

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

發酵乳克弗爾機能物質之研究(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-135-

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學畜產學系暨研究所

計畫主持人：林慶文

計畫參與人員：邱欣怡 等

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 5 月 5 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

發酵乳克弗爾機能物質之研究

Study on the functional substance of fermented milk-kefir

計畫編號：NSC 92-2313-B-002-135

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

計畫主持人：林慶文 國立台灣大學畜產學系

一、中文摘要

本研究目的為評估克弗爾之抗突變性與抗氧化酵素活性。克弗爾之抗突變性乃以安氏試驗法進行；而抗氧化性除檢測其抗氧化酵素活性外，亦評估其還原力。實驗結果顯示，克弗爾對直接與間接突變原均有顯著的抗突變性。而克弗爾之還原力亦顯著高於牛乳；其超氧化物歧化酶(superoxide dismutase; SOD)活性與牛乳間則無顯著差異；麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase; GSHPx)活性則低於牛乳。綜合去年度與本年度研究結果，證實克弗爾具有極佳之抗突變性及抗氧化性，可作為機能性食品補充物。

關鍵詞：克弗爾、抗突變性、抗氧化性

Abstract

This study aims to evaluate the antimutagenicity and antioxidative activities of kefir. The Ames test was used to determine antimutagenic activity, whereas antioxidative enzymes activity and reducing power were used to evaluate the antioxidative activity of kefir. In both cases of direct- or indirect-acting mutagens, the antimutagenic activities of kefir were significantly greater than those of unfermented milk. Kefir demonstrated significantly greater reducing power, but reduced glutathione peroxidase (GSHPx) activity than was the case for milk. There was no significant difference between milk and kefir as regards superoxide dismutase (SOD) activity. These findings have demonstrated that kefir possess significant antimutagenicity and antioxidant activity, thereby suggesting that kefir is a

potential candidate for the role of useful natural antimutagenic and antioxidant supplements for the human diet.

Key words: Kefir, antimutagenicity, anti-oxidative activity

二、緣由與目的

自然界的好氧性生物，於代謝養分產生能量的過程中，通常以氧氣作為最終的電子接受者。粒腺體為細胞內主要產生能量的胞器，當其進行電子傳遞鏈反應(electron transport chain reaction)以釋放能量的過程中，即有自由基(free radical)產生(Halliwell, 1994)。這些代謝產生的自由基，若未適當地排除而累積於體內時，可能對人體造成傷害。此外，食品中潛藏著許多突變原，經代謝產生之自由基與癌症之罹患率具有極高的相關性(Zeiger, 1987)。因此，減少突變原之攝取將可減少癌症的發生。

自1908年俄國科學家 Metchnikoff 提出飲用發酵乳可延年益壽起，學者對於發酵機能性之研究即熱潮不斷。目前已證實飲用發酵乳可活化免疫系統、改善腸內菌相、降低膽固醇等(Cevikbas *et al.*, 1994; Garrote *et al.*, 2000)。克弗爾為源自高加索山之酒精發酵乳，除具有一般發酵乳之風味外，並含有微量酒精產生之獨特口感，咸信長期飲用克弗爾具有延年益壽的效果。本研究即探討克弗爾之抗突變性與抗氧化性，冀能在未來開發契合市場需求之機能性乳品。

三、結果與討論

(一)克弗爾之抗突變性

克弗爾之抗突變性係測定其對直接突變原 N-methyl, N'-nitro, N-nitrosoguanidine (MNNG) 與間接突變原 4-nitroquinoline-N'-oxide (NQNO) 之抑制率。實驗結果如表一所示，克弗爾對直接突變原與間接突變原均有顯著的抑制效果($p < 0.05$)。

目前已知乳酸菌對許多突變原，如 MNNG、NQNO、3,2'-dimethyl-4-amino-biphenyl (DMAB) 等具有抑制性(Hosono *et al.*, 1986; Hosoda *et al.*, 1992)；而酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白亦證實具有抗突變性(Yoshida *et al.*, 1991)。van Boekel *et al.* (1993) 發現酪蛋白經胃蛋白酶水解可提高其抗突變性。Matar *et al.* (1997) 認為牛乳經 *Lactobacillus helveticus* 發酵產生之肽與其抗突變性有關。先前之研究證實分離自克弗爾菌元中的 *L. helveticus* 具有極高的蛋白酶活性(Lin *et al.*, 1999)，故推測克弗爾之抗突變性可能與乳蛋白質水解後產生之肽有關。

Sreekumar and Hosono (1998) 發現 *Bifidobacterium longum* 產生之胞外多醣具有抗突變性。克弗爾菌元所產生之乳酸菌胞外多醣遠高於其他種類發酵乳，分離自克弗爾之多醣是否具有抗突變性，未來將進一步深入研究。

表一、克弗爾之抗突變性

Sample	Inhibition rate (%)	
	MNNG	NQNO
Milk	12.4±0.3 ^a	14.3±0.5 ^a
Kefir	61.5±1.2 ^b	90.0±0.9 ^b

^{a,b} 同行數據具有不同上標者表具有顯著差異($p < 0.05$)

(二)克弗爾之抗氧化酵素活性

生物體內代謝產生之活性氧可造成生物分子的損傷，故體內同時存在抗氧化酵素，可有效地降低活性氧造成的傷害。生物體內主要的抗氧化酵素包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase; SOD)、麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase; GSHPx)，以及觸酶(catalase)。此些抗氧化酵素亦證實存在於牛乳中(Lindmark-

