

Studies on functional component of steamed soybeans and adlay inoculated with *Rhizopus oligosporus*

李家銘、陳明造

E-mail: 321999@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

Tempeh is a traditional fermented food in Indonesia, the steamed soybeans are used as raw material fermented by *Rhizopus oligosporus*. The cotton-like hypha grew and made the fermented soybeans become pressed cake-form product with desirable flavor. In this study, the steamed soybeans and adlay were inoculated with *Rhizopus oligosporus* and incubated at 37 °C, 85% RH for 36hr. The moisture content, pH, *Rhizopus oligosporus* counts, antioxidant activity, SDS-PAGE electrophoretogram of soy proteins, peptide, ACEI and GABA contents of the fermented products were determined to compare the difference between the fermented soybeans and adlay. The results were shown as the follows : after fermentation, the moisture content decreased and pH value declined and resulted in reduction of bacteria growth. DPPH-radical scavenging effect, reducing power, ferrous ion chelating ability of antioxidant properties were increased significantly after fermentation both of the steamed soybeans and adlay. The polysaccharide and GABA contents were also increased Angiotensin converting enzyme inhibitory activity (ACEI) increased with increasing peptide content; however, 50% ACE inhibition required for ACE-I concentration (IC50). IC50 increased with increasing peptide concentration, indicating that the increase in peptide content after fermentation for the number of ACE inhibitory activity was not high.

Keywords : *Rhizopus oligosporus*, solid fermentation, ACEI, antioxidant activity

Table of Contents

封面內頁 簽名頁 授權書 iii 中文摘要iv 英文摘要v 誌謝vi 目錄vii 圖目錄xi 表目錄xiii 1.前言1 2.文獻回顧3 2.1黃豆3 2.1.1 黃豆簡介3 2.1.2 黃豆組成成分4 2.1.3 黃豆之機能性6 2.2 薏仁11 2.2.1 薏仁簡介11 2.2.2 薏仁組成成份12 2.2.3 薏仁之機能性13 2.3 天貝18 2.3.1 天貝菌 18 2.3.2 天貝之簡介20 2.3.3 天貝之機能性成份20 3.材料與方法23 3.1 實驗藥品與儀器23 3.1.1 材料23 3.1.2 藥品24 3.1.3 儀器24 3.2 實驗架構25 3.3 試驗處理26 3.3.1 *Rhizopus oligosporus*發酵26 3.4 一般成份分析26 3.4.1 水份26 3.4.2 *Rhizopus oligosporus*菌數27 3.4.3 pH值27 3.5 機能性成份分析28 3.5.1 抗氧化活性測定28 3.5.1.1 甲醇萃取液制備28 3.5.1.2 清除自由基能力測定28 3.5.1.3 還原力測定28 3.5.1.4 亞鐵離子螯合能力測定29 3.5.2 多糖29 3.5.2.1 多糖萃取液之製備30 3.5.2.2 多糖測定30 3.5.3 SDS-PAGE31 3.5.4 可溶性蛋白測定35 3.5.5 胜肽w35 3.5.6 ACEI活性38 3.5.7 IC5038 3.5.8 GABA39 3.5.8.1 GABA之萃取及衍生39 3.5.8.2 GABA濃度測定39 3.5.8.3 GABA之HPLC條件41 3.6 統計分析41 4.結果與討論42 4.1 接種*Rhizopus oligosporus*發酵蒸煮黃豆與薏仁成份43 4.1.1 發酵期間對蒸煮黃豆與薏仁中水分之變化43 4.1.2 發酵期間對蒸煮黃豆與薏仁pH之變化44 4.1.3 發酵蒸煮黃豆與薏仁*Rhizopus oligosporus*菌數之比較46 4.2 抗氧化活性之分析48 4.2.1 發酵蒸煮黃豆與薏仁之甲醇萃取物之清除 DPPH自由基能力48 4.2.2 發酵蒸煮黃豆與薏仁甲醇萃取物還原力之比較52 4.2.3 發酵蒸煮黃豆與薏仁甲醇萃取物亞鐵離子螯合能力之比較54 4.3 發酵蒸煮黃豆與薏仁機能性成份分析之比較56 4.3.1 發酵蒸煮黃豆與薏仁多糖含量之比較56 4.3.2 發酵蒸煮黃豆與薏仁中蛋白質之SDS-PAGE電泳分析圖譜59 4.3.3 發酵蒸煮黃豆與薏仁ACE-I活性之效果62 4.3.3.1 發酵蒸煮黃豆與薏仁可溶性蛋白之變化62 4.3.3.2 發酵蒸煮黃豆與薏仁胜肽w35之變化64 4.3.3.3 發酵蒸煮黃豆與薏仁萃取液ACE-I活性測定及IC50 66 4.3.4 發酵蒸煮黃豆與薏仁之GABA含量比較70 5.結論75 參考文獻77 圖目錄 圖2.1黃豆的組成成份6 圖2.2大豆異黃酮化學結構8 圖2.3雌激素(Etrogen)化學結構8 圖2.4薏苡種實之部位名稱12 圖2.5傳統天貝之天貝製作法19 圖2.6 GABA合成路徑22 圖3.1葡萄糖標準曲線30 圖3.2雙?汝那 掃u37 圖3.3 GABA標準曲線40 圖4.1發酵蒸煮黃豆與薏仁甲醇萃取物之清除DPPH自由基能力之比較51 圖4.2發酵蒸煮黃豆與薏仁甲醇萃取物之還原力之比較53 圖4.3發酵蒸煮黃豆與薏仁甲醇萃取物之亞鐵離子螯合能力之比較55 圖4.4發酵蒸煮黃豆蛋白質之SDS-PAGE電泳分析圖之比較60 圖4.5發酵蒸煮薏仁蛋白質之SDS-PAGE電泳分析圖之比較61 圖4.6發酵蒸煮黃豆與薏仁之胜肽w35與抑制ACE能力關係69 圖4.7 GABA標準品之HPLC分析圖譜71 圖4.8蒸煮黃豆0hrGABA含量之HPLC分析圖譜72 圖4.9 蒸煮黃豆36hrGABA含量之HPLC分析圖譜72 圖4.10 蒸煮薏仁0hrGABA含量之HPLC分析圖譜73 圖4.11 蒸煮薏仁36hrGABA含量之HPLC分析圖譜73 圖4.12 發酵條件對蒸煮黃豆與薏仁之GABA含量比較74 表目錄 表2.1 胺基酸需要量和大豆產品的胺基酸組成5 表2.2 大豆生物活性物質的分類及作10 表2.3 薏仁不同產地之成分14 表2.4 薏仁中生理機能性成分含量17 表3.1 分離膠組成32 表3.2 排列膠組成33 表4.1 發酵蒸煮黃豆與薏仁水分含量之影響43 表4.2 發酵蒸煮黃豆與蒸煮薏仁pH之影響45 表4.3 發酵蒸煮黃豆與薏仁*Rhizopus oligosporus*菌數之比較 47 表4.4 發酵黃豆與薏仁甲醇萃取率50 表4.5 發酵蒸煮黃豆與薏仁之多糖比較58 表4.6 發酵蒸煮黃豆與薏仁可溶性蛋白之影響63 表4.7 發酵蒸煮黃豆與薏仁胜肽w35之影響

