

菌种对腐乳前发酵过程中大豆异黄酮含量的影响

刘 欣¹, 龚 丽², 刘观福¹, 丁 胜¹, 陈永泉¹

(1 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业机械研究所, 广东 广州 510630)

摘要:分别以雅致放射毛霉 *Actinomucor elegans*、五通桥毛霉 *Mucor wutungkiao* 和少孢根霉 *Rhizopus oligosporus* *saito* 为菌种, 研究菌种种类及菌种接种量、发酵时间对腐乳前发酵过程中异黄酮含量(质量分数)的影响。结果表明:不同菌种的前发酵腐乳, 其异黄酮含量变化有显著差异, 少孢根霉前发酵腐乳异黄酮含量较五通桥毛霉和雅致放射毛霉分别高 90% 和 133%。

关键词:腐乳; 雅致放射毛霉; 五通桥毛霉; 少孢根霉; 异黄酮

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)01-0107-03

The effect of microbial strains on the isoflavone content of fermented soybean curd during the first fermentation period

LIU Xin¹, GONG Li², LIU Guan-fu¹, DING Sheng¹, CHEN Yong-quan¹

(1 College of Food Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Agriculture Machinery Research Institute, Guangzhou 510630, China)

Abstract: The effect of microbial strains, spore suspension concentration and fermentation time on the isoflavone content of fermented soybean curd during the first fermentation period was investigated. The strains used were *Actinomucor elegans*, *Mucor wutungkiao* and *Rhizopus oligosporus* *saito*. The results showed the isoflavone content differed dramatically depending on the strain used, and *Rhizopus oligosporus* *saito* could enhance the isoflavone content of the product by 133% and 90% compared to those with *Actinomucor elegans*, and *Mucor wutungkiao* respectively.

Key words: fermented soybean curd; *Actinomucor elegans*; *Mucor wutungkiao*; *Rhizopus oligosporus* *saito*; isoflavone

大豆异黄酮是大豆生长过程中形成的一类次生代谢产物, 是豆科类主要色素成分^[1]。迄今已知大豆中天然存在的大豆异黄酮总共有 12 种异构体, 包括 3 种甾元——大豆甾元(daidzein)、染料木素(genistein)和大豆黄素(glycitein)以及它们的糖苷形式^[2,3]。在大豆和未经发酵的豆制品中异黄酮主要以糖苷形式存在, 而在发酵豆制品中则主要以甾元形式存在^[4,5]。近年来研究发现大豆异黄酮具有弱雌性激素活性, 可抗癌、预防骨质疏松、防止心脑血管疾病、减轻或避免更年期综合症等病症发生^[6~9]。前人研究发现发酵可促使豆制品中的配糖体异黄酮向高活性的配基形式转化, 提高异黄酮的生理活性^[1]。腐乳是我国独有的发酵食品, 是豆腐经微生物复合发酵

制成的一种植物奶酪型食品, 营养价值很高^[10]。本试验旨在研究菌种种类、菌种接种量及发酵时间对前发酵腐乳中大豆异黄酮(以下简称异黄酮)含量(质量分数)的影响^[11~13], 以求研制出富含异黄酮的保健腐乳。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

752 紫外光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); 高速组织捣碎机(上海标本模型厂, 10 000 ~ 20 000 r/min)

1.2 材料

豆腐(石膏点制); 马铃薯(市售); 琼脂(生物试

剂);硫酸链霉素(药品); KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2HPO_4 、葡萄糖、 $\varphi = 80\%$ 乙醇(分析纯);染料木素(genistein, sigma 公司)。

少孢根霉 *Rhizopus oligosporus saito*、雅致放射毛霉 *Actinomyces elegans* AS3.2778、五通桥毛霉 *Mucor wutungkiao* AS3.25 购于广东省微生物研究所。

1.3 试验方法

1.3.1 马铃薯培养基 取去皮马铃薯 200 g,挖去芽眼,切成丝,加水 1 000 mL,煮沸 15 min,过滤,再加 20 g 琼脂、20 g 葡萄糖、3 g KH_2PO_4 、1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,并加热使之溶化,补足水到 1 000 mL,0.1 MPa 杀菌即成马铃薯培养基,供培养毛霉与根霉菌种用。

1.3.2 孢子悬液的制备 选择生长良好的斜面菌种,在平板上扩大培养后,用 20 mL 蒸馏水充分洗涤,得孢子悬液。按体积比 1:10、1:20、1:40 稀释,分别均匀喷洒到豆腐上,置于 22 ℃ 培养箱前发酵 72 h,3 次重复。

