

# 东方 Cheese 发酵过程中异黄酮、苷元及组分的研究

李艳<sup>1</sup>, 方慧英<sup>1</sup>, 诸葛斌<sup>1</sup>, 长野宏子<sup>2</sup>, 诸葛健<sup>1</sup>

1(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 工业微生物研究中心, 江苏 无锡, 214122)

2(日本岐阜大学教育学部, 日本岐阜市柳戸 1-1)

**摘 要** 东方 Cheese 经毛霉发酵能去除某些过敏源, 这种无盐制品深受日本民众欢迎。文中通过正交试验优化了东方 Cheese 中异黄酮的提取条件。采用了三波长二标样法和 HPLC 测定异黄酮含量和组成。检测了东方 Cheese 发酵过程中异黄酮含量及组成的变化: 异黄酮的总量降低了 37.90%; 其中糖苷由 34.02  $\mu\text{g/mL}$  降至 3.11  $\mu\text{g/mL}$  (即已有 90.86% 糖苷转化为苷元), 苷元含量则相应的由 0.97  $\mu\text{g/mL}$  升至 18.62  $\mu\text{g/mL}$ 。认为异黄酮总量降低以及组成变化的主要因素是糖苷到苷元分子质量的降低和样品含水量提高; 发酵后限制组成变化的主要因素是底物浓度的降低。

**关键词** 异黄酮,  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 高效液相色谱法 (HPLC), 3 波长 2 标样法

异黄酮是大豆生长中形成的一类次生代谢产物, 为多酚类混合物<sup>[1]</sup>, 其化学结构的基本骨架为 3-苯基苯并二氢呋喃<sup>[2]</sup>。具有弱雌激素、抗氧化、抗溶血和抗真菌活性等生理功能, 还能有效预防或抑制白血病、骨质疏松、癌症和妇女更年期综合症等多种疾病<sup>[3-5]</sup>。

由腐乳生产工艺可知, 发酵是腐乳生产的重要部分, 酶在发酵过程中起着至关重要的作用。 $\beta$ -葡萄糖苷酶是雅致放射毛霉生长过程中分泌的一种酶, 它能水解糖苷转化为苷元。豆腐中  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性相对较低, 前期发酵中酶活有显著增加, 后期发酵中酶活受 NaCl 的抑制快速失活。腐乳发酵过程中异黄酮组成的变化亦证明, 糖苷到苷元的转化主要在前期发酵, 后期发酵过程中异黄酮组成总体变化趋于平缓。腐乳发酵过程中异黄酮的研究较多, 一般重点在后期发酵; 对前期发酵中异黄酮较为系统的研究却少见报导。

腐乳是我国的传统大豆发酵食品, 具有多种生物活性物质, 异黄酮就是其中一种。腐乳的进一步发展面临着: 生产的周期过长; 含盐量过高, 可引发各类心血管病, 与近年国际上提倡的食品低盐化相抵触; 包装多采用瓶、罐装, 单一不便捷等问题。

东方 Cheese 是在传统腐乳前期发酵结束后, 进行烘焙处理而成的一种新型食品。东方 Cheese 发酵周期仅为 2 天远低于普通腐乳的 40~60 d。其制作过程没有加入食盐, 解决了腐乳含盐量高的问题。经

毛霉发酵去除了某些过敏源, 可以让一些对大豆蛋白过敏的群众安全食用。经烘焙处理含水量大幅降低、外形的可塑性强, 为采用快捷新颖的包装提供了可能性。食用时, 可以配以多种酱类, 口味更丰富。为大豆发酵食品的开发提供了新的视角, 将会成为一种倍受欢迎新型食品。本文则重点研究东方 Cheese 发酵过程 (即腐乳前期发酵过程) 中异黄酮的含量及组成变化, 分析了其主要影响因素。用数据证明了, 东方 Cheese 完成了异黄酮的主要发酵过程, 进一步证实了东方 Cheese 作为新型大豆发酵制品的优越性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料和仪器

