

產學合作案結案報告書

華生技 104 產學字 007 號

化妝品天然保存配方的 開發與測試

甲方：佰世康生化科技股份有限公司

乙方：中華學校財團法人中華科技大學

生物科技系

計劃主持人：張晉峰

目次

表次	II
圖次	III
摘要	IV
第一章 研究緣起與背景	1
第二章 文獻探討	2
第三章 研究方法	6
第四章 研究內容與結果	9
第五章 結論	16
參考書目	16

表次

表 1. 乳酸菌發酵液抗氧化能力測	12
表 2. 酵母菌發酵液抗氧化活性測試	15

圖次

圖 1.沒食子酸檢量線	12
圖 2. 酵母菌光誘導後波長 310 nm 下的吸收波峰	15

摘 要

本研究由乳酸菌與酵母菌發酵過程進行具抗氧化活性物質的篩選。乳酸菌發酵基質丁香與壯陽草萃取液顯示具有抗氧化的特性，但是經過乳酸菌發酵後與添加鮮乳皆會造成抗氧化能力降低，可能是抗氧化物質受到乳酸菌的轉化及與鮮乳的結合後所導致。光誘導後具類菌孢素產生能力酵母菌的水溶性萃取物，無論是 DPPH 自由基清除試驗還是還原力試驗皆表現出提升的抗氧化能力，推測與類菌孢素相關。

第一章 研究緣起與背景

抗氧化劑之用途為防止或延緩物質氧化之過程。主要的作用機制為扮演自由基(free radical)捕捉者的角色，如捕捉油脂自動氧化(auto-oxidation)過程所產生的自由基，以阻止油脂繼續氧化。抗氧化劑依來源可分為合成抗氧化劑與天然物質抗氧化劑。目前，國內外多使用化學合成抗氧化劑，如二丁基羥基甲苯(BHT)、丁基羥基茴香醚(BHA)、沒食子酸丙酯(PG)和三丁基對苯二酚(TBHQ)等。至今越來越多科學研究顯示，大量的 BHT、BHA、TBHQ 會引起動物肝臟腫大，BHT 還可增加微粒體酶的活性，具有一定的負作用。日本的伊東等人 1983 年報導了 BHA 的致癌性後，各國開始對 BHT、BHA 進行限制使用或暫停使用的措施。

天然抗氧化劑可以取自 1) 天然的食材中，如：蔬菜、水果、中藥材、海草等，2) 農業和食品工業下腳料與 3) 特定微生物發酵產物等。天然抗氧化劑目前被廣泛應用於油脂類及含油脂類食品中來減緩脂質的過氧化。另外，由於人體許多疾病如衰老、癌症、糖尿病與心血管疾病等與脂肪酸氧化作用反應之間顯示出密切關聯性。因此，抗氧化物質不僅可以應用在食品工業方面，在人體抵抗氧化破壞的防禦機制中也佔了重要的角色，隨著人們追求天然產物風潮與對食品安全問題

的逐漸重視，天然抗氧化劑的研究和應用已經成為醫藥、化妝品與食品工業重要的課題。

第二章文獻探討

第一節 酵母菌抗氧化物質

酵母菌與酵母菌萃取物長久以來被認為是天然抗氧化物質的主要來源之一。酵母菌本身能合成或轉化許多天然物質提供抗氧化的活性，這些活性物質添加在食品中能延緩脂質的氧化，當作保健營養補充品能改善健康與福祉(Bastin 等，2002; Gazi 等，2001; Ok 等，2003)。與酵母菌本身組成份相關的抗氧化劑包括類胡蘿蔔素、檸檬酸及其鹽類、輔酵素 Q (coenzyme Q)、麩胱甘肽 (glutathion)、生育酚 (tocopherols)、核黃素 (riboflavin) 及其衍生物與 2-(4-羥基苯)乙醇 (2,4-hydroxyphenyl ethanol) 等。其他與酵母菌發酵產物或發酵後酵母菌菌體部份抗氧化或具去除活性氧相關物質包括，氧化型的類胡蘿蔔素、含硒酵母菌、白藜蘆醇(resveratrol)、二十八烷醇(1-Octacosanol)、酵母細胞衍生物，如葡聚糖(glucan)、含硫胺基酸、未辨識的蛋白質、細胞色素 c (cytochrome c)、含銅/鋅超氧化歧化酶(superoxide dismutases; SOD)與其相關基因 CUP1 與 SOD1 (Archibald 2003; Becker 等，2003; Combs 等，2002; Farid 與 Azar 2001; Marova 等，2004; Sakaki 等，2002; Visser 等，2003)。

