

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

乳酸菌與雙叉桿菌發酵豆奶中異黃酮及維生素 E 之變化

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-050-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：周正俊

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 12 月 14 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

乳酸菌與雙叉桿菌發酵豆奶中異黃酮之變化

計畫編號：92-2313-B-002-050-

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

主持人：周正俊 國立台灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

異黃酮為天然存在於大豆之植物雌激素，共有十二種衍生物。其中以醣苷配基 (aglycone) 形式存在之異黃酮素較易被人體吸收且具較高之生理活性。本研究以豆奶為基質，利用乳酸菌 (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* BCRC 14085, *Lactobacillus acidophilus* BCRC 14079) 及雙叉桿菌 (*Bifidobacterium infantis* BCRC 14633, *B. longum* B6) 單獨或共同進行發酵，探討發酵過程中異黃酮素含量與 β -葡萄糖苷酶活性之變化情形，並比較發酵豆奶製品中之異黃酮素在不同貯存條件下含量之變化。

結果顯示，豆奶發酵後，醣苷配基 (aglycone) 形式之異黃酮素 (daidzein, genistein 及 glycitein) 含量顯著增加，在所測試不同菌種發酵之豆奶中，以 *S. thermophilus* 單獨發酵者醣苷配基之增加最多，其次為 *S. thermophilus* 與 *B. longum* 之共同發酵者。此外，隨著發酵時間之延長，豆奶中之 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase) 活性逐漸提高，且與醣苷配基形式之異黃酮素含量增加有相同的趨勢，而含葡萄糖苷之異黃酮素 (β -glucosides, malonylglucosides 及 acetylglucosides) 之含量則逐漸減少。

發酵豆奶飲料經 4 貯存期間中，以避光包材貯存者之異黃酮素含量保存效果較佳。此外，發酵豆奶乾燥製品之異黃酮素含量以添加有乾燥劑及脫氧劑且於 4 下貯存者之保存效果最佳，於 25 下不添加任何食品保存劑者異黃酮素之保存效果最差。

關鍵字： 乳酸菌，雙叉桿菌，異黃酮， β -glucosidase

二、英文摘要

Isoflavone is an important category of flavonoids and belongs to the phytoestrogen class. There are twelve major isoflavone isomers found in soybean. Isoflavone aglycones (daidzein, genistein and glycitein) are thought to be the most bioactive isomers among the isoflavones. This study investigated the changes of isoflavone composition and activity of β -glucosidase during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* BCRC 14085, *Lactobacillus acidophilus* BCRC 14079) and bifidobacteria (*Bifidobacterium infantis* BCRC 14633, *B. longum* B6) alone or simultaneously. On the other hand, the changes of isoflavone contents of the fermented soymilk products under different packaging and storage conditions were investigated.

The results showed that soymilk after fermentation, the contents of isoflavone malonylglucosides, acetylglucosides and β -glucosides decreased significantly. On the contrary, the amount of aglycones, (daidzein, genistein and glycitein) increased significantly. Among all the fermented soymilks tested, the greatest increase in the contents of aglycones and the highest β -glucosidase activity were noted in soymilk fermented with *Streptococcus thermophilus*, followed by that fermented with *S. thermophilus* and *Bifidobacterium longum* simultaneously. It was also noted that as the fermentation time was extended, the contents of aglycones and activity of β -glucosidase in soymilk was raised.

Fermented soymilks kept in dark glass bottles retained isoflavone contents much

more than those kept in glass bottles exposure to light during the storage period. A better retention of isoflavone was noted in dried fermented soymilk that was held in dessicant and deoxidant containing bottle and stored at 4°C. On the other hand, retention of isoflavone in dried fermented soymilk was the poorest which was held in bottle without dessicant and deoxidant and stored at 25°C.

