

发酵处理对大豆制品中异黄酮含量与组分的影响<sup>\*</sup>张炳文<sup>1</sup> 宋永生<sup>1</sup> 郝征红<sup>2</sup> 迟玉森<sup>3</sup>

1(济南大学食品系, 济南, 250002) T52 | A

2(山东省农业科学院中心实验室, 济南, 250100)

3(山东师范大学生命科学学院, 济南, 250014)

**摘 要** 利用发酵大豆食品——豆豉与酸豆乳作为试验对象, 通过与对照品比较, 发现发酵处理对大豆食品中的异黄酮总含量的影响不大, 但对其异黄酮的组分有较大的影响, 发酵处理使糖苷型大豆异黄酮在  $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用下水解为游离型大豆异黄酮, 从而使发酵制品中的游离型大豆异黄酮的含量增高, 而糖苷型大豆异黄酮的含量降低。

**关键词** 糖苷型大豆异黄酮, 游离型大豆异黄酮, 发酵处理

大豆异黄酮(soybean isoflavones)是存在于大豆等豆科植物中的一类生物类黄酮物质, 在自然界中分布有限, 上世纪 90 年代中后期逐渐受到人们关注, 具有极大的开发潜力。大豆异黄酮主要是指以 3-苯并吡喃酮为母核的化合物, 迄今已从大豆中分离出 9 种异黄酮糖苷(即糖苷型大豆异黄酮)和 3 种相应的糖苷配基(即游离型大豆异黄酮, 也称苷元)<sup>[1]</sup>。

大豆异黄酮在美国市场上被称为“大豆奇迹”。它具有预防癌症、心血管疾病、骨质疏松症和降低妇女更年期综合症等生理功能<sup>[2-4]</sup>。而游离型大豆异黄酮比糖苷型大豆异黄酮具有更强的生物活性<sup>[5,6]</sup>, 对丹贝中异黄酮的研究发现, 苷元形式的异黄酮抗真菌的活性很强, 0.005% 的含量即可抑制许多真菌活性, 而糖苷形式的异黄酮的抗真菌活性是极其微弱的。Murakami 等人<sup>[5]</sup>还研究了丹贝发酵中其异黄酮的变化, 发现发酵使糖苷型异黄酮几乎全部解离成游离型异黄酮, 这使得丹贝粉的脂肪过氧化值(POV)明显低于豆瓣。大豆及普通大豆食品中的异黄酮主要以糖苷型形式存在。本实验通过对发酵大豆制品中异黄酮各组分相互转化的研

究, 从一个侧面进一步证明了发酵处理可增强大豆制品对人体健康的功能性, 为深入、广泛开发发酵大豆食品提供了有力的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

大豆: 鲁黑豆 2 号(山东省农业科学院作物研究所提供)。

发酵酸豆乳所用菌种: 保加利亚乳杆菌和嗜热乳链球菌以 1:1 的比例混合干粉菌种。

发酵豆豉所用菌种: 沪酿米曲霉 3042。

大豆异黄酮标样: 黄豆苷(daidzin, 简称为 D)、染料木苷(genistin, 简称为 G)、黄豆苷元(daidzein, 简称为 De)、染料木黄酮(genistein, 简称为 Ge), 购自 Sigma 公司。

HPLC 用甲醇(色谱纯)、磷酸(AR), 样品处理用甲醇(CR)。

### 1.2 主要仪器

高效液相色谱仪(Waters 公司, 490 型紫外检测器, 510 泵), ZK-82B 型真空干燥箱, 420 型微生物多用培养箱, LD4-2A 型离心机, HY-2 型调速超声波振荡器。

第一作者: 硕士, 副研究员。

\* 山东省科委 1999 年科技攻关项目(No. 993101903)中的部分研究内容

收稿日期: 2002-01-23

1.3 试验方法

1.3.1 豆乳的制作工艺流程

鲁黑豆 2 号→去杂→烘干→去皮→浸泡→磨浆→均质(加入添加剂)→杀菌→冷却→成品。

1.3.2 发酵酸豆乳的制作工艺流程

将上述制作的杀菌冷却后的豆乳装入已杀菌的酸奶瓶中→接种→封口→主发酵→成熟→成品。

1.3.3 豆豉的制作(淡豆豉)