酵母菌生長在壓力的條件或是培養基含特定成份，如酚類化合物或其他影響好氧生長的毒性物質時，也會誘導出抗氧化物質的產生。Gazi 等人(2001)測試25株酵母菌菌株生長在 yeast peptone dextrose broth (YPD)與 yeast malt extract broth (YMB)培養基於震盪及靜止培養條件下的抗氧化活性發現，所有的菌株至少在其中一種培養條件下都能產生抗氧化的活性。其中以*Hansenula anomala*在YPD震盪培養有最高抗氧化活性，*Rhodotorula glutinis*在YMB靜止培養時有最佳抗氧化活性。在Nishino a與Ishikawa (1998)的專利中描述了由酵母菌完整細胞、發酵產物或萃取物所製備的抗氧化物應用在醫藥品、化妝品與食品部份。這些菌株包括*Candida gropengiesseri*, *C. parapsilosis*, *C. maltosa*, *C. stellata*, *C. tropicalis*, *Hansenula holstii*, *Hyphopichia burtonii*, *Pichia membranaefaciens*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. rubra*, *S. bayanus*, *S. elegans*, *S. unisporus*, *Torulopsis magnoliae* 與 *Zygosaccharomyces bisporus*。這些酵母菌生長在含孟加拉玫瑰紅(Rose Bengal)與不含該染劑的培養基中，在光照的條件下測量菌體的生長狀況外，也收集菌體所生產的抗氧化物質，測試發現具有抑制低密度脂肪氧化與抗動脈硬化方面的功能。也能當作乳液中有效的抗氧化配方。

第二節 乳酸菌與抗氧化物質

乳酸菌(Lactic acid bacteria; LAB)是指能夠代謝糖類、產生 50%以上乳酸之細菌，具有這些功能的細菌包括了：乳酸桿菌(*Lactobacillus*)、鏈球菌(*Streptococcus*)、念球菌(*Leuconostoc*)等。雙歧桿菌或比菲德菌會產生乳酸及醋酸，但乳酸不到 50%，所以嚴格說來不應稱為乳酸菌。但若由保健營養觀點而言，雙歧桿菌同樣具有安全、健康等乳酸菌所標榜之形象，因此目前也是將之納入乳酸菌家族。人類飲用發酵乳品歷史非常悠久，所以，乳酸菌一直被認為是非常安全的菌種（GRAS, generally regarded as safe），是最具代表性的腸內有益菌。乳酸菌被認為具有許多有益的用途，包括具有抗微生物的活性、能提升免疫力與抗腫瘤的活性等(Kullisaar 等，2002; Saarela 等，2002)。同時一些 *Lactobacilli* 菌屬也表現出抗氧化的活性，能夠降低反應性活性氧在實物代謝分解過程中的累積(Kaizu 等，1993)，也具有分解超氧陰離子與過氧化氫的能力(Korpela 等，1997; Miller 與 Britigan 1997; Kullisaar 等，2002)。

過去一些研究描述了由動物性與植物性來源蛋白質，如牛奶蛋白(Chen等，2003)、大麥醇溶蛋白(Chiue等，1997)與玉米蛋白(Chiue等，1997)的抗氧化活性。由這些水解的食物蛋白中衍生出一些胜肽類的物質並顯示出對脂質或脂肪酸高度的抗氧化活性(Saiga等，2003)。最近一些研究也描述牛奶蛋白水解後所釋放的胜肽類物質的抗氧化活性(Suetsuna等，2000; Rival等，2001)。這些抗氧化的活性來自於某些