Key word: lactic acid bacteria, bifidobacteria, Isoflavone, β -glucosidase

二、緣由與目的

黃豆及其加工製品除了營養均衡且富含蛋白質、碳水化合物及脂質外，尚含有一些微量成分如異黃酮素等，具甚高之附加價值，已成為世界性的健康營養加工製品之重要原料 (Garcia and others 1997)。許多研究指出，異黃酮素為黃豆中抗氧化及抗癌之主要成分 (Lee and others 1991, Adlercreutz and others 1992, Wei and others 1993)，此外，異黃酮素是天然存在於大豆之植物雌激素，具類雌激素與抗雌激素性質，故可降低與雌激素有關病症如女性更年期障礙等之發生 (Reinli and Block 1996, Setchell 1998, Cohen and others 2000, Gutendorf and Westendorf 2001)。異黃酮素共有十二種衍生物，以糖苷配基 (aglycone) 形式存在之異黃酮素具較高之生理活性且較易被人體吸收 (Peterson and Barnes 1991, Esaki and others 1994, Xu and others 1995, Izumi and others 2000)。經研究證實，黃豆發酵產品經微生物之 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase) 作用後，可提高糖苷配基形式之異黃酮素 (Murakami and others 1984, Sheih and others 2000)。

豆奶為東方國家普遍食用之大豆飲品，具豐富而經濟之蛋白質及熱量 (Bressani and Elias 1968)。利用乳酸菌與雙又桿菌發酵豆奶不僅可改善攝食黃豆製品所引起的脹氣及豆臭味等問題，亦可提供良好風味及補充有益人體健康之益生菌 (Mital and Steinkraus 1979, Murti and others

1993, Wang and others 2002)。

因此本研究以豆奶為基質利用乳酸菌及雙又桿菌進行發酵，分析發酵過程中異黃酮素含量之變化情形，並比較乳酸菌與雙又桿菌單獨和共同發酵所得之發酵豆奶中異黃酮素含量之差異；另探討發酵豆奶及其乾燥製品在不同貯存條件下，其異黃酮素含量之差異，以作為發展豆奶發酵產品為膳食補助品之參考，提高製品之保存性及應用性。

三、結果與討論

1. HPLC 異黃酮素分析方法之建立

在本實驗中使用含 0.1% 冰醋酸的乙腈溶液與含 0.1% 冰醋酸的水溶液為移動相溶劑，以二元溶劑濃度梯度系統來分離 12 種異黃酮素。參考 Wang and Murphy (1994) 所發展之方法，進行濃度梯度之調整以進一步改善溶劑溶析之強度，以期將 12 種異黃酮素有效分離。經多次改變移動相組合及濃度梯度之試驗後，本研究中所建立之最適分離移動相梯度如下：含 0.1% 冰醋酸之乙腈溶液之初始比例為 15%，20 分鐘後上升至 20%，於 30 分鐘上升至 24% 並維持 4 分鐘，再於 44 分鐘上升至 35% 並維持 8 分鐘，最後於 57 分鐘回到初始比例 15%，管柱溫度 25°C，紫外光設定波長為 254 nm。12 種異黃酮素在此分離系統下皆能明顯被分離成單一波峰。

2. 發酵豆奶之異黃酮素含量

利用乳酸菌與雙又桿菌發酵豆奶及未發酵豆奶中 12 種異黃酮素之含量，在未發酵豆奶中所測得總異黃酮含量素為 87.61 $\mu\text{g/mL}$ ，且以 β -glucoside 形式之異黃酮素 daidzin、glycitin 及 genistin 含量較多，豆奶經乳酸菌與雙又桿菌單獨或共同發酵後，總異黃酮素含量因菌種之不同而有所差異，其含量在 81.94 與 86.61 $\mu\text{g/mL}$ 之間。與未發酵豆奶相比，其 β -glucosides、malonylglucosides 及 acetylglucosides 形式之異黃酮素含量大致上均是減少之現象，aglycones 形式之異黃酮素 daidzein、glycitein 及 genistein 含量則顯著增加 (*p*

