

# 苦杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解豆浆中 大豆异黄酮的工艺研究

郭天赐<sup>1,2</sup>, 赵石磊<sup>1,2</sup>, 刘石生<sup>1,2,\*</sup>

(1. 海南大学 食品学院, 海南海口 570228; 2. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室,  
海南海口 570228)

**摘要:**大豆异黄酮的生理活性主要靠异黄酮苷元来发挥, 该试验研究在豆浆中添加苦杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶对大豆异黄酮苷元的影响。采取高效液相色谱检测的方法, 通过响应面优化试验, 得到最佳组合为: 加酶量为 1.4 U/5mL, 酶解时间 40 min, 酶解温度 46.0 °C。测得染料木素(Ge)、黄豆黄素(Gle)、大豆苷元(De)的含量分别为(38.643±2.03)、(5.119±0.275)、(36.954±1.67)  $\mu\text{g/mL}$ 。

**关键词:**大豆异黄酮; 大豆异黄酮苷元; 高效液相色谱; 豆浆; 苦杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶

## Study on the Hydrolyzation of Soybean Isoflavone Aglycones in Soymilk by Bitter Almond $\beta$ -glucosidase

GUO Tian-ci<sup>1,2</sup>, ZHAO Shi-lei<sup>1,2</sup>, LIU Shi-sheng<sup>1,2,\*</sup>

(1. College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China; 2. Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China)

**Abstract:** The physiological activity of soy isoflavones mainly depends on isoflavone aglycones, and the study explored the increasing of soybean isoflavone aglycones in soymilk by adding bitter almond  $\beta$ -glucosidase. The results of surface optimization test showed the best combination of hydrolytic technology were enzymic addition of 1.4 U/5 mL, reactive time of 40 min and reactive temperature of 46.0 °C by high performance liquid chromatography (HPLC) detection method, and the concentration of genistein, glycitein and daidzein were (38.643±2.03), (5.119±0.275), (36.954±1.67)  $\mu\text{g/mL}$ .

**Key words:** soybean isoflavone; isoflavone aglycones; high performance liquid chromatography (HPLC); soymilk; bitter almond  $\beta$ -glucosidase

引文格式:

郭天赐, 赵石磊, 刘石生. 苦杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解豆浆中大豆异黄酮的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(12): 82-88

GUO Tianci, ZHAO Shilei, LIU Shisheng. Study on the Hydrolyzation of Soybean Isoflavone Aglycones in Soymilk by Bitter Almond  $\beta$ -glucosidase[J]. Food Research and Development, 2019, 40(12): 82-88

$\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -D-glucoside, EC3.2.1.21)可以水解糖基原子与羟基或芳香基团结合的糖苷键生成葡萄糖和相应的配基, 它属于一种水解酶<sup>[1-2]</sup>, Liebig 和 Wohler 在研究苦杏仁汁时, 该酶才被第一次报道<sup>[3]</sup>。大豆异黄酮具有抑制癌症<sup>[4-5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、防止骨质疏松<sup>[7]</sup>、防治动脉硬化<sup>[8]</sup>、抵抗神经退化疾病<sup>[9]</sup>、防糖尿病<sup>[10]</sup>等保

健作用, 研究发现其生物学功能的发挥主要依靠游离型苷元形式<sup>[11]</sup>,  $\beta$ -葡萄糖苷酶可水解大豆异黄酮糖苷<sup>[12-17]</sup>成游离型苷元。姚轶俊等<sup>[18]</sup>、周荧等<sup>[19]</sup>研究了固定化 $\beta$ -葡萄糖苷酶在大豆异黄酮水解上的应用, 发现其水解率得到明显的提升。Hsieh M C 等<sup>[20]</sup>、W Fang 等<sup>[21]</sup>从不同霉菌中提取获得 $\beta$ -葡萄糖苷酶, 结果显示来源于真菌的该酶对大豆异黄酮的水解具有很好的效果。大豆异黄酮在大豆中含量最高, 而豆浆是大众最常饮用、最受欢迎的大豆食品, 因而本课题研究在豆浆中添加苦杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶, 对其中大豆异黄酮糖苷水

基金项目: 国家自然科学基金(31460407)

作者简介: 郭天赐(1995—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品工程。

\* 通信作者: 刘石生(1977—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 天然植物资源开发与利用。

解的影响,有利于豆浆营养价值的提升。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生苦杏仁:市售;东北大豆:海口市鹏泰兴超市。  
氯化钠、石油醚(60~90)、十二水和磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、酒石酸、乙酸锌、氯化镁、硝酸铝、无水甲醇、磷酸、无水乙醇:海南擎峰试剂有限公司,均为分析纯;乙腈(色谱纯):默克化工技术有限公司。

