

# 丹贝发酵过程中大豆异黄酮组分与含量的变化

徐德平<sup>1,2</sup>, 潘福生<sup>1</sup>, 韩福贵<sup>1</sup>, 杨如同<sup>1</sup>, 江汉湖<sup>2</sup>

(1. 江苏省植物研究所, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095)

**摘要:** 用 HPLC 方法检测大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 发酵食品——丹贝的发酵过程中异黄酮各组分含量变化。在发酵的最初 24 h 内, 大部分异黄酮由糖甙转化成甙元, 随着发酵时间的延长转化率逐渐降低, 发酵终产物中异黄酮主要以大豆甙元和染料木素形式存在, 发酵 64 h 的丹贝中总异黄酮摩尔含量比未发酵的大豆高 51.25%。

**关键词:** 丹贝; HPLC; 异黄酮糖甙; 异黄酮甙元

**中图分类号:** Q946.83; S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2001)03-0011-04

**Change of the component and content of soybean isoflavones during Tempe fermentation** XU De-ping<sup>1,2</sup>, PAN Fu-sheng<sup>1</sup>, HAN Fu-gui<sup>1</sup>, YANG Ru-tong<sup>1</sup>, JIANG Han-hu<sup>2</sup> (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(3): 11-14

**Abstract:** Change of the component and content of soybean isoflavones were detected with HPLC during Tempe fermentation process. Within the first 24 h fermentation, most isoflavone glycosides change to aglycones. In end product, the isoflavone in Tempe is mainly consist of daidzein and genistein. The mol concentration of total isoflavones in Tempe is 51.25% more than those in soybean.

**Key words:** Tempe; HPLC; isoflavone glycosides; isoflavone aglycones

丹贝 (Tempe) 是一种大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.] 发酵食品, 原产印度尼西亚, 它比未发酵的大豆具有更强的生物活性, 例如: 抗氧化、抗菌、雌性激素和抗癌活性, 这些活性的增强普遍认为是大豆中异黄酮由糖甙转化成甙元所致。本实验的目的在于测定丹贝发酵过程中异黄酮各组分转变的动态变化, 进一步明确丹贝生物活性增强的机理, 同时为丹贝发酵的工艺优化提供理论依据。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 材料

大豆样品为南京农业大学国家大豆品种改良中心提供的“菜豆 5 号”品种, 丹贝由同批大豆发酵制备, 异黄酮标准品 (daidzein, daidzin, genistein, genistin) 由本实验室分离纯化, 各标准品在 HPLC 分离中表现为单峰, 样品提取用甲醇为分析纯, HPLC 用乙腈为色谱纯, 冰醋酸为化学纯, 分析用水为重蒸水。

### 1.2 仪器

主机 Waters 717 plus Autosampler, 泵 Waters 510

HPLC Plum, 检测器 Waters 486 Tunable Absorbance, 梯度控制器 Waters Automated Gradient Controller Detector, 柱子 ODS 柱 (150mm × 6.0mm ID; 5 $\mu$ m)。

### 1.3 色谱条件

流动相为: A: 0.1% 冰醋酸 + ACN; B: 0.1% 冰醋酸 + 水。梯度洗脱: 50 min 内 A 从 15% 增加到 35%, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 254 nm, 每次进样量为 10  $\mu$ L<sup>[3]</sup>。

### 1.4 标准曲线的建立

精密称取大豆甙元、大豆甙元糖甙、染料木素和染料木素糖甙各 10.00 mg, 用 DMSO 溶解并定容至 5 mL, 再分别吸取 25、50、75、100 和 125  $\mu$ L 定容至 1 mL, 按前述条件建立 4 条标准曲线:

大豆甙元标准曲线:  $Y = 0.08 + 0.57X$ , 相关系数 0.995 4, 检测范围 ( $\mu$ g) 0.06 ~ 14.93

大豆甙元糖甙标准曲线:  $Y = 0.1435 + 0.416X$ , 相关系数 0.997 8, 检测范围 ( $\mu$ g) 0.047 ~ 14.52

收稿日期: 2001-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39470610)

