

# 永川豆豉传统发酵过程中的大豆异黄酮变化

索化夷<sup>1,2</sup>, 蹇宇<sup>1,3</sup>, 卢露<sup>1,2</sup>, 阚健全<sup>1,2,\*</sup>

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715;

3. 重庆教育学院生物与化学工程系, 重庆 400067)

**摘要:** 为了探明永川豆豉在传统发酵过程中大豆异黄酮总含量和构成变化, 采用高效液相色谱技术对永川豆豉传统发酵过程中大豆异黄酮总量和构成进行测定。结果表明: 永川豆豉在发酵加工过程中大豆异黄酮总含量由发酵起始的 3117mg/kg 下降到豆豉成熟时的 1754mg/kg; 大豆异黄酮构成变化显著, 游离苷元型大豆异黄酮含量迅速增加由发酵起始的 3.2% 上升到豆豉成熟时的 95.7%, 同时结合糖苷型大豆异黄酮含量迅速降低。

**关键词:** 永川豆豉; 大豆异黄酮; 苷元型异黄酮; 糖苷型异黄酮

## Change in Soybean Isoflavone of Yongchuan Douchi at Different Stages during Traditional Fermentation

SUO Hua-yi<sup>1,2</sup>, QIAN Yu<sup>1,3</sup>, LU Lu<sup>1,2</sup>, KAN Jian-quan<sup>1,2,\*</sup>

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Engineering Technology Research Center for Characteristic Food of Chongqing, Chongqing 400715, China;

3. Department of Biological and Chemical Engineering, Chongqing Education College, Chongqing 400067, China)

**Abstract:** Soybean isoflavones are a group of important functional components in Douchi such as genistein and daidzein. The content of soybean isoflavone in Yongchuan Douchi during the traditional fermentation process was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) in this study. The results showed that the content of soybean isoflavone revealed a gradual decrease from 3117 to 1754 mg/kg during the fermentation process. The content of aglycone exhibited a dramatic increase from 3.2% to 95.7% while the content of glucosides presented a considerable drop.

**Key words:** Yongchuan Douchi; soybean isoflavone; aglycone; glucosides

中图分类号: TS264.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0270-04

植物雌激素(phytoestrogens)为杂环多酚类化合物, 是一种具有弱雌激素作用的植物成分, 主要包括异黄酮(isoflavone)、木脂素(lignan)和香豆雌酚(coumestrol)3 大类, 其中大豆异黄酮(soybean isoflavone)是非常重要一类食物源植物雌激素。大豆异黄酮是大豆生长中形成的一类次生代谢产物, 包含染料木苷(genistin)、染料木黄(genistein)、黄豆苷(daidzin)和黄豆苷元(daidzein)等 12 种成分<sup>[1-2]</sup>。大豆异黄酮除了可以有效地防治癌症、心血管疾病、抵抗骨质疏松症、妇女更年期综合症、糖尿病等疾病, 还具有抗早老年性痴呆、抗机体免疫力下降、抗菌消炎、抗机体功能衰老、抗溶血等作用, 因而越来越受到人们的重视。

大豆异黄酮分为结合型糖苷(glucosides)(大豆苷、

大豆黄苷及染料木苷等)和游离型苷元(aglycons)(大豆素、大豆黄素及染料木素)两类。天然存在大豆异黄酮有 97%~98% 是以  $\beta$ -葡萄糖苷形式存在, 只有 2%~3% 是以游离型苷元形式存在。结合型的异黄酮在肠道内不能直接吸收, 不具有生物活性, 所以异黄酮的主要活性物质是染料木素和大豆素<sup>[3-6]</sup>。

因此, 将大豆异黄酮糖苷转化为异黄酮苷元具有十分重要的意义<sup>[7-10]</sup>。目前学者主要对大豆异黄酮的生物活性及提取工艺进行研究<sup>[11-13]</sup>, 而在大豆异黄酮中结合型糖苷与游离型苷元两种类型的转化规律研究却很少<sup>[14-16]</sup>。本实验通过对毛霉菌豆豉——永川豆豉在传统发酵过程中大豆异黄酮总量和构成变化情况进行研究, 总结大豆异黄酮总含量与构成变化规律, 为永川豆豉产品开发提供基础。