对硝基苯-β-D-葡萄糖苷(4'-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside,pNPG,质量分数≥99%)、考马斯亮蓝 R-250、大豆苷、染料木苷、黄豆黄苷、大豆苷元、染料木素、黄豆黄素:上海源叶生物科技有限公司,均为生化试剂。

1.2 仪器与设备

XL-130B 粉碎机、IKA;HH-S26S 电热恒温水浴锅:金坛市大地自动化仪器厂;FSH-II 型匀浆器:江苏金坛市环宇科学仪器厂;TG16G 离心机:湖南凯达科学仪器有限公司;BS124S 电子天平:德国 Sartorius 公司;PHS-3C pH 计:上海雷磁仪器厂;7230G 可见分光光度计:上海精科实业有限公;XO-5200TDT 超声波清洗机:南京先欧仪器制造有限公司;1-14 小型台式离心机:Sigma 公司;安捷伦 1260 液相色谱仪:安捷伦科技(中国)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 高效液相色谱测定条件

色谱柱:Agilent TC-C18 柱,250 mm×4.6 mm,5 μm;保护柱芯:ZORBAX Eclipse Plus,12.5 mm×4.6 mm,5 μm;检测波长:260 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL;流动相:A(pH 3 的磷酸水溶液)、B(乙腈);后运行时间:5 min;梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件  
Table 1 The condition of gradient elution

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

1.3.2 大豆异黄酮标准曲线的建立

精确称取大豆苷(D)、大豆苷元(De)、黄豆黄苷(GI)、黄豆黄素(GIe)、染料木苷(G)、染料木素(Ge)标样各 5.0 mg,加入 80 %的甲醇溶液,超声溶解,定容至刻度,即为标准储备液。精准吸取不同体积的标准储备液,配制成不同浓度的混合标样溶液,用 0.45 μm 有机系的滤膜过滤,滤液装入进样品瓶中,高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)分析,测定各组分的峰面积。以大豆异黄酮各组分的峰面积(Y)为纵坐标,浓度(X)为横坐标,进行回归分析,计算大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄豆黄素、染料木苷、染料木素标准曲线。

大豆异黄酮含量的计算:

样品浓度=(样品峰面积/标样峰面积)×标样浓度×稀释倍数

1.3.3 豆浆的制备方法

准确称取东北大豆 100 g,洗净放入烧杯中,加入蒸馏水 500 mL 于 25 ℃条件下浸泡 8 h~10 h,再用蒸馏水定量至 1 000 mL,倒入豆浆机中制成豆浆(干湿模式),滤网过滤,冷却后放入冰箱冷藏(4 ℃)待用。

1.3.4 苦杏仁 β-葡萄糖苷酶酶液的制备方法

参考王佩环<sup>[22]</sup>的方法,称取一定量苦杏仁,粉碎,与丙酮按料液比 1:3(g/mL)脱脂,抽滤,待丙酮挥干,加水[料液比 1:5(g/mL)]复溶,高速匀浆后离心过滤,加与滤液等量的丙酮再次沉淀,离心后弃去上清液,待丙酮挥干,将沉淀重新用蒸馏水溶解,匀浆,即为所需酶液,于冰箱 4 ℃冷藏保存。

1.3.5 测定 β-葡萄糖苷酶酶活性方法

参考李斐然等<sup>[23]</sup>的方法,对 β-葡萄糖苷酶的活力进行测定。

测得标准曲线为: $Y=17.071X-0.0009$ , $R^2=0.9998$ 。

酶活/(U/mL)= $0.5x/(30\times0.1)\times C$ ,C 为稀释倍数。

1.3.6 样品的制备

于 25 mL 具塞试管中加入 5 mL 豆浆,再加入适量稀释后的 β-葡萄糖苷酶液,在水浴锅中(不同温度)反应一段时间后沸水浴 5 min,冷却至 25 ℃,得到反应液。于 10 mL 容量瓶中加入 2 mL 反应液和 80 %甲醇溶液,50 ℃超声 30 min 后冷却至 25 ℃,用 80 %甲醇溶液定容,得到样品溶液。将样品溶液置于 2 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液过 0.45 μm 的有机滤膜,滤液收集于进样小瓶中,4 ℃冷藏待用。