作者简介: 徐德平 (1965-), 男, 安徽宣城人, 博士, 助理研究员, 从事食品资源开发研究。

染料木素标准曲线:  $Y = 0.0324 + 0.638X$ , 相关系数 0.9993, 检测范围( $\mu\text{g}$ )0.025 ~ 14.76

染料木素糖甙标准曲线:  $Y = -0.009 + 0.448X$ , 相关系数 0.9966, 检测范围( $\mu\text{g}$ )0.037 ~ 14.83。

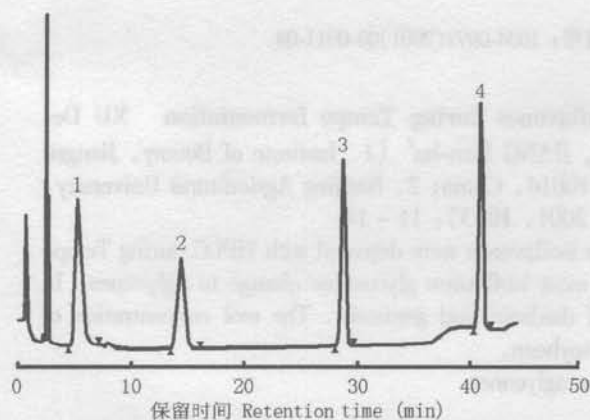
4个标准品的 HPLC 色谱图见图 1。

### 1.5 样品测定

按常规方法制作丹贝, 在接种 RT-3 菌种 16 h 开始取样, 以后每间隔 8 h 取样, 直到 64 h 止, 取样时在同一批发酵产品中随机取 10 个点, 每个点 1 g

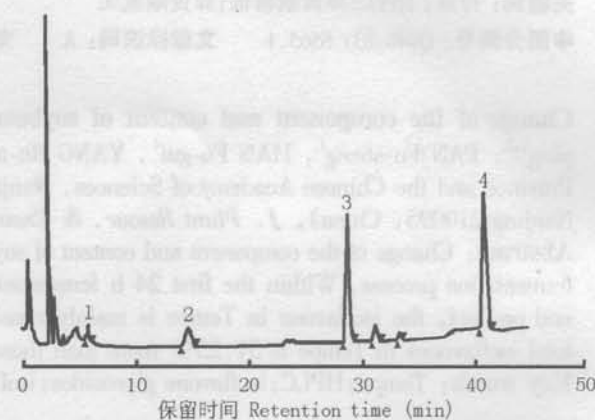
左右, 混匀后置 35℃ 烘干至恒重。大豆磨成细粉后也在相同条件下烘干至恒重。水泡大豆是将大豆加适量水置 25℃ 培养箱中保温 24 h, 取出后于上述条件下烘干。

每样品精确称取 1 g 移入 50 mL 容量瓶中, 加入 80% 甲醇并定容, 置 35℃, 50 r/min 的摇床上提取 12 h, 待澄清后分离取出上清液, 再加入 80% 甲醇至刻度, 反复 3 次, 合并上清液并浓缩定容至 25 mL, 取适量溶液放入 HPLC 专用小瓶中, 按上述色谱条件进行测定, 各样品的 HPLC 色谱图见图 2。



