



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1966705 B

(45) 授权公告日 2010.08.11

(21) 申请号 200610134132.9

7. 2000, 21(7), 摘要.

(22) 申请日 2006.10.30

审查员 林峻凯

(73) 专利权人 辽宁省微生物科学研究院

地址 122000 辽宁省朝阳市文化路二段 22 号

(72) 发明人 李剑梅 刘艳玲 李莉 王振丽 宗玉丽

(51) Int. Cl.

C12P 17/06(2006.01)

C12R 1/69(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1733926 A, 2006.02.15, 权利要求 1-5 和 9, 说明书第 3 页第 11 行, 第 4 页第 12-28 行, 第 8 页第 8 行以及实施例 3 和 7.

王淑豪等. 米曲霉 3042 的液体培养特性及其产氨基酰化酶的特性研究. 食品科学 21

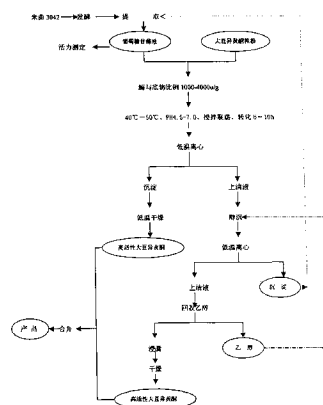
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

微生物酶法制备大豆异黄酮苷元的方法

(57) 摘要

微生物酶法制备大豆异黄酮苷元的方法, 是以大豆异黄酮粉为原料, 用培养米曲霉菌发酵制备 β -葡萄糖苷酶, 将大豆异黄酮苷转化为大豆异黄酮苷元, 其特征是该制备方法包括以下步骤: 所述原料为 2~90% 的大豆异黄酮粉; 筛选的菌种为米曲霉菌 3042, 用该菌种制备种子培养液; 制备固体发酵培养基, 得到含有 β -葡萄糖苷酶的发酵物; 将大豆异黄酮粉加入到经发酵提取的 β -葡萄糖苷酶溶液中制取酶的转化液, 再进行离心固液分离, 沉淀物低温干燥得到大豆异黄酮苷元。本发明不受原料纯度限制, 在原料含量 2~20% 时、转化率仍能达到 90% 以上, 工艺流程明显缩短, 制作成本低, 生物利用率明显提高。



1. 一种微生物酶法制备大豆异黄酮苷元的方法,是以大豆异黄酮粉为原料,用培养米曲霉菌发酵制备的 β -葡萄糖苷酶将大豆异黄酮苷转化为大豆异黄酮苷元,其特征是该制备方法包括以下步骤:

a) 选用 2 ~ 10% 的大豆异黄酮粉作为原料;

b) 用筛选的菌种米曲霉菌 (*Aspergillus oryzae*) 3042 制备液体菌种,所述液体菌种的制备方法如下:称取可溶性淀粉 10.0g,葡萄糖 5.0g,磷酸二氢钾 0.5g,硫酸镁 0.5g,酵母膏 2.5g,硝酸钾 1.0g,用蒸馏水溶解并稀释至 500ml,PH 6.5,分装到 500ml 三角瓶中,每瓶 80ml,121℃ 灭菌 15min,得到种子培养基;挑取适量斜面上的孢子转入到种子培养基中,于 20 ~ 28℃、160 ~ 180r/min 震荡培养 38 ~ 48hr,得到液体菌种;

c) 制备固体发酵培养基,在该培养基中接种上述液体菌种发酵培养得到含有 β -葡萄糖苷酶的固体发酵物,其中所述固体发酵培养基的制备方法和所述发酵培养的方法如下:将麸皮:水按照 1 : 1.5 ~ 3.0W/V 的比例配合,PH 自然,121℃ 灭菌 30min,得到固体发酵培养基,以 1 ~ 7% 的接种量将上述制备好的液体菌种接入固体发酵培养基中发酵培养,培养温度 20 ~ 28℃,湿度 60 ~ 70%,培养时间 60 ~ 84hr,得到含 β -葡萄糖苷酶的固体发酵物;