1.3.7 苦杏仁 β-葡萄糖苷酶对大豆异黄酮糖苷的水解试验

将苦杏仁 β-葡萄糖苷酶液和豆浆于一定条件下

反应,通过调节加酶量( $A$ )、酶解时间( $B$ )、酶解温度( $C$ )以获得更多的大豆苷元(De)、黄豆黄素(Gle)、染料木素(Ge)。

### 1.3.7.1 单因素试验设计

以大豆苷(D)、大豆苷元(De)、黄豆黄苷(Gl)、黄豆黄素(Gle)、染料木苷(G)、染料木素(Ge)为指标,设计单因素试验为:加酶量(0、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 U/5 mL)、酶解时间(0、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5 h)、酶解温度(30、35、45、55、65、75  $^{\circ}\text{C}$ )

### 1.3.7.2 响应面优化试验

在单因素试验的基础上,以大豆苷元(De)、黄豆黄素(Gle)、染料木素(Ge)含量为响应值,设计三因素三水平的响应面优化试验,各因素水平见设计表2。

表2 响应面试验因素与水平

Table 2 The factors and levels of response surface analysis

| 水平 | 因素            |        |                          |
|----|---------------|--------|--------------------------|
|    | A 酶量/(U/5 mL) | B 时间/h | C 温度/ $^{\circ}\text{C}$ |
| -1 | 0.5           | 0.25   | 35                       |
| 0  | 1             | 0.5    | 45                       |
| 1  | 1.5           | 0.75   | 55                       |

### 1.3.8 数据统计分析

试验数据结果取3次平行测定结果 $\bar{X} \pm \text{SD}$ 表示。采用Excel 2016、DPS数据处理系统、OriginPro9.2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的建立

以大豆异黄酮的浓度为横坐标,HPLC所测峰面积的平均值为纵坐标,以峰面积 $Y$ 与质量浓度 $X(\mu\text{g/mL})$ 进行回归分析,得到线性方程。回归方程见表3。

表3 6种大豆异黄酮标准品的标准曲线

Table 3 Standard curve of six soy isoflavone standards

| 组分简称 | 出峰时间/min | 回归方程               | $R^2$  | 线性范围/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|------|----------|--------------------|--------|-------------------------------|
| 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 大豆异黄酮色谱图

对6种大豆异黄酮的混标进行色谱分析,根据单标的保留时间确定依次出峰为大豆苷(D)、黄豆黄苷(Gl)、染料木苷(G)、大豆苷元(De)、黄豆黄素(Gle)、染料木素(Ge),对应出峰时间分别是13.844、14.618、20.350、32.293、33.616、43.319 min。

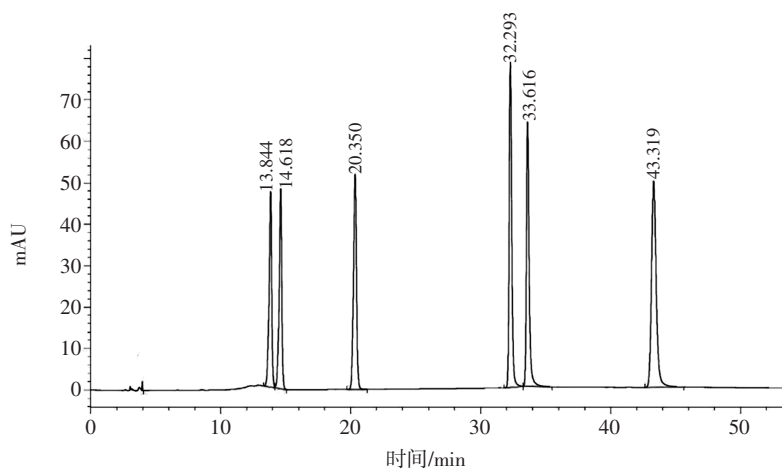


图1 6种大豆异黄酮混合标准品色谱图

Fig.1 The chromatograms of six soy isoflavone in standards substance

### 2.3 苦杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶对大豆异黄酮糖苷水解影响

#### 2.3.1 加酶量对大豆异黄酮水解的影响

控制酶解温度为45  $^{\circ}\text{C}$ ,酶解时间为0.5 h,改变加酶量,HPLC检测大豆异黄酮各组分的含量变化,结果

见图2。

随着加酶量的上升,大豆异黄酮糖苷(D、G、Gl)的含量急剧下降,大豆异黄酮苷元(De、Ge、Gle)的含量呈上升趋势。当加酶量超过1 U/5 mL时,随着酶量的增加,大豆异黄酮各组分呈现稳定的趋势。这是因为

