

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis



探討大麥芽對乳酸菌發酵黑豆奶抗氧化能力之影響

Effect of barley malt on the antioxidative properties of
black soymilk fermented by lactic acid bacteria

張相儀

Hsiang-Yi Chang

指導教授：游若箴博士

Advisor: Roch-Chui Yu, Ph.D.

中華民國 104 年 7 月


July 2015

謝誌

感謝指導教授游若箴博士悉心指導，讓學生在兩年研究生涯期間能克服諸多困難方能順利完成論文，在課業及研究上給予極大地自由與空間，讓學生得以兼顧工作及學業，老師無私地支持鼓勵與包容讓學生有勇往直前的決心，使本論文能順利完成，學生銘感五內。論文初成時，承蒙大同大學顏聰榮博士、臺灣大學周正俊博士、鄭光成博士、臺灣菸酒公司林俊杰博士詳加審閱，逐字斧正方得順利完成，並於口試時給予許多寶貴意見，在此表達萬分謝誌。

回顧兩年來的碩士生活著實一言難盡，僅僅是論文研究方向就遲遲無法確定，因在職進修的緣故，原先希望可以就近利用地緣之便完成實驗，但中間發生許多無法掌控的因素就不再一一細數；隨著時間越來越緊迫，最終下定決心利用下班及假日空檔回學校進行實驗，在這裡真的要大大地感謝R202的實驗室女神天天，從碩一坐進R202開始就感受到妳的關懷，到開始進行實驗之後，也在許多方面幫了我很多很多的忙，這本論文得以順利完成，天天絕對是一等一的大功臣！沒有妳的支持鼓勵與支援，沒有妳不厭其煩地接受我時不時地騷擾，沒有妳給予許多寶貴的意見與想法，我真的沒有把握可以撐過來，再多文字都不足以道盡心中無限的謝意，希望離開R202之後能有很好的發展，祝妳創業順利、生意興隆、財源廣進，我可以先報名預約試吃白老鼠嗎？R202的生態真的很有趣，除了天天之外都是別家人，但是大家卻很開心又無芥蒂地一起分享生活中的酸甜苦辣，坐在我旁邊的豐如還有斜後方的淑惠(柑仔)，半年多的相處雖然短暫卻記憶深刻，總是不吝惜地分享食物及歡笑，又因年齡相仿聊起天來不覺得有隔閡，在實驗上也給予許多幫助，雖然沒能朝夕相處，但是很開心能認識你們。

謝謝R204的宜蓁、亮瑜，因為工作的關係，無法與妳們一起分擔實驗室的事務，總是覺得過意不去，謝謝妳們的諸多包容，能一起完成口試真是太好了！也謝謝R204的力勤、家慧在我口試的時候大力相助，很仔細地幫我作記錄，祝你們接下來實驗順利。很慶幸結交到很棒的同學，謝謝被外包到潘家的盈伊(圓仔)，每



次接到我的call out總是使命必達，不論是課業上或是實驗上都幫我很大的忙，三不五時還得忍受我的捏肉攻擊，每次麻煩妳都覺得很不好意思，謝謝妳的體諒與支持，祝福妳能順利找到好工作。還有江家三朵花-瀨文、冠萱、于婷，從碩一上食加實習相識，自此結下不解之緣，跟妳們天南地北聊，回想起來真的是一段很美好的時光，也謝謝妳們在營養領域的課程幫我很多忙，總是在期中期末的時候，被我糾纏著要妳們回憶考古題，謝謝妳們沒厭煩地把我推開，希望妳們都能順利通過口試，迎向光明璀璨的未來，等著妳們的慶功宴啊！

因在職進修的緣故，總是有固定的時間需要請假去上課，很感謝願意當我代理人的同事們：韻珊、張瀚、炯文、尉光、毓芸等，尤其這半年來接到的業務總是容易被追殺，謝謝你們努力幫我擋、幫我應急，請假的時候心裡著實很愧疚，我會好好地報答你們的；也謝謝學長仁鴻幫忙cover很多突發狀況，給予我很多指點與建議，因為有你們讓我覺得這份工作尚有可取之處。特別感謝大學時期實驗室的佩吟學姐，在我決定實驗方向之後，給了很多實驗上的建議與幫助，實驗卡關時向學姐求助，她總是很快地幫忙想辦法突破盲點，讓我得以順利地完成所有的實驗，很慶幸自己有這個福分能認識一個這麼好的學姐。也謝謝好朋友們在這段時間不時地打氣、鼓勵，小柏、QQ、老龜、肉包總是適時地幫我加油打氣，再忙都不忘從遠方捎來祝福的信息與關懷，有妳們真好。

最後最要感謝的是我的父母，這幾個月為了最後衝刺不得不賃居在外，每星期媽媽總是費盡心思地幫我準備便當、水果，怕我吃得不夠健康、不夠營養，若是無法回去一趟，爸爸也會不辭辛苦地開車幫我快遞過來，一直在背後默默地給予支持，秉持著信念相信我一定可以完成目標，因為你們的支持與鼓勵，讓我無後顧之憂，才能順利地完成碩士學位。雖然我們都不是善於表達的人，但是我相信你們一定為我感到驕傲與歡喜，再次謝謝無私付出的父母親。

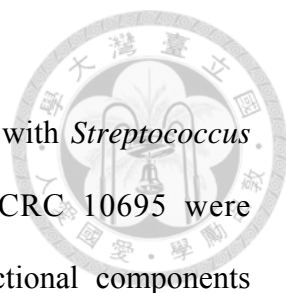
僅將此論文獻給最親愛的家人及所有關心我的師長、同學、同事及朋友們，再次感謝一路上的提攜、關懷與照顧，我會繼續努力，謝謝！

中文摘要

本研究利用 *Streptococcus thermophilus* BCRC 13869 與 *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695 發酵黑豆奶並添加不同比例 [0.5%及 1.0% (w/v)] 之大麥芽，探討乳酸菌在黑豆大麥芽發酵液中之生長情形，並進行黑豆大麥芽發酵液酚類化合物（總酚、總類黃酮、花青素）含量變化及抗氧化能力（DPPH 自由基清除能力、亞鐵離子螯合能力、還原力及總抗氧化能力）之測定。結果顯示添加大麥芽之實驗組與未添加大麥芽之控制組相比，添加 [0.5%及 1.0% (w/v)] 大麥芽之實驗組其乳酸菌數經 48 小時發酵顯著地增加 ($p<0.05$)，發酵 48 小時後菌數可達 8.41 Log CFU/mL；可滴定酸度顯著地上升 ($p<0.05$)，顯示添加大麥芽有助於乳酸菌生長。所有組別之總酚、總類黃酮於發酵初期均顯著地增加 ($p<0.05$)，之後隨著發酵時間增加而遞減，但是添加大麥芽之實驗組比起未添加大麥芽之控制組於發酵終點，仍有較高的總酚、總類黃酮含量。而 DPPH 自由基清除能力、亞鐵離子螯合能力、還原力及總抗氧化能力之結果顯示，添加大麥芽之組別其抗氧化能力均有顯著地提高 ($p<0.05$)，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶可獲得較高的抗氧化能力，顯示大麥芽有助於提升發酵黑豆奶之抗氧化能力。

關鍵字：黑豆奶、大麥芽、乳酸菌、抗氧化能力

Abstract



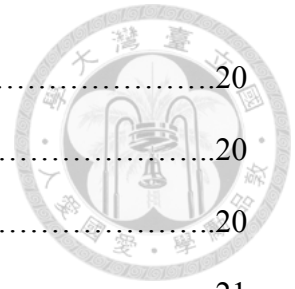
In this study, black soymilk contained barley malt fermented with *Streptococcus thermophilus* BCRC 13869 and *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695 were investigated for the behaviors of starter organisms and the functional components including total phenolic content, total flavonoid content and anthocyanins content during fermentation. The antioxidative activities (DPPH radical-scavenging ability, Fe²⁺ - chelating ability, reducing power and Trolox equivalent antioxidant capacity) of fermented black soymilk were also examined. The results showed that fermented black soymilk with barley malt significant increased ($p<0.05$) compared with fermented black soymilk without barley malt on viable count and titratable acidity. Final viable count of fermented black soymilk with barley malt was 8.41 Log CFU/mL after 48 h fermentation. Furthermore, it was found that the content of total phenolic, total flavonoid increased at the initial period of fermentation, then decreased during further fermentation, but fermented black soymilk with barley malt still had higher amounts of phenolic compounds than fermented black soymilk without barley malt after 48 h fermentation. In addition, the antioxidative activities [DPPH radical-scavenging ability, Fe²⁺ - chelating ability, reducing power and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)] of fermented black soymilk with barley malt increased significantly ($p<0.05$). Black soymilk with barley malt fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 showed the highest antioxidative activities among other fermented black soymilk. These results revealed that barley malt could enhance the antioxidative activities of fermented black soymilk.

Key words: black soymilk, barley malt, lactic acid bacteria, antioxidative activity

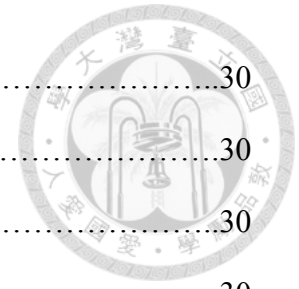
目錄



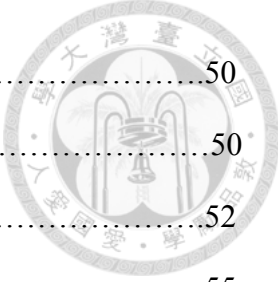
謝誌.....	i
中文摘要.....	iii
Abstract.....	iv
目錄.....	v
圖次.....	ix
表次.....	x
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	2
一、黑豆.....	2
1. 黑豆簡介.....	2
2. 黑豆之生理活性.....	3
二、酚類化合物.....	4
1. 類黃酮.....	4
2. 花青素.....	6
三、大麥.....	9
四、益生菌.....	11
1. 益生菌之簡介.....	11
1.1 益生菌定義.....	11
1.2 益生菌之特性及生理功能.....	11
2. 乳酸菌之簡介.....	17
2.1 乳酸菌定義.....	17
2.2 乳酸菌之分類及特性.....	17
3. 發酵製品之益處.....	19



五、氧化作用及抗氧化之機制與原理.....	20
1. 自由基定義.....	20
2. 自由基種類.....	20
3. 自由基之作用與傷害.....	21
4. 抗氧化劑作用與機制.....	22
4.1 自由基終止型 (Free radical terminator).....	22
4.2 還原劑或氧清除劑 (Reducing agent or oxygen scavengers).....	23
4.3 單重態氧抑制劑 (Singlet oxygen inhibitor).....	23
4.4 金屬螯合劑 (Chelating agent).....	23
4.5 抗氧化酵素 (Antioxidative enzyme).....	24
4.6 天然抗氧化劑.....	24
參、實驗架構.....	25
肆、材料與方法.....	27
一、實驗材料.....	27
1. 黑豆.....	27
2. 大麥芽.....	27
3. 菌種.....	27
4. 培養基.....	27
5. 試驗藥品.....	27
6. 儀器設備.....	28
二、樣品製備.....	29
1. 菌株保存與活化.....	29
2. 菌株冷凍保存.....	29
3. 菌株接種源之製備.....	29
4. 黑豆大麥芽汁之製備.....	29



5. 黑豆大麥芽發酵液之製備.....	30
三、分析方法.....	30
1. 黑豆大麥芽發酵液乳酸菌生長情形之測定.....	30
1.1 乳酸菌菌數測定.....	30
1.2 pH 值測定.....	30
1.3 可滴定酸度測定.....	30
2. 酚類化合物測定.....	31
2.1 總酚含量測定.....	31
2.2 總類黃酮含量測定.....	31
2.3 花青素含量測定.....	31
3. 抗氧化能力分析.....	32
3.1 DPPH 自由基清除能力.....	32
3.2 亞鐵離子螯合能力.....	32
3.3 還原力.....	32
3.4 TEAC 總抗氧化能力.....	33
4. 統計分析.....	33
伍、結果與討論.....	34
一、添加大麥芽對於黑豆奶發酵過程中乳酸菌生長之影響.....	34
1. 乳酸菌菌數之變化.....	34
2. pH 值之變化.....	37
3. 可滴定酸度之變化.....	40
二、添加大麥芽對於黑豆奶中酚類化合物含量之影響.....	43
1. 總酚含量之變化.....	43
2. 總類黃酮含量之變化.....	45
3. 花青素含量之變化.....	47



三、添加大麥芽對於黑豆奶抗氧化能力之影響.....	50
1. DPPH 自由基清除能力.....	50
2. 亞鐵離子螯合能力.....	52
3. 還原力.....	55
4. 總抗氧化能力.....	58
陸、結論.....	61
柒、參考文獻.....	62



圖次

圖一、黑豆種皮中花青素之結構.....	8
圖二、大麥芽的重要酵素.....	10
圖三、益生菌對人體之健康功效.....	16
圖四、實驗流程圖.....	26
圖五、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之菌數變化.....	36
圖六、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之 pH 值變化.....	38
圖七、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之可滴定酸度變化.....	42
圖八、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之花青素含量.....	49
圖九、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之還原力變化.....	57

表次



表一、類黃酮之分類.....	5
表二、花青素的結構.....	7
表三、常見之益生菌菌種.....	13
表四、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵 48 小時之菌數.....	35
表五、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵 48 小時之 pH 值.....	39
表六、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵 48 小時之可滴定酸度.....	41
表七、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之總多酚含量.....	44
表八、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之總類黃酮含量.....	46
表九、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比例 大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之 DPPH 自由基清除能力.....	51
表十、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比 例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之亞鐵離子螯合能力.....	54
表十一、 <i>S. thermophilus</i> BCRC 13869 與 <i>L. acidophilus</i> BCRC 10695 於添加不同比 例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之總抗氧化能力.....	60

壹、前言

黑豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 富含蛋白質及豐富活性物質，如異黃酮、花青素、維生素 E 等，具有良好的抗氧化能力。大豆蛋白質及胜肽已被發現具有許多生理活性，如降低高血壓、降低血中膽固醇及脂質含量、抗氧化能力 (Chen *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2007; Rho *et al.*, 2009)，進而達到預防心血管疾病及保護腎臟的功能。黑豆種皮中所富含的花青素是一種具強力抗氧化活性的物質，可清除體內自由基以減輕各類組織氧化傷害、抑制脂質過氧化及 LDL 的氧化，經研究證實黑豆亦具有清除自由基、抗腫瘤、改善心血管疾病等生理活性 (Singh and Aggarwal, 1995; Lee *et al.*, 2005; Astadi *et al.*, 2009)。

乳酸菌是人體腸道中重要的益生菌，研究顯示乳酸菌發酵豆奶使 glucoside 形式異黃酮含量下降，提高 aglycone 形式異黃酮含量 (錢, 2004; Chien *et al.*, 2006)。而 Lee *et al.* (2015) 以 *Streptococcus thermophilus* S10 作為單一菌醃及加入 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 作為混合菌醃發酵黑豆奶，結果顯示隨著發酵時間增加，發酵黑豆奶的 pH 值有顯著下降 ($p < 0.05$)，而可滴定酸度則是顯著地增加 ($p < 0.05$)，顯示黑豆奶是適合乳酸菌生長之基質；經過 24 小時的發酵，發酵黑豆奶之總多酚含量及 DPPH 自由基清除能力都有顯著地增加 ($p < 0.05$)，不論是單一菌醃或是混合菌醃都比未發酵之黑豆奶更具有抗氧化活性，黑豆發酵後 β -glucosidase 活性顯著上升，提高黑豆中 aglycone 形式之異黃酮含量，提升異黃酮生物可利用率 (Lee *et al.*, 2015)。

大麥 (*Hordeum vulgare*) 為釀造啤酒的主要原料，大麥發芽時會產生大量酵素，使發酵基質能更進一步地被分解。本研究將以黑豆奶作為發酵基質，利用乳酸發酵並添加不同比例之大麥芽，探討乳酸菌在此基質中之生長情形，並進行酚類化合物含量變化及抗氧化能力之測定，期能透過添加大麥芽增進其機能活性，提升此發酵產物作為研發保健產品之潛力。

貳、文獻回顧

本研究探討乳酸菌發酵黑豆過程中添加大麥芽對於乳酸菌生長情形以及黑豆奶抗氧化性質之影響，以下謹就相關文獻加以整理。




一、黑豆

1. 黑豆簡介

黑豆 (Black soybean) 在我國又稱為烏豆或黑大豆，為大豆之黑皮種，與黃豆在分類學上同屬豆科，蝶形花科 (*Papilionaceae*)，大豆屬，為一年生草本植物，種名為 *Glycine max* (L.) Merr.。依子葉顏色可將黑豆區分為青仁黑豆 (綠色子葉) 及黃仁黑豆 (黃色子葉)。前者常用於各種加工產品如黑豆粉、黑豆茶、碳焙黑豆及浸酒入藥；後者則常用在發酵食品上，如蔭油、豆鼓及蜜漬黑豆等用途 (行政院農業委員會農糧署，2006)。根據「本草綱目」記載：服用黑豆，令人長肌膚、益顏色、填筋骨、加氣力，補虛能食。

從營養成分而言，黑豆為一高蛋白食品，約含 30~42%粗蛋白質，由 18 種胺基酸所構成，其中人體必須胺基酸的含量高，Alanine (21.9%)、Glutamic acid (18.35%)、Arginine (17.91%)、Serine (15.45%) 及 Asparagine (8.34%) 等，是良好的動物性蛋白質的替代品 (臺灣食品營養成分資料庫，1998)。大豆蛋白質及胜肽已被發現具有許多生理活性，如降低高血壓 (Rho *et al.*, 2009)、降低血中膽固醇及脂質含量 (Wilson *et al.*, 2007)、抗氧化能力 (Chen *et al.*, 1998)，進而達到預防心血管疾病及保護腎臟的功能。

而黑豆脂肪含量高達 18%，以不飽和脂肪酸為主，其中游離脂肪酸又以十八碳之亞麻油酸 (Linolenic acid) 含量最多，可促進膽固醇之代謝及降低血壓有益健康。黑豆總糖量為 28%，以蔗糖、葡萄糖及果糖居多，亦含有可促進腸道蠕動之水蘇糖、棉實糖等寡糖 (臺灣食品營養成分資料庫，1998)；黑豆粗纖維含量約 8.6%，可促進腸胃蠕動預防便秘、加強腸道排毒作用，且有利腸道菌增殖以改善腸內菌叢生態，保持腸道良好環境 (Morishita and Konishi, 1994)，故被認為是一良好之機



能性食品。此外，黑豆亦含有豐富微量元素，每百克黑豆含鈣 370 毫克、磷 557 毫克、鐵 12 毫克，其它如鋅、銅、鉬、硒等含量都很高，有利於保持身體功能完整，延緩衰老，降低血液黏滯度，對於健腦益智皆有幫助 (連，1995)。