1.3.3 前发酵腐乳的制作 腐乳前发酵工艺流程:市售豆腐→切块→冷却至室温→接种→摊凉→入恒温箱发酵→翻笼→取样→烘干→待测。

1.3.4 腐乳中异黄酮含量的测定 异黄酮类化合物在紫外区有特征吸收,大豆异黄酮的各个甾元和糖甾的最大吸收波长在 260 nm 附近,且在最大吸收峰周围干扰较少。所以,本试验以染料木素为标准样品,用紫外分光光度法、以其吸收强弱来测定腐乳样品中大豆异黄酮的含量^[2,14]。样品的测定:原料→干燥(55~60 ℃,12 h)→粉碎→过筛(60 目)→测定(物料与乙醇质量比为 1:10,在 50 ℃ 水浴下提取 2 h,过滤,260 nm 处测定其紫外吸收值)。

1.3.5 标准曲线的制作 精确称取大豆异黄酮标准样品(染料木素)0.010 0 g,用乙醇溶解并定容到 50 mL。精密吸取标准样品溶液 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mL,分别用水定容到 10 mL,于 260 nm 处测定光密度值,得标准曲线(图 1)。异黄酮标准曲线回归方程 $y = 0.0743x - 0.0004$,相关性 $R^2 = 0.9987$ 。

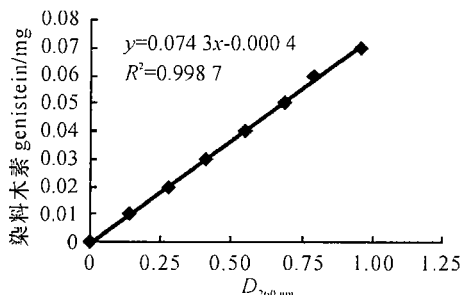


图 1 大豆异黄酮紫外检测标准曲线

Fig. 1 Standard graph of isoflavone by UV spectrophotometry

2 结果与分析

2.1 少孢根霉对前发酵腐乳中异黄酮含量的影响

24 h,豆腐坯表面长满白色菌丝,长度接近 2 mm;36 h,菌丝致密,长度达 12 mm,菌丝白色;48 h,菌丝表面布满黑色孢子;60~72 h,菌丝开始倒伏。

由图 2a 可知:少孢根霉不同接种量前发酵腐乳在 36~72 h,其异黄酮含量总体上呈下降趋势。其中,少孢根霉稀释比为 1:20 的呈直线下降,且随着时间的延长,下降幅度增大。虽然稀释比为 1:10 和 1:40 的在 60 h 时有一增大过程,但幅度很小,达 72 h 时,各稀释比的少孢根霉前发酵腐乳中异黄酮含量均在 $3.60 \sim 4.60 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。可见,36 h 时少孢根霉前发酵腐乳中异黄酮含量最高,此时其菌丝长势及色泽恰好达到腐乳生产所需。故少孢根霉前发酵腐乳最佳发酵条件为:温度 22 ℃,菌种稀释比 1:20,时间 36 h,此时前发酵腐乳中异黄酮含量为 $11.69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 五通桥毛霉对前发酵腐乳中异黄酮含量的影响

24 h,豆腐坯表面未长菌丝;36 h,长有少量白色菌丝;48 h,菌丝致密,长度达 10 mm,菌丝浅黄色,表面有少许黑色孢子;60 和 72 h,表面布满黑色孢子。

由图 2b 可知:五通桥毛霉不同接种量前发酵腐乳,其异黄酮含量在 36~60 h 内呈上升趋势,至 60 h 时达最大值,而后开始下降。其中,在 36~48 h,五通桥毛霉稀释比为 1:10 与 1:40 的都有一个平缓的下降趋势:前者从 $5.40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 降到 $5.27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,后者从 $7.07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 降到 $6.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;稀释比为 1:20 的一直呈上升趋势,从 $4.24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 上升到 $5.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。3 种接种量的前发酵腐乳中异黄酮含量在 60 h 后都下降,且下降幅度相差很大。结合腐乳生产实际对菌丝的需要,取 48 h 为五通桥毛霉前发酵腐乳最佳发酵时间,其菌种稀释比为 1:40,发酵温度为 22 ℃,此时,前发酵腐乳中异黄酮含量达 $6.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.3 雅致放射毛霉对前发酵腐乳异黄酮含量的影响

24 h,豆腐坯表面未长菌丝;36 h,长有较多白色菌丝,菌丝长度小于 1 mm;48 h,白色菌丝致密,长度达 10 mm,表面有少许黑色孢子;60 h,菌丝长接近 20 mm,豆腐坯表面略微发黑;72 h,菌丝倒伏。

由图 2c 可知:不同接种量雅致放射毛霉前发酵腐乳,其异黄酮含量呈先增大后减小的变化过程。稀释比为 1:10 时,在 48 h 异黄酮含量就达到了最大值($5.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),但 60 h 时含量为 $4.97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,与最大值相差无几;而稀释比为 1:20 和 1:40 时,在 60 h