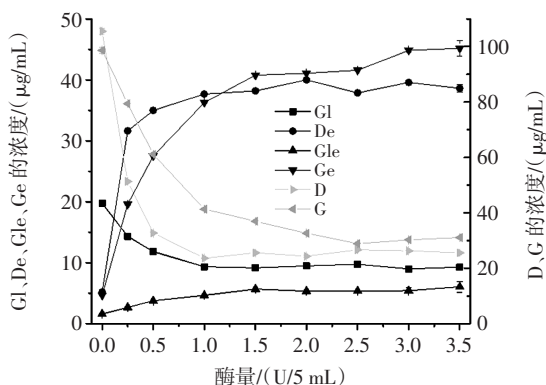


图2 加酶量对大豆异黄酮糖苷水解的影响

Fig.2 The effect of enzyme addition on soybean isoflavone hydrolysis

刚加酶时,大豆异黄酮糖苷底物浓度高,大大超过酶的浓度,酶的浓度与反应速度呈量效关系,当酶的浓度增加时,酶水解速度加快,大豆异黄酮糖苷(D、G、Gl)的含量迅速下降,大豆异黄酮苷元(De、Ge、Gle)的含量逐渐升高,此时影响大豆异黄酮各组分含量的决定因素是酶的加入量。随着酶量的增加,大豆异黄酮苷元(De、Ge、Gle)的浓度增高,此时影响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影响不大。为了降低生产成本,并得到理想的处理效果,优选加酶量为1 U/5 mL。

### 2.3.2 酶解时间对大豆异黄酮水解的影响

控制加酶量为1 U/5 mL,酶解温度为45℃,改变酶解时间,HPLC检测大豆异黄酮各组分的含量变化,结果见图3。

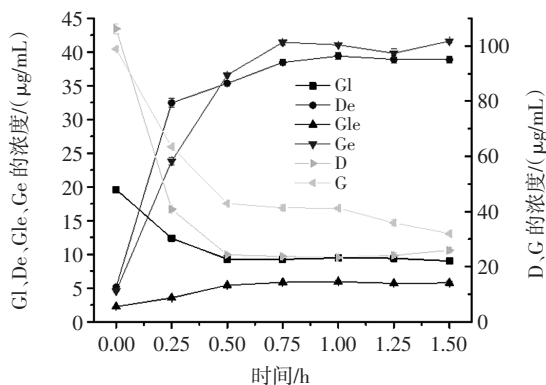


图3 时间对大豆异黄酮糖苷水解的影响

Fig.3 The effect of time on soybean isoflavone hydrolysis

随着反应时间的增加,大豆异黄酮苷(D、G、Gl)呈现下降的趋势,大豆异黄酮苷元(De、Ge、Gle)的含量不断增加。当酶解时间超过0.5 h时,随着时间的增加,所测6种大豆异黄酮的含量变化趋于稳定状态。因为反应刚开始时,苦杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶与底物作用的时

间太短,不能有效的将糖苷型大豆异黄酮水解。随着酶与底物接触时间的增加,可以看出大豆异黄酮糖苷(D、G、Gl)的含量逐渐降低,大豆异黄酮苷元(De、Ge、Gle)的含量逐渐增加。当酶解到达一定程度时,受到大豆异黄酮产物浓度的抑制作用,水解反应达到平衡,大豆异黄酮各组分的含量不再变化。因此选择酶解时间为0.5 h。