收稿日期: 2011-06-30

基金项目: 西南大学基本科研业务费专项(XDJK2009C041)

作者简介: 索化夷(1978—), 男, 讲师, 博士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: birget@swu.edu.cn

\* 通信作者: 阚健全(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: ganjq1965@163.com

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

永川传统毛霉型豆豉采自重庆市永川豆豉食品有限公司,其制作工艺为:大豆筛选→浸泡→沥干→蒸煮→冷却→自然发酵制曲→添加辅料→发酵后熟→成品。 $S_1 \sim S_{16}$ 分别代表豆豉样品的不同加工阶段(表1)。

表1 实验样品代号及其代号含义

Table 1 Sampling time points and codes during Douchi fermentation

代号	样品状态	代号	样品状态
$S_1$	原料大豆(东北大豆)	$S_9$	制曲第10天
$S_2$	浸泡4h后大豆	$S_{10}$	后发酵第10天
$S_3$	蒸煮后大豆,制曲第0天	$S_{11}$	后发酵第25天
$S_4$	制曲第2天	$S_{12}$	后发酵第45天
$S_5$	制曲第4天	$S_{13}$	后发酵第75天
$S_6$	制曲第5天	$S_{14}$	后发酵第105天
$S_7$	制曲第7天	$S_{15}$	后发酵第165天
$S_8$	制曲第9天	$S_{16}$	后发酵第225天

大豆苷(daidzin)、黄豆黄苷(glycitin)、染料木苷(genistin)、大豆苷元(daidzein)、黄豆黄素(glycitein)、染料木素(genistein)标准品(纯度 $\geq 98.0\%$ ) 成都曼斯特有限公司;乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯) 成都市科龙化工试剂厂;磷酸(色谱纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司;超纯水。

### 1.2 仪器与设备

LC-10A 高效液相色谱仪(含紫外检测器) 日本岛津公司;Milli-Q 超纯水器 美国 Millipore 公司;ALPAAI-4LSC 真空冷冻干燥机 美国 Christ 公司;超声波清洗器 昆山超声波仪器公司。

### 1.3 样品前处理

参考毛峻琴等<sup>[16]</sup>、黄芸等<sup>[17]</sup>的方法样品经真空冷冻干燥后,用粉碎机将豆豉样品磨粉(过80目筛),称取样品0.5~1g(精确至0.1mg),用30mL 体积分数80%的甲醇溶液溶解,温度40℃、频率40kHz及功率100W 超声抽提20min,以8000r/min 离心15min,收集上清液。再重复以上操作抽提,总共抽提3次。收集总的上清液并用体积分数为80%的甲醇溶液定容到100mL,用0.45 $\mu$ m 有机滤膜过滤,滤液进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, GC-MS)测定。

### 1.4 色谱条件<sup>[18]</sup>

色谱柱:Aglient  $C_{18}$ (4.6mm $\times$ 150mm, 5 $\mu$ m);流动相为乙腈(A)-磷酸溶液(pH3.0);柱温30℃;流速0.8mL/min;进样量10 $\mu$ L;检测波长260nm;梯度洗脱程序见表2。

表2 色谱实验梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution program

时间/min		0	10	23	30	50	55	56	60
流动相	乙腈	12	18	24	30	30	80	12	12
积配比/%	磷酸(pH3.0)	88	82	76	70	70	20	88	88

### 1.5 大豆异黄酮标准曲线方程的建立

称取大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素各4mg,分别置于10mL 容量瓶中,加入体积分数80%的甲醇溶液至接近刻度,超声处理30min,再用体积分数80%的甲醇溶液定容,即为400mg/mL 标准溶液。将以上配制的异黄酮标准溶液用80%的甲醇溶液稀释成质量浓度分别为20、40、60、80、100、120mg/mL 的混合标准溶液。依次进样,以峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标绘制工作曲线,其线性关系及检出限。

