

臭豆腐中雌马酚的测定及其影响因素

唐辉^{1,2}, 陈霖¹, 石聪³, 陈晓艺³, 谭金萍³, 贺静³, 蒋依琳³, 蒋立文^{3*}

(¹ 韶关学院 食品学院 广东韶关 512005

² 广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室 广东韶关 512005

³ 湖南农业大学食品科学技术学院 长沙 410128)

摘要 目的:研究臭豆腐中雌马酚的含量及其影响因素,以期选择良好食物性来源的雌马酚提供理论依据。方法:采用反相-高效液相色谱法(RP-HPLC)检测我国市场上常见的 4 个品牌臭豆腐中雌马酚的含量(对比其它 8 种发酵豆制品)及其与大豆异黄酮含量和理化指标等因素的 Spearman 相关性,并对卤水及其浸泡和油炸时长沙 HSJD 臭豆腐中雌马酚的含量进行分析。结果:4 种臭豆腐中均含雌马酚,其它发酵豆制品均不含雌马酚。臭豆腐中雌马酚的含量在 11.93~24.33 $\mu\text{g/g}$ 干物质范围,其中,长沙 HSJD 臭豆腐中的含量最高(24.33 $\mu\text{g/g}$ 干物质)。雌马酚含量与大豆苷元、染料木苷元含量呈显著正相关关系($P<0.05$),相关系数分别为 0.335,0.411;与氯化物、氨基酸态氮、总酸含量呈极显著负相关关系($P<0.01$),相关系数分别为-0.463,-0.506,-0.674;与 pH 值呈极显著正相关关系($P<0.01$),相关系数为 0.539。添加豆腐脑发酵一年(STB1)和发酵二年(STB2)的长沙 HSJD 臭豆腐卤水中均含雌马酚,含量分别为 168.31,309.62 $\mu\text{g/g}$ 干物质,而未加豆腐脑的卤水(STB3)中不含雌马酚;臭豆腐坯 ST5、ST6 分别浸泡于 STB1、STB2 卤水,其雌马酚含量分别为 24.33,38.31 $\mu\text{g/g}$ 干物质,浸泡凉白开水和 STB3 卤水的臭豆腐坯均未检出雌马酚;长沙 HSJD 臭豆腐经油炸后,雌马酚含量显著下降,ST5 中雌马酚含量由 24.33 $\mu\text{g/g}$ 干物质降到 9.84 $\mu\text{g/g}$ 干物质,ST6 由 38.31 $\mu\text{g/g}$ 干物质降到 10.27 $\mu\text{g/g}$ 干物质。结论:臭豆腐为雌马酚良好来源的食物,其浸泡卤水和油炸工艺影响臭豆腐中雌马酚的含量。

关键词 臭豆腐; 雌马酚; 大豆异黄酮; 理化指标; Spearman 相关性分析; 臭豆腐卤水; 油炸

文章编号 1009-7848(2023)08-0396-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.039

臭豆腐(Stinky tofu)作为我国久负盛名的传统特色小吃,因“闻起来臭,吃起来香”的味觉特点及深厚的文化底蕴而深受人们喜爱,其起源已无可考,据传已有近千年历史,因曾入宫廷而被赐“御青方”之雅号,更因营养丰富而得“东方奶酪”之称谓^[1]。臭豆腐品种多样,因各地饮食习惯不同而口味不一。最负盛名的是发酵型北方臭豆腐和半发酵型南方臭豆腐,前者(主要以王致和臭豆腐为代表)是将豆腐坯经过前发酵、腌制、后期入坛发酵而制成的产品,后者(主要以长沙、扬州和绍兴臭豆腐为代表)则是将豆腐坯浸入发酵卤水中制成臭豆腐生坯,经油炸后拌佐料食用,其品质控制关键是卤水。南方臭豆腐卤水主要采用豆豉、豆

腐、香菇、苋菜梗、竹笋、鲜雪菜、鲜草头、田螺肉、虾、鱼等原料加水混合自然发酵而成^[2]。臭豆腐营养价值高,含丰富的多肽、氨基酸、VB₁₂ 等营养成分^[3-5]和异黄酮、雌马酚等活性物质^[6-7]。雌马酚(Equol)是一种非甾族黄酮类雌激素,化学名称为 7-羟基-3-(4'-羟苯基)-苯并二氢吡喃(C₁₅H₁₄O₃)^[8],是大豆异黄酮在体内经由某些特定肠道菌代谢后产生的最终代谢物。大豆异黄酮是豆科植物中典型的生物活性成分之一,包括游离型的苷元和结合型的糖苷两类,苷元占总量的 2%~3%,主要为染料木苷元(Genistein)、大豆苷元(Daidzein)和少量的黄豆黄素(Glycitein),糖苷占总量的 97%~98%,主要为染料木苷(Genistin)、大豆苷(Daidzin)和少量的丙二酰染料木苷(6''-O-Malonylgenistin)和丙二酰大豆苷(6''-O-Malonyldaidzin)等^[9]。虽然天然大豆中的异黄酮多数以糖苷的形式存在,但是在发酵过程中可分解为苷元形式,从而提高其吸收率和生理活性^[9]。Setchell 等^[10]研究表明,大豆异黄酮能否更有效发挥功效,取决于人体能否将

收稿日期: 2022-08-30

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32102126); 广东省基础与应用基础研究基金面上项目(2022A1515011362); 广东省普通高校特色创新类项目(2021KTSCX120)