鲁黑豆 2 号→去杂→干蒸→湿蒸→摊凉→接种→制曲→洗曲→发酵→干燥→成品。

1.3.4 样品检测的前处理

(1)称取粉碎混匀的原料豆、原料熟豆与豆豉各 1g, 于 50 mL 容量瓶中, 加少量体积分数为 80% 的甲醇摇匀后, 定容至 50 mL, 超声波振荡提取 45 min, 4000 r/min 离心过滤, 将上清液转入 HPLC 专用小瓶中盖口, 4℃ 保存, 待上机测定。

(2)将豆乳与发酵酸豆乳真空浓缩干燥后, 取 1g 干燥样品, 按 1.3.4 节(1)方法制备样品后保存, 待上机测定。

1.3.5 采用 HPLC 测定 D、G、De、Ge 含量

色谱条件: 色谱柱为 Nova-ParkC<sub>18</sub>3.9×150 mm 5μm(Waters 公司);

流动相: V(MeOH): V(0.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) = 48:52 (测定游离型异黄酮所用的流动相条件); V(MeOH): V(0.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) = 30:70 (测定糖苷型异黄酮所用的流动相条件);

柱温 25℃; 流速 0.7 mL/min; 检测波长 260 nm。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮提取方法的改进

2.1.1 利用超声波技术提高提取率

利用超声波产生的强烈振动, 极高的加速度, 强烈的空化效应, 以及搅拌作用等, 都可加速有效成分进入溶剂, 从而提高提取率, 缩短提取时间, 而且避免了高温对有效成分的影响。本研究利用超声波进行提取处理比

传统的室温静置提取大大缩短了提取时间, 结果见表 1。

表 1 室温静置法与超声波法提取大豆

		异黄酮的比较				μg/g(干基)
提取方式		D	G	De	Ge	总量
室温静置	120	380.1	497.2	nd	nd	877.3
	180	491.3	583.1	12.1	10.7	1097.2
	240	530.9	662.1	17.9	11.5	1222.4
超声波	25	470.1	530.8	10.3	nd	1011.2
	35	536.7	660.1	18.7	10.9	1226.4
	45	537.1	660.9	18.9	11.2	1228.1

由表 1 可知, 室温静置 120 min 提取的异黄酮量只有 877.3 μg/g, 而利用超声波, 仅 25 min 就达 1011.2 μg/g, 超声波提取 45 min 所得的量(1228.1 μg/g)与室温静置 4 h 所得量(1222.4 μg/g)基本相等。

2.1.2 采用体积分数为 80% 的甲醇水溶液作提取液

由表 2 可知, 利用无水甲醇作提取液, 其提取量较低, 测得的 D + G + De + Ge 为 1093.3 μg/g, De、Ge 均未检出; 而利用 80% 甲醇作提取液测得的 D + G + De + Ge 为 1228.1 μg/g, De 检出量为 18.9 μg/g, Ge 检出量为 11.2 μg/g。分析其原因可能是无水甲醇的极性太单调, 不利于多种大豆异黄酮成分的溶出, 苷元的极性大于苷的极性, 所以 80% 的甲醇液提取的苷元量也多。

表 2 利用 80% 甲醇与 100% 甲醇提取大豆异

		黄酮的比较				μg/g(干基)
提取方式		D	G	De	Ge	总量
80% 甲醇超声波						
提取 45 min		537.1	660.9	18.9	11.2	1228.1
100% 甲醇超声波						
提取 45 min		488.1	605.2	nd	nd	1093.3

2.2 发酵处理对样品中异黄酮组分及其含量的影响

品种、产地、贮存时间等因素对大豆异黄酮的含量影响相当明显<sup>[8]</sup>, 因此必须选用同一品种同一批次的原料, 否则无法说明问题。本研究选用 2000 年秋季收获的鲁黑豆 2 号作为试验材料。

