

國產黑豆機能性產品之研發

陳曉菁^{(1)*} 陳嘉琪⁽²⁾ 殷儷容⁽³⁾ 張錦興⁽¹⁾ 陳昱初⁽¹⁾

摘要

為提升國產黑豆之保健機能性與產業應用潛力，本研究以臺南 3 號黑豆為原料，結合酵素水解與益生菌發酵技術，探討其產物生物活性與評估代謝症候族群不易形成體脂肪之功效。試驗先將臺南 3 號黑豆利用澱粉酶和纖維酶酵素水解 3 小時後，再併用益生菌（動物性約氏乳酸桿菌 *L. plantarum* BCRC10069、植物乳酸桿菌 *L. johnsonii* BCRC17010）發酵 12 小時。結果顯示，總酚含量上升至 578.01 $\mu\text{g/mL}$ 及 556.01 $\mu\text{g/mL}$ ；清除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 自由基能力上升至 31.53 mM 及 27.81 mM（相對 Trolox 含量）、游離胺基酸含量上升至 995.18 mg/100g 及 1063.99 mg/100g，進一步以脂多醣誘導之 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞發炎模式進行試驗，具有抗發炎與免疫調節能力之助益。在動物實驗方面，利用高脂飼料誘導肥胖的動物，每日給予劑量為 1,000 mg/kg 的黑豆蛋白 (SS) 與黑豆發酵物 (SSB)，經 12 週後發現黑豆蛋白 SS 與黑豆發酵物 SSB 對於延緩體重增加、降低體脂肪生成及減少肝臟脂肪堆具有正向的功效，且皆不影響肝、腎功能，研究結果說明國產黑豆經加工處理後可開發為高值化保健農產機能性食品。

關鍵詞：臺南 3 號黑豆、益生菌發酵、抗氧化能力、代謝症候群、不易形成體脂肪

(1) 農業部臺南區農業改良場。

(2) 財團法人農業科技研究院農業資材與加值研究所。

(3) 國立高雄科技大學水產食品科學系。

*通訊作者 (hcchen@mail.tndais.gov.tw)

前言

黑豆 (*Glycine max* (L.) Merr) 為豆科 (Fabaceae) 大豆屬 (*Glycine*)，一年生草本植物，食用歷史悠久，傳統中醫學上具有醫食同療的素材之一，黑豆富含花青素同時富含許多生理活性物質，包括皂素 (Saponin)、酚類化合物 (Phenolic compound)，如：異黃酮類 (Isoflavone)、花青素 (Anthocyanins) 及維生素 E 等，可改善血液循環、抗氧化、抗發炎及抗腫瘤等生理活性 (Choi *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2012)；水蘇糖 (Stachyose) 和棉子糖 (Raffinose) 等寡糖，有利於雙叉桿菌生長，能改善腸內菌相 (Hou *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2005)，另黑豆經 *Aspergillus awamori* 發酵後，可提高總酚、抗氧化活性及糖苷配基異黃酮 (aglycone isoflavones) 含量 (Lee *et al.*, 2008)；經 *Bacillus natto* 發酵之黑豆亦有相同結果 (Hu *et al.*, 2010)。經 *Monascus pilosus* 發酵之黑豆抑制脂肪細胞和高脂飲食誘導肥胖小鼠的脂質累積 (Kwon *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2021)。研究發現黑豆發酵物或萃取物對於對抗肥胖、調節血糖與血脂具有正向的功效 (Ganesan *et al.*, 2017; Ahn *et al.*, 2007)。代謝症候群異常於後續發展為心血管疾病、糖尿病及高血脂之風險，較一般族群高出約 2 至 6 倍。根據臺灣衛生福利部國民健康署統計，2020 年至 2024 年間於 20 至 64 歲成人，每 4 人就有 1 人有代謝症候群異常，顯示代謝異常問題於國內亦相當普遍。因此，有效管理與改善代謝症候群相關指標，對於降低慢性疾病發生風險及提升國人精準健康具有重要意義。為了強化進口替代作物的發展，農業部「糧食產業全面升級計畫」農糧產業精進政策中，鼓勵農民種植進口替代作物，同時讓國人了解國產黑豆的蛋白質含量與黑豆鮮度均優於進口黑豆，本場進行黑豆機能性成分技術研發，開發黑豆植物蛋白飲相關產品，提供消費者多樣化選擇。

材料與方法

一、實驗材料為購自嘉義縣義竹雜糧生產合作社之臺南 3 號黑豆。

二、黑豆發酵實驗：

- (一) 益生菌發酵試驗：黑豆與水浸泡 8 小時，再添加澱粉酶和纖維酶水解 3 小時後，加入 0.1% (v/v) 之二次轉接並活化 24 小時菌液分別為動物性約氏乳酸桿菌 (*Lactobacillus plantarum* subsp. BCRC 10069) 和植物乳酸桿菌 (*Lactobacillus johnsonii* BCRC 17010) 及其二者的混合菌株，於 37°C 下進行發酵，分別 0、4、8、12 小時後，分別取樣進行分析試驗，以未經水解處理浸泡黑豆為對照組 (Blank)。
- (二) 菌數計數：取 0.5 mL 發酵液加入 4.5 mL 生理食鹽水，震盪後進行十倍連續稀釋，再取 0.1 mL 稀釋液，注入 MRS agar 表面，並以塗抹棒均勻塗抹，於 37°C 培養 24 小時後計算其菌落數。