### 2.3.3 酶解温度对大豆异黄酮水解的影响

控制加酶量为1 U/5 mL,酶解时间为0.5 h,改变酶解温度,HPLC检测大豆异黄酮各组分的含量变化,结果见图4。

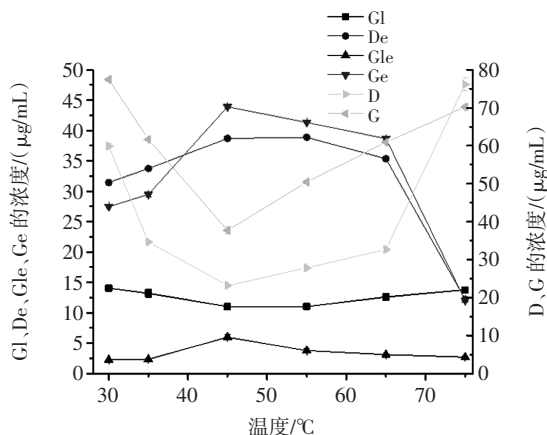


图4 温度对大豆异黄酮糖苷水解的影响

Fig.4 The effect of temperature on soybean isoflavone hydrolysis

温度低于45℃时,大豆异黄酮糖苷(D、G、Gl)的含量随着温度的升高呈现下降的趋势,而大豆异黄酮苷元(De、Ge、Gle)的含量则随温度的升高不断上升。当温度超过45℃时,大豆异黄酮糖苷(D、G、Gl)的含量与温度呈现正相关的关系,大豆异黄酮苷元(De、Ge、Gle)的含量随温度升高含量逐渐下降。这是因为在温度较低时,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45℃时,酶的部分蛋白质开始变形,空间结构发生变化,温度升高对酶蛋白的变形作用更加严重,导致酶的活力下降,酶水解的反应速率下降,大豆异黄酮糖苷(D、G、Gl)的含量会逐渐增加,大豆异黄酮苷元(De、Ge、Gle)的含量逐渐下降。因此选择最佳温度为45℃。

### 2.3.4 苦杏仁 $\beta$ -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,以苦杏仁 $\beta$ -葡萄糖苷酶的加酶量(A)、酶解时间(B)、酶解温度(C)作为响应因素,以大豆异黄酮苷元(De、Gle、Ge)浓度作

为响应值进行试验,试验结果见表4。

表4 响应面试验设计及结果

Table 4 The response surface design and experimental result

| 试验编号 | A 酶量 | B 时间 | C 温度 | De 浓度/<br>(μg/mL) | Gle 浓度/<br>(μg/mL) | Ge 浓度/<br>(μg/mL) |
|------|------|------|------|-------------------|--------------------|-------------------|
| 1    | -1   | -1   | 0    | 28.218            | 3.010              | 23.605            |
| 2    | 1    | -1   | 0    | 32.996            | 4.429              | 35.539            |
| 3    | -1   | 1    | 0    | 32.663            | 4.424              | 31.747            |
| 4    | 1    | 1    | 0    | 37.273            | 5.707              | 42.049            |
| 5    | -1   | 0    | -1   | 28.290            | 2.183              | 22.097            |
| 6    | 1    | 0    | -1   | 32.986            | 4.742              | 37.601            |
| 7    | -1   | 0    | 1    | 27.557            | 3.235              | 25.734            |
| 8    | 1    | 0    | 1    | 32.513            | 4.345              | 39.023            |
| 9    | 0    | -1   | -1   | 28.128            | 2.524              | 24.467            |
| 10   | 0    | 1    | -1   | 33.388            | 4.596              | 32.514            |
| 11   | 0    | -1   | 1    | 28.523            | 3.067              | 21.322            |
| 12   | 0    | 1    | 1    | 34.611            | 5.148              | 39.372            |
| 13   | 0    | 0    | 0    | 37.674            | 5.654              | 42.272            |
| 14   | 0    | 0    | 0    | 36.365            | 5.433              | 41.598            |
| 15   | 0    | 0    | 0    | 38.690            | 5.517              | 42.674            |
| 16   | 0    | 0    | 0    | 36.807            | 5.408              | 40.256            |
| 17   | 0    | 0    | 0    | 37.012            | 5.856              | 41.895            |

利用 Design-expert 7.0.0 软件对数据进行回归分析,得到各因素与大豆苷元(De)浓度  $Y_1$  回归方程为:

$Y_1=37.31+2.38A+2.38B+0.18C-0.042AB+0.065AC-0.043BC-2.8A^2-1.72B^2-4.17C^2$ 。De 回归模型方差分析见表5。

表5 De 回归模型方差分析表

Table 5 The variance analysis of regression model of De

| 因素          | 平方和      | 自由度 | 均方       | F 值      | $P>F$    | 显著性 |
|-------------|----------|-----|----------|----------|----------|-----|
| 模型          | 221.75   | 9   | 24.64    | 31.71    | <0.000 1 | **  |
| A           | 45.32    | 1   | 45.32    | 58.32    | 0.000 1  | **  |
| B           | 45.46    | 1   | 45.46    | 58.51    | 0.000 1  | **  |
| C           | 0.25     | 1   | 0.25     | 0.32     | 0.038 8  | *   |
| AB          | 0.007 06 | 1   | 0.007 06 | 0.009 08 | 0.926 8  |     |
| AC          | 0.017    | 1   | 0.017    | 0.022    | 0.886 9  |     |
| BC          | 0.007 04 | 1   | 0.007 04 | 0.009 52 | 0.925    |     |
| $A^2$       | 32.99    | 1   | 32.99    | 42.46    | 0.000 3  | **  |
| $B^2$       | 12.5     | 1   | 12.5     | 16.09    | 0.005 1  | **  |
| $C^2$       | 73.36    | 1   | 73.36    | 94.42    | <0.000 1 | **  |
| 残差          | 5.44     | 7   | 0.78     |          |          |     |
| 失拟项         | 2.17     | 3   | 0.72     | 0.88     | 0.521 5  |     |
| 纯误差         | 3.27     | 4   | 0.82     |          |          |     |
| 总离差         | 227.19   | 16  |          |          |          |     |
| $R^2$       |          |     |          |          | 0.976 1  |     |
| $R^2_{Adj}$ |          |     |          |          | 0.945 3  |     |

