

青方腐乳发酵过程中大豆异黄酮的转化研究

马艳莉, 夏亚男, 王颖, 刘亚琼, 孙剑锋, 牟建楼

(河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001)

摘要: 本文比较了青方、红方、白方和低盐红腐乳中大豆异黄酮组成和含量差异, 并对青方腐乳发酵过程中大豆异黄酮含量和构型变化规律进行研究。结果表明, 四种类型腐乳中大豆异黄酮基本以苷元形式存在, 青方腐乳大豆异黄酮含量明显低于其他类型腐乳, 仅为红方腐乳的 33.01%, 从单一异黄酮来看, 大豆苷元和染料木素在四种类型腐乳中的含量明显高于黄豆黄素; 青方腐乳发酵过程中大豆异黄酮转化研究发现, 白坯中大豆异黄酮以糖苷型为主, 染料木苷含量高于大豆苷和黄豆苷, 前酵过程中糖苷型大豆异黄酮转化为苷元型大豆异黄酮, 盐腌过程中糖苷型大豆异黄酮含量有轻微降低, 发酵过程中苷元型大豆异黄酮总量在后酵前 30 d 显著下降, 其中大豆苷元可能部分转化为雌马酚, 导致青方腐乳大豆异黄酮含量明显低于其他类型腐乳, 对其转化物质需进一步鉴定。

关键词: 腐乳; 发酵过程; 大豆异黄酮; 雌马酚

文章编号: 1673-9078(2015)6-249-253

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.039

Soy Isoflavone Transformation during Grey Sufu Fermentation

MA Yan-li, XIA Ya-nan, WANG Jie, LIU Ya-qiong, SUN Jian-feng, MU Jian-lou

(Department of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Soy isoflavone composition and content were compared between grey, red, white, and low-salt sufu (or fermented tofu). Changes in soy isoflavone content during the fermentation of grey sufu were also investigated. The results showed that soy isoflavone glucosides were almost completely converted to aglycones in all four types of sufu. Isoflavone content in grey sufu was significantly lower than that in the other types of sufu, in addition to being only 33.01% of the content in red sufu. Additionally, daidzein and genistein content was significantly higher than that of glycitein in all four types of sufu. Monitoring soy isoflavone conversion in grey sufu during the fermentation process showed that glucosides were the main forms of soy isoflavone in pizi, among which, genistein content was higher than daidzein and glycitein content. Soy isoflavone glucosides were converted to soybean isoflavone aglycone during the pre-fermentation process. There was a slight decrease in soy isoflavone glucoside content during the salting process. The total amount of soybean isoflavone aglycone decreased significantly at 30 d post-fermentation. Among soybean isoflavone aglycones, daidzein might be partially converted to equol, which resulted in the lower content of soy isoflavones in grey sufu than in other types of sufu. It remains to be seen if the transformed substance was equivalent in the four types of sufu.

Key words: sufu; fermentation process; soy isoflavone; equal

大豆异黄酮是一种非固醇类物质, 是大豆中的一种多酚类混合物, 分为糖苷型异黄酮和苷元型异黄酮两类, 糖苷型异黄酮可以发生乙酰化、丙二酰化, 生成异黄酮衍生物, 进一步转化为苷元型异黄酮。研究表明, 大豆异黄酮具有缓解骨质疏松症和更年期综合症、降低胆固醇、预防癌症等方面的生理功能, 苷元型异黄酮比糖苷型异黄酮更易吸收, 具有更强的功能性^[1]。雌马酚是一类天然选择性雌激素受体调节剂, 可在特定微生物作用下由大豆苷元转化得到, 具有比

收稿日期: 2014-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101336)