- (三) pH 值：利用 pH meter 測定 pH 值。
- (四) 還原糖 (Reducing sugar)：利用 DNS 試劑之 3,5-二硝基水楊酸 (3,5-dinitrosalicylic acid) 與還原糖共熱反應，產生被還原成棕紅色胺基化合物，利用波長 540 nm 下測其吸光值。藉由葡萄糖 (Glucose) 標準檢量線換算還原糖含量，單位為 mg/mL。在避光條件下，將 1 mL 樣品溶液與 1.5 mL DNS 混合後於 100°C 沸水反應呈色 5 分鐘，冷卻後以分光光度計測定其吸光值 (Bernfeld, 1995)。
- (五) 總酚 (Total phenol)：取 50 μ L 樣品加入 50 μ L 10%佛林試劑 (Folin-Ciocalteu's reagent) 混合均勻，再加入 200 μ L 5%碳酸鈉混合，於室溫下靜置 60 分鐘後，以波長 750 nm 吸光值 (Singleton *et al.*, 1999)。藉由沒食子酸 (gallic acid) 標準檢量線換算總酚含量，單位為 μ g/mL。
- (六) 總抗氧化能力 (清除 ABTS⁺ 自由基能力)：以蒸餾水配製 70 mM K₂S₂O₈，再以 PBS buffer 配製 2.0 mM 2,2'-azono-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺)，將上述二試劑以 1:20 比例混合靜置 16 小時即成為 ABTS⁺ stock solution，使用前需以 PBS buffer 稀釋到吸光值 0.800 ± 0.03 。取 10 μ L 樣品加上 990 μ L 經稀釋的 ABTS⁺ stock solution，在避光下靜置 6 分鐘，以波長 734 nm 下測定其吸光值 (Miller *et al.*, 1993)。由標準品 Trolox 所得之檢量線，換算樣品中相對 Trolox 清除 ABTS⁺ 自由基能力之含量，單位為 mM。清除 ABTS⁺ 自由基能力 (%) = 【(控制組吸光值 - 樣品組吸光值) / 控制組吸光值】 $\times 100\%$ 。
- (七) 胺基酸組成 (Free amino acid composition)：參考 Helda *et al.*, (2011) 方法測定。樣品以 0.22 μ m PVDF 濾膜過濾後，進行 aTRAQ 胺基酸定量分析。使用設備如下：
1. 幫浦：Agilent 1260 G1312B Binary Pump
 2. 管柱：Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 2.7 μ m)
 3. 質譜儀：AB Sciex Instruments QTRAP 5500
 4. 光源來源：Turbo V Ion Source
 5. HPLC 方法；
 - (1) 注射量：2 μ L
 - (2) 移動向：
 - A. 0.1% (v/v) Formic acid / water
 - B. 0.1% (v/v) Formic acid / Methanol

(3) 梯度；

步驟	時間 (min)	流速 ($\mu\text{l/min}$)	A (%)	B (%)
0	0.10	400	98.0	2.00
1	12.0	400	60.0	40.0
2	17.0	400	60.0	40.0
3	18.0	400	10.0	90.0
4	20.0	400	10.0	90.0
5	21.0	400	98.0	2.0

6. Mass 光譜儀；

- (1) 掃描型式：MRM (Multiple Reaction Monitor)
- (2) 極性：Positive
- (3) 光源溫度：600°C
- (4) 數據採集：Analyst 1.5 software

7. 參數表：

- (1) 簾式氣體 (CUR)：20.00 psi
- (2) 霧化氣體 (GS1)：60.00 psi
- (3) 碰撞活化解離 (CAD)：Medium
- (4) 加熱氣體 (GS2)：60.00 psi
- (5) 電噴霧毛細管電壓：5500.00 V
- (6) 碰撞能量 (CE)：30.00 V
- (7) 去簇電壓 (DP)：30.00 V
- (8) 入口電壓 (EP)：10.00 V

三、動物試驗：

本研究於財團法人農業科技研究院執行 (財團法人農業科技研究院實驗動物照護及使用委員會同意書編號：實動字第 112038C1 號)，實驗動物購自於國家實驗研究院之國家生物模式中心，使用動物品系為 C57BL/6JNarl，週齡為 8 週，試驗動物每組 10 隻，分組如下：

(一) 動物實驗設計與規劃

1. 正常對照組 (Normal Control)：以一般飼料 (LabDiet 5058：20%蛋白質，9%脂肪，55%碳水化合物，熱量為 3.46 kcal/g) 飼養，試驗期間不限制飲食。以管餵管投予對照物質-無菌飲用水。
2. 高脂飲食組 (HFD；Negative control 組)：以高脂飼料 (Research Diets D12451：24%蛋白質，24%脂肪，41%碳水化合物，熱量為 4.73 kcal/g) 飼養，試驗期間不限制飲食。以管餵管投予對照物質-無菌飲用水。
3. 黑豆蛋白 SS 組：以高脂飼料 (D12451) 飼養，試驗期間不限制飲

食。以管餵管投予試驗物質-黑豆蛋白 SS (配製濃度為 150 mg/ml，投予劑量為 1,000 mg/kg，假設小鼠體重為 45 g，管餵投予體積為 0.3 ml)。

4. 黑豆發酵物 SSB 組：以高脂飼料 (D12451) 飼養，試驗期間不限制飲食。以管餵管投予試驗物質-黑豆發酵物 SSB (配製濃度為 150 mg/ml，投予劑量為 1,000 mg/kg，假設小鼠體重為 45 g，管餵投予體積為 0.3 ml)。