#### 1.1.1 主要材料

菌种: *Actinomucor elegans* (雅致放射毛霉, 本实验室分离、保藏)。

材料: 异黄酮标准品 (色谱纯, 南京苏朗), 甲醇 (色谱纯), 微孔有机滤膜 (孔径 0.22  $\mu\text{m}$ ), 豆腐 (市购), 其余试剂为分析纯。

#### 1.1.2 主要仪器

高效液相色谱仪 (型号 Alltech 426 HPLC Pump, 美国奥泰科技中国有限公司), 紫外检测 (型号 Uvis200 LTNEAR, 展亨科技香港有限公司), 色谱柱 (Alltima C18 (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 南京昕航科学仪器有限公司); 超声波细胞破碎机 (型号 JY96-II, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 微波炉 (型号 PJ23C-SC1, 美的微波炉有限公司)。

### 1.2 样品提取方法优化

第一作者: 硕士研究生 (方慧英副教授为通讯作者)。

收稿日期: 2008-04-25, 改回日期: 2008-08-19

表 1 正交实验表头设计

	料液比 A	微波处理 B(s)	甲醇浓度 C(%)	提取温度 D(℃)	提取时间 E(h)	浸提次数 F(次)	超声处理 G(min)
1	1 : 10	0	85	50	1	1	5
2	1.5 : 10	15	80	55	1.5	2	10
3	1 : 5	30	75	60			
4	1 : 4	45	70	65			

试验设计参见表  $L_{16}(4^4 \times 2^3)$ 。

参照表 1,取样品,按比例加入甲醇溶液,振荡摇匀。超声波破碎处理,低档微波加热,恒温水浴。冷却后,3 000 r/min 离心 5 min,通过三波长二标样法测定异黄酮总含量。

1.3 异黄酮测定方法的确定

1.3.1 三波长二标样方法的确定

取样品提取液 400  $\mu$ L $\times$ 7,经薄层层析进一步分离,分别回收异黄酮和杂质。以 80% 甲醇溶液为参照,200~360 nm 紫外扫描异黄酮和杂质。比较分析异黄酮和杂质紫外吸收光谱图,确定检测三波长。

HPLC 测定样品中异黄酮的组成,根据组成生物活性、含量比例选择二标准品。

1.3.2 高效液相色谱测定方法

高效液相色谱测定条件:色谱柱 Alltima C18 (250 $\times$ 4.6 mm,5 $\mu$ m),柱温 25℃,洗脱液 V(甲醇):V(水):V(冰醋酸)为 45:55:0.5,流速为 1.0 mL/min,紫外检测波长为 254 nm。

1.4  $\beta$ -葡萄糖苷酶活的测定

取 0.5 mL 的酶液,加入 1% 的水杨苷溶液(溶剂为 pH4.6 的 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液),55℃ 水浴 30 min,沸水浴 5 min 终止反应,测定反应液中葡萄糖含量,计算即得酶活<sup>[6]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 样品提取方法优化

本研究采用溶剂(甲醇)萃取法,与超声波和微波提取法相结合的方法。正交优化样品提取方法,具体试验结果如下:

结果表明, $A_1B_3C_3D_3E_2F_1G_2$  是较优的水平组合。即在料液比 1 : 10、低火微波 30 s、75% 甲醇、60℃ 水浴 1.5 h、浸提 1 次、超声处理 10 min 的条件下,异黄酮提取率最大。影响从大到小以次为:料液比、微波时间、甲醇浓度、提取温度、提取时间、浸提次数和超声时间。

表 2 正交实验结果(单位: $\mu$ g/mL)

编号	A	B	C	D	E	F	G
$K_1$	149.16	118.48	118.08	115.30	248.05	226.08	231.74
$K_2$	141.86	119.12	296.30	115.59	224.27	246.23	240.57
$K_3$	102.90	126.03	126.84	127.53			
$K_4$	78.40	108.69	114.80	113.88			
$k_1$	37.29	29.62	29.52	28.83	31.00	28.26	28.97
$k_2$	35.47	29.78	28.15	28.90	28.03	30.78	30.07
$k_3$	25.73	31.51	31.71	31.88			
$k_4$	19.60	27.17	28.70	28.47			
极差 R	17.69	4.34	3.56	3.41	2.97	2.52	1.10

