

大豆异黄酮的抑菌作用*

谢明杰¹ 陆 敏¹ 邹翠霞¹ 刘长江² 卢明春³ 金凤燮³

(1. 辽宁师范大学 生物系, 大连 116029; 2. 沈阳农业大学食品学院, 沈阳 110161;

3. 大连轻工业学院 食品工程与生物工程学院, 大连 116001)

摘要 以从脱脂豆粕中提取的总大豆异黄酮为实验材料研究其抑菌作用, 实验结果表明, 大豆异黄酮对金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、腊状芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、单增李氏菌、白色念珠菌、梨头霉菌和米曲霉均有明显的抑制作用, 其最低抑菌浓度(MIC)分别为0.03%、0.09%、0.02%、0.03%、0.03%、0.05%、0.05%、0.05%和0.05%, 但对大肠杆菌和酿酒酵母无抑制作用。用本实验室开发的大豆异黄酮糖苷酶将提取的总大豆异黄酮进行酶解, 并将酶解后的产物进行分离纯化, 得到游离型的苷元。游离型苷元和结合型糖苷的抑菌结果显示, 大豆异黄酮中具有抑菌活性的成分是其游离型的苷元。其热稳定性好, 经121℃、30min湿热灭菌处理后仍具有较强的抗菌活性。

关键词 大豆异黄酮; 游离型苷元; 结合型糖苷; 抑菌实验; 最低抑菌浓度

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2004)02-0101-05

大豆含有丰富营养物质。在《中药大词典》中记载:“大豆甘、平、入脾肾经。具有活血、利水、祛风、解毒的功效”。随着人们对大豆及其制品的营养作用和保健功效研究的深入, 发现大豆除不含胆固醇, 是优质蛋白质和油脂的重要来源外, 还含有许多有益的生物活性物质, 如大豆磷脂、大豆低聚糖、大豆皂苷和大豆异黄酮等。在这些生物活性物质中, 大豆异黄酮因具有明显的生物学活性已越来越引起社会和学术界的普遍关注, 是近年来世界各国科学家研究的热点。近期的研究表明, 大豆异黄酮与人类健康密切相关, 具有许多生理功能, 其中像抗肿瘤作用、对血管的防护作用、抗氧化活性、类似女性雌激素作用和抗真菌活性^[1-2]等。本文以从脱脂豆粕中提取的总大豆异黄酮为实验材料, 研究其抑菌作用。迄今为止已知大豆异黄酮共有12种单体, 分为游离型的苷元(Aglycons)和结合型的糖苷(Glucosides)两类, 但关于大豆异黄酮具有抑菌活性的成分, 目前国内外尚无相关报道, 本文利用本实验室开发的大豆异黄酮糖苷酶将提取的总大豆异黄酮进行酶解, 利用得到的游离型苷元与其结合型糖苷形式分别进行抑菌实验, 以期得到大豆异黄酮中具有抑

菌活性的成分。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 大豆异黄酮 从脱脂豆粕中提取(豆粕购于大连调味品厂)

1.1.2 Aglycons 本实验室通过酶解大豆异黄酮获得(含 Genistein 和 Daidzein)

1.1.3 Glucosides 购于营口渤海天然食品有限公司(含 Genistin 和 Daidzin)

1.1.4 供试菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC11411)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC26112)、腊状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* ATCC63501)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* ATCC28001)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* ATCC63202)、单增李氏菌(*Listeria monocytogenes*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 63501)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、梨头霉

* 收稿日期: 2003-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 20076007)

作者简介: 谢明杰(1963-), 女, 硕士, 副教授, 现在读博士学位。

菌(*Absidia sp. R*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*) (以上菌种由中国医学菌种保藏中心和辽师大微生物实验室提供)。