作者简介: 马艳莉 (1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 大豆食品加工技术

通讯作者: 王颖 (1959-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品贮藏与加工

其前体物大豆异黄酮更强的生物活性, 人群中能够代谢大豆苷元为雌马酚者约为 30%~50%, 人体能否代谢大豆苷元为雌马酚可能与膳食结构相关^[2]。

腐乳是以大豆为主要原料, 经磨浆、制坯、前酵、腌制、后酵等生产过程制得的中国传统发酵豆制品, 近年来研究发现, 腐乳具有抗氧化活性、血管紧张素转换酶抑制活性、乙酰胆碱酯酶抑制活性等生理功能^[3-4], 这些生理功能主要由腐乳中的生物活性物质引起。大豆异黄酮是腐乳中一类重要的功能因子, 研究发现, 微生物发酵可使腐乳中大豆异黄酮糖苷向苷元形式转化, 提高其生物活性, 并且生产工艺会影响大豆异黄酮的转化^[5]。根据不同的生产工艺可将腐乳划分为青方、红方、白方和低盐红腐乳等不同的类型, 目前已有关于红方和白方腐乳中大豆异黄酮的研究报

道,但未见关于青方腐乳大豆异黄酮的研究^[6]。青方腐乳是传统腐乳中最具特色的品种,其生产工艺和微生物组成与其他类型腐乳存在较大差异,推测其大豆异黄酮转化规律可能与其他类型腐乳不同。本研究首先比较了青方、红方、白方和低盐红腐乳中六种大豆异黄酮含量差异,并对青方腐乳发酵过程中大豆异黄酮含量和构型变化规律进行研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

青方、红方、白方和低盐红腐乳成品取自北京二商食品有限责任公司,为市售商品;乙腈为色谱纯,购于Dima Technology Inc.;大豆异黄酮标准品大豆苷(Daidzin)、大豆昔元(Daidzein)、染料木苷(Genistin)、染料木素(Genistein)、黄豆黄苷(Glycitin)和黄豆黄素(Glycitein)以及雌马酚(Eqoul)标准品均购于Sigma-Aldrich, Inc.。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪,LC-10A,日本Shimadzu Co.;超声波清洗器,KQ-100E,昆山市超声仪器有限公司;涡旋振荡器,WSZ-100A,上海一恒科技有限公司;真空冷冻干燥机,EYELA FDU-540,日本Tokyo Rikakikai Co., Ltd.;中草药粉碎机,FW135,天津市泰斯特仪器有限公司;台式离心机,TDL-40B,上海安亭科学仪器厂;pH计,F-23,日本Horiba Ltd.。

1.3 试验方法

1.3.1 腐乳样品制备

腐乳样品制备过程包括孢子悬浮液制备、白坯制备、毛坯制备、盐坯及后酵样品制备等过程,具体方法如下:

(1) 孢子悬浮液制备

检查发酵菌种雅致放射毛霉无明显退化现象、菌丝齐壮浓密、无杂菌污染,将菌种划线于PDA培养基斜面上,28℃活化72 h。加入10 mL无菌生理盐水,使培养基表面孢子悬浮其中。将液体无菌移入试管,在混匀器上混匀10 min,成为均匀悬浊液。用灭菌的定性滤纸无菌过滤悬浊液,经血球计数板镜检计数,调整孢子浓度为 1.0×10^6 cfu/mL,备用。孢子悬浮液随用随配,不做储藏。

(2) 白坯制备

将大豆去杂清洗后,按1:4 (g/mL)比例加水,室温浸泡12 h,按浸泡前大豆质量与水1:6 (g/mL)比例

加入磨浆机进行磨制,过100目筛,加热,95℃保温5 min,冷却至80℃,保温5 min,手动搅拌加入1 M MgCl₂溶液点浆,80℃蹲脑40 min,压榨成型,最后将豆腐切成3.1×3.1×1.8 cm的小块,即为白坯。

(3) 毛坯制备

将白坯整齐摆入蒸笼中,喷洒孢子悬浮液,在28℃、相对湿度为90%环境中培菌48 h,成为毛坯,并分别于发酵12 h、24 h、36 h和48 h时取样。

(4) 盐坯及后酵样品制备

将毛坯凉花、搓毛后,腌制5 d,使盐坯的含盐量达到11%~14%。将12块盐坯放入340 mL的玻璃瓶中,加入青方腐乳汤料约140 mL,在25℃~28℃温度下保温后酵。并分别于盐腌1 d、2 d、3 d、4 d、5 d和后酵1 d、15 d、30 d、45 d、60 d、75 d和90 d时取样。