Mansson and Akesson, 2000)。

觸酶對熱極為敏感，牛乳之熱處理造成大部分之觸酶失活。本實驗自牛乳及克弗爾中均無檢出觸酶活性。超氧化物歧化酶活性於牛乳和克弗爾中無顯著差異($p > 0.05$)，而克弗爾中的麩胱甘肽過氧化酶活性則顯著低於牛乳($p < 0.05$) (表二)。

超氧化物歧化酶可將超氧自由基還原成過氧化氫與氧分子，故在生物體中之抗氧化機制扮演重要的角色。某些種類的乳酸菌亦可表現超氧化物歧化酶活性(Sander *et al.*, 1995)，惟在本實驗中牛乳經克弗爾菌元發酵後，超氧化物歧化酶活性並無顯著的變化。

麩胱甘肽過氧化酶係以麩胱甘肽為媒介而將過氧化物還原，可保護生物體免於氧化傷害。食品原料中的麩胱甘肽過氧化酶極易受加工過程的破壞。Hojo (1982) 報告牛乳經 80°C 10 分鐘加熱後即導致麩胱甘肽過氧化酶完全失活。本實驗中牛乳經克弗爾菌元發酵後，麩胱甘肽過氧化酶活性亦顯著降低($p < 0.05$)。

表二、克弗爾之抗氧化酵素活性

Sample	Specific activities (U/mL)	
	SOD	GSHPx
Milk	0.511 ± 0.016 ^a	1.016 ± 0.017 ^a
Kefir	0.533 ± 0.016 ^a	0.603 ± 0.016 ^b

^{a,b} 同行數據具有不同上標者表具有顯著差異($p < 0.05$)

(三)克弗爾之還原力

許多研究報告指出高還原力物質具有極強的抗氧化性(Meir *et al.*, 1995)，因此，藉由測定克弗爾的還原力，可評估其抗氧化性。實驗結果如表三所示，克弗爾之還原力顯著高於牛乳($p < 0.05$)。

目前已知許多牛乳蛋白質或其衍生肽具有抗氧化性(Ye and Ng, 2000)。Wong and Kitts (2003) 發現乳中的還原力主要與蛋白質中的巰基(sulfhydryl group)有關，而羥基亦可供獻部分的還原力。亦有研究發現某些乳酸菌具有極高的還原力(Lin and Yen, 1999)。本實驗中發現克弗爾的還原力顯著高於牛乳($p < 0.05$)，故推測克弗爾發酵過程中，由微生物產生的代謝物應具有相當程度的還原力。

表三、克弗爾之還原力

Sample	Absorbance at 700 nm
Milk	0.690 ± 0.002 ^b
Kefir	0.760 ± 0.001 ^a

^{a,b} 同行數據具有不同上標者表示具有顯著差異($p < 0.05$)

四、計畫成果自評

本研究主旨為評估克弗爾之抗突變性與抗氧化性。將牛乳經克弗爾發酵後，其抗突變性與抗氧化性均有提高的效果。目前國外已有研究報告證實克弗爾具有抗腫瘤、抗菌，以及活化免疫系統等機能活性，本研究進一步證實台灣本土化之克弗爾具有抗突變性及抗氧化性。藉由本研究結果之發現，可有效建立及增加台灣本土化克弗爾之優點，並促進乳製品之消費量，增加台灣本土發酵乳之競爭力。

五、參考文獻

- Cevikbas, A., E. Yemni, F. W. Ezzedenn, and T. Yardimici. 1994. Antitumoural, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytother. Res.* 8: 78-82.
- Garrote, G. L., A. G. Abraham, and G. L. Antoni. 2000. Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *J. Food Prot.* 63: 364-369.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-4.
- Hojo, Y. 1982. Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in cow's milk. *Biol. Trace Elem. Res.* 4: 233-239.
- Hosoda, M., H. Hashimoto, H. Morita, M. Chiba, and A. Hosono. 1992. Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine. *J. Dairy Sci.* 75: 976-981.
- Hosono, A., T. Kashina, and T. Kada. 1986. Antimutagenic properties of lactic acid-cultured milk on chemical and fecal mutagens. *J. Dairy Sci.* 69: 2237-2242.
- Lin, C. W., C. L. Chen, and J. R. Liu. 1999. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Aust. J. Dairy Technol.* 54: 14-18.
- Lin, M. Y. and C. L. Yen. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1460-1466.
- Lindmark-Mansson, H., and B. Akesson. 2000. Antioxidative factors in milk. *Br. J. Nutr.* 84: S103-S110.
- Matar, C., S. S. Nadathur, A. T. Bakalinsky, and J. Goulet. 1997. Antimutagenic effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* L89 and a protease-deficient derivative. *J. Dairy Sci.* 80: 1965-1970.
- Meir, S., J. Kanner, B. Akiri, and S. Philosoph-Hadas. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1813-1819.
- Sanders, J. W., K. J. Leehouts, A. J. Haandrikmam, G. Venema, and J. Kok. 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J. Bacteriol.* 177: 5254-5260.
- Sreekumar, O. and A. Hosono. 1998. The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines. *Can. J. Microbiol.* 44: 1029-1036.
- van Boekel, M. A., C. N. Weerens, A. Holstra, C. E. Scheidtweiler, and G. M. Alink. 1993. Antimutagenic effects of casein and its digestion products. *Food Chem Toxicol.* 31: 731-737.
- Wong, P. Y. Y. and D. D. Kitts. 2003. Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity. *J. Dairy Sci.* 86: 1541-1547.
- Ye, X. Y. and T. B. Ng. 2000. Purification and characterization of glycolactin, a novel glycoprotein from bovine milk. *Life Sci.* 66: 1177-1186.
- Zeiger, E. 1987. Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. *Cancer Res.* 47: 1287-1296.