

## 大豆异黄酮抑菌活性及其热稳定性研究

魏福华<sup>1</sup>, 黄峰华<sup>2</sup>, 张永忠<sup>3</sup>

(1. 江苏食品职业技术学院 食品与营养工程学院, 江苏 淮安 223003; 2. 黑龙江省农业科学院 信息中心, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 东北农业大学 理学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和沙门氏菌为测试菌株, 对大豆异黄酮混合水解苷元、染料木黄酮和黄豆苷元的抑菌活性进行了研究。结果表明, 各组分均具有一定的抑菌效果, 且随浓度的增加效果增强; 大豆异黄酮对革兰氏阳性菌的抑制效果要优于革兰氏阴性菌; 大豆异黄酮混合水解苷元和染料木黄酮的抑菌效果优于黄豆苷元, 三者对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度分别为 0.2、0.2 和 0.8 mg·mL<sup>-1</sup>; 染料木黄酮具有良好的热稳定性。

**关键词:**染料木黄酮; 黄豆苷元; 抑菌活性; 热稳定性

**中图分类号:**TS214.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2013)01-0115-04

## Antibacterial Activity and Thermal Stability of Soybean Isoflavones

WEI Fu-hua<sup>1</sup>, HUANG Feng-hua<sup>2</sup>, ZHANG Yong-zhong<sup>3</sup>

(1. Jiangsu Food Science College, Huai'an 223003, Jiangsu; 2. Information Centre, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang; 3. College of Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** The antibacterial activity of hydrolyzed aglycones of soy isoflavones, genistein and daidzein to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Salmonella* spp. were investigated in the current research. All the tested soy isoflavones showed antibacterial activity with dose dependant manner. The inhibitory effect of soy isoflavones on Gram-positive bacteria were better than Gram-negative ones, and that of mixed aglycones and genistein were better than daidzein. The minimum inhibitory concentration against *Staphylococcus aureus* for three components were 0.2, 0.2 and 0.8 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively. Genistein showed good thermal stability.

**Key words:** Genistein; Daidzein; Antibacterial activity; Thermal stability

异黄酮(Isoflavone)主要是由豆科植物等体内合成的一类次生代谢产物, 具有多种生理功能和生物活性。大豆中的异黄酮含量较高, 其中以苷元形式存在的染料木黄酮和黄豆苷元的生物活性最强<sup>[1]</sup>, 因此研究大豆中异黄酮组分的生物活性成为热点<sup>[2-4]</sup>。目前, 大豆异黄酮抑菌活性的研究尤其引人注目<sup>[5-6]</sup>, Verdrengh 等研究表明大豆染料木黄酮具有抑制拓扑异构酶 II 和蛋白酪氨酸激酶(PTK)的作用, 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、巴氏链球菌(*Streptococcus pasteurianus*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*)具有明显的抑制作用, 但不能抑制大肠杆菌(*Escherichia coli*)。而黄豆苷元不能抑制拓扑异构酶 II, 因此抑菌能力较弱<sup>[7]</sup>。Dastidar 等<sup>[8]</sup>证实大豆染料木黄酮的抑菌能力要优于黄豆苷元。本文研究了大豆异黄酮混合苷元提取物以及其中的两种主要生物活性成分染料木黄酮和黄豆苷元的抑菌活性, 并对其最小抑菌浓度及抑菌活性的热稳定性进行了探讨, 为大豆的深加工和开发新型天然防腐剂或抗菌剂提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 供试异黄酮 大豆异黄酮混合水解苷元参照石冬冬等<sup>[9-11]</sup>的方法制备, 并稍作修改。供试大豆品种为垦丰 5 号, 选用籽粒饱满的大豆, 将其粉碎并过 0.30 mm 筛, 脱脂。准确称取预处理的豆粉 10 g 加入 200 mL 80% 的乙醇于 60℃ 水浴中搅拌提取 9 h, 减压抽滤, 将滤液用旋转蒸发仪于 50℃ 蒸至没有溶剂流出, 得大豆异黄酮浓缩液, 多次重复此过程, 将浓缩液合并。将得到的大豆异黄酮粗提物调节至 pH4.5, 然后加入 CaCl<sub>2</sub>, 其添加量为浓缩液中固形物含量的 5%, 在 85℃ 下加热 15 min 后, 冷却, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 将固形物用低纯度(30%)的乙醇回溶, 使其中的异黄酮尽量溶出, 再离心, 合并上清液。采用 D4006 大孔树脂柱层析法对大豆异黄酮进行纯化, 上柱条件为: 温度为 25℃, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 浓度为 1.0 g·L<sup>-1</sup>, 20% 与 95% 的乙醇梯度洗脱。通过上述方法提取的大豆