1.1.5 培养基: 营养琼脂培养基、肉汤蛋白胨培养基、麦芽汁和查氏培养基

1.1.6 仪器: 日本岛津 PERKIN—ELMER Lambda 17 uv/vis Spectrophotometer

SXHW 型电热套 巩义市英峪予华仪器厂
SHB—A 循环水式多用真空泵 郑州市长城科工贸有限公司

薄层层析板: 硅胶板 Kieselgel 60 F—254, 德国 Merck 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌和酵母菌悬液的制备

从新鲜菌种斜面分别沾取少量细菌、酵母菌的菌苔, 将其依次接种在肉汤蛋白胨和麦芽汁培养基中, 然后在一定温度下的摇床中培养 24 小时 (细菌 37℃, 酵母菌 28℃, 转数为 150rpm/min), 使菌浓度为 10⁶cfu/ml。

1.2.2 霉菌悬液的制备

从新鲜菌种斜面分别沾取少量青霉和曲霉的孢子, 将其接入到无菌水中, 使菌悬液的孢子数为 10⁶cfu/ml。

1.2.3 大豆异黄酮的提取和样品液的制备

脱脂豆粕→乙醇回流提取→浓缩提取液→大孔树脂吸附→乙醇洗脱→洗脱液浓缩→干燥→丙酮萃取→总大豆异黄酮→uv—vis Spectrophotometer 检测→大豆异黄酮的含量为 97%。准确称取一定量的大豆异黄酮, 用无水乙醇将其配制成一定浓度的样品液。

1.2.4 游离型苷元的制备

将提取的大豆异黄酮用乙醇和缓冲液配制成浓

度为 20mg/ml 的底物, 取等体积的底物和酶液, 在 40℃水浴中反应 2 小时, 然后用乙酸乙酯萃取, 减压蒸馏去除乙酸乙酯后即得大豆异黄酮苷元。用 TLC 检验酶解情况并测定生成的苷元含量。准确称取一定量的大豆异黄酮苷元, 用无水乙醇将其配制成一定浓度的样品液。

1.2.5 结合型糖苷样品液的制备

准确称取一定量的 Glucosides, 用无水乙醇将其配制成一定浓度的样品液。

1.2.6 抑菌试验^[3]

本试验采用杯碟法。首先在培养皿内注入 20ml 2% 的固体培养基作为底层, 凝固后, 再在平板中倒入 5ml 加有 0.1ml 供试菌的 1% 的半固体培养基。待凝后在其上等距离分散地轻轻放上无菌牛津杯 (内径 6mm±0.1mm, 外径 8mm±0.1mm, 高 10mm±0.1mm), 在杯内分别注入 200ml 不同浓度的样品液, 无水乙醇作为对照, 每组做 3 个平行实验。于相应温度下培养一定时间后用卡尺测定抑菌圈直径, 取其平均值。

1.2.7 抑菌指标判定

抑菌圈直径 D≥320mm 为“+++”, 高度敏感; 15≤D≤20mm 为“++”, 中度敏感; 8≤D≤15mm 为“+”, 低度敏感; D<8mm 为“—”, 不敏感。

1.2.8 最低抑菌浓度 (MIC) 的测定

将浓度为 0.0025g/ml 酶解样品液, 按照表 1^[4] 加入大试管中, 充分混匀后倒平皿, 待平板凝固后, 用平板划线法接种上述供试菌, 其中以不含大豆异黄酮的琼脂平板作为阳性菌生长对照。以含药物但不加试验菌作为空白对照; 以无水乙醇与琼脂培养基混合作为助溶剂对照。在恒温箱中培养 24—48h, 检测出供试菌不生长的最低大豆异黄酮浓度, 即为该菌的最低抑菌浓度^[5]。