## 2.2.1 发酵处理前后各组分含量变化对比

由表3的检测结果以及从图1、图2可以看出,发酵处理可明显改变大豆制品中的异黄酮的组分,如经过发酵处理的豆豉中黄豆苷元(De)、染料木黄酮(Ge)的含量比原料熟黑豆的含量明显增加,De + Ge/D + G 竟高达20倍,而D、G的含量明显降低;经过发酵得到的酸豆乳中黄豆苷元(De)、染料木黄酮(Ge)的含量比对照豆乳的含量明显增加,De + Ge/D + G 也高达19倍,普通豆乳中的Ge未检出,而在发酵酸豆乳中竟高达507.3  $\mu\text{g/g}$ ,而D、G的含量也明显降低。

表3 发酵处理对大豆异黄酮含量的影响

样品名称	组分变化的影响 $\mu\text{g/g}$ (干基)				
	D	G	De	Ge	总量
原料黑豆	537.7	662.5	18.0	11.1	1229.3
蒸熟黑豆	778.2	901.7	19.1	17.2	1716.2
淡豆豉	30.9	28.3	451.3	733.9	1244.4
豆乳	357.8	527.2	11.3	nd	896.3
发酵酸豆乳	23.1	21.6	338.1	507.3	890.1

由表3的检测结果与图1、图2还可以看出,发酵基本上不改变大豆制品中的异黄酮的总含量(D + G + De + Ge)。如发酵前豆乳中的异黄酮的总含量为896.3  $\mu\text{g/g}$ ,发酵后酸豆乳中的异黄酮的总含量为890.1  $\mu\text{g/g}$ ,二者的含量基本相等;在原料熟黑豆与豆豉的比较中发现,发酵后的豆豉中异黄酮的总含量为1244.4  $\mu\text{g/g}$ ,原料熟黑豆中的总含量为1716.2  $\mu\text{g/g}$ ,发酵后的豆豉中异黄酮的总含量要略低于原料熟黑豆的总含量,这可能是豆豉在制作工艺中流失了一部分异黄

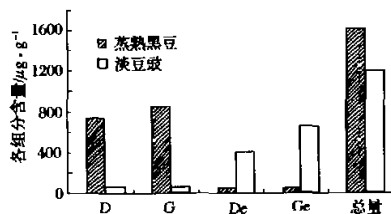


图1 淡豆豉与对照品蒸熟黑豆D、G、De、Ge的含量比较

酮的缘故。

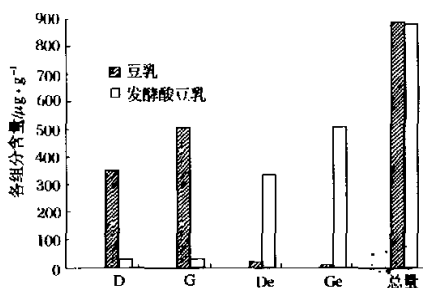
2.2.2 糖苷型异黄酮在 $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用下水解为游离型异黄酮

图2 发酵酸豆乳与对照品豆乳D、G、De、Ge的含量比较

在豆豉的发酵过程中,除了添加曲霉菌外,还有许多自然菌种参加发酵,在发酵过程中会产生一定量的 $\beta$ -葡萄糖苷酶。糖苷型异黄酮是由游离型异黄酮与一分子的葡萄糖以7-位氧苷键结合的产物, $\beta$ -葡萄糖苷酶可作用于糖苷型异黄酮分子中的氧苷键,使其葡萄糖基团脱掉,供微生物代谢利用,从而使糖苷型异黄酮转化为游离型异黄酮,即使糖苷转化为苷元的形式。同样发酵酸豆乳在发酵过程中,保加利亚乳杆菌与嗜热乳杆菌也会产生一定量的 $\beta$ -葡萄糖苷酶,从而使糖苷型异黄酮转化为游离型异黄酮。

## 2.3 选用汽蒸法避免异黄酮的流失

对大豆的蒸煮是豆豉加工工艺中关键而又必需的一步,目的是使大豆组织软化,蛋白质适度变性,以利于酶的分解,同时也可杀灭杂菌,提高发酵的安全性。此步操作有2种方法,以湖南浏阳豆豉为代表的采用的是汽蒸法,以山东临沂豆豉为代表的采用的是水煮方法。浸泡与水煮可使异黄酮流失,如在丹贝生产中,水煮使异黄酮流失大约39%,浸泡可使异黄酮流失大约10%<sup>[9]</sup>。为避免大豆异黄酮的流失,本试验特采用汽蒸方法,而且使浸泡用水尽量少,以水刚好没过豆为准,浸泡结束,水分大部分进入大豆组织中,可有效的避免异黄酮的流失。