2. 黑豆之生理活性

黑豆是兼具經濟價值及營養價值之作物，被廣泛地種植及食用 (Riberio and Salvadori, 2003)，並富含抗氧化活性物質能提供多種生理功效，如維生素 E、皂素、酚酸及花青素等抗氧化活性物質，其中維生素 E 可維持人體生理正常機能、防止老化，為一必須營養素；皂素被證實能降低血清中膽固醇並具溶血活性 (Lasztity *et al.*, 1998)；酚酸則具有抗發炎、防止血栓形成、抑制腫瘤增生等功效 (Singh and Aggarwal, 1995; Lee *et al.*, 2005)。黑豆種皮中所富含的花青素是一種具強力抗氧化活性的物質，可清除體內自由基以減輕各類組織氧化傷害、抑制脂質過氧化及 LDL 的氧化，因此對心血管及神經系統具有保護作用 (Astadi *et al.*, 2009)，亦富有抗致突變活性 (Aparicio-Fernández *et al.*, 2005)；Takahata *et al.* (2001) 測定不同品種大豆種皮之抗氧化能力，發現以種皮顏色最深的黑豆其抗氧化能力較其他種皮顏色較淺的豆類為佳，且 Takahashi *et al.* (2005) 在大豆對抑制 LDL 氧化作用能力的研究中，得知相對於 Control 的 LDL 氧化反應速率，黃豆與黑豆分別可延緩 1.5 與 4.6 倍，黑豆的延緩時間為 205 分鐘、黃豆的延緩時間為 65 分鐘。推測由於黑豆種皮中的多酚類含量為 29.0 mg/g，遠高於黃豆種皮的 0.45 mg/g。

大豆是異黃酮含量最高的植物，其中以 Genistein 和 Daidzein 為主，含有醣基形式的異黃酮生物活性較差且不利腸道吸收，而利用微生物進行發酵增加大豆中去醣基 (aglycones) 異黃酮的含量，可提高異黃酮的生物利用率 (Cederroth *et al.*, 2009)。異黃酮具有抗氧化作用，可消除自由基及減少氧化壓力以達防癌及降低血管粥狀硬化的形成，並可減少脂質過氧化，預防心血管疾病的發生 (Hsu *et al.*, 2003)。血管新生 (angiogenesis) 是癌症成長與發展的重要因素，而血管內皮生長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 是調節血管新生的關鍵

(Folkman, 2003)。Guo *et al.* (2007) 的研究中表示 5-50 μ m 的異黃酮即可抑制添加 VEGF 之培養基中人臍靜脈內皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) 的生長，具有良好抑制血管增生 (antiangiogenic) 的作用，因而能阻斷腫瘤生成。

二、酚類化合物

酚類化合物 (phenolic compounds) 廣泛地存在於植物中，是植物體內主要的二次代謝產物。酚類化合物之結構中帶有一個或數個 OH 基的芳香環，包含簡單的酚類分子及高度聚合之化合物 (Bravo, 1998)，這些化合物中，以酚酸、類黃酮、花青素等被視為飲食中主要的酚類化合物 (King and Young, 1999)。以下謹就類黃酮及花青素之相關文獻加以整理。

1. 類黃酮

類黃酮基本結構含有 15 個碳原子，為 C₆-C₃-C₆ 之結構，依序為 A、C 及 B 環，表一是類黃酮常見之結構與分類 (Karakaya, 2004)，大致上可分為黃酮類 (flavones)、黃酮醇類 (flavonols)、黃烷酮類 (flavanones)、黃烷醇類 (flavanols)、異黃酮類 (isoflavones)、黃烷酮醇類 (flavanonols) 及花青素類 (anthocyanins)。類黃酮主要的抗氧化活性來自於 B 環上 3'、4' 及 5' 碳上帶有的 OH 基數目 (Van Acker *et al.*, 1996)、C 環上的 2、3 號碳是否形成雙鍵以及 4 號碳上是否有氧原子存在 (Pietta, 2000)。植物中類黃酮含量依品種及季節變化有很大的差異，植物體中的類黃酮需要光線照射，因此種植於溫室的植物其類黃酮含量會降低。類黃酮是抗氧化物質，具有促進人體健康之生理活性，如抗氧化、抗發炎、抗癌等活性功能 (Soobrattee *et al.*, 2005; Pedreschi *et al.*, 2006)。

表一、類黃酮之分類

Table 1. The subgroups of flavonoids



Main structure	Flavonoids	Chemical structure	Samples
$C_6C_3C_6$	Flavones	<p style="text-align: center;">FLAVONES</p>	Cinencetin, nobiletin, tangeritin, isocinencitin, luteolin, apigenin
	Flavonols	<p style="text-align: center;">FLAVONOLS</p>	Quercetin, kaempferol
	Flavanones	<p style="text-align: center;">FLAVANONES</p>	Hesperidin, naringenin
	Flavanols (catechins)	<p style="text-align: center;">CATECHINS</p>	(+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin
	Anthocyanins	<p style="text-align: center;">ANTHOCYANIDINS</p>	Peonidin, delphinidin, petunidin, cyanidin
	Isoflavones	<p style="text-align: center;">ISOFLAVONES</p>	Daidzein, genistein
	Chalcones	<p style="text-align: center;">Chalcones</p>	Phloretin, arbutin, chalconaringenin

(Karakaya, 2004)



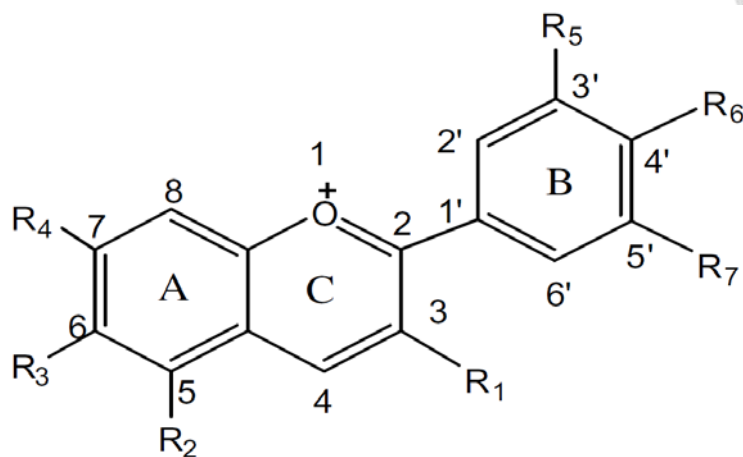
2. 花青素

花青素是維管束植物中常見的色素，廣泛地存在於花卉及蔬果中，花青素無毒且可溶於水，因此常被作為天然水溶性色素，花青素在不同環境下可呈現不同顏色，例如紅色、藍色、橘色等 (Alexandra Pazmiño-Durán *et al.*, 2001)。表二為花青素常見的 23 種結構，主要結構為一苯環[A]和一含氧的[C]環，[C]環再與一苯環[B]以碳-碳鍵結 (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009)。花青素結構上取代基種類及醣取代基種類個數的不同形成多種類的花青素，黑豆種皮中的花青素 (圖一) 已被鑑定出為 cyanidin-3-monoglucoside 與 delphinidin-3-monoglucoside 及 petunidin-3-glucoside (Choung *et al.*, 2001)。

而花青素為一極不安定且易降解的物質 (Giusti and Wrolstad, 2003)，其安定性受到許多因子影響，例如 pH 值、溫度、化學結構、氧氣、光線、溶劑、酵素、蛋白質及金屬離子的存在 (Rein, 2005)。當 pH 值為 1 時，花青素結構會偏向 flavylum cation 而呈現紅色；pH 值介於 2~4 之間時，花青素結構會偏向 quinoidal blue 進而呈現藍色；pH 值介於 5~6 時，其結構偏向 carbinol pseudobase 和 chalcone 呈現無色；若 pH>7，花青素會開始降解。

表二、花青素的結構

Table 2. Structural identification of anthocyanidins (aglycons)

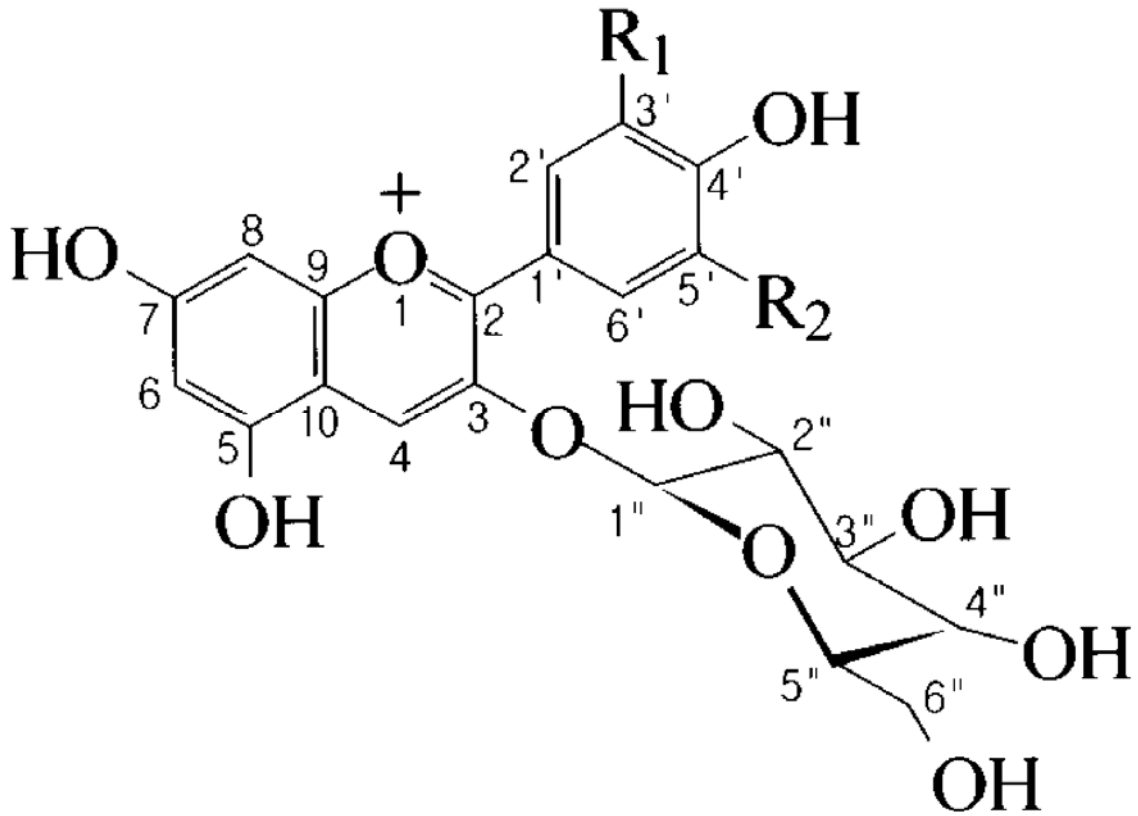


General anthocyanins structure

Name	Abbreviations	Substitution pattern							Colour
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	
Arrabidin	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OMe	N.R. ^a
Aurantininidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	
Capensinidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Blue-red
Carajurin	Cj	H	H	OH	OH	H	Ome	OMe	N.R. ^a
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Blue-red
Europinidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Blue-red
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Blue-red
3'-HydroxyAb	3'OHAb	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe	N.R. ^a
6-HydroxyCy	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Red
6-HydroxyDp	6OHDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Blue-red
6-HydroxyPg	6OHPg	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	N.R. ^a
Luteolin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	
Malvidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Blue-red
5-MethylCy	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Orange-red
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Orange-red
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Blue-red
Pulchellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Blue-red
Riccionidin A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H	N.R. ^a
Rosinidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Red
Tricetinidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Red

^a N.R.: not reported.

(Castañeda-Ovando *et al.*, 2009)



圖一、黑豆種皮中花青素之結構

Figure 1. Chemical structures of anthocyanins in seed coats of black soybean.

Delphinidin-3-glucoside (**1**, $R_1=OH$, $R_2=OH$); cyanidin-3-glucoside (**2**, $R_1=OH$, $R_2=H$); petunidin-3-glucoside (**3**, $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$).

(Choung *et al.*, 2001)

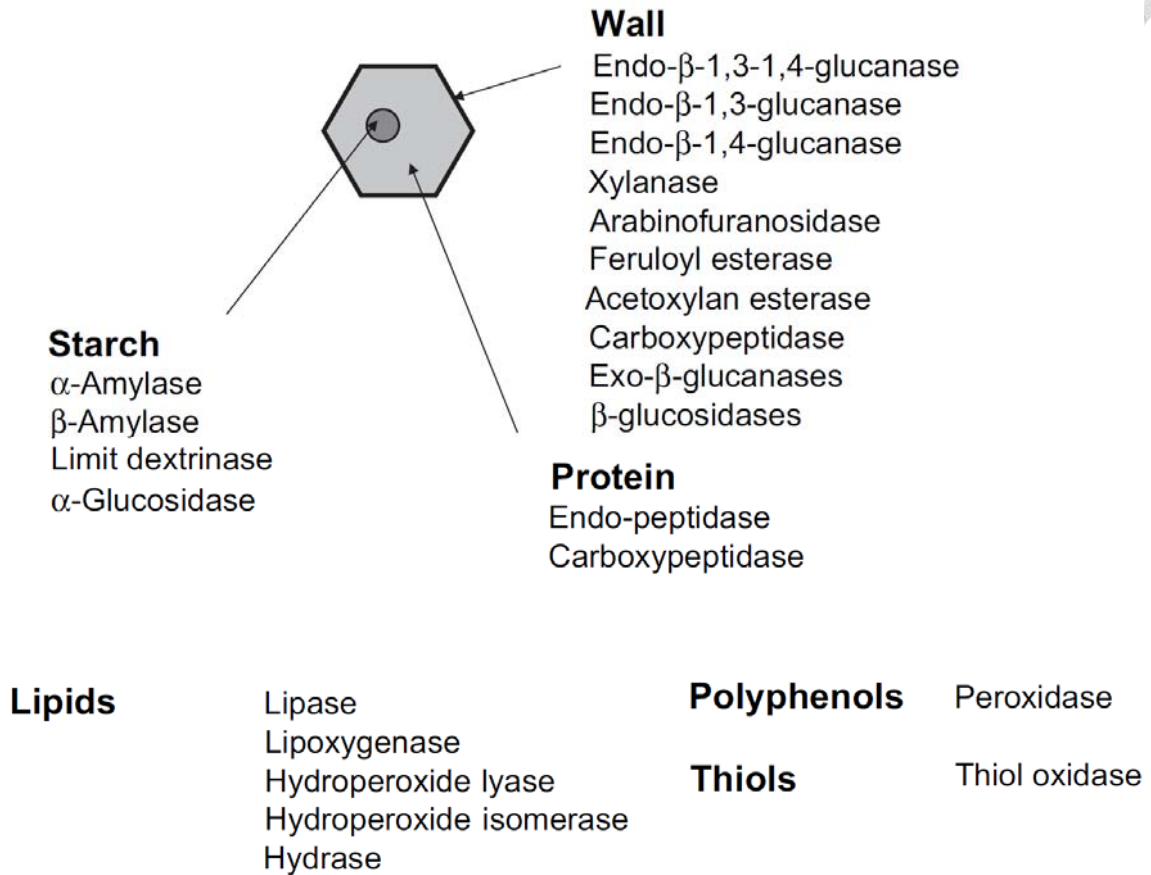


三、大麥

大麥 (barley) 學名為 *Hordeum vulgare*，大麥為釀造啤酒之主要原料，製麥 (malting) 之目的為大麥經過浸泡、發芽進而產生大量酵素，使胚乳中儲藏的物质適當地分解，再經烘焙乾燥去除水分，促進香氣及色素等物質形成。圖二 (Bamforth, 2009) 為大麥含有的酵素種類，常見的酵素有細胞壁分解酵素、蛋白質分解酵素及澱粉分解酵素。

大麥細胞壁主要成分為 β -glucan 且伴隨著少量的 arabinoxylan 和 protein，有研究利用 β -glucanase 和 pentosanase 分解大麥細胞壁，成效非常顯著 (Scheffler and Bamforth, 2005)，唯有細胞壁被充分地分解才能讓蛋白質和澱粉能繼續被分解。而大麥芽含有超過 40 種 endopeptidase，可被分類成 cysteine-、metallo-、aspartic 和 serine proteinases (Jones, 2005)。

大麥組成以澱粉為主，亦提供大麥發芽的主要碳源，大麥芽主要含有的澱粉分解酵素為 α -amylase、 β -amylase 及 limit dextrinase， α -amylase 可以快速地隨機切斷澱粉的 (1 \rightarrow 4)- α 糖苷鍵，產生線性或具有分支的糊精； β -amylase 由非還原端開始水解產生麥芽糖；limit dextrinase 則是分解 (1 \rightarrow 6)- α 糖苷鍵，將具有分支的糊精水解產生線性糊精，供 β -amylase 繼續分解成麥芽糖 (Sancho *et al.*, 1999)。研究指出發酵玉米泥中添加 1.5% 的大麥芽，可顯著降低玉米泥的黏度 (Helland *et al.*, 2004)，故本研究以此文獻作為調整大麥芽添加濃度之依據。



(Bamforth, 2009)

圖二、大麥芽的重要酵素

Figure 2. Key enzymes from malt



四、益生菌


1. 益生菌之簡介

1.1 益生菌定義

益生菌 (Probiotics) 其字源衍生自希臘文 "for life", 意指對生命有益 (李及林, 2005)。1960 年波特蘭之俄勒岡醫學校之微生物學教授 Richard Parker, 相對於會殺死微生物之抗生素物質 (antibiotics) 取名有保護生命作用之有用物質 (protect of biotics = probiotics) (Gomes *et al.*, 1999), 其機制為透過兩種菌株互相促進生長之共生機制 (probiosis) 改善腸道內菌群的平衡、增強免疫系統以及促進營養之消化與生化作用 (Kopp-Hoolihan, 2001)。益生菌之定義眾說紛紜, 在最初被定義為一種原生於動物體內並可刺激其他物質生長之微生物 (Lilly and Stillwell, 1965), 但在多次學者的補充說明之後, 由 1989 年 Fuller 將其定義為一種藉由口服補充之食物以對宿主促進腸內菌相平衡產生有利影響之活菌補給物 (Fuller, 1989), 強調「活的微生物」才是益生菌。此一定義仍然廣為市售益生菌產品所使用; 而後凡是對宿主健康有益之微生物及其細胞組成物質, 而不一定是活菌者, 皆稱之為益生菌 (Salminen *et al.*, 1999)。

1.2 益生菌之特性及生理功能

根據聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization, FAO) 及世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 之益生菌定義為「攝取足夠的活菌數, 可提供宿主健康上的益處」, 主要為乳酸菌, 並以乳酸桿菌及雙叉桿菌為大宗 (Butel, 2014)。益生菌經人體食入後, 必須克服腸胃道之化學性抑制如胃酸及膽鹽, 以及物理性抑制如腸道之蠕動, 並且定殖 (colonization) 於腸壁細胞上生長, 成為腸道之優勢菌群。因此理想益生菌種應具備一些特性如: 其來源為人體、對酸及膽鹽具抗性、對人體腸細胞具吸附性、能產生抗菌物質、對致病原菌具拮抗性、人體攝取後具安定性及臨床證實具有健康效用等 (Gibson and Rohafroid, 1995; Lee and Salminen, 1995)。



除此之外，益生菌須在加工製造過程期間具穩定性，此為工業化產品優先考慮之重點，如：發酵後可形成優良風味、產品加工和貯存期間維持定殖、具有貯存安定性、乾燥處理後具安定性、貯存期間維持酸度及存活能力、具有效攝取劑量之實驗數據等 (Lee and Salminen, 1995)。但為適應加工上應用之特性，不易取得符合所有特點之菌株，因此益生菌之基本應用要件為：宿主腸道內正常棲息生態之一員且可於腸道內存活並生長，能提供宿主有益之效用以及相關產品之製程與貯存期間能維持活性及存活力 (Hull *et al.*, 1992)。表三為常見之益生菌種類 (Saad *et al.*, 2013)。