1.3.2 大豆异黄酮组成和含量测定

使用HPLC法测定样品中大豆异黄酮和雌马酚,参照Yin et al.^[5]的方法,略有改动。

(1) 样品提取液制备

称取样品冻干粉0.50 g,加入80%甲醇5.0 mL,80℃条件下160 r/min水浴震荡提取4 h,以80%甲醇定容至原体积,5000 r/min离心10 min,取上清液,过0.45 μm有机膜,得到样品提取液备用。

(2) HPLC检测条件

色谱柱:Shiseido C18色谱柱,250×4.6 mm×4.5 nm;流动相A相:0.1%(V/V)冰醋酸;B相:乙腈/甲醇=5/2 (V/V);柱温:40℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm。梯度洗脱程序如表1所示。

表1 HPLC 梯度洗脱程序

Table 1 High-pressure liquid chromatography gradient elution

program		
时间/min	A 浓度/%	B 浓度/%
0.01	15	85
35	45	55
35.01	15	85
40	15	85

1.3.3 统计分析

采用SPSS 16.0软件进行方差分析,邓肯氏多重检验确定数据间的差异,显著水平为 $p < 0.05$ 。每个样品重复测定三次,取其平均值。

2 结果与amp;讨论

2.1 不同类型腐乳大豆异黄酮组成和含量比较

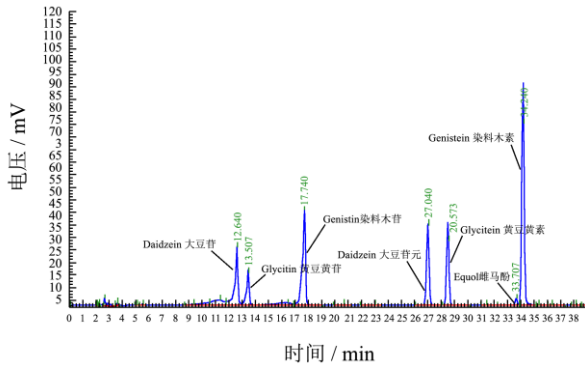


图1 大豆异黄酮标准品色谱图

Fig.1 Chromatogram of soy isoflavone standards

六种大豆异黄酮和雌马酚标准品色谱图如图1所示,采用表1所示 HPLC 梯度洗脱程序可在 40 min 内实现六种大豆异黄酮和雌马酚的分离与鉴定,分离效果良好,大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、雌马酚和染料木素的保留时间分别为 12.640 min、13.507 min、17.740 min、27.040 min、29.573 min、33.707 min 和 34.240 min。

对青方、红方、白方和低盐红腐乳大豆异黄酮组成与含量研究发现,四种类型腐乳几乎不含糖苷型大豆异黄酮。Yin et al.^[5]研究发现,白方腐乳在后发酵 60 d 时,糖苷型大豆异黄酮仅为大豆异黄酮总量的 0.3%,而 99.7%的异黄酮为苷元型,并指出糖苷型异黄酮向苷元型异黄酮的转变与β-葡萄糖苷酶活性密切相关。Chen et al.^[7]使用黄色毛霉在低温条件下发酵生产腐乳,同样发现,后发酵 8 周时,腐乳中 99.4%的大豆异黄酮为苷元型。本研究中四种类型腐乳大豆异黄酮基本呈现苷元型与这些文献报道相一致。