才达到最大值,分别为 5.58 和 $8.78 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。据此可知:雅致放射毛霉前发酵腐乳其异黄酮含量最高时为 60 h ,与五通桥毛霉一致。但结合腐乳实际生产对菌丝长势的需求, 60 h 时豆腐坯发黑,不能满足生产所需,所以,雅致放射毛霉前发酵腐乳最佳发酵时间为 48 h ,其菌种稀释比为 $1:10$ 和 $1:20$,发酵温度为 22°C 时前发酵腐乳中异黄酮含量为 $5.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

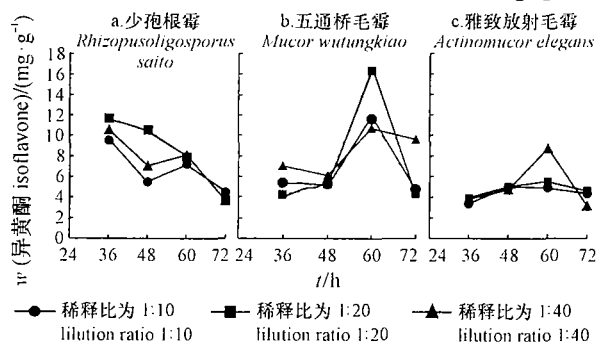


图2 不同菌种及其接种量对腐乳前发酵过程中大豆异黄酮含量(质量分数)的影响

Fig. 2 Effect of microbial strains on the isoflavone content of fermented soybean curd during the first fermentation period

3 讨论

不同菌种在最佳接种量及菌丝长势适合腐乳生产需求的情况下,前发酵腐乳中异黄酮含量分别为 11.69 (少孢根霉)、 6.16 (五通桥毛霉) 和 5.02 (雅致放射毛霉) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,少孢根霉较五通桥毛霉与雅致放射毛霉分别高 90% 与 133% 。可见,以少孢根霉为菌种制成腐乳将更有益于人体健康。腐乳前发酵过程中异黄酮含量有所增加,可能是由于少孢根霉、五通桥毛霉、雅致放射毛霉等发酵菌种参与作用时分泌的 β -葡萄糖苷酶等酶类,使豆腐坯中配糖体形式异黄酮转化为游离形式;同时豆腐在少孢根霉、五通桥毛霉、雅致放射毛霉等微生物作用下,可能有些成分与异黄酮相互转化,从而使其有所增加^[1,15,16]。有关丹贝等发酵豆制品中异黄酮的研究也有类似腐乳前发酵过程中异黄酮变化的现象^[12]。关于腐乳前发酵过程因发酵菌种类及发酵时间不同异黄酮含量有差异的机理还有待进一步探讨。

参考文献:

[1] 吴定,江汉湖. 发酵大豆制品中异黄酮形成及其功能[J]. 中国调味品,2001,(6):3-6.

[2] 孙梅君,骆炼,史长颖,等. 中国大豆制品中异黄酮含量测定和分析研究[J]. 食品与发酵工业,1999,26(5):14-18.

[3] NAIM M, GESTETNER B, ZILKAH S. Soybean isoflavones characterization, determination, and antifungal activity[J]. J Agric Food Chem, 1974, 22(5):806-810.

[4] WANG C, SHERRARD M, PAGADALA S, et al. Isoflavone content among maturity group 0 to 11 soybeans[J]. JAOCS, 2000, 77(5):483-487.

[5] COWARD L, BARNES N R K. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets[J]. J Agric Food Chem, 1993, (41):1961-1967.

[6] 刘志胜,李里特,辰巳英三. 大豆异黄酮及其生理功能研究进展[J]. 食品工业科技,2000, 21(1):78-80.

[7] 徐德平,江汉湖,汤涛,等. 大豆及丹贝异黄酮对乳腺癌、子宫癌和卵巢癌细胞抑制效应[J]. 食品科学, 2001, 22(6):69-72.

[8] 阎祥华,孙存普. 大豆异黄酮的抗癌作用机制研究进展[J]. 生理科学进展,1997,28(4):362-364.

[9] 周玲,苏黎红,侯金玲. 大豆异黄酮研究概况[J]. 时珍国医国药,2001,12(3):157-158.

[10] 王瑞芝,杜晓湘. 中国腐乳的酿造[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998. 10-15.

[11] 赵玉莲,郑学翔. 豆腐乳生产用微生物(一)[J]. 中国调味品,1998,(12):5-7.

[12] 孙兴民,陈有容,齐凤兰,等. 少孢根霉 RT-3 的研究及其在传统发酵食品中的应用[J]. 食品科学,1997,18(3):21-24.

[13] 王金元. 功能性大豆开发出成果[J]. 中国食品,2000,(13):12.

[14] 鞠兴荣,袁建,汪海峰. 三波长紫外分光光度法测定大豆异黄酮含量的研究[J]. 食品科学,2001,22(5):46-48.

[15] MATSUURA M, ASAAKI J, MURAO S. Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59(9):1623-1627.

[16] PANDJAITAN N, HETTIARACHCHY N, JU Z Y, et al. Enrichment of genistein in soy protein concentrate with β -glucosidase[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(3):403-407.

【责任编辑 李晓卉】