表三、常見之益生菌菌種



Table 3. Microorganisms used as probiotics

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Other lactic acid bacteria	Other
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilis</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

(Saad *et al.*, 2013)



許多研究證實益生菌對人體有營養機能、健康與治療等方面的功效，圖三為益生菌常見的人體健康功效 (Prado *et al.*, 2008)。

(1) 維持正常腸道之微生物菌相

益生菌具有增進宿主健康之功能，對人類而言主要藉由修飾腸道之代謝反應，增進腸內菌叢品質進而對宿主有正面效益 (Scheinbach, 1998)。人體腸道內有大量且複雜之菌群，彼此以互利共生或競爭的關鍵是須能生存於腸道中 (Bouhnik *et al.*, 1996)。一般而言，在健康人體腸道內之菌叢，多數屬於腸道內之正常菌群，能抑制外來害菌之生長、刺激免疫反應、降血脂及幫助食物消化吸收 (Gibson *et al.*, 2000)。

(2) 降低血膽固醇

Fukushima 等人 (1999) 指出，攝食益生菌之大鼠，其血清及肝臟中膽固醇含量相較未攝食益生菌者低。Harrison 等人 (1975) 發現，每日攝食含 *Lactobacillus acidophilus* 牛乳之新生兒，其血液中膽固醇明顯降低。目前推測益生菌降低血液中膽固醇之形式有兩種，一是乳酸菌具有膽鹽水解酶，可將膽鹽分解，使肝臟膽固醇轉化能力上升，進而使血液中膽固醇含量下降 (Begley *et al.*, 2006)；另一種為益生菌細胞膜可與膽固醇鍵結，吸附腸道內的膽固醇 (Pereira *et al.*, 2002)。

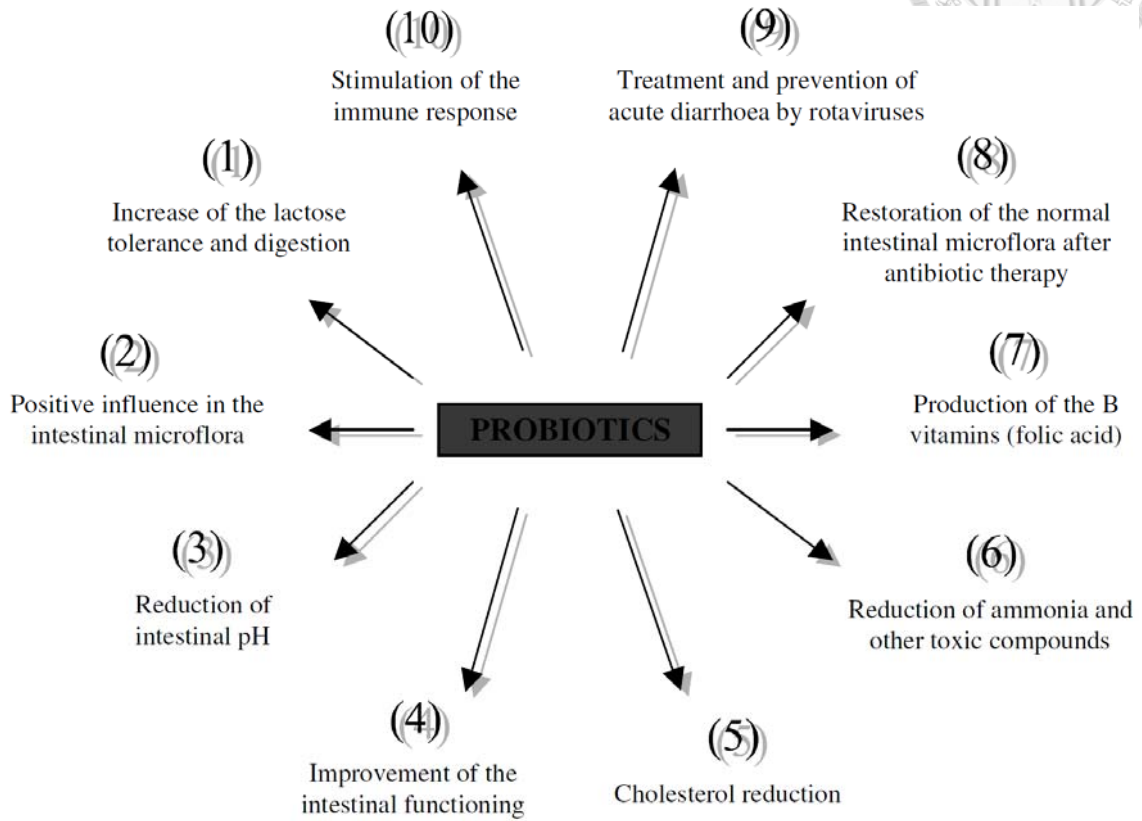
(3) 調節免疫機能

一般認為益生菌之免疫調節功能與菌體表面多醣有關，細胞壁含肽聚糖 (peptidoglycan)，其分解產物 muramyl peptide 可表現多種生理活性，促使細胞產生細胞激素，進而調節免疫反應 (Zubillaga *et al.*, 2001)。另有研究指出 *Bifidobacterium longum* 的 oligodeoxynucleotide 具有抑制 Th2 (T helper type 2) 系列之免疫反應 (Takahashi *et al.*, 2006)。

(4) 抗氧化

有研究利用乳酸菌培養的上清液及胞內物分別探討抗氧化能力，發現無論是上清液或胞內物相較於控制組均表現出良好的抗氧化能力 (Pieniz *et al.*, 2014)，顯示乳酸菌具抗氧化作用。





(Prado *et al.*, 2008)

圖三、益生菌對人體之健康功效

Figure 3. Probiotic beneficial effects on human health



2. 乳酸菌之簡介

2.1 乳酸菌定義

乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 是指能利用碳水化合物產生多量乳酸之細菌稱之，屬於公認安全食用菌 (GRAS) (Gibson and Rohafroid, 1995)。其分類主要應用傳統的鑑定方法 (生理學與型態學) 進行菌種分類，至 1980 年的一般乳酸菌有 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Streptococcus* 等四個屬，廣義的乳酸菌尚包括 *Bifidobacterium* 與 *Sporolactobacillus* 兩個屬，至 1992 年後由原本四屬增加成 *Lactobacillus*、*Carnobacterium*、*Weissella*、*Oenococcus*、*Atopobium*、*Enterococcus*、*Lactococcus*、*Vagococcus*、*Tetragenococcus*、*Leuconostoc*、*Streptococcus*、*Pediococcus* 等 12 屬。隨著分子生物技術進步，至 1999 年 12 月底已擴增成 16 屬，其新增之屬，主要依據 DNA 相似性與 rDNA 序列比對相似性作為分類方式 (張，2001)。

乳酸菌為革蘭氏陽性菌，幾乎不具運動性，除 *Sporolactobacillus* 之外，皆為非產孢菌。乳酸菌之營養需求複雜，須有碳水化合物、胺基酸、核酸衍生物、維生素及多種生長素等養分方可生長，通常缺乏觸媒 (catalase) 及細胞色素 (cytochrome)，故多為厭氧、微好氧或兼性厭氧菌，可於有氧環境下生長，但於無氧環境下之生長情況較佳，亦有絕對厭氧者 (廖，1998)。

2.2 乳酸菌之分類及特性

乳酸菌依外觀型態可分為球菌和桿菌，桿菌分乳酸桿菌 (*Lactobacillus spp.*) 及雙叉桿菌 (*Bifidobacterium*) 之不同菌屬。雙叉桿菌有呈 Y 字狀、彎曲狀、匙狀及桿棒狀 (張，2001)。乳酸菌依代謝途徑及最終產物之不同，可分成同型發酵 (homolactic fermentation) 及異型發酵 (heterolactic fermentation) 乳酸菌，前者經糖解作用將碳水化合物分解成丙酮酸 (pyruvate) 後，直接還原成約 90~100% 乳酸，其菌株包括部份 *Lactobacillus spp.*、*Lactococcus spp.*、*Pediococcus spp.*、*Streptococcus spp.*、*Tetragenococcus spp.* 及 *Vagococcus spp.* 等；而後者經糖解作用產生約 45~50%

理論值乳酸之外，亦可經由磷酸酮解酶作用 (phosphoketolase)，產生諸如酒精及二氧化碳等其他產物，其菌屬包括 *Bifidobacterium spp.*、*Carnobacterium spp.*、部份 *Lactobacillus spp.*、*Leuconostoc spp.*、*Oenococcus spp.*及 *Weissella spp.*等 (廖，1998)。

乳酸菌不論在食品或藥品中皆為典型的益生菌，是目前最廣泛使用的益生菌株。乳酸菌的功能主要分為調整腸道菌相、免疫調節作用及代謝作用三部分 (Parvez *et al.*, 2006)。

(1) 調整腸道菌相

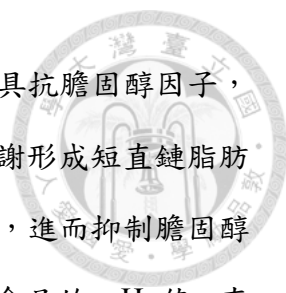
乳酸菌為腸道內常駐的益生菌，藉由吸附於腸道上皮絨毛細胞上與外來病原菌競爭吸附位置，或分泌有機酸或抑菌素，達到防護人體阻斷病原菌入侵的效果 (Parvez *et al.*, 2006)。許多臨床與動物實驗證實，服用乳酸菌可預防與治療腸胃道疾病，如旅行者腹瀉、抗生素誘發型腹瀉、食物病原菌引起的腹瀉、大腸急躁症候群、潰瘍性結腸炎及抑制幽門螺旋桿菌生長等 (潘，2008)。

(2) 免疫調節作用

乳酸菌在不同生理條件的宿主中所調節的免疫反應會有所不同，如乳酸菌在健康個體會促進免疫反應，對過敏患者則可抑制發炎反應 (Isolauri, 2004)。乳酸菌也具刺激淋巴細胞活化的能力，使 IgA 的濃度增加，並可產生 γ -干擾素刺激免疫系統抑制腫瘤的形成 (Paturi *et al.*, 2007)。

(3) 代謝作用

乳糖不耐症 (lactose intolerance) 是由於人體腸道內缺乏乳糖酶 (lactase)，無法分解部分糖類而使其直接進入大腸，被腸內菌分解產生氣體及短鏈脂肪酸，造成脹氣與腹瀉。乳酸菌會產生乳糖分解酶並將食品中的乳糖發酵，且乳糖酶活性不會受胃部酸性環境破壞，故能改善先天性腸黏膜 β -galactosidase 缺乏症造成的乳糖代謝障礙 (Heyman, 2000)。乳酸菌具膽鹽水解酵素活性，可使膽固醇代謝生成



去結合型膽鹽 (deconjugated bile acid), 其菌體成分或代謝產物亦具抗膽固醇因子, 可降低血清膽固醇 (Liong and Shah, 2005)。乳酸菌可將糖類代謝形成短直鏈脂肪酸, 具抑制 Hydroxymethylglutaric (HMG)-CoA reductase 之活性, 進而抑制膽固醇的合成 (Lim *et al.*, 2004)。乳酸菌所產生的乳酸與醋酸也可降低食品的 pH 值, 直接或間接抑制有害菌生長, 進而減少致癌物 (carcinogen), 降低大腸致癌性 (Rafter, 2002)。

3. 發酵製品之益處

發酵是一種簡單且經濟的食品加工技術, 發展歷史十分悠久, 利用微生物進行發酵可改變基質中之化學成分, 達到改善質地、產生特殊風味、增加消化率、提升營養價值等效果, 也可以延長食品保存期限 (羅與余, 2004)。發酵過程中, 微生物可能經由代謝過程產生抗氧化物質, 像是活性氧清除劑 (scavenger)、脂加氧酶抑制劑 (lipoxygenase inhibitors)、金屬螯合劑 (metal chelating agent) 等 (Ishikawa, 1992); 此外, 食品中的成分也可能因為微生物酵素作用而生成具有抗氧化性之物質 (Murakami, 1984)。

Lee *et al.* (2015) 以 *Streptococcus thermophilus* S10 作為單一菌醃及加入 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 作為混合菌醃發酵黑豆奶, 結果顯示隨著發酵時間增加, 發酵黑豆奶的 pH 值有顯著下降 ($p < 0.05$), 而可滴定酸度則是顯著地增加 ($p < 0.05$), 因此作者認為黑豆奶是適合乳酸菌生長之基質; 經過 24 小時的發酵, 發酵黑豆奶之總多酚含量及 DPPH 自由基清除能力都有顯著地增加 ($p < 0.05$), 不論是單一菌醃或是混合菌醃都比未發酵之黑豆奶更具有抗氧化活性。

Chien *et al.* (2006) 探討豆奶發酵過程中異黃酮含量及 β -glucosidase 活性之變化情形, 與未發酵豆奶相比, 發酵豆奶 glucoside 形式異黃酮含量下降, 而 aglycone 形式異黃酮含量則顯著增加 ($p < 0.05$), 研究指出 aglycone 形式異黃酮比 glucoside 形式異黃酮更具有生理活性, aglycone 形式異黃酮在小腸中吸收得比較快 (Izumi *et al.*, 2000)。接種乳酸菌發酵黑豆奶亦得到類似之實驗結果, 乳酸菌發酵時



β -glucosidase 活性顯著上升，使得 aglycone 形式異黃酮含量顯著增加 (Lee *et al.*, 2015)。

五、氧化作用及抗氧化之機制與原理

1. 自由基定義

自由基 (free radical) 含有一個或多個不成對電子的原子、分子或離子 (Halliwell and Gutteridge, 1985)，由於結構不穩定，其化學特性大部分處於極不穩定的狀態，反應性較其他分子高，會搶奪鄰近分子的電子形成電子對，使其達到穩定的狀態，被搶奪電子的分子則會變得不穩定，因而形成新的自由基，若又具有高度的活動性則會造成連鎖反應 (chain reaction)，促使更多自由基產生，造成化學性質、結構或功能上的改變，在生物體中容易造成細胞的危害 (Halliwell *et al.*, 1992)。

2. 自由基種類

(1) 活性氧 (Reactive oxygen species, ROS)

泛指以氧為中心之高反應性分子，可區分為下列五種：

a. 超氧陰離子 (Superoxide anion, O_2^-)

是最常產生之自由基，因體內粒線體電子傳遞鏈或吞噬細胞的過程中，皆會形成超氧陰離子，而超氧陰離子再經連鎖反應產生過氧化氫和氫氧自由基，對生物體造成嚴重傷害 (Halliwell, 1994)。

b. 過氧化氫 (Hydrogen peroxide, H_2O_2)

是因體內粒線體電子傳遞鏈或吞噬細胞的過程中產生之超氧陰離子，經連鎖反應後而生成之產物，過氧化氫通過細胞膜會與細胞內的鐵離子及銅離子產生破壞性極大的自由基 (Ahsan *et al.*, 2003)。

c. 氫氧自由基 (Hydroxyl radical, $OH\cdot$)

因放射線照射、過多紫外線或形成活性氧 (ROS) 等途徑產生的，造成體內脂質過氧化進而破壞細胞，會與體內的醣類、蛋白質、磷脂質等發生反應，尤其會



導致細胞凋亡或 DNA 突變 (Ahsan *et al.*, 2003)。

d. 單重態氧 (Singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)

單重態氧容易因脂質過氧化、光敏化或臭氧作用在有機分子時產生，當細胞照射紫外線，會使體內穩定的氧分子產生大量不穩定的氧分子，使其處於激發態，容易與氫發生作用 (Halliwell, 1994)。

e. 過氧化脂質 (lipid peroxidation, $\text{ROO}\cdot$)

過氧化脂質是自由基攻擊生物體中不飽和脂肪酸所形成的產物，這些產物會再進一步裂解成其他自由基，生成像是丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 等有害之醛類，與生物體中的蛋白質、胺基酸或 DNA 反應，進而引起慢性疾病 (Halliwell, 1994)。

(2) 活性氮 (Reactive nitrogen species, RNS)

RNS 是以氮為中心之高反應性分子，常見之活性氮分子包括一氧化氮 (nitric oxide, NO)、二氧化氮 (nitric dioxide, NO_2)、過氧亞硝基陰離子等 (Wiseman and Halliwell, 1996)。

一氧化氮是由一氧化氮合成酵素 (nitric oxide synthase, NOS) 將 L-arginine 轉變成 L-citrulline 時釋放出來的，已知 NOS 類型主要分為 eNOS (endothelial)、nNOS (neuronal) 及 iNOS (inducible)，其中 eNOS 及 nNOS 是自然存在於人體內，而 iNOS 則是體內有異物侵入時出現，具免疫調節功能 (Nathan and Hibbs Jr, 1991)，但是過多一氧化氮可能對人體造成危害，與超氧陰離子會生成過氧亞硝基陰離子 (peroxynitrite, ONOO^-)，於 pH 7.4 時形成過氧化硝酸，而過氧化硝酸會誘導脂蛋白之脂質過氧化作用及促使神經退化 (Przedborski *et al.*, 1996)。

3. 自由基之作用與傷害

自由基為細胞在氧化代謝過程中之正常產物，並具有一定之生理作用，其作用大致可分為代謝儲能、轉化排廢及防禦消毒等三類。生物體行呼吸作用與 ATP 儲能合成均與 $\text{O}_2\cdot^-$ 有關，肝臟氧化儲能也需先形成 H_2O_2 ；而體內清除代謝廢物時，

須在活性氧酶系作用下經過羥化等反應，轉化成高極性之衍生物，再經尿液或膽汁排出；吞噬細胞和溶酶體也可利用吞噬作用產生 H_2O_2 、 1O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 以抑制微生物或殺死不正常細胞，並進一步氧化破壞吞噬異物 (馮，1994)。

正常生物體內之氧化-抗氧化系統為平衡狀態，隨著老化或疾病影響，自由基與活性氧物質隨之增加，加速生物體生成自由基，此動態平衡就被破壞了，稱為氧化壓力 (oxidative stress)。細胞長期暴露在過多自由基或活性氧物質的情形下，會攻擊蛋白質、醣類、脂質、核酸、酵素等，造成氧化性傷害 (oxidative damage)，進而引發身體病變，導致老化、心血管疾病、癌症、神經功能失調、糖尿病、風濕性關節炎等 (Kehrer, 1993)。

過量自由基使得細胞膜上不飽和脂肪酸被攻擊，形成脂質自由基，進一步氧化形成過氧化自由基 (peroxyl radical) 與氫過氧化物 (hydroperoxide)，引發連鎖反應使細胞膜結構或通透性改變。脂質過氧化物經裂解、環化反應形成醛類 (如丙二醛)，使得低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 形成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized LDL)，因巨噬細胞無法將其完全分解而形成泡沫細胞 (foam cell)，堆積在動脈壁上形成脂肪斑 (fatty streak)，促使動脈粥狀硬化 (Cybulsky and Gimbrone, 1991)，因此丙二醛之含量常用來當作脂質過氧化程度之指標 (Niedernhofer *et al.*, 2003)。