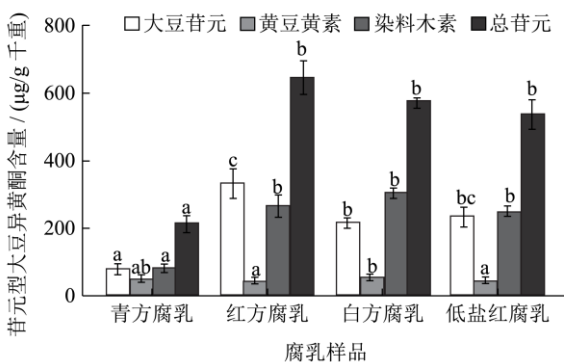


图2 不同类型腐乳苷元型大豆异黄酮含量比较

Fig.2 Comparison of aglycone isoflavone content in different types of sufu

注:同一类型柱状图上不同字母(a、b和c)表示差异显著(P<0.05)。

对四种类型腐乳苷元型大豆异黄酮含量进行研究,结果如图2所示,红方腐乳苷元型异黄酮含量最高,白方和低盐红腐乳次之,但三者之间差异不显著,

青方腐乳苷元型异黄酮含量最低,不仅与其他三种类型腐乳有显著性差异(P<0.05),而且其含量仅为红方腐乳的33.01%。腐乳中大豆异黄酮含量差异与生产工艺密切相关,青方腐乳生产工艺与其他三种腐乳的区别主要在后发酵汤料组成上^[8],所以推测,青方腐乳苷元型大豆异黄酮含量与其他类型腐乳的差异主要是在后酵过程中产生的。从三种苷元型异黄酮含量上来看,大豆苷元和染料木素在四种类型腐乳中的含量明显高于黄豆黄素,其中,红方腐乳中大豆苷元含量最高,白方腐乳中染料木素含量最高,四种类型腐乳中黄豆黄素含量差异不显著。研究表明,苷元型大豆异黄酮并不是大豆异黄酮转化的最终产物,例如,大豆苷元可以在特定微生物作用下转化为具有稳定化学结构且功能性更强的代谢终产物-雌马酚^[9],因此,可以推测,青方腐乳中苷元型大豆异黄酮可能进一步转化为其他代谢产物,导致其含量较低,对于青方腐乳中苷元型大豆异黄酮的转化需要进一步研究。

2.2 青方腐乳前酵和盐腌过程中大豆异黄酮

变化

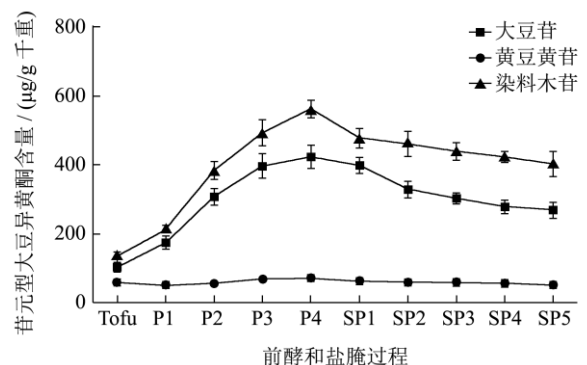
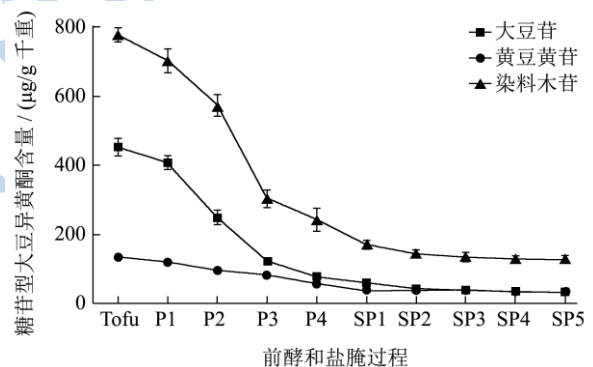


图3 青方腐乳前酵和盐腌过程中大豆异黄酮变化

Fig. 3 Changes in soy isoflavones during pre-fermentation and salting process of grey sufu

注: Tofu代表白坯, P1、P2、P3和P4分别代表前酵12h、24h、36h和48h的样品, SP1、SP2、SP3、SP4和SP5分别代表盐腌1d、2d、3d、4d和5d的样品。Note: Tofu is on behalf of unfermented Pizi;

P1 to P4 were pehtzes fermented for 12, 24, 36, and 48 h; SP1 to SP5 were pehtzes subjected to salting for 1, 2, 3, 4, and 5 days, respectively.