第一作者: 唐辉,女,博士,讲师

通信作者: 蒋立文 E-mail: hndjlw@163.com

大豆异黄酮代谢为雌马酚。研究发现,雌马酚具有较强的雌激素活性,如 Aso 等^[11]发现雌马酚可降低绝经后妇女更年期综合症的发生率。Akaza 等^[12]和 Fuhrman 等^[13]发现雌马酚可降低罹患前列腺癌和乳腺癌的风险。研究还发现,雌马酚具有抗心血管疾病^[14],预防弗里德赖希共济失调^[15]和保持细胞活性,提高细胞超氧歧化酶(SOD)抗氧化作用^[16],在保健品和护肤品领域崭露头角,然而,其来源匮乏,价格昂贵,限制了发展。

目前,国外关于食品中雌马酚的调查研究屡见报道。Saitoh 等^[17]发现,用富含大豆异黄酮的饲料喂养母鸡,其鸡蛋黄中雌马酚含量较高。Abiru 等^[7]测定了 33 种蛋黄、16 种日本本土发酵豆制品、中国豆豉和豆腐乳、泰国豆酱和生抽以及中国台湾臭豆腐中的大豆异黄酮异构体和雌马酚含量,发现仅中国台湾臭豆腐中含雌马酚。我国臭豆腐品种多样,加工方式各异。目前关于市场上其它种类臭豆腐中雌马酚的测定及其它发酵豆制品中含雌马酚的情况未见报道。本文采集国内市场

常见的 4 个品牌的臭豆腐,测定其雌马酚含量,并对比一些常见的其它发酵豆制品(豆豉、酱油、腐乳和纳豆),检测其含雌马酚情况。在此基础上,分析雌马酚与大豆异黄酮和理化指标等因素的相关性。同时对长沙 HSJD 臭豆腐中雌马酚含量变化的影响因素进行探究,以期选择良好食物性来源的雌马酚提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

4 种品牌臭豆腐和其它发酵大豆制品的编号、来源、产地等信息详见表 1。

大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木苷元、雌马酚等采购于美国 Sigma 公司。

甲醇、乙酸乙酯(均为色谱纯级),Dikma 公司;磷酸、磷酸氢二钠、EDTA-Na、甲醛(36%~38%)、氢氧化钠、酚酞、乙醇、邻苯二甲酸氢钾、铬酸钾、酚酞、硝酸、乙醇(均为分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;自备超纯水。

表 1 样品采集信息表

Table 1 The information of samples

样品类别	样品编号	来源/品牌	水分含量/% ^①	主要原料	主要微生物 ^[1-7,18-23]
臭豆腐	ST1	市售/扬州 ZM	80.37	黄豆	细菌类
	ST2	市售/北京 WZH	69.20	黄豆	细菌类
	ST3	市售/绍兴 SXDF	79.40	黄豆	细菌类
	ST4	市售/长沙 HSJD	85.50	黄豆	细菌类
豆豉	DC1	市售/湖南 LY 豆豉	12.53	黑豆	曲霉、根霉
	DC2	市售/广东 YJ 豆豉	24.00	黑豆	曲霉、根霉
	DC3	市售/湖南 PZ 腊八豆	24.77	黄豆	毛霉、根霉
纳豆	NA1	市售/SD 纳豆	52.77	黄豆	纳豆芽孢杆菌
酱油	SS1	市售/YFX 酱油	58.4	黄豆	米曲霉
腐乳	SF1	市售/广东 DG 南乳	68.40	黄豆	毛霉、根霉
	SF2	市售/广东 YL 港式白乳	70.13	黄豆	毛霉、根霉
	SF3	市售/湖南 MZ 乳腐	64.37	黄豆	毛霉、根霉

注:①表示采用文中 1.3.1 节的方法测定水分含量。

1.2 仪器与设备

LC-20AT 型高效液相色谱仪(包括 LC-20AT 溶剂输送泵、SPD-20A 紫外检测器、CTO-10ASVP 柱温箱、DGU-20A5R 自动脱气机、CBM-20A 系统控制器),日本岛津公司;50UL 手动进样器,上海高鸽工贸有限公司;Aquelix 5 超纯水机,美国默

克密理博公司;PE20K pH 计,美国梅特勒-托利多有限公司;其它常规仪器设备由湖南农业大学食品科学技术学院实验室和韶关学院食品学院实验室提供。

1.3 方法

1.3.1 理化指标的测定 水分含量参照 GB

5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中的直接干燥法进行测定。pH值采用pH计测定。氨基酸态氮参照GB 5009.235-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》中的酸度计法进行测定。氯化物参照GB 5009.44-2016《食品安全国家标准 食品中氯化物的测定》中的银量法进行测定。总酸参照GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》中的电位滴定法进行测定,以乳酸计。

1.3.2 雌马酚和大豆异黄酮的测定 采用反相-高效液相色谱法(Reversed-Phase High performance liquid chromatography, RP-HPLC)测定4

种臭豆腐和8种其它发酵豆制品中雌马酚、大豆苷、大豆苷元、染料木苷和染料木苷元的含量,优化Abiru等^[7]的方法。

1.3.2.1 雌马酚和大豆异黄酮的RP-HPLC测定条件 色谱柱:Agilent Technologies 反向色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A:磷酸盐流动相(甲醇18%,乙酸乙酯1.8%,磷酸盐缓冲液(pH=3.0)0.04%,EDTA-Na 8 μg/mL,超纯水定容),B:乙酸乙酯2%,甲醇定容;流速:0.6 mL/min;柱温:40℃;进样量:20 μL;检测波长:280 nm;梯度洗脱程序见表2。

表2 反相高效液相色谱梯度洗脱程序
Table 2 RP-HPLC gradient elution program

时间/min		0	35	45	50	65
流动相体积配比/%	流动相A	90	65	65	60	90
	流动相B	10	35	35	40	10

1.3.2.2 雌马酚和大豆异黄酮标准曲线的建立

分别取1 mg/mL标准品(雌马酚、大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木苷元)的甲醇(60%)溶液各0.5 mL,置于10 mL的容量瓶中,用60%的甲醇定容至刻度,制成50 μg/mL的标准溶液。将以上配制的标准溶液用10%的甲醇稀释成质量浓度分别为0.25,0.5,1,1.5,2,3,5 μg/mL的混合标准品。根据上述的液相色谱条件,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,建立标准曲线方程,计算 R^2 值,检测检出限。