d) 将大豆异黄酮粉加入到由上述固体发酵物提取的 β -葡萄糖苷酶溶液中制取酶的转化液,再进行离心液固分离,沉淀物低温干燥得到大豆异黄酮苷元,其中所述由上述固体发酵物提取的 β -葡萄糖苷酶溶液是 β -葡萄糖苷酶粗酶液或经过初步纯化的 β -葡萄糖苷酶液,所述 β -葡萄糖苷酶粗酶液的制备方法如下:向上述固体发酵物中加入 10 倍量的蒸馏水,搅拌均匀浸泡 2 ~ 6hr,于 4 ~ 10℃,5000 ~ 10000r/min 条件下离心进行液固分离,所得上清液为 β -葡萄糖苷酶粗酶液;所述经过初步纯化的 β -葡萄糖苷酶液的制备方法如下:在上述粗酶液中加入食用乙醇,使乙醇浓度至 75%,于 4 ~ 10℃ 下进行醇沉过夜,在此温度下以 5000 ~ 10000r/min 离心分离,沉淀物用蒸馏水溶解得到初步纯化的 β -葡萄糖苷酶液。

2. 按照权利要求 1 所述的方法,其特征是步骤 d) 中 β -葡萄糖苷酶与原料的比例为 1000 ~ 4000U/g,转化温度 40 ~ 50℃,PH 4.5 ~ 7.0,搅拌速度为 160 ~ 180r/min,转化时间 6 ~ 10hr,得到酶的转化液,再将该转化液于 4 ~ 10℃,5000 ~ 10000r/min 的条件下离心进行液固分离,沉淀物低温干燥得到大豆异黄酮苷元。

3. 按照权利要求 2 所述的方法,进一步包括在所述酶的转化液进行液固分离后的上清液中加入食用乙醇,使乙醇浓度至 75% 进行醇沉淀过夜,在 4 ~ 10℃,5000 ~ 10000r/min 条件下离心进行液固分离,沉淀的 β -葡萄糖苷酶,用蒸馏水溶解,测定酶活力后重新利用;回收上清液中乙醇,获得的浸膏于 50 ~ 80℃ 减压干燥得大豆异黄酮苷元。

微生物酶法制备大豆异黄酮苷元的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用大豆异黄酮制作大豆异黄酮苷元的方法,特别是涉及微生物酶法由 β -葡萄糖苷酶转化为大豆异黄酮苷元的制备方法。

背景技术

[0002] 大豆异黄酮(sorbean isoflavone)是指以3-苯基色原酮为母核的一类化合物,是具有多种生物活性的大豆营养成分。目前,科学家已经发现的大豆异黄酮共有15种异构体,分为游离型的苷元和结合型的糖苷两大类。其中糖苷约占大豆异黄酮总量的95-98%(w/w),苷元占大豆异黄酮总量的2-5%(w/w)。日本东京rakult微生物研究中心最新研究表明:游离型的苷元相对于结合型糖苷分子较小,疏水性更强,所以生物利用性更好。研究还表明:大豆中只含有0.5-2.5%的大豆异黄酮,而大豆异黄酮的生物利用率也只有10-40%,这主要是由于糖苷型或其衍生物很难被人体直接吸收。只有生成苷元形式,才易被吸收利用。由此可见,把大豆异黄酮糖苷型及糖苷衍生物转化成苷元形式,是提高其生物利用率的前提。近年来国外学者的专利报道了制备大豆苷元的方法有:利用商品酶(如: β -葡萄糖苷酶、酯酶等)将异黄酮水解成苷元,利用化学方法合成、提取大豆苷元,强酸、强碱水解方法制备大豆苷元,这些方法由于存在着操作复杂、收率低、反应条件剧烈、成本高、有机溶剂残留造成环境污染等缺点,都未能得到广泛的应用。已经公开的黑龙江双河松嫩大豆生物工程有限责任公司的200410058379.3号专利申请,披露了用 β -葡萄糖和膜技术生产大豆异黄酮苷元的工艺方法,该方法是以大豆异黄酮粉为基本原料,以大豆蛋白和大豆异黄酮作诱导剂,用培养霉菌释放的胞外酶 β -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮,并利用选自超滤和透析的膜技术进行酶水解液的后处理,得到大豆异黄酮苷元。该方法在原料适用性和工艺方面还存在一定缺陷:1、由于采用含量20%以上的大豆异黄酮粉,转化率达90%以上,实验表明,如大豆异黄酮粉含量低于20%,转化率会明显降低;特别是原料含量低于10%时,如果采用上述工艺,会因为杂质多,大大增加过滤精制成本;2、工艺流程较长,发酵制备 β -葡萄糖苷酶原料较多,对过滤设备及技术条件要求较苛刻。本发明与现有技术相比,不受原料纯度的限制,其工艺条件的设计同样适应低于20%的原料纯度,转化率均达到90%以上,在制作成本和原料的适应性方面具有更大的优势。