REFERENCES

- 1.戶田靜男、谷澤久之、有地滋、湊野吉雄。1984。生藥 - - 酸空氣酸化作用。醫學雜誌(日)。104: 394-397。 2. 王伯徹、陳啟楨、華傑。1998。食藥用菇類的培養與應用。財團法人食品工業發展研究所報告:第M87-019號, 187頁。 3.王思涓。2002。薏苡籽實中特殊生理機能性成分的定量分析與比較。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。台北。 4.江文章、徐明麗、蘇瑞斌、龐飛。2000。薏仁加工食品輔助抑制腫瘤功效之評估。醫護科技學刊2:113-122。 5.江文章、張子文。1991。薏苡的食療與加工利用、中國飲食文化學術研討專輯。中國飲食文化基金會。 6.江文德。2000。大豆異黃酮類之機能與應用。食品市場資訊7: 5-8。 7.江伯源、張心怡。2005。浸漬溫度對黃豆吸水特性及物性因子之影響。中華農學會報第六卷第三期: 257~266。 8.江美昭。2003。酵素水解豬血漿中白蛋白已製備高血壓抑制性?式C東海大學食品科學研究所碩士論文。台中。 9.余靜菡。2007。耐酸性納豆菌之納豆激? B基因選殖、表現與酵素活性分析。大葉大學生物產業科技學系所大學專題。 10.呂鋒洲。2002。發酵大豆抗癌新希望。P: 45-48。元氣齋出版社有限公司。台北。 11.李微宣。2007。液態培養條件對舞菇(*Grifola frondosa*)菌絲體及多醣體生產的影響。東海大學食品科學系研究所碩士論文。台中。 12.杜姿瑩。1999。糙薏仁降血脂作用之研究。國立臺灣大學食品技研究所碩士論文。台北。 13.姜淑繡。2001。省產蘿蔔之抗氧化性研究。碩士論文。大葉大學食品工程學系研究所碩士論文。彰化 14.張南玲。1993。胃腸系統內 -胺基丁酸研究的進展。國外醫學:生理病理科學與臨床分冊。13:139-142。 15.張啟霆。2007。培養基組成與液態培養條件對*Rhizopus oligosporus*發酵產物之理化性質的影響。大葉大學生物產業科技學系研究所碩士論文。彰化 16.張寶文。2004。食藥用菌培養技術圖解。P: 15-20。中國農業出版社。中國。 17.細野明義。1990。牛乳發酵 機能性 向上。New Food Industry 32:51-64。 18.郭靜娟。2001。薏苡籽實之抗氧化成分及其抑制自由基傷害之研究。國立臺灣大學食品科技研究所博士論文。台北。 19.陳明造。2007。機能性食品。富林出版社。台中。 20.陳俞伶。2005。發酵豆乳中活性胜?村坏艾H C國立臺灣海洋大學食品科學系研究所碩士論文。基隆。 21.曾金木。1998。食物營養。躍昇文化事業有限公司。台北。 22.曾美華。2004。不同培養條件對舞菇多醣生產之探討,大葉大學生物產業科技學系研究所碩士論文。彰化。 23.黃士禮、陳瑤峰、江文章。1994。省產薏苡籽實中氨基酸、脂肪酸和一般組成成分分析。食品科學。21: 67-74。 24.黃羌維、陳由強。1987。薏苡營養成分和產地環境條件的關係。植物生理學通訊。4: 36-39。 25.黃國書。2007。加工製程對組織化大豆蛋白內異黃酮類含量之影響。國立屏東科技大學食品科學系研究所碩士論文。 26.楊莉君、蔡敬民。1998。薏苡對倉鼠血漿脂質的影響。食品科學。25:638-650。 27.楊詠翔。1999。食品中抗高血壓胜?打熊o展現礦石。食品工業, 31(1): 9-18。 28.解放軍白求恩國際和平醫院研究室。1978。從132種中藥篩出25種有增強動物機體免疫能力的中藥。醫學資料彙編1:62-66。 29.劉正才、蔣紅。2003。天然的薏仁健康法。P: 47-50。暖流出版社。 30.劉伯康、陳惠英、顏國欽。(1999)數種傳統食用植物甲醇萃取物抗氧化性之研究。中國農業化學會誌, 37:105-116。 31.劉伯康。1997。數種傳統食用植物抗氧化性之研究。國立中興大學食品科學系研究所碩士論文。台中 32.劉?X睿, 林慶文。2002。黃豆脂機能活性。科學農業。50: 194-201。 33.劉伯康、陳惠英、顏國欽。1999。數種傳統食用植物甲醇萃取物抗氧化性之研究。中國農業化學會誌。37: 105-116。 34.蔡孟貞。2001。大豆蛋白之凝膠機制。食品工業月刊。33:32-38。 35.鄭心怡。1993。磷脂質與健康。名望出版社。台北。 36.蘇正德。1992。果實種子類中藥之抗氧化性及生育醇含量之調查研究。食品科學。19: 12-24。 37.蘇宗振, 陳銓燦, 張永欣。2003。台灣大豆及其加工產業之研究。科學農業51: 1-11。 38.蘇宗振。2003。台灣薏苡種原農藝性狀變異及利用RAPD鑑別與親緣關係之研究。博士論文。國立中興大學農藝學系。台中。 39.蘇珮琪。1996。薏仁對高脂症和糖尿病病患血漿脂質和血糖的影響。私立輔仁大學食品營養研究所碩士論文。台北。 40.Akoi, M., and N.Tuzihara. 1984. Effects of the hatomugi (*Coixlachryma-jobi* L. var.ma-yuen) on the blood pressure, cholesterol absorption and serum lipids level. Kaseigaku Zasshi 35: 89-96. 41.Bernard,F G. Alexandre,Z.Robert, M.and Catherine, M. 2004.Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolylase and soy-fermented food. Food Research Int.37: 123-131. 42.Breslaw, E. S., and D. H. Kleyn. 1973. In vitro digestibility of protein in yo- gurt at various stages of processing. J. Food Sci. 59:1016-1021. 43.Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., and Catignani, G L. 198- 3.Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. Journal of Dairy Science.66: 1219-1227. 44.Dibois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Reber, P. A. and Smith F. 1956. Colorimetric method for determineation of sugars and related substances. Analytical Chem. 28: 350-356. 45.Dinis, T.C.P.,Madeira, V.M.C.and Almeida, L. M. 1994. Action of phenoic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of memembrance lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Arch. Biochem. Biophys.315: 161-169. 46.Feng, X.M. , Anders R.B.Eriksson , Johan Sahnurer.2005.Growth of lactic acid bacteria and *Rhizopus oligosporus* during barley tempeh fermentation , International J.Food Micro.104 : 249-256. 47.Feng, J. and Y. L. Xiong. 2002. Interaction of myofibrillar and preheated soy protein. J. Food Sci.67: 2851-2856. 48.Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies. p.636-69, p.685. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA. 49.Hesslite,C.W.,Smith, M.,Bradle,R.and Djien,K.S.1963.Investigations of tem- peh an Indonesian food.Dev.Ind.Microbiol.4:275-287. 50.Hideo,E.Hiromichi,O.Shunro,K.and Toshihiko,O.1999.New antioxidant isol- ated from Tempeh.J.Agric.Food Chem 44 : 696-700. 51.Hollenberg, M.D., 1994. Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. Trends in Pharmacological Sciences 15: 108- 114. 52.Hsin, Lee., Yu-Hsiang, Hung., Cheng-Chun, Chou.2007.Solid-state fermentati- on with fungi to enhance the antioxidative, total phenolic and anthocyanin contents of black bean.Food science. 35: 89-96. 53.Ko , S.D.and Hesseltine , C.W.1974.Tempe and occurrence of phenolic phytochemicals.J.AmDiet Assoc.99 : 213-218. 54.Kon,S.1979. Effect of soaking temperature on cooking and nutritional quality of beans. J. Food Sci., 44 : 1329-1334 1340 55.krbicek,C.P. , Hample,W.and Rohr,M.1979.Manganese deficiency leada to elevated amino acid pools in citric acid accumulating *Aspergillus niger*.Arch.Microbiol.123 : 73-79. 56.Ronenberg,H.J.1984.Reduction of incubation time for tempeh