1.3.2.3 样品的预处理 称取10 g样品加入20 mL的超纯水稀释,取1~3 mL样品稀释液(其中豆豉类取1 mL,腐乳类、臭豆腐类取2 mL,臭豆腐卤水类取3 mL)用10 mL乙酸乙酯提取,重复提取2次,收集乙酸乙酯层,混合后转入蒸发皿中,在通风橱中水浴蒸干,再用1 mL 60%甲醇溶解蒸干物,用10%甲醇定容至10 mL,0.45 μm有机滤膜过滤,超声脱气20 min后,采用RP-HPLC法采集数据,每个样品重复3次。

1.3.2.4 雌马酚和大豆异黄酮含量的测定 样品中各组分的含量按式(1)计算。

$$X_i(\%) = C_i \times V / m \times 100 \quad (1)$$

式中, X_i ——样品中大豆苷(X_1)、染料木苷(X_2)、大豆苷元(X_3)、雌马酚(X_4)、染料木苷元(X_5)的含量,μg/g干物质; C_i ——样品的质量浓度,μg/mL; V ——样品稀释液总体积,mL; m ——样品中干物质的质量,g。

1.3.2.5 雌马酚占大豆苷元 and 雌马酚含量的比率(P_c) 发酵大豆制品中的微生物及酶将大豆苷元代谢生成雌马酚,从而使发酵大豆制品雌激素样活性功能显著增强,雌马酚占大豆苷元和雌马酚的比率按式(2)计算。

$$P_c(\%) = X_4 / (X_3 + X_4) \times 100 \quad (2)$$

1.3.2.6 苷元占4种大豆异黄酮总量的比率(P_g) 发酵大豆制品中微生物及酶将结合型糖苷(大豆苷、染料木苷)水解成游离型苷元形式(大豆苷元、染料木苷元),从而发挥类雌激素功效。不同样品中苷元占4种大豆异黄酮总量的比率按式(3)计算。

$$P_g(\%) = (X_3 + X_5) / (X_1 + X_2 + X_3 + X_5) \times 100 \quad (3)$$

1.3.3 卤水及浸泡和油炸工艺对长沙臭豆腐中雌马酚含量的影响 采集不同的长沙HSJD卤水【STB1指以香菇、竹笋、芥菜或梅干菜、水等为原料,再加入豆腐脑混合发酵一年的长沙HSJD卤

水,含水量 93.10%; STB2 指以香菇、竹笋、芥菜或梅干菜、水等为原料,再加入豆腐脑混合发酵二年的长沙 HSJD 卤水,含水量为 92.03%; STB3 指仅以香菇、竹笋、芥菜或梅干菜、水等为原料(未加豆腐脑),混合发酵二年的长沙 HSJD 卤水,含水量 99.73%],将豆腐坯用不同卤水浸泡,浸泡温度为自然室温(15~21 ℃),浸泡时间为 48 h,测定卤水和卤水浸泡前、后豆腐坯中雌马酚含量,平行测定 3 次,初步探究卤水及浸泡工艺对长沙臭豆腐中雌马酚含量的影响。

将浸泡卤水后的臭豆腐坯,用花生油油炸,油炸工艺为 200 ℃,油炸 4 min,300 ℃油复炸 2 min,比较油炸前、后长沙臭豆腐的雌马酚含量,平行测定 3 次,探究油炸对长沙臭豆腐中雌马酚含量的影响。

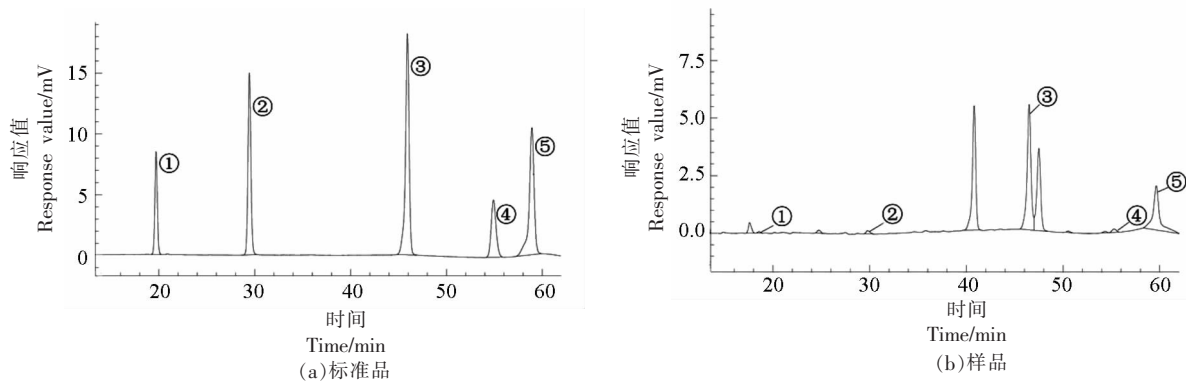
1.3.4 统计分析 采用 SPSS 19.0 软件进行单因

素 ANOVA 分析、Spearman 相关性分析。

2 结果与分析

2.1 雌马酚及大豆异黄酮的测定

采用 RP-HPLC 法测定,依据单一标准样品的保留时间对混合标准品及样品溶液中的组分进行定性,混合标准品及样品(ST1)的色谱图结果见图 1a 和 1b)。几种大豆异黄酮及雌马酚的出峰时间、标准曲线、 R^2 及检出限结果见表 3。从表 3 中可以看出,采用 1.3.2.3 节方法测定不同质量浓度混合标准品中的大豆苷、大豆苷元、染料木苷、染料木苷元及雌马酚等成分时,标准曲线线性关系好, R^2 达 0.995 以上,最低检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,提示该方法能够较好的测定样品中雌马酚及各大豆异黄酮含量。



