

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

高機能性黑豆發酵膳食輔助物製備之探討(2/3) 期中進度報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2313-B-002-017-
執行期間：95年08月01日至96年10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

處理方式：期中報告不提供公開查詢

中華民國 96年06月07日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫期中進度報告

高機能性黑豆發酵膳食輔助物製備之探討(2/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2313-B-002-017

執行期間： 95 年 08 月 01 日至 96 年 10 月 31 日

計畫主持人：周正俊

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫
及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台灣大學食品科技研究所

中 華 民 國 96 年 06 月 07 日

目錄

目錄	頁次
一、中文摘要	3
二、緣由與目的	4
三、結果與討論	
1. 比較不同菌醱發酵黑豆所呈現抗致突變性之差異。-----	4
2. 發酵黑豆發酵溫度與時間影響抗致突變活性之探討。-----	5
3. 發酵過程抗致突變活性變化之探討。-----	6
四、結論	6
五、參考文獻	6
六、表次	

Table 1. Toxicity and mutagenicity of black soybean koji extracts prepared with various starters to <i>S. Typhimurium</i> TA98-----	8
---	---

Table 2. Toxicity and mutagenicity of black soybean koji extracts prepared with various starters to <i>S. Typhimurium</i> TA100-----	9
--	---

Table 3. Effects of the unfermented and fermented black bean extracts against the mutagenic effects of 4-NQO and B[a]P on <i>S. Typhimurium</i> TA98-----	10
---	----

Table 4. Effects of the unfermented and fermented black bean extracts against the mutagenic effects of 4-NQO and B[a]P on <i>S. Typhimurium</i> TA100-----	11
--	----

Table 5. Inhibition of the mutagenic effects of 4-NQO and B[a]P on <i>S. Typhimurium</i> by the methanol extracts of fermented black soybean (5	
---	--

mg/plate) fermented by *A. awamori* at different temperatures for 3 days 12

Table 6. Inhibition of the mutagenic effects of 4-NQO and B[a]P on *S.*

Typhimurium by the methanol extract of fermented black soybean (5

mg/plate) fermented by *A. awamori* during fermentation at

30°C----- 13

七、成果自評

14

一、 中文摘要

本研究以被視為食品 GRAS 級之黴菌菌醅 *Aspergillus oryzae* BCRC 30222、*Aspergillus sojae* BCRC 30103、*Rhizopus azygosporus* BCRC 31158、*Aspergillus awamori* 及 *Rhizopus* sp. No. 2 利用固態發酵方式比較不同菌醅發酵黑豆所呈現抗致突變性之差異，探討發酵黑豆發酵溫度與時間影響對抗致突變活性之影響，以及發酵過程抗致突變活性變化情形。

結果發現，經過發酵處理之後可以提高黑豆之抗致突變活性，而在試驗中所使用的菌醅中，以 *A. awamori* 製備黑豆之黑豆麴甲醇萃取物對 4-NQO 及 B[a]P 誘導 *S. Typhimurium* TA98 和 TA100 之突變有最佳之抑制效果。因此後續進一步探討培養溫度對 *A. awamori* 製備黑豆麴抗致突變活性之影響，發現 *A. awamori* 在不同溫度下製備黑豆麴萃取物對 4-NQO 及 B[a]P 誘導 *S. Typhimurium* TA98 及 TA100 突變之抗致突變性，在 30°C 下製備黑豆麴者具有最好之抗致突變能力。大致而言 *A. awamori* 在不同發酵期間黑豆麴甲醇萃取物對 4-NQO 及 B[a]P 誘導 *S. Typhimurium* TA98 及 TA100 之抗致突變性，在發酵 3 天後之黑豆麴樣品對 4-NQO 及 B[a]P 誘導 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 之突變皆有 80% 以上之抑制率。顯示黑豆麴顯著提高黑豆之抗致突變性，未來可參考作為製備具高機能性之膳食輔助物。