自由基對蛋白質之氧化傷害包括破壞蛋白質肽鍵、胺基酸側鏈脂修飾、產生蛋白質氧化產物再與蛋白質酯鍵交聯結合成更大的分子，若蛋白質硫氫基被氧化，使許多酵素失活，進而造成蛋白質變性扭曲、斷裂，影響正常生理功能 (Stadtman, 1992)。

4. 抗氧化劑作用與機制

雖然自由基是人體正常氧化還原作用運作下之產物，但是過多自由基會導致細胞病變，因此必須靠抗氧化劑來保護細胞不受自由基侵害、阻止細胞病變，並且消除體內過多不正常之自由基。抗氧化劑是一類能抑制或阻斷自由基連鎖反應

之啟動與增生，降低自由基濃度、延緩衰老之化合物 (Halliwell *et al.*, 1995)。

4.1 自由基終止型 (Free radical terminator)

即所謂的一級抗氧化劑，其作用機制主要是干擾起始期自由基形成或延緩連鎖反應中的連鎖步驟 (propagation)。此類抗氧化劑之代表為酚類化合物，多具苯環結構，可放出氫氧基上的氫原子，提供電子給不安定的自由基分子，本身形成穩定的共振形式，以終止連鎖反應的進行 (Giese, 1996)。食品中常見的維生素 E、BHA、BHT 皆屬此類。

4.2 還原劑或氧清除劑 (Reducing agent or oxygen scavengers)

主要藉由抗氧化劑本身氧化還原能力來抑制氧化，其作用機制在於移轉氫原子與捕捉氧原子，提供一個傾向還原狀態的環境，還原已被氧化之過氧化物，延緩氧化作用的進行。此類抗氧化劑可有效地將超氧陰離子、氫氧自由基、過氧化自由基等氧自由基或非自由基類的過氧化氫等予以清除或不活化，使這些活性氧喪失起始及加速氧化反應進行之能力 (Namiki, 1990)。脂溶性的生育醇 (tocopherol)、水溶性的抗壞血酸和麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 等對活性氧及自由基之作用都是基於氧化還原反應原理。

4.3 單重態氧抑制劑 (Singlet oxygen inhibitor)

此類抑制劑主要是破壞單重態氧 (Singlet oxygen, $^1\text{O}_2$) 而抑制光氧化反應。常見的有 β -胡蘿蔔素、蕃茄紅素 (lycopene)、三乙基胺 (triethylamine) 等，其中 β -胡蘿蔔素為脂溶性抗氧化劑，具有很多雙鍵，可迅速和引起氧化連鎖反應之過氧化自由基 ($\text{ROO}\cdot$) 作用，形成穩定共振狀態的 carbon-central radical，亦可藉由清除活性氧達到抗氧化的效果 (陳與顏, 1998)。

4.4 金屬螯合劑 (Chelating agent)

食品中或多或少都有金屬離子存在，Dziedzic (1986) 指出食品中金屬離子含量即使低於 0.1 ppm 仍具有加速脂質氧化之能力，其中以鐵離子及銅離子之促氧化力最強。此類抗氧化劑本身不具有抗氧化的效果，但因其結構上有一未共用電子

對，可與金屬產生螯合作用而間接減緩基由基氧化作用之進行，達成抗氧化之目的，例如檸檬酸 (citric acid)、磷酸 (phosphoric acid) 及 EDTA 等皆屬此類。

4.5 抗氧化酵素 (Antioxidative enzyme)

除了抗氧化物之外，體內也含有酵素型抗氧化防禦系統，一些與金屬離子結合之酵素也可以清除活性氧，包括超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、觸媒 (catalase, CAT)、麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSHPx) 等。SOD 為好氧性生物體對抗氧化傷害的第一防禦系統，含鋅銅之 SOD 主要存在於細胞質或葉綠體中，含錳之 SOD 主要存在於粒線體，含鐵之 SOD 則存在於原核生物或葉綠體中。主要能促使超氧陰離子轉化成過氧化氫 (Kazzaz *et al.*, 1996)；CAT 存在於細胞膜過氧化物之含鐵酵素，可催化過氧化氫分解成水和氧 (Chance *et al.*, 1979)；GSHPx 藉由還原態的 GSH 氧化為氧化態的 GSSG 而清除過氧化氫，亦會還原脂質過氧化物和氫過氧化物 (陳與顏，1998)。

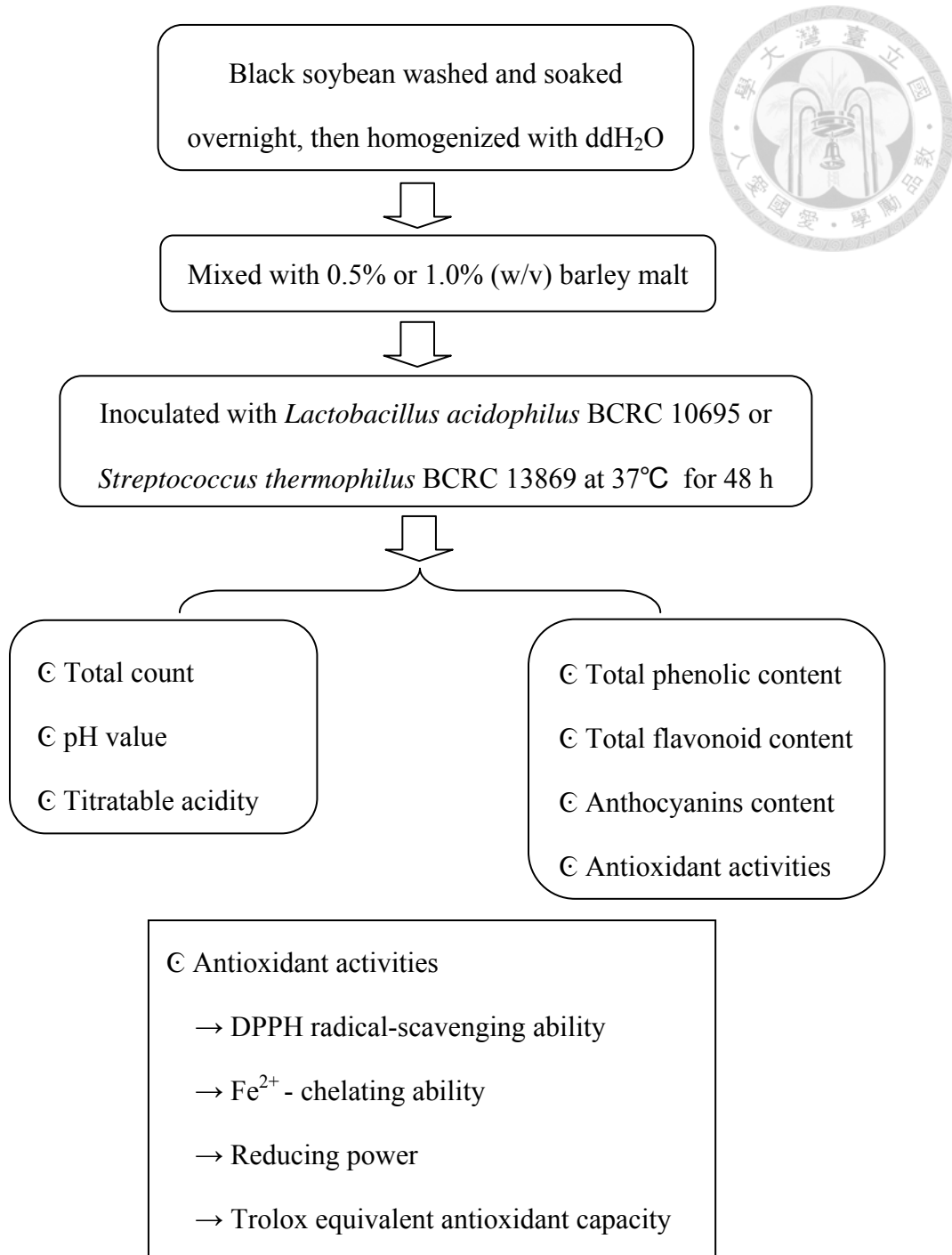
4.6 天然抗氧化劑

在食品加工及保存過程中，添加抗氧化劑為一重要關鍵，人工合成及天然的抗氧化劑常應用於食品上，BHA、BHT 等合成的抗氧化劑性質安定、成本低且容易取得，因此廣泛用於食品中，但是合成之抗氧化劑有安全上之顧慮，研究指出 BHA 及 BHT 可能導致肝臟病變 (Imida, 1983)，使得合成抗氧化劑的安全性受到質疑。天然抗氧化劑乃自然存在，非經化學合成，多種植物如穀類、豆類、蔬菜、茶葉、海藻、蛋白質水解物等都被發現具有極佳之抗氧化性，目前已知天然抗氧化成分主要為酚類物質 (類黃酮、花青素、類胡蘿蔔素) 與有機酸 (維生素 C、維生素 E) 等 (Shimada *et al.*, 1992)。

參、實驗架構

本研究探討添加大麥芽對於乳酸菌在黑豆奶中生長以及黑豆奶抗氧化能力之影響，期望藉由大麥芽之酵素將黑豆中大分子分解成可被乳酸菌利用之小分子，藉以提升乳酸菌之生長，並藉由乳酸菌生長增加黑豆奶抗氧化之能力。

實驗分成兩部分，先以 *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695 及 *Streptococcus thermophilus* BCRC 13869 兩株乳酸菌分別進行黑豆發酵，並添加不同濃度之大麥芽萃取液，觀察發酵過程乳酸菌在黑豆大麥芽液中之生長情形，第二部分則是探討發酵過程中總多酚、花青素、總類黃酮等抗氧化成分含量之變化情形，並分析黑豆大麥芽發酵液之抗氧化能力。本研究之實驗架構圖如圖四。



圖四、實驗流程圖

Figure 4. Experimental flowchart

肆、材料與方法



一、實驗材料

1. 黑豆

本研究使用之黑豆為青仁黑豆 [*Glycine max* (L.) Merr.]，購自當地市場（臺北，臺灣）。

2. 大麥芽

本研究使用之大麥芽 (*Hordeum vulgare*) 購自汎球國際貿易有限公司（彰化，臺灣）。

3. 菌種


本研究所使用之菌株為 *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695 與 *Streptococcus thermophilus* BCRC 13869，兩株菌株均是購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心（新竹，台灣）。

4. 培養基

Lactobacilli MRS broth、Lactobacilli MRS agar 及 Peptone 均為 Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) 之產品。


5. 試驗藥品

- a. 95%酒精：台灣菸酒股份有限公司（臺南，臺灣）
- b. Peptone：BD. Co., Franklin Lakes, NJ, USA
- c. Folin-Ciocalteu's phenol reagent、Methanol：Fluka, St. Gallen, Switzerland
- d. Potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$]: Hayashi (Osaka, Japan)
- e. Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$): J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA
- f. Sodium hydroxide (NaOH): Merck (Darmstadt, Germany)
- g. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)、Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4): Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)

- 
- h. Hydrochloric acid (HCl): Riedel-deHaen (Seelze, Germany)
- i. Potassium chloride (KCl): Showa, Tokyo, Japan
- i. (+)-catechin、2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)、2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)、6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox)、Aluminium chloride (AlCl_3)、Ferric chloride (FeCl_3)、Ferrous chloride (FeCl_2)、Ferrozine、Gallic acid、Sodium acetate (CH_3COONa)、Sodium carbonate (Na_2CO_3)、Sodium nitrite (NaNO_2)、Trichloroacetic acid (TCA): Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
- j. Dimethyl sulfoxide (DMSO): Wako (Osaka, Japan)

6. 儀器設備

- a. 蒸餾水製作裝置 (Distillation unit) (Buchi, Model 315, Flawil, Switzerland)
- b. 去離子水製作裝置 (Millipore Co., Massachusetts, USA)
- c. 無菌操作台 (Laminar flow, TH-420) (Tsao Hsin Ent. Co. Ltd., Taipei, Taiwan)
- d. 離心機 (model RC5C, Dupont Co., Delaware, USA)
- e. 恆溫震盪水浴槽 (model 903, Hotech Co., Taipei, Taiwan)
- f. 水浴槽 (model E-200, Lauda Co., Darmstadt, Germany)
- g. 果汁碎冰機 (MX2050) (百靈, 臺北, 臺灣)
- h. 臥式殺菌釜 (TOMIN Autoclave TM-322) (L.M.I. Co. Ltd., Taipei, Taiwan)
- i. 恆溫恆濕培養箱 (model 621 RHD, Hotech Co., Taipei, Taiwan)
- j. 攪拌均質機 (Vortex Mixer Genie) (Scientific Industries Co., Bohemia, NY, USA)
- k. 微量吸管 (Transferpette[®] 5000 μL , 1000 μL , 200 μL , 100 μL , 20 μL) (Brand, Wertheim, Germany)
- l. 菌落計數器 (Colony counter 570) (Suntex Instrument Co. Ltd., Taipei, Taiwan)
- m. 酸鹼測定計 (Micro-computer pH meter) (Model F-21, Horiba Ltd., Kyoto, Japan)
- n. 自動滴定儀 (Titrette) (Merck, Darmstadt, Germany)

- 
- o. 酵素免疫分析自動判讀儀 (ELISA reader) (VersaMax™ tunable microplate reader, Molecular Devices Co., California, USA)
 - p. 分析天平 (Electronic balance, B204-S) (Mettler-Toledo Inc., Taipei, Taiwan)
 - q. 無菌培養皿 (Petri dish, Model 9 cm plate) (RAFA Inc. Co., New Taipei, Taiwan)
 - r. 96 孔盤 (Micro well plate, Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Denmark)

二、樣品製備

1. 菌株保存與活化

將保存 *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695 與 *Streptococcus thermophilus* BCRC 13869 之冷凍小管置於 37°C 水浴槽中解凍回溫，接種 1% 菌液至 MRS broth 中，於 37°C 下培養 2 天後，置於 4°C 冰箱中保存 (Wang *et al.*, 2003)。

2. 菌株冷凍保存

菌株之保存採用 DMSO (dimethyl sulfoxide) 為抗凍劑，將 37°C 下培養 2 天後之菌液與 DMSO 以 9:1 之比例混合後，置於 -80°C 冰箱保存 (Lee *et al.*, 2006)。

3. 菌株接種源之製備

進行實驗之前，將 4°C 冰箱中保存之菌液接種於 MRS broth 中，於 37°C 下培養 24 小時，經兩次繼代培養後，再以無菌之 0.02 % peptone water 適當稀釋後，作為接種源。取 1 mL 至 50 mL 豆奶中，使初始菌數為 10^5 CFU/mL。

4. 黑豆大麥芽汁之製備

黑豆奶之製備參考 Wang *et al.* (2003) 稍作修改，將黑豆清洗後，加入 4 倍重量之蒸餾水浸漬隔夜，取出滴乾並移除浸漬液，重新加入 7 倍黑豆乾中之蒸餾水，以果汁機打漿 3 分鐘後，經三層棉紗布過濾，將濾液置於 121°C 滅菌 15 分鐘，冷卻後即得黑豆汁。另將大麥芽分別以黑豆奶體積之 0.5% (w/v) 與 1.0% (w/v) 倒入果汁機中均質 2 分鐘，以三層棉紗布過濾後，與冷卻之黑豆奶混合均勻，即得黑豆大麥芽汁。



5. 黑豆大麥芽發酵液之製備

將黑豆大麥芽汁分別接種 2% (v/v) *Lactobacillus acidophilus* BCRC 10695 與 *Streptococcus thermophilus* BCRC 13869，置於 37°C 下靜置培養 48 小時，培養期間定期取樣進行後續分析。

三、分析方法

1. 黑豆大麥芽發酵液乳酸菌生長情形之測定

1.1 乳酸菌菌數測定

定點取 0.1 mL 黑豆大麥芽發酵液至 9.9 mL 已滅菌之 0.02% peptone water 進行序列稀釋，選擇 3 個適當之稀釋倍數，取 1 mL 稀釋菌液注入培養皿中，以傾注法 (pour plate) 倒入低於 50°C 且呈液態之 MRS agar 混合均勻，待固化後置於 37°C 下靜置培養 48 小時後，取出培養基以菌落計數器計算其菌落數 (Wang *et al.*, 2003)。

1.2 pH 值測定

取適量黑豆大麥芽發酵液置於燒杯中，放入已校正之酸檢測定計電極，於室溫下直接讀取發酵液之 pH 值。

1.3 可滴定酸度測定

參考 AOAC (2012) 之方法，取 1 mL 發酵液加入 10 mL 蒸餾水，利用自動滴定儀以 0.01 N NaOH 標準溶液滴定至 pH 8.5，記錄 NaOH 滴定體積，再依下列公式換算成以乳酸計算可滴定酸度 (%)。

$$\text{lactic acid (\%)} = (N \times f \times V \times 0.090 / v) \times 100\%$$

f: NaOH 標準溶液之力價

N: NaOH 標準溶液之當量濃度

V: NaOH 標準溶液滴定值(mL)

v: 樣品體積(mL)



2. 酚類化合物測定

2.1 總酚含量測定

總酚含量參考 Folin-Ciocalteu assay (Singleton *et al.*, 1999) 稍作修飾，將發酵液經離心 (9,000 rpm, 10 min, 25°C) 去除菌體並適當稀釋，取 20 μ L 樣品加入 80 μ L 7.5% sodium carbonate 及 100 μ L Folin-Ciocalteu's phenol reagent，避光反應 30 分鐘後，以 Elisa reader 檢測波長 765 nm 下之吸光值。

另配置 gallic acid 之標準溶液繪製標準曲線，樣品中總酚含量以每 100 mL 黑豆奶中所含 gallic acid 毫克數表示 [mg gallic acid equivalents (GAE)/ 100 mL black soymilk] (Xu *et al.*, 2008)。

2.2 總類黃酮含量測定

參考 Heimler *et al.* (2005) 之方法稍作修飾，將發酵液經離心 (9,000 rpm, 10 min, 25°C) 去除菌體並適當稀釋後，取 250 μ L 樣品，加入 75 μ L 5% sodium nitrite 均勻混合，反應 6 分鐘後，再加入 150 μ L 10% aluminium chloride，反應 5 分鐘後，加入 0.5 mL 1 M sodium hydroxide，最後以去離子水定量至 2.5 mL，測定波長 510 nm 之吸光值。另配置(+)-catechin 標準溶液繪製標準曲線，總類黃酮含量以每 100 mL 黑豆奶中含有之(+)-catechin 毫克數 [mg of (+)-catechin equivalents (CAE)/100 mL black soymilk)] 表示。

2.3 花青素含量測定

本研究以不同 pH 值下花青素呈現出不同顏色之原理測定其含量，將發酵液經離心 (9,000 rpm, 10 min, 25°C) 去除菌體並適當稀釋後，取 50 μ L 樣品分別與 pH 1.0 之 0.025 M potassium chloride 和 pH 4.5 之 0.4 M sodium acetate 各 200 μ L 於暗室下反應 15 分鐘，兩者皆於波長 510 nm 及 700 nm 下測定吸光值 (Lee *et al.*, 2005)，花青素含量將以每 100 mL 黑豆奶中含有之 cyanidin-3-glucoside 毫克數[mg of cyanidin-3-glucoside equivalents (C3GE)/100 mL black soymilk)] 表示，其計算公式如下：



$$\text{Anthocyanin content (mg/L)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\varepsilon \times l)$$