注:①. 大豆苷;②. 染料木苷;③. 大豆苷元;④. 雌马酚;⑤. 染料木苷元。

图 1 标准品和样品的液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatography of standards and samples

表 3 雌马酚及大豆异黄酮标准曲线及检出限

Table 3 Standard curve and detection limit of equol and soy isoflavones

成分	出峰时间/min	标准曲线	R^2	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
雌马酚	54.899	$y = 33896x - 4788.7$	0.9972	0.1
染料木苷	29.441	$y = 63296x - 905.48$	0.9999	0.1
大豆苷	19.711	$y = 30225x - 1282.9$	0.9996	0.1
大豆苷元	45.925	$y = 97665x - 11283$	0.9956	0.1
染料木苷元	58.910	$y = 76259x - 16092$	0.9964	0.1

2.2 4 种臭豆腐和 8 种其它发酵豆制品中雌马酚、大豆异黄酮和理化指标的测定与相关性分析

测定不同样品的雌马酚、大豆异黄酮和理化指标,结果见表 4。仅在 4 种臭豆腐中检测出雌马

酚,4 种臭豆腐中雌马酚含量由高至低依次为: ST4>ST1>ST3>ST2,在 11.93~24.33 $\mu\text{g}/\text{g}$ 干物质范围,差异显著($P<0.05$)。其它 8 种发酵豆制品豆豉、纳豆、酱油和腐乳等均未检测到雌马酚。

分析4种臭豆腐和8种其它发酵豆制品的大豆苷元、大豆苷及苷元占4种大豆异黄酮总量的比率(P_g)、雌马酚占大豆苷元和雌马酚含量的比率(P_c),可以看出,12种样品中均检测到大豆苷元,豆豉、纳豆、酱油和腐乳类产品虽检测出较高的大豆苷元,但可能缺少将大豆苷元代谢为雌马酚的微生物,因此这些产品中均未检测到雌马酚,这与Abiru等^[7]的研究结果一致。臭豆腐ST1、ST2、ST3、ST4的 P_c 值分别为13.34%、14.67%、21.38%和23.09%,其中ST4中 P_c 值最高,这可能与其中发酵的微生物种类有关。12种样品中纳豆NA1的大豆苷和染料木苷含量最高,进一步分析苷元占4种大豆异黄酮总量的百分比,纳豆NA1最低, P_g 仅为23.36%,酱油较低, P_g 为59.64%,豆豉类、腐乳类和臭豆腐类的 P_g 值都达80%以上,这说明除纳豆和酱油外,其余样品中大部分大豆异黄酮糖苷已分解为苷元形式,异黄酮类雌激素样活性作用较强。Yin等^[24]研究发现腐乳发酵过程中,大豆异黄酮几乎可全部由糖苷形式转化成苷元形式,更好地在体内发挥生理活性,这与本文试验结果相似。由此推测,纳豆的优势菌种纳豆芽孢杆菌将大豆异黄酮的糖苷形式水解为苷元形式的活性较低,且不能将大豆苷元代谢为雌马酚;豆豉、豆腐乳、酱油的优势菌种曲霉、根霉、毛霉等将大豆异黄酮的糖苷形式水解为苷元形式的活性较好,然而不能将大豆苷元代谢为雌马酚;4种臭豆腐中均检出雌马酚,其优势菌群一方面表现出将大豆异黄酮的糖苷形式水解为苷元形式的较好活性,另一方面表现出有将大豆苷元代谢成雌马酚的代谢活性。

分析12个样品的理化指标可以看出,不同样品之间因工艺的差异,理化指标间存在显著的差异($P<0.05$),同种类的样品,因其加工工艺上的相似性,虽使其理化指标间存在一定趋同性和类似性,但相互之间仍可能因其原料品种、菌种、工艺参数等的差异,在理化指标间亦表现出一定的差异($P<0.05$)。不同种类样品中氯化物含量差异显著($P<0.05$),4种臭豆腐中,ST2中的氯化物含量最高,为5.21%,其它3种臭豆腐中氯化物含量都较低,在0.26%~0.61%之间。据Han等^[25]的研究,含盐量大于5%的物质可有效阻止腐败性细菌的

生长,从而达到防腐的目的。ST2可直接食用,属于全发酵型臭豆腐,为达到防腐的作用,生产过程中应该添加较高的食盐,而ST1、ST3和ST4中氯化物(以氯计)的含量普遍较低,存在微生物污染的可能,一般需采用高温再烹饪的方式食用。8种其它发酵豆制品中,酱油SS1氯化物含量最高,达10.61%,其次是腐乳SF1~3,含量分别为5.43%、4.50%、3.76%,豆豉(除豆豉2外)、纳豆的氯化物含量普遍较低;12个样品中的氨基酸态氮含量范围为0.11~0.99 g/100 g,差异显著($P<0.05$),4种臭豆腐中,ST2氨基酸态氮含量较高,为0.95 g/100 g,主要因为入坛后全过程发酵,周期长,而ST1、ST3与ST4等属于半发酵产品,发酵周期短,氨基酸态氮含量低^[26],也从一定程度上验证了发酵豆制品发酵工艺与发酵微生物对其氨基酸态氮含量的影响;从12个样品的有效酸度(pH值)、总酸含量可以看出,臭豆腐的pH值都偏高,总酸含量偏低,pH值均在6.82以上,总酸含量均在4.61 g/kg以下,由此推测,臭豆腐中优势菌群代谢大豆蛋白能产生大量碱性氨基酸,从而提高其pH值。