關鍵字：抗致突變性，4-NQO，DMAB，發酵豆麴

二、前言

黑豆(*Glycine max* (L.) Merrill) 依子葉可分為青仁與黃仁兩種，青仁黑豆常作為浸酒入藥或其他具療效之用途 (連，1995)。過去大多是研究黃豆或發酵後黃豆的生理活性，對發酵後黑豆的研究較為欠缺，本實驗利用 *Aspergillus oryzae* BCRC 30222、*Aspergillus sojae* BCRC 30103、*Rhizopus azygosporus* BCRC 31158、*Aspergillus awamori* 及 *Rhizopus* sp. No. 2 五種菌醃製備黑豆麴，因安氏試驗法 (Ames test) 能在短時間內利用微生物系統來檢測致癌物質與致突變物質是否減少 (Maron and Ames, 1983) 故採用此法以探討黑豆麴之抗致突變性。本實驗所使用的 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) 為氧化型的致突變劑，會導致腫瘤的發生 (Yano and others 1993)，而間接型致突變劑 Benzo[a]pyrene (B[a]P) 為雜環芳香羣類化合物(polycyclic aromatic hydrocarbons；PAHs)，主要來自於高溫煎烤或煙燻，或是工廠排放廢氣及廢油污染大氣與水導致其沉積於環境中，經常作為致癌性 PAHs 的指標物，故以此兩種致突變劑研究黑豆麴之抗致突變性。結果顯示以不同菌醃發酵黑豆麴能提高對 4-NQO 及 B[a]P 之抗致突變性，但黑豆麴之抗致突變性會因為發酵菌醃及測試菌株 (TA98 及 TA100) 而有所不同。一般而言以 30°C 培養 *A. awamori* 三天所製備之黑豆麴抗致突變活性最佳。

三、結果與討論

1. 比較不同菌醃發酵黑豆所呈現抗致突變性之差異。

1.1. 不同菌醃發酵黑豆麴甲醇萃取物對 *S. Typhimurium* TA98 及 TA100 毒性與致突變性

黑豆及黑豆麴樣品若對 *S. Typhimurium* 突變株具毒性或致突變性將影響抗致突變試驗之結果，因此在進行抗致突變試驗前先進行黑豆及黑豆麴萃取物對 *S. Typhimurium* TA98 及 TA100 之毒性與致突變性試驗，*S. Typhimurium* 突變株進行毒性試驗時乃以樣品處理後之 His⁺ revertants/plate 數目低於對照組 80% 以下，則表示此樣品對 *S. Typhimurium* TA98 及 TA100 具有毒性。Table 1 與 Table 2 之實驗結果顯示，在未發酵黑豆與不同發酵菌醃所製備之黑豆麴，其甲醇萃取物在各測試劑量 (0.625~5mg/plate) 下不會造成 *S. Typhimurium* TA98 及 TA100 的死亡並不具有致突變性，故不會影響後續試驗結果。

1.2. 不同菌醃發酵黑豆麴甲醇萃取物對 *S. Typhimurium* TA98及 TA100 之抗致突變

利用致突變劑(4-NQO 與 B[a]P)誘發 *S. Typhimurium* TA98 及 TA100 之突變，再添加樣品與之反應，觀察樣品抑制致突變劑造成 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 突變之能力。由 Table 3 與 Table4 結果顯示經發酵處理後之黑豆皆有提升黑豆之抗致突變性之效果，但是其抗致突變活性會因為不同發酵菌種而有差異。對直接型的致突變劑 4-NQO，發酵後黑豆甲醇萃取物(5mg/plate)其抗致突變率顯著 ($p<0.05$) 高於未發酵黑豆，其中以 *A. awamori* 所發酵之黑豆具有最高之抗致突變性，其抗致突變率可達 94%，對間接型致突變劑 B[a]P，各發酵後之黑豆樣品同樣在最高測試劑量 (5mg/plate) 下，抗致突變率顯著 ($p<0.05$) 高於未發酵之黑豆，除了 *Rhizopus* sp. No.2. 發酵的組別抑制率較低外，其他菌醃發酵黑豆之抗致突變率高達 80% 左右。

不同菌醃發酵黑豆麴甲醇萃取物對 4-NQO 及 B[a]P 誘導 *S. typhimurium* TA100 突變之抑制效果與 TA98 相似，黑豆麴樣品在測試濃度(0.625~5mg/plate) 下，隨濃度的提高其抗致突變率也跟著上升。在 4-NQO 部份，最高測試劑量 (5mg/plate)下仍是以 *A. awamori* 所發酵之黑豆麴其抗致突變能力最好，其抑制率高達 92%，而在 B[a]P 方面，各發酵之樣品於最高測試劑量下，有高達 81%~89%之抑制率。