对青方腐乳前酵和盐腌过程中大豆异黄酮变化进行研究, 结果如图 3 所示, 白坯中的大豆异黄酮以糖苷型为主, 染料木苷含量高于大豆苷, 黄豆黄苷含量最低, 在前发酵过程中, 染料木苷和大豆苷含量显著降低, 黄豆黄苷含量也有降低趋势, 而苷元型大豆异黄酮染料木素和大豆苷元含量明显上升, 黄豆黄素含量也有轻微上升, 由此可见, 前酵过程中糖苷型大豆异黄酮转化为苷元型大豆异黄酮, 与文献报道相一致^[10], 说明腐乳制造有效提高了大豆异黄酮的生物活性。大豆异黄酮的转化普遍归因于微生物发酵过程中产生的 β -葡萄糖苷酶的作用, β -葡萄糖苷酶作用于氧苷键, 使其葡萄糖苷基团脱掉, 从而转化成相应的具有更高生物活性的苷元形式。盐腌过程中, 糖苷型大豆异黄酮含量轻微降低, 这是由于食盐抑制了 β -葡萄糖苷酶活性, 影响了糖苷型大豆异黄酮向苷元型转化, 并且由于食盐进入盐坯, 增加了盐坯干物质含量, 所以带来大豆异黄酮含量轻微降低。

2.3 青方腐乳后酵过程中大豆异黄酮转化

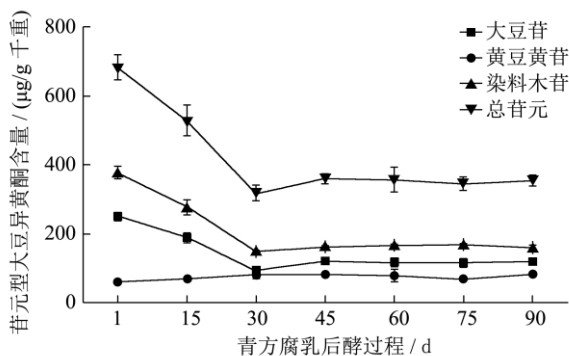


图 4 青方腐乳后发酵过程苷元型大豆异黄酮变化

Fig.4 Changes in aglycone isoflavones post fermentation of grey sufu

青方腐乳后发酵过程中苷元型大豆异黄酮变化如图4所示, 染料木素和大豆苷元含量在后酵前30d显著下降, 随后轻微上升后基本保持稳定, 黄豆黄素含量变化不大。文献报道腐乳后酵过程中糖苷型大豆异黄酮继续向苷元型转化^[7], 这与本研究中青方腐乳后发酵过程中苷元型大豆异黄酮变化趋势不一致。使用HPLC检测青方腐乳后酵过程中苷元型大豆异黄酮变化时, 在出峰时间33.707 min时检测到一种未知物, 且该未知物在红方、白方和低盐红腐乳中均未检测到, 其HPLC图谱及在青方腐乳后发酵过程中峰面积变化如图5所示, 从图中可知, 该物质与雌马酚标准品出峰时间一

致, 且峰面积在青方腐乳后发酵前30 d内显著增加, 随后峰面积下降后再度上升。因为大豆苷元在特定微生物作用下会转化为雌马酚, 联系青方腐乳后酵前30 d 苷元型异黄酮含量下降的试验结果, 推测在本试验所使用的HPLC条件下, 出峰时间为33.707 min的未知物可能为雌马酚。