分析雌马酚与大豆异黄酮组分和理化指标的Spearman相关性,可以看出,雌马酚与其前体物质大豆苷元呈显著正相关关系($P<0.05$,相关系数为0.335),这主要是因为雌马酚由大豆苷元代谢而来。雌马酚与染料木苷元呈显著正相关关系($P<0.05$,相关系数为0.411),推测是由于染料木苷与大豆苷元之间的极显著相关性($P<0.01$,相关系数0.832);另外,雌马酚与其理化指标之间呈在一定显著相关性,与氯化物呈极显著负相关关系($P<0.01$,相关系数为-0.463),Wang等^[27]研究发现高盐可以导致豆豉抗氧化活性及异黄酮含量降低,使得臭豆腐中的雌马酚的含量较低,由此分析,4种臭豆腐中,ST2因高含盐量导致雌马酚含量最低。雌马酚与氨基酸态氮呈极显著负相关关系($P<0.01$,相关系数为-0.506),这与Rui等^[2]研究结果不一致,这可能是本试验中ST2虽发酵时间长,氨基酸态氮含量较高,但其高含盐量对雌马酚的含量有较强的抑制作用,因而雌马酚含量较低。雌马酚与pH值呈极显著正相关关系($P<0.01$,相关系数为0.539)、与总酸呈极显著负相关($P<0.01$,相关系数为-0.674),此推测臭豆腐中的细菌随着pH

表 4 12 种样品中雌马酚、大豆异黄酮和理化指及其相关性分析

Table 4 The equol, soy isoflavones and physicochemical indexes and its correlation in 12 samples

样品	大豆苷/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干物质	染料木苷/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干物质	大豆苷元/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干物质	染料木苷元/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干物质	雌马酚/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干物质	Pg/%	Pc/%	氯化物(以氯计)/%	氨基酸态氮/ $\text{g}\cdot(100\text{g})^{-1}$	pH 值	总酸/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
ST1	6.38±0.28 ^{bc}	5.38±0.70 ^d	140.74±4.87 ^e	106.76±0.54 ^b	21.67±0.64 ^b	95.46±0.22 ^b	13.34±0.06 ^e	0.61±0.05 ^h	0.22±0.01 ⁱ	7.29±0.02 ^b	2.59±0.87 ^j
ST2	5.02±0.50 ^{bc}	2.22±0.21 ^{cd}	69.21±2.52 ^e	41.77±2.88 ^e	11.93±1.30 ^d	93.88±0.22 ^d	14.67±0.92 ^e	5.21±0.02 ^d	0.95±0.01 ^b	7.64±0.01 ^a	4.61±0.50 ^b
ST3	5.65±0.57 ^{bc}	11.12±1.17 ^e	51.10±2.04 ^{bc}	44.08±3.93 ^e	13.88±0.95 ^e	85.03±0.32 ^e	21.38±1.73 ^b	0.26±0.02 ⁱ	0.13±0.01 ^k	7.08±0.02 ^e	1.15±0.50 ^f
ST4	-	6.23±0.59 ^d	81.22±5.65 ^d	59.93±4.69 ^d	24.33±0.92 ^a	95.76±0.44 ^b	23.09±1.30 ^a	0.35±0.04 ^d	0.11±0.01 ^l	6.82±0.02 ^e	4.32±0.86 ^{bc}
DC1	4.23±0.24 ^{bc}	10.25±0.73 ^e	277.87±2.96 ^b	99.21±1.21 ^e	-	96.30±0.10 ^b	-	0.33±0.06 ⁱ	0.91±0.01 ^e	5.79±0.01 ^b	66.53±0.87 ^a
DC2	3.40±0.12 ^c	59.21±1.78 ^b	284.99±2.52 ^b	143.93±1.62 ^a	-	87.26±0.23 ^d	-	6.14±0.09 ^b	0.74±0.01 ^e	5.27±0.01 ^j	57.89±0.87 ^b
DC3	4.05±0.22 ^{bc}	5.89±0.17 ^d	57.03±1.04 ^f	13.38±0.09 ^g	-	87.62±0.20 ^d	-	2.28±0.03 ^g	0.18±0.01 ^j	6.15±0.01 ^g	8.07±0.50 ^g
NA1	188.80±3.74 ^a	112.58±2.67 ^a	45.21±1.90 ^f	46.65±1.03 ^e	-	23.36±0.12 ^e	-	0.44±0.03 ^j	0.66±0.01 ^f	6.94±0.03 ^d	27.64±0.87 ^e
SS1	4.95±0.31 ^{bc}	11.67±0.30 ^e	24.56±0.50 ^b	-	-	59.64±1.35 ^f	-	10.61±0.01 ^a	0.57±0.01 ^g	5.32±0.01 ⁱ	55.30±0.87 ^c
SF1	-	3.52±0.35 ^{bc}	64.39±1.21 ^e	23.45±0.54 ^f	-	96.15±0.29 ^{bc}	-	5.43±0.13 ^c	0.31±0.01 ^h	5.82±0.01 ^h	34.85±0.99 ^d
SF2	-	-	24.84±0.30 ^b	-	-	100.00±0.01 ^a	-	4.50±0.08 ^e	0.78±0.01 ^d	7.61±0.01 ^a	2.88±0.50 ^{cd}
SF3	6.81±0.18 ^b	-	19.97±0.30 ^b	16.09±0.28 ^g	-	84.11±0.54 ^e	-	3.76±0.05 ^f	0.99±0.01 ^a	6.20±0.02 ^f	18.4 [±] 0.50 ^f
与雌马酚的 Spearman 相 关系数	0.054	-0.080	0.335 [*]	0.411 [*]	1.00	0.166	0.965 ^{**}	-0.463 ^{**}	-0.506 ^{**}	0.539 ^{**}	-0.674 ^{**}