胺基酸的序列，並與高濃度的組胺酸(histidine)及一些非極性的胺基酸有高度相關(Suetsuna等，2000)。Herna'ndez-Ledesma等(2005)證實一條胜肽鏈(Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ser-Asp-Ile)具有比丁基羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole; BHA)較佳的清除活性氧的能力。除此之外，一些具環狀結構的胺基酸也具抗氧化的特性(Rajalakshmi與Narasimhan 1996)。食物在發酵的過程中，透過微生物菌體或是酵素的作用經常可以使食物在風味與質地上產生明顯的生化或修飾反應以提升食品品質與產生更佳的风味。乳酸菌是食品中重要的發酵微生物，傳統上在發酵牛奶與優格的過程會形成大量的益生物質，然而隨著已開發國家中素食主義或是提倡蔬食消費者的增加，與乳糖不耐症及發酵乳製品高膽固醇的缺點，因此對於相關以植物為主的乳酸菌發酵益生物質的開發產生明顯的需求，將發酵原料由傳統的牛奶延伸至蔬菜與水果等植物性來源材料。

乳酸菌一般存在於蔬菜、水果、乳製品、肉製品、水產品與各類發酵食品中。如果由食物來源的方向進行篩選具有抗氧化活性的乳酸菌，並進一步應用於生產功能性的發酵食品、保健食品或是開發為抗衰老的保養品或藥品，對於益生菌產業的發展與人體健康的促進都具有機高的應用價值，具高度發展與應用潛力。本研究的主要目的為利用酵母菌與乳酸菌為發酵菌株，進行發酵產物中具抗氧化活性成份的篩選，1)酵母菌部分:利用光照與黑暗培養發酵的方式，收集菌體水溶

性萃取液為樣品進行抗氧化活性的篩選。2)乳酸菌部分:利用乳酸菌在牛奶與其它植物來源原料進行發酵後，收集發酵液為樣品進行抗氧化活性的篩選。

第三章研究方法

一、測試材料

1.天然抗氧化成份來源:

(1) 乳酸菌發酵液

(2) 酵母菌發酵液

2.測試菌株

酵母菌: *Rhodotorula keelungensis* SN2、*Rhodotorula mucilaginosa*

LA1S09 、 *Rhodospiridium toruloides* NU10S03 、

Sporobolomyces carnicolor NF21S07 、 *Sporidiobolus*

pararoseus NF18S10

乳酸菌: 天賜爾生技提供

二、微生物發酵液製備

1.酵母菌發酵液製備

本次試驗主要挑選紅色酵母菌作為發酵試驗菌株，分黑暗組與光

照組培養進行測試。酵母菌主要培養在含 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 PD 液態培養基中在 25°C 下震盪培養。黑暗組不照光，光照組生長期間以 12:12 小時的光:暗週期循環照射紫外光，紫外光光源主要由 2 支 15 W 的 UV-A 燈管與 1 支 15 W UV-B 燈管來提供 (UVA: 11 Wm^{-1} ; UVB: 0.88 Wm^{-1})。培養 4 天後取 2 ml 菌液進行離心去除上清液，加入與菌體等量的 0.45 μm 大小玻璃珠與 1 mL 的萃取液(0.2% acetic acid + 0.5% methanol, v/v)，高速震盪 3 分鐘後於 4°C 下震盪 12 小時。最後再經 $14\,000 \times g$ 5 min 離心收集上清液進行測試。