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

MW 為 cyanidin-3-glucoside 之分子量 449.2 g/mol

DF 為樣品稀釋倍數

ε 為 cyanidin-3-glucoside 之莫耳吸光係數 26900 L/mol \times cm

l 為光程 (pathlength)，以 cm 表示

3. 抗氧化能力分析

3.1 DPPH 自由基清除能力

參考 Shimada *et al.* (1992) 之方法稍作修改，將發酵液經離心 (9,000 rpm, 10 min, 25°C) 去除菌體並適當稀釋後，取 50 μ L 樣品加入 150 μ L 含有 100 μ M DPPH 之甲醇溶液，於室溫下避光反應 30 分鐘，以 Elisa reader 檢測波長 517 nm 下之吸光值 (A)，並以 50 μ L 甲醇取代樣品進行測定即為 DPPH 溶液本身之吸光值 (A_b)，以 150 μ L 甲醇取代 DPPH 溶液進行測定即為樣品本身之吸光值 (A_s)，清除率之計算方式：

$$\text{清除率 (Scavenging effect, \%)} = [A_b - (A - A_s) / A_b] \times 100\%$$

3.2 亞鐵離子螯合能力

參考 Dinis *et al.* (1994) 之方法稍作修飾，將發酵液經離心 (9,000 rpm, 10 min, 25°C) 去除菌體並適當稀釋後，取 500 μ L 樣品加入 300 μ L 去離子水及 50 μ L 之 2 mM ferrous chloride，混勻靜置 30 秒後，再加入 100 μ L 之 5 mM ferrozine 靜置反應 10 分鐘，以 Elisa reader 檢測波長 562 nm 下之吸光值 (A_s)，並以去離子水取代樣品作為控制組測定吸光值 (A_b)，螯合能力以百分率表示，計算方式如下：

$$\text{螯合率 (Chelating effect, \%)} = (1 - A_s / A_b) \times 100\%$$

3.3 還原力

參考 Oyaizu (1986) 之方法稍作修改，將發酵液經離心 (9,000 rpm, 10 min, 25°C) 去除菌體並適當稀釋後，將樣品、200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6) 與

1% potassium ferricyanide 各 250 μ L 混合均勻，置於 50°C 水浴反應 20 分鐘後，加入 250 μ L 之 1% trichloroacetic acid，以轉速 6,000 rpm 在 4°C 下離心 10 分鐘，取 100 μ L 上清液混合 100 μ L 去離子水及 20 μ L 之 0.1% ferric chloride，以 Elisa reader 測量波長 700 nm 之吸光值，還原力直接以吸光值表示。

3.4 TEAC 總抗氧化能力

參考 Re *et al.* (1999) 之方法並稍作修改，首先配製 7 mM ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) 溶液，並以此溶液配製 2.5 mM potassium persulfate，避光靜置 12-16 小時使之成為藍綠色 ABTS⁺溶液。進行實驗前先以 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) 稀釋 ABTS⁺溶液，使其於波長 734 nm 下之吸光值為 0.7 \pm 0.02，即可作為反應試劑進行後續實驗。

將發酵液經離心 (9,000 rpm, 10 min, 25°C) 去除菌體並適當稀釋後，取 100 μ L 樣品加入 1 mL 稀釋之反應試劑，室溫下避光反應 6 分鐘，以 Elisa reader 測量波長 734 nm 之吸光值(A)，並以 50 μ L 去離子水取代樣品進行測定即為 ABTS⁺溶液本身之吸光值 (A_b)，以 1 mL 去離子水取代 ABTS⁺溶液進行測定即為樣品本身之吸光值 (A_s)，清除率之計算方式：

$$\text{清除率 (Scavenging effect, \%)} = [A_b - (A - A_s) / A_b] \times 100\%$$

另以不同濃度之 Trolox 標準溶液取代樣品進行試驗，建立 Trolox 濃度對應清除率之標準曲線，將樣品測得之清除率代入回歸式，換算每 100 mL 黑豆奶中含有之 Trolox 毫克數。

4. 統計分析

每項試驗均重複三次，所得之數據以平均值及標準偏差表示 (mean value \pm standard deviation, means \pm SD)。利用統計分析軟體 SAS (Statistical analysis system) 9.4 版 (SAS 2013) 進行統計分析，以 ANOVA 作變異數分析，並以鄧肯氏多變域測驗法 (Duncan's multiple range test) 比較各組試驗數值間之差異，當 $p < 0.05$ 視為各組試驗間具有顯著性差異 (沈，2014)。

伍、結果與討論



一、添加大麥芽對於黑豆發酵過程中乳酸菌生長之影響

1. 乳酸菌菌數之變化

表四顯示 *S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 未添加大麥芽及添加大麥芽於 37°C 發酵 48 小時後之乳酸菌菌數，可看出添加大麥芽之組別在 48 小時後之乳酸菌菌數明顯高於未添加大麥芽之組別；另圖五顯示 *S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 未添加大麥芽及添加大麥芽於 37°C 發酵 48 小時後之乳酸菌菌數變化情形，由圖五可發現 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵 12 小時後菌數迅速上升，在發酵 24 小時達到最高菌數 (8.32 Log CFU/mL)，而後隨著發酵時間增加而遞減；*L. acidophilus* BCRC 10695 則是一開始生長較緩慢，發酵 24 小時後才達到最高菌數 (7.78 Log CFU/mL)，之後亦隨著發酵時間增加而遞減，與 (Wang *et al.*, 2002) 以乳酸菌發酵豆奶之實驗結果相似，未添加大麥芽組以 *L. acidophilus* BCRC 10695 經 48 小時發酵之菌數最高 (7.12 Log CFU/mL)。

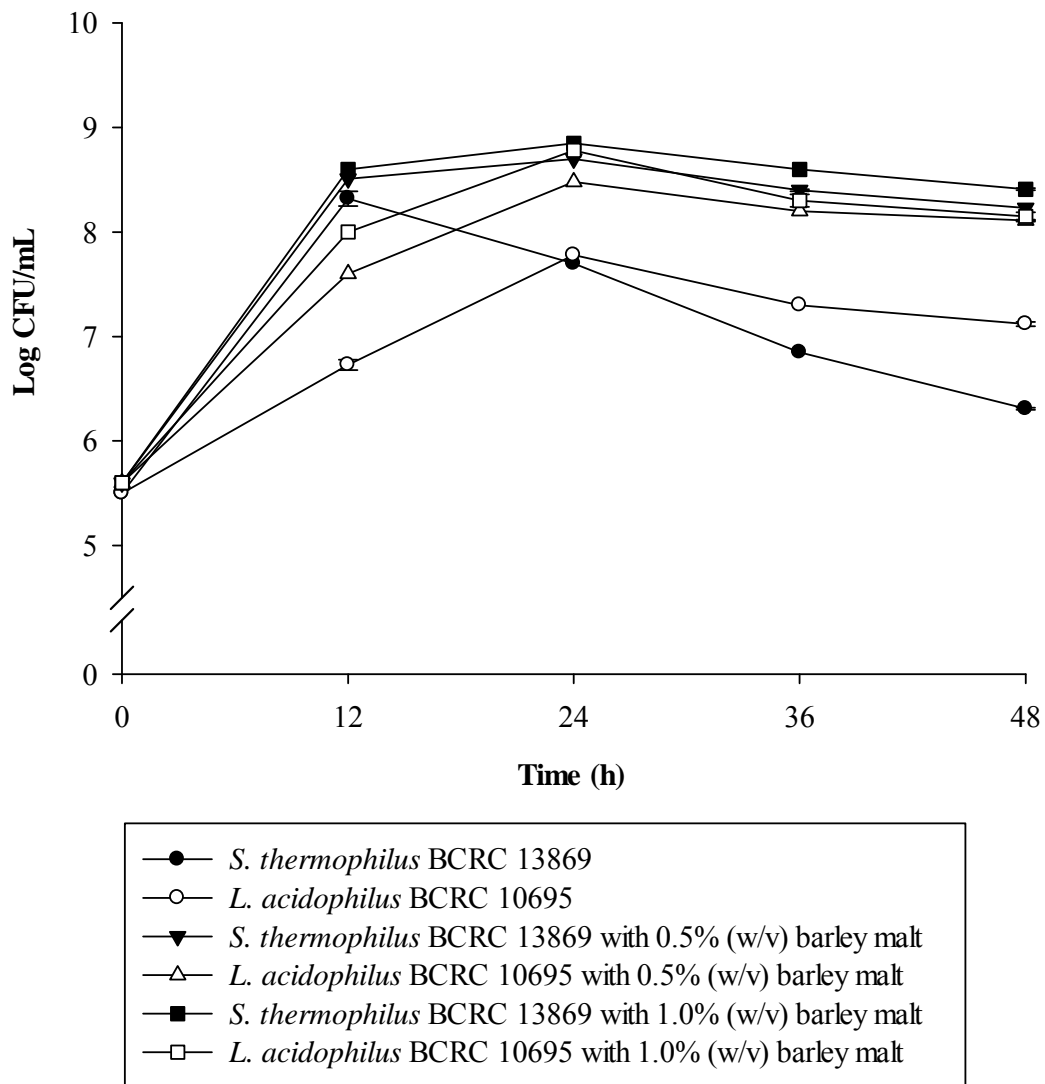
添加大麥芽之組別其乳酸菌生長趨勢與未添加大麥芽之組別相近，添加大麥芽之組別隨著發酵時間增加，其菌數遞減趨勢較緩慢，推測原因可能是大麥芽粉碎時釋出之酵素，將大分子物質分解成可被乳酸菌利用之小分子，提供較多營養物質給乳酸菌，因而維持了乳酸菌在發酵期間之生長。比較 *S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 添加大麥芽發酵黑豆奶之乳酸菌數，發現 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 48 小時後，最終菌數可達 8.41 Log CFU/mL，結果顯示 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加大麥芽發酵黑豆奶提升乳酸菌生長之效果較顯著 ($p < 0.05$)。另比較添加 0.5% 及 1.0% (w/v) 大麥芽之乳酸菌發酵情形，結果發現兩種大麥芽濃度對於發酵黑豆奶 48 小時後之菌數雖有顯著差異 ($p < 0.05$)，但是實際數值差距並不大，推測大麥芽濃度高低對乳酸菌生長情形不會造成太大影響。

表四、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵 48 小時之菌數

Table 4. Viable count of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt after 48 h fermentation at 37°C

	Viable count (Log CFU/mL)		
	Without barley malt	With 0.5% (w/v) barley malt	With 1.0% (w/v) barley malt
<i>S. thermophilus</i> BCRC 13869	^B 6.31±0.01 ^c	^A 8.23±0.01 ^b	^A 8.41±0.01 ^a
<i>L. acidophilus</i> BCRC 10695	^A 7.12±0.02 ^c	^B 8.11±0.01 ^b	^B 8.15±0.03 ^a


Each value is expressed as means±SD (n=3). Means with different uppercase letters (A,B) in the same column, and the lowercase letters (a,b,c) in the same row are significantly different ($p<0.05$).



圖五、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之菌數變化

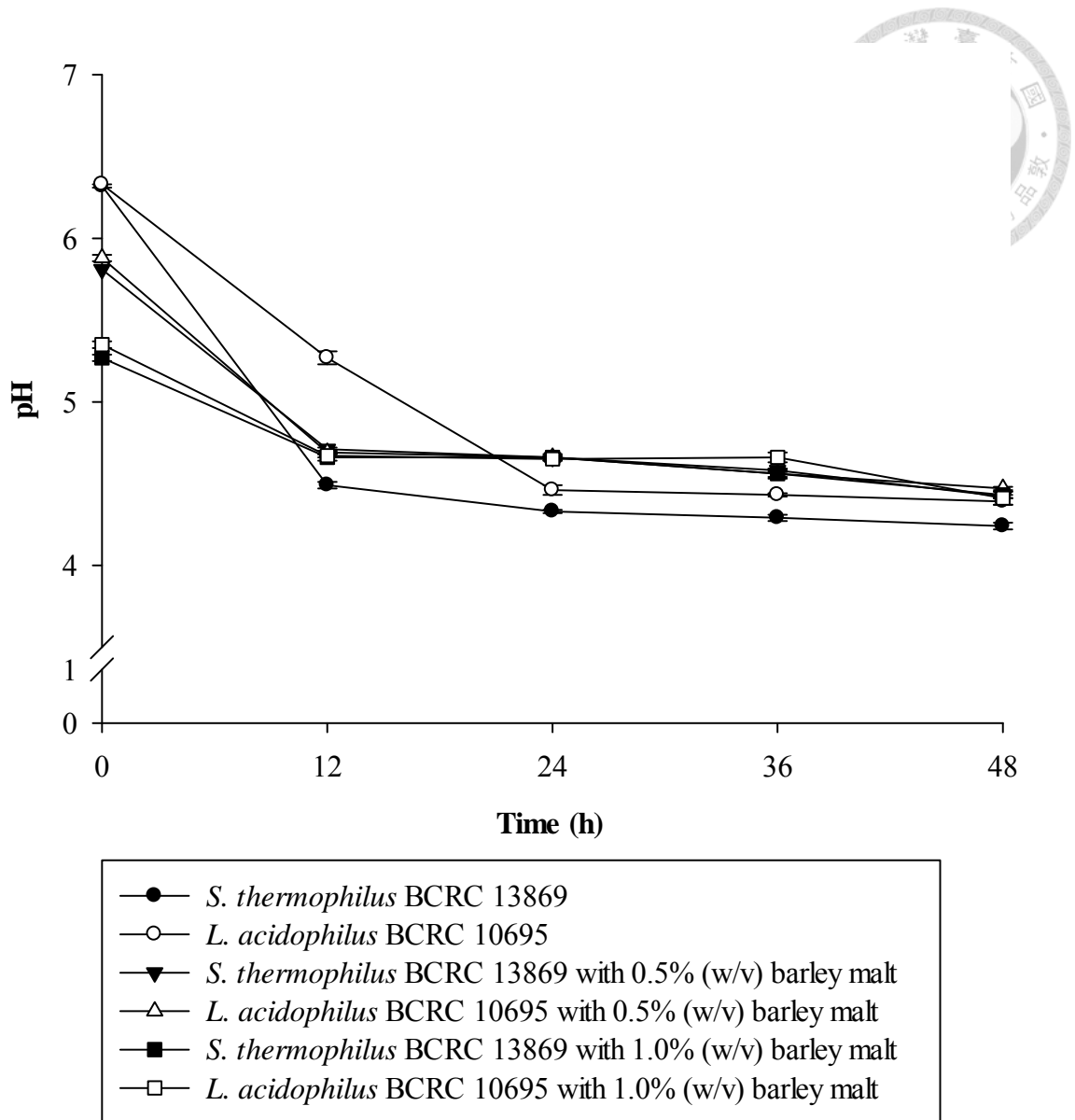
Figure 5. Viable count of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C. Each value is expressed as means±SD (n=3)

2. pH 值之變化



未添加大麥芽之控制組及添加大麥芽之實驗組在發酵期間之 pH 值變化如圖六所示，顯示控制組發酵 24 小時後 pH 值漸趨平穩，而實驗組之 pH 值則是發酵 12 小時後就沒有太大之變化；Lee *et al.* (2015) 以 *S. thermophilus* S10 single culture 及混合 *L. acidophilus* ATCC 4356 發酵黑豆奶，結果顯示發酵 24 小時後，pH 值也是急遽下降，由 6.28 降至 4.35，與本研究之實驗結果相近 (pH 6.32~4.33)。經過 48 小時發酵後之最終 pH 值如表五所示，結果顯示實驗組之 pH 值雖然與控制組有顯著差異($p < 0.05$)，但是實際數值沒有太大的差別。適當地 pH 值對乳酸菌生長及發酵豆奶之品質有重要影響，依據 Pinthong *et al.* (1980) 研究市售豆類優格產品之 pH 值大約是 pH 4.2~4.4，由結果可看出不論控制組 (pH 4.24、pH 4.39) 或實驗組 (pH 4.41~pH 4.47) 都有落在此範圍內，顯示添加大麥芽並不會抑制乳酸菌生長，與乳酸菌菌數測定結果一致。

另比較添加 0.5% 及 1.0% (w/v) 大麥芽對於發酵黑豆奶 pH 值之差異，結果顯示 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加不同濃度之大麥芽發酵黑豆奶其最終 pH 值沒有顯著差異，而 *L. acidophilus* BCRC 10695 之最終 pH 值在統計上雖有差異，但實際數值差別不大，周 (2014) 以 0.2% 及 0.4% (w/v) 大麥芽製備紫米發酵液，其最終 pH 值亦沒有顯著差異，可以看出大麥芽濃度高低對於發酵液 pH 值之影響並不明顯。



圖六、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之 pH 值變化

Figure 6. The pH value of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C. Each value is expressed as means±SD (n=3).

表五、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例
大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵 48 小時之 pH 值

Table 5. The pH value of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869
and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley
malt after 48 h fermentation at 37°C

	pH value		
	Without barley malt	With 0.5% (w/v) barley malt	With 1.0% (w/v) barley malt
<i>S. thermophilus</i> BCRC 13869	^B 4.24±0.02 ^b	^B 4.42±0.01 ^a	^A 4.43±0.02 ^a
<i>L. acidophilus</i> BCRC 10695	^A 4.39±0.02 ^b	^A 4.47±0.01 ^a	^B 4.41±0.04 ^b

Each value is expressed as means±SD (n=3). Means with different uppercase letters (A,B) in the same column, and the lowercase letters (a,b) in the same row are significantly different ($p<0.05$).



