

## 鸡内金糖苷酶水解大豆异黄酮的研究

王美玲, 康少华, 芦明春

(大连工业大学 食品学院, 辽宁 大连 116034)

**摘 要:**从鸡内金中分离得到鸡内金糖苷酶,以大豆异黄酮为水解底物,HPLC 法测定大豆异黄酮的水解转化率。结果表明:鸡内金糖苷酶对大豆异黄酮苷(至少 6 种异构体)能进行有效水解,水解率达 99%,结果为进一步研究鸡内金糖苷酶的水解特性奠定了良好的基础。

**关键词:**鸡内金糖苷酶;大豆异黄酮;水解

**中图分类号:**TS214.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2010)06-1081-03

## Hydrolysis of Soybean Isoflavone by Endothelium Corneum Glucosidase

WANG Mei-ling, KANG Shao-hua, LU Ming-chun

(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China)

**Abstract:** Glucosidase was separated from Endothelium Corneum to hydrolyze soybean isoflavones. The hydrolysis rate of soybean isoflavone was determined by HPLC. Results indicated that Endothelium Corneum glucosidase could convert soybean isoflavone glucosides into the corresponding aglycones and the hydrolysis reached 99%, which laid a good foundation for studying hydrolysis characteristics of Endothelium Corneum glucosidase.

**Key words:** Endothelium Corneum; Glucosidase; Soybean isoflavone; Hydrolysis

鸡内金为雉科动物家鸡的干燥胃内壁,别名鸡肫皮。鸡内金始载于《神农本草经》,它作为药用动物内脏,是一味很好的中药,其性平,味甘,具有健胃消食、涩精止遗的功能,临床用于消化不良、脾胃虚弱、腕腹胀满、泌尿系结石和胆道结石等症<sup>[1-2]</sup>。目前,对鸡内金的组成、营养价值、药理作用以及鸡内金的综合性探索还不够深入,特别是对鸡内金中酶类研究的报道甚少。

糖苷酶亦称糖苷水解酶,是作用于各种糖苷或寡糖使糖苷键水解的酶之总称。已知在生物体中存在着许多种类的糖苷酶,这些酶的特异性水解作用已成为研究糖苷、寡糖、多糖必不可少的手段。

大豆异黄酮是从天然植物大豆中提取的一种生物活性物质,是一类化合物总称。有 3 种游离苷元:染料木素、大豆素、黄豆黄素和 9 种结合型葡萄糖苷,其中  $\beta$ -葡萄糖苷形式为:染料木苷,大豆黄苷和黄豆黄苷;另 2 种糖苷结合形式为:6-氧-酰基结合物和 6-氧-丙二酰基结合物。近年来研究发现大豆中异黄酮存在形式主要是结合型糖苷,游离苷元含量很少,但苷元表现出的活性要比结合型糖苷高很多倍<sup>[3-4]</sup>。因此,将结合型糖苷水解成苷元形式

是提高大豆异黄酮生理活性的一个有效手段,也是近年大豆异黄酮研究的一个热点。

该试验研究了鸡内金糖苷酶对大豆异黄酮的水解效果,为进一步研究该酶的水解特性与提高大豆异黄酮的利用价值提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

材料:鸡内金,市售;大豆异黄酮,大连绿峰生物有限公司;DEAE-cellulose DE-52,宝生物工程(大连)有限公司;甲醇,色谱纯,EDIA;其它试剂均为国产分析醇。

仪器:Waters Alliance 2695 液相色谱仪,美国 Waters 公司。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 粗酶液的提取及浓缩 称取 100.0 g 的鸡内金粉末,按 1:5 质量比加入 pH5 醋酸-醋酸钠缓冲溶液,4℃下浸提 8 h,过滤,取上清液;用 75% 硫酸铵饱和溶液沉淀粗酶,高速冷冻离心机 8 000 r·min<sup>-1</sup>,4℃离心 8 min;沉淀物加入 30 mL 醋酸-

收稿日期:2010-09-05

基金项目:辽宁省教育厅创新团队资助项目(2008T009)。

第一作者简介:王美玲(1984-),女,在读硕士,研究方向为食品资源开发与利用。E-mail:wml1012@sina.cn。

通讯作者:芦明春,教授。E-mail:slmchun@sina.com。

醋酸钠缓冲溶液复溶,将复溶后的酶液装入透析袋除盐后即为制备的鸡内金糖苷酶粗酶液<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 酶的分离纯化** 取一定量粗酶液通过已预处理好的 DEAE-cellulose DE-52 阴离子交换柱进行分离纯化,得到较纯的酶液,4℃ 保存备用。先用 Tris-HCl 缓冲溶液洗掉粗酶液中的杂蛋白,然后用 0.1~0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 Tris-HCl 缓冲溶液进行梯度洗脱。利用自动分部收集器收集洗脱液,紫外分光光度计 280 nm 下测定各管的吸光值。以管数为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制洗脱曲线。

