HAL open science

Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja

Jane Hubert

To cite this version:

Jane Hubert. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2006. Français. ⟨NNT : 2006INPT019A⟩. ⟨tel-04626920⟩

HAL Id: tel-04626920

https://ut3-toulouseinp.hal.science/tel-04626920v1

Submitted on 27 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Autorisation HAL

HAL Authorization

N° d'ordre : 2435

THESE

présentée pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Spécialité : Qualité et sécurité des aliments

Mademoiselle Jane Hubert

Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines

Soutenue le 15 décembre 2006 devant le jury composé de :

Présidente :	Mme NEPVEU F.	Professeur, UPS, Toulouse
Directeur de thèse :	Mr DAYDE J.	Professeur, EI-Purpan, Toulouse
Rapporteur :	Mme BENNETAU-PELISSERO C.	Professeur, ENITA, Bordeaux
Rapporteur :	Mme MORAND C.	Professeur, INRA, Clermont-Ferrand
Membre :	Mme BERGER M.	Docteur en Sciences, EI-Purpan, Toulouse
Membre :	Mr PAUL F.	Docteur en Sciences, GENIBIO, Lorp-Sentaraille

RESUME

Le germe de soja est une matrice naturelle riche en substances biologiquement actives, ce qui lui confère un grand intérêt en terme de valorisation industrielle. L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence les particularités de cette matière première par une caractérisation approfondie de ses principaux métabolites, ciblés en fonction de leurs propriétés biologiques. Une étape de développement analytique a permis d'évaluer leur variabilité dans le germe natif et de suivre leur évolution au cours d'un procédé d'extraction hydro-alcoolique destiné à concentrer les isoflavones. Afin de valoriser l'ensemble de la matière première tout en conservant le potentiel biologique des métabolites, l'effet d'un procédé de fermentation lactique sur la composition et la capacité antioxydante du germe de soja, a également été étudié. L'évaluation de l'activité biologique de ce nouvel ingrédient fermenté permettrait d'envisager des applications prometteuses dans les domaines de l'alimentation diététique ou de la santé.

MOTS CLES

Germe de soja ; Isoflavones ; Saponines ; Fermentation lactique ; Micronutriments ; Antioxydants

ABSTRACT

Soy germ, a natural matrix concentrated in bioactive phytochemicals, may offer interesting possibilities in term of industrial valorisation. The aim of this work was to highlight the distinctive features of soy germ through the complete characterization of its main metabolites, selected for their biological effects, by evaluating their variability in the raw material, and by following their content and composition during an extraction process used to concentrate the isoflavones. The effects of a lactic acid fermentation on the sensory and nutritional characteristics of soy germ, were also studied in the perspective of a novel ingredient. Such a process, conducted on the entire soy germ matrix, should preserve the biological potential of all metabolites. The antioxidant capacity of fermented soy germ was determined, conferring to this product promising applications in the prevention of oxidative stress related diseases.

KEY WORDS

Soy germ ; Isoflavone ; Soyasaponin ; Lactic acid fermentation ; Micronutrients ; Antioxidant

REMERCIEMENTS

Ce travail, dirigé par le Professeur Jean Daydé et le Docteur Monique Berger, est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire d'Agrophysiologie de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan (Toulouse, 31) et la société GENIBIO (Lorp-Sentaraille, 09) dirigée par Mr François Paul.

J'adresse tout d'abord un grand Merci à Mme Vassilia Théodorou-Bayle, Professeur à l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan et Directrice du laboratoire d'Agrophysiologie, pour m'avoir intégrée dans son équipe et pour son œil attentif sur l'avancement de mes travaux.

Un grand Merci également à Mr Jean Daydé, Directeur de la Recherche à l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan pour avoir accepté de me diriger dans ce travail. Je le remercie en particulier pour sa solide présence à chaque étape cruciale de cette thèse et pour la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie sincèrement Mme Monique Berger, Enseignante Chercheur à l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan et co-directrice de ma thèse, pour m'avoir guidée, soutenue et motivée. Je la remercie aussi pour m'avoir fait partager sa culture scientifique inépuisable.

Merci également à Mr François Paul, gérant de la société GENIBIO, qui est à l'origine de ce programme de recherche. Mon contact avec lui et les situations inattendues auxquelles il m'a confrontée auront commencé à faire mûrir ma vision du système professionnel.

Aux membres du jury :

J'exprime ma reconnaissance à Mme Catherine Bennetau-Pelissero, Professeur au Laboratoire des Micronutriments, Reproduction et Santé de l'ENITA de Bordeaux, ainsi qu'à Mme Christine Morand, Professeur au Laboratoire des Maladies Métaboliques et Micronutriments de L'INRA de Clermont-Ferrand, qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail en qualité de rapporteurs.

Un grand merci également à Mme Françoise Nepveu, Professeur au Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox de la Faculté de Pharmacie de Toulouse. Je suis ravie d'avoir « goûté » au monde des substances antioxydantes et d'avoir pu profiter de son expérience dans ce domaine au cours des quelques semaines passées dans son équipe de recherche.

Et aussi à tous ceux qui ont participé aux meilleurs moments de ces trois années…

J’adresse un clin d’œil amical à mes collègues de l’EI-Purpan ainsi qu’à la pétillante équipe GENIBIO. Je suis ravie d’avoir croisé le chemin de toutes ces personnes...

Merci aussi à l’équipe des entomologistes de l’EI-Purpan pour m’avoir fait partager de temps en temps, l’oxygène précieux de leurs forêts du sud.

Enfin, un simple merci ne serait pas suffisant pour traduire ce que je dois à mes proches. Je dois en particulier ce travail à mes parents, qui ont donné beaucoup de leurs forces pour me permettre d’avoir conscience aujourd’hui que la vie offre une multitude de possibilités. Wagner, obrigada pela sua patiencia.

Et une pensée toute spéciale pour ma Pauline, en espérant que ce modeste travail te donnera du courage quand viendra ton tour de nous conter ta folle histoire de hérissons !...

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION 9

II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 13

II.1. Effets bénéfiques du soja et particularités du germe 13
II.2. Présentation des métabolites à effets-santé de la graine entière de soja - Spécifités de la composition du germe 16
II.2.1. Protéines 16
II.2.2. Lipides 18
II.2.3. Glucides 19
II.2.4. Vitamines et minéraux 20
II.2.5. Isoflavones 22
II.2.6. Saponines 35
II.2.7. Phytostérols 38
II.2.8. Tocophérols (Vitamine E) 40
II.2.9. Sphingolipides 41
II.2.10. Inhibiteurs de protéases 42
II.2.11. Phytates 43
II.2.12. Lunasine 44
II.3. Résultats contradictoires quant aux réels déterminants des effets des produits à base de soja 45
II.3.1. Nécessité d'une caractérisation biochimique systématique des fractions testées 45
II.3.2. Facteurs liés à l'origine et aux procédés de fabrication des extraits testés 49
II.3.3. Facteurs liés au choix du modèle d'étude 51
II.4. Bilan de la revue bibliographique et présentation des travaux 52

III. MATERIEL VEGETAL, METHODES ET DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE 53

III.1. Matériel étudié 53
III.1.1. Variétés de soja et lots industriels de germe 53
III.1.2. Compléments alimentaires enrichis en isoflavones 54
III.2. Méthodes 54
III.2.1. Quantification des protéines totales 54
III.2.2. Extraction de la fraction lipidique 55
III.2.3. Analyse des acides gras 56
III.2.4. Analyse des isoflavones 57
III.2.5. Analyse des phytostérols 59
III.2.6. Analyse des tocophérols 60
III.2.7. Quantification des inhibiteurs de protéase 60
III.2.8. Quantification des phytates 62
III.2.9. Evaluation de l'activité antioxydante d'extraits de germe de soja 63
III.3. Essais de fermentation 66
III.3.1. Présentation des souches 66
III.3.2. Influence du type de souche sur l'acidification du milieu 66
III.3.3. Influence du taux d'inoculation sur l'acidification du milieu 67
III.4. Développement analytique : Quantification des saponines du soja 68
III.4.1. Problèmes soulevés 68
III.4.2. Méthode de quantification des saponines du groupe B 69
III.4.3. Méthode de quantification des sapogénols A et B, précurseurs aglycones des saponines du soja. 79
III.4.4. Conclusion 89

IV. CARACTERISATION DU GERME DE SOJA NATIF ET DE SES PRODUITS DERIVES 91

IV.1. Contexte industriel 91
IV.2. Caractérisation des lots industriels de germe de soja natif 92
IV.2.1. Concentration des principaux métabolites du germe de soja natif 92
IV.2.2. Analyse détaillée des isoflavones et des saponines : variabilité des lots 94
IV.2.3. Analyse de la variabilité des composés lipidiques du germe de soja 97
IV.3. Caractérisation chimique et évaluation de la variabilité des extraits d'isoflavones 98
IV.3.1. Description du procédé industriel d'extraction 98
IV.3.2. Influence du procédé d'extraction sur le profil des isoflavones et des saponines 100
IV.3.3. Conclusion 104
IV.4. Caractérisation de compléments alimentaires commerciaux enrichis en isoflavones 105
IV.4.1. Objectif de l'étude 105
IV.4.2. Bilan des travaux relatifs à la caractérisation du germe natif et de ses produits dérivés118

V. DEVELOPPEMENT D'UN INGREDIENT FERMENTE A BASE DE GERME DE SOJA.....119

V.1. Objectifs industriels 119
V.2. Développement du procédé de fermentation 121
V.2.1. Influence du type de souche et du taux d'inoculation sur l'acidification du milieu 121
V.3. Influence de la fermentation sur les propriétés organoleptiques et la composition du germe 122
V.3.1. Critères organoleptiques 122
V.3.2. Modification de la composition du germe de soja 123
V.3.3. Bilan des essais de fermentation 126
V.4. Evaluation de l'activité antioxydante du nouvel ingrédient fermenté 126
V.4.1. Implication des processus oxydatifs dans le développement des cancers et des maladies cardiovasculaires 126
V.4.2. Objectif de l'étude 127
V.4.3. Bilan de l'étude sur les propriétés antioxydantes du germe de soja fermenté.....150

VI. CONCLUSION GENERALE.....151

VII. TABLE DES ILLUSTRATIONS.....155

VII.1. Liste des tableaux 155
VII.2. Liste des figures 155

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....157

I. INTRODUCTION

Le soja [*Glycine max* (L.) Merr.] est cultivé depuis plus de deux millénaires en Extrême-Orient, où il représente l'une des bases essentielles de l'alimentation, de la diététique et de la gastronomie. Sa culture s'est développée dans les pays occidentaux à partir du XIXème siècle, et il constitue aujourd'hui le principal oléoprotéagineux produit et échangé au monde. Le soja est cultivé dans 47 pays mais la majorité des cultures intensives reste localisée aux Etats-Unis, au Brésil, en Argentine et en Chine.

Avant 1990, la production occidentale était principalement destinée à l'alimentation du bétail sous forme de tourteaux, à l'alimentation humaine pour l'huile et ses dérivés et à l'industrie dans la fabrication de matières synthétiques, peintures, cosmétiques ou émulsifiants. Plus récemment, de multiples possibilités d'usage dans l'industrie agroalimentaire se sont révélées, soit directement par l'utilisation des recettes traditionnelles asiatiques, soit indirectement par addition de protéines végétales aux préparations industrielles. Aujourd'hui, le soja est aussi largement utilisé dans l'industrie parapharmaceutique pour ses teneurs importantes en lécithines, lipides, minéraux et autres composés mineurs potentiellement bénéfiques pour la santé. De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont mis en évidence l'association d'une consommation régulière de produits à base de soja avec une diminution des risques de développer certaines maladies métaboliques comme les cancers ou les maladies cardiovasculaires. Les composés impliqués dans ces effets se trouvent dans les fractions protéique et lipidique, les fibres et surtout parmi les molécules provenant du métabolisme secondaire de la plante, incluant vitamines, triterpènes ou flavonoïdes pouvant agir seuls ou en interaction. La distribution de ces composés actifs varie significativement d'un compartiment à l'autre de la graine, et bien que le germe de soja ne représente que 2 à 3% de la masse totale de la graine, il serait particulièrement concentré en ces différents composés. En raison, notamment, de ses propriétés sensorielles indésirables, il est fréquemment éliminé lors des procédés de fabrication des produits dérivés du soja, devenant ainsi un co-produit industriel potentiellement valorisable.

C'est dans ce contexte que la société GENIBIO s'approvisionne auprès de NUTRITION & SOJA (Revel, 31, France) en lots de germes de soja labellisés Agriculture Biologique ou non, totalement tracés depuis le producteur, afin de développer des ingrédients innovants. L'étroite collaboration entre Genibio et le Laboratoire d'Agrophysiologie de l'Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan (Toulouse, 31, France) s'est renforcée en 2003 par la mise en place d'un programme de thèse consacré à l'exploration de nouvelles pistes de valorisation du germe de soja en tant qu'ingrédient actif possédant des effets bénéfiques dans la prévention de certaines pathologies.

Afin de mettre en évidence les particularités du germe de soja, le premier objectif de ce travail a consisté en la caractérisation approfondie de sa composition biochimique. La concentration et le profil des principaux métabolites à effet santé présents dans les graines de soja et en particulier dans le germe, ont déjà été reportés dans la littérature à partir de données de synthèse, mais il n'existe

actuellement aucune étude consacrée à la caractérisation complète du germe. Le second objectif a été de déterminer la variabilité de certaines familles de molécules contenues dans le germe, ciblées en fonction de leur intérêt biologique, au niveau des lots de matière première. En effet, bien qu'il existe une unité géographique concernant la provenance des lots de germe natif, ainsi qu'un cahier des charges précis établi par le fournisseur, l'homogénéité de la composition des lots reste tout de même dépendante des variétés cultivées et des effets environnementaux accompagnant la maturation des graines de soja. La répercussion de ces facteurs sur la teneur et la composition des métabolites secondaires les plus abondants du germe de soja, incluant les isoflavones et les saponines, a donc été déterminée. L'impact d'un procédé industriel d'extraction sur l'enrichissement, l'élimination ou la modification des métabolites caractérisés, a également été étudié, l'objectif étant d'assurer la fabrication d'un ingrédient enrichi en isoflavones dont la composition reste stable d'une production à l'autre. Une étude également menée dans le cadre de cette recherche, a montré que les compléments alimentaires enrichis en isoflavones présentent des profils très divers de composés potentiellement bioactifs, soulignant que la caractérisation globale des produits proposés aux consommateurs est indispensable. Enfin, dans le but d'apporter une valeur ajoutée à la matière première, les effets d'une fermentation lactique sur les qualités organoleptiques et nutritionnelles du germe de soja, ont été déterminés. Le développement d'un tel procédé pourrait alors permettre de valoriser l'ensemble de la matrice du germe en conservant le potentiel biologique de tous ses métabolites, sans générer de co-produit. Les propriétés antioxydantes de ce nouvel ingrédient fermenté ont également été étudiées, afin, éventuellement, d'envisager une application préventive de ce produit vis-à-vis des dysfonctionnements physiologiques liés au stress oxydatif.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à la revue bibliographique des connaissances concernant la composition et les propriétés biologiques des substances actives présentes dans le germe de soja. Parmi les composés à effet santé, nous nous intéresserons d'abord aux macronutriments ayant montré une action bénéfique sur des fonctions particulières de l'organisme, tels que les protéines, les acides gras polyinsaturés ou les α-galactooligosaccharides. Nous considérerons ensuite les composés mineurs tels que les isoflavones, les saponines, les phytostérols, les tocophérols (Vitamine E), les phytates et les inhibiteurs de protéases, ainsi que les peptides susceptibles d'apporter une valeur ajoutée aux protéines du germe de soja. Cette revue bibliographique mettra également l'accent sur la difficulté d'interpréter la multitude d'études expérimentales ou cliniques évaluant les effets des différents métabolites du soja, tant les résultats publiés sont contradictoires et les méthodologies variables d'une étude à l'autre.

Puis, dans une deuxième partie, nous exposerons les méthodes analytiques qui ont été développées et optimisées afin de quantifier certaines familles de molécules structuralement diversifiées ou complexes. Dans ce cadre, nous aborderons en particulier les isoflavones dont la procédure de calibration n'avait pas encore été clairement établie, les saponines des groupes A et B qui n'avaient jamais été quantifiées de manière précise, répétable et reproductible dans un contexte

industriel d'analyses de routine, les phytates et les inhibiteurs de protéases pour lesquels aucune méthode de quantification adaptée aux matrices végétales n'était disponible.

L'étude de la variabilité de la teneur et de la composition de ces micronutriments dans le germe de soja, évaluée sur l'ensemble des lots de matière première reçus par Genibio en 2004 et 2005, ainsi que dans plusieurs variétés de soja, sera ensuite présentée. Cette variabilité a aussi été suivie au cours d'un procédé d'extraction développé par GENIBIO, conduisant à une fraction enrichie en isoflavones. Un tel traitement est, en effet, susceptible d'agir sur la concentration et le profil de composés bénéfiques ou antinutritionnels présents dans le germe, mais aussi d'éliminer ou d'exacerber certaines propriétés physico-chimiques ou sensorielles indésirables propres à cette matrice. Ce travail mettra également en évidence que la caractérisation analytique rigoureuse d'une matrice naturelle contenant de nombreuses substances susceptibles d'agir en synergie, est d'une importance capitale. Pour cela, une étude évaluant la variabilité des teneurs en composés potentiellement actifs présents dans différents compléments alimentaires commerciaux enrichis en isoflavones, sera également décrite dans cette troisième partie du document.

Après cette phase de caractérisation complète du germe et de ses produits transformés, nous présenterons les travaux portant sur le développement d'un nouvel ingrédient à base de germe de soja fermenté, depuis les essais d'optimisation réalisés au laboratoire jusqu'à la transposition du procédé à l'échelle industrielle. La fermentation du germe de soja est un procédé entrepris par Genibio dans le but de valoriser la matrice entière du germe de soja tout en améliorant ses critères organoleptiques et éventuellement sa composition en phytonutriments biologiquement actifs.

Enfin, l'évaluation de l'activité biologique de métabolites secondaires particuliers, choisis en fonction de leur intérêt pour l'industriel, sera présentée dans la dernière partie du document. Les propriétés antioxydantes du germe de soja et de métabolites isolés, ont été déterminées au Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox (UMR 152 IRD-Université Paul Sabatier). La capacité antioxydante des extraits a été évaluée à l'aide de trois approches analytiques qui ont permis en particulier de comparer le potentiel pharmacologique du germe de soja natif et celui du germe de soja fermenté, dans le but d'apporter une valeur ajoutée au nouvel ingrédient. La préservation, voire l'amélioration de son pouvoir antioxydant après fermentation a été corrélée à l'évolution de la concentration et du profil des métabolites du germe de soja au cours du procédé. Le développement d'un tel produit pourrait être véritablement adapté au contexte actuel, dans lequel la nécessité de pallier les fluctuations du seul marché des isoflavones dans un secteur très concurrentiel, apparaît cruciale pour tous les professionnels liés à la filière des produits dérivés du soja.

II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Effets bénéfiques du soja et particularités du germe

La notion d'« aliment fonctionnel » est très récente. Elle est le fruit de l'évolution de notre société vers une alimentation ne devant plus seulement répondre à des exigences purement nutritionnelles ou organoleptiques, mais devant également posséder un potentiel bénéfique pour la santé. Un aliment est dit « fonctionnel » s'il possède des effets sur une ou plusieurs fonctions cibles du corps, au-delà de ses atouts nutritifs, améliorant l'état de bien-être ou l'état de santé des individus, ou réduisant le risque d'une maladie (Roberfroid, 2000).

En se basant sur cette définition et de par sa composition spécifique en divers nutriments, le soja appartient aujourd'hui à cette classe d'aliments. Il est en effet reconnu depuis longtemps que le soja présente un profil très intéressant de composés bénéfiques pour la santé humaine. Une alimentation à base de soja est pauvre en graisses saturées et en cholestérol, et apporte peu de calories par rapport à une alimentation à base de viande ou de produits laitiers (Messina, 1999). Les graines de soja sont riches en vitamines A, B, E, K et en minéraux, dont le calcium, le fer, le zinc, le potassium, le phosphore et contiennent une quantité importante de composés mineurs issus du métabolisme secondaire de la plante. Les isoflavones, les phytates, les stérols, les saponines ou les inhibiteurs de protéases font partie de ces composés potentiellement responsables des propriétés préventives du soja vis-à-vis d'un grand nombre de pathologies. Aujourd'hui, de nombreux chercheurs se consacrent à la caractérisation complète de ces familles de molécules ainsi qu'à la compréhension de leur mécanisme d'action, tentant d'établir clairement leur rôle dans la prévention des maladies métaboliques.