### 1.6 大豆异黄酮各组分含量的计算

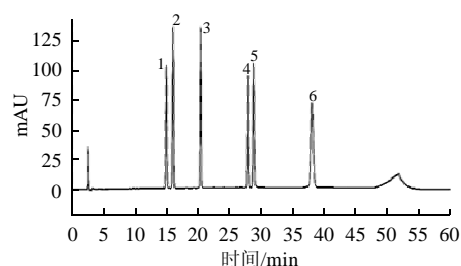
样品中大豆异黄酮各组分的含量分别按式(1)计算:

$$X_i = C_i \times \frac{V}{m} \times \frac{1000}{1000} \quad (1)$$

式中: $X_i$ 为样品中大豆异黄酮单一组分的含量/(mg/kg) 分别从小豆苷( $X_1$ )、黄豆黄苷( $X_2$ )、染料木苷( $X_3$ )、大豆苷元( $X_4$ )、黄豆黄素( $X_5$ )、染料木素( $X_6$ ); $C_i$ 为根据标准曲线得到的大豆异黄酮单一组分的质量浓度/(mg/L); $V$ 为样品稀释液总体积/mL; $m$ 为固体样品质量/g。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆异黄酮标准品的 HPLC 图



1.大豆苷;2.黄豆黄苷;3.染料木苷;4.大豆苷元;5.黄豆黄素;6.染料木素。

图1 大豆异黄酮标准品的 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed soybean isoflavone standards

将大豆异黄酮标准品溶液稀释10倍,经过HPLC 配合紫外检测器测定,依据单一标准样品的保留时间对样品溶液中的组分进行定性,可得大豆异黄酮标准品的

HPLC 图(图 1), 其中异黄酮中的大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素 6 种成分的出现时间分别为 15.029、16.062、20.469、26.997、28.504、38.479min。

## 2.2 大豆异黄酮各组分的线性关系和检出限

经 HPLC 配合紫外检测器测定, 以峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标绘制工作曲线, 其线性关系及检出限结果见表 3。

表 3 回归方程和检出限  
Table 3 Regression equations and detection limits of 6 soybean isoflavones

组分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (mg/L)
大豆苷	$Y = 1.966536 \times 10^{-5}X - 0.1720338$	0.9995	1~120
黄豆黄苷	$Y = 2.838263 \times 10^{-5}X + 0.2080201$	0.9992	1~120
染料木苷	$Y = 1.820025 \times 10^{-5}X + 0.8155345$	0.9999	1~120
大豆苷元	$Y = 1.455644 \times 10^{-5}X - 0.3183206$	0.9999	1~120
黄豆黄素	$Y = 2.396825 \times 10^{-5}X + 0.191702$	0.9997	1~120
染料木素	$Y = 1.251838 \times 10^{-5}X - 1.012567$	0.9999	1~120

## 2.3 样品中的大豆异黄酮总含量

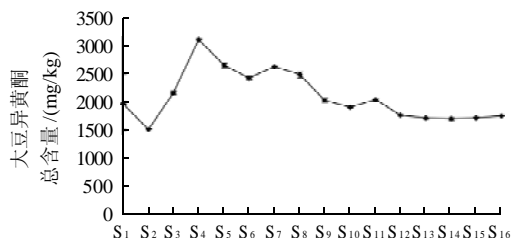


图 2 不同时期毛霉型豆豉中大豆异黄酮总含量变化  
Fig.2 Change in total soybean isoflavone content during Douchi fermentation

如图 2 所示, 干黄豆样品与浸泡样品的异黄酮含量比经蒸煮后的异黄酮总含量迅速增加, 但 Coward 等<sup>[19]</sup>研究表明, 121℃加热 15min 可使异黄酮损失约 20%, 加热可使丙二酰基异黄酮通过脱羧作用转化为乙酰基异黄酮, 或脱酯转化为  $\beta$ -葡萄糖苷型异黄酮。这是由于大豆原料结构致密, 浸泡后虽然膨胀但大豆异黄酮浸出提取效率不高, 但经过蒸煮处理后大豆结构变得松散, 且蒸煮温度未达 121℃, 且短暂制曲更有利于大豆组织结果破坏, 使异黄酮提取率提高, 而并没有明显改变其含量。随后的制曲得进一步进行及后发酵过程中, 异黄酮总含量有下降的趋势, 其中制曲阶段损失了 33%, 后酵阶段损失了 14%, 这与 Wang 等<sup>[4]</sup>研究米曲霉型豆豉的变化趋势相同。

## 2.4 大豆异黄酮各组分含量测定

表 4 大豆异黄酮各组分含量  
Table 4 Change in soybean isoflavone composition during Douchi fermentation