- (二) 試驗為期 12 週，期間每日紀錄體重及攝食量，於第 4、8 和 12 週進行動物前肢抓力測試，試驗結束後犧牲動物紀錄肝臟重量與腎臟周圍、腸繫膜及副睪脂肪重量。體脂肪率計算為 $[\text{體脂肪重量 (g)} / \text{體重 (g)}] \times 100\%$ ，而體脂肪重量為腎臟周圍、腸繫膜及副睪脂肪的重量總和。
- (三) 動物前肢抓力測試：將動物輕放於拉力計拉桿上，操作人員輕拉固定動物尾巴，使動物前肢拉動抓力計拉桿以偵測動物前肢肌肉力量 (單位：kgf)。

四、統計分析：

試驗結果以平均值±標準偏差表示，所得數據使用 Statistical Package for Social Science (SPSS) 20.0 統計套裝軟體進行統計分析，利用單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, ANOVA) 處理間之顯著性。所有數值以 mean ± SD 表示， $p < 0.05$ 表示具有統計上意義。

結果與討論

一、黑豆最適發酵條件探討

運用臺南 3 號黑豆水解物接種動物性約氏乳酸桿菌、植物約氏乳酸桿菌及其混合菌株發酵，探討其 pH 值、還原糖及益生菌數之影響。結果顯示，黑豆水解終點 3 小時之 pH 值約為 5.92 及還原糖含量達 26.02 mg/mL，發酵時間 12 小時後，pH 值顯著下降至 4.95、4.91 及 4.66 (圖 1 (A-C))；同時菌數顯著增加至 8.81、8.81 及 8.94 log CFU/mL (圖 1 (A-C))；而還原糖含量則下降至 24.17 mg/mL、23.41、21.68 mg/mL (圖 1 (A-C))，此結果顯示黑豆水解物可做為良好的益生質，其釋放之還原糖可以被益生菌有效利用，進而促進菌數生長並產生有機酸與代謝，使 pH 下降。進一步分析機能性成分變化，發酵 12 小時後總酚含量顯著上升至 556.01 μg/mL、578.01 μg/mL 及 583.45 μg/mL (圖 2)；清除 ABTS⁺ 自由基能力亦顯著提升至 25.81、31.53 及 27.81 mM (以 Trolox 當量表示) (圖 3)；此外，游離胺基酸含量 (FAA; free amino acids) 分別提升至 995.18 mg/100g 及 1063.99 mg/100g，而支鏈胺基酸含量 (BCAA) 含量為 74.38 及 71.46 mg/100g (圖 4)。寡糖類分析 (包

含 oilgosaccharides、raffinose 及 stachayose) 含量變化，由圖 4 結果顯示經酵素水解 3 小時期間其寡糖 (oligosaccharides) 含量為 3.03~4.17 g/100g、蜜三糖 (raffinose) 含量為 0.49~1.08 g/100g、水蘇四糖 (stachayose) 含量為 2.36~2.79 g/100g (圖 5)。綜合上述結果，臺南 3 號黑豆水解物，利用益生菌發酵 12 小時，可使 pH 下降，菌數提升至 8.5 log CFU/mL 以上，推測乳酸菌於生長過程中，利用蛋白質作為氮源，將大分子蛋白質分解為小分子胍肽與胺基酸，進而提升其生物可利用性 (Ziegler *et al.*, 1998)。本研究結果與先前文獻相符，黃鈺婷 (2009) 指出 *Lactobacillus plantarum* 可有效利用葡萄糖進行代謝；Juan and Chou 等學者 (2010) 及 Orozco 等學者 (2007) 均證實 *Bacillus subtilis* BCRC14715 與 *Lactobacillus plantarum* 等微不同菌種發酵皆提升大豆類之抗氧化能力；Qin 等學者 (2010) 亦指出 *Aspergillus* sp. 或 *Bacillus* sp. 之不同菌種發酵皆可提高黑豆之抗氧化活性，與本研究結果相符。李惠紅等學者 (2023) 以 LPS 誘導小鼠巨噬細胞 (RAW 264.7) 進行體外試驗，結果顯示黑豆水解及發酵產物可降低發炎相關基因 COX-2 與 iNOS 之表現，顯示其具潛在抗發炎與免疫調節能力。

二、黑豆發酵物對小鼠體重、食物利用率及脂肪組織重量之影響

試驗執行期間食用高脂飼料的組別體重變化量較食用一般飼料組顯著增加。比較各食用高脂飼料的組別，可明顯發現至第 3 週起投予黑豆蛋白 SS 組與黑豆發酵物 SSB 組的體重變化量較高脂飲食組 (HFD；Negative control 組) 低且可維持至第 12 週，顯示食用黑豆素材可延緩體重增加速度 (圖 6)。依據試驗動物體重變化量與攝食量計算食物利用率 (食物利用率 = [體重增加量 (g) / 總飼料攝取量 (g)] × 100%)，比較各食用高脂飼料的組別，發現黑豆蛋白 SS 組與黑豆發酵物 SSB 組食物利用率雖與高脂飲食組 (HFD；Negative control 組) 未見統計差異，但卻可見黑豆蛋白 SS 與黑豆發酵物 SSB 兩組的食物利用率有較高脂飲食組 (HFD；Negative control 組) 低之趨勢，說明食用黑豆蛋白影響食物利用率，進而延緩動物體重增加之效果 (圖 7)。於試驗第 4、8、12 週檢測各組動物前肢抓力，結果顯示食用高脂飼料動物前肢抓力下降，當搭配食用黑豆素材可延緩動物前肢抓力下降的狀況，又比較各食用高脂飼料的組別發現食用黑豆發酵物 SSB 組的動物前肢抓力具較食用黑豆蛋白 SS 大之趨勢 (圖 8)。本試驗進一步探討在相同餵食高脂飼料狀況下，分別投予黑豆蛋白 SS 與黑豆發酵物 SSB 經 12 週後對於動物體脂肪累積影響，故試驗採集副睪、腎臟周圍與腸繫膜周圍的脂肪並加總脂肪重量 (為體脂肪重量)，發現連續餵食黑豆蛋白 SS 與黑豆發酵物 SSB 後，動物體脂肪重量較高脂飲食組 (HFD；Negative control 組) 少，且黑豆發酵物 SSB 組具顯著性差異，可說明補充黑豆發酵物 SSB 可降低高脂飲食造成的體脂肪提升 (圖 9)。動物試驗結果與先前研究指出黑豆蛋白可抑制脂肪生成 (lipogenesis) 並促進脂肪分解 (lipolysis) 之結果相同。綜合上述可說明，黑豆發酵物 SSB 可抑制脂肪堆積、維持肌肉功能及調