3. 可滴定酸度之變化

由表六看出添加大麥芽之發酵黑豆奶發酵 48 小時後，可滴定酸度與未添加大麥芽之發酵黑豆奶相比約上升 0.03~0.05%，依統計結果而言，控制組與實驗組有顯著差異 ($p < 0.05$)，但就實際數值似乎差異不大，顯示大麥芽雖然沒有抑制乳酸菌生長，卻也不會因此使乳酸菌產生較多之乳酸，對照 pH 值之實驗結果亦是如此。而乳酸菌發酵紫米添加大麥芽比起沒有添加大麥芽之紫米發酵液，其可滴定酸度可上升大約 1% (周，2014)，其最終 pH 值約為 pH 3.0~3.3，與本研究結果之差異，可能原因是發酵基質與乳酸菌種之不同，使得乳酸菌對大麥芽利用情形之不同。

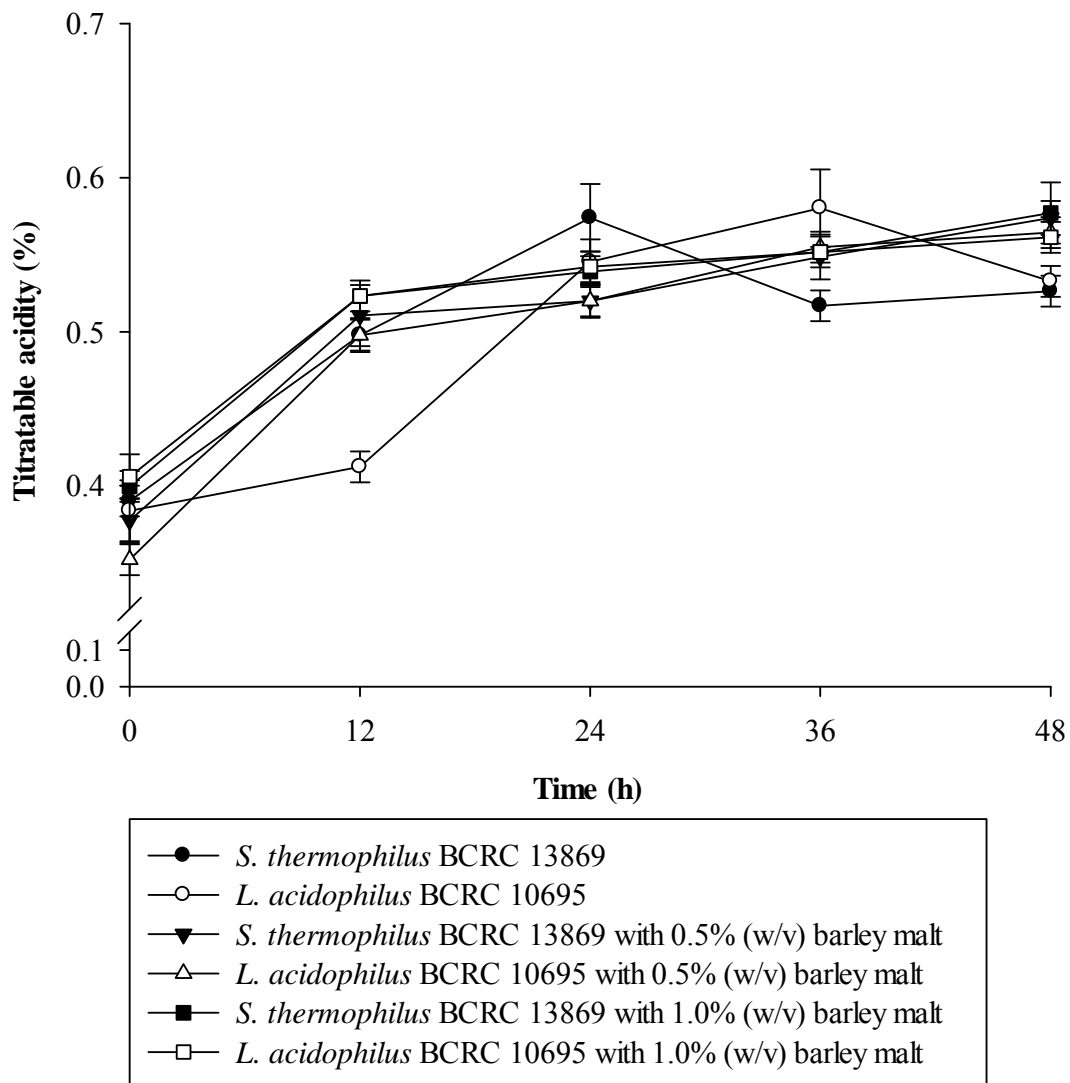
另比較添加 0.5% 及 1.0% (w/v) 大麥芽對於發酵黑豆奶可滴定酸度之差異，結果顯示不論是 *S. thermophilus* BCRC 13869 或是 *L. acidophilus* BCRC 10695 添加不同濃度之大麥芽發酵黑豆奶，其最終可滴定酸度 (0.56~0.58%) 沒有顯著差異。由圖七可看出發酵黑豆奶於 37°C 發酵期間可滴定酸度之變化，其中控制組 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵 24 小時後，可滴定酸度即達最大值，*L. acidophilus* BCRC 10695 則是發酵 36 小時才上升至最大值，之後便下降；實驗組之可滴定酸度均隨著發酵時間增加而上升，顯示添加大麥芽使乳酸菌於發酵期間可持續產酸，推測可能原因為大麥芽之酵素將黑豆奶之大分子分解為小分子，讓乳酸菌得以利用這些小分子持續代謝生長並產酸。

表六、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵 48 小時之可滴定酸度

Table 6. The titratable acidity of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt after 48 h fermentation at 37°C

	Titratable acidity (%)		
	Without barley malt	With 0.5% (w/v) barley malt	With 1.0% (w/v) barley malt
<i>S. thermophilus</i> BCRC 13869	^A 0.53±0.01 ^b	^A 0.57±0.01 ^a	^A 0.58±0.02 ^a
<i>L. acidophilus</i> BCRC 10695	^A 0.53±0.01 ^b	^A 0.56±0.01 ^a	^A 0.56±0.01 ^a

Each value is expressed as means±SD (n=3). Means with different lowercase letters (a,b) in the same row are significantly different ($p<0.05$).



圖七、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之可滴定酸度變化

Figure 7. The titratable acidity of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C. Each value is expressed as means±SD (n=3).



二、添加大麥芽對於黑豆奶中酚類化合物含量之影響

1. 總酚含量之變化

植物內含許多酚類化合物，為二級代謝物，研究證實酚類化合物具有抗氧化、抗致突變、抗發炎、抗癌等作用 (Soobrattee *et al.*, 2005)。 *S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 發酵黑豆奶於 37°C 發酵期間之總酚含量變化如表七所示，結果顯示不論是控制組或是實驗組，*S. thermophilus* BCRC 13869 發酵 12 小時後，其總酚含量顯著地增加 ($p < 0.05$)，而 *L. acidophilus* BCRC 10695 則是發酵 24 小時後才達最大值，之後總酚含量均隨著發酵時間增加而遞減，可能原因是乳酸菌在發酵過程使得酚類物質氧化，或者因乳酸菌發酵提高 β -glucosidase 之活性 (Lee *et al.*, 2015)、產生 esterase、decarboxylase，將酚類化合物的糖基、酯化物及羧基水解，使得酚類化合物之安定性下降，研究指出 *Lactobacillus paracasei* 於發酵過程會產生過氧化氫並將氧還原成過氧化氫 (Felten *et al.*, 1999)，也有研究指出乳酸菌在發酵過程會產生多種酵素，像是 benzyl alcohol dehydrogenase、decarboxylase、esterase 等，會導致酚類化合物降解 (Rodríguez *et al.*, 2009)。

雖然乳酸菌發酵過程最終導致整體總酚含量下降，但是添加大麥芽之組別發酵 48 小時後之總酚含量仍顯著地高於未添加大麥芽之組別 ($p < 0.05$)，且總酚含量下降的幅度相對控制組來得小，兩種菌株添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶之總酚含量也比添加 0.5% (w/v) 大麥芽來得高，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆奶添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 48 小時後，其總酚含量可達 71.2 mg GAE/100 mL black soymilk。結果顯示添加大麥芽可顯著增加乳酸菌發酵黑豆奶之總酚含量，而添加 1.0% (w/v) 大麥芽以 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆奶 12 小時，有最高之總酚含量 85.6 mg GAE/100 mL black soymilk，結果顯示控制發酵時間並添加大麥芽可顯著地提升乳酸菌發酵黑豆奶之總酚含量，且 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加大麥芽發酵黑豆奶對於提升總酚含量及減緩總酚含量降解之效果較 *L. acidophilus* BCRC 10695 者佳。

表七、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之總酚含量

Table 7. The total phenolic content of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C

Total phenolic content (mg *GAE/100 mL black soymilk)						
Time (h)			<i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	with 0.5% (w/v) barley malt	with 0.5% (w/v) barley malt	with 1.0% (w/v) barley malt	with 1.0% (w/v) barley malt
0	^D 45.2±0.04 ^d	^D 46.1±0.03 ^c	^E 44.5±0.23 ^e	^E 43.2±0.22 ^f	^E 47.3±0.11 ^a	^E 46.7±0.06 ^b
12	^A 55.3±0.12 ^e	^B 50.1±0.12 ^f	^A 70.1±0.04 ^c	^C 60.3±0.31 ^d	^A 85.6±0.23 ^a	^B 80.6±0.04 ^b
24	^B 50.2±0.07 ^f	^A 55.2±0.22 ^e	^B 67.8±0.06 ^d	^A 68.1±0.15 ^c	^B 74.7±0.05 ^b	^A 82.8±0.12 ^a
36	^C 47.3±0.12 ^f	^C 48.5±0.08 ^e	^C 65.4±0.11 ^c	^B 64.6±0.05 ^d	^C 72.5±0.07 ^a	^C 71.2±0.09 ^b
48	^E 34.6±0.06 ^e	^E 34.9±0.18 ^c	^D 53.2±0.07 ^c	^D 52.2±0.07 ^d	^D 71.2±0.05 ^a	^D 68.9±0.14 ^b

Each value is expressed as means±SD (n=3). Means with different uppercase letters (A,B,C,D,E) in the same column, and the lowercase letters (a,b,c,d,e,f) in the same row are significantly different (p<0.05).

*GAE is abbreviated as gallic acid equivalents.



2. 總類黃酮含量之變化

類黃酮是酚類化合物之一種，研究證實類黃酮具有促進人體健康之生理活性，如抗氧化、抗發炎、抗癌等活性功能 (Pedreschi *et al.*, 2006)。表八為 *S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 發酵黑豆奶於 37°C 發酵期間之總類黃酮含量變化，結果顯示不論是控制組或是實驗組，*S. thermophilus* BCRC 13869 發酵 12 小時後，其總類黃酮含量顯著地增加 ($p < 0.05$)，而 *L. acidophilus* BCRC 10695 則是發酵 24 小時後才達最大值，之後總類黃酮含量均隨著發酵時間增加而遞減，此實驗結果與總酚含量之趨勢相同。

雖然乳酸菌發酵過程最終導致總類黃酮含量下降，但是添加大麥芽之組別發酵 48 小時後之總類黃酮含量仍顯著地高於未添加大麥芽之組別 ($p < 0.05$)，且總類黃酮含量下降的幅度相對控制組來得小，兩種菌株添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶之總類黃酮含量也比添加 0.5% (w/v) 大麥芽來得高，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆奶添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 48 小時後，其總類黃酮含量可達 35.6 mg CAE/100 mL black soymilk。結果顯示添加大麥芽可顯著地增加乳酸菌發酵黑豆奶之總類黃酮含量 ($p < 0.05$)，且有減緩發酵過程總類黃酮降解之趨勢，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆奶添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 12 小時，有最高之總類黃酮含量 42.8 mg CAE/100 mL black soymilk，結果顯示控制發酵時間並添加大麥芽可顯著地提升乳酸菌發酵黑豆奶之總類黃酮含量，而且 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加大麥芽發酵黑豆奶對於提升總類黃酮含量之效果比 *L. acidophilus* BCRC 10695 好。

表八、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之總類黃酮含量

Table 8. The total flavonoid content of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C

Total flavonoid content (mg *CAE/100 mL black soymilk)						
Time (h)			<i>S.</i>	<i>L.</i>	<i>S.</i>	<i>L.</i>
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>thermophilus</i> with 0.5% (w/v) barley malt	<i>acidophilus</i> with 0.5% (w/v) barley malt	<i>thermophilus</i> with 1.0% (w/v) barley malt	<i>acidophilus</i> with 1.0% (w/v) barley malt
0	^C 23.2±0.14 ^a	^C 23.5±0.04 ^a	^E 22.8±0.24 ^b	^E 21.7±0.02 ^c	^E 22.6±0.11 ^b	^E 22.9±0.21 ^b
12	^A 30.5±0.02 ^d	^B 25.7±0.61 ^f	^A 35.7±0.12 ^c	^C 29.4±0.08 ^e	^A 42.8±0.05 ^a	^B 38.1±0.15 ^b
24	^B 24.2±0.07 ^f	^A 28.1±0.13 ^e	^B 33.5±0.03 ^d	^A 34.6±0.09 ^c	^B 37.9±0.01 ^b	^A 41.5±0.04 ^a
36	^D 20.1±1.12 ^f	^D 21.2±0.11 ^e	^C 31.3±0.42 ^c	^B 30.2±0.12 ^d	^C 36.5±0.02 ^a	^C 34.3±0.07 ^b
48	^E 17.4±0.05 ^e	^E 16.5±0.08 ^f	^D 26.8±0.05 ^c	^D 25.9±0.03 ^d	^D 35.6±0.03 ^a	^D 33.5±0.01 ^b

Each value is expressed as means±SD (n=3). Means with different uppercase letters (A,B,C,D,E) in the same column, and the lowercase letters (a,b,c,d,e,f) in the same row are significantly different (p<0.05).

*CAE is abbreviated as (+)-catechin equivalents.



3. 花青素含量之變化

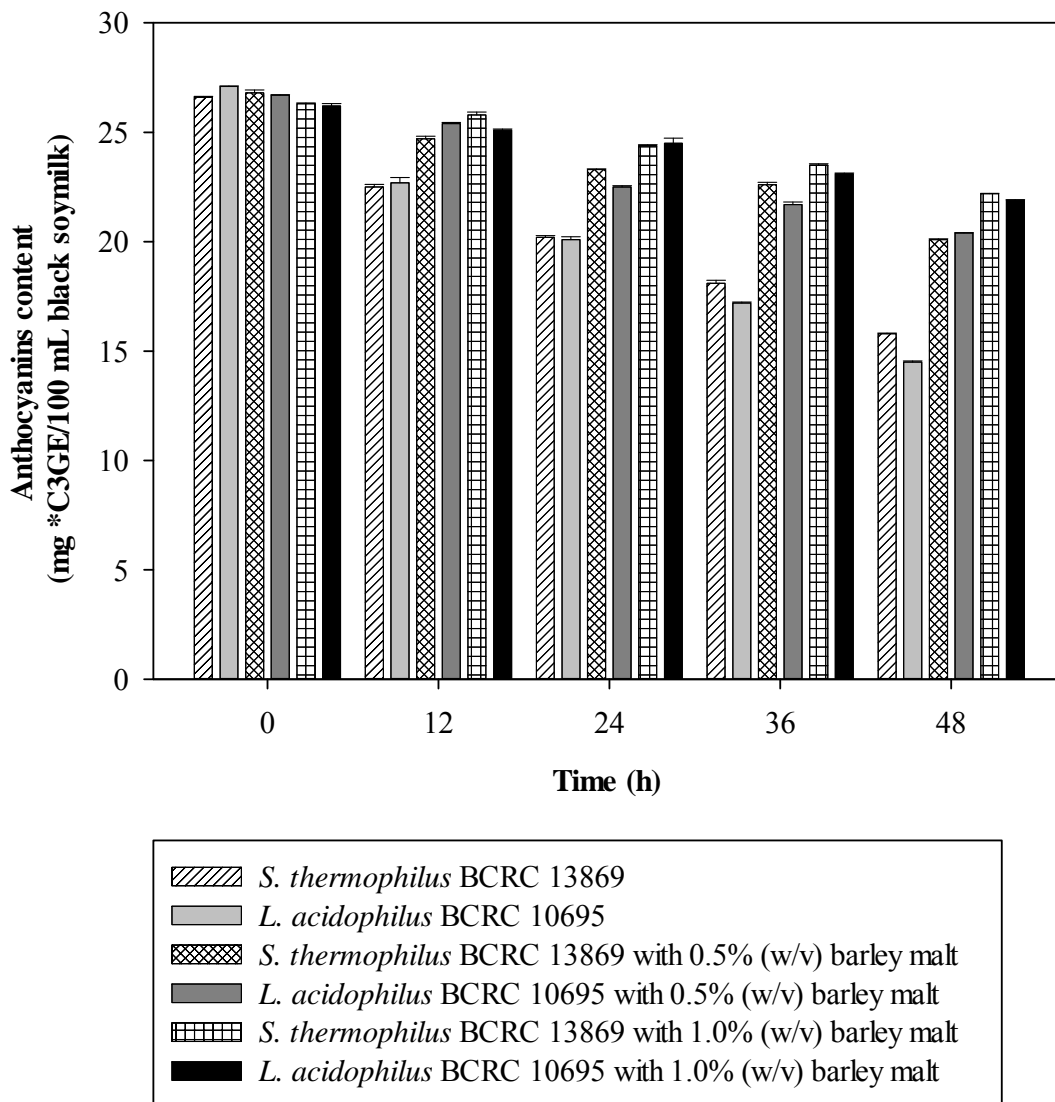
花青素屬類黃酮之一種，廣泛存在於許多蔬菜水果中，在不同 pH 值下呈現不同顏色，研究證實花青素具有多項生理功能，如抑制 LDL 與脂質氧化、抗癌、預防心血管疾病等 (Lohachoompol *et al.*, 2006)，但花青素為水溶性不穩定之色素，容易在不同處理過程及貯藏下脫色與裂解。林 (2006) 將黑豆麴以不同溫度加熱 30 分鐘，觀察加熱處理對黑豆麴中花青素含量之影響，結果顯示加熱溫度上升至 80 °C 時，黑豆麴中花青素含量顯著地下降了 72% ($p < 0.05$)，但是加熱溫度不高於 60 °C 下之花青素熱穩定性高。

S. thermophilus BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 發酵黑豆奶於 37°C 發酵期間之花青素含量變化如圖八所示，結果發現不論是未添加大麥芽之控制組或是添加大麥芽之實驗組，花青素含量均隨著發酵時間增加而遞減，推測本研究於基質處理過程如黑豆浸漬、均質、加熱等因素造成花青素大量損失，黃 (2011) 以 *Actinomucor spp.* 接種黑豆渣探討發酵期間花青素含量之變化，結果顯示黑豆渣花青素含量亦隨著發酵時間增加而減少；此外也可能因為微生物在發酵過程將較大分子的花青素，如原花青素降解成小分子花青素或是其他酚類物質，Keppler *et al.* (2005) 指出花青素含量會隨著發酵時間增加而減少，轉變成小分子酚類物質。郭 (2003) 亦指出黑豆經納豆菌發酵後花青素含量下降，推測花青素經微生物代謝轉換成其他形式之酚類化合物，如 cyanidin-3-glucoside 經酸或微生物水解會轉變成 cholconol 類化合物，具有較強之抗氧化活性。

雖然乳酸菌發酵過程導致花青素含量下降，但是由圖八可以發現添加大麥芽之組別發酵 48 小時後之花青素含量仍顯著地高於未添加大麥芽之組別 ($p < 0.05$)，且花青素降解之幅度亦較緩慢；兩種菌株添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶之花青素含量相較於添加 0.5% (w/v) 大麥芽也比較高，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆奶添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 48 小時後，其花青素含量達 22.9 mg

C3GE/100 mL black soymilk，推測大麥芽含有之酵素參與分解發酵基質，提供乳酸菌其他營養物質，減緩乳酸菌利用花青素進行代謝生長，實驗結果顯示添加大麥芽可減緩乳酸菌發酵黑豆奶過程中花青素含量降解之趨勢。





圖八、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之花青素含量

Figure 8. The anthocyanins content of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C. Each value is expressed as means±SD (n=3).