Les protéines et les isoflavones sont les deux composés qui ont fait l'objet du plus grand nombre de travaux scientifiques relatifs aux effets bénéfiques du soja. Il est officiellement reconnu depuis 1999 qu'une consommation de protéines de soja supérieure à 25 g/jour réduit le risque de maladies cardiovasculaires (FDA Food Labelling : health claims, 1999). Quant aux isoflavones, les données scientifiques concernant leurs propriétés oestrogéniques et leur action préventive sur les troubles liés à un dérèglement hormonal se révèlent extrêmement complexes et font actuellement l'objet de grands débats.

Une multitude de produits à base de protéines de soja ainsi que des compléments alimentaires enrichis en isoflavones sont actuellement développés par les industriels du secteur agroalimentaire. Pour cette activité, différentes matières premières ou ingrédients sont disponibles, allant de la farine brute issue du broyage des graines natives aux extraits les plus sophistiqués. L'un de ces ingrédients, le germe de soja, présente un profil de nutriments unique par rapport à toutes les

autres fractions de la graine, isolats ou concentrés, offrant aux fabricants de compléments alimentaires la possibilité d'apporter une valeur ajoutée intéressante aux formulations basiques des produits dérivés du soja.

C'est ainsi qu'en 1999, la FDA (Food and Drug Administration) a reconnu officiellement le germe de soja comme un ingrédient naturel à part entière possédant des effets bénéfiques sur la santé. L'utilisation de cette matrice a été régularisée en 1994 par le DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act) sous différentes labellisations : « extrait de soja standardisé à 10 % », « extrait standardisé de germe de soja » ou « extrait de germe de soja » sous la forme de gélules, capsules, tablettes, barres ou poudres.

Ainsi, des concentrés allant jusqu'à 40% d'isoflavones, revendiquant leur origine germe, sont proposés, les principaux étant SoyLife d'Acatris qui vient de s'associer à Archer Danields Midland (ADM) déjà fortement présent sur ce marché avec Novasoy qui est un concentré d'isoflavones fabriqué à partir de graines entières. Sur le marché Français, Phytosoya, Biopause, Bioptimum, Féminabiane et Yméa sont les principaux produits à base de germe de soja.

Figure 1. Description macroscopique de la graine de soja

Comme le germe de blé, le germe de soja est une matrice très compacte. Il ne représente que 2 à 3% du poids de la graine entière (**Figure 1**), mais contient à lui seul de 15 à 20 % des isoflavones totales de la graine et présente aussi une plus forte concentration en saponines, phytostérols, acides gras polyinsaturés et vitamine E que les cotylédons (Schryver, 2002).

Grâce à sa teneur élevée en isoflavones, il peut être utilisé comme additif dans les matrices alimentaires avec un taux d'inclusion faible, typiquement de l'ordre de 1 à 2 %, ce qui permet de l'ajouter aux formulation liquides, aux produits laitiers, dermatologiques ou cosmétiques sans modifier la saveur ou l'odeur du produit final (Tiziani et Vodovotz, 2005 ; Franz *et al.*, 2006).

Le germe de soja a déjà trouvé de multiples applications alimentaires. Bien que les résultats issus des études *in vitro, in vivo* et des études cliniques évaluant les propriétés biologiques des produits à base de soja soient encore contradictoires, il est tout de même possible de souligner quelques résultats prometteurs quant à la valorisation de la « matrice germe » :

- Il a récemment été observé que l'ingestion d'isoflavones extraites du germe de soja permet de maintenir l'équilibre du profil hormonal de la femme post ménopausée (Petri-Nahas *et al.*, 2004), et de réduire significativement le nombre de bouffées de chaleur survenant au moment de la ménopause (AsterCephac, 2000). Cet ingrédient constitue donc une alternative intéressante au traitement hormonal substitutif au même titre que les concentrés d'isoflavones issus des graines entières de soja.

- Un effet sur le profil lipidique a également été observé, traduit par une augmentation des lipoprotéines de haute densité (HDL) correspondant au « bon cholestérol », et par une diminution significative de la pression sanguine (Wong, 2001).

- L'administration de germe de soja a aussi été associée chez le rat à des propriétés préventives vis-à-vis du développement de tumeurs au niveau des cellules mammaires (Zaizen *et al.*, 2000) ainsi qu'à des propriétés anti-inflammatoires sur un modèle d'irritation intestinale chronique chez le rat (Andres *et al.*, 2002).

- De même l'huile de germe de soja aurait une activité anti-inflammatoire offrant de possibles applications cosmétiques ou thérapeutiques contre les maladies de la peau (Bonina *et al.*, 2005). Les bénéfices de l'huile extraite du germe de soja ont par exemple été soulignés *in vivo* contre l'érythème cutané induit par des radiations UVB (Sato *et al.*, 2001)

Cependant, le germe de soja est une matrice naturelle complexe contenant une grande diversité de nutriments, et les effets observés ne sont pas encore attribués à des composés individuels spécifiques, ni à une seule famille de molécules. La plupart des effets reportés dans la littérature sont associés à la présence d'isoflavones, mais d'autres métabolites pourraient contribuer ou renforcer leur activité biologique. Il apparaît probable que la matrice entière du germe de soja soit à considérer avec autant d'attention que des molécules individuelles isolées.

II.2. Présentation des métabolites à effets-santé de la graine entière de soja - Spécifités de la composition du germe

De nombreuses revues bibliographiques ont mis en avant l'intéressante composition de la graine entière de soja. Parmi les substances actives potentiellement responsables des effets bénéfiques des produits à base de soja, certaines familles de molécules ont été détectées avec une concentration beaucoup plus élevée dans le germe que dans les autres compartiments de la graine. Il s'agit dans ce chapitre de décrire successivement les caractéristiques biochimiques avérées des macronutriments et des métabolites secondaires de la graine de soja et de souligner leur présence éventuelle dans le germe. Cette étude bibliographique nous permettra alors de cibler quelques familles particulières de molécules en fonction de leur intérêt biologique pour évaluer ensuite rigoureusement leur teneur dans le germe et mettre en évidence l'originalité de la composition de cette matrice.

II.2.1. Protéines

Les protéines de soja sont principalement utilisées sous forme de tourteaux, de farines contenant de 45 à 65 % de protéines, de concentrés contenant de 65 à 90 % de protéines ou d'isolats enrichis à plus de 90 %. On trouve respectivement dans la matrice sèche du germe et des cotylédons de 35 à 45 % et de 40 à 50 % de protéines totales. Leur qualité est idéale en termes de profil d'acides aminés et de digestibilité (**Tableau 1**).

Tableau 1. Profil des acides aminés de la graine de soja.

% des acides aminés totaux	Germe*	Cotylédons**
Cystine + méthionine	3,7	1,1
Histidine	3,0	2,6
Isoleucine	5,0	4,6
Leucine	7,9	7,6
Lysine	8,3	6,4
Phenylalanine	9,0	9,0
Threonine	4,7	6,2
Valine	5,3	4,7
Alanine	5,8	4,5
Arginine	9,0	6,7
Acide aspartique	11,3	12,5
Acide Glutamique	16,0	24,6
Glycine	5,1	4,2
Sérine	5,7	5,2
Tryptophane	1,3	1,1

* Fiche technique interne Genibio, 2005 ; ** Gonzales et al., 2000

La lysine, acide aminé indispensable facilitant la synthèse des protéines et l'assimilation des autres acides aminés, est beaucoup plus concentrée dans le soja que dans de nombreuses autres sources végétales, les acides aminés limitant étant la méthionine et la cystéine. Le soja est donc complémentaire des céréales qui sont déficitaires en lysine mais riches en acides aminés soufrés, c'est pourquoi on l'associe traditionnellement au riz dans les rations alimentaires asiatiques et dans la préparation d'ingrédients protéiques commerciaux. En alimentation infantile, des formules à base de protéines de soja supplémentées en méthionine sont proposées aux enfants intolérants au lactose ou allergiques aux protéines de lait.

Il n'existe pas d'information concernant la composition des protéines du germe de soja. Dans les cotylédons, les deux globulines majeures sont la glycinine (11S) et la β-conglycinine (7S) qui représentent environ 70 % des protéines de réserve (Meinke *et al.*, 1981). La glycinine est une globuline de 320 kDa équilibrée puisque 3 à 5 % de ses acides aminés résiduels sont composés d'une cystéine ou d'une méthionine (Fukushima, 1991). La β-conglycinine est une globuline d'environ 150 kDa, composée de 3 sous-unités α, α'et β (Koshiyama et Fukushima, 1976).

De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de ces deux globulines dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Manzoni *et al.*, 1998 ; Lovati *et al.*, 2005). Leur valeur biologique ainsi que l'absence de toxicité attestée par leur usage régulier en Asie depuis plusieurs siècles ont incité nombre de spécialistes à conseiller l'introduction de ces protéines dans les régimes destinés à contrôler l'hypercholestérolémie. Une méta analyse de 38 études d'interventions contrôlées publiée en 1995 a montré que la substitution de protéines animales par des protéines de soja induit une diminution significative des triglycérides, du cholestérol total et des lipoprotéines de faible densité (LDL) sans affecter les lipoprotéines de haute densité (HDL) (Anderson *et al.*, 1995). En se basant sur des données scientifiques provenant de plus de cinquante études indépendantes, la Food and Drug Administration aux Etats-Unis autorise depuis 1999 les industriels du secteur agroalimentaire à stipuler que 25 g de protéines de soja par jour, faisant partie d'un régime pauvre en graisses saturées et en cholestérol peuvent diminuer le risque de maladies cardiovasculaires.

Les protéines de soja auraient également un effet vis-à-vis de l'hypertension se traduisant par une diminution significative de la pression sanguine diastolique et systolique (He *et al.*, 2005). Quelques hypothèses relatives à leur mécanisme d'action ont été proposées : la régulation du cholestérol par les protéines pourrait impliquer une activation des récepteurs LDL au niveau des cellules hépatiques, une augmentation de la sécrétion d'acides biliaires, ayant pour effet d'éliminer le cholestérol du sang, ou une stimulation du foie provoquant l'élimination des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Potter, 1998). Une autre étude propose un mécanisme d'inhibition de gènes spécifiques au niveau des adipocytes, empêchant le développement d'hypertrophie ou d'une lipotoxicité hépatique (Tovar *et al.*, 2005).

La fraction protéique du soja contient aussi une quantité significative de β-amylase, de cytochrome C, de lectines, de lipoxygénases, d'uréases, de lunasine et d'inhibiteurs de protéases. Il a été montré *in vitro* sur un modèle gastro-intestinal que les lectines possèdent des propriétés anticancérigènes (Abel *et al.*, 1996) et participent au transport du calcium et des isoflavones glycosylées, probablement grâce à leurs propriétés liantes spécifiques des sucres (Ohno *et al.*, 2006). Les peptides du soja potentiellement actifs ont en commun une chaîne peptidique résiduelle relativement courte, de l'ordre de 2 à 9 acides aminés, et comprenant des résidus aminoacides hydrophobes substitués aux groupements proline, lysine ou arginine (Kim *et al.*, 2000). Des propriétés leur ont été attribuées vis-à-vis des processus oxydatifs (Pena-Ramos et Xiong, 2002) ainsi que contre l'obésité (Nakamori, 2002). Un peptide récemment isolé, la lunasine, aurait également une activité anticancérigène au niveau des cellules mammaires (de Lumen, 2005). Ces peptides, natifs ou dérivés de protéines hydrolysées, agiraient pendant la digestion gastro-intestinale des produits à base de soja (Korhonen et Pihlanto, 2003).

Par ailleurs, les lipoxygénases, qui constituent 1 % des protéines de la graine, sont associées à l'oxydation des acides gras polyinsaturés qu'elles transforment en aldéhydes à chaîne plus courte, résultant en une saveur désagréable de certains produits à base de soja (Nielsen, 1990).

II.2.2. Lipides

Le germe de soja et les cotylédons contiennent respectivement de 13 à 16 % et de 18 à 20 % de lipides totaux, dont environ 85% sont composés d'acides gras polyinsaturés riches en acides linoléique et linolénique (Snyder et Kwon, 1987). Leur teneur dépend de la variété et des conditions de culture (Bhardwaj *et al.*, 2004) et leur répartition varie dans les différents compartiments de la graine (**Tableau 2**).

L'huile issue des cotylédons contient 11-15 % d'acide palmitique, 2-5 % d'acide stéarique, 20-30 % d'acide oléique, 45-55 % d'acide linoléique et 5-9 % d'acide linolénique (Liu et Brown, 1996), alors que le germe est caractérisé par une plus forte proportion d'acide palmitique et linolénique qui représentent respectivement 15-20 % et 20-25 % des acides gras totaux (Yoshida *et al.*, 2003).

Tableau 2. Profil des acides gras contenus dans les graines de soja.

% des acides gras totaux	Germe*	Cotylédons**
acide palmitique C16:0	15 - 20	11 – 15
acide stéarique C18:0	2 - 5	2 – 5
acide oléique C18:1	5 - 10	20 – 30
acide linoléique C18:2	40 - 50	45 – 55
acide linolénique C18:3	20 - 25	5 – 9

* Fiche technique Genibio, 2005
** USDA = Nutrient Database for Standard Reference(Nov.B39 1999)

Indispensables à la cohésion des cellules, les acides gras polyinsaturés interviennent dans la constitution des tissus et des membranes cellulaires. L'acide α-linolénique, précurseur des acides

oméga-3, régule la pression artérielle, l'élasticité des vaisseaux et l'agrégation des plaquettes sanguines (Sinclair *et al.*, 2000 ; Romieu *et al.*, 2005). Ils interviennent également au niveau des mécanismes de certaines réactions immunitaires et semblent posséder un pouvoir analgésique significatif (Perez *et al.*, 2005). L'acide linoléique, précurseur des acides oméga-6, est responsable de l'équilibre cardiovasculaire et immunitaire. Il agit sur la régulation du système nerveux, sur la cicatrisation et contre les réactions allergiques et inflammatoires (Vessby, 1994 ; Demaison et Moreau, 2002).

L'huile de soja est également la principale source de lécithine, largement utilisée par l'industrie agroalimentaire pour ses propriétés émulsifiantes. La lécithine est un mélange complexe de phospholipides, de triglycérides et de glycolipides. En pharmacie, elle permet l'obtention d'émulsions stables et de liposomes et favorise la solubilisation du cholestérol dans le sang, empêchant ainsi son dépôt sur la paroi des artères. La lécithine apporte une quantité importante de choline et d'inositol qui interviennent sur le métabolisme hépatique des graisses, augmentant ainsi le taux des HDL, diminuant les LDL et favorisant l'élimination par le foie du cholestérol en excès.

L'huile brute de soja contient aussi de 1 à 3 % de phospholipides, dont 25 % sont localisés dans les cotylédons, suggérant que le reste provient du germe (Yoshida *et al.*, 2003). Le germe est effectivement une source importante de phosphore principalement réparti entre les phytates et les phospholipides. Les phospholipides entrent dans la composition des cellules nerveuses du cerveau et leur apportent le phosphore indispensable à leur fonctionnement. En plus de ce rôle essentiel, les phospholipides et leurs métabolites sont impliqués dans de nombreuses autres fonctions cellulaires dont les processus de prolifération et l'apoptose. La fraction lipidique de l'huile de soja renferme également des stérols, des tocophérols et des sphingolipides.

II.2.3. Glucides

La graine de soja contient de 30 à 35 % de sucres dont 15 % sont des sucres solubles incluant le saccharose et d'autres oligosaccharides. Le soja est aussi une excellente source de fibres alimentaires. Les sucres insolubles issus de ces fibres, dont la cellulose, les hémicelluloses, la pectine et l'amidon, représentent 15 % des cotylédons et 9 % du germe.

La consommation du soja a souvent été limitée par la présence d'α-galactooligosaccharides non digestibles tels que le raffinose, le stachyose et le verbascose qui représentent de 4 à 6 % de la matière sèche des graines et ne sont pas éliminés lors des procédés industriels usuels (Hymowitz *et al.*, 1972 ; Leske *et al.*, 1993). Leur digestion enzymatique au niveau du duodénum est faible car la plupart des mammifères n'expriment pas l'α-galactosidase pancréatique nécessaire à leur hydrolyse (Slominski, 1994). Chez l'homme, ils sont métabolisés par les microorganismes intestinaux, libérant une quantité importante de gaz tels que le dioxyde de carbone, l'hydrogène ou le méthane, responsables de flatulences.

Cependant, des travaux plus récents ont fait émerger les oligosaccharides comme de nouveaux ingrédients pré-biotiques pouvant améliorer la digestibilité des nutriments (Smiricky *et al.*, 2002). Il a été mis en évidence *in vivo* qu'une alimentation contenant moins de 2,2 % de stachyose et moins de 0,2 % de raffinose améliore la digestibilité des nutriments sans provoquer de problèmes de flatulence (Yamka *et al.*, 2006). Les oligosaccharides du soja sont même commercialisés sous forme de compléments alimentaires pour leur capacité à stimuler la croissance des espèces *Bifidobacterium* au niveau du colon.

L'ingestion d'oligosaccharides du soja pourrait influencer l'activité métabolique de la microflore intestinale ainsi que la concentration plasmatiques des isoflavones, puisqu'à travers leur activité prébiotique, ils pourraient convertir les structures glycosylées en aglycones (Slavin, 1999 ; Tamura *et al.*, 2003), ou même influencer la biosynthèse de l'équol, métabolite de la daidzéine possédant un pouvoir oestrogénique et antioxydant plus important que les autres isoflavones (Lampe *et al.*, 1998 ; Rowland *et al.*, 1999). Il a aussi été montré *in vitro* et *in vivo* que les polysaccharides du soja possèdent une activité anti-allergène (Kobayashi *et al.*, 2005).

II.2.4. Vitamines et minéraux

- *Profil minéral du germe de soja*

La graine de soja contient de 4 à 5 % de minéraux, les principaux éléments étant le potassium, le phosphore, le magnésium et le calcium (**Tableau 3**).

La biodisponibilité du calcium et du zinc dans le soja est plus élevée que celle du fer d'origine végétale qui est difficilement absorbé par l'organisme (Messina, 1999). Le potassium est impliqué dans plusieurs fonctions vitales incluant l'édification des protéines, la synthèse glucidique ou l'excitabilité neuromusculaire. Le calcium intervient principalement dans la composition des os et dans la régulation de la coagulation sanguine. Le phosphore a un rôle physiologique fondamental puisque les réactions de phosphorylation sont impliquées dans la production d'énergie. Le magnésium assure la cohésion des protéines et agit en activateur des systèmes enzymatiques. La plupart des minéraux sont localisés dans les cotylédons. Seul le zinc est 2 fois plus concentré dans le germe que dans les cotylédons.

Tableau 3. Composition des minéraux dans différentes fractions de la graine de soja.

Minéraux (µg pour 100 g de matière sèche)	Germe de soja*	Cotylédons**
Calcium	83	277
Fer	14,4	15,1
Magnesium	182	280
Phosphore	740	850
Potassium	1398	1797
Sodium	2,7	3,0
Zinc	8,1	4,9
Cuivre	1,4	1,6
Manganèse	3,1	4,2

*: Schryver, 2002
* USDA : Nutrient Database for Standard Reference, Release 13 (Nov. 1999)

➢ *Profil vitaminique du germe de soja*

L'apport en vitamines des graines de soja est également significatif, puisqu'on y trouve les vitamines liposolubles A, E, D et K ainsi que les vitamines hydrosolubles essentiellement du groupe B (**Tableau 4**).

Les vitamines interviennent en général dans les mécanismes enzymatiques membranaires, et l'absence de l'une d'entre elles peut arrêter la croissance ou entraîner une maladie de carence spécifique. Les vitamines A (β-carotène) et E (α-tocophérol) en particulier protègent l'organisme vis-à-vis du stress oxydatif grâce à leur capacité de capture des radicaux libres. La vitamine D assure une minéralisation optimale des os et régule l'absorption intestinale du calcium. La vitamine K est indispensable à la coagulation sanguine et favorise la fixation osseuse du calcium.

Tableau 4. Composition des vitamines du germe et de la graine entière de soja.

Vitamines (µg pour 100 g de matière sèche)	Germe de soja*	Cotylédons**
Thiamine (B1)	0,03	0,9
Ribloflavine (B2)	0,50	0,9
Niacine (B3)	2,7	1,6
Acide pantothénique (B5)	1,3	0,8
Pyroxidine (B6)	0,5	0,4
Acide folique (B9)	430	375
Acide ascorbique (C)	0,2	6,0
β-carotène (A)	ND	1,0
Tocophérols (E)	37,5	3,5

* : Schryver, 2002
** USDA : Nutrient Database for Standard Reference, Release 13 (Nov. 1999)

Le germe est significativement plus riche que les cotylédons en vitamines du groupe B. Hormis les vitamines B1 et B2 dont les teneurs sont plus élevées dans les cotylédons, le germe est plus concentré en vitamine B3 qui régule les cycles de transport de l'hydrogène, en vitamine B5 qui intervient dans la constitution de la coenzyme A, en vitamine B6 qui intervient dans la constitution du système nerveux central et en vitamine B9 qui contribue au métabolisme des vitamines C et B12.