2. 乳酸菌發酵液製備

乳酸菌相關發酵液分為下列組別

組別代號	內容物
A	TS-2L(乳酸菌發酵液)
B	壯陽草發酵液
C	丁香發酵液
D	壯陽草萃取液
E	丁香萃取液
F	丁香鮮奶液
G	壯陽草鮮奶液

三、抗氧化活性測試

1. 總酚酸含量測定

總酚酸含量利用 Folin-Ciocalteu 分析法測定 (Julkunen-Tiitto , 1985)。0.1 ml 樣品、8.4 ml 蒸餾水、0.5 ml Folin-Ciocalteu 試劑與 1 ml 20% (w/v) 碳酸鈉溶液(sodium carbonate)置於 15 ml 試管中。震盪混合均勻並於室溫下避光靜置 1 小時後測量波長 765 nm 吸光值。標準曲線係利用沒食子酸(gallic acid, GA)當作標準品，利用甲醇配製 0.25、0.5、1.0、2.0 與 4.0 mg/ml 的濃度，依照上述方法進行測量。結果以 mg/g 表示。

2. DPPH 自由基清除率(DPPH radicals scavenging activity, RSA)

參考 Gyamfi 等試驗方法 (1999)：取 0.152 mM 的 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 甲醇溶液 2.5 ml 及 0.5 ml 樣品，震盪混合均勻後於室溫下避光靜置 30 分鐘後，測量波長 515 nm 吸光值。結果以下式計算之：

$$\text{自由基清除率 (\%)} (\text{RSA}\%) = (1 - \text{樣品吸光值} / \text{控制組吸光值}) \times 100$$

3. 還原力測定

配置 0.2 M sodium phosphate buffer 與 1% potassium hexacyanoferrate (II)(K_3FeCN_6)。取 0.25 mL 不同稀釋濃度之樣品萃取液，加入 0.25 毫升 0.2 M sodium phosphate buffer pH 6.6 及 0.25 mL 1% K_3FeCN_6 混合均勻後，於 50°C 水浴 20 min。冷卻後，加入 0.25 mL 10%

trichloroacetic acid (TCA) 混合均勻後，加入 1 mL 蒸餾水及 0.2 mL 0.1% FeCl₃ 混合均勻後，於 3000 rpm 離心 10 分鐘。使用分光光度計分析 700 nm 吸光值。以 10 mg/mL 或不同稀釋濃度抗壞血酸(ascorbic acid)做為對照組(Oyaizu, 1986)。

第四章 研究內容與結果

一、乳酸菌抗氧化活性篩選

(一)總酚含量測定

乳酸菌與不同基質發酵後的總酚含量測定如表 1 所示。在總酚含量測試試驗中，利用沒食子酸當作標準品進行檢量線試驗結果如圖 1 所示。根據檢量線換算各組總酚含量高低依序為:E>D>F>C>G>B>A。最高為 E 組 6.76 ± 0.05 mg/ml，

最低為 A 組 0.19 ± 0.02 ，相差 35.6 倍。總酚類化合物包括類黃酮(isoflavone)、黃酮類(flavone)、黃醇酮類(flavonol)、黃烷酮醇類(flavanols)與花青素(anthocyanidin)等，廣泛存在植物組織中，依據結構與官能基組成的不同，分別具有不同的抗氧化活性。表 1 中萃取液中(DEFG)的總酚含量相較於發酵液(ABC)有相對較高的總酚含量，推測可能是由於乳酸菌將酚類化合物進行生物轉化後改變其結構或是分泌酵素分解酚類化合物而造成(Otieno 等, 2006)。

(二)DPPH 自由基清除率試驗

乳酸菌與不同基質發酵後的 DPPH 自由基清除率測定如表 1 所示。DPPH 試驗中，自由基清除活性高低依序為:F>C>B>G>D>A>E。最高為 F 組 $131\pm 2\%$ ，最低為 A 組 98 ± 3 ，僅相差 1.3 倍。過去文獻指出，總酚酸含量與抗氧化活性之間有明顯的相關性(Alothman 等，2009)，但也有持相反結果的研究(Bozan 與 Karakaplan，2007)。乳酸菌發酵試驗的結果相較於 5 mg/ml 維生素 C 的自由基清除率結果，在統計上並沒有明顯的差異性，也證明了這些發酵液組別都具有一定程度的抗氧化能力。