<0.05)。在所測試不同菌醃發酵之豆奶中，以利用 *S. thermophilus* 單獨發酵後豆奶中之 daidzein、glycitein 及 genistein 含量最高，其 daidzein 含量由未發酵時之 12.59 $\mu\text{g/mL}$ 增加至發酵後之 29.65 $\mu\text{g/mL}$ ，glycitein 則由 2.08 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 10.60 $\mu\text{g/mL}$ ，而 genistein 則由 6.34 $\mu\text{g/mL}$ 增加至 22.79 $\mu\text{g/mL}$ 。至於乳酸菌與雙叉桿菌共同發酵豆奶中，以利用 *S. thermophilus* 與 *B. longum* 共同發酵後豆奶中之 daidzein、glycitein 及 genistein 含量增加最多，其 daidzein、glycitein 及 genistein 含量分別增加至發酵後之 26.14 $\mu\text{g/mL}$ 、9.90 $\mu\text{g/mL}$ 及 22.57 $\mu\text{g/mL}$ 。菌醃中含 *S. thermophilus* 進行豆奶之發酵時， β -glucosides, malonylglucosides 及 acetylglucosides 轉變成 aglycones 之情形最明顯，但總異黃酮素質量損失也最多。

3. 發酵豆奶中 β -glucosidase 活性

在各發酵豆奶中所測得 β -glucosidase 之活性顯示因所試用菌醃之不同有所差異。其中以利用 *S. thermophilus* 單獨發酵之豆奶者所呈現之 β -glucosidase 之活性最高，達 196.73 mU/mL，其次為利用 *S. thermophilus* 與 *B. longum* 共同發酵之豆奶者，達 133.28 mU/mL，至於以 *L. acidophilus* 單獨發酵者則呈現最低之 β -glucosidase 活性，僅約 28.49 mU/mL。此結果顯示，豆奶可利用具較高 β -glucosidase 活性之 *S. thermophilus* 與 *B. longum* 來進行發酵，並藉由菌體所釋出的酵素，將較具生理活性且較易被人體吸收之異黃酮素—daidzein、genistein 及 glycitein 釋出。

4. 豆奶發酵過程中異黃酮素含量與 β -glucosidase 活性之變化

隨著發酵時間增加，豆奶中之 β -glucosidase 活性逐漸提高，且與醣苷配基形式之異黃酮含量增加有相同的趨勢，而含葡萄糖苷之異黃酮素（包括 β -

glucosides, malonylglucosides 及 acetylglucosides) 含量則逐漸減少。此顯示在發酵過程中豆奶藉由乳酸菌及雙叉桿菌所產生之 β -glucosidase 活性將豆奶中含葡萄糖苷之異黃酮水解成醣苷配基，使較具生理活性之異黃酮含量提高。

5. 發酵豆奶飲料於貯存過程中異黃酮素含量變化之情形

S. thermophilus 單獨發酵之豆奶飲料置放於 4°C 透光或避光容器中貯存下，總異黃酮素及 12 種異黃酮素—malonyldaidzin、malonylgenistin、malonylglycitin、acetyldaidzin、acetylgenistin、acetylglycitin、daidzin、genistin、glycitin、daidzein、genistein 及 glycitein 含量變化之情形。無論在透光或避光包材下貯存 15 天後，豆奶飲料中之所測得各種異黃酮素含量皆呈現些許降低之情形。總異黃酮素由 73.32 $\mu\text{g/mL}$ 分別降低至 62.34 $\mu\text{g/mL}$ (避光貯存) 與 51.29 $\mu\text{g/mL}$ (透光貯存)。大致而言，以避光包材貯存之豆奶飲料中異黃酮素含量之減少較小。在 15 天之貯存期間內，隨著貯存時間延長，malonyldaidzin、malonylgenistin、malonylglycitin、acetyldaidzin、daidzin、及 daidzein 含量皆呈現持續下降之情形。以 *S. thermophilus* 與 *B. longum* 共同發酵豆奶進行貯存試驗其異黃酮含量之變化亦得相同之趨勢。

6. 發酵豆奶乾燥製品於貯存過程中異黃酮素含量變化之情形

發酵豆奶經冷凍乾燥後置放於玻璃瓶，分別添加乾燥劑、脫氧劑、乾燥劑及脫氧劑均添加以及不添加任何食品保存劑，於 25°C 或 4°C 下貯存 10 週。結果發現無論何種處理貯存 10 週後，隨著貯存時間延長，各種異黃酮素含量皆呈現些許降低之情形，但大致而言，在 12 種異黃酮素之貯存情形中，添加有乾燥劑及脫氧劑且於 4°C 下，貯存者其異黃酮素含量之降低皆低