Le germe de soja est également 10 à 20 fois plus concentré que la graine entière en vitamine E. Les molécules appartenant à la famille de la vitamine E, appelées tocophérols et tocotriénols, sont considérées comme de puissants antioxydants. Leur profil précis dans le germe et la description de leurs propriétés biologiques seront décrits plus loin de manière plus détaillée.

II.2.5. Isoflavones

➢ *Structure et profil des isoflavones du soja*

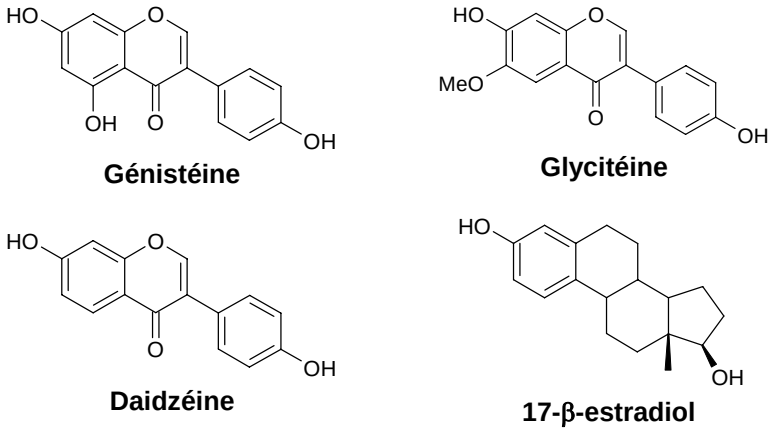


Figure 2. Comparaison structurale des phyto-oestrogènes du soja et du 17-β-oestradiol

Parmi les composés mineurs du soja possédant des effets bénéfiques sur la santé apparaît particulièrement une classe de phyto-oestrogènes non stéroïdiens appelés isoflavones. La structure moléculaire des isoflavones comprend 2 cycles benzéniques liés par un noyau pyranne hétérocyclique (**Figure 2**). Cette structure est proche de celle de l'estradiol humain, naturellement sécrété chez la femme au niveau des ovaires jusqu'à la ménopause.

Les isoflavones se fixent aux récepteurs oestrogéniques avec une affinité particulière pour les récepteurs ER-β, majoritaires dans certains tissus (**Figure 3**), entrant ainsi dans le circuit des agents potentiellement actifs pour une thérapie oestrogénique chez la femme post-ménopausée (Setchell et Cassidy, 1999). Cependant, la liaison des isoflavones aux récepteurs de l'oestradiol s'établit avec une affinité relativement faible par rapport à l'oestradiol humain. Il s'ensuit des effets compétitifs avec l'oestradiol selon la cellule cible considérée. Des études plus approfondies concernant l'interaction des phytoestrogènes avec les récepteurs des gènes oestrogéno-dépendants sont encore en cours.

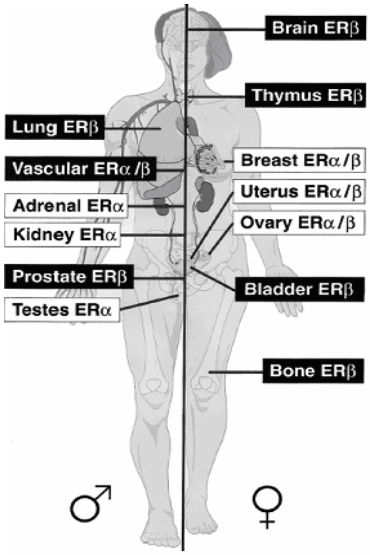


Figure 3. Diagramme simplifié de la distribution anatomique des récepteurs oestrogéniques ERβ (Setchell et Cassidy, 1999)

Dans la graine native de soja, les isoflavones se divisent en 12 structures chimiques, réparties en 3 familles dérivées des structures aglycones daidzéine, génistéine et glycitéine. Les formes β-glucosides, acétylglucosides et malonylglucosides sont des formes dites conjuguées libèrant après hydrolyse leur structure aglycone correspondante (**Figure 4**).

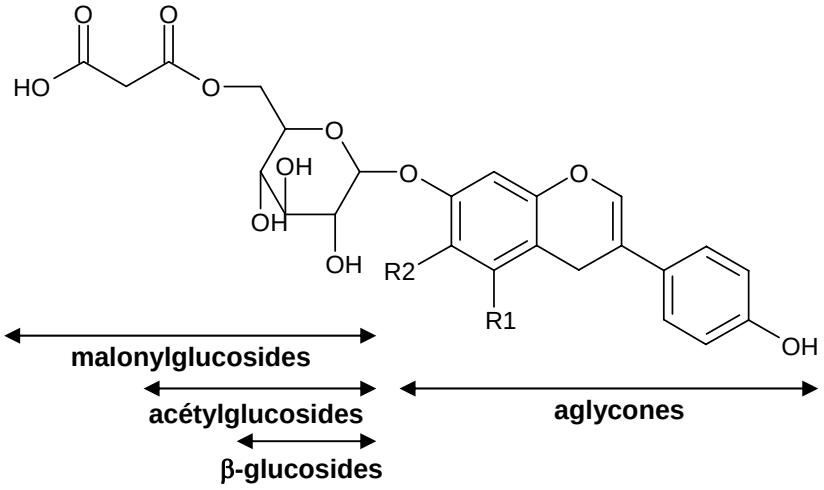


Figure 4. Structure et conjugaison des 3 familles d'isoflavones du soja

La concentration des isoflavones dépend fortement des variétés de soja, des conditions géographiques et environnementales de culture (Daydé et Lacombe, 2002 ; Lozovaya *et al.*, 2005), ainsi que des procédés industriels utilisés lors de la transformation des graines (Coward *et al.*, 1998). La concentration massique des isoflavones totales dans le germe de soja varie de 2 à 3 %, ce qui représente une teneur 10 fois supérieure à celle des cotylédons (Tsukamoto *et al.*, 1995). Leur profil est totalement différent entre ces deux fractions. Dans le germe, les conjugués de la daidzéine et de la glycitéine représentent respectivement 40-60 % et 25-40 % des isoflavones totales (Daydé *et al.*, 2004), alors que dans les cotylédons, la génistéine, largement majoritaire, représente 50-70 % des isoflavones totales (Eldridge et Kwolek, 1983).

- *Estimation des apports en isoflavones dans la population française*

Les teneurs en isoflavones sont naturellement les plus élevées dans les produits d'origine végétale, de l'ordre de 10 mg pour 100 g dans les aliments à base de soja (tonyu, tofu, desserts à base de soja). L'estimation de l'apport journalier moyen en génistéine et en daidzéine pour un français ayant un régime alimentaire occidental traditionnel, i.e. excluant les produits dérivés du soja, est de l'ordre de 26 µg/j en moyenne pour un adulte, et de 18 µg/j pour un enfant de 3 à 15 ans (Afssa, 2005). Les populations asiatiques les plus exposées aux aliments à base de soja (Japonais) ont des apports moyens en isoflavones aglycones d'environ 45 mg/j (de 8 à 118 mg/j) tandis que ceux des populations occidentales sont d'environ 0,4 mg/j (de 0 à 2 mg/j). En l'absence d'études, l'apport par les compléments alimentaires est difficile à évaluer. Selon la dose préconisée par les fabricants,

ces compléments apporteraient des quantités journalières inférieures à 40 mg d'isoflavones aglycones. Cet apport est comparable à celui observé chez les populations asiatiques.

- *Biodisponibilité et métabolisme des isoflavones*

De nombreux travaux étudient actuellement le métabolisme des isoflavones dans l'organisme. La principale difficulté concernant la compréhension de leurs mécanismes d'absorption est liée à l'importante variabilité interindividuelle de la microflore intestinale, du pH ou de la vitesse de transit digestif, facteurs pouvant être influencés par le régime alimentaire, ou le système immunitaire (Atkinson *et al.*, 2005). L'absorption des isoflavones et leur utilisation par l'organisme pour produire une activité estrogénique dépend également de la forme chimique de la molécule lors de son absorption, des processus mis en œuvre lors de son métabolisme et de son transport dans l'organisme jusqu'aux cellules où l'activité peut se produire. La quantité d'isoflavones biodisponibles est donc la résultante de leur absorption orale, de leur métabolisme, de leur résorption intestinale et de leur élimination fécale et urinaire.

Il n'existe que peu de données sur la biodisponibilité des isoflavones chez l'Homme. Les principaux résultats sont issus d'études menées sur des modèles animaux et notamment le rat, mais compte tenu des particularités propres à chaque espèce, ils présentent des limites quant à leur transposition chez l'Homme. Une revue rassemblant les résultats de 97 études évaluant la biodisponibilité des polyphénols contenus dans l'alimentation a mis en évidence que les isoflavones, au même titre que l'acide gallique, sont les polyphénols les mieux absorbés par l'organisme (Manach *et al.*, 2005).

Les études concernant la biodisponibilité relative des différentes structures d'isoflavones sont très contradictoires et leurs résultats restent fortement dépendants des méthodologies utilisées. Les tests *in vitro*, par exemple, ne peuvent pas refléter exactement les phénomènes liés à l'absorption des molécules, et à l'activité métabolique présente dans le tube digestif et dans le foie, où arrivent tous les composés ingérés par voie orale. Il en résulte que des molécules actives *in vitro* ne sont pas nécessairement actives dans l'organisme, tout comme à l'inverse, l'activité métabolique dans l'organisme peut conférer à la substance absorbée une activité qui ne sera pas révélée par un test *in vitro* (Bennetau-Pelissero, 2004). Certains travaux s'appuyant sur les concentrations plasmatiques des isoflavones chez la femme ont montré que la daidzéine est plus disponible que la génistéine (Xu *et al.*, 1994; King, 1998), alors que d'autres suggèrent le contraire (Setchell *et al.*, 2003). Les études concernant la biodisponibilité de la glycitéine sont beaucoup plus limitées. Les quelques données disponibles dans la littérature lui confèrent une biodisponibilité plus importante que la daidzéine et la génistéine (Zhang *et al.*, 1999 ; Bloedon *et al.*, 2002).

Une méthode ELISA a été mise au point pour évaluer avec exactitude les concentrations plasmatiques des isoflavones (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). Il s'agit d'une avancée importante dans la mesure où cette méthode a permis de mettre en évidence que, malgré une ingestion régulière

de produits à base de soja, les asiatiques ne présentent finalement que de faibles doses circulantes d'isoflavones. Les variations de biodisponibilité des isoflavones observées entre individus de différents pays peuvent s'expliquer par la variabilité interindividuelle des systèmes enzymatiques gastro-intestinaux dépendant fortement des habitudes alimentaires ou de la précocité d'une consommation d'isoflavones dès l'adolescence.

La conjugaison des isoflavones semble également avoir une influence sur leur biodisponibilité, mais là aussi les résultats publiés sont contrastés. Il est essentiel de souligner que les isoflavones ne sont pas présentes dans la plante sous leurs structures biologiquement actives, mais acquièrent leur activité estrogénique après une transformation métabolique par la flore bactérienne intestinale conduisant à la déglycosylation des isoflavones, qui doivent se trouver sous leur forme aglycone pour passer la barrière intestinale. La différence de biodisponibilité entre les formes aglycones et glycosylées dépend ainsi de leur délai d'apparition dans le sang, la forme d'ingestion jouant donc probablement un rôle essentiel. Setchell *et al.* (2001) ont mis en évidence que les structures glycosylées des isoflavones ont une meilleure biodisponibilité que les structures aglycones, alors que Izumi *et al.* (2000) ont attribué aux aglycones une meilleure biodisponibilité. Les isoflavones glycosylées seraient plus difficilement absorbées que leurs formes aglycones en raison de leur caractère hydrophile plus marqué et de leur plus haut poids moléculaire (Izumi *et al.*, 2000). Après ingestion, ces structures ne seraient pas absorbées directement mais subiraient une hydrolyse enzymatique partielle sous l'action des β-glucosidases intestinales. Les structures aglycones ainsi libérées seraient alors absorbées à travers l'épithélium intestinal (Setchell *et al.*, 2002). La fraction non hydrolysée atteindrait ensuite le colon où les structures conjuguées seraient à leur tour dégradées par des enzymes bactériennes avant d'être absorbées ou métabolisées en d'autres composés (Setchell *et al.*, 2003 ; Wiseman *et al.*, 2004).

L'équol et la O-desméthylangolensine (O-DMA) sont les principaux métabolites de la daidzéine détectés dans l'urine après ingestion d'isoflavones (Heinonen *et al.*, 2003). Dans le milieu réducteur du colon, la daidzéine serait d'abord transformée en dihydrodaidzéine (DHD), et ensuite en O-desmethylangolensine (O-DMA) ou en équol (**Figure 5**). Un métabolite de la génistéine, la 6'hydroxy-*O*-DMA a également été identifié (Joannou *et al.*, 1995). La glycitéine serait quant à elle métabolisée majoritairement en dihydroglycitéine, en dihydro-6,7,4'-trihydroxyisoflavone et en 5'-OMe-*O*-desmethylangolensine, alors que seuls quelques individus seraient capables de la métaboliser en 6-OMe-équol et en daidzéine (Simons *et al.*, 2005).

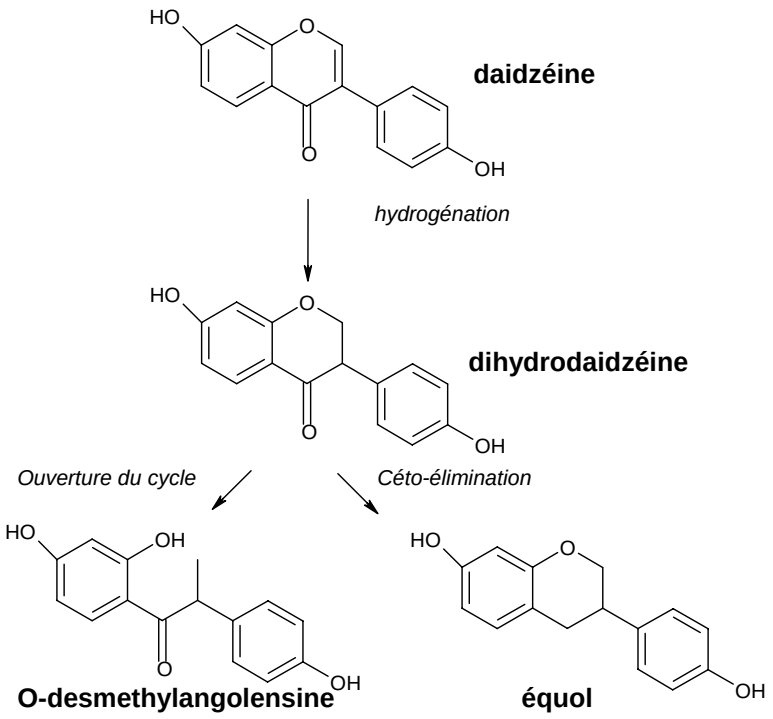


Figure 5. Métabolisme de la daidzéine

L'équol est d'un intérêt tout particulier puisqu'il est facilement absorbé à travers la paroi du colon et présente une affinité 10 à 80 fois plus élevée que la daidzéine pour les récepteurs oestrogéniques ER α et β (Grubber *et al.*, 2002). L'efficacité des produits dérivés du soja pourrait donc dépendre fortement de la capacité des individus à produire de l'équol (Akaza *et al.*, 2002 ; Atkinson *et al.*, 2005). Pourtant, seuls 30 à 40 % des humains sont capables de le métaboliser (Kelly *et al.*, 1995), alors que les producteurs de O-DMA représentent 80 à 90 % de la population.

Les bactéries intestinales responsables de la métabolisation de la daidzéine en équol ou en O-DMA n'ont pas été précisément identifiées. Il a tout de même été observé chez la femme que la sécrétion d'équol est associée à une consommation importante de fibres alimentaires agissant sur la croissance de populations bactériennes productrices d'équol dans le colon (Slavin *et al.*, 1998).

Une étude *in vitro* est parvenue à identifier 4 souches dominantes productrices d'équol, mais aucune de ces cultures isolées n'a produit de l'équol ou de la dihydrodaidzéine (Decroos *et al.*, 2005). Cette étude a aussi mis en évidence que l'hydrogène, le butyrate et le propionate, qui sont des produits de fermentation issus de la faible digestibilité des glucides, stimulent la production d'équol par les cultures mélangées de ces 4 souches.

Plus récemment, une hypothèse selon laquelle certaines souches microbiennes transforment des individus non-producteurs d'équol en producteurs d'équol, a été vérifiée *in vitro* (Decroos *et al.*, 2006). Cette étude nécessite d'être confirmée par des essais *in vivo*.

- *Effets des isoflavones sur les troubles de la ménopause*

La ménopause est liée à une diminution du taux d'oestrogènes, induisant une série de symptômes caractéristiques, tels que bouffées de chaleur ou irritabilité et s'accompagnant de processus dégénératifs tels que l'athérosclérose ou l'accélération du vieillissement cutané. Le traitement hormonal de substitution (THS) est apparu pendant longtemps comme la solution la plus adaptée, jusqu'à ce que l'on prenne conscience de ses dangers, notamment sur l'augmentation des risques de cancer du sein. C'est pourquoi il existe aujourd'hui une demande croissante de traitements alternatifs naturels considérés comme plus doux.

Les isoflavones aglycones ont une activité estrogénique potentielle du fait de leur affinité de liaison pour les récepteurs ERα et ERβ des estrogènes. Elles peuvent également modifier les taux circulants des hormones stéroïdes sexuelles par intéraction avec les enzymes de synthèse ou de conversion périphérique. Comme plusieurs études scientifiques ont mis en évidence ce pouvoir estrogénique des isoflavones ainsi que leur capacité à lutter contre le stress oxydatif responsable du déclin des fonctions physiologiques des femmes ménopausées, de nombreux extraits commerciaux d'isoflavones de soja ont émergé, principalement sous la forme de compléments alimentaires, pour prévenir les troubles de la ménopause. Bien qu'il n'existe actuellement aucune dose efficace de référence pour les isoflavones, les nutritionnistes recommandent une quantité comprise entre 20 et 50 mg/jour sur la base des doses journalières typiquement relevées en Asie (Setchell et Cassidy, 1999).

Les résultats actuels concernant l'action précise des isoflavones vis-à-vis des symptômes de la ménopause sont encore très contrastés. Plusieurs études ont montré que leur consommation régulière (17 à 90 mg/jour) inhibe les troubles de la ménopause tout en diminuant le risque de développer un cancer du sein (Nagata *et al.*, 1999 ; Faure *et al.*, 2002). La génistéine en particulier empêcherait l'augmentation de la masse corporelle et induirait l'apoptose des tissus adipeux dont le dérèglement survient après la ménopause (Kim *et al.*, 2006). D'autres travaux ont montré au contraire que la consommation d'isoflavones (99 mg/jour) n'entraîne aucun changement significatif des symptômes climactériques des femmes postménopausées (Kok *et al.*, 2005 ; Verhoeven *et al.*, 2005).

Il existe aussi des publications qui mettent en avant le rôle d'autres métabolites dans la prévention de ces symptômes. L'association d'acides gras polyinsaturés avec un extrait d'isoflavones entraînerait par exemple une réduction plus importante des bouffées de chaleur de la femme postménopausée qu'un extrait d'isoflavones seul (Campagnoli *et al.*, 2005).

Il faut également souligner que plusieurs données scientifiques remettent en question la sécurité de ces traitements, puisqu'en dehors de leur pouvoir oestrogénique, les isoflavones exerceraient à forte dose une activité génotoxique. Ceci a été montré en particulier pour la génistéine et la daidzéine (Kulling *et al.*, 1999 ; Di Virgilio *et al.*, 2004). Une faible mais significative hyperplasie de l'endomètre a également été observée chez des femmes ayant reçu une dose quotidienne

d'isoflavones de 150 mg pendant 5 ans (Arici et Bukulmez, 2004). D'autres études observationnelles ont aussi souligné un possible effet négatif sur le risque de développer un cancer du sein ou de la vessie (Parkin, 1989 ; Sun *et al.*, 2004). Ainsi, il n'est pas possible d'admettre à ce jour que l'effet thérapeutique des isoflavones dans les troubles climatériques soit établi. Il est possible de s'interroger sur l'importance des résultats négatifs et sur la grande variabilité des résultats.