发明内容

[0003] 本发明的目的是克服现有技术存在的不足,提供一种微生物酶法制备大豆异黄酮苷元的方法,该方法不受原料纯度限制,在原料成份低于20%,甚至更低时,仍然具有较高转化率,并且工艺流程缩短,转化成本低,生物利用率明显提高,可直接用作医药、保健食品原料。

[0004] 本发明方法即微生物酶法制备大豆异黄酮苷元的方法,是以大豆异黄酮粉为原料,用培养米曲霉菌发酵制备的 β -葡萄糖苷酶,将大豆异黄酮苷转化为大豆异黄酮苷元,其特征是该制备方法包括以下步骤:a)所述原料为2~10%的大豆异黄酮粉;b)筛选的菌

种为米曲霉菌 3042, 用该菌种制备种子培养液 ;c) 制备固体发酵培养基, 得到含有 β -葡萄糖苷酶的发酵物 ;d) 将大豆异黄酮粉加入到经发酵提取的 β -葡萄糖苷酶溶液中制取酶的转化液, 再进行离心固液分离, 沉淀物低温干燥得到大豆异黄酮苷元。

[0005] 本发明更详细的制备大豆异黄酮苷元的方法包括以下步骤 :

[0006] 一、原料

[0007] 基本原料为 2 ~ 90% 的大豆异黄酮粉, 本发明工艺也同样适于含量为 5 ~ 20% 的大豆异黄酮粗粉。

[0008] 二、菌种

[0009] 筛选用菌种为米曲霉菌 (*Aspergillus oryzae*) 3042

[0010] 菌种斜面传代培养基制备方法 :PDA 培养基制备法

[0011] 三、固体发酵法制备 β -葡萄糖苷酶及纯化、酶活力测定

[0012] 1、种子培养液的制备及培养方法 :

[0013] 可溶性淀粉 2%, 葡萄糖 1%, 磷酸二氢钾 0.1%, 硫酸镁 0.1%, 酵母膏 0.5%, 硝酸钾 0.2%, PH 自然, 于 121℃ 灭菌 15min ; 无菌操作, 挑取适量新鲜斜面上的孢子转入到 80ml 种子培养基中, 于 20 ~ 28℃、160 ~ 180r/min 震荡培养 38 ~ 48hr。

[0014] 2、固体发酵培养基及培养方法

[0015] 将麸皮 : 水按照 1 : 1.5 ~ 3.0 (W/V) 的比例配合, PH 自然, 121℃ 灭菌 30min, 以 1 ~ 7% 的接种量将制备好的种子接入固体培养基中发酵培养, 培养 20 ~ 28℃, 湿度 60 ~ 70%, 培养时间 60 ~ 84hr, 得到含 β -葡萄糖苷酶的固体发酵物 ;

[0016] 3、 β -葡萄糖苷酶粗酶液的提取

[0017] 将上述固体发酵物加入 10 倍量的蒸馏水, 搅拌均匀浸泡 2 ~ 6hr, 于 4 ~ 10℃, 5000 ~ 10000r/min 条件下离心进行液固分离, 所得上清液为 β -葡萄糖苷酶粗酶液。

[0018] 4、 β -葡萄糖苷酶初步纯化

[0019] 为便于保存, 需对粗酶液进行纯化处理, 在粗酶液中加入食用乙醇, 使乙醇浓度至 75%, 于 4 ~ 10℃ 下进行醇沉过夜, 在此温度下以 5000 ~ 10000r/min 离心分离, 沉淀物用蒸馏水溶解得到初步纯化的 β -葡萄糖苷酶液, 或在 -40 ~ -50 下冷冻干燥获得固体 β -葡萄糖苷酶。初步纯化后, 用 DEAE-sephadexA-50 离子交换树脂纯化, 用 SDS 测定 β -葡萄糖苷酶的分子量为 45kd。