2.2 三波长二标样测定方法的确定

2.2.1 三波长的确定

三波长法可以最大限度地消除异黄酮提取液中其他杂质的干扰,更适合快速地测定异黄酮的含量。该方法简便、灵敏,最低检出浓度为 1  $\mu$ g/mL,具有良好的准确性和精密度<sup>[7]</sup>。

比较分析图谱发现:异黄酮紫外曲线上  $A_{260} > (A_{240} + A_{280}) / 2$ ,而杂质紫外曲线上  $A_{260} = (A_{240} +$

$A_{280}) / 2$ (图 1、2)。故可以采用三波长法有效去除杂质的影响。

2.2.2 二标样的确定

腐乳发酵过程中糖苷经  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解转化为游离型苷元,苷元生物活性远高于糖苷;腐乳前酵结束时毛坯中苷元含量已经在 80% 以上<sup>[8]</sup>。故选择大豆苷元或染料木素作为标准参照。统计分析可知,不同发酵时间样品中大豆苷元、染料木素含量比值在

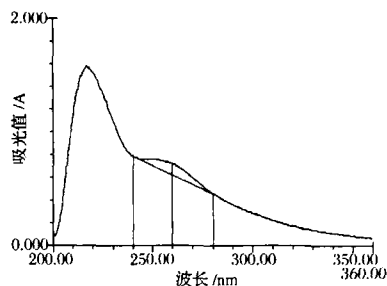


图1 异黄酮紫外扫描图

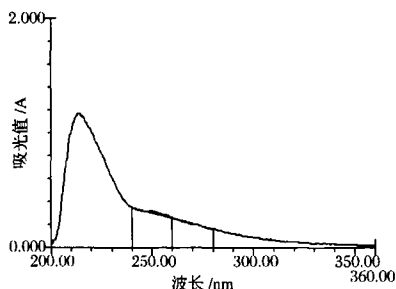


图2 杂质紫外扫描图

1.2左右(图3),故标准参照物为含量比例为1.2:1的大豆苷元和染料木素混合溶液。

## 2.3 东方 Cheese 发酵过程中异黄酮含量及组成的变化

### 2.3.1 东方 Cheese 发酵过程中异黄酮含量的变化

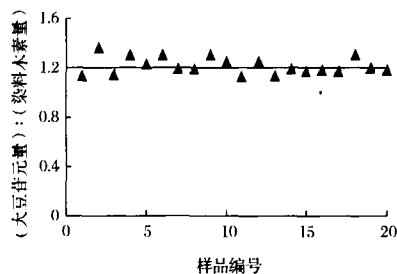


图3 样品中大豆苷元含量和染料木含量比例

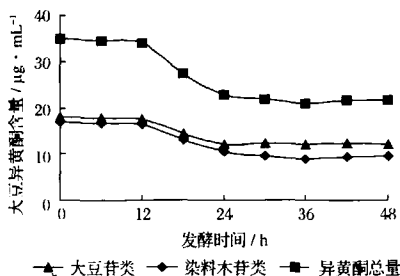


图4 异黄酮含量变化

东方 Cheese 发酵过程中,异黄酮含量呈明显下降趋势,由  $34.99 \mu\text{g/mL}$  降至  $21.73 \mu\text{g/mL}$ ,下降了 37.90%;其中大豆苷类(大豆苷、大豆苷元)含量由

$18.07 \mu\text{g/mL}$  降至  $12.10 \mu\text{g/mL}$ 、染料木苷类(染料木苷与染料木素)含量由  $16.92 \mu\text{g/mL}$  降至  $9.63 \mu\text{g/mL}$ ,分别下降了 33.04%、43.09%(图4)。12~24 h 期间异黄酮含量下降最为显著,由  $34.07 \mu\text{g/mL}$  降至  $22.76 \mu\text{g/mL}$ ,占整个发酵过程下降幅度的 85.31%。