- *Effets des isoflavones sur la densité osseuse*

Les effets concernant l'action des isoflavones sur la diminution de la densité osseuse survenant au moment de la ménopause, sont également très discutés. Selon certains travaux, la génistéine induirait une diminution du nombre d'ostéoblastes nécrosés, mais son mécanisme d'action sur le renouvellement osseux en comparaison avec l'oestradiol reste inconnu (Rliwinski *et al.*, 2005). Il a été suggéré par ailleurs que la stimulation des ostéoblastes est provoquée par la daidzéine et que la génistéine inhibe ensuite la résorption osseuse (Blair *et al.*, 1996).

Une étude récente menée sur des rats sains a montré au contraire que la densité minérale osseuse n'est pas affectée par une exposition à la génistéine, et qu'une trop forte dose pourrait même provoquer une réduction de la taille des os (Hotchkiss *et al.*, 2005). Une action synergique entre les isoflavones et les omegas-3 atténuant la diminution de la densité minérale osseuse, a également été évoquée (Watkins *et al.*, 2005). Aux vues de ces résultats, il ressort que les phyto-estrogènes aurait un potentiel pour la prise en charge de la femme ménopausée dans un objectif de prévention de l'ostéoporose. Toutefois, si l'expérimentation animale, majoritairement conduite chez la rate ovariectomisée, modèle de l'ostéoporose postménopausique, a fourni les preuves d'une certaine efficacité pour la prévention de la perte osseuse liée à la suppression de la synthèse des estrogènes, les investigations chez l'Homme sont moins consensuelles. Des études supplémentaires interventionnelles ou mécanistiques apparaissent nécessaires afin de déterminer l'impact réel des isoflavones sur les troubles de la ménopause.

- *Isoflavones de soja et prévention des cancers*

De nombreux travaux ont mis en évidence que la consommation d'isoflavones réduit le risque de cancer du sein de façon significative chez les femmes asiatiques. On les associe également dans certaines études à une diminution des risques d'autres cancers hormono-dépendants de la prostate ou de l'endomètre. Le facteur de risque majeur des cancers causés par un dérèglement hormonal est en effet lié à une surexposition des cellules aux oestrogènes humains. En se fixant aux récepteurs β-oestrogéniques des cellules du sein, des ovaires ou de l'endomètre, les isoflavones pourraient contribuer à la régulation des mécanismes de reproduction cellulaires. Le **Tableau 5** présente les principaux résultats montrant ou non un effet préventif des isoflavones vis-à-vis des cancers.

Il apparaît que la réduction des risques de cancer du sein correspond à un apport compris entre 30 et 40 mg/jour dès l'adolescence. Cet effet paraît plus net chez les femmes avant la ménopause, suggérant un mécanisme hormonal. Concernant le risque de développer un cancer de

l'endomètre, les études sont moins nombreuses et il apparaît que les isoflavones sont sans effet chez les femmes occidentales, soit que les doses habituellement consommées soient trop faibles ou que ces femmes ont des habitudes alimentaires différentes. Quant au cancer de la prostate, il existe peu d'études épidémiologiques analytiques concluantes, mais les études animales convergent globalement vers une réduction du risque.

Le rôle préventif des isoflavones vis-à-vis des cancers serait peut-être lié à leur pouvoir oestrogénique (Pfeiffer *et al.*, 2006), mais aussi à leur capacité d'inhibition de l'activité d'enzymes spécifiques telles que les tyrosines kinases ou les ADN-topoisomérases I et II impliquées dans la prolifération cellulaire (Brown et Lamartinière, 2000). Leur pouvoir antioxydant leur permettrait aussi d'inhiber la production de peroxyde d'hydrogène et la propagation des radicaux libres ou d'espèces oxygénées hautement réactives impliquées dans l'altération de l'ADN (Wei *et al.*, 1995 ; Ruiz-Larrea *et al.*, 1997 ; DiSilvestro *et al.*, 2005 ; Takahashi *et al.*, 2005). Les radicaux libres étant impliqués dans la genèse de tous les types de cancers, le pouvoir antioxydant des isoflavones trouve des applications au-delà de la prévention des cancers hormono-dépendants. Leur consommation s'est par exemple avérée efficace vis-à-vis du développement de la maladie de Crohn, puisque cette maladie, liée au syndrome du colon irritable, est causée par une exposition des cellules intestinales aux espèces oxygénées hautement réactives générées par la peroxydation des phospholipides membranaires (Wiseman, 2006). De même une étude cas-contrôle récente a mis en évidence une relation inverse entre la consommation d'isoflavones et le risque de développer un cancer colorectal (Rossi *et al.*, 2006). Les isoflavones exerceraient aussi un effet anti-hypertensif par une amélioration du stress oxydatif et une augmentation significative de la production d'oxyde nitrique (NO) qui est un vasodilatateur efficace régulé par l'activité des NO-synthases (Nakaya *et al.*, 2005). Cependant, d'autres facteurs prépondérants associés au style de vie sont difficilement dissociables de l'effet des isoflavones et empêche de conclure à la spécificité de leur effet.

Tableau 5. Principales études impliquant les isoflavones dans la prévention des cancers.

	TRAVAUX PUBLIES	OBSERVATIONS
Etudes cliniques	***Zheng et al., 1999*** : Etude de la cinétique d'excrétion urinaire des isoflavones chez 60 femmes présentant un cancer du sein.	L'excrétion urinaire des isoflavones, notamment la glycitéine, est plus faible chez les femmes atteintes d'un cancer.
	Dalais et al., 2004 : 29 hommes atteints d'un cancer de la prostate soumis à une alimentation riche ou pauvre en phyto-oestrogènes.	Le régime riche en phyto-oestrogènes diminue le niveau des antigènes spécifiques de la prostate des individus malades, suggérant un mécanisme d'inhibition de la propagation des cellules malignes.
Revues	***Strom et al., 1999*** : Etude rétrospective évaluant l'impact d'une consommation de phytoestrogènes sur le risque de développer un cancer de la prostate.	Association inverse entre une consommation de daidzéine et le risque de cancer de la prostate. La génistéine montre un effet protecteur plus faible.
	Adlercreutz, 2002 : Revue bibliographique évaluant l'effet préventif des phyto-oestrogènes et des lignanes contre les cancers du sein, de la prostate et du colon.	Une alimentation à base de soja inhibe la croissance des tumeurs prostatiques, prévient faiblement l'apparition de cancers du sein, mais serait plutôt bénéfique si initiée dès l'adolescence.
Etudes chez l'animal	***Hickey et al., 2005***: Comparaison des effets des protéines de soja avec (SP+) ou sans (SP-) isoflavones sur un modèle de tumeurs mammaires induites chez la souris.	Retardement de l'apparition des tumeurs après les traitements SP+ et SP- et diminution de leur taille après le traitement par SP-. Des composés présents dans SP+ pourraient confondre les effets bénéfiques des protéines.
	Zhou et al., 2004 : Effet d'un extrait de soja enrichi ou non en génistéine sur la progression de tumeurs mammaires chez la souris.	Inhibition de la prolifération cellulaire et réduction de la croissance des tumeurs pour les 2 traitements.
	Pollard et al., 2000: Traitement de métastases prostatiques chez le rat par un ingrédient naturel à base de soja, ou par de l'amidon supplémenté d'un isolat de protéines de soja contenant des isoflavones (SPII).	Inhibition de la propagation des métastases par SPII, mais pas par l'ingrédient naturel à base de soja, suggérant que certains facteurs bloquent l'action antiandrogénique des isoflavones dans l'ingrédient entier.
Etudes in viro	***Singh et al., 2006*** : Evaluation *in vitro* et *in vivo* de l'effet de la génistéine et d'un extrait de métabolites secondaires du soja sur une culture de cellules cancéreuses de la vessie.	Inhibition de la croissance cellulaire de manière dose-dépendante, induction de l'apoptose *in vitro*. Réduction de la taille des tumeurs chez la souris d'environ 50 % pour les 2 traitements.
	Constantinou et al., 2001 : Cellules mammaires cancéreuses traitées par un isolat de protéine de soja avec (SPI+) ou sans (SPI-) isoflavones, par de la daidzéine ou de la génistéine purifiées sur un modèle de souris.	Réduction significative de la prolifération des tumeurs après traitement par la daidzéine, SPI+ ou SPI-, mais pas avec la génistéine purifiée.
	Li et al., 2005 : Prétraitement *in vitro* de cellules cancéreuses (prostate, sein, pancréas et poumon) par de la génistéine pendant 24 h suivi d'un traitement par un agent chemothérapeutique pendant 72 h.	Augmentation de l'inhibition de la croissance des cellules tumorales et induction de l'apoptose avec le prétraitement à la génistéine.
	Lin et al., 2005 : Effet de la daidzéine ou de la génistéine sur une culture de cellules mammaires cancéreuses.	Inhibition de l'activité des phosphodiestérases impliquées dans les processus prolifératifs cellulaires à l'issue des 2 traitements.
	Cao et al., 2006 : Traitement de cellules cancéreuses de la prostate par la daidzéine et la génistéine.	La viabilité des cellules cancéreuses diminue à l'issue des 2 traitements. La daidzéine réduit l'expression des gènes des récepteurs oestrogéniques ⇒ Réduction de la prolifération cellulaire.
	Hedlund et al., 2006 : Traitement de cellules cancéreuses de la prostate par différentes isoflavones : génistéine, équol, daidzéine, glycitéine, O-DMA, DHD.	La génistéine, l'équol et la daidzéine freinent la croissance des cellules épithéliales prostatiques bénignes (PrEC). La glycitéine freine significativement la croissance des cellules prostatiques cancéreuses. La combinaison de plusieurs isoflavones semble synergique.
	Ju et al., 2006 : Evaluation du potentiel oestrogénique de la daidzéine et de l'équol sur la stimulation de la croissance de cellules cancéreuses mammaires (MCF-7) *in vitro* et *in vivo* (modèle souris ovariectomisée).	Effet prolifératif de la daidzéine et de l'équol *in vitro* si c<50 µM. *In vivo*, la daidzéine stimule faiblement la croissance des tumeurs, mais pas l'équol ⇒ Des facteurs pharmacocinétiques ou métaboliques atténuent les effets oestrogéniques de la daidzéine et de l'équol *in vivo.*

Parmi les 3 familles d'isoflavones du soja, les dérivés de la génistéine et de la daidzéine ont été les plus étudiés. L'effet antiprolifératif de la génistéine a été démontré sur des cultures de cellules mammaires, mais aussi au niveau du foie, de la peau, de la prostate et du colon (Adlercreutz, 2002). Il semblerait qu'une exposition des femmes à la génistéine avant la puberté diminue l'incidence des cancers du sein survenant à l'âge adulte, suggèrant que des facteurs sociaux-culturels tels que les habitudes alimentaires sont à considérer avec attention (Rowell *et al.*, 2005). La génistéine a également montré un pouvoir d'inhibition de la croissance des mélanomes *in vitro* et de réduction des dommages oxydatifs de l'ADN induits par des radiations UV (Russo *et al.*, 2006).

D'autres résultats ont montré par ailleurs que la daidzéine exerce une activité inhibitrice plus importante que la génistéine sur la croissance des cellules cancéreuses du sein et de la prostate (Constantinou *et al.*, 2001), et que le métabolisme de la daidzéine en équol pourrait jouer un rôle clé dans la prévention des cancers hormono-dépendants (Hedlund *et al.*, 2006). L'équol possède en effet un pouvoir antioxydant plus fort que les autres isoflavones (Mitchell *et al.*, 1998) et exerce une activité anti-androgène pouvant prévenir le développement du cancer de la prostate (Lund *et al.*, 2004). L'équol serait également associé à une diminution des risques de développer un cancer du sein, la densité mammaire étant plus faible à la ménopause chez les productrices d'équol que chez les non-productrices (Duncan *et al.*, 2000 ; Frankenfeld *et al.*, 2004).

En parallèle, les effets de la glycitéine, isoflavone exclusivement détectée dans le germe, ont été beaucoup moins étudiés. Les quelques études concernant la glycitéine lui ont attribué un effet protecteur vis-à-vis du cancer du sein et de la prostate mais son mécanisme d'action reste inconnu (Zheng *et al.*, 1999 ; Hedlund *et al.*, 2006).

Les conclusions issues de ces études sont variables, et il apparaît que le rôle précis des différentes familles d'isoflavones ainsi que leurs mécanismes d'action ne sont pas encore parfaitement élucidés. Des travaux supplémentaires validant les effets de la daidzéine par rapport à la génistéine ainsi que les effets propres de la glycitéine et de ses dérivés seraient intéressants pour valoriser la matrice germe de soja en comparaison avec les matrices dérivées des graines entières.

➢ *Isoflavones et prévention des maladies cardiovasculaires*

Les travaux d'identification de la ou des fractions du soja pouvant prévenir le développement de maladies cardiovasculaires se sont focalisés sur les protéines et sur les isoflavones, en particulier la daidzéine et la génistéine. Le **Tableau 6** présente les principaux résultats montrant ou non un effet préventif des isoflavones vis-à-vis des affections cardiovasculaires. Il apparaît que les mécanismes relatifs à leur réelle implication sont encore très discutés.

Tableau 6. Principales études évaluant l'effet des isoflavones vis-à-vis des maladies cardiovasculaires.

	TRAVAUX PUBLIES	OBSERVATIONS
Meta-analyses	***Zhan et Ho, 2005*** : Méta-analyse de 23 études d'intervention contrôlée publiées de 1995 à 2002 évaluant l'effet d'une association protéines-isoflavones sur les risques de maladies cardiovasculaires.	Diminution du cholestérol total, des LDL et des triglycérides et augmentation des HDL. Effet plus significatif chez l'homme que chez la femme et chez les patients hypercholestérolémiques. Les extraits enrichis en isoflavones uniquement ne présentent aucun effet sur le cholestérol.
	Anderson et al., 1995 : Méta-analyse de 38 études d'intervention contrôlée sur des individus ayant ingéré quotidiennement un extrait protéique de soja à différentes concentrations.	Diminution du cholestérol total, des LDL et des triglycérides sans affecter les HDL. Effet plus marqué chez les patients présentant une cholestérolémie élevée. Pas de différence entre les régimes contenant 50%, 70% ou 90% de protéines
Etudes cliniques	***Hallund et al., 2006*** : 30 femmes postménopausées consommant des barres céréalières avec ou sans isoflavones pendant 8 semaines.	Les barres enrichies en isoflavones affectent la réactivité vasculaire : amélioration de la vasodilatation de la paroi de l'artère brachiale.
	Engelman et al., 2005 : 55 femmes postménopausées soumises à 4 traitements à base de protéines contenant des ratios variables phytates/isoflavones.	Ni les phytates ni les isoflavones contenus dans l'isolat de protéines n'ont montré un effet significatif sur les dégâts oxydatifs ou le profil des lipides sanguins.
	Hermansen et al., 2005 : Individus présentant une forte cholestérolémie, ingestion d'un extrait de soja contenant 30 g de protéines, 9 g de fibres et 100 mg d'isoflavones.	Aucun effet sur le profil des lipides circulants ou sur la sensibilité à l'insuline.
	West et al., 2005 : 18 femmes postménopausées et 14 hommes hypercholestérolémiques, 25 g/j de protéines de soja associées à 90 mg d'isoflavones ou 25 g/j de protéines de lait pendant 6 semaines.	Diminution des triglycérides chez les individus utilisant un traitement hormonal substitutif sans affecter les LDL. Diminution des LDL chez les individus non soumis au THS.
	Cheng et al., 2004 : Etude clinique sur 30 femmes postménopausées traitées par des isoflavones (100 mg) associées à du calcium (300 mg)	Diminution des taux de glucose sanguin et d'insuline
	Texeira et al., 2000 : Adultes présentant une hypercholestérolémie traités par des protéines de soja (20 à 50 g/j).	Diminution significative du cholestérol non-HDL quelque soit la concentration.
	Baum et al., 1998 : Femmes postménopausées, 40 g/j de protéines de soja + 56 ou 90 mg d'isoflavones pendant 6 mois	Amélioration du profil des lipides sanguins. Augmentation des HDL, diminution des LDL. Aucune différence entre les deux concentrations d'isoflavones.
	Nestel et al., 1997 : femmes consommant des extraits d'isoflavones sans protéines	Pas d'effet sur la teneur des lipides sanguins, mais amélioration de l'élasticité des parois artérielles.
	Crouse et al., 1999 : Adultes présentant une cholestérolémie élevée, 25 g/j de protéines de soja en association avec des isoflavones.	Diminution du cholestérol total et des LDL. Effet plus marqué avec une forte teneur en isoflavones. Pas d'effet pour le régime pauvre en isoflavones.
Modèles animaux	***Anthony et al., 1997*** : Modèle primate, ingestion de protéines (20% du régime) en association avec des isoflavones	Inhibition de la formation de lésions athérosclérotiques.
	Mezei et al., 2002 : Modèle rat obèses, traitement par un extrait d'isoflavones	Meilleure tolérance au glucose, moins de triglycérides et de cholestérol hépatique et plasmatique.

Les isoflavones pourraient réguler le métabolisme lipidique par une activation des récepteurs oestrogéniques (Ricketts *et al.*, 2005) ou des PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) (Dang *et al.*, 2003). Leur pouvoir antioxydant leur permettrait aussi d'agir directement contre l'hypertension et les phénomènes de coagulation sanguine (Matsuo, 2004 ; Park *et al.*, 2005). Il a également été montré sur des cellules endothéliales humaines que l'administration d'équol engendre une relaxation vasculaire rapide, suggérant un effet potentiel contre le risque de maladies cardiovasculaires (Joy *et al.*, 2006).

Cependant, trop peu d'études ont été réalisées à partir d'isoflavones purifiées, rendant impossible la validation de ces hypothèses, d'autant que leurs effets sont souvent confondus avec ceux des protéines. La détermination du rôle de la génistéine et de la daidzéine dans les dyslipidémies et particulièrement dans le diabète de type 2 nécessite des investigations supplémentaires, notamment concernant leur action sur les récepteurs PPARs. Le rôle de la glycitéine reste très peu étudié. Une évaluation de ses effets ainsi qu'une approche mécanistique comparable aux autres isoflavones pourraient peut-être offrir des perspectives intéressantes.

- *Mise en évidence des risques liés à la consommation d'isoflavones*

Les compléments alimentaires dérivés du soja commercialisés sur les marchés occidentaux peuvent contenir jusqu'à 100 mg d'isoflavones totales par tablette. A de telles concentrations, se pose la question de la sécurité de ces produits.

En 1946, une étude décrivait déjà une potentielle toxicité des isoflavones vis-à-vis de la fertilité (Bennetts *et al.*, 1946). Plus récemment, il a été suggéré que de faibles concentrations en flavonoïdes empêchent la propagation de lésions cellulaires au niveau du foie, alors que de fortes concentrations (50-250 µmol/L) provoqueraient des lésions au niveau de l'ADN (Wätjen *et al.*, 2005) et entraîneraient une augmentation de la pression sanguine (Hutchins *et al.*, 2005).