節代謝，延緩體重增加，顯示其在不形成體脂肪之應用潛力。

結論

本研究以臺南 3 號黑豆為原料，探討酵素水解與益生菌發酵對其機能性成分及生理活性之影響，結果顯示黑豆水解物與發酵物之營養價值及機能性成分明顯提升，發酵過程不僅促進益生菌生長與代謝，亦可提升總酚含量與抗氧化能力，且具有抑制發炎相關因子表現之潛力，顯示其具抗發炎與免疫調節能力。動物試驗結果進一步證實，在高脂飲食誘導之肥胖小鼠模式中，持續 12 週在高脂飲食下適時食用黑豆蛋白 SS 與發酵物 SSB 組皆不影響肝、腎功能，且可有效延緩體重增加、降低食物利用率、減少體脂肪堆積及改善肝臟脂質沉積。其中以黑豆發酵物 SSB 組表現較佳。依體表面積換算結果，推估成人每日攝取約 4.88 g 黑豆蛋白即可達到相對應之生理效益。鑑於全球肥胖與代謝相關疾病盛行率持續上升，且國人過重與肥胖已有過半數，開發具機能性之植物性蛋白產品具重要性與市場潛力。綜上所述，本研究證實適當加工技術可有效提升黑豆植物蛋白之保健機能性與應用價值，未來可應用於素食、特殊飲食需求族群及運動營養補充等全年齡補充蛋白質需求，具發展為預防不易形成體脂肪之代謝症候群相關產品之潛力。

誌謝

本研究承蒙農業部科技司、本場各級長官的指導與支持，以及本場作物改良科加工生技研究室加工助理人員進行各項實驗及分析協助，另感謝財團法人農業科技研究院產業分析組相關產業推動人員提供實務上的建議，得以順利完成，特此致謝。

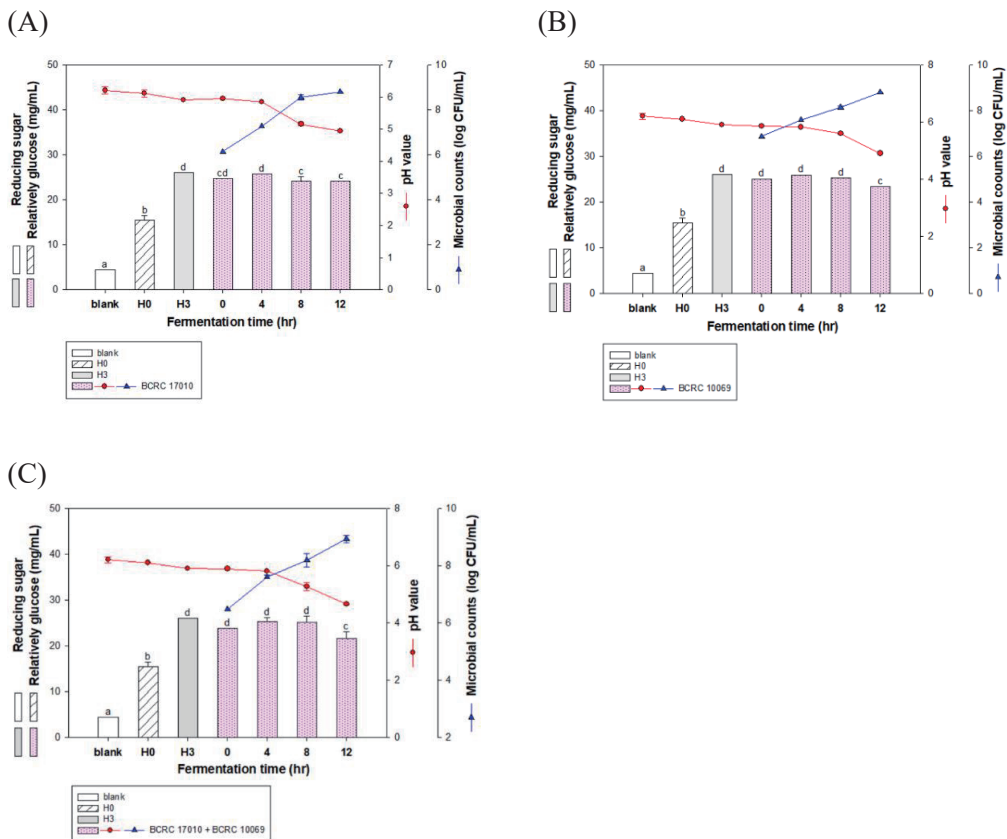


圖 1、黑豆水解物（臺南 3 號）接種動物性約氏乳酸桿菌發酵 12 小時期間之 pH 值、菌數及還原糖含量變化。

Figure 1. Changes in pH, probiotic microbial counts and reducing sugar of hydrolyzed black soybean during 12 hr fermentation with *Lactobacillus plantarum* subsp. BCRC 10069 and *Lactobacillus johnsonii* BCRC 17010.

a~d: Different lowercase letters on the top of each bar are significantly different ($p < 0.05$).

blank: Tainan No. 3 black soybean without hydrolysis.