## 2.4 采用热处理使部分丙二酰基糖苷型异黄酮转化为相应的糖苷型异黄酮

由表3可知,大豆原料蒸煮前D+G+De+Ge的含量为1229.3  $\mu\text{g/g}$ ,蒸煮后D+G+De+Ge的含量增加到1716.2  $\mu\text{g/g}$ ,增加了486.9  $\mu\text{g/g}$ 。究其原因,可能是内二酰基糖苷型异黄酮转化为相应的糖苷型异黄酮。因为丙二酰基(malonyl)糖苷型异黄酮具有对热不稳定性,80℃可完全水解为相应的乙酰基(acetyl)糖苷型异黄酮或相应的糖苷型异黄酮<sup>[10]</sup>。由于缺少MD、MG标准品,无法直接分析样品中的MD、MG的变化,但是可以通过样品蒸煮前后D+G+De+Ge的变化来判断样品中的MD、MG的变化,D+G+De+Ge的增加推理是MD、MG分解的结果。

## 3 结 论

本研究通过对豆豉与发酵酸豆乳的研究发现,发酵处理基本上不改变大豆异黄酮的总含量,但游离型大豆异黄酮的含量明显提高,糖苷型大豆异黄酮的含量明显降低,糖苷型大豆异黄酮在 $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用下部分转化为游离型大豆异黄酮。由于游离型大豆异黄酮的生物活性比糖苷型大豆异黄酮要高,说明发酵可使糖苷型大豆异黄酮转化为游离型大豆异黄酮,大大提高了大豆发酵食

品的功能保健性,因此发酵处理对于提高大豆制品中高生物活性的功能成分是一种十分有效的工艺技术。

但是大豆异黄酮化合物与豆制品的不愉快风味如苦味、收敛性、干涩等感觉有关,而且游离型大豆异黄酮比糖苷型大豆异黄酮具有的不愉快风味更强。所以如何获得感官指标与口感良好且又富含高生物活性的功能性成分的大豆食品是我们工作中面临的另一研究课题。

## 参 考 文 献

- 1 Kudou S, Fleury Y, Welte D et al. J. Agri. Biol. Chem., 1991, 55: 2227~2233
- 2 Naim M, Gestetner B, Bondi A et al. J. Agri. Food Chem., 1976, 24: 1174~1177
- 3 史林娜, 苏宜香. 营养学报, 2000, 22(2): 113~118
- 4 闫祥华, 顾景范, 孙存普. 生理科学进展, 1997, 28(4), 362~364
- 5 Murakami H et al. Agri. and Biolo. Chem., 1984, 48: 2971~2975
- 6 Naim M, Gestetner B, Zilkah S et al. J. Agri. Food Chem., 1974, 22: 806~810
- 7 郭孝武. 中草药, 1993, 24(10): 548~549
- 8 孙君明, 丁安林. 中国粮油学报, 1998, 13(2): 10~13
- 9 Wang H J, Murphy P A. J. Agric. Food Chem., 1996, 44: 2377~2383
- 10 Wang H J, Murphy P A. J. Agric. Food Chem., 1994, 42: 1666~1673

## The Effects of Fermentation Process on Total Content and Type of Isoflavones in Soybean Food

Zhang Bingwen<sup>1</sup> Song Yongsheng<sup>1</sup> Hao Zhenghong<sup>2</sup> Chi Yusen<sup>3</sup>

1(Department of Food Science, Jinan University, Jinan, 250002)

2(Center of Lab., Shandong Academy of Agriculture, Jinan, 250100)

3(College of Life Science, Shandong Teacher's University, Jinan, 250014)

**ABSTRACT** Fermentation process had little effect on the total content of soybean isoflavones(D+G+De+Ge) in soybean food, but substantially effect on the type of soybean isoflavones. Fermentation process led to soybean isoflavones glycoside hydrolyzing into isoflavones aglycon by  $\beta$ -glucosidase. As a result, the content of soybean isoflavones aglycon was increased and the content of isoflavones glycoside was reduced.

**Key words** soybean, isoflavones glycoside, soybean isoflavones aglycon, fermentation process