1. 大豆甙元糖甙 daidzin; 2. 染料木素糖甙 genistin;  
3. 大豆甙元 daidzein; 4. 染料木素 genistein

图 1 大豆异黄酮标准品的 HPLC 色谱图  
Fig. 1 HPLC chromatogram of isoflavone standards



1. 大豆甙元糖甙 daidzin; 2. 染料木素糖甙 genistin;  
3. 大豆甙元 daidzein; 4. 染料木素 genistein

图 2 丹贝中异黄酮的 HPLC 色谱图  
Fig. 2 HPLC chromatogram of isoflavones in Tempe

## 2 结果

### 2.1 大豆样品中各异黄酮成分的含量

实验结果表明, 大豆中大豆甙元、染料木素、大豆甙元糖甙和染料木素糖甙含量分别为 0.014, 0.020, 0.365 和 0.968 mg/g (摩尔含量分别为  $0.56 \times 10^{-7}$ ,  $0.74 \times 10^{-7}$ ,  $8.86 \times 10^{-7}$  和  $22.60 \times 10^{-7}$  mol/g), 总异黄酮含量达到 1.367 mg/g (摩尔含量  $32.76 \times 10^{-7}$  mol/g)。

由以上数据可知: 大豆中异黄酮成分主要为大豆甙元糖甙和染料木素糖甙, 占 97.5%, 其中染料木素糖甙占 70.8%, 这与 Eldridge(1982)的研究结果一致<sup>[2]</sup>。

### 2.2 水泡 24 h 后大豆中各异黄酮成分的含量

水泡 24 h 后大豆中大豆甙元、染料木素、大豆甙元糖甙和染料木素糖甙含量分别为 0.021、0.033、

0.310 和 0.929 mg/g (摩尔含量分别为  $0.81 \times 10^{-7}$ 、 $1.21 \times 10^{-7}$ 、 $7.45 \times 10^{-7}$  和  $21.70 \times 10^{-7}$  mol/g), 总异黄酮含量为 1.293 mg/g (摩尔含量为  $31.17 \times 10^{-7}$  mol/g)。

从以上数据可知: 与未经水泡的大豆相比, 经水泡 24 h 后大豆中总的糖甙含量下降 7%, 甙元增加 59%, 而总异黄酮含量仍下降近 5.42%, 异黄酮总量中糖甙占 95.8%, 说明经水泡后, 大豆中各异黄酮成分的比例发生了变化。这一结果与 Matsuura 等(1989)的报道不一致<sup>[3]</sup>, 其原因有待进一步研究。

### 2.3 丹贝发酵过程中异黄酮成分含量变化

2.3.1 丹贝发酵过程中大豆甙元的变化 丹贝发酵过程中, 随着时间的延长, 大豆甙元含量呈上升的趋势, 由表 1 可看出, 在发酵的前 16 h 中, 大豆甙元的摩尔含量由发酵前的  $0.81 \times 10^{-7}$  mol/g 增加到  $10.2 \times 10^{-7}$  mol/g, 是发酵前的 12.6 倍, 在 24 h 增加

到  $12.7 \times 10^{-7}$  mol/g, 发酵终了时大豆甙元摩尔含量达  $20.1 \times 10^{-7}$  mol/g, 是发酵前的 24.8 倍。

表1 丹贝发酵过程中大豆甙元的变化  
Table 1 The change of the content of daidzein during Tempe fermentation

发酵时间 (h) Time of fermentation	含量 Content	
	mg/g	$1 \times 10^{-7}$ mol/g
0	0.021	0.8
16	0.259	10.2
24	0.064	12.7
32	0.069	14.4
40	0.060	15.3
48	0.045	15.1
56	0.423	16.7
64	0.510	20.1

2.3.2 丹贝发酵过程中大豆甙元糖甙的变化 丹贝发酵过程中大豆甙元糖甙的含量随发酵时间的延长而下降, 由表2可以看出, 在发酵的前16h中, 大豆甙元糖甙摩尔含量由  $7.45 \times 10^{-7}$  mol/g 减少到  $4.03 \times 10^{-7}$  mol/g, 下降到原来的54%, 24h减少到  $1.56 \times 10^{-7}$  mol/g, 仅为原来的20.9%, 发酵终了时为  $0.803 \times 10^{-7}$  mol/g, 仅为发酵前的10.8%。