H0: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 0 hour.

H3: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 3 hours.

(A) BCRC 17010: Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by *L. johnsonii*.

(B) BCRC 10069: Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by *L. plantarum*.

(C) BCRC 17010 + BCRC 10069: Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by the mixture of *L. johnsonii* and *L. plantarum*.

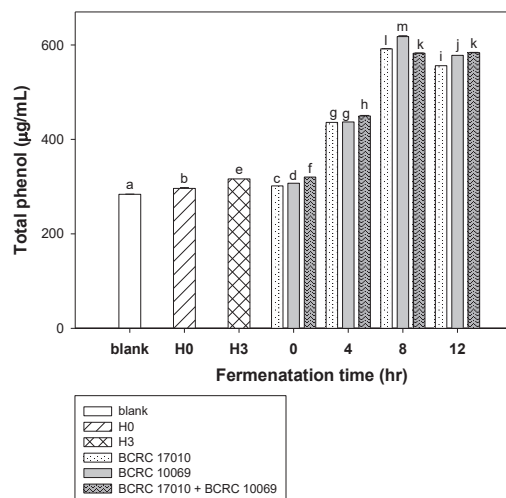


圖 2、黑豆水解物（臺南 3 號）接種動物性約氏乳酸桿菌或植物乳酸桿菌發酵 12 小時期間之總酚含量變化。

Figure 2. Changes in pH, probiotic microbial counts and reducing sugar of hydrolyzed black soybean during 12 hr fermentation with *Lactobacillus plantarum* subsp. BCRC 10069 and *Lactobacillus johnsonii* BCRC 17010.

a~m: Different lowercase letters on the top of each bar are significantly different ($p < 0.05$).

blank: Tainan No. 3 black soybean without hydrolysis.

H0: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 0 hour.

H3: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 3 hours.

BCRC 17010: Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by *L. johnsonii*.

BCRC 10069: Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by *L. plantarum*.

BCRC 17010 + BCRC 10069: Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by the mixture of *L. johnsonii* and *L. plantarum*.

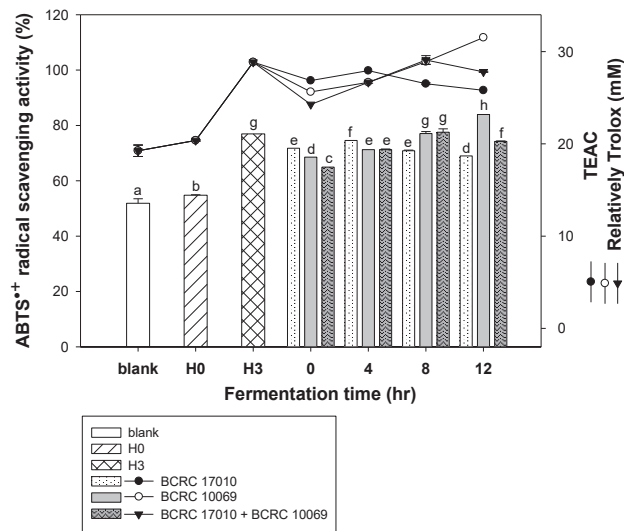


圖 3、黑豆水解物（臺南 3 號）接種動物性約氏乳酸桿菌或植物乳酸桿菌發酵 12 小時期間之清除 ABTS⁺ 自由基能力與相對 Trolox 含量變化。

Figure 3. Change in ABTS⁺ radical scavenging activity of hydrolyzed black soybean during 12 hr fermentation with *Lactobacillus plantarum* subsp. BCRC 10069 or *Lactobacillus johnsonii* BCRC 17010.

a-h: Different lowercase letters on the top of each bar are significantly different ($p < 0.05$).

blank: Tainan No. 3 black soybean without hydrolysis.

H0: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 0 hour.

H3: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 3 hours.

BCRC 17010: Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by *L. johnsonii*.

BCRC 10069: Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by *L. plantarum*.

BCRC 17010 + BCRC 10069: Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by the mixture of *L. johnsonii* and *L. plantarum*.

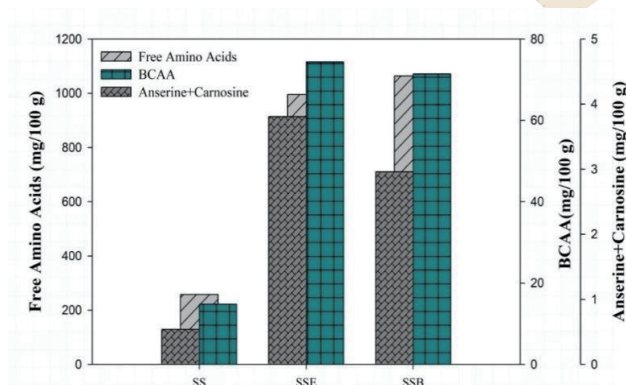


圖 4、黑豆水解物（臺南 3 號）併用接種動物性約氏乳酸桿菌或植物乳酸桿菌發酵後之游離胺基酸、支鏈胺基酸(BCAA)與胜肽含量變化。

Figure 4. Total free amino acid and branched chain amino acid (BCAA) content of the hydrolyzed and fermented "Tainan No. 3" black soybean.