异黄酮含量下降原因可能是(1)糖苷到苷元相对分子质量的减小:大豆苷( $M$  为 416.38)到大豆苷元( $M$  为 254.23);染料木苷( $M$  为 432.38)到染料木素( $M$  为 270.23),相对分子质量分别降低了 38.94%和 37.50%;(2)发酵过程中样品含水量的提高:样品含水量 0h 为 83.89%、48h 为 86.66%,样品含水量提高了 2.77%。

### 2.3.2 东方 Cheese 发酵过程中异黄酮组成的变化

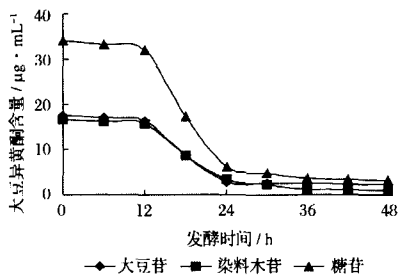


图5 糖苷含量变化

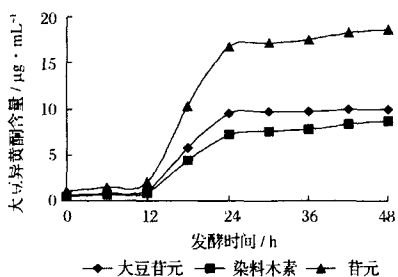


图6 苷元含量变化

东方 Cheese 发酵过程中,经  $\beta$ -葡萄糖苷酶的水解作用,糖苷含量由  $34.02 \mu\text{g/mL}$  降至  $3.11 \mu\text{g/mL}$ ,下降了 90.86%(即 90.86%的糖苷水解转化为苷元);其中大豆苷含量由  $17.54 \mu\text{g/mL}$  降至  $2.20 \mu\text{g/mL}$ ,染料木苷含量由  $16.48 \mu\text{g/mL}$  降至  $0.90 \mu\text{g/mL}$ ,分别下降了 87.46%、94.54%。12~24h 期间糖苷含量下降趋势最为明显,由  $32.03 \mu\text{g/mL}$  降至  $6.06 \mu\text{g/mL}$ ,占整个发酵过程下降幅度的 84.03%;其中大豆苷含量由  $16.42 \mu\text{g/mL}$  降至  $2.70 \mu\text{g/mL}$ ,染料木苷含量由  $15.62 \mu\text{g/mL}$  降至  $3.37 \mu\text{g/mL}$ (图5)。

东方 Cheese 发酵过程中,糖苷经  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解作用生成苷元,故苷元含量较糖苷呈明显上升趋势,苷元含量由  $0.97 \mu\text{g/mL}$  升至  $18.62 \mu\text{g/mL}$ ,提高了 18.20 倍;其中大豆苷元含量由  $0.53 \mu\text{g/mL}$  升至  $9.89 \mu\text{g/mL}$ ,染料木素含量由  $0.44 \mu\text{g/mL}$  升至  $8.73 \mu\text{g/mL}$ ,分别提高了 17.66 倍、18.84 倍。12~24 h 期间苷元含量上升趋势亦最为显著,苷元含量由  $2.04 \mu\text{g/mL}$  升至  $16.70 \mu\text{g/mL}$ ,占整个发酵过程上升幅度的 83.07%;其中大豆苷元含量由  $1.11 \mu\text{g/mL}$  升至  $9.47 \mu\text{g/mL}$ ,染料木素含量由  $0.93 \mu\text{g/mL}$  升至  $7.23 \mu\text{g/mL}$ (图 6)。

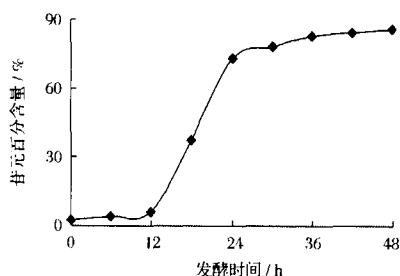
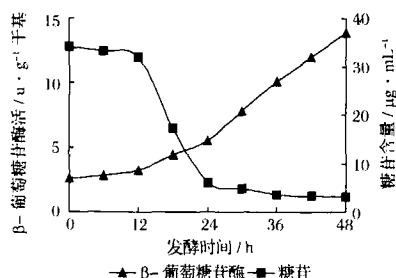


