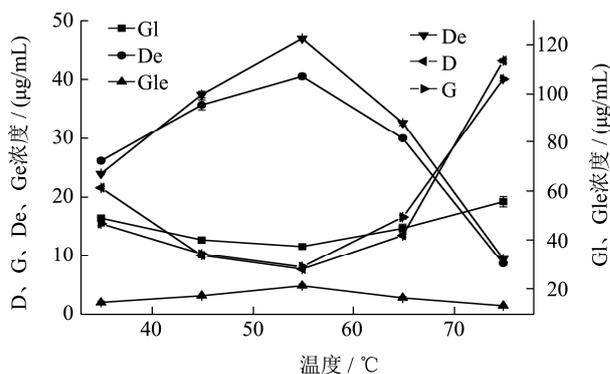


图 3 温度对大豆异黄酮糖苷水解的影响

Fig.3 Effect of temperature on hydrolysis of glycosides

## 2.3 黑曲霉 β-葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷的响应面实验

根据 Box-Behnken 中心设计原理,在单因素试验的基础上,以黑曲霉 β-葡萄糖苷酶的加酶量(A)、反应时间(B)、反应温度(C)3 因素作为响应因素,以大豆苷元(De)、黄豆黄素(Gle)和染料木素(Ge)的浓度作为响应值进行试验,试验结果如表 4。

对响应面实验结果进行方差分析,方差分析及显著性比较结果见表 5,其后得到各因素与大豆苷元(De)浓度  $Y_1$  的回归方程:

$$Y_1 = 40.14 + 2.35A + 1.87B - 0.92C + 0.34AB - 0.79AC - 3.85A^2 - 1.98B^2 - 4.24C^2$$

由表 5 可以看出,失拟项不显著( $p=0.8282 > 0.05$ ),且试验模型的差异极显著( $p < 0.0001$ ),表明软件模拟的黑曲霉 β-葡萄糖苷酶水解优化试验模型和实际情况拟合度较好。由此可认为试验各因素结果采用此方程进行分析是可行的。由于所得的相关系数  $R^2=0.9921$ ,再次说明方程预测的结果与试验结果拟合性较好。而  $R^2_{Adj}=0.9821$ ,说明可信度高。响应面回归模型中 A、B、C、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对黑曲霉 β-葡萄糖苷酶水解的影响极显著( $p < 0.01$ ),AB、AC、BC 交互因素项对大豆苷元(De)的浓度的影响不显著( $p > 0.05$ )。通过方程结果可以看出,试验中 3 个因素影响大豆苷元(De)浓度的次序为  $A > B > C$ 。

表4 响应面试验设计及结果

Table 4 Program and experimental results of Box-Behnken experimental

试验编号	A 酶量/(U/5 mL)	B 时间/h	C 温度/°C	De 浓度/(μg/mL)	Gle 浓度/(μg/mL)	Ge 浓度/(μg/mL)
1	-1	-1	0	29.838	1.799	29.206
2	1	-1	0	35.353	4.203	39.513
3	-1	1	0	33.951	3.319	34.579
4	1	1	0	38.102	3.341	46.459
5	-1	0	-1	29.759	2.048	32.018
6	1	0	-1	35.904	2.918	43.190
7	-1	0	1	29.759	1.942	29.456
8	1	0	1	32.761	3.024	37.898
9	0	-1	-1	32.945	2.665	40.848
10	0	1	-1	36.993	2.877	43.701
11	0	-1	1	30.849	2.241	32.725
12	0	1	1	34.897	2.665	39.433
13	0	0	0	40.673	4.214	46.697
14	0	0	0	40.895	4.288	46.955
15	0	0	0	39.981	4.225	47.166
16	0	0	0	39.325	4.164	45.732
17	0	0	0	39.838	4.109	46.317

表5 De 回归模型方差分析表

Table 5 De regression model analysis of variance

因素	平方和	自由度	均方	F 值	$p > F$	显著性
模型	252.82	9	28.09	98.5	< 0.0001	**
A	44.24	1	44.24	155.13	< 0.0001	**
B	27.97	1	27.97	98.07	< 0.0001	**
C	6.73	1	6.73	23.58	0.0018	**
AB	0.47	1	0.47	1.63	0.2423	
AC	2.47	1	2.47	8.66	0.0216	
BC	0	1	0	0	1	
A <sup>2</sup>	62.52	1	62.52	219.21	< 0.0001	**
B <sup>2</sup>	16.47	1	16.47	57.77	0.0001	**
C <sup>2</sup>	75.81	1	75.81	265.83	< 0.0001	**
残差	2	7	0.29			
失拟项	0.36	3	0.12	0.29	0.8282	
纯误差	1.63	4	0.41			
总离差	254.81	16				
R <sup>2</sup>					0.9921	
R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>					0.9821	