2. 發酵黑豆發醇溫度與時間影響抗致突變活性之探討。

同樣為了避免黑豆麴樣品對抗致突變試驗造成干擾，在進行抗致突變試驗以前先進行毒性與致突變性試驗。結果顯示，不同溫度下製備所得黑豆麴之甲醇萃取物在濃度(5mg/plate) 下對 *S. typhimurium* TA98 和 TA100 皆不具毒性。Table 5 為 *A. awamori* 在不同溫度下製備黑豆麴萃取物分別對 4-NQO 及 B[a]P 誘導 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 突變之抗致突變性。不論於何種培養溫度下所製備的黑豆麴，在 5mg/plate 下對 4-NQO 誘導 *S. typhimurium* TA98 之抗致突變活性皆顯著的 ($p<0.05$) 高於未發酵之黑豆，其中於 30°C 培養下之黑豆麴抗致突變之效果最好，而對 B[a]P 則發現發酵後之黑豆麴樣品在各測試劑量下之抗致突變能力皆顯著的高於未發酵黑豆，且以 30°C 發酵之黑豆麴效果最佳，其次為 25°C 及 35°C 之發酵樣品。

而對 *S. typhimurium* TA100 之抗致突變活性結果顯示，黑豆麴濃度

5mg/plate 下對 4-NQO 所呈現各發酵黑豆麴之處理組別在各相同測試劑量下，其抗致突變的能力皆顯著高於未發酵者，同樣地隨劑量的提高，樣品之抗致突變率有上升的趨勢，以在 30°C 下製備之黑豆麴具有最佳之抗致突變能力；以 B[a]P 為致突變劑時，30°C 即有 89% 之抗致突變率，高於其他的處理組別。

3. 發酵過程抗致突變活性變化之探討。

預實驗先研究不同發酵天數之黑豆麴甲醇萃取物對 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 之毒性與致突變性試驗。發現其也不具有致突變性。

Table 6 為 *A. awamori* 在不同發酵天數下製備黑豆麴之甲醇萃取物在濃度(5mg/plate) 下分別對 4-NQO 及 B[a]P 誘導 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 突變之抗致突變性。樣品對直接型致突變劑 4-NQO 誘導 *S. typhimurium* TA98 下之抗致突變性，於發酵第三天時達到最高，抗致突變率達 92%，在 B[a]P 致突變劑的部份，同樣在發酵到第三天時，抗致突變能力會跟著提高達 81%。而樣品對 B[a]P 致突變劑誘導 *S. typhimurium* TA98 下之抗致突變性，

四、 結論

綜合以上結果可知發酵黑豆麴能提高對 4-NQO 及 B[a]P 之抗致突變性，但黑豆麴之抗致突變性會因為發酵菌醃及測試菌株 (*S. typhimurium* TA98 及 TA100) 而有所不同。一般而言以 *A. awamori* 製備之黑豆麴抗致突變活性最佳。在 25°C、30°C 及 35°C 下製備之 *A. awamori* 黑豆麴甲萃物在 5mg/plate 劑量下對 4-NQO 之致突變性皆有 80% 以上之抑制率，而又以在 30°C 下製備者最佳。而在 B[a]P 方面以 TA98 為測試菌株之結果發現同樣於 30 下製備之黑豆麴抗致突變活性最佳。

而不同發酵期間黑豆麴甲醇萃取物對 4-NQO 及 B[a]P 誘導 *S. Typhimurium* TA98 及 TA100 之抗致突變性，於發酵 3 天後之黑豆麴樣品對 4-NQO 及 B[a]P 誘導 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 之突變即高達 81~94% 之抑制率。

五、 參考文獻

連大進。1995。台灣黑豆的利用與生產展望。農業世界 147：39-42。

Maron DM and Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mut Res 113:173-215.

Yano T, Obata Y, Ishikawa G, Hagiwara K, Ichikawa T. 1993. Effect of Vitamin E on

4-nitroquinoline-1-oxide-induced lung tumorigenesis in mice. *International Vit Nutr Res* 64: 181-184.

Table 1 . Toxicity and mutagenicity of black soybean koji extracts prepared with various starters to *S. typhimurium* TA98

Extracts (mg/plate)	Non-fermented black soybean		Extracts of black soybean koji prepared with									
	Revertants (CFU/plate)	Mutagenicity	<i>A. awamori</i>		<i>A. sojae</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>Rhi. azygospous</i>		<i>Rhi</i> sp. No.2.	
			Revertants (CFU/plate)	Mutagenicity	Revertants (CFU/plate)	Mutagenicity	Revertants (CFU/plate)	Mutagenicity	Revertants (CFU/plate)	Mutagenicity	Revertants (CFU/plate)	Mutagenicity
Control	20±1 ^a	1	21±1	1	20±2	1	20±1	1	20±1	1	20±1	1
5	20±1 ^b	1	21±1	0.98	22±2	1.07	21±2	1.05	21±2	1.05	22±2	1.07
2.5	21±1	1.03	21±1	1.00	22±2	1.08	21±1	1.02	22±2	1.10	22±2	1.08
1.25	21±1	1.02	21±2	1.00	22±1	1.07	22±3	1.08	21±1	1.02	22±1	1.07
0.625	21±1	1.02	21±1	1.02	22±2	1.07	21±2	1.05	21±1	1.05	22±2	1.07

^aResult are presented as means ± SD for three separate experiments.