(三)還原能力試驗

乳酸菌與不同基質發酵後的還原能力試驗測定如表 1 所示。還原力試驗中，還原能力高低依序為:D>E>C>B>F>G>A。最高為 D 組 $102\pm 0.6\%$ ，最低為 A 組 $2\pm 0.6\%$ ，僅相差 51 倍。還原力主要是樣品提供電子，將 Fe^{3+} 還原成 Fe^{2+} ，當還原力越強，則吸光值越高，因此在 620 nm 吸光值高者，即為良好之電子供應者，利用電子的提供使自由基還原成較穩定之物質。本實驗以維他命 C 作為還原力試驗之參考指標。

綜合以上結果顯示，乳酸菌發酵液在三種試驗中都顯示出最低值的結果，表示該乳酸菌在單獨培養時並不會有抗氧化活性的產生。壯

陽草與丁香萃取液無論在總酚含量、DPPH 自由基清除率與還原力部分皆有明顯的抗氧化表現，說明該種植物具有一定的多酚含量與抗氧化能力。而在鮮奶中添加萃取液後，總酚含量的降低推測可能是酚類化合物與牛奶中的蛋白質結合的結果。抗氧化劑可以分為一級、二級抗氧化劑，一級抗氧化劑是與自由電子反應提供氫給自由基，使其轉成熱力學上較穩定之產物，如 BHA；二級抗氧化劑依功能可分為：還原、清除或螯和型，如 Vit.C、EDTA(11)。DPPH 的結果在此實驗中只能顯示各組別具抗氧化能力但並無法明顯區隔出不同組別間抗氧化能力的強弱，可能是由於抗氧化物質的相關機制所至，但由總酚與還原力試驗的結果顯示發酵後並無明顯提升整體的抗氧化能力，並且總酚含量有降低的情形，說明該菌株與基質間需要在進行調整。

二、酵母菌發酵液抗氧化能力測試

挑選 5 種不同的紅色酵母菌進行黑暗組與光照組發酵培養後，水溶性萃取物抗氧化活性的測試結果如表二所示。

(一)總酚含量測定

不同酵母菌發酵後的總酚含量測定如表 2 所示。在總酚含量測試試驗中，利用沒食子酸當作標準品進行檢量線試驗結果如圖 1 所示。黑暗組培養部分，總酚含量藉於 0.11-0.20 mg/ml 之間，而經過光照培養後的總酚含量皆有明顯的增加，藉於 0.20-0.44 mg/ml 之間，增加

1.2-4.1 倍。其中以 NU10S03 與 LA1S09 分別增加 2.8-4.1 倍為最多。

表 1. 乳酸菌發酵液抗氧化能力測試

品 項	總 酚(mg/ml)	DPPH(%)	還 原 力 (% of vit C)
A	0.19±0.02	98±3	2±0.6
B	0.73±0.01	121±0	60±7.3
C	1.30±0.05	123±9	90±1.0
D	4.13±0.01	109±10	102±0.6
E	6.76±0.05	94±5	95±0.9
F	3.16±0.05	131±2	17±2.0
G	1.05±0.01	115±2	17±3.0
Ascorbic acid (5 mg/mL)	*Gallic acid Standard curve	120±3	100±0.0