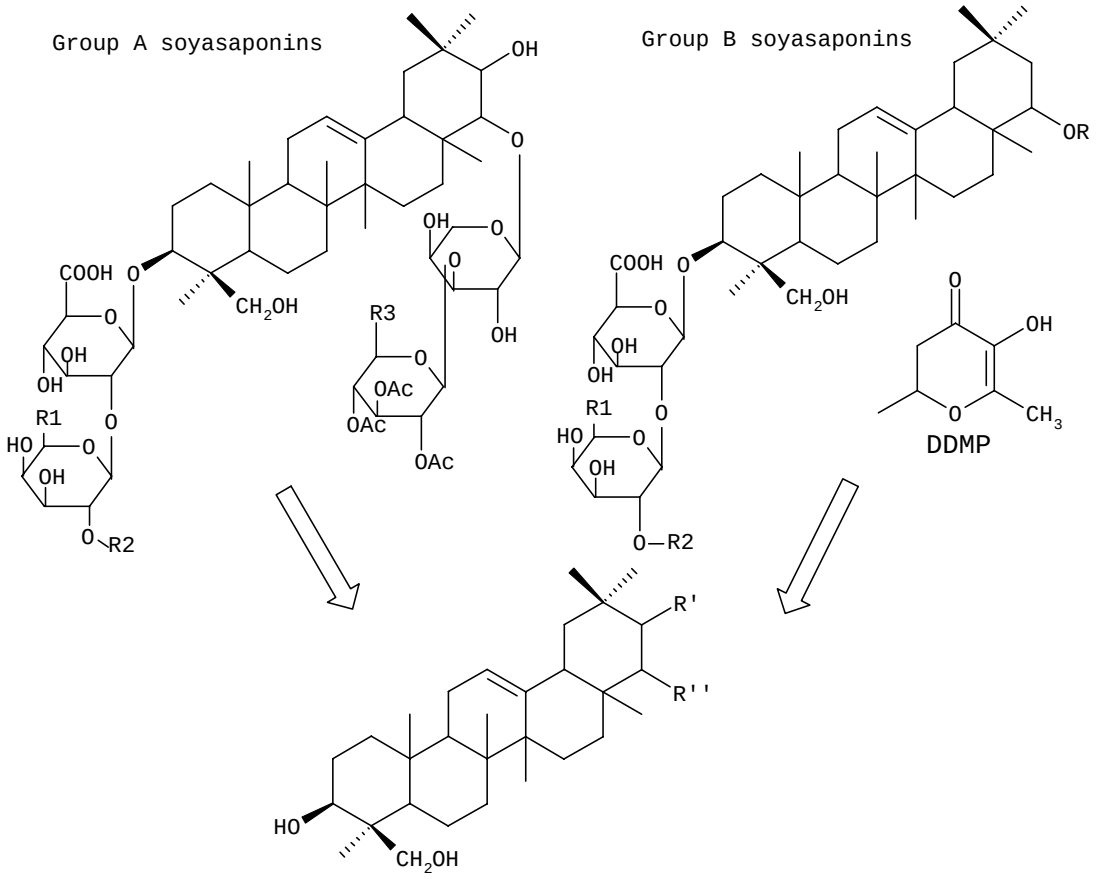
De plus, une teneur trop élevée en isoflavones dans les laits de soja substituts de lait maternel, pose le problème de leur innocuité chez les nourrissons et les jeunes enfants (Strom *et al.*, 2001 ; Rieu *et al.*, 2006). Il n'a pour l'instant été observé aucun trouble de développement chez les nourrissons exposés aux phyto-oestrogènes, mais les mécanismes redoutés impliqueraient une activité thyrotoxique (Doerge et Sheehan, 2002) ou une inhibition de la prolifération cellulaire dans l'intestin conduisant à une immaturité intestinale (Chen *et al.*, 2005). En réalité, les enfants ingérant des préparations à base de soja sont exposés à des concentrations en phyto-estrogènes ramenées à leur masse corporelle 6 à 11 fois plus élevées que les femmes ingérant des phyto-estrogènes pour prévenir les troubles de la ménopause.

Ces risques potentiels ont conduit les autorités de plusieurs pays à définir des doses maximales quotidiennes. En France, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Afssa) recommande actuellement une dose maximale quotidienne d'isoflavones dans les aliments à base de soja (lait de soja, miso, tofu, yaourts et autres desserts au soja), limitée à 1 mg/kg du poids corporel et déconseille l'utilisation de formulations infantiles concentrées à plus de 1 mg/L en isoflavones.

Toutes ces observations mettent en évidence que des études à long terme sont nécessaires avant d'émettre des recommandations officielles concernant l'ingestion de produits à base d'isoflavones de soja. Les effets néfastes étant susceptibles de se déclarer aux mêmes concentrations que les doses ingérées doivent suggérer l'emploi de ces molécules dans un contexte beaucoup mieux contrôlé où toutes les caractéristiques physiologiques ainsi que les antécédents des patients seraient pris en compte.

II.2.6. Saponines

Les saponines constituent un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules triterpéniques constituées d'une fraction aglycone hydrophobe liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile (**Figure 6**). Cette structure leur donne d'excellentes propriétés émulsifiantes.



Group A soyasaponins			
	R1	R2	R3
A1	CH_2OH	β-D-glu	CH_2OAc
A2	CH_2OH	H	CH_2OAc
A3	H	H	CH_2OAc
A4	CH_2OH	β-D-glu	H
A5	CH_2OH	H	H
A6	H	H	H

Group B soyasaponins			
R=H	R=DDMP	R1	R2
I	βg	CH_2OH	α-L-rham
II	βa	H	α-L-rham
III	γg	CH_2OH	H
IV	γa	H	H
V	αg	CH_2OH	β-D-glu

Figure 6. Structure des saponines du soja.

Chez le soja, les saponines sont divisées en trois groupes majeurs se distinguant par la nature des fractions liées au squelette aglycone. Les saponines du groupe A sont substituées par 2 chaînes glycosylées (Shiraiwa *et al.*, 1991a). Les saponines du groupe B portent seulement une chaîne glycosylée, et peuvent être conjuguées avec un groupement 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4*H*-pyran-4-one (DDMP) (Shiraiwa *et al.*, 1991b). Des conditions particulières de température ou de pH peuvent facilement libérer ce groupement DDMP. Les saponines du groupe E, beaucoup moins abondantes, sont considérées comme des artéfacts formés pendant l'extraction des saponines ou comme des composés issus de la photo oxydation des saponines du groupe B (Kudou *et al.*, 1994).

Les saponines A ont la particularité d'être exclusivement présentes dans le germe, alors que les saponines B sont présentes à la fois dans le germe et les cotylédons (Rupasinghe *et al.*, 2003). Les structures naturelles des saponines A seraient responsables d'un goût amer et astringent, probablement lié à la présence de groupements acétylés, conférant au germe ses propriétés sensorielles particulières (Okubo *et al.*, 1992). Parmi les composés du groupe B, la saponine V est uniquement détectée dans le germe, alors que la saponine trisaccharidique II est caractéristique des cotylédons. Le germe de soja peut contenir jusqu'à 6% de saponines, alors que les cotylédons présentent une teneur totale en saponines de l'ordre de 0,5 % (Tsukamoto *et al.*, 1995).

Les saponines pourraient fortement contribuer aux effets bénéfiques des produits dérivés du soja (Francis *et al.*, 2002). Des études menées sur des modèles animaux ont attribué aux saponines du groupe B des propriétés anti-virales (Nakashima *et al.*, 1989 ; Okubo *et al.*, 1994 ; Hayashi *et al.*, 1997), hypocholestérolémiantes (Potter *et al.*, 1993 ; Rodrigues *et al.*, 2005), hépatoprotectrices (Ikeda *et al.*, 1998 ; Kinjo *et al.*, 1998) et antitumorales (Gurfinkel et Rao, 2003 ; Kerwin, 2004). Etant donné leur présence exclusive dans le germe de soja et leur diversité structurale, les saponines du groupe A sont plus difficiles à isoler. C'est pourquoi leur activité biologique a été beaucoup moins étudiée. Quelques travaux leur ont pourtant associé un pouvoir hépatoprotecteur significatif (Kuzuhara *et al.*, 2000).

- *Métabolisme et biodisponibilité des saponines*

La biodisponibilité des saponines n'est pas encore élucidée et fait actuellement l'objet de résultats très controversés. Certaines études menées sur des modèles de rongeurs suggèrent que les saponines du germe de soja ne sont pas absorbées (Yoshikoshi *et al.*, 1995). Elles seraient majoritairement hydrolysées par la microflore intestinale en leur forme aglycone correspondante avant d'être excrétées dans les selles (Hu *et al.*, 2004).

Les doses quotidiennes de saponines ingérées peuvent varier de 60 à 600 mg dans l'alimentation traditionnelle des populations asiatiques (Shi *et al.*, 2004). Ces valeurs fournissent une indication des doses pouvant être considérées comme inoffensives. Par ailleurs, l'ingestion d'une

quantité trop importante de saponines pourrait provoquer des effets indésirables, tels qu'une action hémolytique endommageant les cellules sanguines, ou l'apparition de nausées causées par des interactions entre les saponines et les muqueuses de l'estomac pouvant causer une perte d'appétit ou des vomissements (Kawahima *et al.*, 1972). Le pouvoir hémolytique des saponines serait lié à leur interaction avec le cholestérol dans les membranes des cellules sanguines conduisant à la formation de complexes poreux endommageant les cellules.

- *Rôle des saponines dans la prévention des cancers et des maladies cardiovasculaires*

Plusieurs travaux ont suggéré que les saponines du soja présentent un effet protecteur vis-à-vis du cancer du colon (Oh et Sung, 2001 ; Kang et al., 2005) et en particulier les saponines du groupe B (Ellington *et al.*, 2006). Au niveau des poumons, un effet anticancérigène a été attribué à la saponine I pour sa capacité à inhiber l'activité d'enzymes particulières (sialyltransférases) impliquées dans le développement des métastases (Chang *et al.*, 2006).

Les saponines interviendraient également dans les mécanismes de piégeage des espèces oxygénées hautement réactives. Par exemple, sur un modèle *in vivo* de lésions induites par le peroxyde d'hydrogène, la saponine Ab, exclusivement détectée dans le germe de soja, a révélé un effet inhibiteur significatif, suivie des saponines du groupe B (I et βg), suggérant une relation structure-activité (Yoshikoshi *et al.*, 1996). Il a aussi été montré que les structures DDMP-conjuguées des saponines du groupe B sont plus efficaces que leurs structures aglycones correspondantes au niveau des mécanismes antioxydants (Okubo et Yoshiki, 2000).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'une consommation régulière de saponines du soja pourrait résulter en une diminution des risques d'athérosclérose, soit par une action antioxydante (Rodrigues *et al.*, 2005), soit en induisant une augmentation de l'excrétion des acides biliaires (Sidhu et Oakenfull, 1986 ; Lee *et al.*, 2005). Les saponines pourraient en effet interférer avec leur circulation entérohépatique par la formation de micelles de masse molaire élevée, bloquant ainsi leur réasorption au niveau de l'iléum (Oakenfull, 1990).

Les mécanismes d'action des saponines du soja sont encore loin d'être clairs, principalement en raison du manque de méthodes de purification permettant de les tester individuellement. Le développement actuel de nouvelles procédures analytiques devrait permettre d'élucider prochainement leurs effets et de les relier à des structures particulières.

II.2.7. Phytostérols

➢ *Structure et propriétés biologiques des stérols libres du soja*

Les phytostérols végétaux ont une structure chimique similaire à celle du cholestérol, comportant un noyau stéroïdien 3-β-hydroxylé (**Figure 7**). Les principaux stérols végétaux sont le β-sitostérol (24-α-éthylcholesterol), le campestérol (24-α-méthylcholesterol) et le stigmastérol (Δ^{22}, 24-α-éthylcholesterol) (Itoh *et al.*, 1973).

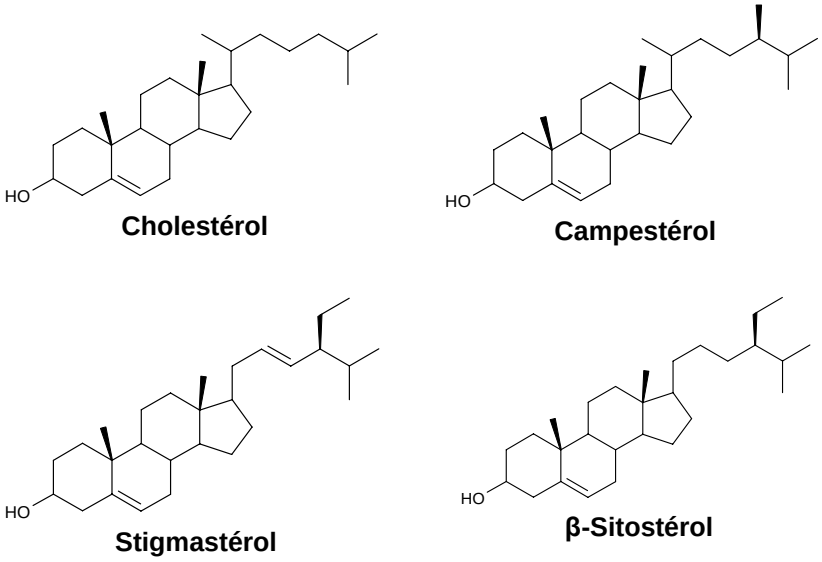


Figure 7. Structure chimique du cholestérol et des principaux phytostérols du soja.

Les phytostérols participent à la cohésion des membranes cellulaires et leur structure chimique similaire au cholestérol leur permet d'inhiber son absorption, ce qui leur confère un rôle protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (St Onge et Jones, 2003 ; Trautwein *et al.*, 2003 ; Lukaczer *et al.*, 2006). Il a également été suggéré que les phytostérols inhibent la biosynthèse du cholestérol et que le β-sitostérol en particulier interfère avec l'absorption du cholestérol micellaire (Field *et al.*, 1997).

Aux Etats-Unis, la Food and Drug Administration a reconnu officiellement en 2000 que les produits contenant des phytostérols diminuent les risques de maladies cardiovasculaires s'ils sont associés à une alimentation pauvre en graisses saturées et en cholestérol (US FDA, 2000). Les phytostérols sont également utilisés en cosmétique comme émulsifiants (Clark, 1996).

L'huile extraite des graines de soja contient de 2 à 5 % de phytostérols totaux (Vlahakis et Hazebroek, 2000) dont approximativement 50-55 % de β-sitostérol, 20-25 % de campestérol, 18-22 % de stigmastérol, 2-3 % de Δ7-stigmastérol et 1-2 % de Δ5-avenestérol (Lechner *et al.*, 1999). Il n'existe pas de données concernant la concentration et la composition des phytostérols dans le germe de soja.

- *Stérylglucosides*

Les stérols du soja existent également sous la forme de molécules conjuguées appelées « stérylglucosides ». Leur concentration dans les végétaux est rarement prise en compte, et seules quelques publications récentes ont exprimé la concentration totale des phytostérols comme la somme des stérols libres et des stérylglucosides (Breinholder *et al.*, 2002). Les stérylglucosides pourraient pourtant représenter une fraction importante des phytostérols du soja et des propriétés biologiques intéressantes pourraient leur être associées. Une étude récente menée sur plusieurs types de graines et de noix a mis en évidence que les teneurs en phytostérols sont beaucoup plus élevées que celles reportées dans les bases de données officielles si les stérylglucosides sont inclus dans la fraction totale des stérols (Phillips *et al.*, 2005).

Les stérylglucosides dérivés du soja exerceraient un effet positif sur la fluidité des liposomes des membranes cellulaires (Yan *et al.*, 2003) et pourraient améliorer l'absorption de médicaments. Il a en effet été montré que les stérylglucosides présentent une efficacité importante pour promouvoir l'absorption nasale de l'insuline chez le lapin en comparaison avec des stérols libres (Ando *et al.*, 1998), et que l'association d'un agent thérapeutique contre le cancer tel que l'acide trans-rétinoïque avec une solution de liposomes contenant des stérylglucosides présente une activité antitumorale améliorée vis-à-vis des métastases hépatiques (Shimizu *et al.*, 2003). Les stérylglucosides pourraient en effet jouer un rôle de médiateur dans la transduction des signaux émis en réponse à un stress physiologique (Kunimoto *et al.*, 2002).

II.2.8. Tocophérols (Vitamine E)

Les tocophérols et tocotriénols sont des lipides solubles appartenant à la famille de la vitamine E. Ce sont des composés phénoliques constitués d'un noyau aromatique lié à une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone. Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne latérale. Les structures naturelles isolées α, β, γ et δ diffèrent par le nombre et la position relative de groupements méthyles sur le noyau aromatique (**Figure 8**).

Le germe de soja contient de 0,2 à 0,5 % de tocophérols totaux, dont 60-66 % d' γ-tocophérol, 24-29 % de δ-tocophérol, 4-10 % d'α-tocophérol et 1-3 % de β-tocophérols (Yoshida *et al.*, 2003). Le germe contient 20 fois plus d'α-tocophérol et 4 fois plus de δ-tocophérol que la graine entière de soja (Ko *et al.*, 2003).

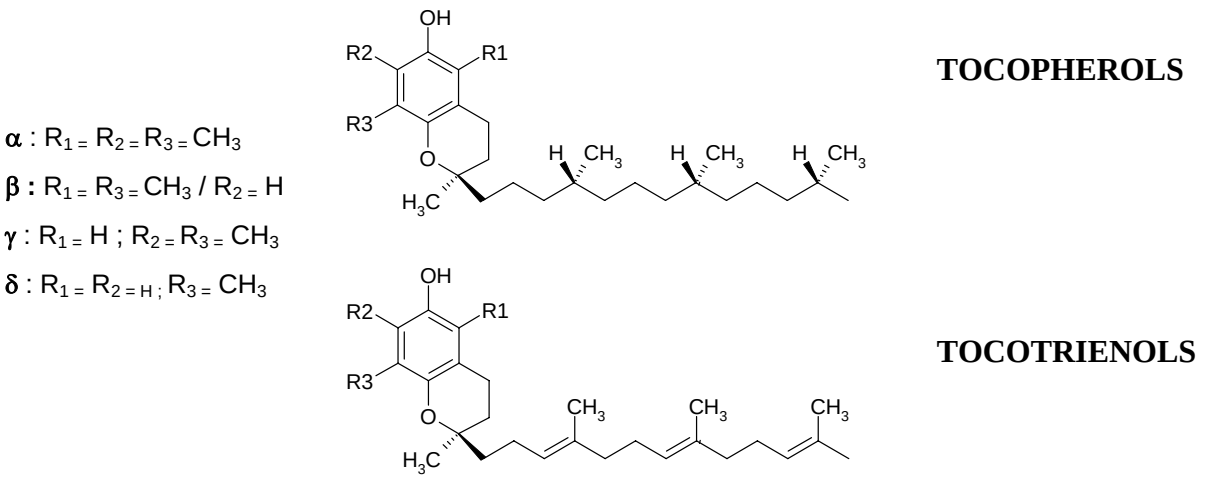


Figure 8. Structure chimique de la vitamine E.

Les tocophérols assurent la rigidité des membranes (Wang et Quinn, 2000) et s'opposent aux phénomènes oxydatifs, notamment à l'oxydation des acides gras. Leur pouvoir antioxydant dépend de leur structure chimique (Yoshida et Takagi, 1999). Les quatre isomères α-, β-, γ- et δ-tocophérols présents dans le germe de soja sont des antioxydants liposolubles puissants reconnus pour leur capacité à stabiliser par résonance l'électron célibataire des radicaux libres, formant ainsi des espèces neutres et inoffensives pour l'organisme. L'oxydation des lipoprotéines jouant un rôle dans l'athérogenèse, la vitamine E pourrait prévenir les risques de maladies cardiovasculaires (Buring et Hennekens, 1997 ; Pryor, 2000). En plus de son rôle antioxydant, la vitamine E éviterait l'agrégation excessive des plaquettes responsable des thromboses et possèderait une action protectrice sur les globules rouges (Bramley *et al.*, 2000). La prise journalière recommandée en tocophérols est de 15 mg/jour (National Research Council, 2000).

II.2.9. Sphingolipides

Les sphingolipides sont des lipides polaires complexes structuralement très diversifiés et impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques. D'origines animale ou végétale, ils sont tous issus d'une même molécule appelée sphingosine et du même processus de synthèse, liant une chaîne lipophile à un squelette hydrophile et pouvant contenir un groupement phosphaté ou glycosylé (Sullard *et al.*, 2000). Les céramides résultent d'une N-acétylation de la sphingosine par un acide gras, et les glycosphingolipides, dont les gangliosides, les sulfatides et les cérébrosides, résultent de la substitution d'une fraction céramide par un sucre (**Figure 9**).

Les glucocérébrosides sont les sphingolipides majoritaires des végétaux. On les trouve à l'état naturel dans de nombreuses sources alimentaires telles que le soja, le blé, le riz ou les épinards (Vesper *et al.*, 1999 ; Sperling *et al.*, 2004). Chaque famille de sphingolipides contient plusieurs composés selon le degré d'hydroxylation et la longueur de la chaîne hydrophobe, ce qui complique fortement l'identification et la quantification des molécules individuelles. De ce fait, peu de travaux ont reporté leurs teneurs exactes chez le soja, d'autant que l'étude des sphingolipides d'origine végétale est assez récente (Sperling et Heinz, 2003).