三、添加大麥芽對於黑豆奶抗氧化能力之影響

1. DPPH 自由基清除能力

DPPH 為一種安定之自由基，常用作研究抗氧化特性之方法 (Kordali *et al.*, 2005)，其甲醇溶液為紫色，於 517 nm 下有較強吸光值；當 DPPH 與抗氧化物結合時，抗氧化物提供氫離子還原 DPPH，使吸光值下降，藉此判斷其清除 DPPH 自由基之能力，吸光值越低表示抗氧化物質之清除能力越強 (Chou *et al.*, 2002)。表九為 *S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之 DPPH 自由基清除能力，結果顯示不論是控制組或是實驗組，*S. thermophilus* BCRC 13869 發酵 12 小時後，其 DPPH 自由基清除能力顯著地提高 ($p < 0.05$)，而 *L. acidophilus* BCRC 10695 則是發酵 24 小時後才達最大值，表示乳酸菌發酵黑豆奶可提升黑豆奶對於 DPPH 自由基之清除能力，Lee *et al.* (2015) 以 *S. thermophilus* S10 發酵黑豆奶亦得到相似結果。然而 DPPH 自由基清除能力隨著發酵時間增加而下降，由於 DPPH 自由基清除能力與抗氧化物質含量多寡有關，總酚、總類黃酮含量之變化亦是先升後降，與 DPPH 自由基清除能力之變化趨勢一致。

比較添加大麥芽與未添加大麥芽之組別發現不論是發酵初期或是發酵終點，添加大麥芽之實驗組其 DPPH 自由基清除能力顯著地高於未添加大麥芽之控制組 ($p < 0.05$)，且 DPPH 自由基清除能力下降之幅度相對控制組來得小；兩種菌株添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶之 DPPH 自由基清除能力也比添加 0.5% (w/v) 大麥芽來得高，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆奶添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 12 小時，其 DPPH 自由基清除率為 77.8%。結果顯示控制發酵時間並添加大麥芽可顯著地提升乳酸菌發酵黑豆奶之 DPPH 自由基清除能力，且 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加大麥芽發酵黑豆奶對於減緩 DPPH 自由基清除能力下降效果比 *L. acidophilus* BCRC 10695 來得好。

表九、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之 DPPH 自由基清除能力

Table 9. The DPPH radical-scavenging ability of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C

DPPH radical-scavenging ability (%)						
Time (h)			<i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	with 0.5% (w/v) barley malt	with 0.5% (w/v) barley malt	with 1.0% (w/v) barley malt	with 1.0% (w/v) barley malt
0	^B 62.8±0.11 ^b	^C 61.2±0.7 ^d	^D 63.3±0.04 ^a	^D 62.3±0.02 ^c	^E 61.4±0.05 ^d	^E 62.5±0.12 ^c
12	^A 66.5±0.03 ^d	^B 63.5±0.21 ^e	^A 68.9±0.12 ^b	^B 66.6±0.05 ^c	^A 77.8±0.02 ^a	^C 66.7±0.03 ^c
24	^C 58.3±0.08 ^f	^A 65.1±0.13 ^e	^B 66.3±0.03 ^d	^A 68.5±0.09 ^c	^B 73.4±0.13 ^a	^A 70.5±0.11 ^b
36	^D 52.7±0.04 ^e	^D 50.2±0.07 ^f	^C 63.6±0.01 ^d	^C 64.7±0.02 ^c	^C 69.1±0.06 ^a	^B 67.2±0.04 ^b
48	^E 48.5±0.11 ^e	^E 46.5±0.05 ^f	^E 62.1±0.03 ^c	^E 61.1±0.05 ^d	^D 68.5±0.01 ^a	^D 65.9±0.02 ^b

Each value is expressed as means±SD (n=3). Means with different uppercase letters (A,B,C,D,E) in the same column, and the lowercase letters (a,b,c,d,e,f) in the same row are significantly different (p<0.05).

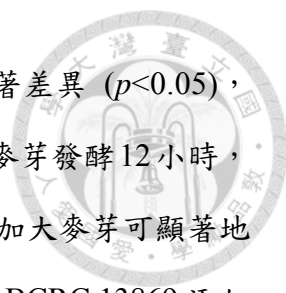


2. 亞鐵離子螯合能力

亞鐵離子 (Fe^{2+}) 經由 Haber-Weiss Fenton reaction 生成 $\text{HO}\cdot$ 自由基，過多的 Fe^{2+} 使 oxygen-derived free radicals 快速生成，造成脂質過氧化及細胞傷害 (Kadkhodae *et al.*, 2004)，因此若能螯合金屬離子降低其濃度，當能降低氧化傷害 (Moore *et al.*, 2004)。亞鐵離子螯合能力之測定是藉由 Fe^{2+} 與 ferrozine 反應生成 Fe^{2+} -ferrozine 之複合物，此複合物於 562 nm 下具有較大之吸光值，若 Fe^{2+} 與抗氧化物結合，減少 Fe^{2+} -ferrozine 之生成，則吸光值會降低，以此判斷樣品螯合亞鐵離子之能力，吸光值越低表示螯合亞鐵離子之能力越強 (Dinis *et al.*, 1994)。

S. thermophilus BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之亞鐵離子螯合能力如表十所示，結果顯示不論是未添加大麥芽之控制組或是添加大麥芽之實驗組，*S. thermophilus* BCRC 13869 發酵 12 小時後，其亞鐵離子螯合能力顯著地提高 ($p < 0.05$)，而 *L. acidophilus* BCRC 10695 則是發酵 24 小時後才達最大值，表示乳酸菌發酵黑豆奶可提升黑豆奶螯合亞鐵離子之能力。文獻指出豆科植物所含之酚類化合物具有螯合亞鐵離子之能力 (Shahidi *et al.*, 1992)，亦指出黑豆異黃酮具有抗氧化能力及螯合金屬之能力 (黃，2007)，推測螯合機制與酚類物質之結構有關，特定位置之碳上有氫氧基時，具有較佳之螯合能力 (Kao *et al.*, 2006)。黃 (2007) 研究指出黑豆麴經 *Aspergillus awamori* 發酵後，其亞鐵離子螯合能力上升；黃 (2011) 以 *Actinomucor spp.* 接種碎黑豆腐測定其螯合亞鐵離子之能力，結果發現黑豆腐發酵後亦可提升亞鐵離子螯合能力，本研究結果顯示乳酸菌發酵黑豆奶確實可提升黑豆奶螯合亞鐵離子之能力。

比較添加大麥芽與未添加大麥芽之組別發現不論是發酵初期或是發酵終點，添加大麥芽之實驗組其亞鐵離子螯合能力均顯著地高於未添加大麥芽之控制組 ($p < 0.05$)，且亞鐵離子螯合能力下降之幅度相對控制組來得小；兩種菌株添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶之亞鐵離子螯合能力也比添加 0.5% (w/v) 大麥芽高，



表示大麥芽濃度對於提高發酵黑豆奶之亞鐵離子螯合能力有顯著差異 ($p < 0.05$)，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆奶添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 12 小時，具最高之亞鐵離子螯合能力 72.8%。結果顯示控制發酵時間並添加大麥芽可顯著地提升乳酸菌發酵黑豆奶之亞鐵離子螯合能力，且 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加大麥芽發酵黑豆奶對於提高亞鐵離子螯合能力之效果比 *L. acidophilus* BCRC 10695 發酵黑豆奶效果佳。

表十、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之亞鐵離子螯合能力

Table 10. The Fe²⁺-chelating ability of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C

Fe ²⁺ -chelating ability (%)						
Time (h)	<i>S. thermophilus</i>		<i>L. acidophilus</i>		<i>S. thermophilus</i>	
	with 0.5% barley malt	with 1.0% barley malt	with 0.5% barley malt	with 1.0% barley malt	with 0.5% barley malt	with 1.0% barley malt
0	^C 55.8±0.01 ^c	^C 55.5±0.02 ^c	^E 60.3±0.03 ^b	^E 60.5±0.11 ^b	^E 61.4±0.05 ^a	^D 61.3±0.02 ^a
12	^A 57.5±0.13 ^f	^A 58.2±0.21 ^e	^A 68.9±0.12 ^b	^D 63.3±0.05 ^d	^A 72.8±0.03 ^a	^C 65.4±0.11 ^c
24	^B 56.3±0.02 ^f	^B 57.1±0.03 ^e	^B 66.5±0.05 ^d	^A 67.5±0.02 ^c	^B 70.7±0.06 ^a	^A 69.2±0.01 ^b
36	^D 51.6±0.23 ^d	^D 52.2±0.07 ^d	^C 65.6±0.01 ^c	^B 65.7±0.01 ^c	^C 68.5±0.02 ^a	^B 66.4±0.04 ^b
48	^E 49.5±0.03 ^e	^E 49.9±0.05 ^d	^D 64.1±0.02 ^c	^C 63.8±0.03 ^c	^D 67.9±0.01 ^a	^C 65.9±0.02 ^b

Each value is expressed as means±SD (n=3). Means with different uppercase letters (A,B,C,D,E) in the same column, and the lowercase letters (a,b,c,d,e,f) in the same row are significantly different (p<0.05).



3. 還原力

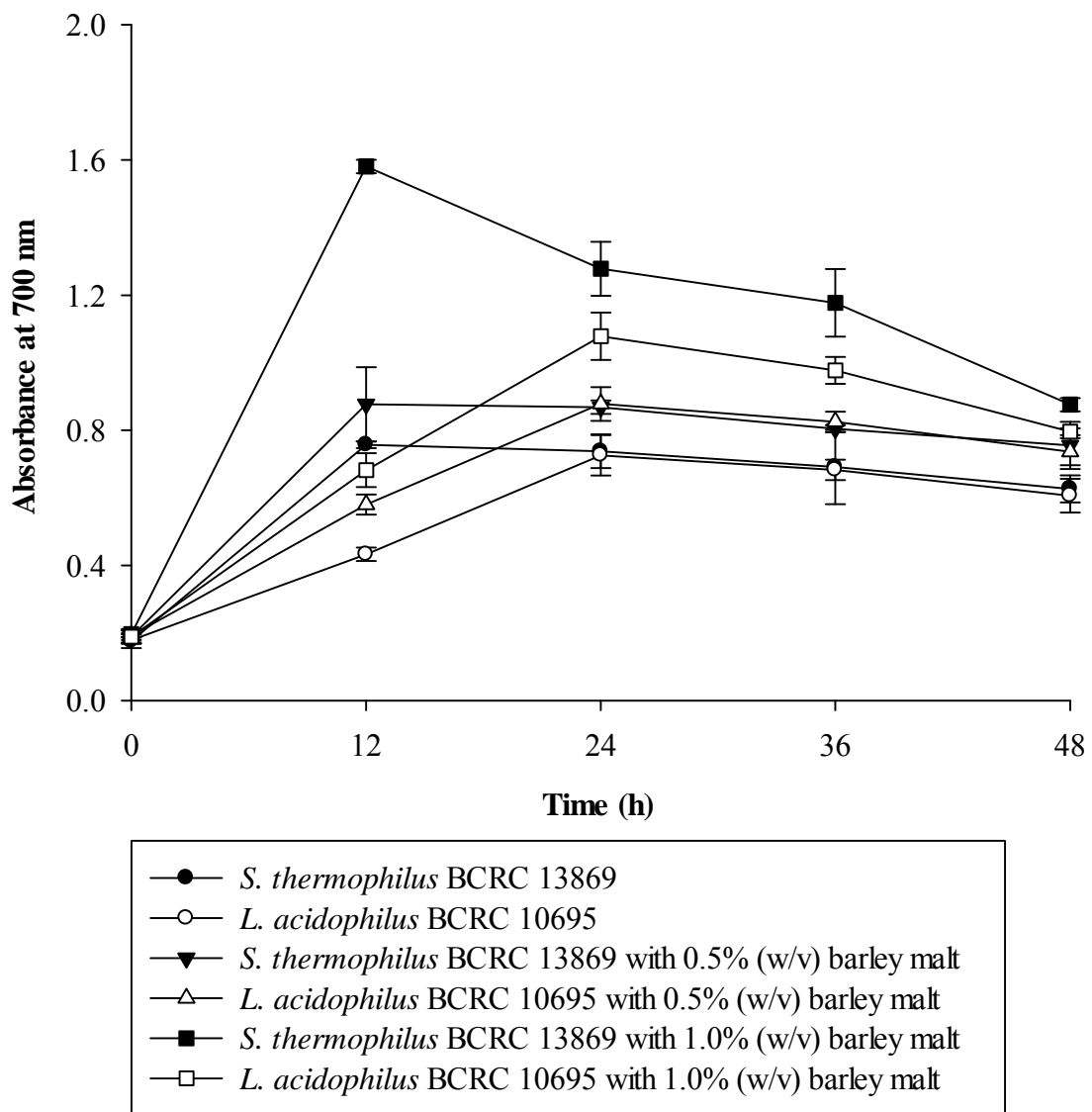
還原力是檢測抗氧化物是否具有提供電子或氫離子之能力，其測定原理為抗氧化物質將赤血鹽 ($K_3[Fe(CN)_6]$) 還原成黃血鹽 ($K_4[Fe(CN)_6]$)，黃血鹽再與 Fe^{3+} 作用生成普魯士藍 (Perl's Prussian blue)，在 700 nm 下測定吸光值，檢測普魯士藍之生成量，可瞭解抗氧化物質之還原力，吸光值越高表示還原力越強 (Oyaizu, 1988)。

S. thermophilus BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之還原力變化如圖九所示，結果顯示不論是未添加大麥芽之控制組或是添加大麥芽之實驗組，經過乳酸菌發酵 48 小時之還原力均比未發酵顯著地提高 ($p < 0.05$)，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵 12 小時後，其還原力迅速上升，而 *L. acidophilus* BCRC 10695 則是發酵 24 小時後才出現最大值，顯示乳酸菌發酵黑豆奶可提升黑豆奶之還原力，與 Lee *et al.* (2015) 以 *S. thermophilus* S10 發酵黑豆奶之結果相符；而黃 (2011) 研究 *Actinomucor spp.* 接種碎黑豆腐對其還原力之影響，結果顯示種麴發酵可提高黑豆腐之還原力，推測還原能力可能來自微生物發酵代謝時產生提供氫離子能力較強之物質，與自由基反應時，將過氧化物還原或螯合過氧化物前驅物，進一步終止自由基連鎖反應，進而降低過氧化物濃度 (吳，2007；Shimada *et al.*, 1992；黃，2007)。

另比較添加大麥芽之實驗組與未添加大麥芽之控制組發現不論是發酵初期或是發酵終點，實驗組之還原力均顯著地高於控制組 ($p < 0.05$)；兩種菌株添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶之還原力也顯著地比添加 0.5% (w/v) 大麥芽來得高 ($p < 0.05$)，表示大麥芽濃度對於提高發酵黑豆奶之還原能力有顯著差異 ($p < 0.05$)，由圖九發酵期間還原力變化可看出發酵中期開始不論哪個組別的還原力都開始下降，推測可能原因是因為發酵黑豆奶之抗氧化物質隨著發酵時間增加而減少，與總酚、總類黃酮含量之實驗結果一致。其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆

奶添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 12 小時，有最高的還原力，顯示控制發酵時間並添加大麥芽可顯著地提升乳酸菌發酵黑豆奶之還原力，且 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加大麥芽發酵黑豆奶對於提高還原力之效果比 *L. acidophilus* BCRC 10695 添加大麥芽發酵黑豆奶效果好。





圖九、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之還原力變化

Figure 9. The reducing power of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C. Each value is expressed as means±SD (n=3).



4. 總抗氧化能力

TEAC 總抗氧化能力與 DPPH 自由基清除能力同屬以清除自由基作為評估之標之抗氧化力測定方法， $ABTS^{\cdot+}$ 為一藍綠色穩定之自由基水溶液，加入抗氧化物質清除 $ABTS^{\cdot+}$ 陽離子自由基進行反應，在 734 nm 下有較強之吸光值，當樣品具有清除自由基能力時， $ABTS^{\cdot+}$ 水溶液之顏色會褪去，觀察藍綠色之脫色程度，故吸光值越低表示樣品之抗氧化能力越好，另以 Trolox 為標準品，換算樣品清除率相對於 Trolox 之濃度 (Miller *et al.*, 1993)。TEAC 為一種十分簡便且有效的抗氧化活性檢測方法，可廣泛應用於萃取物、食品中化合物、純物質、飲料等，且此方法對於水溶性或油溶性物質均適用 (Doblado *et al.*, 2005)。

表十一為 *S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之總抗氧化能力變化，結果顯示不論是未添加大麥芽之控制組或是添加大麥芽之實驗組，於乳酸菌發酵初期之還原力均有顯著地提高 ($p < 0.05$)，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵 12 小時即出現最大值，而 *L. acidophilus* BCRC 10695 則是發酵 24 小時後才出現最大值，顯示兩種菌株於發酵過程之生長速度不同，與乳酸菌菌數之測定結果一致。葉 (2012) 研究指出黑豆麴甲醇 (80%) 萃取物之 TEAC 值顯著地高於未發酵黑豆 ($p < 0.05$)，Kao and Chen (2006) 指出萃取物中含有越多總類黃酮及多酚化合物，就擁有越高之 TEAC 值，對照本研究發酵初期總酚及總類黃酮含量之結果是相符的。

比較添加大麥芽之實驗組與未添加大麥芽之控制組發現不論是發酵初期或是發酵終點，實驗組之 TEAC 值均顯著地高於控制組 ($p < 0.05$)，且實驗組發酵過程 TEAC 值下降之幅度也較控制組來得小；兩種菌株添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶之還原力也顯著地比添加 0.5% (w/v) 大麥芽高 ($p < 0.05$)，表示大麥芽濃度對於提高發酵黑豆奶之 TEAC 值有顯著差異 ($p < 0.05$)，由表十一發酵過程 TEAC 值之變化可看出發酵中期開始不論哪個組別之 TEAC 值都開始下降，推測可能原因是因為發酵黑豆奶之抗氧化物質隨著發酵時間增加而減少，此變化趨勢與總酚、

總類黃酮、DPPH 自由基清除能力、亞鐵離子螯合能力及還原力之實驗結果一致。

發酵終點 (48 小時) 之 TEAC 值唯有添加 1.0% (w/v) 大麥芽之組別比未發酵黑豆奶之 TEAC 值高，其餘組別發酵 48 小時後之 TEAC 值均低於未發酵之黑豆奶，顯示控制發酵時間可以獲得較高之 TEAC 值。而 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆奶添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 12 小時，有最高之 TEAC 值 (114.2 mg Trolox/100 mL black soymilk)，表示 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加大麥芽發酵黑豆奶對於提高 TEAC 值之效果較 *L. acidophilus* BCRC 10695 者佳。

表十一、*S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 於添加不同比例大麥芽之黑豆奶於 37°C 發酵期間之總抗氧化能力

Table 11. The total antioxidant capacity of black soymilk fermented with *S. thermophilus* BCRC 13869 and *L. acidophilus* BCRC 10695 contained different proportion of barley malt during 48 h fermentation at 37°C

*TEAC (mg Trolox/100 mL black soymilk)						
Time (h)	<i>S. thermophilus</i>		<i>L. acidophilus</i>		<i>S. thermophilus</i>	
	with 0.5% (w/v) barley malt	with 1.0% (w/v) barley malt	with 0.5% (w/v) barley malt	with 1.0% (w/v) barley malt	with 0.5% (w/v) barley malt	with 1.0% (w/v) barley malt
0	^B 92.7±0.04 ^a	^C 92.8±0.05 ^a	^C 93.6±0.11 ^b	^C 91.1±0.02 ^c	^E 89.3±0.04 ^d	^E 89.3±0.13 ^d
12	^A 95.9±0.05 ^d	^B 93.3±0.14 ^f	^A 97.5±0.09 ^c	^B 93.5±0.07 ^e	^A 114.2±0.06 ^a	^B 103.6±0.05 ^b
24	^C 87.7±0.18 ^f	^A 94.6±0.03 ^e	^B 95.7±0.02 ^d	^A 96.4±0.16 ^c	^B 110.8±0.02 ^a	^A 108.6±0.24 ^b
36	^D 76.4±0.11 ^f	^D 78.4±0.04 ^e	^D 88.6±0.01 ^c	^D 85.2±0.10 ^d	^C 98.7±0.03 ^a	^C 95.9±0.03 ^b
48	^E 65.8±0.03 ^e	^E 63.1±0.21 ^f	^E 80.3±0.03 ^c	^E 78.2±0.01 ^d	^D 94.1±0.01 ^a	^D 92.8±0.02 ^b

Each value is expressed as means±SD (n=3). Means with different uppercase letters (A,B,C,D,E) in the same column, and the lowercase letters (a,b,c,d,e,f) in the same row are significantly different (p<0.05).