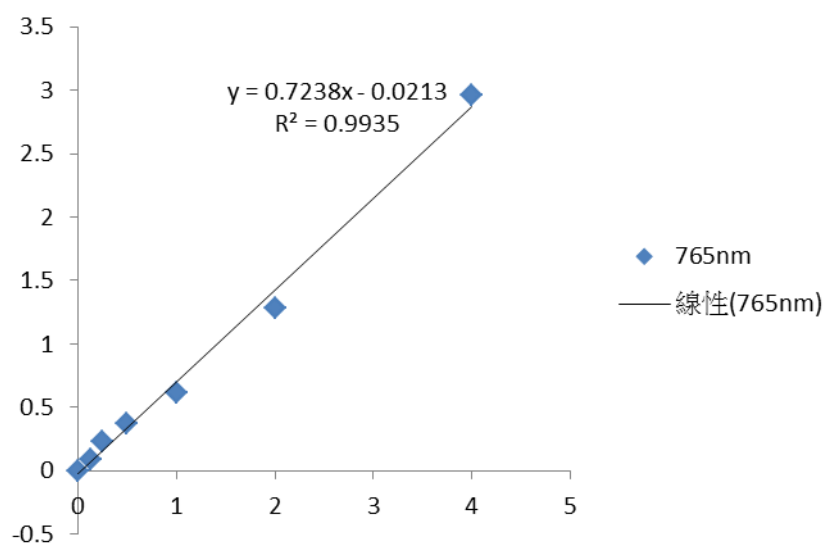


圖 1.沒食子酸檢量線

(二)DPPH 自由基清除率試驗

不同酵母菌發酵後的 DPPH 自由基清除率測定如表 2 所示。黑暗組培養部分，DPPH 自由基清除率藉於 21-39%之間，以 LA1S09 為最低、NU10S03 為最高。光照培養後，DPPH 自由基清除率藉於 6-122%之間，其中以 NF21S07 與 SN2 在清除率部分有大幅度的增加，分別增加 4.5 與 3.7 倍，顯示在光照後誘導了某類具抗氧化物質的產生。

(三)還原能力試驗

不同酵母菌發酵後的還原能力測定如表 2 所示。黑暗組培養部分，還原能力藉於 4.3-6.2%之間，以 LA1S09 為最低、NU10S03 為最高。光照培養後，還原能力藉於 7-31.1%之間，其中以 NF21S07 與 SN2

在還原能力部分有大幅度的增加，分別增 6.1 與 6.7 倍，顯示在光照後誘導了某類具抗氧化物質的產生。

(四)類菌孢素測定

不同酵母菌發酵後類菌孢素產生能力測定如表 2 所示。過去研究發現某些酵母菌在經過光誘導後的水溶性萃取物相較於黑暗組培養在波長 310 nm 會產生明顯吸收波峰，經 HPLC 與質譜的分析確認該化合物屬於類菌孢素的一類(Libkind et al., 2004; Sommaruga et al., 2004; Libkind et al., 2006)。本試驗中，黑暗組培養時 5 株菌的水溶性萃取物在波長 310 nm 無吸光值被偵測到。光照組部分僅有 NF21S07 與 SN2 在波長 310 nm 有明顯的吸收波峰被偵測到(圖 2)，顯示菌株 NF21S07 與 SN2 具有在供誘導後產生類菌孢素的能力。

總酚含量在經過光照培養後都有增加的情形，增加最明顯的菌株 NU10S03 與 LA1S09 在其它抗氧化能力測試方面並無隨光照而明顯增加，反而有略微減少的情形。總酚含量測試的是磷鎢鉬酸與總多酚化合物反應，磷鎢鉬酸被還原，生成藍色化合物，藍色的深淺與總多酚含量呈正相關，但是經常性的總酚含量並無法代表抗氧化的能力，過去的研究中也產生過相似的情況(Bozan 與 Karakaplan, 2007)，菌株 NU10S03 與 LA1S09 光誘導後也無偵測到類菌孢素的產生。光誘導後

偵測到類菌孢素產生的 NF21S07 與 SN2 兩菌株，其在 DPPH 與還原力試驗部分皆有明顯的隨光誘導後增加抗氧化力的情形，這也顯示類菌孢素除了具有紫外線波長的吸收能力外，也可能具有抗氧化的能力表現。

表 2. 酵母菌發酵液抗氧化活性測試

菌株代號	黑暗培養組				光照培養組			
	總酚	DPPH(%)	還原力 (%)	MAA	總酚	DPPH(%)	還原力 (%)	MAA
NF18S10	0.15±0.01	30±2	5.1±0.2	X	0.28±0.01	26±4	9.6±3.5	X
NF21S07	0.20±0.03	26±3	4.9±0.1	X	0.29±0.01	118±8	30.1±0.4	○
SN2	0.16±0.01	33±3	4.6±0.2	X	0.20±0.01	122±1	31.1±0.4	○
NU10S03	0.14±0.01	39±1	6.2±0.1	X	0.39±0.04	6±2	9.3±0.3	X
LA1S09	0.11±	21±1	4.3±	X	0.44±	13±5	7.0±0.3	X