表2 丹贝发酵过程中大豆甙元糖甙的变化  
Table 2 The change of the content of daidzin during Tempe fermentation

发酵时间 (h) Time of fermentation	含量 Content	
	mg/g	$1 \times 10^{-7}$ mol/g
0	0.365	7.45
16	0.307	4.03
24	0.064	1.56
32	0.069	1.67
40	0.060	1.46
48	0.045	1.09
56	0.057	1.37
64	0.033	0.80

2.3.3 丹贝发酵过程中染料木素的变化 丹贝发酵过程中染料木素含量随发酵时间的延长呈增加的趋势(表3), 在发酵16h时, 染料木素摩尔含量由发酵前的  $1.21 \times 10^{-7}$  mol/g 增加到  $14.0 \times 10^{-7}$  mol/g, 是发酵前的11.6倍, 24h增加到  $19.7 \times 10^{-7}$  mol/g, 是发酵前的16.3倍, 发酵终了时达到  $240 \times 10^{-7}$  mol/g, 是发酵前的19.9倍。

2.3.4 丹贝发酵过程中染料木素糖甙的变化 丹贝发酵过程中染料木素糖甙含量随发酵时间的延长而下降, 在发酵16h时, 染料木素糖甙摩尔含量由

发酵前的  $21.7 \times 10^{-7}$  mol/g 减少到  $13.8 \times 10^{-7}$  mol/g, 下降了36.5%, 24h时减少到  $8.79 \times 10^{-7}$  mol/g, 下降到原来的40.5%, 发酵终了时染料木素糖甙含量为  $4.65 \times 10^{-7}$  mol/g, 仅为发酵前的20.5%。

表3 丹贝发酵过程中染料木素的变化  
Table 3 The change of the content of genistein during Tempe fermentation

发酵时间 (h) Time of fermentation	含量 Content	
	mg/g	$1 \times 10^{-7}$ mol/g
0	0.033	1.2
16	0.379	14.0
24	0.533	19.7
32	0.563	20.9
40	0.600	22.2
48	0.601	22.3
56	0.590	21.9
64	0.647	24.0

表4 丹贝发酵过程中染料木素糖甙的变化  
Table 4 The change of the content of genistin during Tempe fermentation

发酵时间 (h) Time of fermentation	含量 Content	
	mg/g	$1 \times 10^{-7}$ mol/g
0	0.929	21.70
16	0.591	13.80
24	0.376	8.79
32	0.329	7.69
40	0.259	6.06
48	0.243	5.68
56	0.237	5.53
64	0.199	4.65

2.3.5 丹贝发酵过程中总异黄酮的变化 丹贝发酵过程中总异黄酮含量呈上升趋势(表5), 其中异黄

表5 丹贝发酵过程中总异黄酮的变化  
Table 5 The change of the content of total isoflavones during Tempe fermentation

发酵时间 (h) Time of fermentation	含量 Content	
	mg/g	$1 \times 10^{-7}$ mol/g
0	1.289	31.17
16	1.395	40.03
24	1.317	42.95
32	1.326	44.66
40	1.309	45.02
48	1.273	44.17
56	1.306	45.50
64	1.389	49.55



酮甙元和糖甙的比例则发生变化,在发酵 16 h 时,总异黄酮中异黄酮甙元的比例由 4.2% 上升到 45.75%,糖甙由 95.8% 下降到 54.25%,24 h 后甙元增加到 75.48%,32 h 上升到 80%,在发酵终止时甙元的比例达 88%。与未发酵的大豆基质相比发酵后的丹贝异黄酮的含量仅上升 0.1 mg/g,而摩尔含量却增加  $18.28 \times 10^{-7}$  mol/g。

