

微生物发酵制备大豆异黄酮的研究进展*

井乐刚¹ 张永忠²

(哈尔滨师范大学阿城学院生物系 阿城 150301)¹

(东北农业大学基础部 哈尔滨 150030)²

摘要: 综述了微生物发酵制备大豆异黄酮特别是染料木黄酮和大豆苷元所用的菌种、发酵的工艺条件, 以及如何从发酵液中提取、分离、纯化大豆异黄酮。

关键词: 大豆异黄酮, 发酵, 提取, 纯化

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0086-04

大豆异黄酮是大豆生长中形成的一类次生代谢产物。大豆中天然存在的异黄酮总共有 12 种, 可以分为 3 类, 即黄豆苷类 (Daidzin groups)、染料木苷类 (Genistin groups)、大豆黄素苷类 (Glycitin groups), 每类以游离型 (苷元)、葡萄糖苷型、乙酰基葡萄糖苷型、丙二酰基葡萄糖苷型等 4 种形式存在^[1]。大豆中异黄酮含量约为 1,200 ~ 4,216 $\mu\text{g/g}$, 其中 95% ~ 98% 为葡萄糖苷型和丙二酰基葡萄糖苷型。发酵大豆制品如丹贝、味噌等中游离型异黄酮含量很高, 占总异黄酮的 40% ~ 100%^[2]。大豆异黄酮具有弱雌激素活性、抗氧化活性、抗溶血活性和抗真菌活性, 能有效地预防和抑制白血病、骨质疏松、癌症、妇女更年期综合症等多种疾病的发生^[3-5]。一般来说, 大豆异黄酮的苷元形式比糖苷形式活性要高, 特别是染料木黄酮 (genistein) 的活性更高。

目前市场上销售的大豆异黄酮大多为从脱脂豆粉中提取, 由于对大豆异黄酮生理功能的研究不断取得新进展, 市场对大豆异黄酮的需求量也在不断增长, 据调查年需求量在 1,500 吨, 而目前的年产量为 500 吨。其中苷元形式的异黄酮含量低。尽管可以通过酸处理或酶 (β -葡萄糖苷酶) 处理, 可得到苷元, 也可以通过化学合成的方法得到苷元, 但是生产成本都是很昂贵的。利用微生物发酵的方法生产大豆异黄酮, 和化学合成、提取法相比, 不但可以使产量大大增加, 而且还可以降低成本, 更有吸引力的是能直接生产苷元。本文通过对发酵菌种、发酵条件、提取、分离、纯化过程的系统综述, 旨在使人们对这种新的制备方法进行更深入的研究, 以便使之更快地应用于生产实践。

1 发酵菌种

目前已报道的可以产生游离型大豆异黄酮, 特别是染料木黄酮和大豆苷元 (daidzein) 的微生物有: 浅玫瑰链霉菌 (*Streptomyces roseolus* ATCC 31047)、红色糖多孢菌 (*Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635)、嗜盐小单孢菌嗜盐亚种 (*Micromonospora halophytica* subsp. halophytica ATCC 27596) 和嗜盐小单孢菌黑色亚种 (*Micromonospora halophytica* subsp. *nigra* ATCC 33088)^[6]、黄暗色链霉菌 (*Streptomyces xanthophaeus* MD865-C3)^[7]、

* 黑龙江省十五科技攻关项目 (No. GA01B404-08)

收稿日期: 2002-03-18, 修回日期: 2002-05-10

基因工程链霉菌 K_3 ^[8]、灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*)^[9]、假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp. YO-1070J)^[10]、黑曲霉 (*Asperillus niger* NRRL-3122)^[11]、斋藤曲霉 (*Aspergillus saitoi*)^[12]、米根霉 (*Rhizopus oryzae*)^[13]、红酵母 (*Rhodotorula glutinis* KCCM-10172) 长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、德氏乳杆菌 (*Lactobacillus debrueckii*)、链轮丝菌属 (*Streptoverticillium* sp. K-251)^[14]、少孢根霉 (*Rhizopus oligosporus saito*)、葡枝根霉 (*R. stolonifer vuill*)、朱根霉 (*R. oryzae* Want & Greerlings)、台湾根霉 (*R. taiwanensis nakaewa*)、无厚孢根霉 (*R. achlamydosporus takeda*)^[15]等。