*TEAC is abbreviated as Trolox equivalent antioxidant capacity.

陸、結論

1. 利用 *S. thermophilus* BCRC 13869 與 *L. acidophilus* BCRC 10695 發酵黑豆奶並添加大麥芽，添加大麥芽之發酵黑豆奶其乳酸菌菌數顯著地高於未添加大麥芽之發酵黑豆奶 ($p<0.05$)。 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵 48 小時後，最終菌數可達 8.41 Log CFU/mL；而發酵黑豆奶最終 pH 值為 pH 4.24~4.47，顯示大麥芽不會抑制乳酸菌生長；添加大麥芽發酵黑豆奶之可滴定酸度約上升 0.03~0.05%，且 0.5% (w/v) 與 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶之可滴定酸度沒有顯著地差異，最終可滴定酸度為 0.56%~0.58%。
2. 發酵黑豆奶之總酚及總類黃酮含量於發酵初期有顯著地增加，之後隨著發酵時間增加而減少，但是添加大麥芽之實驗組發酵 48 小時後之總酚含量仍顯著地高於未添加大麥芽之控制組 ($p<0.05$)。添加 1.0% (w/v) 大麥芽以 *S. thermophilus* BCRC 13869 發酵黑豆奶 12 小時，有最高之總酚含量 85.6 mg GAE/100 mL black soymilk 及最高之總類黃酮含量 42.8 mg CAE/100 mL black soymilk；而各組別之花青素含量皆隨著發酵時間增加而遞減，但是添加大麥芽之實驗組其花青素降解之幅度較緩慢，且實驗組最終花青素含量皆高於控制組。
3. DPPH 自由基清除能力、亞鐵離子螯合能力、還原力及總抗氧化能力之結果顯示，添加大麥芽之實驗組其抗氧化能力均高於控制組，其中 *S. thermophilus* BCRC 13869 添加 1.0% (w/v) 大麥芽發酵黑豆奶可獲得較高的抗氧化能力，顯示大麥芽有助於提升發酵黑豆奶之抗氧化能力。

柒、參考文獻

行政院衛生署。1998。臺灣食品營養成分資料庫。行政院衛生署員工消費合作社。

pp. 116-117, 239。

行政院農業委員會農糧署。2006。黑豆。

http://www.afa.gov.tw/public_index.asp?CatID=89

沈明來。2014。試驗設計學。九州圖書文物有限公司。臺北。

李坤美、林應然。2005。益生菌在臨床上的使用。北市醫學雜誌。2:410-422。

李時珍 (明)。1990。本草綱目。大台北出版社。臺北。

吳國豪。2007。糙米發酵飲品之製造與抗氧化性質研究。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。臺中。

林怡菁。2006。加熱處理對黑豆麴抗氧化活性與總酚類化合物及花青素含量之影響。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。臺北。

周雲駿。2014。添加大麥芽對乳酸菌在紫米基質中生長情形與抗氧化性的影響。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。臺北。

連大進。1995。台灣黑豆的利用與生產展望。農業世界 147:39-42。

張效銘。2001。乳酸菌與人體之健康。大同工學院生物科技系碩士論文。臺北。

郭淑姿。2002。黑豆納豆最適加工條件之探討。中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。臺北。


陳惠英、顏國欽。1998。自由基、抗氧化物防禦與人體健康。中華民國營養學會雜誌。23:105-121。

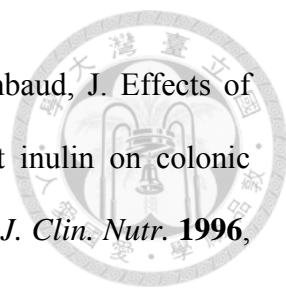
馮文虎。1994。淺談自由基與抗氧化物。中華民國醫檢會報。9:34-43。

黃如悅。2007。加熱及儲藏條件對黑豆及黑豆麴異黃酮素組成與抗氧化活性之影響。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。臺北。

黃震宇。2011。以黑豆為基質製備放射毛黴種麴及其機能性與應用。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。臺中。



- 
- 葉如雪。2012。黑豆經 *Monascus pilosus* BCRC 31526 發酵後對異黃酮組成與抗氧化活性之影響。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。臺北。
- 廖啟成。1998。乳酸菌之分類利用。食品工業。30(2):1-10。
- 潘子明。2008。乳酸菌的保健功效。健康世界。266:41-66。
- 錢香伶。2004。乳酸菌與雙叉桿菌發酵豆奶中異黃酮素含量之變化。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。臺北。
- 羅國仁、余立文。2004。固態發酵製程的開發與應用。食品工業 36:2-10。
- Ahsan, H.; Chen, Y.; Kibriya, M. G.; Islam, M. N.; Slavkovich, V. N.; Graziano, J. H.; Santella, R. M. Susceptibility to arsenic-induced hyperkeratosis and oxidative stress genes myeloperoxidase and catalase. *Cancer Lett.* **2003**, *201*, 57-65.
- Alexandra Pazmiño-Durán, E.; Mónica Giusti, M.; Wrolstad, R. E.; Glória, M. B. A. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. *Food Chem.* **2001**, *75*, 211-216.
- AOAC, Official methods of analysis of association of official analytical chemists. 19th ed. Washinton D.C., USA. **2012**.
- Aparicio-Fernández, X.; Yousef, G. G.; Loarca-Pina, G.; Mejia, E.; Lila, M. A. Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.).*J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4615-4622.
- Astadi, I. R.; Astuti, M.; Santoso, U.; Nugraheni, P. S. *In vitro* antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). *Food Chem.* **2009**, *112*, 659-663.
- Bamforth, C. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *J. Cereal Sci.* **2009**, *50*, 353-357.
- Begley, M.; Hill, C.; Gahan, C. G. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microb.* **2006**, *72*, 1729-1738.



Bouhnik, Y.; Flourie, B.; Andrieux, C.; Bisetti, N.; Briet, F.; Rambaud, J. Effects of *Bifidobacterium sp.* fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1996**, *50*, 269-273.

Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317-333.

Butel, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. *Med. Mal. Infect.* **2014**, *44*, 1-8.

Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. D. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859-871.

Cederroth, C.; Nef, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *304*, 30-42.


Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **1979**, *59*, 527-605.

Chen, H. M.; Muramoto, K.; Yamauchi, F.; Fujimoto, K.; Nokihara, K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 49-53.

Chien, H. L.; Huang, H. Y.; Chou, C. C. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 772-778.

Choung, M. G.; Baek, I. Y.; Kang, S. T.; Han, W. Y.; Shin, D. C.; Moon, H. P.; Kang, K. H. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5848-5851.

Chou, S. T.; Chang, C. T.; Chao, W. W.; Chung, Y. C. Evaluation of antioxidative and mutagenic properties of 50% ethanolic extract from red beans fermented by

- 
- Aspergillus oryzae*. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 1463-1469.
- Cybulsky, M. I.; Gimbrone, M. A. Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* **1991**, *251*, 788-791.
- Dinis, T. C.; Madeira, V. M.; Almeida, L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *315*, 161-169.
- Doblado, R.; Zielinski, H.; Piskula, M.; Kozłowska, H.; Muñoz, R.; Frías, J.; Vidal-Valverde, C. Effect of processing on the antioxidant vitamins and antioxidant capacity of *Vigna sinensis* var. *Carilla*. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1215-1222.
- Dziezak, J. D. Preservatives: antioxidant. *Food Technol.* **1986**, *40*, 94-102.
- Felten, A.; Barreau, C.; Bizet, C.; Lagrange, P. H.; Philippon, A. *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 729-733.
- Folkman, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* **2003**, *3*, 643-651.
- Fukushima, M.; Yamada, A.; Endo, T.; Nakano, M. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on $\Delta 6$ -desaturase activity in the livers of rats fed a fat- and cholesterol-enriched diet. *Nutrition.* **1999**, *15*, 373-378.
- Fuller, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **1989**, *66*, 365-378.
- Gibson, G. R.; Fuller, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 391s-395s.
- Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microflora:



- Introducing of the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1401-1402.
- Giese, J. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Technol.* **1996**, *50*, 73-82.
- Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem. Eng. J.* **2003**, *14*, 217-225.
- Gomes, A. M. P.; Malcata, F. X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and the rapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food. Sci. Technol.* **1999**, *10*, 139-157.
- Guo, Y.; Wang, S.; Hoot, D. R.; Clinton, S. K. Suppression of VEGF-mediated autocrine and paracrine interactions between prostate cancer cells and vascular endothelial cells by soy isoflavones. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18*, 408-417.
- Halliwel, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* **1994**, *52*, 253-265.
- Halliwel, B.; Gutteridge, J. M. C. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*, 598-620.
- Halliwel, B.; Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medical. Oxford University Press. **1985**.
- Halliwel, B.; Murcia, M. A.; Chirico, S.; Aruoma, O. I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1995**, *35*, 7-20.
- Harrison, V. C.; Peat, G. Serum cholesterol and bowel flora in the newborn. *Am. J. Clin. Nutr.* **1975**, *28*, 1351-1355.
- Heimler, D.; Vignolini, P.; Dini, M. G.; Romani, A. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3053-3056.

Helland, M. H.; Wicklund, T.; Narvhus, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *91*, 305-313.

Heyman, M. Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* **2000**, *19*, 137S-146S.

Hsu, C. S.; Chiu, W. C.; Yeh, S. L. Effects of soy isoflavone supplementation on plasma glucose, lipids, and antioxidant enzymeactivities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.* **2003**, *23*, 67-75.

Hull, R. R.; Conway, P. L.; Evans, A. J. Probiotic foods: a new opportunity. *Food Aust.* **1992**, *44*, 112-113.

Imaida, K.; Fukushima, S.; Shirai, T.; Ohtani, M.; Nakanishi, K.; Ito, N. Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase-positive foci development in the liver of rats. *Carcinogenesis.* **1983**, *4*, 895-899.

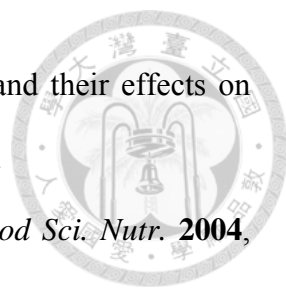
Ishikawa, Y.; Morimoto, K.; Sada, T.; Fujiwara, T. Aurantione produced by *Penicillium aurantio-virens*, and its antioxidant activity. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **1992**, *41*, 7-10.

Isolauri, E. Dietary modification of atopic disease: Use of probiotics in the prevention of atopic dermatitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2004**, *4*, 270-275.

Izumi, T.; Piskula, M. K.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1695-1699.

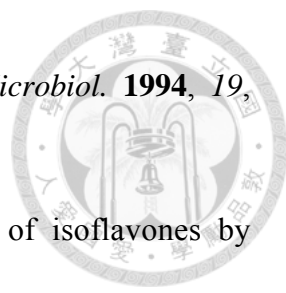
Jones, B. L. Endoproteases of barley and malt. *J. Cereal Sci.* **2005**, *42*, 139-156.


Kadkhodae, M.; Gol, A. The role of nitric oxide in iron-induced rat renal injury. *Hum. Exp. Toxicol.* **2004**, *23*, 533-536.


- 
- Kao, T. H.; Chen, B. H. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7544-7555.
- Karakaya, S. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 453-464.
- Kazzaz, J. A.; Xu, J.; Palaia, T. A.; Mantell, L.; Fein, A. M.; Horowitz, S. Cellular oxygen toxicity. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15182-15186.
- Kehrer, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* **1993**, *23*, 21-48.
- Keppler, K.; Humpf, H. U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5195-5205.
- King, A.; Young, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* **1999**, *99*, 213-218.
- Kopp-Hoolihan, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. *J. Am. Diet. Assoc.* **2001**, *101*, 229-239.
- Kordali, S.; Cakir, A.; Mavi, A.; Kilic, H.; Yildirim, A. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish artemisia species. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1408-1416.
- Lasztity, R.; Hidvegi, M.; Bata, A. Saponins in food. *Food Rev. Int.* **1998**, *14*, 371-390.
- Lee, I. H.; Chou, C. C. Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1309-1314.
- Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1269-1278.
- Lee, M. Y.; Hong, G. E.; Zhang, H. P.; Yang, C. Y.; Han, K. H.; M., P. K. ; Lee, C. H.



- Production of the isoflavone aglycone and antioxidant activities in black soymilk using fermentation with *Streptococcus thermophilus* S10. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, *24*, 537-544.
- Lee, Y. K.; Salminen, S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Tech.* **1995**, *6*, 241-245.
- Lee, Y. T.; Don, M. J.; Liao, C. H.; Chiou, H. W.; Chen, C. F.; Ho, L. K. Effects of phenolic acid esters and amides on stimulus-induced reactive oxygen species production in human neutrophils. *Clin. Chim. Acta.* **2005**, *352*, 135-141.
- Lilly, D. M., and R. H. Stillwell. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science.* **1965**, *147*, 747-748.
- Lim, H. J.; Kim, S. Y.; Lee, W. K. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J. Vet. Sci.* **2004**, *5*, 391-395.
- Liong, M. T.; Shah, N. P. Bile salt deconjugation ability, bilesalt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *Int. Dairy J.* **2005**, *15*, 391-398.
- Lohachoompol, V.; Szrednicki, G.; Craske, J. The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, *5*, 248-252.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, *84*, 407-412.
- Moore, D. R.; Kotake, Y.; Huycke, M. M. Effects of iron and phytic acid on production of extracellular radicals by *Enterococcus faecalis*. *Exp. Biol. Med.* **2004**, *229*, 1186-1195.
- Morishita, Y.; Konishi, Y. Effects of high dietary cellulose on the large intestinal

- 
- microflora and short-chain fatty acids in rats. *Lett. Appl. Microbiol.* **1994**, *19*, 433-435.
- Murakami, H. Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 2971-2975.
- Namiki, M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1990**, *29*, 272-300.
- Nathan, C. F.; Hibbs Jr, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **1991**, *3*, 65-70.
- Niedernhofer, L. J.; Daniels, J. S.; Rouzer, C. A.; Greene, R. E.; Marnett, L. J. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31426-31433.
- Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* **1986**, *44*, 307-315.
- Parvez, S.; Malik, K. A.; Ah Kang, S.; Kim, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 1171-1185.
- Paturi, G.; Phillips, M.; Jones, M.; Kailasapathy, K. Immune enhancing effects of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 in mice. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *115*, 115-118.
- Pedreschi, R.; Cisneros-Zevallos, L. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4557-4567.
- Pereira, D. I.; Gibson, G. R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 4689-4693.
- Pieniz, S.; Andrezza, R.; Anghinoni, T.; Camargo, F.; Brandelli, A. Probiotic potential,

- 
- antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*. **2014**, *37*, 251-256.
- Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.
- Pinthong, R.; Macrae, R.; Rothwell, J. The development of a soya-based yoghurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1980**, *15*, 647-667.
- Prado, F. C.; Paarada, J. L.; Pandey, A.; Soccol, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 111-123.
- Przedborski, S.; Jackson-Lewis, V.; Yokoyama, R.; Shibata, T.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 4565-4571.
- Rafter, J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, S89-S94.
- Rein, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. In University of Helsinki: **2005**.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231-1237.
- Riberio, L. R.; Salvadori, D. M. F. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. *Mutat. Res.* **2003**, *544*, 195-201.
- Rodrígueza, H.; Curiel, J. A.; Landetea, J. M.; de las Rivasa, B.; de Felipeb, F. L.; Gómez-Cordovésa, C.; Mancheñoc, J. M.; Muñoz, R. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *132*, 79-90.
- Rho, S. J.; Lee, J. S.; Chung, Y. I.; Kim, Y. W.; Lee, H. G. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzymeinhibitory peptide from

- 
- fermented soybean extract. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 490-493.
- Saad, N.; Delattre, C.; Urdaci, M.; Schmitter, J. M.; Bressollier, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, 1-16.
- Salminen, S.; von Wright, A.; Morelli, L.; Marteau, P. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *44*, 93-106.
- Sancho, A. I.; Faulds, C. B.; Bartolome, B.; Williamson, G. Characterisation of feruloyl esterase activity in barley. *J. Sci. Food Agr.* **1999**, *79*, 447-449.
- Scheffler, A.; Bamforth, C. Exogenous β -glucanases and pentosanases and their impact on mashing. *Enzyme Microb. Tech.* **2005**, *36*, 813-817.
- Scheinbach, S. Probiotics: Functionality and commercial status. *Biotechnol. Adv.* **1998**, *16*, 581-608.
- Shahidi, F.; Janitha, P. K.; Wanasundara, P. D. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *32*, 67-103.
- Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K.; Nakamura, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 945-948.
- Singh, S.; Aggarwal, B. B. Activation of transcription factor NF-kappaB is suppressed by curcumin (Diferuloylmethane). *J. Biological Chem.* **1995**, *270*, 24995-25000.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 153-178.
- Soobrattee, M. A.; Neergheen, V. S.; Luximon-Rammaa, A.; Aruomab, O. I.; Bahorun, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* **2005**, *579*, 200-213.

Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging. *Science*. **1992**, *257*, 1220-1224.

Takahashi, N.; Kitazawa, H.; Iwabuchi, N.; Xiao, J. Z.; Miyaji, K.; Iwatsuki, K.; Saito, T. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Clin. Exp. Immunol.* **2006**, *145*, 130-138.

Takahashi, R.; Ohmori, R.; Kiyose, C.; Momiyama, Y.; Ohsuzu, F.; Kondo, K. Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4578-4582.

Takahata, Y.; Ohnishi-Kameyama, M.; Furuta, S.; Takahashi, M.; Suda, I. Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5843-5847.

Van Acker, S. A.; Van Den Berg, D. J.; Tromp, M. N.; Griffioen, D. H.; Van Bennekom, W. P.; Van Der Vijgh, W. J.; Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 331-342.

Wang, Y. C.; Yu, R. C.; Chou, C. C. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiol.* **2002**, *19*, 501-508.

Wilson, T. A.; Nicolosi, R. J.; Kotyla, T.; Fleckinger, B. Soy protein without isoflavones reduces aortic total and cholesterol ester concentrations greater than soy protein with isoflavones compared with casein in hypercholesterolemic hamsters. *Nutr. Res.* **2007**, *27*, 498-504.

Wiseman, H.; Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **1996**, *313*, 17-29.

Xu, B.; Chang, S. K. C. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids,

anthocyanins and isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8365–8373.

Zubillaga, M.; Weill, R.; Postaire, E.; Goldman, C.; Caro, R.; Vocciò, J. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut.

Nutr. Res. **2001**, *21*, 569-579.