^{a-h}: Different lowercase letters on the top of each bar are significantly different ($p < 0.05$).

SS: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 0 hour.

SSE: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 3 hours.

SSB : Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by the mixture of *L. johnsonii* (BCRC 17010) and *L. plantarum* (BCRC 10069) .

註：僅針對本批次 (Lot ID：SA03022-0323) 樣本之檢測結果。

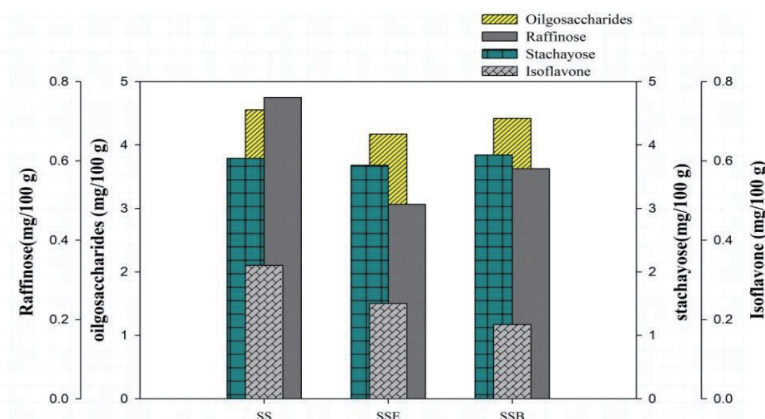


圖 5、黑豆水解物（臺南 3 號）與發酵物之寡糖與異黃酮含量變化。

Figure 5. Total oligosaccharide composition and isoflavone content of the hydrolyzed and fermented "Tainan No. 3" black soybean.

^{a-h}: Different lowercase letters on the top of each bar are significantly different ($p < 0.05$).

SS: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 0 hour.

SSE: Tainan No. 3 black soybean hydrolyzed for 3 hours.

SSB : Tainan No. 3 black soybean hydrolysates fermented by the mixture of *L. johnsonii* (BCRC 17010) and *L. plantarum* (BCRC 10069) .

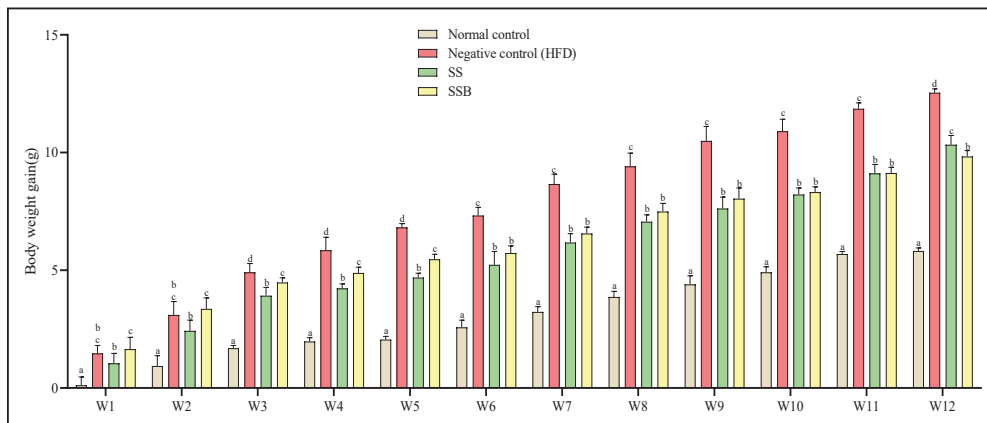


圖 6、實驗動物在為期 12 週試驗期間體重增加量變化。

Figure 6. Body weight gain in C57BL/6JNarl mice during 12 weeks experiment period.

註：每天量測動物體重，並以體重變化量公式計算之。體重變化量公式＝結束體重－起始體重。

a,b,c,d 不同字母代表有顯著性差異 ($p < 0.05$)。

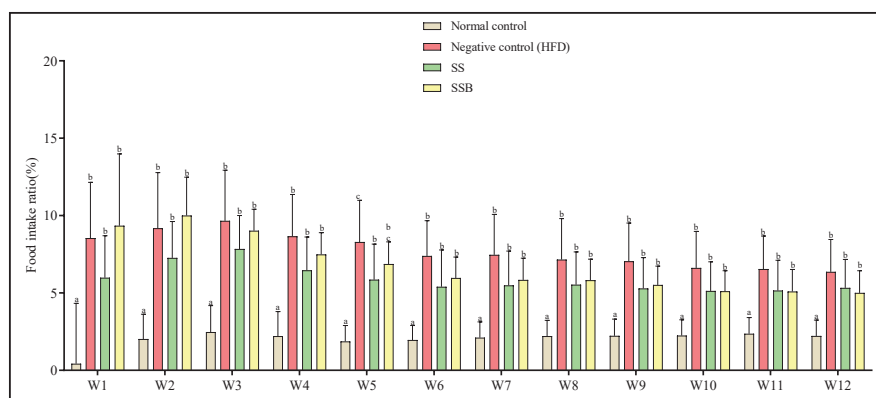


圖 7、實驗動物在為期 12 週試驗期間食物利用率變化。

Figure 7. Food efficiency of C57BL/6JNarl mice during 12 weeks experiment period

a,b,c,d Statistically significant difference between control and high-fat control at $p < 0.05$.

a,b,c,d Statistically significant difference between high-fat control and treated group at $p < 0.05$.