上述微生物都具有产生 β -葡萄糖苷酶的特性,此酶能水解培养基中的大豆异黄酮糖苷为苷元。Schliemann报道^[6] β -葡萄糖苷酶存在于400多种微生物中。因此,可以预测,还会有大量关于产生游离型大豆异黄酮的微生物的报道。

2 发酵条件

2.1 培养基 上述微生物只有在以大豆为基质的培养基中才能发酵产生大豆异黄酮。以大豆为基质是指培养基中必须包含大豆或从大豆衍生的基质,如大豆粒、大豆粉、豆饼粉、豆粕粉、大豆蛋白胨、大豆或大豆胚提取物等。发酵培养基中除了含有大豆基质外,还必须含有淀粉、糊精、葡萄糖、玉米浆、酵母提取物、无机盐、维生素等微生物生长、代谢所必需的各种生长因子。

2.2 其他发酵条件 上述微生物经过扩培后,制成种子培养物,再把种子培养物按一定比例接种到摇床(往复式或旋转式)或发酵罐中。发酵需在有氧条件下进行。如果在摇床中发酵,三角瓶中的装液量为其容积的1/10左右,摇床转速为200~300r/min;如果在发酵罐中发酵,搅拌速度调整到300~600r/min,空气量控制在0.5~2.5vvm;在pH4.0~9.0、27℃~32℃发酵3~6d。当然,在发酵的早期和后期,空气量、搅拌速度等参数都要适当调整。

3 大豆异黄酮的提取、分离和纯化

尽管文献报道的从发酵液中提取、分离、纯化大豆异黄酮的方法各不相同,但基本都要用到过滤、离心、有机溶剂提取、柱层析、重结晶等操作。

Hazato等^[7]先把发酵液过滤,再把滤液上Amberlite XAD-2树脂柱。用水洗柱后,活性部分用甲醇洗脱,活性洗脱物减压蒸发得一浆状物,这一浆状物用甲醇溶解,上Sephadex LH-20柱,用甲醇洗脱。从Sephadex LH-20柱上得到4个馏分,把第3个馏分用硅胶柱分离得到染料木黄酮,产量为1 μ g/mL。把第4个馏分上硅胶柱,用氯仿-甲醇(10:1)洗脱,得到大豆苷元,产量为0.9 μ g/mL。

姜蓉等^[8]先把发酵液离心后,再把上清液用盐酸调pH到4,用乙酸乙酯提取,提取液经无水硫酸钠脱水后,减压浓缩得粗品。粗品经Sephadex LH-20柱层析,甲醇洗脱收集黄色馏分,再用苯-丙酮(5:2)作展开剂,进行两次制备性薄层层析,得到了大豆苷元和染料木黄酮。

Hessler等^[6]先用NaOH把发酵液调整到pH9.5,再用有机溶剂如乙酸乙酯、乙酸戊酯、正丁醇等提取;然后再用酸化水提取溶剂部分以除去红霉素;染料木黄酮保留在有机相中,而红霉素进入水相中;通过把有机溶剂蒸馏,就可以纯化染料木黄酮。*Saccharopolyspora erythraea* (ATCC 11635)在发酵终了时产生的染料木黄酮的量为2.5~

5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 *Streptomyces roseolus* (ATCC 31047) 产生的染料木黄酮的量是前者的 2 倍。