[0020] 5、 β -葡萄糖苷酶的活力测定方法

[0021] (1) 葡萄糖标准曲线的制作

[0022] 采用分光光度法。取 8 只带有刻度的比色管, 精密吸取葡萄糖标准使用液 (1mg/ml) 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4ml ; 用蒸馏水补充 2ml ; 分别加入 1.5ml DNS 试液, 沸水浴 5min, 用蒸馏水定容至 10ml, 于 540nm 比色, 绘制标准曲线。

[0023] (2) 样品中 β -葡萄糖苷酶活力的测定

[0024] 取 4 只带有刻度的比色管, 分别加入 0.5% 的水杨苷 0.5ml, 对照管加入 DNS 试液 1ml, 将样品管与对照管同时放在 50℃ 环境下水浴 5min ; 各管分别加入酶液 0.5ml, 50℃ 水浴 30min 后, 样品管加入 DNS 试液 1ml, 沸水浴 5 分钟, 用蒸馏水定容至 10ml, 于 540nm 波长测定吸光度值。酶活单位规定为每小时由底物生成 1 μ mol 的葡萄糖所需要的酶量为一个酶活单位 (U)。

[0025] 四、大豆异黄酮的 β -葡萄糖苷酶生物转化

[0026] 本步骤用以转化的酶液可以是上述步骤中制取的粗酶液或经过纯化的酶液。

[0027] 1、大豆异黄酮苷元的制备

[0028] β -葡萄糖苷酶与原料的比例为 1000 ~ 4000U/g, 转化温度 40 ~ 50℃, PH4.5 ~ 7.0, 搅拌速度为 160 ~ 180r/min, 转化时间 6 ~ 10hr, 得到酶的转化液, 再将该转化液于 4 ~ 10℃, 5000 ~ 10000r/min 的条件下离心进行液固分离, 沉淀物低温干燥得到大豆异黄酮苷元。

[0029] 2、分离液的处理

[0030] 转化液进行液固分离后的上清液中加入食用乙醇, 使乙醇浓度至 75%, 进行醇沉淀过夜, 在 4 ~ 10℃, 5000 ~ 10000r/min 条件下离心进行液固分离, 沉淀的 β -葡萄糖苷酶, 用蒸馏水溶解, 测定酶活力后重新利用; 回收上清液中乙醇, 获得浸膏于 50 ~ 80℃减压干燥得大豆异黄酮苷元, 与转化后第一次液固分离得到的大豆异黄酮苷元合并。

[0031] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0032] 1、不受原料纯度限制, 在原料含量 2 ~ 20% 时, 转化率仍能达到 90% 以上, 工艺流程明显缩短, 转化成本低, 生物利用率提高数 10 倍, 可直接用作医药、保健食品原料;

[0033] 2、利用米曲 3042 发酵生产的 Bata- 葡萄糖苷酶进行大豆异黄酮的转化无有机溶剂残留, 工艺简单、操作性强、可规模化生产;

[0034] 3、培养基成份简单, 培养条件易控制, 转化所用的酶及乙醇都可重复回收利用, 无环境污染;

[0035] 4、提高了大豆异黄酮的生物利用率及生物活性, 填补了高活性大豆异黄酮制备工艺的空白。

[0036] 下面用具体的实施例说明本发明的方法, 本发明的具体实施例中的实施方式不会构成对本发明保护范围的任何限制。

[0037] 附图为本发明的工艺流程示意图。

[0038] 实施例 1:

[0039] 原料: 采用含量 10% 的大豆异黄酮粗粉 (天津尖峰天然产物有限公司产品)

[0040] 菌种: 米曲霉菌 (*Aspergillus oryzae*) 3042 上海酿造研究所

[0041] 菌种斜面传代培养基制备方法: PDA 培养基制备

[0042] 1、固体发酵法 β -葡萄糖苷酶的制备及酶活力测定

[0043] (1) 种子培养基的制备及其菌种培养:

[0044] 精密称取可溶性淀粉 10.0g, 葡萄糖 5.0g, 磷酸二氢钾 0.5g, 硫酸镁 0.5g, 酵母膏 2.5g, 硝酸钾 1.0g, 用蒸馏水溶解并稀释至 500ml, PH6.5, 分装到 500ml 三角瓶中, 每瓶 80ml, 121℃灭菌 15min。无菌操作, 挑取适量的新鲜斜面上米曲 3042 的孢子转入到种子培养基中, 于 27℃、160r/min 震荡培养 42h。即得到固体发酵所需要的液体菌种。(注: 以上所需化学试剂均为分析纯)

[0045] (2) 固体发酵培养基的制备及其菌种的培养

[0046] 称取麸皮 1000g, 按照麸皮: 水 1 : 2(w/v) 的比例进行配置固体发酵培养基, PH 自然, 121℃灭菌 30min。无菌操作以 5% 的接种量将制备好的液体菌种接入固体培养基中, 混匀后装入培养槽内, 培养基的厚度约为 3cm, 在无菌发酵室内发酵培养。培养温度为

27℃,湿度保持在65-70%,培养时间为84小时。

[0047] (3) β -葡萄糖苷酶提取及初步纯化

[0048] 将上述固体发酵物按照1:10的比例加入蒸馏水,搅拌均匀,于4℃条件下浸泡4小时,在4℃,5000r/min条件下离心,收集上清液即为 β -葡萄糖苷酶粗酶液。

[0049] 取粗酶液500ml,缓慢加入食用酒精,使酒精浓度达75%,4℃条件下醇沉过夜,10000r/min、4℃条件下离心,收集沉淀,用500ml蒸馏水溶解或者在-40℃的条件下冷冻干燥保存。用初步纯化的酶液经过DEAE-sephadexA-50离子交换树脂吸附、氯化钠溶液梯度洗脱、透析、浓缩后用12%的SDS电泳测定米曲3042 β -葡萄糖苷酶分子量在45kd。

[0050] (4) β -葡萄糖苷酶活力测定方法

[0051] a) 葡萄糖标准曲线的制作

[0052] 采用分光光度法。取8只带有刻度的比色管,精密吸取葡萄糖标准使用液(1mg/ml)0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4ml;用蒸馏水补足2ml;分别加入1.5mlDNS试液,沸水浴5min,用蒸馏水定容至10ml,于540nm比色,绘制标准曲线。

[0053] b) 样品中 β -葡萄糖苷酶活力的测定

[0054] 取4只带有刻度的比色管,分别加入0.5%的水杨苷0.5ml,对照管加入DNS试液1ml,将样品管与对照管同时放在50℃环境下水浴5min;各管分别加入酶液0.5ml,50℃水浴30min后,样品管加入DNS试液1ml,沸水浴5分钟,用蒸馏水定容至10ml,于540nm波长测定吸光度值。酶活单位规定为每小时由底物生成1 μ mol的葡萄糖所需要的酶量为一个酶活单位(U)。

[0055] 按照实施案例中的方法制备5批的 β -葡萄糖苷酶粗酶液的平均酶活力为1201U/ml,初步纯化后的平均酶活力为4750U/ml。

[0056] 2、大豆异黄酮苷元的制备

[0057] 水解所用的酶液如上所述的粗酶液或者初步纯化的酶,所用原料为10%的大豆异黄酮(华北制药股份有限公司)转化前大豆苷含量为6.42%、染料木苷含量为2.02%、黄豆苷2.24%、大豆苷元0.46%、木素0.03%、黄豆黄素0.10%。

[0058] (1) 称取10%的大豆异黄酮100g,按照酶与底物2250U/g的比例加入粗酶液187.3ml,加入蒸馏水至1000ml(底物浓度为0.1g/ml),PH自然,在温度45℃搅拌速度180转/分条件下,转化8小时,终止反应,将酶转化液在10000r/min,4℃条件下离心,收集沉淀于70℃,-0.1Mpa条件下减压干燥,粉碎后即可得到转化后的大豆异黄酮粉末80.1g。

[0059] (2) 向“(1)”步骤中离心收集的上清液中缓慢加入食用酒精至75%,4℃条件下醇沉过夜,10000r/min、4℃条件下离心,收集上清液回收乙醇,获得的膏体同上述条件减压干燥,粉碎后得到转化后的大豆异黄酮粉10.4g。