Value is expressed as mean $\pm$ SD ($n=10$).

¹ Food efficiency: (body weight gain/total food intake) *100%.

註：每日量測各組動物飼料攝取量，以食物利用率公式計算之。食物利用率 = [體重增加量 (g)/總飼料攝取量 (g)] $\times$ 100%。a,b 不同字母代表有顯著性差異 ($p < 0.05$)。

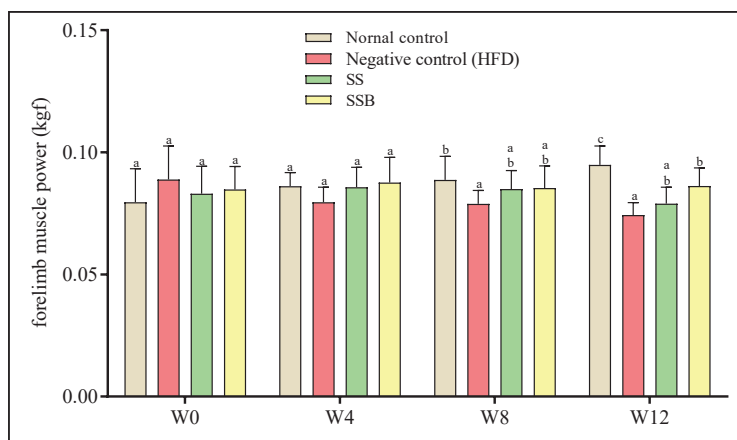


圖 8、黑豆蛋白對高脂飲食動物前肢抓力表現之影響。

Figure 8. Effects of black soybean protein on forelimb muscle power in C57BL/6JNarl mice fed with HFD.

^{a,b} Statistically significant difference between control and high-fat control at $p < 0.05$.

註：^{a,b} 不同字母代表有顯著性差異 ($p < 0.05$)。

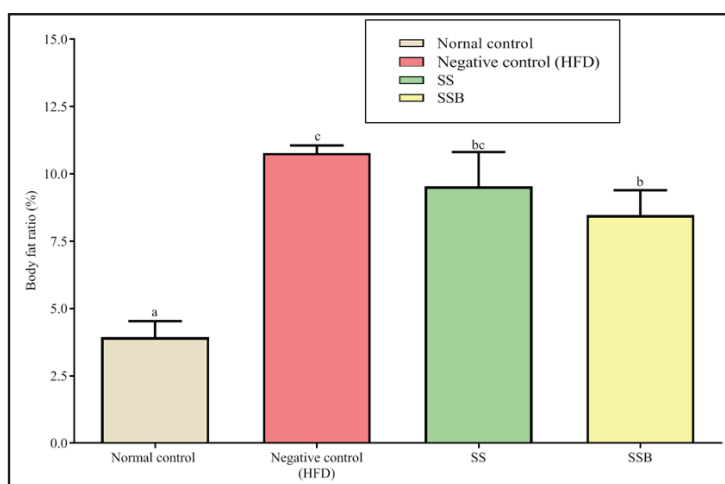


圖 9、各組動物體脂肪率。將各組動物附睪附近脂肪、腎臟周圍脂肪與腸系膜上脂肪加總後進行計算，體脂肪率公式為體脂肪率 = [體脂肪量 (g) / 體重 (g)] × 100%。

^{a,b,c} 不同字母代表有顯著性差異 ($p < 0.05$)。

Figure 9. Effects of black soybean protein on visceral fat weight in C57BL/6JNarl mice fed with HFD.

^{a,b,c} Statistically significant difference between control and high-fat control at $p < 0.05$.

Value is expressed as mean $\pm$ SD (n=10).

#Total fat is the sum of mesentery fat, kidneys fat and epididymis fat.

參考文獻

- 李惠虹、陳曉菁、彭建豪、陳建利、殷儷容。2023。臺南3號青仁黑豆之益生菌最適發酵條件及生理活性探討。臺北：台北海洋科技大學學報，第十四卷、第一期，第1-20頁。
- 黃鈺婷。2009。利用饋料批式發酵及連續細胞循環系統生產高細胞密度乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* LP69 之研究。碩士論文。台中：弘光科技大學食品暨應用生物科技所。
- Ahn, I. S., Kim, S. O., Kong, C. S., Chung, H. Y., Do, M. S., and Park, K. Y. 2007. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *J. Med. Food*. 10 (3): 552-6.
- Bernfeld, P. 1955. Methods in Enzymology. Academic Press, 149-158.
- Choi, Y. M., Yoon, H., Lee, S., Ko, H. C., Shin, M. J., Lee, M. C., Hur, O. S., Ro, N. Y., and Desta, K. T. 2020. Isoflavones, anthocyanins, phenolic content, and antioxidant activities of black soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) as affected by seed weight. *Sci. Rep.* 10: 19960.
- Ganesan, K., Xu, B. 2017. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. *Nutrients*. 4;9 (5): 455.
- Han, R., Ebert, C. E., Zhao, Z., Li, L., Zhang, H. and Tian, R. 2005. Novel characteristics of *Bifidobacterium bifidum* in solid state fermentation system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1245-1248.
- Helda, P. K., White, L., and Pasquali, M. 2011. Quantitative urine amino acid analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry and a TRAQR reagents. *J. Chromatogr.* 879: 2695-2703.
- Hou, J. W., Yu, R. C., and Chou, C. C. 2000. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Res. Int.* 33 (5): 393-397.
- Hu, Y., Ge, C., Yuan, W., Zhu, R., Zhang, W., and Du, L. 2010. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 90(7): 1194-1202.
- Jia, Z., Tang, M., and Wu, J. 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559.
- Juan, M. Y., and Chou, C. C. 2010. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbiol.* 27: 586-591.
- Kim, D. M., Lee, H., and Yoo, S. H. 2012. Compositional changes and physical properties of soymilk prepared with pre-soaked-fermented soybean. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55(1): 121-126.
- Kwon, S. H., Ahn, I. S., Kim, S. O., Kong, C. S., Chung, H. Y., Do, M. S., and Park, K. Y. 2007. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *J. Med. Food* 10 (3): 552-6.
- Lee I. H., Hung Y. H., and Chou C. C. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *Int. J. Food Microbiol.* 121(2): 150-156.