Ogawara 等^[10]把发酵液用盐酸调 pH 到 2.0, 然后 3,000r/min 离心 15min, 上清液加入乙酸乙酯, 3,000r/min 再离心 15min, 把溶剂相用蒸馏水洗涤, 然后把溶剂相干燥, 上两次硅胶柱, 再用制备性薄层层析得到染料木黄酮的粗品, 再经重结晶得到纯品染料木黄酮, 产量为 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Umezawa 等^[11]把发酵液过滤, 滤液用乙酸乙酯在 pH2.0 下萃取 3 次。湿菌丝饼用甲醇提取, 然后把甲醇蒸发, 残留物溶于 pH8.0 的水中, 在 pH2.0 下用乙酸乙酯提取 3 次, 把乙酸乙酯的提取物合并, 减压下蒸发, 得棕黑色浆状物。把此浆状物溶解于甲醇中, 上硅胶柱, 用氯仿-甲醇 (50:1) 洗脱, 分别收集活性馏分。把活性馏分在减压下蒸发干燥, 溶解于甲醇中, 上 Sephadex LH-20 柱, 用甲醇洗脱, 把洗脱液蒸发干燥。干燥后的物质溶于甲醇, 上硅胶柱, 用氯仿-甲醇 (100:1) 洗脱, 把活性洗脱物蒸发, 得到活性成分的粗晶体。然后用甲醇和苯的混合物重结晶, 得到染料木黄酮, 产量为 89.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Gyorgy 等^[13]把丹贝 (tempeh) 粉用 95% 乙醇提取, 浓缩成浆状物; 浓缩后的浆状物用 50% 乙醇提取, 再把溶剂蒸发掉; 浓缩后的油状物用乙醚提取, 再把乙醚蒸发; 残留物用 25% 乙醇处理, 从 25% 乙醇不溶部分得到大豆苷元和染料木黄酮的晶体。

4 展望

尽管目前已报道的微生物所产生的大豆异黄酮的产量并不是很高, 但是我们可以通过菌种选育, 特别是通过现代生物技术来选育优良菌种。如果能够找到并克隆生物转化基因, 如果能找出最优的发酵条件和提取、分离、纯化操作, 就可以通过微生物发酵来大量生产大豆异黄酮的苷元。当然, 在这方面要做的工作还很多。可以预见, 在不久的将来, 通过微生物发酵方法生产的大豆异黄酮, 特别是苷元形式的大豆异黄酮, 在食品、医药等方面的应用会非常广泛。

参考文献

- [1] Kudou S, Fleury Y, Welti D, *et al.* J Agric Biol Chem, 1991, 55: 2227 ~ 2233.
- [2] Wang H, Murphy P A. J Agric Food Chem, 1994, 42: 1666 ~ 1673.
- [3] Naim M, Gestetner B, Zikah S, *et al.* J Agric Food Chem, 1974, 22: 806 ~ 810.
- [4] Han K K, Soares J M, Haidar M A, *et al.* Obstet Gynecol, 2002, 99 (3): 389 ~ 394.
- [5] Messina M, Barnes S. J Natl Cancer Inst, 1991, 83: 541 ~ 546.
- [6] Weber J M, Constantiou A I, Hessler P E. U S Patent, 5554519.
- [7] Hazato T, Naganawa H, Kumagai M, *et al.* J Antibiotics, 1979, 32 (3): 217 ~ 222.
- [8] 姜 蓉, 李保义, 肖春玲, 等. 中国抗生素杂志, 1997, 22 (2): 81 ~ 83, 139.
- [9] Sariaslani F S, Kunz D A. Biochem Biophys Res Commun, 1986, 141 (2): 405 ~ 410.
- [10] Ogawara H, Akiyama T, Ishida J. J Antibiotics, 1986, 39 (6): 606 ~ 608.
- [11] Umezawa H, Tobe H, Shibamoto N, *et al.* J Antibiotics, 1975, 28 (12): 947 ~ 952.
- [12] Esaki H, Watanabe R, Onozaki H, *et al.* Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63 (5): 851 ~ 858.
- [13] Gyorgy P, Murata K, Ikehata H. Nature, 1964, 203 (4947): 870 ~ 872.
- [14] Sung T K, Park K S. U S Patent, 6245536.
- [15] 吴 定, 江汉湖. 中国调味品, 2001, (6): 3 ~ 6.