图7 苷元百分含量变化

图8  $\beta$ -葡萄糖苷酶活及糖苷含量变化

$\beta$ -葡萄糖苷酶的水解作用下,糖苷到苷元的转化,提高了苷元的含量,同时也降低了异黄酮的总含量。故在东方 Cheese 发酵过程中苷元百分含量(苷元含量和异黄酮总量的比值)递增趋势更为显著。样品中苷元百分含量 0 h 时仅为 2.77%,24 h 时为 73.37%,48 h 时已高达 85.69%(图 7)。

#### 2.4 东方 Cheese 发酵过程中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活的变化

东方 Cheese 发酵过程中, $\beta$ -葡萄糖苷酶活性呈递增趋势。0~12 h 期间  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性最弱为  $2.60 \sim 3.25 \text{ U/g}$  干物质,12~24 h 期间酶活性较强为  $3.25 \sim 5.49 \text{ U/g}$  干物质,24~48 h 期间酶活性明显最强为  $5.49 \sim 13.87 \text{ U/g}$  干物质(图 8)。

比较分析东方 Cheese 发酵过程中糖苷含量、 $\beta$ -

葡萄糖苷酶活的变化趋势(图 8)。很明显,0~48 h 期间底物糖苷含量逐渐降低,0~48 h 期间  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性呈提高趋势。而 0~12 h 期间、24~48 h 期间糖苷转化率却远低于 12~24 h 期间。认为限制 0~12 h 期间糖苷转化率的主要因素是酶活较低;限制 24~48 h 期间糖苷转化率的主要因素是底物浓度较低。

#### 4 结果与讨论

东方 Cheese 发酵过程中,异黄酮含量由  $34.99 \mu\text{g/mL}$  下降到  $21.73 \mu\text{g/mL}$ ,下降了 37.90%。其中 90.89% 糖苷已水解转化为苷元;苷元的含量提高更为显著由 2.77% 升至 85.69%。分析各组分变化趋势认为,0~12 h 期间酶活较低限制了糖苷转化率;24~28 h 期间底物浓度降低限制了糖苷转化率。12~24 h 期间酶活、底物浓度均较高,故糖苷转化率较高。故发酵过程中异黄酮总量、糖苷和苷元含量的变化在 12~24 h 期间更为显著。

东方 Cheese 是在腐乳前期发酵结束后烘焙而成的一种新型大豆发酵食品。其发酵周期仅为 2 天远低于普通腐乳的 40~60 d,却完成了 90.86% 糖苷到苷元的转化。其制作过程没有加入食盐,解决了腐乳含盐量高的问题;亦能使其走出佐餐、调味品的限制,市场潜力更大。经烘焙处理含水量大幅降低、外形的可塑性强,为采用快捷新颖的包装提供了可能性。食用时,可以配以多种酱类,口味更丰富。为大豆发酵食品的开发提供了新的视角,将会成为一种倍受欢迎的新型食品。

#### 参考文献

- 1 蒋蔡滨. 关于大豆异黄酮的研究综述[J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(1): 49~51
- 2 姚守珍, 王伊萍. 植物雌激素: 大豆异黄酮的研究进展[J]. 国外医学妇幼保健分册, 2005, 16(5): 315~317
- 3 闫作梅, 顾雪峰, 韩俊. 大豆异黄酮的功能和开发前景的研究进展[J]. 大豆通报, 2006, 1: 34~36
- 4 李玉珍, 林亲录, 肖怀秋等. 大豆异黄酮的功能特性研究进展[J]. 中国食物与营养, 2005, 10: 21~22
- 5 田璐, 韩峰. 大豆异黄酮研究概况[J]. 大豆通报, 2004, 2: 20~21
- 6 李华, 高丽.  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J]. 食品与生物学报, 2007, 2: 107~114
- 7 高荣海, 李长彪, 孟宪文等. 大豆异黄酮分离及其检测方法的研究进展[J]. 中国调味品, 2006, 7: 4~8