收稿日期: 2012-12-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863 计划”项目(2008AA10Z331)。

第一作者简介: 魏福华(1978-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为食品化学与营养。E-mail: weifuhua12@gmail.com。

通讯作者: 张永忠(1953-), 男, 教授, 研究方向为天然产物化学。E-mail: zyz1953@sohu.com。

异黄酮中 97% 以上都是以糖苷的形式存在,为了获得大豆异黄酮苷元需对糖苷型大豆异黄酮进行水解。水解采用黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解法,底物浓度为  $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,加酶量 60 U、温度  $45^\circ\text{C}$ 、水解时间 90 min。

染料木黄酮和黄豆苷元购自 SIGMA 公司。用二甲基亚砜 (DMSO) 分别溶解大豆异黄酮混合苷元、染料木黄酮和黄豆苷元,配制成  $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液备用。

**1.1.2 供试菌种** 供试菌种均为本实验室提供,包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)。

**1.1.3 培养基** 牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g (液体培养基不加琼脂), 蒸馏水 1 000 mL, pH7.0 ~ 7.2。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 菌悬液的制备** 将供试菌种分别接种于牛肉膏蛋白胨培养基斜面上,  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h 进行活化。从活化后的斜面上挑取菌体接种于液体牛肉膏蛋白胨培养基中,  $37^\circ\text{C}$  培养至对数生长期。分别吸取各对数生长期菌液 500  $\mu\text{L}$  至一定量的无菌水中, 调整配制成含菌数  $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  的菌悬液。

**1.2.2 异黄酮抗菌效果的测定** 采用滤纸片法测定异黄酮的抗菌效果。异黄酮溶液浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 以滴加 DMSO 为空白对照, 3 次重复。用灭菌微量移液器吸取 100  $\mu\text{L}$  菌悬液于牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 再用灭菌的涂布棒迅速将菌悬液涂抹均匀, 制成含菌平板。在平板上分别放置 4 个直径为 6 mm 的灭菌滤

纸片, 然后向滤纸片上滴加配制好的一定浓度的异黄酮溶液。置于  $37^\circ\text{C}$  下培养 24 h 后, 用游标卡尺测定抑菌圈直径的大小, 取其平均值。

抑菌效果评定标准如下: 抑菌圈直径小于或等于 7 mm 时, 规定为无抑菌作用或抑菌效果不明显, 抑菌圈直径大于 7 mm 时为有抑菌作用<sup>[12]</sup>。

**1.2.3 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定** 以金黄色葡萄球菌作为代表菌株, 分别测定大豆异黄酮水解苷元、染料木黄酮及黄豆苷元的最小抑菌浓度。向 96 孔板中加入 160  $\mu\text{L}$  液体培养基, 再加入 20  $\mu\text{L}$  金黄色葡萄球菌菌液 ( $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 以及 20  $\mu\text{L}$  不同浓度的异黄酮溶液, 混匀, 最终分别调整异黄酮终浓度为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以加入 DMSO 为对照,  $37^\circ\text{C}$  培养 20 h 取出, 滴加显色剂碘硝基四唑紫后再培养 4 h, 然后观察颜色变化。为了考察大豆异黄酮在不同温度下的抑菌效果, 进而评价其热稳定性, 将异黄酮分别在  $40^\circ\text{C}$ 、 $80^\circ\text{C}$ 、 $100^\circ\text{C}$  和  $121^\circ\text{C}$  处理 30 min, 然后再进行金黄色葡萄球菌的抑菌试验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大豆异黄酮的抑菌效果