注: $P<0.05$ ,差异显著; $P<0.01$ ,差异极显著。

由表5所示可知,方程模型是极显著的( $P<0.01$ ),失拟项不显著( $P=0.521\ 5>0.05$ ),说明该模型拟合良好,可以用于分析和预测苦杏仁β-葡萄糖苷酶水解大豆苷(D)的试验条件。该模型一次项中的A、B,二次项中的 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 对苦杏仁β-葡萄糖苷酶水解有极显著的影响,二次项中的AB、BC、AC交互作用对苦杏仁β-葡萄糖苷酶水解的影响不显著,一次项中C对水解反应的影响显著,模型的相关系数 $R^2=0.976\ 1$ ,说明试验误差较小。而 $R^2_{Adj}=0.945\ 3$ ,说明可信度较高。通过结果可以看出,本试验中3个因素影响大豆苷元(De)浓度的次序为 $B>A>C$ 。

利用 Design-expert 7.0.0 软件对数据进行回归分析,得到各因素与黄豆黄素(Gle)浓度  $Y_2$  回归方程为:

$Y_2=5.57+0.8A+0.86B+0.22C-0.034AB-0.36AC+2.25\times10^{-3}BC-0.69A^2-0.49B^2-1.25C^2$ 。Gle 回归模型方差分析见表6。

表6 Gle 回归模型方差分析表

Table 6 The variance analysis of regression model of Gle

| 因素          | 平方和         | 自由度 | 均方          | F 值       | $P>F$    | 显著性 |
|-------------|-------------|-----|-------------|-----------|----------|-----|
| 模型          | 22.39       | 9   | 2.49        | 31.99     | <0.000 1 | **  |
| A           | 5.07        | 1   | 5.07        | 65.23     | <0.000 1 | **  |
| B           | 5.86        | 1   | 5.86        | 75.29     | <0.000 1 | **  |
| C           | 0.38        | 1   | 0.38        | 4.92      | 0.046 2  | *   |
| AB          | 0.004 62    | 1   | 0.004 62    | 0.059     | 0.814 4  |     |
| AC          | 0.52        | 1   | 0.52        | 6.75      | 0.035 5  | *   |
| BC          | 0.000 020 3 | 1   | 0.000 020 3 | 0.000 204 | 0.987 6  |     |
| $A^2$       | 2.03        | 1   | 2.03        | 26.09     | 0.001 4  | **  |
| $B^2$       | 1           | 1   | 1           | 12.83     | 0.009    | **  |
| $C^2$       | 6.61        | 1   | 6.61        | 84.99     | <0.000 1 | **  |
| 残差          | 0.54        | 7   | 0.078       |           |          |     |
| 失拟项         | 0.41        | 3   | 0.14        | 3.98      | 0.107 6  |     |
| 纯误差         | 0.14        | 4   | 0.034       |           |          |     |
| 总离差         | 22.94       | 16  |             |           |          |     |
| $R^2$       |             |     |             |           | 0.976 3  |     |
| $R^2_{Adj}$ |             |     |             |           | 0.945 7  |     |

注: $P<0.05$ ,差异显著; $P<0.01$ ,差异极显著。

由表6所示可知,在失拟项不显著的前提下,得到的回归方程极其显著。该结果表明,采用软件模拟的方程模型是理想的。所得的相关系数 $R^2=0.976\ 3$ ,说明方程预测的结果与试验结果拟合性较好,而 $R^2_{Adj}=0.945\ 7$ ,说明可信度高。响应面回归模型中A、B、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ ( $P<0.01$ )对苦杏仁β-葡萄糖苷酶水解的影响极显著,C、AC对苦杏仁β-葡萄糖苷酶水解的影响显著,AB、BC( $P>0.05$ )交互因素项对黄豆黄素(Gle)的浓度的影响不显著。通过结果可以看出,本试验中3