- Lee, H. J., Cho, H. E., and Park, H. J. 2021. Germinated black soybean fermented with *Lactobacillus pentosus* SC65 alleviates DNFB-induced delayed-type hypersensitivity in C57BL/6N mice. *J. Ethnopharmacol.* 265: 113236.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner, A. 1993. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clin. Sci.* 84 (4): 407-412.
- Oh, H. G., Kang, Y. R., Lee, H. Y., Kim, J. H., Shin, E. H., Lee, B. G., Park, S. H., Moon, D. I., Kim, O. J., Lee, I. A., Choi, J., Lee, J. E., Park, K. H., and Suh, J. W. 2014. Ameliorative effects of *Monascus pilosus*-fermented black soybean (*Glycine max* L. Merrill) on high-fat diet-induced obesity. *J. Med. Food.* 17 (9): 972-8.
- Orozco, F. R., Frias, J., Muñoz, R., Zielinski, H., Piskula, M. K., and Kozłowska, H. 2007. Fermentation as a bio-process to obtain functional soybean flour. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8972-8979.
- Qin, Y., Jin, X. N., and Park, H. D. 2010. Comparison of antioxidant activities in black soybean preparations fermented with various microorganisms. *Agric. Sci. China.* 9 (7): 1065-1071.
- Samruan, W., Oonsivilai, A., and Oonsivilai, R. 2012. Soybean and Fermented Soybean Extract Antioxidant Activities. World Academy of Science, Engineering and Technology, *Int. J. Biol. Biomol. Agric. Food Biotechnological Eng.* 6 (12): 1134-1137.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by meas of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Eenzymol.* 299: 152-178.
- Ziegler, F., Nitenberg, G., Coudray-Lucas, C., Lasser, P., Giboudeau, J., and Cynober, L. 1998. Pharmacokinetic assessment of an oligopeptide-based enteral formula in abdominal surgery patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 124-128.

Development of functional products in domestic black soybean

Hsiao-Ching Chen ^{(1)*} Chia-Chi Chen ⁽²⁾ Li-Jung Yin ⁽³⁾ Chin-Hsing Chan ⁽¹⁾ Yu-Chu Chen ⁽¹⁾

Abstract

To improve the functionality and potential application of domestic black soybeans (*Glycine max* (L.) Merr), it was hydrolyzed by enzymes, and further fermented by probiotics. This study used enzymatic hydrolysis combined with probiotic fermentation technology to explore its bioactivity and anti-metabolic syndrome benefits. Tainan No. 3 black soybeans were hydrolyzed for 3 hours using amylase and cellulase, and then fermented for 12 hours with probiotics (*L. johnsonii* and *L. plantarum*). This shows that the "Tainan No. 3" black soybeans can greatly enhance the anti-inflammatory and immune regulation ability of black beans after enzymatic hydrolysis and probiotic fermentation. This study further investigated black bean protein after probiotic fermentation would alter the beneficial effects on animal metabolic syndromes. The control group of C57BL/6JNarl mice were fed with LabDiet 5058, in comparison with a group fed with high-fat diet (HFD). The experiment group was fed with HFD and supplemented oral with black bean protein (SS) and probiotic fermentation (SSB), prepared by SS, at amount of 1,000 mg/kg body weight. The fat and hepatic lipids, liver and kidney functions were analyzed and compared after 12 weeks. When feeding a high-fat diet at the same time oral administration of black soybean protein, the results found SS and SSB do not affect liver and kidney function. In conclusion, the black soybean protein SSB has positive efficiency in delaying weight gain, reducing body fat production, and reducing liver fat accumulation, indicates its potential to ameliorate metabolic syndrome and can be developed into high-value functional food. In the future, this processing technology can be used as a foundation to establish more diversified and high-value black soybean functional products.

Keywords: Tainan No. 3 black soybean, Probiotic fermentation, Antioxidant activity, Metabolic syndrome, Prevent body fat accumulation

(1) Associate researcher and Researcher and Chief of crop improvement division, and Director of Tainan District Agricultural Research and Extension Station, MOA, R.O.C.

(2) Associate researcher for Agricultural Input and Product Valorization Research Center of Agricultural Technology Research Institute, R.O.C.

(3) Professor of Department of Seafood Science, National Kaohsiung University of Science and Technology, Kaohsiung, R.O.C.

*Corresponding author (hcchen@mail.tndais.gov.tw)