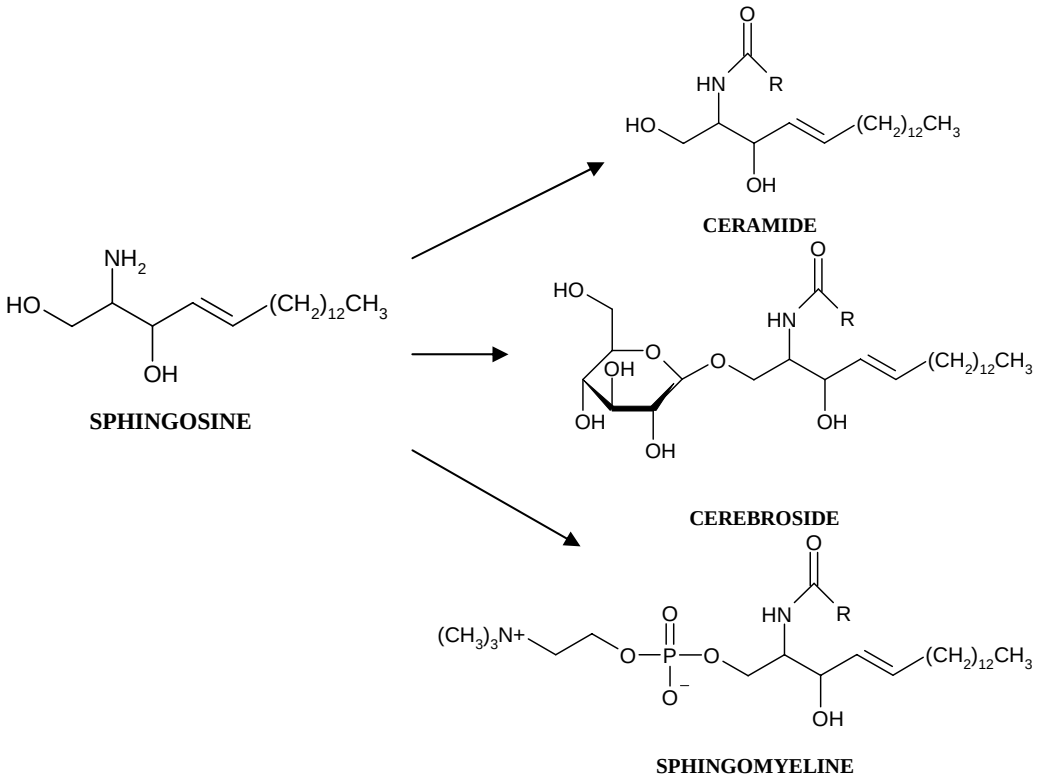


Figure 9. Structure des sphingolipides.

Les connaissances relatives aux sphingolipides et en particulier à la sphingomyéline ont beaucoup progressé ces dix dernières années. On sait aujourd'hui qu'ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques incluant la signalisation intracellulaire, offrant ainsi de possibles effets sur le métabolisme des lipoprotéines et vis-à-vis des risques coronariens (Fredman, 1998 ; Pettus *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2004).

Des propriétés intéressantes leur ont été attribuées dans la prévention du cancer du colon ou de la peau (Berra *et al.*, 2002 ; Symolon *et al.*, 2004). Les sphingolipides interagissent également avec le cholestérol au niveau de l'intestin, ce qui limite son absorption (Garmy *et al.*, 2005). Cependant, les études cliniques évaluant ces propriétés chez l'homme sont rares et la quantité effective de sphingolipides à apporter par l'alimentation reste méconnue.

Les céramides ont été plus étudiés que les cérébrosides, principalement pour leur propriétés hydratantes (Latti, 1995). Ils représentent en effet les lipides majoritaires du *stratum corneum* (30-40 %) et forment avec le cholestérol et les acides gras des lamelles extracellulaires protectrices et responsables de la perméabilité de la barrière épidermique, d'où leur utilisation courante dans l'industrie cosmétique (Di Nardo *et al.*, 1998 ; Hamanaka *et al.*, 2002).

L'étude de la biodisponibilité de la sphingomyéline, des céramides et de la sphingosine menée *in vivo* sur un modèle animal a montré que ni la sphingomyéline, ni les céramides ne sont hydrolysés ou éliminés du petit intestin. Leur assimilation au niveau du colon a été mise en évidence (Merril *et al.*, 1997).

II.2.10. Inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases ont d'abord été étudiés en raison de leurs propriétés antinutritionnelles, mais depuis plusieurs années, ces composés suscitent un grand intérêt en raison de leur potentiel anti-cancéreux, observé *in vitro* et *in vivo*.

Les plus connus sont l'inhibiteur de Bowman-Birk (BBI) et l'inhibiteur de Kunitz (KI). Le BBI est un petit peptide de 7900 Da pouvant inhiber l'activité de la trypsine et de la chymotrypsine, alors que le KI est un inhibiteur de trypsine uniquement (Birk, 1985 ; Koepke *et al.*, 2000). La région active du BBI comprend 9 résidus liés en boucle par des ponts disulfures formant une structure canonique caractéristique de nombreux inhibiteurs de protéases à sérine, ainsi nommés car ils présentent tous un résidu sérine (Ser) sur leur site actif (Qi *et al.*, 2005).

Les inhibiteurs de protéases sont localisés dans la fraction protéique des graines de soja (Friedman *et al.*, 1991). La concentration du BBI dans les graines entières de soja a été évaluée récemment à 3,56 µg/g (Park *et al.*, 2005). Des teneurs moyennes en KI et en BBI de 6,8 µg/mL et

8,2 µg/mL respectivement, ont été détectées dans des formules infantiles à base de soja (Brandon *et al.*, 2004). La concentration des inhibiteurs de protéases dans le germe de soja n'a jamais été reportée.

L'action protectrice du BBI contre les dommages causés par les radiations ou les radicaux libres a été mise en évidence sur des cultures cellulaires de différents organes ou tissus ainsi que chez le rat, offrant un potentiel préventif sur plusieurs types de cancers, dont le cancer du colon, des poumons, de la peau ou de la cavité buccale (Ware *et al.*, 1999 ; Kennedy *et al.*, 2002 ; Frank et Meyskens, 2001 ; Dittmann *et al.*, 2005). Une étude clinique a même révélé un effet protecteur du BBI contre l'hyperplasie bénigne de la prostate (Kennedy et Wan, 2002) et une diminution de l'atrophie musculaire provoquée par un étirement prolongé des muscles chez le rat (Morris *et al.*, 2005).

Cependant, son mécanisme d'action n'est pas encore clairement établi. Sa capacité à inhiber les protéases, enzymes dont l'activité augmente fortement dans les cellules tumorales et les tissus précancéreux, pourrait être directement impliquée pour ralentir la propagation de la cancérogenèse (Wan *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2005). Ses propriétés anti-inflammatoires pourraient également être impliquées, puisque différentes protéases libérées par les cellules de l'inflammation, telles que l'élastase, la chymase ou la cathepsine G, sont inhibées par le BBI, au même titre que la formation de peroxyde d'hydrogène et d'anion superoxyde dans les cellules inflammatoires (Larionova *et al.*, 1997 ; Kobayashi *et al.*, 2005).

II.2.11. Phytates

L'acide phytique est un composé qui représente la principale réserve de phosphore des graines de soja (**Figure 10**). Sous l'influence de procédés industriels alimentaires ou pendant la digestion sous l'action des enzymes intestinales, l'acide phytique peut être hydrolysé en *myo*-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- ou monophosphates (Insp5 – InsP1).

L'acide phytique est majoritairement localisé dans les cotylédons, à une concentration d'environ 16 mg/g sous forme de globoïdes cristallins immergés dans le réseau des protéines. On en détecte également 9 mg/g dans le germe et de 1 à 5 mg/g dans l'enveloppe (Hamada, 1996).

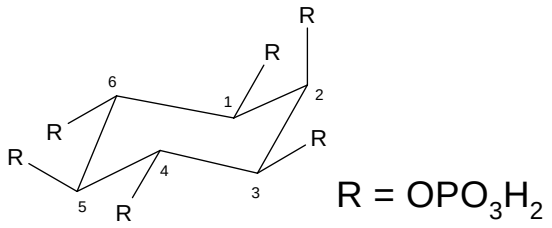


Figure 10. Structure de l'acide phytique.
Acide phytique: inositol-1,2,3,4,5,6-hexaphosphate ou *myo*-inositol hexakisphosphate (InsP6)

L'acide phytique présente des effets à la fois positifs et négatifs au pH physiologique. On lui a d'abord attribué des propriétés antinutritionnelles, puisqu'en formant des complexes avec les cations divalents tels que Fe^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} ou Zn^{2+}, il génère des structures moléculaires insolubles dans l'appareil digestif, ce qui empêche le métabolisme de ces minéraux, affecte leur solubilité ou leur fonctionnalité (Rickard et Thompson, 1997 ; Kumagai *et al.*, 1998). Pourtant, des interactions entre l'acide phytique et les protéines lui confèrent des propriétés d'inhibition enzymatique, spécialement de l'α-amylase, ce qui empêche la digestion de l'amidon et réduit la quantité de glucose dans le sang.

Il a été mis en évidence que les produits de l'hydrolyse de l'inositol hexaphosphate, en particulier le D-myo-inositol-1,4,5-triphosphate (Insp3), pourrait jouer un rôle important comme messager secondaire dans la transduction des signaux cellulaires par la mobilisation du calcium des compartiments intracellulaires (Sakamoto *et al.*, 1992). Insp3 pourrait aussi agir sur le cycle cellulaire au niveau de la prostate (Singh et Agarwal, 2005) et induire l'apoptose dans les cellules malignes (Jenab *et al.*, 2000). Ses propriétés antioxydantes lui permettraient aussi d'empêcher la péroxydation des lipides et la production d'espèces oxygénées hautement réactives au niveau du colon (Harland et Morris, 1995). Cet effet est d'autant plus significatif en association avec un apport modéré en Fer, puisqu'en se complexant avec le Fer, les dérivés de l'acide phytique piégent plus efficacement les radicaux hydroxyles. Des travaux ont aussi attribué à l'acide phytique des propriétés préventives contre les maladies cardiovasculaires (Vucenik et Shamsuddin, 1994).

Les effets bénéfiques ou antinutritionnels de l'acide phytique pourraient donc dépendre de son degré d'hydrolyse, ce qui implique plusieurs facteurs, notamment sa concentration par rapport aux autres nutriments, la présence d'enzymes, l'influence des procédés de fabrication des produits à base de soja ou l'état de santé et les habitudes nutritionnelles de chaque individu.

II.2.12. Lunasine

La lunasine est un peptide composé de 43 acides aminés qui a été identifié récemment dans le soja et dont le groupement carboxyl contient 9 résidus d'acide aspartique (Jeong *et al.*, 2003). Sa concentration dans la graine entière ainsi que dans un grand nombre de fractions protéiques commerciales de soja s'élève jusqu'à 13,3 mg/g (Park *et al.*, 2005). Sa teneur dans le germe n'a encore jamais été reportée. La lunasine serait impliquée dans les mécanismes de modification de la chromatine, procédé intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire et dans l'inhibition des tumeurs (De Meija *et al.*, 2004). Elle pourrait également empêcher la transformation des cellules mammaires causée par des composés chimiques carcinogènes ou des oncogènes viraux et ralentir la prolifération cellulaire au niveau de l'épiderme, prévenant ainsi l'apparition de cancers de la peau (Lam *et al.*, 2003 ; Hsieh *et al.*, 2004 ; De Lumen, 2005). Cependant, la biodisponibilité de la lunasine ainsi que son mode d'action ne sont pas encore élucidés.

II.3. Résultats contradictoires quant aux réels déterminants des effets des produits à base de soja

L'intérêt des professionnels de la santé, des industriels du secteur agroalimentaire et des consommateurs pour les effets potentiellement bénéfiques des produits à base de soja a entraîné un nombre considérable de publications rapportant les résultats de travaux scientifiques relatifs à ce champ de recherche. Cependant, les messages conflictuels résultant des études cliniques et épidémiologiques ont freiné la mise en place d'allégations officielles concernant les doses efficaces recommandées et la nature exacte des extraits à ingérer. Même les nutritionnistes les plus spécialisés trouvent des difficultés à synthétiser la quantité croissante d'informations fournies par la littérature scientifique et à formuler des conclusions cohérentes. Ce chapitre est consacré à l'évaluation des différents facteurs pouvant perturber l'interprétation des effets observés.

II.3.1. Nécessité d'une caractérisation biochimique systématique des fractions testées

Lors des tests d'évaluation biologique, la composition précise des extraits étudiés est souvent ignorée et leurs teneurs en substances supposées actives font fréquemment l'objet d'une estimation non rigoureuse alors qu'elles devraient être analysées systématiquement avant la mise en place d'un test biologique.

- *Une variabilité ignorée des extraits d'isoflavones*

On rencontre majoritairement deux types de produits sur le marché des compléments alimentaires enrichis en isoflavones, d'une part les produits fortement concentrés, comparables aux produits utilisés dans le traitement hormonal substitutif classique, et d'autre part les produits à faible dose sécuritaire qui apportent généralement une quantité quotidienne moyenne inférieure à 40 mg d'isoflavones (équivalents aglycones), apport comparable à celui observé dans l'alimentation traditionnelle des populations asiatiques.

Cependant, malgré la modernité des procédés industriels et des méthodes analytiques post-production, la reproductibilité des concentrations n'est pas toujours garantie d'un produit à l'autre, et les teneurs annoncées par les fabricants ne sont pas toujours respectées. Le profil des isoflavones varie déjà fortement dans la matière première en fonction de la physiologie de la plante qui les a biosynthétisées et des conditions de culture accompagnant la maturation des graines (Daydé *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2003), mais il existe une variabilité plus importante encore associée à la méthodologie employée pour l'analyse des isoflavones.

En 2002, la société Acatris, basée aux Pays Bas, a diffusé les résultats d'une étude interlaboratoire de quantification des isoflavones entre plusieurs universités, commerciaux et industriels localisés en Europe, aux USA, au Canada, au Japon et en Australie (Verbruggen *et al.*,

2002 ; Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). Les procédures analytiques utilisées pour quantifier les isoflavones étaient très variables d'un laboratoire à l'autre, et bien que la plupart aient pu obtenir des résultats reproductibles, les fluctuations interlaboratoires se sont montrées statistiquement inacceptables.

De même en 2001, une étude concernant l'analyse de 33 compléments alimentaires et extraits commerciaux à base d'isoflavones de soja a révélé des écarts considérables entre les teneurs en isoflavones analysées et celles annoncées par les fabricants (Setchell *et al.*, 2001). La moitié de ces compléments présentait plus de 10% d'écart avec la teneur massique annoncée, cet écart pouvant être supérieur à 50%.

Ces observations mettent en évidence la nécessité de trouver un consensus sur la méthode à utiliser pour doser les isoflavones dans les systèmes biologiques et alimentaires. Si la concentration et la composition des extraits d'isoflavones testés ne sont pas parfaitement élucidées, des comparaisons et conclusions cohérentes issues des études biologiques ou cliniques évaluant les effets des isoflavones sont impossibles.

Certains résultats peuvent également paraître confus selon la manière d'exprimer les concentrations des composés actifs dans un produit. Ce problème a été évoqué pour les extraits commerciaux d'isoflavones dont les teneurs sont généralement exprimées en unités massiques sans préciser si la valeur indiquée se réfère aux formes aglycones ou glucosides (Murphy *et al.*, 1997). La distinction est pourtant importante puisqu'après ingestion, la fraction glycosylée des isoflavones est libérée sous l'action des β-glucosidases de la microflore intestinale et par conséquent ne contribue pas à leur activité biologique. Idéalement, les teneurs en isoflavones devraient être exprimées en équivalent aglycones, ou directement en concentrations molaires. De même la répartition des 3 familles d'isoflavones devrait être précisée, puisque les activités biologiques des dérivés de la génistéine, de la daidzéine et de la glycitéine sont différentes.

- *Synergie issue de la combinaison des métabolites du soja*

La plupart des tests d'évaluation biologiques se focalisent généralement sur une seule famille de composés plutôt que sur la matrice dans son ensemble. Pourtant, il semble probable qu'étant donné la complexité des interactions intermoléculaires, un composé étudié individuellement ne peut pas exercer la même activité qu'un extrait naturel même concentré de manière sélective. Certains effets peuvent s'additionner ou agir en synergie, mais d'autres peuvent s'avérer antagonistes. Ainsi, la détermination de l'activité biologique d'une famille de composés présents dans un extrait de soja doit s'accompagner d'une caractérisation systématique des principales familles de molécules présentes dans l'extrait testé.

Les isoflavones sont par exemple fréquemment administrées dans une matrice à base de protéines, rendant difficile la distinction entre les effets des isoflavones et ceux des protéines. Plusieurs travaux menés sur des individus hypercholestérolémiques illustrent bien ce phénomène. Il a déjà été observé qu'un régime à base de protéines de soja réduit significativement la concentration du cholestérol total et des LDL (Texeira *et al.*, 2000), alors que l'ingestion d'un extrait de soja associant des protéines, des fibres et des isoflavones n'induit pas d'effet significatif sur le profil des lipides circulants (Hermansen *et al.*, 2005). D'autres études ont montré par ailleurs que l'ingestion de protéines associées à une forte concentration d'isoflavones résulte en une amélioration du profil lipidique (Crouse *et al.*, 1999) et que des protéines de soja combinées avec des fibres et des phospholipides sont plus efficaces qu'une préparation contenant uniquement un isolat de protéines (Hoie *et al.*, 2005).

Des résultats contrastés se rencontrent également à l'issue des études cherchant à identifier les composés du soja impliqués dans la prévention des cancers. Comme nous l'avons vu précédemment, cette propriété est généralement attribuée aux seules isoflavones (**Tableau 5**). Cependant, d'autres familles de molécules présentes dans le soja, et en particulier dans le germe, ont déjà été mises en avant pour leur potentiel préventif vis-à-vis des cancers. Le **Tableau 7** résume les principales études ayant proposé un effet préventif de composés du soja différents des isoflavones, sur les risques de développer un cancer. Ces familles de molécules actives, incluant l'inhibiteur de Bowman-Birk, les phytates, les stérols, les acides gras poly-insaturés ainsi que les saponines, pourraient contribuer ou au contraire exercer une activité totalement indépendante et confondue dans la littérature avec les effets des isoflavones.

Toutes ces observations mettent en évidence la complexité de la composition des extraits naturels dérivés du soja et renforcent l'utilité d'identifier et de quantifier le mieux possible les substances actives contenues dans un extrait soumis à une évaluation biologique. Cette caractérisation systématique apparaît nécessaire pour comprendre le rôle précis de chaque molécule, pour déterminer les interactions et mécanismes gouvernant les propriétés observées et surtout pour assurer la reproductibilité des essais biologiques ainsi que leur comparaison.

Tableau 7. Exemples d'études impliquant d'autres composés que les isoflavones dans la prévention des cancers

TRAVAUX PUBLIES	OBSERVATIONS
Goodman et al., 1997 : Population multi-éthnique d'Hawaï (n=332 cas de cancers, 511 cas contrôle) ayant consommé du **SOJA** et des **FIBRES** pendant 8 ans.	Une alimentation riche en soja et en fibres diminue significativement le risque de développer un cancer de l'endomètre
Koraktar et Rao, 1997 : Effet des **SAPONINES** du soja sur des lésions du colon (Aberrant Crypt Foci) induites par injections d'azoxyméthane.	Réduction significative de l'incidence des lésions après le traitement aux saponines
Kinjo et al., 1998 : Traitement de lésions du foie induites immunologiquement sur des cultures *in vitro* d'hépatocytes de rats par des **SAPONINES B** glycosylées.	Effet de la saponine II comparable à la saponine I, alors que les saponines III et IV sont significativement plus efficaces.
Armstrong et al., 2000 : Etude clinique : leucoplasie orale (transformation pathologique des muqueuses) traitée par un concentré d'**INHIBITEUR DE BOWMAN-BIRK** pendant un mois.	Diminution de l'aire totale des lésions (24,2%) après le traitement, suggérant une activité chémopréventive du BBI.
Jun et al., 2002: Traitement de cellules cancéreuses humaines du foie par des **SAPONINES** du soja .	Les saponines inhibent la mutagénicité des cellules de manière dose-dépendante et empêchent la formation d'adduits carcinogènes sur l'ADN.
Kennedy et Wan, 2002: Culture de cellules épithéliales humaines prostatiques saines ou cancéreuses traitées par un concentré d'**INHIBITEUR DE BOWMAN-BIRK**.	Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses par le BBI sans affecter celle des cellules normales, suggérant un effet préventif contre le cancer de la prostate.
Rowlands et al., 2002 : Evaluation des propriétés oestrogéniques et anti-prolifératives des **SAPOGENOLS A et B** sur un modèle *in vitro* de cancer du sein.	Le sapogénol B inhibe la croissance des tumeurs mais n'a pas d'effet oestrogénique. Le sapogénol A inhibe la prolifération des cellules oestrogéniques.
Fleming, 2003 : 64 femmes préménopausées ingérant quotidiennement des **PROTEINES** de soja pendant 1 an.	Diminution significative des maladies fibrocystiques au niveau des tissus mammaires.
Gurfinkel et Rao, 2003 : Traitement de cellules cancéreuses humaines du colon (HT-29) par des **SAPONINES** et **SAPOGENOLS** purifiés (c=0-50 ppm).	Les sapogénols A et B ont montré une quasi-complète suppression de la croissance des cellules. Pas d'effet des saponines glycosylées du groupe B et des saponines acétylées ou non du groupe A.
Abel et al., 2004 : Rats présentant des nodules au niveau des hépatocytes et soumis à un régime contenant des ratios variables d'**ACIDES GRAS POLYINSATURES** (omegas-6/omegas-3)	Un ratio faible n-6/n-3 dans un régime alimentaire contenant des acides gras peut moduler le développement de cancers au niveau du foie.
Campagnoli et al., 2005 : 57 femmes postménopausées souffrant de bouffées de chaleur traitées par un extrait d'ISOFLAVONES associé ou non à un complément d'**ACIDES GRAS POLYINSATURES** pendant 24 semaines	Pas d'effet de l'extrait d'isoflavones seul. Réduction très nette des bouffées de chaleur à l'issue du traitement aux acides gras polyinsaturés (en particulier les Omegas-3).
Ellington et al., 2005 : Traitement de cellules cancéreuses du colon par un extrait purifié de **SAPONINES B** (c=25–500 ppm).	Réduction significative de la viabilité des cellules cancéreuses après 24 et 48 heures d'exposition.
MacDonald et al., 2005 : Cellules cancéreuses du colon traitées par des **ISOFLAVONES** et des **SAPONINES**.	Inhibition de la prolifération des cellules Caco-2 par les 2 traitements.