^b100µL *S. typhimurium* TA98 was mixed with 100µL sample and 500µL phosphate buffer, and incubated at 37°C for 20 min, after that the population of *S. typhimurium* TA98 was calculated.

Table 2. Toxicity and mutagenicity of black soybean koji extracts prepared with various starters to *S. Typhimurium* TA100

Extracts (mg/plate)	Non-fermented black soybean		Extracts of black soybean koji prepared with									
			<i>A. awamori</i>		<i>A. sojae</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>Rhi. azygospous</i>		<i>Rhi</i> sp. No.2.	
	Revertan ts (CFU/pla te)	Mutagenic ity	Revertan nts (CFU/p late)	Mutageni city	Revertan ts (CFU/pl ate)	Mutagen icity	Revertan nts (CFU/pl ate)	Mutagen icity	Revertan nts (CFU/p late)	Mutageni city	Revertan ts (CFU/pl ate)	Mutagen icity
Control	162±4 ^a	1	157±7	1	175±5	1	156±11	1	155±11	1	148±6	1
5	168±3 ^b	1.04	154±4	0.99	176±6	1.01	155±9	0.99	154±6	0.99	151±3	1.02
2.5	167±4	1.03	156±5	1.00	166±4	0.95	153±7	0.99	153±7	0.99	150±2	1.02
1.25	168±17	1.04	158±5	1.01	165±6	0.94	153±15	0.99	152±11	0.98	150±4	1.01
0.625	173±5	1.07	157±7	1.00	173±6	0.99	152±9	0.98	154±13	0.99	151±3	1.02

^aResult are presented as means ± SD for three separate experiments.

^b100µL *S. typhimurium* TA100 was mixed with 100µL sample and 500µL phosphate buffer, and incubated at 37°C for 20 min, after that the population of *S. typhimurium* TA100 was calculated.

Table 3. Effects of the unfermented and fermented black bean extracts against the mutagenic effects of 4-NQO and B[a]P on *S. Typhimurium* TA98

Mutagen	Amounts of extracts (mg/plate)	Extracts of black soybean prepared with											
		Unfermented black soybean extracts		<i>A. awamori</i>		<i>A. sojae</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>R. azygospous</i>		<i>Rhizopus</i> sp. No.2.	
		Revertants (CFU/plate) ^a	Inhibition rate(%) ^b	Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)	Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)	Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)	Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)	Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)
4-NQO	None	98±8		98±8		98±8		98±8		98±8		98±8	
	5	C53±6	58d	D26±2	94a	C27±3	92a	D51±3	61c	D55±3	56d	C41±4	74b
	2.5	BC57±3	54b	C58±3	52b	B33±2	85a	C61±2	48c	C66±3	42c	B55±4	56b
	1.25	B63±3	45b	B74±6	32c	B36±2	81a	B72±2	34c	B74±3	31c	A71±3	35c
	0.625	A76±5	28b	A91±4	10d	A45±3	69a	A84±2	18c	A83±4	19c	A76±4	28b
B[a]P	None	80±7		80±7		80±7		80±7		80±7		80±7	
	5	C55±6	44c	C34±6	81a	C35±6	80a	C32±6	84a	C33±4	82a	C44±6	64b
	2.5	B63±4	30d	B42±3	67a	B44±5	64a	B42±3	67a	B49±5	54b	B56±6	42c
	1.25	B67±4	23c	A46±3	59a	A56±9	43b	B49±3	54a	B58±7	39b	A66±7	25c
	0.625	A75±6	9e	A53±5	47a	A69±3	19d	A61±8	34b	A68±3	22c	A77±8	6e

^aData were expressed as means ±SD (CFU/plate) of three separate experiments. Statistical differences were calculated by Duncan's multiple range test.

Value in the same row with different lower case letters (a, b, c, d) and column with upper case letters (A, B, C, D) are significantly different (p<0.05).

^bInhibition rate (%)=[1-number of induced revertants in the presence of extract of unfermented black soybean or fermented black soybean /number of induced revertants in the absence of extract of unfermented black soybean or fermented black soybean]×100. Numbers of spontaneous revertants were 21±1 and 23±2, respectively, when studies on 4-NQO and B[a]P were performed.