[0060] (3) 将两次得到的产品合并共得到转化后的大豆异黄酮粉90.5g,用HPLC法测定主要活性成份大豆苷0.347%、染料木苷0.094%、大豆苷元4.667%、染料木素1.227%;大豆苷转化率为95.1%,染料木苷转化率95.8%。

[0061] 3、 β -葡萄糖苷酶的回收利用

[0062] 将本制备工序中的第“(2)”步骤中离心后获得的沉淀部分用适量的蒸馏水溶解与第1工序中第(3)步骤中获得的粗酶液合并使用。

[0063] 实施例2:

[0064] 1、5%大豆异黄酮粉水解制备大豆异黄酮苷元

[0065] 水解所用的酶液同 10%大豆异黄酮粉水解实验：所用原料 5%大豆异黄酮（用华北制药股份有限公司生产的 10%的大豆异黄酮粉添加 1 倍量的提取大豆异黄酮后干燥的脱脂豆粉调配而成）转化前大豆苷含量为 3.37%、染料木苷含量为 1.12%、黄豆苷 1.21%、大豆苷元 0.25%、染料木素 0.02%、黄豆黄素 0.04%。

[0066] (1) 称取 5%的大豆异黄酮 100g，按照酶与底物 2300U/g 的比例加入粗酶液 192ml，加入蒸馏水至 1000（底物浓度为 0.1g/ml），PH 自然，在温度 45℃搅拌速度 180 转/分条件下，转化 8 小时，终止反应，将酶转化液在 10000r/min，4℃条件下离心，收集沉淀于 70℃。-0.1Mpa 条件下减压干燥，粉碎后即可得到转化后的大豆异黄酮粉末 80.6g。

[0067] (2) 向“（1）”步骤中离心收集上清液中缓慢加入食用酒精，使酒精浓度至 75%，4℃条件下醇沉过夜，10000r/min、4℃条件下离心，收集上清液回收乙醇，获得的膏体同上述条件减压干燥，粉碎后得到转化后的大豆异黄酮粉 9.7g。

[0068] (3) 将两次得到的产品合并共得到转化后的大豆异黄酮粉 91.3g，用 HPLC 法测定主要活性成份大豆苷 0.236%、染料木苷 0.071%、大豆苷元 2.112%、染料木素 0.731%；大豆苷转化率为 93.6%，染料木苷转化率 94.2%。

[0069] 2、β-葡萄糖苷酶的回收利用

[0070] 与实施例 1 中 10%大豆异黄酮水解实验中的回收步骤相同。

[0071] 实施例 3：

[0072] 1、20%大豆异黄酮粉水解制备大豆异黄酮苷元

[0073] 水解所用的酶液同 10%大豆异黄酮粉水解实验：所用原料为 20%大豆异黄酮粉（天津尖峰天然产物有限公司）中的大豆苷含量为 7.98%、染料木苷含量为 9.51%、黄豆苷 2.62%、大豆苷元 0.72%、染料木素 0.61%、黄豆黄素 0.19%。

[0074] (1) 称取 20%的大豆异黄酮 100g，按照酶与底物 3000U/g 的比例加入粗酶液 250ml，加入蒸馏水至 1000（底物浓度为 0.1g/ml），PH 自然，在温度 45℃搅拌速度 180 转/分条件下，转化 8 小时，终止反应，将酶转化液在 10000r/min，4℃条件下离心，收集沉淀于 70℃。-0.1Mpa 条件下减压干燥，粉碎后即可得到转化后的大豆异黄酮粉末 82.3g。

[0075] (2) 向“（1）”步骤中离心收集的上清液中缓慢加入食用酒精，使酒精浓度至 75%，4℃条件下醇沉过夜，10000r/min、4℃条件下离心，收集上清液回收乙醇，获得的膏体同上述条件减压干燥，粉碎后得到转化后的大豆异黄酮粉 10.3g。

[0076] (3) 将两次得到的产品合并共得到转化后的大豆异黄酮粉 92.6g，用 HPLC 法测定主要活性成份大豆苷 0.370%、染料木苷 0.359%、大豆苷元 5.874%、染料木素 5.709%；大豆苷转化率为 95.7%，染料木苷转化率 96.5%。

[0077] 2、β-葡萄糖苷酶的回收利用

[0078] 与 10%大豆异黄酮水解实验中的回收步骤相同。