注:-,表示未检测出;同一列有相同字母的表示在 $P=0.05$ 水平差异不显著,不同字母表示差异显著,*表示显著相关($P<0.05$),**表示极显著相关($P<0.01$)。

值的升高和总酸的降低,将大豆苷元代谢为雌马酚的活性更强。综上所述,3种臭豆腐坏,并将浸泡后的臭豆腐坏进行油炸,测定卤水、臭豆腐坏、所述,臭豆腐中的雌马酚与大豆苷元、染料木苷元、氯化物、氨基酸氮、pH值、总酸等因素显示出一定的相关性。

2.3 卤水及其浸泡和油炸工艺对长沙HSJD臭豆腐中雌马酚的影响

为了探究长沙HSJD臭豆腐的浸泡卤水和油炸对雌马酚含量的影响,将豆腐白坯浸泡于STB1、STB2、STB3 3种卤水中得ST5、ST6、ST7 检出雌马酚,这说明卤水中雌马酚来源于豆腐脑原料。分析浸泡卤水

后的臭豆腐坯,发现浸泡凉白开水和 STB3 卤水的臭豆腐坯均未检出雌马酚,浸泡在 STB1、STB2 的 ST5、ST6 中均含雌马酚,分别为 24.33, 38.31 $\mu\text{g/g}$ 干物质,这说明长沙臭豆腐中的雌马酚主要与卤水中的微生物有关。浸泡时,添加了豆腐脑的卤水中微生物发酵代谢,从而使得臭豆腐坯中产生雌马酚。长沙臭豆腐卤水中的微生物主要是拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes),其中的普雷沃氏菌属(Prevotellaceae)是主要优势菌属^[28],推测这些菌与雌马酚的产生有密切关系。Abiru 等^[7]在台湾臭豆腐卤水中分离鉴定出 6 株能将大豆苷元代谢为雌马酚的革兰氏阳性杆菌属,这些革兰氏阳性杆菌属主要是拟杆菌门和厚壁菌门,这与本文结果一致。前文调查中,4 种臭豆腐均产生雌马酚,其中,ST1、ST3、ST4 均需浸泡卤水,推测其中的雌马酚均来自于卤水中的微生物,ST2

虽不浸泡卤水,但在长期的发酵过程中,发酵微生物主要是一些复杂的细菌体系,亦能产生雌马酚。豆豉、酱油、酸乳等产品中的发酵微生物主是一些霉菌,纳豆是由纳豆芽孢杆菌发酵而成,这些产品中均不含雌马酚,说明这些霉菌和纳豆芽孢杆菌均不能将大豆苷元降解为雌马酚。

进一步分析油炸后的臭豆腐胚中雌马酚含量的变化,结果发现,油炸后,臭豆腐中的雌马酚含量显著下降,ST5 由 24.33 $\mu\text{g/g}$ 干物质下降到 9.84 $\mu\text{g/g}$ 干物质,ST6 由 38.31 $\mu\text{g/g}$ 干物质下降到 10.27 $\mu\text{g/g}$ 干物质,此研究说明高温油炸处理,使雌马酚含量显著下降($P<0.05$),这可能是雌马酚因随臭豆腐水分含量的降低而发生流失,且雌马酚在高温环境中发生分解有关,该结果与南京农大 Rui 等^[2]研究结果一致,然而雌马酚在高温中的降解机制尚不清楚,还需进一步的深入研究。

表 5 臭豆腐及其卤水中的雌马酚含量

Table 5 Equol contents of stinky tofu and stinky tofu brine samples

项目	样品	说明	雌马酚/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干物质
卤水	STB1	发酵一年,加豆腐脑的长沙 HSJD 臭豆腐卤水	168.31 \pm 6.08 ^b
	STB2	发酵二年,加豆腐脑的长沙 HSJD 臭豆腐卤水	309.62 \pm 5.68 ^a
	STB3	发酵二年,未加豆腐脑的长沙 HSJD 臭豆腐卤水	-
臭豆腐坯	白豆腐坯(浸泡凉白开水)	油炸前	-
		油炸后	-
	ST5(浸泡 STB1 卤水)	油炸前	24.33 \pm 0.92 ^d
		油炸后	9.84 \pm 1.11 ^e
	ST6(浸泡 STB2 卤水)	油炸前	38.31 \pm 1.23 ^e
		油炸后	10.27 \pm 1.37 ^e
ST7(浸泡 STB3 卤水)	油炸前	-	
	油炸后	-	

注:.-表示未检出;同一列有相同字母的表示在 $P=0.05$ 水平差异不显著,不同字母表示差异显著。

3 结论与讨论

通过测定市场上常见的 4 种品牌臭豆腐和 8 种其它发酵豆制品含雌马酚的情况,发现 4 种臭豆腐中均含雌马酚,其它发酵豆制品均不含雌马酚。臭豆腐中雌马酚的含量在 11.93~24.33 $\mu\text{g/g}$ 干物质之间,含量由高至低依次为:ST4>ST1>ST3>ST2,差异显著($P<0.05$),其中,长沙 HSJD 臭豆腐中的含量最高(24.33 $\mu\text{g/g}$ 干物质)。将雌马酚与大豆异黄酮和理化指标进行 Spearman 相关性分析,结果表明,雌马酚与大豆苷元、染料木苷元呈显著

正相关关系($P<0.05$),相关系数分别为 0.335, 0.411;与氯化物、氨基酸态氮、总酸呈极显著负相关关系($P<0.01$),相关系数分别为-0.463, -0.506, -0.674;与 pH 值呈极显著正相关($P<0.01$),相关系数为 0.539。初步研究了卤水及其浸泡和油炸工艺对长沙臭豆腐中雌马酚的影响,结果表明,加了豆腐脑发酵二年(STB2)和一年(STB1)的长沙 HSJD 臭豆腐卤水中含雌马酚,含量分别为 309.62 $\mu\text{g/g}$ 干物质和 168.31 $\mu\text{g/g}$ 干物质,未加豆腐脑的卤水(STB3)中不含雌马酚;臭豆腐坯 ST5、ST6 分