表 1 不同浓度大豆异黄酮培养基的配制

Table 1 Preparation of isoflavone of different concentration

试管号 Test tube number	大豆异黄 酮量 (ml) The volume of isoflavone	营养琼脂 培养基 (ml) Nutrition agar medium	查氏培养 基 (ml) Czapek medium	大豆异黄酮 的浓度 (%) The concen- tration of isoflavone	试管号 Test tube number	大豆异黄 酮量 (ml) The volume of isoflavone	营养琼脂 培养基 (ml) Nutrition agar medium	查氏培养 基 (ml) Czapek medium	大豆异黄酮 的浓度 (%) The concen- tration of isoflavone
1	1	24	24	0.01	6	6	19	19	0.06
2	2	23	23	0.02	7	7	18	18	0.07
3	3	22	22	0.03	8	8	17	17	0.08
4	4	21	21	0.04	9	9	16	16	0.09
5	5	20	20	0.05	10	10	15	15	0.10

1.2.9 大豆异黄酮的热稳定性实验: 将一定浓度的大豆异黄酮分别于 80℃、100℃和 121℃处理 20min,

然后以未经加热处理的大豆异黄酮作为对照, 按照 1.2.6 方法测定其抑菌作用。

2 结果

2.1 大豆异黄酮的抑菌效果

不同浓度的大豆异黄酮的抑菌结果见表 2 和图 1。结果显示, 大豆异黄酮对金黄色葡萄球菌、藤黄

微球菌、腊状芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、单增李氏菌、白色念珠菌、犁头霉菌和米曲霉均有明显的抑制作用, 但对大肠杆菌和酵母菌无抑制作用。其中大豆异黄酮的浓度对抑菌效果有很大的影响, 但抑菌效果在一定浓度范围内不随大豆异黄酮的浓度的增高而增大, 究其原因可能是大豆异黄酮浓度过高, 其溶解性和扩散性不好而影响其抑菌效果。

表 2 不同浓度的大豆异黄酮的抑菌效果(三次实验平均值)
Table 2 Anti-microorganism effect of isoflavone of different concentration

菌种 Strain	0.20	0.15	0.10	0.05	0.01	0.005
Staphylococcus aureus	++	++	++	++	++	+
Micrococcus luteus	++	+++	+++	++	++	+
Bacillus cereus	++	++	++	++	++	+
Bacillus pumilus	++	++	++	++	++	+
Bacillus subtilis	+++	+++	+++	+++	+	+
Listeria monocytogenes	++	++	++	++	++	+
Escherichia coli	-	-	-	-	-	-
Saccharomyces cerevisiae	-	-	-	-	-	-
Candida albicans	++	+++	+++	+++	++	+
Absidia sp. R	++	+++	+++	+++	++	+
Aspergillus oryzae	++	+++	+++	+++	++	+

2.2 大豆异黄酮的酶解结果

大豆异黄酮糖苷酶水解总异黄酮得到的产物经

TLC 检测的结果见图 2。由图可知, 该酶能将大豆异黄酮彻底地水解成游离型苷元。

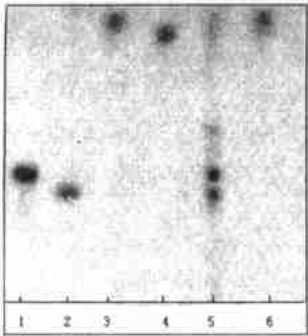


图 1 大豆异黄酮糖苷酶水解总异黄酮的 TLC 图谱
Fig. 1 Thin layer chromatogram (TLC) of isoflavone hydrolyzed by the enzyme solution developing solution $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$; $\text{CH}_3\text{COC}_2\text{H}_5$; MeOH ; H_2O = 10 : 7 : 1 : 1;
1. Genistein; 2. Daidzein; 3. Genistin; 4. Daidzin; 5. Isoflavone;
6. Hydrolysis of isoflavone by the enzyme solution

2.3 Aglycons 和 Glucosides 的抑菌效果

Aglycons 和 Glucosides 的抑菌结果见图 3—6。由图可知, Aglycons 对供试菌的抑菌结果与上述总大豆异黄酮的抑菌效果一致, 而 Glucosides 对供试菌无抑制作用。由此说明大豆异黄酮有抑菌活性的成分是游离型的苷元。