8 Yin Li-Jun, Li Li-Te, Li Zai-Gui, et al. Changes in isoflavone contents and composition of sufu (fermented tofu)

during manufacturing[J]. Food Chemistry, 2004, 87: 587~592

## The Study of Isoflavone , Aglycones and Composition of Eastern Cheese in the Fermentation

Li Yan<sup>1</sup>, Fang Huiying<sup>1</sup>, Zhuge Bin, Nagano Hiroko<sup>2</sup>, Zhuge Jian<sup>1</sup>

1(Key Lab of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, the Research Center of Industry Microorganism, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(the Ministry of Education of Japan Gifu University, Liu Edo 1-1, Gifu, Japan)

**ABSTRACT** Eastern Cheese can remove certain allergic source after the fermentation by mucor, This kind of non-NaCl product was welkl accepted in Japan. In this paper, the orthogonal tests on the extraction conditions were optimied. The method of three wave lengths of two standard samples and the HPLC method were used to determine the content and composition of isoflavone, Changes in the content and composition of isoflavone during the fermentation process of Eastern Cheese were; the content and composition of isoflavone during the fermentation process of Eastern total quantity of isoflavone reduced 37.90%, the content of glucosides dropped from 34.02 $\mu\text{g/mL}$  to 3.11  $\mu\text{g/mL}$  (it indicated that 90.86% of glucsides transformed into aglycones), corresponding the content of aglycones climbed from 0.97 $\mu\text{g/mL}$  to 18.62  $\mu\text{g/mL}$ . It was determined that the reduction of their relative molecular weight and the enhancement of the content of water were the factors contributing to the reduction of the total quantity of isoflavone. The reduction of the content of substrate was the main factor which limited the change of the composition of isoflavone during the latter fermentation process.

**Key words** isoflavone,  $\beta$ -glucosidase enzyme, HPLC, the method of three wavelengths of two samples

信息窗

### 南开大学研制出生物环保新材料

南开大学研制的环保高分子材料  $\gamma$ -聚谷氨酸将在这些领域大显身手。该高新技术成果在食品、化妆品、医药、环保、农业和水处理等八大领域具有广泛应用前景。

据南开大学环境微生物与微生物催化室研究人员介绍,通过微生物方法合成的环保材料  $\gamma$ -聚谷氨酸,具有优良的水溶性和吸附性,吸水量最高可达4000倍。该材料不仅可降解,而且对人体和环境无毒害,可直接接触皮肤也可食用。

由该材料进一步加工而成的高、低端产品均具有广泛应用价值,辐射八大产业。如:其低端产品可用于农田保湿、沙漠治理,强大的吸水性可帮助植物有效固沙,提高存活率;高端产品可用于药物缓释剂、手术用止血剂、食品加工增稠剂、化妆品抗衰老抑制制、保湿剂等生产。该项目已列入2009年天津市科技支撑计划重点项目。

### 我国科学家在香菇育种新技术及新品种选育上取得突破

香菇产量占世界总产70%的中国,已在香菇育种新技术及新品种选育上取得突破。上海市农业科学院,以其为第一完成单位的《香菇育种新技术的建立与新品种的选育》项目整合了国内香菇遗传育种研究的技术优势,针对中国栽培香菇区域性广和菌种需求多样化的特点,选育出10个适合不同栽培模式和不同环境条件的香菇菌种,并已辐射到全国香菇的主产区。

由于这些新选育出的香菇菌种具有高产、优质和适应性广的特点,已成为中国的香菇主栽品种,覆盖率达70%以上,累积推广了130多亿袋,产值达到280多亿元,其中近3年产值为110多亿元,利润超50亿元。与此同时,项目组在香菇野生种质资源评价、香菇遗传规律研究、香菇菌种特异性分子标记的研发等方面也进行了较为系统深入的研究,其成果全面提升了中国的香菇育种技术水平,确立了中国在这一领域中的国际领先地位。