Table 4. Effects of the unfermented and fermented black bean extracts against the mutagenic effects of 4-NQO and B[a]P on *S. Typhimurium* TA100

Mutagen	Amounts of extracts (mg/plate)	Unfermented black soybean extracts		Extracts of black soybean fermented with									
		Revertants (CFU/plate) _a	Inhibition rate(%) ^b	<i>A. awamori</i>		<i>A. sojae</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>R. azygospous</i>		<i>Rhizopus</i> sp. No.2.	
				Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)	Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)	Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)	Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)	Revertants (CFU/plate)	Inhibition rate(%)
4-NQO													
	None	549±96		549±96		549±96		549±96		549±96		549±96	
	5	D388±15	41d	D189±4	92a	D229±9	82b	C247±6	77b	C333±10	55c	D230±10	82b
	2.5	C461±5	23d	C242±6	79a	C261±8	74a	B338±20	54b	B358±10	49c	C313±8	61b
	1.25	B506±13	11e	B462±20	22d	B281±8	69a	A381±14	43b	A425±3	32c	B363±8	48b
	0.625	A541±10	2d	A587±7	17c	A309±6	62a	A405±4	37b	A413±4	35b	A424±8	32b
B[a]P													
	None	271±12		271±12		271±12		271±12		271±12		271±12	
	5	C180±13	63b	C143±6	89a	C146±10	87a	C155±6	81a	C146±9	87a	D149±9	85a
	2.5	C191±14	55d	B154±4	81a	C152±9	82a	C163±9	75b	C152±9	83a	C178±11	65c
	1.25	B229±23	29e	A165±5	74a	B174±20	67b	B178±12	65b	B198±12	51c	B214±11	40d
	0.625	A264±12	5e	A179±9	64a	A249±7	16d	A214±12	39b	A256±8	10d	A241±13	21c

^aData were expressed as means ±SD (CFU/plate) of three separate experiments. Statistical differences were calculated by Duncan's multiple range test.

Value in the same row with different lower case letters (a, b, c, d) and column with upper case letters (A, B, C, D) are significantly different (p<0.05).

^bInhibition rate (%)=[1-number of induced revertants in the presence of extract of unfermented black soybean or fermented black soybean /number of induced revertants in the absence of extract of unfermented black soybean or fermented black soybean]×100. Numbers of spontaneous revertants were 159±9 and 127±2, respectively, when studies on 4-NQO and B[a]P were performed.

Table 5. Inhibition of the mutagenic effects of 4-NQO and B[a]P on *S. Typhimurium* by the methanol extracts of fermented black soybean (5 mg/plate) fermented by *A. awamori* at different temperatures for 3 days

Fermentation temperature (°C)	Inhibition rate(%) ^a			
	<i>S. Typhimurium</i> TA98		<i>S. Typhimurium</i> TA100	
	4-NQO	B[a]P	4-NQO	B[a]P
Not fermented	58C ^b	44D	41C	63C
25°C	92A	62B	85B	87A
30°C	94A	81A	92A	89A
35°C	72B	51C	80B	78B

^aInhibition rate (%)=[1-Number of induced revertants in the presence of extract of black soybean or fermented black soybean/Number of induced revertants in the absence of extract of black soybean or fermented black soybean]×100. Data are expressed as means of three separate experiments.

^bStatistical differences were calculated by Duncan's multiple range test. Value in the same row for the same test strain of *S. Typhimurium* with different upper case letters A, B, C, D are significantly different (p<0.05).

Table 6. Inhibition of the mutagenic effects of 4-NQO and B[a]P on *S. Typhimurium* by the methanol extract of fermented black soybean (5 mg/plate) fermented by *A. awamori* during fermentation at 30°C

Fermentation time (days)	Inhibition rate(%) ^a			
	<i>S. Typhimurium</i> TA98		<i>S. Typhimurium</i> TA100	
	4-NQO	B[a]P	4-NQO	B[a]P
0	58D ^b	44C	41C	63C
1	63C	38C	74B	69B
2	67C	60B	92A	77B
3	94A	81A	92A	89A
4	68C	70A	93A	83A
5	74B	65B	95A	85A

^aInhibition rate (%)=[1-Number of induced revertants in the presence of extract of black soybean or fermented black soybean/Number of induced revertants in the absence of extract of black soybean or fermented black soybean]×100. Data are expressed as means of three separate experiments.

^bStatistical differences were calculated by Duncan's multiple range test. Value in the same row for the same test strain of *S. Typhimurium* with different upper case letters A, B, C, D are significantly different (p<0.05).

七、成果自評

研究過程中藥劑之購置取得稍有延誤之情形發生，此外所使用之部份儀器發生故障，目前已維修完畢，正常使用，惟試驗之時程因而稍受影響，將再予以補足。