2.4 Aglycons 的最低抑菌浓度 (MIC)

Aglycons 对各种菌的最低抑菌浓度为: *Staphylococcus aureus* 0.03%; *Micrococcus luteus* 0.09%; *Bacillus cereus* 0.02%; *Bacillus pumilus* 0.03%; *Bacillus subtilis* 0.03%; *Listeria monocytogenes* 0.05%; *Candida*

albicans 0.05%; *Absidia sp.* 0.05%; *Aspergillus oryza* 0.05%。

2.5 Aglycons 的热稳定性试验

将加热处理后的 Aglycons 与未经热处理的 Aglycons 作抑菌试验, 二者的抑菌效果无差别, 由此得出大豆异黄酮的热稳定性好。

3 讨论

大豆异黄酮有明显的抑细菌和真菌作用, 其抑菌的活性成分是其游离型的苷元。目前食品工业中

使用防腐剂大都是化学防腐剂,而化学防腐剂往往可致癌或引起积累性中毒,因此研究和开发天然防腐剂是当今世界食品添加剂工业的发展潮流。大豆异黄酮由于具有抑菌、抗氧化等生理活性,不失为一种理想的天然食品添加剂。另据日本科研人员从免

疫学调查和骨质密度与异黄酮摄取关系推算,成人每日异黄酮摄取量至少应在 30—40mg^[6]。因此从营养学角度讲,如果选用大豆异黄酮作为食品添加剂,能发挥其双重作用,应用价值极大。