由表 1 可知, 不同浓度和类型的异黄酮对微生物的抑制效果存在明显差异。从总体上看, 各类异黄酮对多数微生物均具有一定的抑制效果, 并随着浓度的增高抑制效果增强。不同类型异黄酮之间的抑菌效果差异明显, 其中, 大豆异黄酮水解苷元和染料木黄酮的抑菌效果较好, 且前者略微优于后者, 而黄豆苷元的抑菌效果很弱。这与 Dastidar 等<sup>[8]</sup>的研究结果相似。

表 1 大豆异黄酮对不同微生物的抑菌效果

Table 1 The inhibition result of soybean isoflavones to different bacteria

异黄酮 Isoflavones	菌种 Strains	抑菌圈直径 Antibacterial circle diameter/mm				
		0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
异黄酮水解苷元	<i>Escherichia coli</i>	6.0 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.7	7.4 $\pm$ 1.0	8.8 $\pm$ 0.8
Hydrolyzed	<i>Staphylococcus aureus</i>	7.2 $\pm$ 2.2	8.2 $\pm$ 2.9	10.2 $\pm$ 1.9	11.2 $\pm$ 4.2	15.6 $\pm$ 5.7
aglycones of soy	<i>Bacillus subtilis</i>	7.5 $\pm$ 3.5	7.2 $\pm$ 5.8	9.2 $\pm$ 2.6	12.3 $\pm$ 2.4	13.8 $\pm$ 4.5
isoflavones	<i>Salmonella</i> spp.	6.0 $\pm$ 0.0	6.4 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 1.2	8.0 $\pm$ 2.1	8.4 $\pm$ 3.3
染料木黄酮	<i>Escherichia coli</i>	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 0.4	8.0 $\pm$ 2.0
Genistein	<i>Staphylococcus aureus</i>	7.5 $\pm$ 1.0	9.1 $\pm$ 1.9	11.0 $\pm$ 2.3	14.8 $\pm$ 3.3	15.1 $\pm$ 3.9
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.1 $\pm$ 2.9	7.9 $\pm$ 5.3	10.0 $\pm$ 3.7	11.1 $\pm$ 4.6	13.3 $\pm$ 6.6
	<i>Salmonella</i> spp.	6.0 $\pm$ 0.0	6.4 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.5	7.7 $\pm$ 5.6	8.0 $\pm$ 2.1
黄豆苷元	<i>Escherichia coli</i>	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 0.1	6.3 $\pm$ 0.1
Daidzein	<i>Staphylococcus aureus</i>	6.2 $\pm$ 1.3	6.5 $\pm$ 0.7	7.6 $\pm$ 1.9	8.5 $\pm$ 3.1	9.6 $\pm$ 2.2
	<i>Bacillus subtilis</i>	6.5 $\pm$ 0.8	6.6 $\pm$ 1.1	7.2 $\pm$ 3.8	7.0 $\pm$ 3.4	7.5 $\pm$ 1.9
	<i>Salmonella</i> spp.	6.0 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.0	6.3 $\pm$ 0.1	6.5 $\pm$ 0.8

从对不同微生物的抑制浓度来看,异黄酮对革兰氏阳性菌抑菌效果要优于革兰氏阴性菌。例如,染料木黄酮在较低浓度( $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )下就表现出对 *Staphylococcus aureus* 和 *Bacillus subtilis* 的抑制作用,而对 *Escherichia coli* 和 *Salmonella* spp. 的抑制作用则在浓度达到  $0.6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  后才显示出来。革兰氏阴性菌的细胞壁外侧含有一层脂多糖,它能够阻止疏水性的化合物进入到菌体细胞体内,这可能是导致降低抑菌效果的原因之一<sup>[13]</sup>。