II.3.2. Facteurs liés à l'origine et aux procédés de fabrication des extraits testés

Les procédés de fabrication des produits dérivés du soja conduisent à un nombre considérable de fractions intermédiaires (**Figure 11)**, utilisées sous forme de produits alimentaires traditionnels comme ceux trouvés en Asie, mais aussi sous forme d'ingrédients plus ciblés ayant des effets sur la santé ou des propriétés de textures particulièrement intéressantes. La teneur et la composition de chaque fraction en métabolites potentiellement actifs seront spécifiques de chaque procédé utilisé.

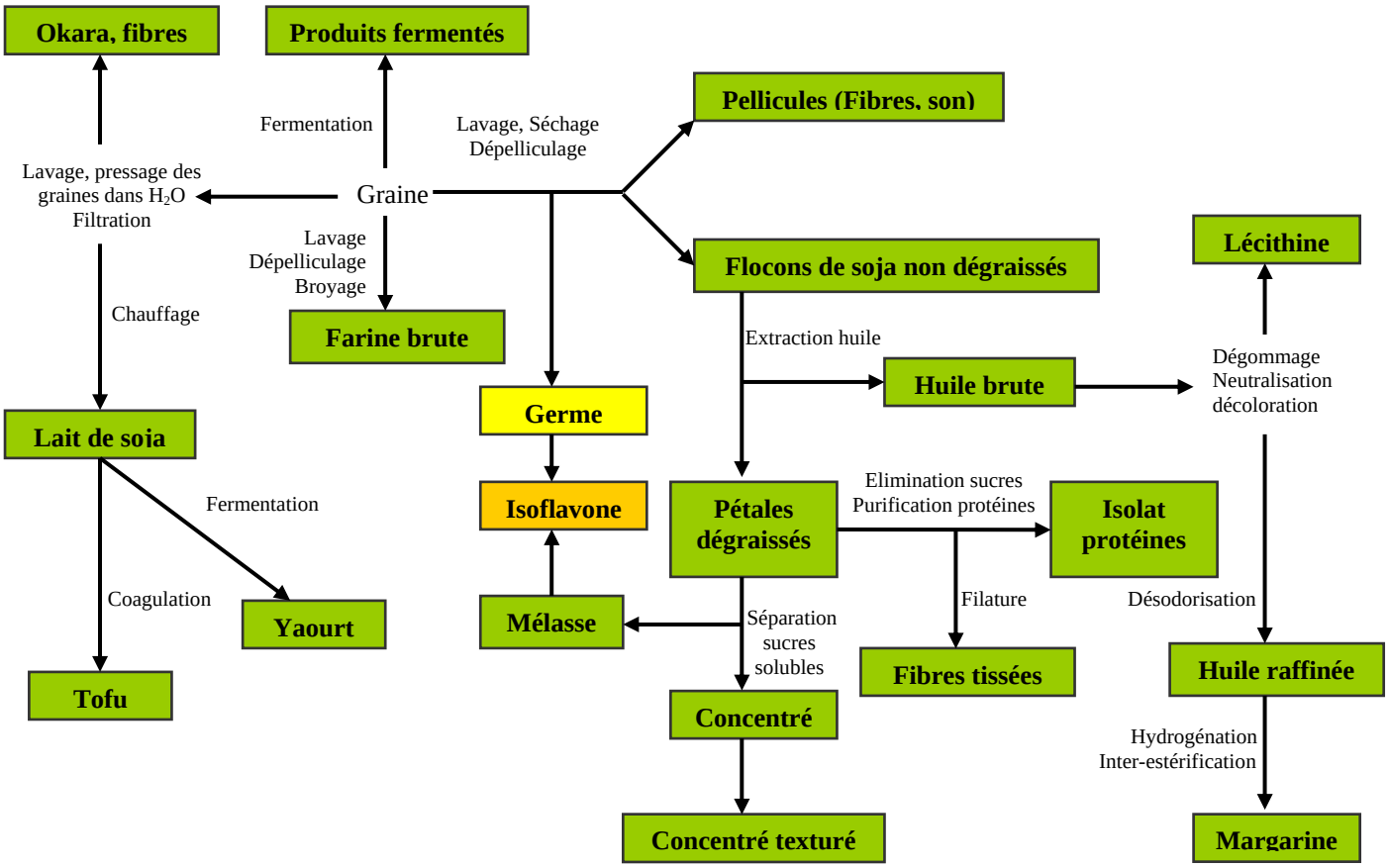


Figure 11. Procédés usuels de transformation des graines de soja

➢ *Fractions protéiques*

Les farines de soja, obtenues après lavage, élimination des pellicules et broyage des graines entières, présentent une teneur en protéines d'environ 40 %. Des étapes supplémentaires de délipidation ou d'élimination des sucres solubles conduisent à des concentrés ou à des isolats de protéines contenant respectivement 65 % et plus de 90 % de protéines. Certains traitements thermiques destinés à la desactivation d'enzymes indésirables telles que les lipoxygénases qui contribuent à l'astringence et à l'amertume du soja (Orthoefer, 1978), peuvent également altérer d'autres composés mineurs actifs sensibles aux variations de température. Les extraits de faible poids

moléculaire, obtenus après une hydrolyse enzymatique des protéines dans le but d'améliorer les propriétés crémeuses et la solubilité des extraits destinés à l'alimentation humaine, sont susceptibles de contenir des peptides d'intérêt biologique libérés pendant la protéolyse.

- *Produits fermentés*

Il existe également une large gamme de produits fermentés dérivés du soja. Les plus populaires sont le tempeh, le miso, le shoyu (sauce de soja), le natto, le tofu fermenté et le lait de soja fermenté, traditionnellement consommés en Asie depuis des millénaires. Sous l'action des microorganismes, les extraits fermentés subissent des modifications biochimiques importantes se répercutant sur la composition des métabolites actifs. Plusieurs études ont, par exemple, montré que les graines de soja fermentées par des bactéries lactiques ont un profil de phytonutriments plus intéressant que les graines natives non fermentées (De Boever *et al.*, 2001 ; Minamiyama *et al.*, 2003 ; Manzoni *et al.*, 2005). La fermentation du soja trouve également des applications en terme de digestibilité en améliorant l'assimilation des acides aminés essentiels et des glucides ou en éliminant des composés antinutritionnels indésirables tels que les sucres non digestibles ou les phytates (Chompreeda et Fields, 1984).

- *Extraits d'isoflavones*

Les extraits d'isoflavones destinés à prévenir les symptômes de la ménopause pourraient eux aussi s'avérer très variables en terme de concentration et de composition selon leur origine et leur mode de préparation. Un extrait issu de graines entières ou de cotylédons sera majoritairement composé des dérivés de la génistéine et de la daidzéine, alors qu'il ne contiendra pas de glycitéine. Par contre, les compléments alimentaires fabriqués à partir de germe de soja devraient être plus riches en dérivés de la daidzéine et de la glycitéine, mais faiblement concentrés en génistéine.

Le degré de conjugaison de chaque famille d'isoflavone sera également variable d'un produit à l'autre en fonction du choix du procédé industriel utilisé pour leur fabrication, en particulier si celui-ci implique un traitement thermique. Il a en effet été montré que les farines de soja non chauffées contiennent majoritairement des isoflavones sous leur forme malonylglucosides, alors que des farines ayant subi un traitement thermique présentent une teneur plus élevée en acétylglucosides, formées par la décarboxylation des groupements malonates en acétates (Coward et al., 1998).

De même la dégradation des structures malonylglucosides en β-glucosides en solution est fréquemment observée lors de la fabrication des extraits dérivés du soja (Jackson et al., 2002). Chaque produit présente donc un profil d'isoflavones tout à fait caractéristique de la fraction de la graine de soja utilisée comme ingrédient de départ et du choix du procédé industriel.

Il faut souligner que cette différence de matière première peut se répercuter significativement sur les concentrations plasmatiques des isoflavones après ingestion des produits. En effet, il est non seulement difficile de prédire l'efficacité des phyto-estrogènes étant donné la grande variabilité interindividuelle de la microflore intestinale, mais cette difficulté peut s'accroître d'avantage si l'on ignore les différences de biodisponibilité et d'activité biologique entre les différentes familles d'isoflavones elles-mêmes.

II.3.3. Facteurs liés au choix du modèle d'étude

Un même effet biologique peut être mis en évidence par des approches différentes qui ne mettent pas forcément en jeu les mêmes composés ni les mêmes mécanismes d'action. Ainsi, des résultats contradictoires peuvent être issus d'un manque d'uniformité des protocoles d'évaluation biologique.

Dans le cas des affections cardiovasculaires, l'effet des protéines de soja sur l'amélioration du profil lipidique sanguin peut par exemple se montrer très significatif lors d'une expérimentation animale (Tovar *et al.*, 2005), mais inexistant lors d'un essai clinique (Ma *et al.*, 2005). De même les conséquences d'un régime à base de protéines de soja sur les risques d'athérosclérose ne seront pas les mêmes chez des individus diabétiques (Stephenson *et al.*, 2005), chez des individus présentant une cholestérolémie normale (Wong *et al.*, 1998) ou chez des femmes postménopausées (Engelman *et al.*, 2005).

Ces comparaisons d'études s'avèrent d'autant plus compliquées que les extraits testés ne présentent pas forcément la même composition. On comprend alors que des fractions contenant à la fois des protéines, des isoflavones et des phytostérols dans des ratios variables ne peuvent pas exercer la même activité biologique (Lin *et al.*, 2004 ; Cicero *et al.*, 2005 ; West *et al.*, 2005).

A partir de ces observations, formuler une conclusion claire semble impossible. Il apparaît difficile de savoir si les résultats contradictoires issus de ces études proviennent du choix du modèle ou d'une caractérisation non-rigoureuse de l'extrait testé. De plus, la comparaison des études épidémiologiques menées sur des populations asiatiques s'alimentant de produits entiers traditionnels tels que le tofu ou le lait de soja avec les études *in vitro* ou *in vivo* réalisées à partir d'extraits délipidés, concentrés ou de métabolites purifiés n'est pas toujours propice à des conclusions cohérentes, d'autant plus que les études réalisées sur l'homme ignorent généralement les facteurs associés à leur consommation, tels que les habitudes alimentaires, les caractéristiques métaboliques (flore intestinale) et d'autres facteurs environnementaux ou socio-culturels.

II.4. Bilan de la revue bibliographique et présentation des travaux

L'ensemble des données bibliographiques décrites ci-dessus a mis en évidence quelques points essentiels.

- En premier lieu, la plupart des composés présents dans les graines entières de soja et ayant une activité biologique reconnue vis-à-vis de certaines maladies métaboliques, sont soupçonnés d'être significativement plus concentrés dans la fraction germe.
- Par ailleurs, cette richesse en substances potentiellement actives fait du germe une matrice fortement valorisable par les industriels puisqu'un taux d'inclusion faible devrait suffire pour conférer à l'ingrédient final une forte activité biologique en fonction de l'application ciblée.
- Enfin, les nombreuses disparités observées parmi les résultats issus des tests d'évaluation biologique menés *in vitro* ou *in vivo*, mais aussi d'études cliniques ou épidémiologiques, semblent être majoritairement liées au fait que la composition exacte des fractions testées n'est pas toujours élucidée.

Le premier objectif de notre étude sera donc consacré à la caractérisation biochimique des matrices dérivées du germe de soja. Un important travail de développement analytique a, en effet, été nécessaire afin d'identifier et de quantifier précisément l'ensemble des métabolites actifs contenus dans le germe natif et d'évaluer la variabilité de leurs concentrations dans différentes variétés ou lots de matière première. Le second objectif sera d'évaluer l'impact d'un procédé industriel d'extraction sur la teneur et la répartition des métabolites du germe de soja dans la matrice finale transformée. L'importance de l'élucidation la plus précise possible de la composition des extraits naturels testés biologiquement ou commercialisés à des fins thérapeutiques sera renforcée par l'étude de la composition en métabolites actifs de différentes gammes de compléments alimentaires enrichis en isoflavones destinés à la prévention des troubles de la ménopause. Dans le but de valoriser l'ensemble de la « matrice germe », c'est-à-dire en conservant le potentiel biologique global de tous ses composés, l'étape suivante consistera à déterminer l'influence d'un procédé de fermentation lactique sur les critères organoleptiques indésirables du germe (amertume, astringence) et également sur l'évolution de la teneur et de la composition des métabolites actifs au cours de la fermentation. Enfin, il s'agira de mettre en avant les propriétés antioxydantes du germe fermenté, apportant à ce nouvel ingrédient dérivé du germe de soja un potentiel préventif particulièrement intéressant vis-à-vis des maladies dégénératives liées à un stress radicalaire.

III. MATERIEL VEGETAL, METHODES ET DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE

Etant donné la grande diversité du germe de soja en métabolites secondaires potentiellement actifs vis-à-vis de différentes maladies, une étape cruciale de ce projet de recherche a été de déterminer avec précision la variabilité des teneurs et des profils de ces de ces différents composés dans le germe de soja depuis la matière première jusqu'aux produits transformés industriellement chez Genibio. Ce chapitre décrit le matériel végétal utilisé dans chaque partie de l'étude ainsi que les méthodes analytiques issues de la littérature qui ont été directement appliquées pour caractériser les métabolites contenus dans les différents extraits étudiés. Par ailleurs, l'accès à certaines familles de molécules structuralement complexes, dont les isoflavones, les saponines, les phytates ou les inhibiteurs de protéases, a nécessité un important travail de développement ou d'optimisation analytique afin de les identifier et de les quantifier de manière précise, répétable et reproductible et de pouvoir compléter la caractérisation des molécules potentiellement actives du germe de soja. Ce chapitre décrit également les essais de fermentation du germe de soja réalisés en laboratoire et l'optimisation des différents paramètres du procédé avant sa transposition à l'échelle industrielle. Enfin, les différentes méthodes de mesure d'activité antioxydante réalisées sur le germe de soja natif ou fermenté, sont présentées.

III.1. Matériel étudié

III.1.1. Variétés de soja et lots industriels de germe

Le travail de développement analytique et la caractérisation biochimique des macronutriments et des composés mineurs du germe de soja ont nécessité différents matériels végétaux. Les graines entières de 43 variétés de soja ont été fournies par la société Euralis (Mondoville, 31, France). Les germes et les cotylédons de chaque variété ont été séparés manuellement afin d'étudier comparativement leur teneur et leur composition en métabolites secondaires.

Dans notre contexte industriel, la variabilité des métabolites du germe en termes de teneur et de composition a ensuite été déterminée dans plusieurs lots de matière première issus des récoltes de 2004 et 2005. Les lots industriels de germe de soja ont été fournis par la société Genibio qui s'approvisionne auprès de Nutrition et Soja (Revel, 31, France) en lots labellisés ou non Agriculture Biologique et certifiées non-OGM. Ces lots sont toujours issus de mélanges de variétés car le nombre de variétés semées par les fournisseurs de Nutrition et Soja est exhaustif (59 variétés possibles).

Pour les germes qui ne sont pas issus de l'agriculture biologique, les variétés principales sont Safrana, Isidor, Nikko, Shama, Yushu et Zen. Après réception des lots, les germes de soja sont stabilisés par un traitement thermique et broyés en poudre fine de granulométrie inférieure à 500 µm. Les lots ainsi préparés ont été utilisés lors de la caractérisation analytique du germe de soja natif, lors des essais de fermentation réalisés au laboratoire et lors du développement de l'ingrédient fermenté à l'échelle industrielle.

III.1.2. Compléments alimentaires enrichis en isoflavones

La variabilité des métabolites détectés dans les graines de soja et en particulier dans le germe a également été déterminée dans plusieurs compléments alimentaires enrichis en isoflavones de soja commercialisés en France et aux Etats-Unis et destinés à la prévention des troubles de la ménopause. A titre indicatif, les produits testés sont : Biopause, Bioptimum, Caltrate, Easy Soy, Elugyn 50, Innéov, Natrol, Nature's Made 50, Nature's Woman, Soja+ Cal, Soja+ Mag, Sojyam, Solaray Genistein, Solaray Phytoestrogen, Soy Care, Soy Isoflavones Schiff, Soy Isoflavones GPH, Yméa, Estroven, Evestrel, Féminabiane, Healthy Woman et Phytosoya. La composition des 5 derniers compléments alimentaires a été déterminée dans 2 lots différents.

III.2. Méthodes

III.2.1. Quantification des protéines totales

- *Principe*

La teneur totale des protéines contenues dans les différentes matrices dérivées du germe de soja est déterminée selon la méthode de DUMAS (Buckee, 1994). Cette méthode s'appuie sur la quantification de l'azote total par un analyseur élémentaire, impliquant une combustion totale et instantanée de l'échantillon par l'oxygène, suivie d'une réduction des oxydes nitriques, du piégeage des composés soufrés et de l'excès d'oxygène par le cuivre.

- *Mode opératoire*

Les réactifs et matériels nécessaires à l'analyse des protéines totales des matrices à base de germe de soja sont décrits dans le **Tableau 8**. Un échantillon de poudre de germe de soja de granulométrie inférieure à 500 µm (20 mg) est pesé dans une coupelle en étain puis introduit dans le puits du passeur avant de lancer la combustion. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium. Le tube d'oxydation rempli d'oxyde de chrome, d'oxyde de cobalt et de laine de quartz, est chauffé à 900 °C. Le tube de réduction contenant du cuivre et de la laine de quartz, est chauffé à 750 °C. La détection de l'azote est

réalisée à l'aide d'un catharomètre conservé dans une chambre thermique à 60 °C. La méthionine est utilisée comme standard. Le coefficient permettant de convertir la teneur en azote total par rapport à la méthionine en protéines totales est de 6,25 pour les matrices dérivées du soja.

Tableau 8. Réactifs et matériels nécessaires à l'analyse des protéines.

Réactifs	Matériels
Méthionine (Sigma)	Analyseur élémentaire NA 2000 (Fisons Instruments) Capsules en étain (Courtage Analyse Scientifique CAS) Bouteille d'azote 200 Bars (Air Liquide) Bouteille d'oxygène 200 Bars (Air Liquide) Laine de quartz (CAS) Quartz (CAS) Cuivre (CAS) Matériel courant de laboratoire

III.2.2. Extraction de la fraction lipidique

- *Principe*

L'extraction de l'huile contenue dans les graines et le germe de soja est réalisée par la méthode de Soxhlet. Cette technique assure une extraction à chaud des matières grasses contenues dans un échantillon végétal solide placé dans une cartouche de cellulose et imbibé continuellement par les vapeurs d'un solvant choisi en fonction de la polarité des principes actifs lipidiques à extraire.

- *Mode opératoire*

Les réactifs et matériels nécessaires à l'extraction d'huile par la méthode de Soxhlet sont décrits dans le **Tableau 9**. Environ 10 g de poudre de germe de soja de granulométrie inférieure à 500 µm sont pesés dans le tube en cellulose fermé par du coton cardé, et introduit dans un soxhlet. L'extraction est réalisée par un mélange *n*-hexane / chloroforme (70 : 30 v/v) porté à reflux pendant 4 heures. Les solvants sont ensuite éliminés à l'évaporateur rotatif à 45 °C. L'huile ainsi extraite est conservée congelée à -20 °C.

Tableau 9. Réactifs et matériels nécessaires pour extraire l'huile des graines de soja.