注:  $p < 0.05$ , 差异显著;  $p < 0.01$ , 差异极显著; 下同。

对响应面试验结果进行方差分析, 方差分析及显著性比较结果见表 6, 其后得到各因素与黄豆黄素(Gle)的浓度  $Y_2$  的回归方程:

$$Y_2 = 4.2 + 3.90A + 0.55B - 0.08C - 0.6AB + 0.053AC + 0.053BC - 0.58A^2 - 0.45B^2 - 1.14C^2$$

由表 6 可以看出, 失拟项不显著( $p = 0.0615 > 0.05$ ), 且试验模型的差异极显著 ( $p < 0.0001$ ), 表明软件模拟的黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解优化试验模型和实际情况拟合度较好。由此可认为试验各因素结果采用此方程进行分析是可行的。由于所得的相关系数  $R^2 = 0.9923$ ,

再次说明方程预测的结果与试验结果拟合性较好。而  $R^2_{Adj}=0.9824$ ，说明可信度高。响应面回归模型中 A、B、AB、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解条件的影 响极显著 ( $p<0.01$ )，因素 C 对黄豆黄素 (Gle)

含量的影响显著 ( $p<0.05$ )，AC、BC 交互因素项对黄豆黄素 (Gle) 含量的影响程度不显著 ( $p>0.05$ )。通过方程结果可以看出，试验中 3 个因素影响黄豆黄素 (Gle) 浓度的次序为  $A>B>C$ 。

表 6 Gle 回归模型方差分析表

Table 6 Gle regression model analysis of variance

因素	平方和	自由度	均方	F 值	$p_i>F$	显著性
模型	12.53	9	1.39	100.65	< 0.0001	**
A	2.4	1	2.4	173.17	< 0.0001	**
B	0.21	1	0.21	15.13	0.006	**
C	0.051	1	0.051	3.65	0.0475	*
AB	1.42	1	1.42	102.52	< 0.0001	**
AC	0.011	1	0.011	0.81	0.3974	
BC	0.011	1	0.011	0.81	0.3974	
$A^2$	1.42	1	1.42	102.99	< 0.0001	**
$B^2$	0.86	1	0.86	62.38	< 0.0001	**
$C^2$	5.43	1	5.43	392.21	< 0.0001	**
残差	0.097	7	0.014			
失拟项	0.079	3	0.026	5.78	0.0615	
纯误差	0.018	4	4.54E-003			
总离差	12.63	16				
$R^2$					0.9923	
$R^2_{Adj}$					0.9824	

表 7 Ge 回归模型方差分析表

Table 7 Ge regression model analysis of variance

因素	平方和	自由度	均方	F 值	$p_i>F$	显著性
模型	656.49	9	72.94	90.58	< 0.0001	**
A	218.42	1	218.42	271.22	< 0.0001	**
B	59.84	1	59.84	74.31	< 0.0001	**
C	51.23	1	51.23	63.62	< 0.0001	**
AB	0.62	1	0.62	0.77	0.4099	
AC	1.86	1	1.86	2.31	0.172	
BC	3.72	1	3.72	4.61	0.0688	
$A^2$	168.99	1	168.99	209.84	< 0.0001	**
$B^2$	32.99	1	32.99	40.96	0.0004	**
$C^2$	89.01	1	89.01	110.52	< 0.0001	**
残差	5.64	7	0.81			
失拟项	4.35	3	1.45	4.51	0.0898	
纯误差	1.29	4	0.32			
总离差	662.12	16				
$R^2$					0.9914	
$R^2_{Adj}$					0.9805	

对响应面试验结果进行方差分析，方差分析及显著性比较结果见表 7。其后得到各因素与染料木素 (Ge)  $Y_3$  的回归方程：

$$Y_3=46.57+5.23A+2.74B-2.53C+0.39AB-0.68AC+0.96BC-6.34A^2-2.8B-4.6C^2$$

由表 7 可以看出，失拟项不显著 ( $p=0.0898>0.05$ )，

且试验模型的差异极显著 ( $p < 0.0001$ ), 表明软件模拟的黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解优化试验模型和实际情况拟合度较好。由此可认为试验各因素结果采用此方程进行分析是可行的。由于所得的相关系数  $R^2=0.9914$ , 再次说明方程预测的结果与试验结果拟合性较好。而  $R^2_{Adj}=0.9805$ , 说明可信度高。响应面回归模型中 A、B、C、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对水解条件的影响极显著 ( $p < 0.01$ ), AB、AC、BC 交互因素项的影响程度不显著 ( $p > 0.05$ )。通过方程结果可以看出, 试验中 3 个因素影响大豆异黄酮苷元染料木素 (Ge) 浓度的次序为  $A > B > C$ 。