本试验的供试微生物都是常见的致病菌和食品腐败菌,危害性较大,选择其作为研究对象具有

一定的代表性。大豆异黄酮作为天然物质,具有广泛的生物学活性。大豆异黄酮经过水解后,其抑菌性得到增强,可以作为营养保健成分添加到其它产品中,或作为防腐剂添加到食品中,防止食品腐败变质和食物中毒及其它一些食源性疾病的发生。

## 2.2 大豆异黄酮最小抑菌浓度 (MIC) 及其热稳定性

选择抑制效果明显的金黄色葡萄球菌作为代表菌株,采用 2 倍稀释法测定了不同异黄酮的最小抑菌浓度,其结果如表 2 所示。

表 2 大豆异黄酮对金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度  
Table 2 The minimal inhibition concentrations of soybean isoflavones to *Staphylococcus aureus*

异黄酮 Isoflavones	热处理 Heat treatment/℃	异黄酮浓度 Concentration of isoflavones / $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$						MIC
		0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	
异黄酮水解苷元 Hydrolyzed aglycones of soy isoflavones	RT	-	-	-	+	+	+	0.2
	40	-	-	-	+	+	+	0.2
	80	-	-	-	+	+	+	0.2
	100	-	-	-	-	+	+	0.4
	121	-	-	-	-	+	+	0.4
染料木黄酮 Genistein	RT	-	-	-	+	+	+	0.2
	40	-	-	-	+	+	+	0.2
	80	-	-	-	+	+	+	0.2
	100	-	-	-	+	+	+	0.2
	121	-	-	-	+	+	+	0.2
黄豆苷元 Daidzein	RT	-	-	-	-	-	+	0.8
	40	-	-	-	-	-	+	0.8
	80	-	-	-	-	-	+	0.8
	100	-	-	-	-	-	-	
	121	-	-	-	-	-	-	

“-”表示无抑制作用;“+”表示有抑制作用。  
“-” indicates no inhibition effect; “+” indicates inhibition.

由表 2 可以看出,大豆异黄酮水解苷元和染料木黄酮的抑菌效果明显优于黄豆苷元。在室温条件下,大豆异黄酮水解苷元和染料木黄酮对 *Staphylococcus aureus* 的最小抑菌浓度均为  $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,而黄豆苷元则为  $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

通过不同温度处理后异黄酮的抑菌效果的评价,可以看出温度对抑菌作用的影响及异黄酮的热稳定性。当在  $100^{\circ}\text{C}$  及以上温度处理 30 min 后,异黄酮水解苷元和黄豆苷元的抑菌效果有所下降,而染料木黄酮的热稳定性较好,最小抑菌浓度没有发生变化。

有研究表明大豆染料木黄酮可以抑制拓扑异构酶 II 和蛋白酪氨酸激酶 (PTK),而黄豆苷元不能抑制拓扑异构酶 II<sup>[7]</sup>,这可能是导致不同类型异黄

酮抑菌效果差异的主要原因。

## 3 结 论

不同类型大豆异黄酮均对 *Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli* 和 *Salmonella* spp. 具有一定的抑制作用,且随着异黄酮浓度的升高抑制效果增强,异黄酮对革兰氏阳性菌的抑制效果要优于革兰氏阴性菌。染料木黄酮和大豆异黄酮水解苷元的抑菌效果明显优于黄豆苷元,三者对 *Staphylococcus aureus* 的最小抑菌浓度分别为 0.2、0.2 和  $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