0.01	0.2	0.04
Ascorbic acid (5 mg/mL)		120±3 100±0.0

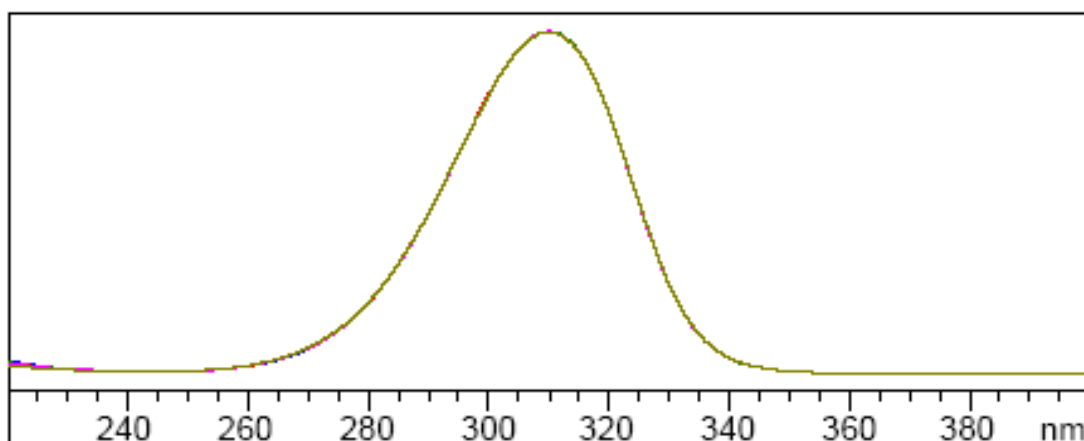


圖 2. 酵母菌光誘導後波長 310 nm 下的吸收波峰

第五章 結論

本研究由乳酸菌與酵母菌發酵過程進行具抗氧化活性物質的篩選。乳酸菌發酵基質丁香與壯陽草萃取液顯示具有抗氧化的特性，但是經過乳酸菌發酵後與添加鮮乳皆會造成抗氧化能力降低，可能是抗氧化物質受到乳酸菌的轉化及與鮮乳的結合後所導致。光誘導後具類菌孢素產生能力酵母菌的水溶性萃取物，無論是 DPPH 自由基清除試驗還是還原力試驗皆表現出提升的抗氧化能力，推測與類菌孢素相關。

參考書目

Alothman, M., R. Bhat and A.A. Karim. (2009) Antioxidant capacity and

- phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem.* 115: 785-788.
- Archibald F (2003) Oxygen toxicity and the health and survival of eukaryote cells: a new piece is added to the puzzle. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10141–10143.
- Bastin, P., M. Dillemans, L. Van Nedervelde, P. Boivin, A. Debourg. (2002) Evaluation of the potent antioxidant effect of *Saccharomyces cerevisiae* extracts during beer production. *Cerevisia* 27: 27–32.
- Becker, J.V.W., G.O. Armstrong, M.J. Van der Merwe, M.G. Lambrechts, M.A. Vivier, I.S. Pretorius. (2003) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the winerelated antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res* 4: 79–85.
- Bozan, B. and U. Karakaplan. (2007) Antioxidants from laurel (*Laurus nobilis* L.) berries: Influence of extraction procedure on yield and antioxidant activity of extracts. *Acta Alimentaria* 36: 321-328.
- Chen, J., H. Lindmark-Mansson, L. Gorton and B. Akesson. (2003) Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *Int Dairy J* 13: 927–935.
- Chiue, H., T. Kusano and K. Iwami. (1997) Antioxidative activity of barley hordein and its loss by deamidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 43: 145–154.
- Combs, G.F., Jr, L.C. Clark and B.W. Turnbull. (2002) Cancer prevention by selenium. *Met Ions Biol Med* 7: 600–603.
- Farid, M.A.R., M. Azar. (2001) β -Carotene production from *Rhodotorula*. *Amirkabir* 12: 228–236.
- Gazi, M.R., A. Hoshikuma, K. Kanda, A. Murata, F. Kato. (2001) Detection of free radical scavenging activity in yeast culture. *Saga Daigaku Nogakubu Iho* 86: 67–74.
- Gyamfi, M.A., M. Yonamine and Y. Aniya. (1999) Free-radical

- scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Gen Pharmacol* 32: 661-667.
- Hernandez-Ledesma, B., B. Miralles, L. Amigo, M. Ramos and I. Recio. (2005) Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *J Sci Food Agric* 85: 1041–1048.
- Julkunen-Tiitto R. (1985) Phenolic constituents on the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agr. Food Chem.* 330: 213-217.
- Korpela, R., T. Lahteenmaki, E. Sievi, M. Saxelin and H. Vapaatalo (1997) *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell cultures. *Milchwissenschaft* 52: 503–505.
- Kullisaar, T., M. Zilmer, M. Mikelsaar, T. Vihalemm, H. Annuk, C. Kairane and A. Kilk. (2002) Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int J Food Microbiol* 72: 215–224.
- Libkind, D., C. María, M.M. Diéguez, P. Patricia, E.Z. Horacio, and B. María. (2006) Occurrence of Photoprotective Compounds in Yeasts from Freshwater Ecosystems of Northwestern Patagonia (Argentina). *Photochem Photobiol* 82: 972-980.
- Libkind, D., P. Pérez, R. Sommaruga, M.C. Diéguez, M. Ferraro, S. Brizzio, H. Zagarese and M. van Broock. (2004) Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochem Photobiol Sci* 3: 281-286.
- Marova, I., Breierova, E., Koci, R., Friedl, Z., Slovak, B., Pokorna, J. (2004) Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. *Ann Microbiol* 54: 73–85.
- Miller, R.A. and Britigan, B.E. (1997) Role of oxidants in microbial

- pathophysiology. Clin Microbiol Rev 10: 1–18.
- Nishino, T. and Ishikawa, F. (1998) Pharmaceutical, cosmetic, and food antioxidants containing yeasts and a method for evaluation of antioxidant activity of microorganisms. Jpn Patent 10287872 A2 19881027.
- Ok, T., N.N. Lin, T. Zaima, H. Nakajima. (2003) *Para*-aminobenzaldehyde produced by yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and its antioxidant activity. Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol 103: 0–009.
- Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nutr 44: 307-315.
- Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S. (1996) Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives ed. Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K. pp. 65–157. New York: Marcel Dekker.
- Rival, S.G., S. Fornaroli, C.G. Boeriu and H.J. Wichers. (2001) Caseins casein hydrolysates. 1. Lipoxigenase inhibitory properties. J Agric Food Chem 49: 287–294.
- Saarela, M., L. Lahtenmaki, R. Crittenden, S. Salminen, and T. Mattila-Sandholm. (2002) Gut bacteria and health foods– the European perspective. Int J Food Microbiol 78: 99–117.
- Saiga, A., S. Tanabe and Nishimura T. (2003) Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. J Agric Food Chem 51: 3661–3667.
- Sakaki, H., H. Nochide, S. Komemushi, W. Miki. (2002) Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis* no. 21. J Biosci Bioeng 93: 338–340.
- Sommaruga, R., D. Libkind, M. van Broock, and K. Whitehead. 2004.

- Mycosporine-glutaminol-glucoside, a UV-absorbing compound of two *Rhodotorula* yeast species. *Yeast* **21**: 1077-1081.
- Suetsuna, K., H. Ukeda and H. Ochi. (2000) Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem* 11: 128–131.
- Visser, H., A.J.J. van Ooyen, J.C. Verdoes. (2003) Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res* 4: 221–231.