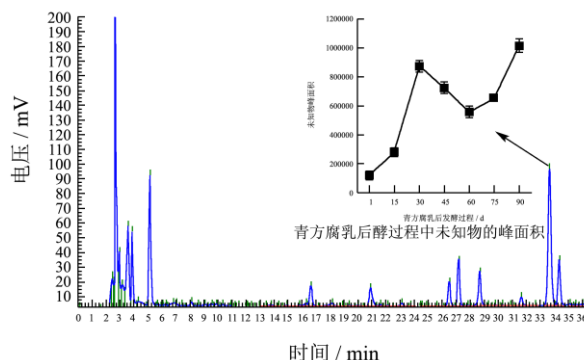


图 5 青方腐乳大豆异黄酮及未知物色谱图

Fig.5 Chromatogram of soy isoflavones and unknown compounds in grey sufu

雌马酚是一类天然选择性雌激素受体调节剂, 可在特定微生物作用下由大豆苷元转化得到, 具有比其前体物大豆异黄酮更高的生物活性。Abiru et al.^[11]调查了21种发酵豆制品, 仅在臭豆腐中发现了雌马酚, 进一步对不同季节购买的16种臭豆腐中雌马酚含量进行测定, 发现其含量在0.34~2.68 mg/100 g之间, 平均含量为1.39 mg/100 g, 该研究首次发现了臭豆腐是一种富含雌马酚的食品。Jou et al.^[12]研究了台湾138种臭豆腐菜肴, 发现91% 含有雌马酚, 且这些臭豆腐中的雌马酚具有含量高和生物利用率高的特点。但是这两项研究仅使用HPLC方法对雌马酚进行定性定量, 其准确度有待进一步商榷。本研究中对青方腐乳中未知物可能是雌马酚的推测需要进一步使用质谱及核磁共振的方法验证, 并且需要对青方腐乳中是否含有雌马酚产生菌进行研究。

3 结论

四种类型腐乳中大豆异黄酮基本以苷元形式存在, 红方腐乳中苷元型异黄酮含量最高, 青方腐乳含量最低, 仅为红方腐乳的 33.01%; 从单一异黄酮来看, 大豆苷元和染料木素在四种类型腐乳中的含量明显高于黄豆黄素; 青方腐乳发酵过程中大豆异黄酮转化研究表明, 前酵过程苷元型大豆异黄酮含量上升, 盐腌导致其轻微下降, 但是后酵前 30 d 内, 苷元型异黄酮含量下降, 转化为其他物质, 导致终产品中总苷元含量低于其他类型腐乳; 使用 HPLC 法检测青方腐乳后酵过程中苷元型大豆异黄酮变化时, 在出峰时间

33.707 min 时检测到一种未知物,且该未知物在红方、白方和低盐红腐乳中均未检测到,该物质与雌马酚标准品出峰时间一致,且峰面积在青方腐乳后发酵前 30 d 内显著增加。

参考文献

- [1] Hea FJ, Chen JQ. Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: differences between Chinese women and women in western countries and possible mechanisms [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2013, 2(3-4): 146-161
- [2] Ueno T, Abirua Y, Uchiyama S, et al. Distribution of 24-h urinary equol excretion as an indicator of the physiological range in healthy Japanese equol excretors [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7: 129-135
- [3] Kuba M, Tanaka K, Tawata S, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67(6): 1278-1283
- [4] Chen J, Quan MH, Cheng YQ, et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity of Chinese sufu (fermented tofu) ethanol-extract [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(3): 1263-1266
- [5] Yin LJ, Li LT, Li ZG, et al. Changes in isoflavone contents and composition of sufu (fermented tofu) during manufacturing [J]. *Food Chemistry*, 2004, 87(4): 587-592
- [6] 汪建明,耿媛,胡峰,等.从腐乳中提取大豆异黄酮及含量测定[J]. *食品与发酵科技*, 2012, 48(5): 92-95
Wang JM, Geng Y, Hu F, et al. The extraction and determination of isoflavones in sufu [J]. *Food and Fermentation Technology* [J]. 2012, 48(5): 92-95
- [7] Cheng YQ, Zhu YP, Hu Q, et al. Transformation of isoflavones during sufu (a traditional Chinese fermented soybean curd) production by fermentation with *Mucor flavus* at low temperature [J]. *International Journal of Food Properties*, 2011, 14(3): 629-639
- [8] 陈涛,陈燕华,陈福生.汤料对青方腐乳后期发酵过程中主要成分、质构及臭味的影响[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(12): 2883-2888
Chen T, Chen YH, Chen FS. Effects of soup on the main compositions, texture and odour of grey sufu during ripening process [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(12): 2883-2888
- [9] Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, et al. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12(6): 1559-1567
- [10] Huang YH, Lu TJ, Chou CC. Ripening temperature affects the content and distribution of isoflavones in sufu, a fermented soybean curd [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2011, 46(2): 257-262
- [11] Abiru Y, Kumemura M, Ueno T, et al. Discovery of an S-equol rich food stinky tofu, a traditional fermented soy product in Taiwan [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2012, 63(8): 964-970
- [12] Jou HJ, Tsai PJ, Tu JH., et al. Stinky tofu as a rich source of bioavailable S-equol in Asian diets [J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(2): 651-659