於任何處理在 25°C 下貯存者。相對而言，在 25°C 下不添加任何食品保存劑者異黃酮素之保存效果皆最差。乾燥劑及脫氧劑對不同形式異黃酮素之保存效果不一，對 malonylgenistin、malonylglycitin、acetylglycitin、daidzein 及 genistein 而言，兩者幾乎沒有差異，對 acetyldaidzin、acetylgenistin 及 genistein 之保存而言，乾燥劑及脫氧劑同時添加者效果大於個別添加者。

四、計畫成果自評

進行本研究時發現使用他人之方法並不能有效分析各異黃酮素。因此在本研究中首先進行異黃酮素 HPLC 分析條件之建立。本研究對 daidzin、glycitin、genistin、malonyldaidzin、malonylglycitin、malonylgenistin、acetyldaidzin、acetylgenistin、geinsteinacetylglycitin、daidzein 及 glycitein 等 12 種異黃酮素進行探討。維生素 E 分析部分則改進行「乾燥劑及脫氧劑影響各類異黃酮素在貯存時含量變化之影響」之探討。以冀貯存試驗所得資料之完整性。本研究所得顯示豆奶利用乳酸菌及（或）雙叉桿菌發酵可提高 daidzin、glycitein 及 genistein 之含量，並與 β -glucosidase 之活性呈相關性，且貯存條件會影響異黃酮素之含量。這些資訊除具學術價值外亦可作為未來發展具保健功能發酵豆奶時之參考。

五、參考文獻

1. Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J, Hockerstedt K, Hase T. 1992. Dietary phytoestrogens and cancer: in vivo and in vitro studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:331-337.
2. Bressani R, Elias LG. 1968. Processed vegetable protein mixtures for human consumption in developing countries. In: Chichester CO, Mark EM, Stewart GF, eds. *Advances in Food Research*. Vol. 16. New York: Academic Press, pp. 1-103.
3. Cohen LA, Zhao Z, Pittman B, Scimeca JA. 2000. Effect of intact and isoflavone-depleted soy protein on NMU-induced rat mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis* 21:929-935.
4. Esaki H, Onozaki H, Osawa T. 1994. Antioxidative activity of fermented soybean products. In: Huang MT, editor. *Food phytochemicals for cancer prevention I, fruits and vegetables*. Washington, D.C.: American Chemical Society. P353-360.
5. Garcia MC, Torre M, Marina ML, Laborda F. 1997. Composition and characterization of soyabean and related products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37:361-391.
6. Gutendorf B, Westendorf J. 2001. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166:79-89.
7. Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. 2000. Soy Isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr*. 130(7):1695-1699.
8. Lee HP, Gorulery L, Duffy SW, Esteve J, Day NE. 1991. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* 337:1197-1200.
9. Mital BK, Steinkraus KH. 1979. Fermentation of soymilk by lactic acid bacteria: A review. *J Food Prot* 42: 895-900.
10. Murakami H, Asakawa T, Terao J, Matsushita S. 1984. Antioxidative stability of temp and liberation of isoflavones by fermentation. *Agric Biol Chem* 48:2971-2975.
11. Murti TW, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud MJ. 1993. Bacterial growth and volatile compounds in yogurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* ssp.. *J Food Sci* 58:153-156.

12. Peterson G, Barnes S. 1991. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun* 179:661-667.
13. Reinli K, Block G. 1996. Phytoestrogen content of foods—a compendium of literature values. *Nutr Cancer* 26:123-48.
14. Setchell KD. 1998. Phytoestrogens:the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68(6 Suppl):1333-1346.
15. Wang HJ, Murphy PA. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 42:1666-1673.
16. Wang YC, Yu RC, Chou CC. 2002. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiol.* 19(5):501-508.
17. Wei H, Wei L, Frankel K, Bowen R, Barnes S. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr Cancer* 20:1-12.
18. Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S. 1995. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr* 125:2307-2311.