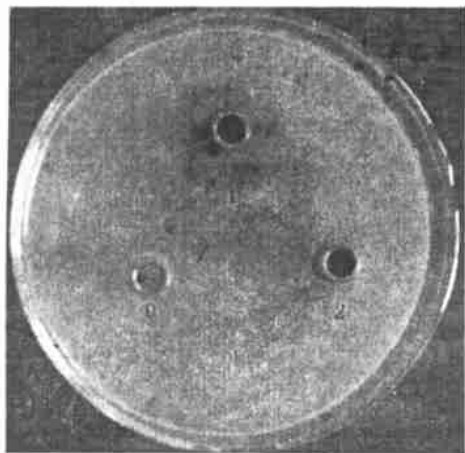


图2 Aglycons 和 glucosides 对枯草芽孢杆菌的抑菌结果

Fig. 2 Anti-microorganism effect to *Bacillus subtilis*

0, control; 1, aglycons; 2, glucosides

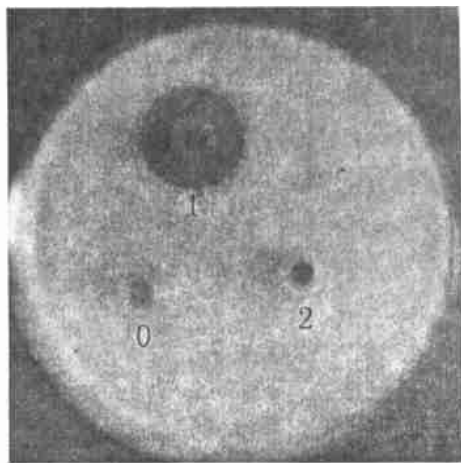


图3 Aglycons 和 glucosides 对藤黄微球菌的抑菌结果

Fig. 3 Anti-microorganism effect to *Micrococcus luteus*

0, control; 1, aglycons; 2, glucosides

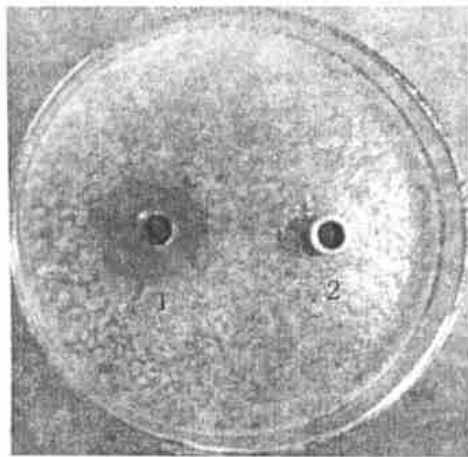


图4 Aglycons 和 glucosides 对白色念珠菌的抑菌结果

Fig. 4 Anti-microorganism effect to *Candida albicans*

1, aglycons; 2, glucosides

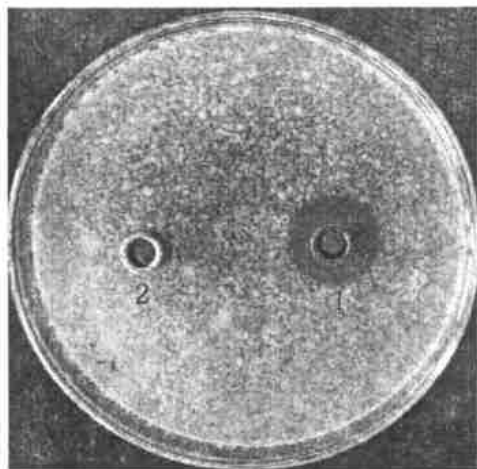


图5 Aglycons 和 glucosides 对米曲霉的抑菌结果

Fig. 5 Anti-microorganism effect to *Aspergillus oryzae*

1, aglycons; 2, glucosides

[J]. Agr. Food Chem., 1974, 22(5): 806—810.

参考文献

- 1 C. Lee Holder, Mona I. Churchwell, Daniel R. Doerge. Quantification of Soy Isoflavones, Genistein and Daidzein, and Conjugates in Rat Blood Using LC/ES-MS[J]. Agric. Food Chem., 1999, 47: 3764—3770.
- 2 Michael Naim, Benjamin Gestetner, Shmuel Zilkah, et al. Soybean Isoflavones Characterization, Determination, and Antifungal Activity

- 3 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2001, 153—155.

- 4 吕源玲, 王洪新. 黄荆叶提取液抑菌作用的研究[J]. 中国食品添加剂, 2002, 3: 24—26.
- 5 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 210—220.
- 6 Shaw Watanabe. Pharmacokinetics of Soybeans in Plasma, Urine and Feces of Men After Ingestion of 60g Baked Soybean Powder (Kinako)[J]. J. Nutr., 1998, 128: 1710—1715.

THE EFFECT ON ANTI—MICROORGANISM OF SOYBEAN ISOFLAVONES

Xie Mingjie¹ Lu Min¹ Zou Cuixia¹ Liu Changjiang² Lu Mingchun³ Jin Fengxie³

(1Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian, 116029; 2College of Food, Shenyang Agriculture University, Shenyang, 110161; 3Department of Food and Biotechnology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian, 116001)

Abstract In this text, soybean isoflavone was extracted from defatted soybean and its effect on anti—microorganism was studied. The results showed that soybean isoflavone could obviously inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*; *Micrococcus luteus*; *Bacillus cereus*; *Bacillus pumilus*; *Bacillus subtilis*; *Listeria monocytogenes*; *Candida albicans*; *Absidia sp. R* and *Aspergillus oryza*. Its minimum inhibition concentration (MIC) was 0.03%, 0.09%, 0.02%, 0.03%, 0.03%, 0.05%, 0.05%, 0.05% and 0.05% respectively, but it could not inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. The ingredients of anti—microorganism in soybean isoflavones were dissociated Aglycons, combined glucosides had not any effects to all tested microorganism. Furthermore, dissociated Aglycons was stable on heat, after 121 °C, 30min hot procession, it still had a stronger anti—microorganism activeness.

Key words Isoflavones; Aglycons; Glucosides; Anti—microorganism test; MIC