样品代号	大豆苷	黄豆黄苷	染料木苷	大豆苷元	黄豆黄素	染料木素
S1	188.50	62.24	565.62	1.30	51.82	ND
S2	57.88	56.29	297.41	6.30	65.65	ND
S3	613.49	156.88	1208.43	14.23	40.54	ND
S4	957.59	217.16	1808.77	10.93	33.60	ND
S5	544.10	161.59	1271.00	332.32	59.17	291.91
S6	510.92	155.13	633.09	685.15	103.36	354.77
S7	327.67	103.12	850.15	687.41	102.04	563.28
S8	213.49	100.54	663.31	748.50	107.42	654.56
S9	269.10	95.08	686.48	478.59	106.42	726.37
S10	16.08	41.59	295.96	624.79	136.09	791.92
S11	5.42	30.47	218.99	862.93	142.46	778.53
S12	ND	ND	97.69	636.43	152.35	871.70
S13	ND	ND	93.74	655.39	143.93	814.26
S14	ND	ND	88.47	647.20	144.87	812.14
S15	ND	ND	74.08	635.92	150.17	856.29
S16	ND	ND	75.24	649.70	150.03	880.01

注: ND 表示未检出。

样品在制曲及后发酵的各个阶段, 大豆异黄酮各组分含量都在不断变化, 大豆苷、黄豆黄苷分别由制曲初期的原来的 957.59、217.16mg/kg 减少到几乎为 0; 染料木素也由原来的 565.62mg/kg 减少到 75.24mg/kg; 而大豆苷元、黄豆黄素分别由 1.3、51.82mg/kg 增加到 649.70、150.03mg/kg; 染料木素也由最初的未检出增加到 880.01mg/kg。所以可以看出变化的总体趋势为异黄酮大部分由糖苷型转化为苷元型, 这与其他相关报道<sup>[4,10,14]</sup>的结果是一致的。在原料大豆和制曲初始阶段糖苷型异黄酮中, 以染料木苷和大豆苷为主。而成熟豆豉中苷元型异黄酮中, 以染料木素和大豆苷元为主。很多研究表明, 主要起生物活性作用的成分也正是染料木素和大豆苷元。

## 2.5 豆豉中糖苷型和苷元型异黄酮的转化

大豆异黄酮分为结合型糖苷和游离型苷元两类, 因为结合型的异黄酮在肠道内不能被人体直接消化吸收, 不具生物活性, 所以异黄酮的主要活性物质是游离型苷元。大豆异黄酮中糖苷型和苷元型异黄酮含量的构成也是一个很重要的衡量指标。不同时期毛霉型豆豉中糖苷型和苷元型异黄酮含量见图 3。可以看出, 大豆在发酵前和发酵后糖苷型和苷元型异黄酮含量比值相差较大, 在制曲过程中, 苷元型异黄酮含量占总异黄酮含量的比值从 6.1% 增加到 54.9%; 后发酵过程中, 苷元型异黄酮含量占总异黄酮含量的比值从 81.5% 上升到 95.7%, 所以发酵前和发酵后苷元型异黄酮含量总共增加了 89.6%,

这与前人的报道<sup>[4,10,14]</sup>一致,且 daidzein 和 genistein 两种生理活性高的苷元型异黄酮在豆豉中含量丰富。这是因为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,发酵过程中微生物产生  $\beta$ -葡萄糖苷酶作用于糖苷型异黄酮分子中的氧苷键,同时豆豉总酸逐渐提高使其葡萄糖基团脱掉。与其他豆豉相比,永川传统毛霉型豆豉的苷元型异黄酮含量很高,仅次于贵州淡豆豉的 96%,应得到进一步开发利用。浸泡后的样品 2 比样品 1 苷元型异黄酮含量增加了 8.7%,可见浸泡可使大豆中的葡萄糖苷型异黄酮转化为苷元型异黄酮,这主要是由于大豆本身内源性的  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解异黄酮葡萄糖苷作用的结果,这与刘亚琼等<sup>[14]</sup>的研究结果相同。从样品 5 开始,豆豉的苷元型异黄酮含量急剧上升,比样品 4 增加了将近 1 倍,这与豆豉制曲 2d 后,微生物在豆豉上迅速繁殖使得  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性增强有关。