个因素影响黄豆黄素(Gle)浓度的次序为  $B>A>C$ 。

利用 Design-expert 7.0.0 软件对数据进行回归分析,得到各因素与染料木素(Ge)浓度  $Y_3$  回归方程为:

$Y_3=41.74+6.38A+4.84B+1.35C-0.41AB-0.55AC+2BC-3.65A^2-4.85B^2-6.97C^2$ 。Ge 回归模型方差分析见表 7。

表 7 Ge 回归模型方差分析表  
Table 7 The variance analysis of regression model of Ge

| 因素                            | 平方和    | 自由度 | 均方     | F 值    | Pr>F     | 显著性 |
|-------------------------------|--------|-----|--------|--------|----------|-----|
| 模型                            | 943.79 | 9   | 104.87 | 36.74  | <0.000 1 | **  |
| A                             | 325.49 | 1   | 325.49 | 114.03 | <0.000 1 | **  |
| B                             | 187.69 | 1   | 187.69 | 65.75  | <0.000 1 | **  |
| C                             | 14.5   | 1   | 14.5   | 5.08   | 0.058 8  |     |
| AB                            | 0.67   | 1   | 0.67   | 0.23   | 0.643 8  |     |
| AC                            | 1.23   | 1   | 1.23   | 0.43   | 0.533 1  |     |
| BC                            | 16.01  | 1   | 16.01  | 5.61   | 0.049 7  | *   |
| A <sup>2</sup>                | 56.23  | 1   | 56.23  | 19.7   | 0.003    | **  |
| B <sup>2</sup>                | 99.02  | 1   | 99.02  | 34.69  | 0.000 6  | **  |
| C <sup>2</sup>                | 204.6  | 1   | 204.6  | 71.68  | <0.000 1 | **  |
| 残差                            | 19.98  | 7   | 2.85   |        |          |     |
| 失拟项                           | 16.58  | 3   | 5.53   | 6.5    | 0.051 2  |     |
| 纯误差                           | 3.4    | 4   | 0.85   |        |          |     |
| 总离差                           | 963.77 | 16  |        |        |          |     |
| R <sup>2</sup>                |        |     |        |        | 0.979 3  |     |
| R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub> |        |     |        |        | 0.952 6  |     |

注: $P<0.05$ ,差异显著; $P<0.01$ ,差异极显著。

由表 7 所示可知,在失拟项不显著的前提下,得到的回归方程极其显著。结果表明,采用软件模拟的方程模型是理想的。所得的相关系数  $R^2=0.979\ 3$ ,说明了方程预测的结果与试验结果拟合性较好。而  $R^2_{Adj}=0.952\ 6$ ,说明可信度高。从各因素 A、B、C 对染料木素(Ge)浓度的影响来看,A、B、A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>的影响均为极其显著( $P<0.01$ ),BC 的交互作用对 Ge 的浓度影响显著( $P<0.05$ )。而 C 与 AB、AC 的交互作用对染料木素(Ge)的浓度影响不显著。通过方程结果可以看出,试验中 3 因素的影响稳定性系数值得次序为: $A>B>C$ ;由方程及方差分析结果可看出各因素与染料木素(Ge)浓度之间的关系呈二次关系。

优化 3 个影响因素的最佳组合为:加酶量为 1.28 U/5 mL,酶解时间 0.66 h,酶解温度为 45.6 ℃,预测大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的浓度分别为 38.561、6.135、45.255 μg/mL。在试验条件下:加酶量为 1.4 U/5mL,反应时间 40 min,反应温度 46.0 ℃,测得大豆异黄酮苷元(De、Gle、Ge)的浓度分别为(36.954±1.67)、(5.119±0.275)、(38.643±2.03) μg/mL,与模型预估值相差不

大,说明软件模拟出的模型是可信的。

3 结论

将苦杏仁  $\beta$ -葡萄糖苷酶添加到豆浆中进行反应,通过控制加酶量、酶解温度和酶解时间进行单因素试验。以单因素为基础进行响应面优化试验,得到 3 个影响因素的最佳组合为:加酶量为 1.4 U/5mL,反应时间 40 min,反应温度 46.0 ℃,测得大豆异黄酮苷元(De、Gle、Ge)的浓度分别为(36.954±1.67)、(5.119±0.275)、(38.643±2.03) μg/mL。