### 3 讨论

(1) 大豆异黄酮是大豆生长过程中形成的一类次生代谢产物,迄今为止已从大豆及其制品中分离出 13 种异黄酮,基本结构有 3 种,染料木素、大豆甙元和黄豆素甙元,其中 3 种以  $\beta$ -葡萄糖甙的形式存在,另 6 种分别为葡萄糖上的 C-6 羟基被丙二酰和乙酰基取代,有人推测葡萄糖上的 C-6 乙酰基取代可能是提取过程中丙二酰基异黄酮糖甙脱羧基的降解产物。不同大豆品种中的异黄酮含量在 1.2~4.2 mg/g 之间变化,且主要以葡萄糖甙的形式存在。大豆制品中主要为 3 种甙元和相应的葡萄糖甙,几乎不含乙酰基和丙二酰基异黄酮,大豆发酵制品中以 3 种甙元为主,本实验中发酵好的丹贝也是以甙元为主<sup>[1]</sup>。

(2) 大豆经水泡 24 h 处理,异黄酮中糖甙含量下降 7% 而甙元含量上升,这是因为大豆种子中含有  $\beta$ -葡萄糖苷酶,在吸水后被活化,该酶水解异黄酮糖甙成甙元所致,但甙元的增加量小于糖甙的减少量,总黄酮含量下降 5.42%,这是由于异黄酮糖甙可溶于水,在浸泡过程中随水流失的缘故。

(3) 在丹贝发酵过程中总异黄酮变化的总趋势是:随着发酵时间的延长异黄酮糖甙含量逐渐降低,甙元含量上升,在发酵最终产物中异黄酮主要以染料木素和大豆甙元存在。在发酵 24 h 内大部分异黄酮由糖甙转化成甙元,在这段时间内 RT-3 菌的菌丝

体生长最旺盛,到 24 h 接近最大值,这是因为在菌丝体生长时需要大量营养,作为碳源的糖分消耗量最大,而大豆中可利用的游离单糖较少,微生物必须分泌大量的酶来分解各种含糖底物以获取需要的糖分,这样异黄酮糖甙中的糖分子被分解利用,产生不被微生物利用的甙元。随着发酵时间的延长菌丝体生长停止或消减,对糖的利用下降,酶分泌能力减弱,异黄酮的转化率相应降低,到达一定时几乎不再变化,同时作为酶反应底物的异黄酮糖甙浓度已下降到  $1 \times 10^{-7}$  mol/g,在此低浓度下酶反应可能已处于动态平衡之中。

(4) 在整个发酵过程中从含量上看总异黄酮含量变化不大,大豆中为 1.367 mg/g,发酵 64 h 的丹贝中达到 1.389 mg/g,但发酵后总异黄酮中主要为甙元,而甙元分子质量比糖甙小,所以应从摩尔浓度的变化来看,在大豆中总异黄酮含量为  $3.27 \times 10^{-6}$  mol/g,而发酵 64 h 后为  $4.955 \times 10^{-6}$  mol/g,发酵 64 h 的丹贝比未发酵的大豆总异黄酮含量高 51.25%,这是由于大豆中一部分异黄酮以 6"-丙二酰葡萄糖基和 6"-乙二酰葡萄糖基的形式存在,而这部分异黄酮在发酵过程中也逐步被转化成相应的甙元<sup>[5]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 江和源,吕飞杰,邵建祥. 高效液相色谱法测定大豆中异黄酮的含量[J]. 食品科学, 2000, 21(4):56-58.
- [2] Eldridge A C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein contents, and isolates[J]. J Agric Food Chem, 1982,30:35-39.
- [3] Matsuura M, Obata A, Fukushima D. Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control [J]. J Food Sci 54, 1989, (3):602-605.
- [4] Murphy P A. Phytoestrogen content of processed soybean products[J]. Food Technol, 1982, 36:60-67.
- [5] Naim M, Gestner B, Zilkah S, et al. Soybean isoflavones, characterization, determination and antifungal activity [J]. J Agric Food Chem, 1974, 22:806-809.

(责任编辑:惠 红)