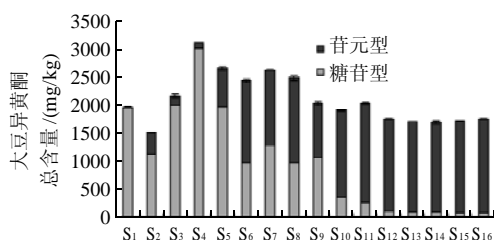


图3 不同时期毛霉型豆豉中糖苷型和苷元型大豆异黄酮总含量

Fig.3 Changes in total contents of glucosides and aglycone in during Douchi fermentation

### 3 结 论

本实验通过对不同时期传统毛霉型豆豉异黄酮含量的测定和成分变化比较分析发现:永川豆豉在传统发酵过程中大豆异黄酮总量会发生较大流失,下降到制曲初期的 57%;在传统发酵过程中永川豆豉大豆异黄酮构成发生根本转变由糖苷型转变为具有生物活性的苷元型,占总量的 95.7%。使豆豉具有更高的保健功效;在原料大豆和制曲初始阶段苷型异黄酮中,以染料木苷和大豆

苷为主。而成熟豆豉中苷元型异黄酮中,以染料木素和大豆苷元为主。

### 参考文献:

- [1] KUDOU S, SHIMOYAMADA M, IMURA T. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), glycitein 7-O- $\beta$ -D-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside[J]. Agric Biol Chem, 1991, 55(3): 859-860.
- [2] KUDOU S, FLEURY Y, WELTI D. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill)[J]. Agric Biol Chem, 1991, 55(9): 2227-2233.
- [3] 张晓红, 于殿宇, 周凤超, 等. 制备大豆异黄酮苷的方法[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 583-585.
- [4] WANG Lijun, YIN Lijun, LI Dong, et al. Influences of processing and NaCl supplementation on isoflavone contents and composition during Douchi manufacturing[J]. Food Chemistry, 2007, 101(3): 1247-1253.
- [5] 黄进, 罗琼, 李晓莉, 等. 大豆异黄酮的降血糖活性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 166-170.
- [6] 杨世军, 张会香, 周怡静. 葛根中异黄酮的提取和纯化工艺研究[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 124-128.
- [7] 高秀芝, 刘慧, 丁雪莲, 等. 大豆异黄酮的研究和应用进展[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 386-392.
- [8] 牛丽颖, 刘敏彦, 王玉峰, 等. 河北产淡豆豉黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 大豆科学, 2009, 28(2): 329-331.
- [9] 曲丽萍, 范国荣, 宓鹤鸣, 等. 反相高效液相制备色谱法分离淡豆豉中的大豆苷、黄豆苷、染料木苷[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(3): 325-326.
- [10] YAMABE S, KOBAYASHI-HATTORI K, KANEKO K, et al. Effect of soybean varieties on the content and composition of isoflavone in rice-koji miso[J]. Food Chemistry, 2007, 100(1): 369-374.
- [11] 张乐. 大豆异黄酮药理作用研究进展[J]. 草业科学, 2007, 24(4): 54-57.
- [12] 李俏俏, 王清路, 薛金艳, 等. 大豆异黄酮对绝经女性血清中脂类物质的影响[J]. 大豆科学, 2009, 28(1): 172-174.
- [13] 杨茂区, 陈伟, 冯磊, 等. 大豆异黄酮的生理功能研究进展[J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 320-324.
- [14] 刘亚琼, 穆慧玲, 赵瑞平, 等. 中国市售豆豉中异黄酮含量及分布比较研究[J]. 食品科技, 2009, 34(4): 20-23.
- [15] 韩锋, 张永忠, 杨学军. 大豆制品中异黄酮各组分含量测定及分析[J]. 大豆通报, 2006, 84(5): 20-23.
- [16] 毛峻琴, 宓鹤鸣, 姜子洋, 等. HPLC 法测定淡豆豉中异黄酮的含量[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(10): 955-957.
- [17] 黄芸, 崔利剑, 窦玉红. 中药淡豆豉异黄酮类化合物的超声循环提取[J]. 精细化工, 2008, 25(3): 231-233; 242.
- [18] 国家质量监督检验检疫局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23788—2009 保健食品中大豆异黄酮的测定方法: 高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [19] COWARD L, SMITH M, KIRK M, et al. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1998, 68(1): 1486-1491.