已有研究分别从大豆、鹰嘴豆、黄热厌氧芽孢杆菌、土曲霉等<sup>[15,24-25]</sup>中提取  $\beta$ -葡萄糖苷酶,用以水解大豆异黄酮糖苷,并进一步将其进行固定化,结果显示微生物来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶比植物来源的热稳定性更强,最适水解温度更加宽泛,水解效果更好,且固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶相比之下提高了利用重复率,反应过程更易控制。目前研究最广泛水解大豆异黄酮糖苷的酶是  $\beta$ -葡萄糖苷酶,其次是半乳糖苷酶<sup>[26]</sup>,少数有机酸<sup>[27-28]</sup>也能水解大豆异黄酮,更多水解大豆异黄酮的方法有待进一步研究。

参考文献:

[1] 潘利华,罗建平,罗水忠,等.高活性大豆异黄酮糖苷酶的分离原料筛选、纯化及性质研究[J].食品科学,2009,30(1):166-170

[2] 孟宪文,宋小红,陈历俊,等. $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究进展[J].中国乳业,2009(10):42-44

[3] 李远华. $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究进展[J].安徽农业大学学报,2002,20(4):21-425

[4] 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

[5] 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]. J Agric Food Chem, 1993, 41(11): 1961-1967

[6] 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

[7] GUO Y, ZHAO S, PEI L D, et al. Effect of soybean isoflavone on alveolar bone absorption in osteoporosis rats with experimental periodontitis[J]. Chinese Journal of Public Health, 2007(7): 854-855

[8] KAPRELIANTS L V, KISELEV S V, IORGACHEVA E G. Soybean isoflavones and prospects of their therapeutic application[J]. Vo-prosy Pitaniia, 2003, 72(4): 36

[9] TANIDA M, IMANISHI K, KOMATSU M, et al. Soy isoflavone af-

- fects the autonomic nervous system in a tissue-specific manner in anesthetized rats[J]. *Experimental Biology & Medicine*, 2014, 239(4): 477-483
- [10] WANG H, MURPHY P A. Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location[J]. *J. agric. food Chem*, 1994, 42(8): 1674-1677
- [11] 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
- [12] GRADE L C, MOREIRA A A, Varea G D S, et al. Soybean $\beta$ -Glucosidase immobilised on chitosan beads and its application in soy drink increase the aglycones [J]. *Brazilian Archives of Biology & Technology*, 2014, 57(5): 766-773
- [13] Suzuki H, Takahashi S, Watanake R, et al. An isoflavone conjugate-hydrolyzing keta-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings: purification, gene cloning, phylogenetics and cellular localization[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(40): 30251-30259
- [14] SONG X, XUE Y, WANG Q, et al. Comparison of three thermostable $\beta$ -glucosidases for application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(5): 1954
- [15] 孙艳梅, 张永忠, 王伊强, 等. 大豆  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷的研究[J]. *中国粮油学报*, 2006, 21(2): 86-89
- [16] 李笑梅, 向世新, 杨春华, 等. 发酵酶解耦合合法大豆苷元转化工艺[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(19): 118-124
- [17] 刘颖, 曹小芳, 郑芳, 等. 具有大豆异黄酮水解活性的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的纯化和特性[J]. *南开大学学报: 自然科学版*, 2017(2): 91-101
- [18] 姚铁俊, 王立峰, 鞠兴荣. 纤维素载体固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶及其在大豆异黄酮水解中的应用[J]. *食品科学*, 2017, 38(24): 177-182
- [19] 周炎, 魏建林, 罗胜保, 等. 固定化  $\beta$ -葡萄糖苷酶在异黄酮生物转化中的应用[J]. *粮食科技与经济*, 2016, 41(2): 37-40, 50
- [20] Hsieh M C, Graham T L. Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates[J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(7): 995-1005
- [21] 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
- [22] 王佩环. 橡胶籽  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮的研究[D]. 海口: 海南大学, 2013: 9
- [23] 李斐然, 刘石生, 王海燕. 橡胶籽中  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定条件研究[J]. *食品科技*, 2011(5): 264-267
- [24] 刘洋. 黄热厌氧芽孢杆菌云南亚种三种新型糖苷酶的鉴定及性质研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2017: 5-11
- [25] 闫丰英. 产  $\beta$ -葡萄糖苷酶微生物的筛选、酶学特性及水解大豆异黄酮的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016: 8-14
- [26] Pham T T, Shah N P. Hydrolysis of isoflavone glycosides in soy milk by  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -glucosidase[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2009, 33(1): 38-60
- [27] 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
- [28] 于丽颖, 罗亚楠. 酒石酸催化大豆异黄酮糖苷水解苷元的工艺研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2014, 35(6): 86-88

收稿日期: 2018-11-04

进行伟大斗争、建设伟大工程、  
推进伟大事业、实现伟大梦想。