别浸泡于 STB1、STB2 卤水后,雌马酚含量分别为 24.33,38.31 $\mu\text{g/g}$ 干物质,浸泡凉白开水和 STB3 卤水的臭豆腐坯均未检出雌马酚;长沙 HSJD 臭豆腐经油炸后,雌马酚含量显著下降,ST5 由 24.33 $\mu\text{g/g}$ 干物质下降到 9.84 $\mu\text{g/g}$ 干物质,ST6 由 38.31 $\mu\text{g/g}$ 干物质下降到 10.27 $\mu\text{g/g}$ 干物质。

雌马酚作为大豆异黄酮的代谢终产物,具有比其前体物大豆异黄酮更强的功能活性,在保健品、护肤品行业具有较高的市场经济价值。然而,并非所有人都能代谢产生雌马酚,研究发现,人群中仅有 30%~50% 的个体能够代谢产生这种物质,且不同人种对雌马酚的代谢能力也不一样^[27,29]。本文研究发现我国市场上常见的 4 种臭豆腐都含雌马酚,为雌马酚的摄入提供了良好的食物来源。大豆原材料的选择、大豆异黄酮的种类和含量、卤水发酵微生物和加工工艺的优化等对长沙臭豆腐中雌马酚的含量都有一定的影响,因此,今后围绕这些因素进行深入研究,对促进臭豆腐、保健品和护肤品产业的可持续发展具有重要的指导性意义。

参 考 文 献

- [1] 唐辉,钟瑞敏,朱建华,等.电子鼻结合 OAV 分析臭豆腐卤水的挥发性成分及风味活性物质[J].中国食品学报,2021,21(3):351-359.
TANG H, ZHONG R M, ZHU J H, et al. Analysis of volatile flavor compounds and odor-active compounds of stinky tofu brine by electronic nose combined with OAV[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 351-359.
- [2] RUI X, XU X, WU H, et al. A survey of equol contents in Chinese stinky tofu with emphasis on the effects of cooking methods[J]. International Journal of Food Sciences & Nutrition, 2014, 65(6): 667-672.
- [3] 李里.臭豆腐风味产生菌的分离、鉴定及风味产生机理初探[D].武汉:华中农业大学,2010.
LI L. Isolation and identification of flavor producing strains of stinky tofu and research on its flavor formation mechanism[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [4] 何理.发酵型臭豆腐生产工艺和营养价值的研究[D].广州:华南理工大学,2012.
HE L. Optimization of production techniques and evaluation of nutritional value of grey sufu [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [5] TANG H, MA J K, CHEN L, et al. GC-MS characterization of volatile flavor compounds in stinky tofu brine by optimization of headspace solid-phase microextraction conditions [J]. Molecules, 2018, 23(12): 3155-3165.
- [6] JOU H J, TSAI P J, TU J H, et al. Stinky tofu as a rich source of bioavailable S-equol in Asian diets[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(2): 651-659.
- [7] ABIRU Y, KUMEMURA M, UENO T, et al. Discovery of an S-equol rich food stinky tofu, a traditional fermented soy product in Taiwan[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2012, 63(8): 964-970.
- [8] MARRIAN G F, HASLEWOOD G A. Equol, a new inactive pheol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine[J]. The Biochemical Journal, 1932, 26(4): 1227-1232.
- [9] 刘欣,赵新淮.发酵豆制品中主要植物化学成分及生理功能的研究进展[J].大豆科学,2017,36(1):157-162.
LIU X, ZHAO X H. Research progress of main phytochemicals and physiological functions on fermented soybean products[J]. Soybean Science, 2017, 36(1): 157-162.
- [10] SETCHELL K D, BROWN N M, LYDEKING-OLSEN E. The clinical importance of the metabolite equol - A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones[J]. The Journal of Nutrition, 2002, 132(12): 3577-3584.
- [11] ASO T, UCHIYAMA S, MATSUMURA Y, et al. A natural S-(-)equol supplement alleviates hot flushes and other menopausal symptoms in equol nonproducing postmenopausal Japanese women[J]. Women's Health, 2012, 21(1): 92-100.
- [12] AKAZA H, MIYANAGA N, TAKASHIMA N, et al. Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: Case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents[J]. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2004, 34(2): 86-89.