**1.2.3 酶活力的测定** 采用 TLC 法对酶活力进行检测。取少量峰值管酶液,按 1:1 的体积比加入大豆异黄酮溶液,40℃ 水浴水解 8 h 后,加 2 倍于反应液的乙酸乙酯终止反应,震荡,分层后取上层溶液, TLC 检测,点样量为 5 μL,展开剂为 V(乙酸乙酯):V(丁酮):V(甲醇):V(水)=10:7:1:1,紫外灯 254 nm 波长下检测。

**1.2.4 大豆异黄酮的水解反应** 大豆异黄酮配成 4 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液,按照 1:1 的体积比加入纯化后具酶活的鸡内金糖苷酶液,加酶量为 3500 U·mL<sup>-1</sup>,在温度为 35℃,水解时间为 15 h 的条件下进行水解反应并萃取反应物,得到一定量的水解产物,进行色谱分析<sup>[6]</sup>。

**1.2.5 大豆异黄酮水解转化率的测定** 采用高效液相色谱法<sup>[7]</sup>测定水解前后大豆异黄酮。色谱条件:色谱柱为 Hypersil ODS2 (46 mm×150 mm, 5 μm);紫外检测器 260 nm 波长下检测;1.0 mL·min<sup>-1</sup> 流速;柱温 40℃;进样量 10 μL;流动相为 A(甲醇),B(1.0% 水-冰乙酸);洗脱梯度为:0~5 min, 10% A(体积分数);5~20 min, 10% A 到 40% A;20~32 min, 40% A 到 46% A;32~40 min, 46% A。

水解率=(水解前后糖苷型大豆异黄酮色谱峰面积之差/水解前糖苷型大豆异黄酮色谱峰面积)×100%

## 2 结果与讨论

### 2.1 粗酶液的得率计算

采用 pH5 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液对鸡内金糖苷酶进行了提取,粗酶的得率约为 5%。

### 2.2 鸡内金糖苷酶的纯化

鸡内金粗酶液经 0~0.2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 的 Tris-HCl 缓冲溶液每 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 为一个梯度进行洗脱,洗脱曲线如图 1 所示。

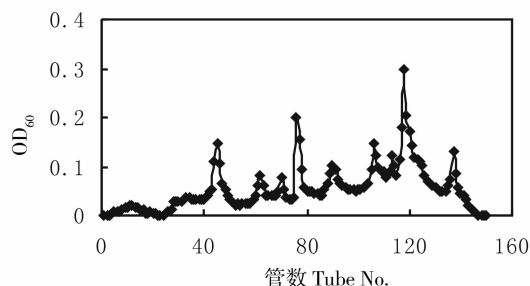


图 1 DEAE-Cellulose DE-52 洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of DEAE-Cellulose DE-52

该酶经 DEAE-cellulose DE-52 分离,共有 9 个洗脱峰,峰值管分别为 45、62、70、77、90、106、113、118、137。第 1 号峰为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaCl 洗脱组分,第 2、3、4、5 号峰为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaCl 洗脱组分,第 6、7、8 号峰为 0.15 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaCl 洗脱组分,第 9 号峰为 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaCl 洗脱组分。经 TLC 检测结果如图 2 所示:e 为对照,和它比较 5 号峰对应的大豆异黄酮斑点发生了变化,苷的斑点消失而苷元斑点颜色加深。表明 5 号峰值管有酶活。

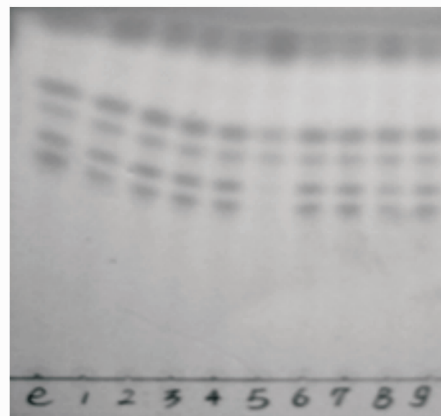


图 2 各峰值管的薄层色谱图

Fig.2 TLC of soybean isoflavones

### 2.3 HPLC 测定大豆异黄酮的水解转化率

按照方法 1.2.3 水解大豆异黄酮,取反应物和水解物进行 HPLC 分析,测定大豆异黄酮的水解转化率,反应前后的色谱对照如图 3 所示。水解前的色谱图中含有 9 种物质,保留时间分别是 18.195、19.204、20.751、24.666、25.742、26.531、28.193、28.658、30.937 min,分别为大豆异黄酮苷及其苷元异构体。水解反应后,仅有保留时间 26.531、28.193、30.937 min 位置上的 3 个峰存在,从峰面积可以判断该 3 种物质的含量明显增加,而其余 6 个保留时间所对应的峰均消失。由此可以判断,酶解前样品中含有 6 种大豆异黄酮苷异构体,3 种大豆异黄酮苷元异构体,在鸡内金糖苷酶的作用下,该 6