fermentation by use of pregerminated inoculum. *Econ. Bot.* 38 : 433-438. 57. Messina, M. J., Messina, V., and Setchell, K. D. R. 1994. The Simple Soybean and Your Healthy. Avery Publishing Group, New York 58. Mora-Escobedo, R., Paredes-Lopez, O., & Gutierrez-Lopez, G. F. 1994. Effect of germination on the rheological and functional properties of amaranth seeds. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 24:241-246. 59. Murphy, C. T., Kellie, S., Westwick, J., 1993. Tyrosine – kinase activity in rabbit platelets stimulated with platelet-activating factor. *European Journal of Biochemistry* 216: 639-651. 60. Nakamura, Y., N. Yamamoto, K. Sakai, A. Okubo, S. Yamazaki, and T. Taka- no. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.* 78: 1253-1257. 61. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., and Takano, T. 1995. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science.* 78: 1253-1257. 62. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutri.* 44: 307. 63. Paola I. Angulo-Bejarano, 2007. Tempeh flour from chickpea (*Cicerarietlnu m L.*) nutritional and physicochemical properties. *Food chemistry.* 106:106-112 64. Park Y, Suzuki H., Lee YS, Hayakawa S and Wada S. 1988. Effect of coix on plasma, liver, and fecal lipid components in the rat fed on lard or soybean oil cholesterol diet. *Biochem Med Metab Biol.* 39: 11-17. 65. Pratt DE, Birac PM. 1979. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J Food Sci* 44: 1720-1723. 66. Ramire-Suarez, J. C. and Y. L. Xiong. 2002. Transglutaminase cross-linking of whey /myofibrillar proteins and the effect on protein gelation. *J. Food Sci.* 67: 2885-2891. 67. Ramos, R. R., F. Alarcon-Aguilar, A. Lara-Lemus, and L. Flores-Saenz. 1992. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch. Med. Res.* 23: 59-64. 68. Sarker, P. K., Jones, L. J., Craven, G. S., Somerset, S. M. and Palmer, C. 1997. Amino acid profiles of Kinema, a soybean-fermented food. *Food Chem.* 59 : 69-75. 69. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthane on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40:945. 70. Steinkraus, K. H., van Buren, J. P., Provvidenti, M. J. and Hand, D. B. 1960. Studies on tempeh-an Indonesian fermented soybean food. *Food Res.* 25 : 777-788. 71. Takahashi, M., C. Konno, and H. Hikino. 1986. Isolation and hypoglycemic activity of coixan A, B, C, glycans of *Coix lacryma-jobi var. ma-yuen* seed. *Planta Med.* 52: 64-65. 72. Tamura, Y. and Takenawa, T. 1999. Antioxidative activity of water soluble extracts from okara fermented with *Bacillus natto* and *Rhizopus oligosporus*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 46 : 561-569. 73. Valeria Rossetti and Anna Lombard. 1996. Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia.* 43: 63-67. 74. Wolf, W. J., F. L. Baker, and K. L. Bernard. 1981. Soybean seed-coat structured features : pits, deposits and cracks. *Scanning Electron Microscopy.* 3 : 531. 75. Wright, S. M., and Salter, A. M. 1998. Effect of soy protein on plasma cholesterol and bile acid excretion in hamsters. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 119B: 247-254.