同时, 对 3 个影响因素进行优化后, 得到的最佳组合为: 加酶量 0.028 U/5 mL, 反应时间 1.64 h, 反应温度 53.82 °C, 大豆苷元 (De)、黄豆黄素 (Gle)、染料木素 (Ge) 浓度的预测值分别为 40.905  $\mu\text{g/mL}$ 、4.263  $\mu\text{g/mL}$ 、48.441  $\mu\text{g/mL}$ 。为了检验模型预测的准确性, 在最佳组合, 即加酶量 0.03 U/5 mL, 反应时间 1.5 h, 反应温度 54.0 °C 的条件下进行试验, 测得大豆苷元 (De)、黄豆黄素 (Gle)、染料木素 (Ge) 的浓度依次为  $39.434 \pm 1.410 \mu\text{g/mL}$ 、 $4.626 \pm 0.462 \mu\text{g/mL}$ 、 $45.851 \pm 2.098 \mu\text{g/mL}$ 。结果表明, 试验的测定值与软件的模拟值接近, 软件模拟出的模型是可靠的。

### 3 结论

试验利用响应面设计并建立了豆浆中大豆异黄酮苷元含量与加酶量、反应时间、反应温度三个因素之间的回归模型, 旨在优化黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解豆浆中大豆异黄酮糖苷的工艺条件, 制得大豆异黄酮苷元含量更高的豆浆。通过响应面法优化得到的水解反应的最佳组合为加酶量 0.028 U/5 mL, 反应时间 1.64 h, 反应温度 53.82 °C。在此条件下, 大豆苷元 (De)、黄豆黄素 (Gle)、染料木素 (Ge) 浓度的测定值与软件模拟值相符度较高, 进一步验证了模型的可靠性。试验获得的最佳工艺条件能最大限度的提高豆浆中大豆异黄酮苷元的浓度, 提升了豆浆的营养价值。

### 参考文献

- [1] WEI H, BOWEN R, CAI Q, et al. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine Society for Experimental Biology & Medicine, 1995, 208(1): 124-130
- [2] Coward L, Barnes N C, Setchell K D R, et al. Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41(11): 1961-1967
- [3] Akaza H, Miyanaga N, Takashima N, et al. Is daidzein non-metabolizer a high risk for prostate cancer? A case-controlled study of serum soybean isoflavone concentration [J]. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2002, 32(8): 296-300
- [4] Kaprel'ants L V, Kiselev S V, Iorgacheva E G. Soybean isoflavones and prospects of their therapeutic application [J]. Voprosy Pitaniia, 2003, 72(4): 36-41
- [5] Yang G, Shuang Z, Ludepartment P, et al. Effect of soybean isoflavone on alveolar bone absorption in osteoporosis rats with experimental periodontitis [J]. Chinese Journal of Public Health, 2007, 23(7): 854-855
- [6] Tanida M, Imanishi K, Komatsu M, et al. Soy isoflavone affects the autonomic nervous system in a tissue-specific manner in anesthetized rats [J]. Experimental Biology and Medicine, 2014, 239(4): 477-483
- [7] HAN K K, JR J M S, HAIDAR M A, et al. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms [J]. Obstetrics & Gynecology, 2002, 99(3): 389-394
- [8] 潘利华.大豆异黄酮糖苷的超临界流体萃取及固定化酶转化研究[D].合肥:合肥工业大学,2009  
PAN Li-hua. Supercritical fluid extraction and immobilized enzyme conversion of soybean isoflavone glucoside [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2009
- [9] 孙国祥,吴美仙. $\beta$ -葡萄糖苷酶水解结合型大豆异黄酮参数相关性研究[J].浙江海洋学院学报(自然科学版),2014,33(3): 284-287  
SUN Guo-xiang, WU Mei-xian. Correlation of  $\beta$ -glucosidase hydrolyzed combined soy isoflavones [J]. Journal of Zhejiang Ocean University(Natural Science), 2014, 33(3): 284-287
- [10] 齐斌,刘贤金.产大豆异黄酮  $\beta$ -葡萄糖苷酶菌株的筛选及酶学性质研究[J].食品科学,2007,28(8):290-293  
QI Bin, LIU Xian-jin. Study on screen of soybean isoflavone  $\beta$ -glucosidase-producing strain and its enzymatic properties [J]. Food Science, 2007, 28(8): 290-293
- [11] FANG W, SONG R, ZHANG X, et al. Characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from *Gongronella* sp. W5 and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(48): 11688-11695

(下转第 229 页)