种不同形式的糖苷异构体水解掉糖基后,生成对应形式的 3 种大豆异黄酮苷元异构体,几乎完全转化,转化率达 99%。

大豆异黄酮有 3 种苷元异构体,分别为染料木

素、大豆素和黄豆黄素,分别对应图 1 中水解后的 3 种物质,另外 6 种大豆异黄酮苷的异构体分别为 3 种苷元的衍生物,具体对应关系还需进一步研究。

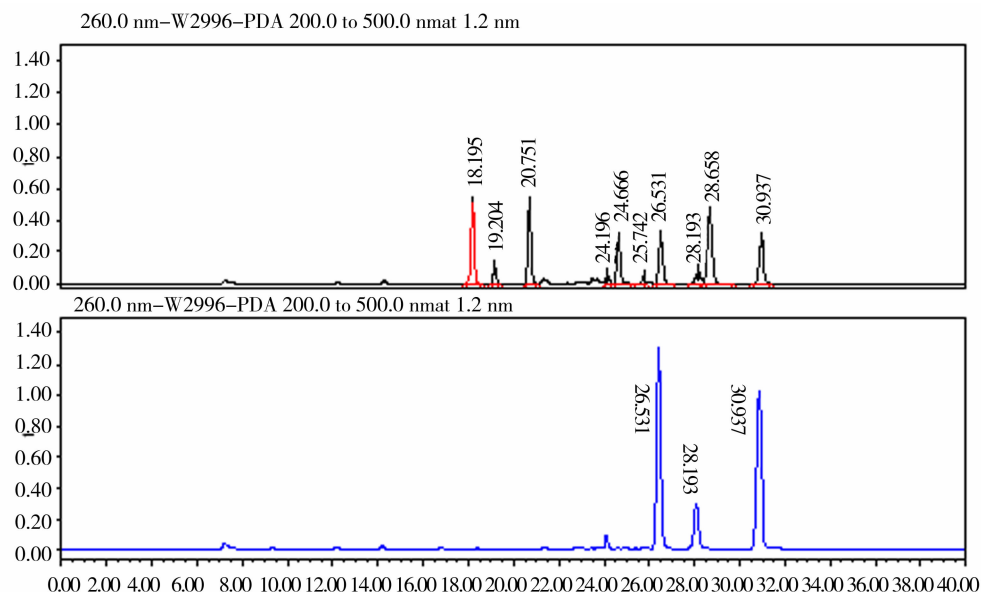


图 3 大豆异黄酮水解前后 HPLC 对照图

Fig. 3 HPLC chromatogram of soybean isoflavones

### 3 结论

从鸡内金中提取、分离纯化得到鸡内金糖苷酶,以大豆异黄酮做为水解底物,HPLC 检测水解转化率。通过水解前后 HPLC 可以得出:鸡内金糖苷酶对大豆异黄酮苷(至少 6 种异构体)能进行有效水解,水解率高达 99%。鸡内金糖苷酶将大豆异黄酮结合型糖苷水解成相应的苷元形式,水解率高,反应条件温和,能很好的保持大豆异黄酮的结构,有效地提高了大豆异黄酮的生理活性。因此,该研究对提高大豆异黄酮的应用价值及进一步研究鸡内金糖苷酶的水解特性奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 黄继全. 鸡内金炮制工艺研究[J]. 中国临床医药研究杂志, 2008(16):3-4. (Huang J Q. Study on the processing technology of Endothelium Coneum[J]. The Chinese Journal of Clinical Medicine Research, 2008(16):3-4. )
- [2] 王彦勤. 鸡内金的药用价值[J]. 特种经济动植物, 2002(10): 35. (Wang Y Q. The medicinal value of endothelium coneum[J]. Special Economic Animals and Plants, 2002(10):35. )
- [3] 井乐刚, 张永忠, 杨健. 大豆异黄酮在保健食品和医药中的应用的研究进展[J]. 植物学通报, 2002, 19(6):692-697. (Jing L G, Zhang Y Z, Yang J. Development of the application of soy isoflavones in health foods and pharmaceutical[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2002, 19(6):692-697. )
- [4] 谢明杰, 高爽, 邹翠霞, 等. 大豆异黄酮生理功能的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(5):94-97. (Xie M J, Gao S, Zou C X, et al. The physiology functions of soybean isoflavones[J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(5):94-97. )
- [5] 张亮, 王清章, 李洪, 等. 莲子  $\beta$ -葡萄糖苷酶提取及酶学性质[J]. 食品科技, 2008(6):142~146. (Zhang L, Wang Q Z, Li Y, et al. Study on the characterization of  $\beta$ -Glucosidase in the lotus seed[J]. Food science and technology, 2008(6):142-146. )
- [6] 许晶, 孙艳梅, 张永忠. 里氏木霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮糖苷的工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(3):31-34. (Xu J, Sun Y Y, Zhang Y Z. Hydrolysis of soybean isoflavone glucosides by  $\beta$ -Glucosidases from trichoderma reesei[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(3):31-34. )
- [7] 高荣海, 孙昭宁, 李长彪, 等. 高效液相色谱法同时测定大豆粕四种异黄酮含量研究[J]. 粮食与油脂, 2006(10):33-35. (Gao R H, Sun Z N, Li C H, et al. Study on simultaneous determination of four isoflavones from soybean meal by HPLC[J]. Grain and Oil, 2006(10):33-35. )