染料木黄酮的热稳定性要优于大豆异黄酮水解苷元和黄豆苷元,在  $121^{\circ}\text{C}$  高温处理 30 min 最小抑菌浓度没有变化。

## 参考文献

- [1] 高荣海,张春红,赵秀红,等.大豆异黄酮研究进展[J].粮食与油脂,2009(5):1-4. (Gao R H, Zhang C H, Zhao X H, et al. Research progress on soybean isoflavone[J]. Journal of Cereals and Oils, 2009(5):1-4.)
- [2] 徐春华,张治广,谢明杰.大豆异黄酮的抗氧化和抗肿瘤活性研究[J].大豆科学,2010,29(5):870-873. (Xu C H, Zhang Z G, Xie M J. Research on antioxygenic and antitumor activities of soybean isoflavones [J]. Soybean Science, 2010, 29(5): 870-873.)
- [3] 石治强,吴雨珊,杨文钰,等.大豆异黄酮抑菌的研究进展[J].大豆科学,2011,30(6):1047-1050. (Shi Z Q, Wu Y S, Yang W Z, et al. Advanced research of soybean isoflavones on bactriostasis [J]. Soybean Science, 2011, 30(6):1047-1050.)
- [4] 周丽,张永忠.黄豆苷元神经保护作用研究进展[J].食品科学,2012,33(5):281-284. (Zhou L, Zhang Y Z. Research progress in neuronal protection mechanisms of daidzein[J]. Food Science, 2012, 33(5):281-284.)
- [5] Morel C, Stermitz F R, Tegos G, et al. Isoflavones as potentiators of antibacterial activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(19):5677-5679.
- [6] Hong H, Landauer M R, Foriska M A, et al. Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein [J]. Journal of Basic Microbiology, 2006, 46(4):329-335.
- [7] Verdrengh M, Collins L V, Bergin P, et al. Phytoestrogen genistein as an anti-staphylococcal agent[J]. Microbes and Infection, 2004, 6(1):86-92.
- [8] Dastidar S G, Manna A, Kumar K A, et al. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2004, 23(1):99-102.
- [9] 石冬冬.大豆异黄酮的提取纯化工艺及其抗氧化性的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2002. (Shi D D. Researchs on isoflavone's extraction and purification technology and its antioxidizability [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2002.)
- [10] 井乐刚.大豆乳清中大豆异黄酮的提取纯化及其生物活性的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2003. (Jing L G. Studies on extraction, purification and biological activity of soybean isoflavones in soybean whey [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2003.)
- [11] 孙艳梅.  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2003. (Sun Y M. Studies on  $\beta$ -Glucosidases hydrolysis of soybean isoflavone glucosides [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2003.)
- [12] 中华人民共和国卫生部.消毒技术规范[M].北京:人民卫生出版社,2002:92-94. (Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical standard for disinfection [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:92-94.)
- [13] Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane [J]. Microbiological Reviews, 1992, 56(3):395-411.

## 科学出版社生物分社新书推介

## 《中国转基因作物抗性的动态优化政策和管理研究》



编著者: 乔方彬

初版时间: 2012 年 6 月

书号: 9787030346971

定价: 36.00 元

《中国转基因作物抗性的动态优化政策和管理研究》旨在讨论天然庇护所作物在减缓棉铃虫抗性发展中的作用,以及中国是否需要为转基因抗虫棉制定专门的庇护所政策。书中首先描述了在制定庇护所政策时所需要考虑的各种因素;其次,为了科学合理地分析这些因素的影响,构建了一个生物经济学模型并利用实证数据进行了量化分析。本书在模型分析过程中,考虑了多种方案以增强分析结果的稳定性和可靠性,结果表明中国多样性的种植结构使玉米等作物成为棉铃虫的天然庇护所。换言之,在此情况下仍然要求农民种植一定比例

的非转基因抗虫棉作为棉铃虫的专门庇护所是不经济的。

《中国转基因作物抗性的动态优化政策和管理研究》可供包括关注转基因技术效益(尤其是经济效益)的研究人员、决策者和一切对转基因技术感兴趣的人士参考。

## 购书指南

网上购书: 淘宝商城科学出版社旗舰店 <http://kxcbs.tmall.com/>

电话购书: 联系人: 贾海涛; 电话: 010-64017321