- [13] FUHRMAN B J, TETER B E, BARBA M, et al. Equol status modifies the association of soy intake and mammographic density in a sample of post menopausal women[J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2008, 17(1): 33-42.
- [14] FRANKENFELD C L. Cardiometabolic risk and gut microbial phytoestrogen metabolite phenotypes [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(1): 26-29.
- [15] RICHARDSON T E, SIMPKINS J W. R- and S-equol have equivalent cytoprotective effects in Friedreich's Ataxia[J]. *Bmc Pharmacology & Toxicology*, 2012, 13(1): 1-6.
- [16] WEI X J, JING W, NI Y D, et al. Antioxidant effect of a phytoestrogen equol on cultured muscle cells of embryonic broilers[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 2011, 47(10): 735-741.
- [17] SAITOH S, SATO T, HARADA H, et al. Biotransformation of soy isoflavone -glycosides in laying hens: Intestinal absorption and preferential accumulation into egg yolk of equol, a more estrogenic metabolite of daidzein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1674(2): 122-130.
- [18] 谢靓, 蒋立文, 龚彩姣, 等. 浏阳豆豉生产过程中理化性质的变化研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(8): 225-232.
- XIE J, JIANG L W, GONG C J, et al. Changes of physicochemical property during Liuyang Douchi fermentation[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2016, 32(8): 225-232.
- [19] HUI-LAN Y E, ZHI Q U, SUN Q R, et al. Screening of optimal fermentation starter and optimization of primary fermentation for Yangjiang lobster sauce production[J]. *Food Science*, 2012, 33(9): 264-268.
- [20] 夏岩石, 夏延斌, 蒋立文. 腊八豆生产菌株的选育[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(2): 16-19.
- XIA Y S, XIA Y B, JIANG L W. Breeding of producing strains for Laba beans production[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2007, 23(2): 16-19.
- [21] 冯云子, 周婷, 吴伟宇, 等. 酱油风味与功能成分研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(4): 14-28.
- FENG Y Z, ZHOU T, WU W Y, et al. Research progress on flavor and functional components of soy sauce[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(4): 14-28.
- [22] 陶康, 吴凌伟, 金晓芳, 等. 基于高通量基因测序分析腐乳微生物多样性[J]. *食品科学*, 2021, 42(8): 143-149.
- TAO K, WU L W, JING X F, et al. Analysis of microbial diversity in Sufu using high-throughput sequencing[J]. *食品科学*, 2021, 42(8): 143-149.
- [23] CHEN X F, LU Y L, ZHAO A Q, et al. Quantitative analyses for several nutrients and volatile components during fermentation of soybean by *Bacillus subtilis* natto[J]. *Food Chemistry*, 2022, 374: 131725.
- [24] YIN L J, LI L T, LI Z G, et al. Changes in isoflavone contents and composition of sufu (fermented tofu) during manufacturing[J]. *Food Chemistry*, 2004, 87(4): 587-592.
- [25] HAN B Z, WAN J H, FRANS M R, et al. Effect of NaCl on textural changes and protein and lipid degradation during the ripening stage of sufu, a Chinese fermented soybean food [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 83(9): 899-904.
- [26] 贺静. 三种接种方式臭豆腐卤水发酵过程中主要指标研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.
- HE J. Study on main indicators in the fermentation brine of stinky tofu by three inoculation methods[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2018.
- [27] WANG L J, YIN L J, LI D, et al. Influences of processing and NaCl supplementation on isoflavone contents and composition during douchi manufacturing[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(3): 1247-1253.
- [28] 邓高文, 蒋立文, 刘洋. 基于 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析 5 种不同臭豆腐生坯细菌多样性[J]. *中国酿造*, 2021, 40(9): 155-158.
- DENG G W, JIANG L W, LIU Y. Bacterial diversity of 5 different stinky tofu Shengpei based on Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology [J]. *China Brewing*, 2021, 40(9): 155-158.
- [29] ATKINSON C, FRANKENFELD C L, LAMPE J W. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: Exploring the relevance to human health [J]. *Exp Biol Med*, 2005, 230(3): 155-170.

Determination of Equol in Stinky Tofu and Its Influencing Factors

Tang Hui^{1,2}, Chen Lin¹, Shi Cong³, Chen Xiaoyi³, Tan Jinping³, He Jing³, Jiang Yilin³, Jiang Liwen^{3*}

¹Henry Fok School of Food Science and Technology, Shaoguan University, Shaoguan 512005, Guangdong

²Provincial Key Laboratory for Utilization and Conservation of Food and Medicinal Resources in Northern Guangdong, Shaoguan 512005, Guangdong

³College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract Objective: In order to provide insight to food sources basis of equol, the content of equol in stinky tofu and its influencing factors was studied. Method: This study was to investigate the equol in 4 representative brands of stinky tofu and 8 others fermented soybean products on the domestic market by RP-HPLC, Spearman's correlation was used to analyze the relationship between the equol and soy isoflavones and physicochemical indexes, and the effects of stinky tofu brine and brine soaking and frying on the content of equol in Changsha stinky tofu were also investigated. Results: The equol was only detected in 4 kinds of stinky tofu, and the contents ranged between 11.93–24.33 $\mu\text{g/g}$ dry matter, with the Changsha HSJD stinky tofu being the highest content (24.33 $\mu\text{g/g}$ dry matter), and 8 others fermented soybean products without equol. A significant positive correlation between equol and daidzein and genistein (Spearman's r was 0.335 and 0.411, respectively, $P < 0.05$), and pH (Spearman's r was 0.539, $P < 0.01$), a negative correlation between equol and chlorides, amino acid nitrogen and total acid content (Spearman's r was -0.463 , -0.506 , and -0.674 , respectively, $P < 0.01$). Our research revealed that the equol was detected in Changsha HSJD stinky tofu fermented for 2 years (called STB2) or 1 year (called STB1) and added bean cured, the content was 309.62, 168.31 $\mu\text{g/g}$ dry matter, respectively. There were no equol in Changsha HSJD stinky tofu without bean cured (called STB3). ST5 was soaked in STB1 and ST6 was soaked in STB2, and then their equol content were 24.33 $\mu\text{g/g}$ dry matter and 38.31 $\mu\text{g/g}$ dry matter, respectively. There were no equol in Changsha HSJD stinky tofu was soaked in Cold boiled water and STB3. The content of equol was significantly decreased ($P < 0.05$) after the Changsha HSJD stinky tofu is fried, the ST5 decreased from 24.33 $\mu\text{g/g}$ dry matter from to 9.84 $\mu\text{g/g}$ dry matter and that of ST6 from 38.31 $\mu\text{g/g}$ dry matter from to 10.27 $\mu\text{g/g}$ dry matter. Conclusion: A kind of food with good source of equol was Stinky tofu. The content of equol in stinky tofu was affected by the technology of soaking brine and fryin.

Keywords stinky tofu; equol; soy isoflavone; physicochemical indexes; Spearman correlation analysis; stinky tofu brine; frying