Réactifs	Matériels
Chloroforme (SDS) *n*-hexane (SDS)	Soxhlet Rampe d'extraction munie de chauffe-ballons Tubes en cellulose, Coton cardé Evaporateur rotatif Matériel courant de laboratoire

III.2.3. Analyse des acides gras

➢ *Principe*

La méthode d'analyse des acides gras repose sur une réaction de saponification de la fraction lipidique du germe de soja (ou des autres matrices dérivées du soja) permettant de les libérer des esters de glycérol. Les acides gras sont ensuite substitués par un groupement méthyle ($-CH_3$), ce qui les rend plus volatils. Les acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0), oléique (C18:1), linoléique (C18:2) et linolénique (C18:3), présents dans l'huile de soja, sont alors analysés par chromatographie en phase gazeuse, identifiés grâce aux temps de rétention des molécules standards et quantifiés par une calibration interne.

➢ *Mode opératoire*

Les réactifs et matériels nécessaires à l'analyse des acides gras sont décrits dans le **Tableau 10**. Un aliquote d'huile (50 mg) est pesé dans un tube à col rodé et dilué dans une solution de soude méthanolique (5 mL, 0,5 M). Une solution d'acide arachidique (c = 1 mg/mL, V = 1 mL), utilisé comme étalon interne, est ajoutée au milieu réactionnel. Après agitation pendant 30 secondes au vortexer, le tube est surmonté d'une baguette réfrigérante puis placé au bain marie à 65°C pendant 30 minutes. La méthylation des acides gras est ensuite réalisée par l'ajout de 2,5 mL d'une solution de trifluorure de bore à 12 % dans le méthanol. Le mélange est agité pendant 15 secondes et porté à 65 °C pendant exactement 3 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau froide, 5 mL d'eau distillée et 10 mL de *n*-hexane sont ajoutés. Une brève agitation permet de faire migrer les acides gras vers la phase organique. Après décantation, la phase organique est récupérée et analysée par chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Un volume d'échantillon fixé à 1 µL est directement injecté dans une colonne capillaire. L'azote utilisé comme gaz vecteur est réglé à une pression de 200 kPa. Le mélange azote/oxygène et l'hydrogène sont respectivement réglés à une pression de 100 kPa et 60 kPa. La température initiale du four de 185 °C augmente de 5 °C/min jusqu'à 200 °C, puis est maintenue pendant 20 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 200 °C. Le standard interne utilisé est l'acide arachidique (C20:0).

Tableau 10. Réactifs et matériels pour l'analyse des acides gras.

Réactifs	Matériels
Hydroxyde de sodium (SDS) Méthanol (SDS) *n*-hexane (SDS) Trifluorure de Bore 12% dans MeOH (SDS) Molécules standards : acides palmitique, stéarique, linoléique, oléique, linolénique (Sigma)	Système CPG: GC 8000 series (Fisons Instruments) Colonne capillaire 30 m × 0.25 mm i.d × 0.25 µm (J&W Scientific, Cluzeau) Gaz : Azote, mélange azote/oxygène, hydrogène (Air liquide) Matériel courant de laboratoire

III.2.4. Analyse des isoflavones

➢ *Préparation des extraits*

Les réactifs et matériels nécessaires à l'analyse des isoflavones sont décrits dans le **Tableau 11.** Un échantillon de poudre de germe de soja (0,1 g) de granulométrie inférieure à 500 µm, est extrait par une solution de méthanol à 80 % (10 mL) pendant 2 heures à température ambiante. Après centrifugation (10 min, 9000g), le surnageant est filtré et analysé par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet (HPLC/UV) dont la longueur d'onde est fixée à 260 nm.

Tableau 11. Réactifs et matériels nécessaires à l'analyse des isoflavones.

Réactifs	Matériels
Méthanol (SDS) Acétonitrile (SDS) Acide trifluoroacétique (SDS) Diméthylsulfoxyde DMSO (SDS) Molécules standards : daidzéine, daidzine, glycitéine, glycitine, génistéine, génistine (Chromadex)	Système HPLC-UV: pompes P4000, autosampler AS3000, détecteur UV2000 (Spectra Physics Analytical) Colonne RP-C_{18}-AB Satisfaction : 250 × 4,6 mm i.d, 5 µm (Cluzeau) Centrifugeuse Matériel courant de laboratoire

➢ *Séparation chromatographique*

Les 12 structures d'isoflavones sont séparées sur une colonne de silice greffée en phase inverse (250 × 4,6 mm i.d, 5 µm) maintenue à 30°C. La reproductibilité du volume injecté fixé à 10 µL est assurée par une boucle d'injection. Les isoflavones sont éluées par un mélange eau-acide trifluoroacétique 0,5 % (solvant A) et acétonitrile (solvant B). Le renouvellement régulier des phases mobiles évite des variations de pH pouvant provoquer une fluctuation des temps de rétention.

La séparation complète des 12 isoflavones est réalisée sous un gradient de 54 minutes: Le solvant A est maintenu à 100% pendant 2 min, puis diminué à 85% en 2 min, à 75,5% en 30 min, à 60% en 7 min, à 50% en 5 min puis à 0% en 2 min. L'éluant revient à ses conditions initiales en 2 min et le solvant A reste maintenu à 100% pendant 4 min afin de réinitialiser la colonne. La dégradation spontanée des structures malonyles en β-glucosides dans les extraits liquides étant perceptible en quelques heures à température ambiante, le nombre d'échantillons analysés dans une même série doit être inférieur à 10. L'identification des pics obtenus par une intégration numérique s'effectue en référence aux molécules purifiées des isoflavones.

➢ *Calibration*

La quantification des isoflavones est basée sur une calibration externe. Cependant, les formes malonyles et acétyles étant très instables en solution, seules les 6 isoflavones aglycones (daidzéine, glycitéine et génistéine) et β-glucosides (daidzine, glycitine et génistine) sont utilisées comme standards externes. Environ 3 mg de standards, peu solubles dans le méthanol, sont individuellement

solubilisés dans 0,5 mL de DMSO. Le volume des solutions mères est ajusté à 10 mL avec du méthanol. Chaque solution mère est ensuite diluée en une gamme de dilution croissante (8, 25, 50, 80, 110 et 150 $\mu g.mL^{-1}$). Les solutions mères sont dupliquées pour chaque standard, et 2 solutions mères contenant un mélange de 3 standards sont préparées. A chaque solution mère correspondent 2 gammes de dilutions.

Les coefficients de réponse des formes malonyles et acétyles sont ensuite extrapolés à partir de l'absorption des formes les plus stables. Les groupements malonyle et acétyle ne possèdent pas de fonction chromophore sensible à l'absorption des rayons UV. Par conséquent les propriétés d'absorption des isoflavones malonylglucosides et acétylglucosides dans des régions de faible longueur d'onde sont similaires à celles des formes β-glucosides. On a donc émis l'hypothèse qu'à λ=260 nm, l'absorption des isoflavones malonylglucosides et acétylglucosides par rapport aux formes β-glucosides dépend uniquement de leur poids moléculaire (MW). Les coefficients de réponse (K) des formes malonyles et acétyles des 3 familles d'isoflavones (dérivés de la daidzéine, de la génistéine et de la glycitéine) sont donc déterminés par le calcul suivant : $K_{acétyle}=MW_{glucoside}\times K_{glucoside}/MW_{acétyle}$ et $K_{malonyle}=MW_{glucoside}\times K_{glucoside}/MW_{malonyle}$. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement au laboratoire d'Agrophysiologie de l'ESAP et confirmée par d'autres équipes scientifiques (Zang *et al.*, 2001).

- *Carte de contrôle*

La stabilité des analyses en fonction du temps est suivie à l'aide d'une carte de contrôle. Deux poudres de références, l'une de graines entières (variété Imari) et l'autre de germe de soja (mélange de variétés, lot industriel Genibio) sont conservées lyophilisées dans un endroit sec. Les valeurs de références sont établies après une série de 20 analyses préliminaires permettant d'établir les valeurs cibles des teneurs moyennes m_0 et écarts-type σ_0 de chaque isoflavone et de leur temps de rétention. A chaque série d'analyse et selon la matrice étudiée, un échantillon de contrôle est préparé dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les limites de contrôle sont placées à $m_0 \pm 3\sigma_0$ de la moyenne cible. L'évolution des mesures sur l'échantillon de référence est suivie graphiquement, les points en dehors des limites de contrôle invalidant la série réalisée et entraînant une vérification de l'ensemble du protocole et du matériel. L'utilisation d'une carte de contrôle permet de détecter les dérives lentes ou périodiques des concentrations ainsi que le vieillissement de la colonne.

III.2.5. Analyse des phytostérols

➢ *Principe*

L'analyse des phytostérols est réalisée après avoir isolé la fraction insaponifiable contenue dans l'huile du germe de soja (ou des autres matrices dérivées du soja). L'extraction de l'insaponifiable consiste en une réaction de saponification de l'huile suivie d'une chromatographie en phase liquide sur une colonne d'alumine. La fraction ainsi récupérée contenant les phytostérols est ensuite soumise à une réaction de silylation, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse. Le β-sitostérol, le campestérol, le stigmastérol, le Δ^7-stigmastérol et le Δ^5-avenestérol sont identifiés grâce aux temps de rétention des molécules standards et quantifiés par une calibration interne.

➢ *Mode opératoire*

Les réactifs et matériels nécessaires à la quantification des phytostérols du soja sont décrits dans le **Tableau 12**. Un aliquote d'huile (100 mg) est dilué dans une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 5 % (10 mL). Une solution de bétuline, utilisée comme étalon interne (c = 1 mg/mL, V = 1 mL), est ajoutée au mélange. La solution est soumise à une réaction de saponification à 65 °C pendant 15 minutes, puis refroidie par l'ajout de 5 mL d'eau distillée. La fraction insaponifiable est ensuite extraite sur une colonne remplie par 10 g d'oxyde d'aluminium en éluant 5 mL d'éthanol puis 30 mL d'éther. Les solvants sont éliminés à l'évaporateur rotatif à 45 °C.

Le résidu est ensuite solubilisé dans 100 µL de réactif silylant. La silylation est réalisée pendant 15 minutes à 105 °C. Les phytostérols sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Un volume d'échantillon fixé à 1 µL est directement injecté dans la colonne capillaire. L'azote utilisé comme gaz vecteur est réglé à une pression de 130 kPa. Le mélange azote/oxygène et l'hydrogène sont respectivement réglés à une pression de 100 kPa et 60 kPa. La température initiale du four, fixée à 240 °C augmente de 4 °C/min jusqu'à 320 °C. Cette température est maintenue pendant 10 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 320 °C. Le standard interne utilisé est la bétuline.

Tableau 12. Réactifs et matériels pour l'analyse des phytostérols.

Réactifs	Matériels
Hydroxyde de potassium (SDS) Ethanol (SDS) Ether (SDS) Bétuline (Sigma) Réactif silylant : 5 µL 1-méthylimidazole + 100 µL N-méthyl-N-triméthylsilyl-heptafluoroacétamide (Sigma) Oxyde d'aluminium (MP Biochemicals) Molécules standards : β-sitostérol, campestérol, stigmastérol, Δ^7-stigmastérol et Δ^5, avenestérol (Sigma)	Système CPG: GC 8000 series (Fisons Instruments) Colonne capillaire Zebron 30 m × 0,25 mm i.d × 0,25 µm (Phenomenex). Gaz : azote, mélange azote/oxygène, hydrogène (Air liquide) Matériel courant de laboratoire

III.2.6. Analyse des tocophérols

➢ *Principe*

Les tocophérols présents dans les matrices dérivées du soja (α-, β-, δ-, et γ-tocophérols) sont directement analysés par Chromatographie Liquide Haute Performance et détectés par fluorimétrie, après dissolution d'un aliquote d'huile dans le *n*-hexane. Les tocophérols étant très sensibles aux phénomènes d'oxydation, une préparation simple et rapide des échantillons permet ainsi d'éviter leur dégradation. Leur identification et leur quantification sont basées sur une calibration externe.

➢ *Mode opératoire*

Les réactifs et matériels nécessaires à l'analyse des tocophérols sont décrits dans le **Tableau 13**. La procédure analytique est décrite dans la norme internationale ISO9936 publiée 1997 s'appliquant aux matrices végétales. Un aliquote d'huile (50 mg) est pesé dans une fiole jaugée ambrée de 5 mL et dilué dans du *n*-hexane. La séparation chromatographique de l'α-, β-, δ-, et γ-tocophérols est réalisée par chromatographie liquide haute performance sur une colonne de silice en phase normale couplée à un détecteur fluorimétrique dont la longueur d'onde d'excitation est fixée à 290 nm et la longueur d'onde d'émission fixée à 330 nm. La phase mobile constituée d'un mélange *n*-hexane / isopropanol (99,5 / 0,5) est maintenue en régime isocratique à un débit de 1 mL/min pendant 25 minutes. Le volume d'injection est fixé à 20 µL. Les tocophérols sont identifiés en comparant les temps de rétention des molécules standards et quantifiés par une calibration externe.

Tableau 13. Réactifs et matériels pour l'analyse des tocophérols.

Réactifs	Matériels
n-hexane (SDS) Isopropanol (SDS) Molécules standards : α-tocophérol, β-tocophérol, δ-tocophérol, γ-tocophérol (Sigma)	Système HPLC-UV: pompes P4000, autosampler AS3000 (Spectra Physics Analytical) Détecteur fluorimétrique (multi λ, Waters 2475) Colonne de silice phase normale 250 × 4,0 mm i.d, 5 µm (Cluzeau) Matériel courant de laboratoire

III.2.7. Quantification des inhibiteurs de protéase

➢ *Principe*

Le facteur de Bowman-Birk (BBI) est déterminé dans les échantillons de germe de soja par l'intermédiaire de son activité anti-trypsique et anti-chymotrypsique. La méthode de quantification implique donc un dosage indirect de l'inhibition enzymatique provoquée par un extrait de germe de soja en comparaison avec l'inhibiteur de Bowman-Birk purifié. La capacité du germe de soja à inhiber la trypsine et la chymotrypsine sera ainsi exprimée par une concentration massique en équivalent BBI. Bien que la précision de ce dosage indirect soit probablement limitée par rapport à d'autres méthodes directes, il s'est avéré suffisamment répétable dans le cas des matrices végétales dérivées du soja et présente l'avantage d'utiliser du matériel peu coûteux.

➢ *Extraction du facteur de Bowman-Birk*

Les réactifs et matériels nécessaires à l'extraction du facteur de Bowman-Birk sont décrits dans le **Tableau 14**. Environ 150 mg de poudre de germe de soja (fermenté ou non-fermenté) sont dilués dans 5 mL d'eau acidifiée (HCl, pH = 4 - 4,5). Les solutions sont agitées au bain à ultrasons pendant 2h30 à 30°C. Les surnageants sont récupérés après centrifugation et filtration (0,45µm), puis utilisés directement pour l'évaluation de leur activité antitrypsique et antichymotrypsique.

Tableau 14. Réactifs et matériels pour la détermination du facteur de Boman-Birk.

Réactifs	Matériels
Acide chlorhydrique (Fluka) Eau déminéralisée (Sigma) BAEE (Nα-Benzoyl-L-arginine ethyl ester, Sigma) BTEE (N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, Sigma) Facteur de bowman-birk purifié (BBI) (Sigma) Tampon phosphate de sodium (67 mM, pH 7,6) tampon Tris-HCl (80 mM, pH 7,8) Chlorure de calcium (Fluka) Trypsine (Sigma) Chymotrypsine (Sigma)	Spectromètre UV (Thermo, Heλios β) Bain à ultrasons (Fisher Scientific) Matériel courant de laboratoire

➢ *Inhibition de la trypsine*

Une solution de BAEE (3,0 mL, 0,25 mM) préparée dans le tampon phosphate, est pipetée dans une cuve en quartz. 3 mL d'une solution de BBI ou d'extrait de soja dans le tampon phosphate sont mélangés avec 2 mL d'une solution de trypsine à 200 U/mL. Le mélange est équilibré à 25 °C pendant 10 min, et 0,25 mL sont ajoutés aux 3 mL de BAEE. L'évolution de l'absorbance est mesurée sur une durée de 4 min à $\lambda = 253$ nm. Cette expérience est réalisée avec des quantités variables d'inhibiteur de trypsine, afin d'établir une relation entre l'activité d'inhibition de la trypsine et la concentration en BBI ou extrait de soja. A partir des courbes de cinétique obtenues, la quantité de chaque inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% de la trypsine est déterminée. La capacité du germe de soja à inhiber la trypsine sera ainsi exprimée par une concentration massique en équivalent BBI.

➢ *Inhibition de la chymotrypsine*

Une solution tampon Tris-HCl (1,42 mL, 80 mM, pH 7,8) et une solution de chymotrypsine (0,1 mL) diluée à environ 3 U/mL sont mélangées dans une cuve en quartz, puis 50 µL d'une solution de BBI ou d'extrait de soja sont ajoutés. Le mélange est équilibré à 25 °C pendant 10 min, et 0,08 mL de {$CaCl_2$, $2H_2O$} (2 M) et 1,4 mL de BTEE (1,18 mM) sont ajoutés. L'évolution de l'absorbance est mesurée sur une durée de 4 min à $\lambda = 253$ nm. Cette expérience est réalisée avec des quantités variables d'inhibiteur de chymotrypsine, afin d'établir une relation entre l'activité d'inhibition de la chymotrypsine et la concentration en BBI ou extrait de soja. Les cinétiques obtenues permettent de calculer le pourcentage d'inhibition de la chymotrypsine en fonction de la quantité de BBI. La concentration nécessaire pour inhiber 50% de la chymotrypsine sera déterminée. La capacité du germe de soja à inhiber la chymotrypsine sera ainsi exprimée par une concentration massique en équivalent BBI.

III.2.8. Quantification des phytates

➢ *Principe*

La méthode utilisée est basée sur les travaux de Brooks *et al.* (2001) avec quelques modifications. Elle permet de déterminer d'une part la concentration du phosphore libre et d'autre part la concentration de phosphore total dans des matrices végétales. La quantité de phosphore est ainsi déterminée avant et après une étape d'hydrolyse acide permettant de dégrader tous les groupements phosphatés en phosphore libre. La quantification du phosphore est réalisée par spectrométrie à 660 nm après une réaction avec un mélange {molybdate / acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique}.

➢ *Mode opératoire*

Les réactifs et matériels nécessaires pour quantifier les phytates sont décrits dans le **Tableau 15**. Cette méthode s'applique à des échantillons préalablement dégraissés (se référer au paragraphe III.3), afin de ne pas confondre le phosphore provenant de l'acide phytique et celui provenant éventuellement de la fraction lipidique incluant les phospholipides.

Une solution mère d'acide phytique est préparée en diluant 0,25 g d'acide phytique standard dans 25 mL d'eau déminéralisée. Un aliquote de cette solution mère (0,5 mL) ou de poudre de germe de soja (50 mg) sont pesés dans un tube à hémolyse. 0,5 mL d'une solution d'acide sulfurique concentré sont ajoutés, suivis de 100 µL d'une solution à 35 % de peroxyde d'hydrogène. Le mélange est porté à 100 °C au bain-marie pendant 15 minutes. Quand l'hydrolyse est terminée, le milieu réactionnel est incolore. Après refroidissement, le mélange est transféré dans une fiole jaugée de 10 mL et dilué jusqu'au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée.

Tableau 15. Réactifs et matériels pour l'analyse des phytates.

Réactifs	Matériels
Acide 1-amino-2-naftol-4-sulfonique (Fluka) Molybdate d'ammonium tétrahydrate (Sigma) Sodium sulfite (Fluka) Sodium bisulfite solution 40% (SDS) Dihydrogénophosphate de potassium (Fluka) Acide phytique standard (Fluka) Acide sulfurique concentré (Fluka) Peroxyde d'hydrogène 35% (Sigma) Eau déminéralisée	Spectromètre UV (Thermo, Heλios β) Matériel courant de laboratoire

Pour analyser le phosphore libre contenu dans les échantillons de germe de soja, 100 mg de poudre de germe de soja sont dilués dans 50 mL d'eau déminéralisée. Après agitation pendant 30 minutes à température ambiante, le surnageant est filtré (0,2 µm). Un aliquote de l'échantillon à analyser (200 µL) est prélevé et mélangé avec 840 µL d'eau déminéralisée, 200 µL de réactif sulfonique et 200 µL du réactif molybdique. Pour préparer le réactif sulfonique, 0,16 g d'acide 1-amino-2-naftol-4-sulfonique, 1,92 g de sulfite de sodium et 9,6 g de bisulfite de sodium sont solubilisés dans une fiole jaugée de 200 mL avec de l'eau déminéralisée. Pour préparer le réactif molybdique, 12,5 g de molybdate d'ammonium et 50 mL d'acide sulfurique concentré sont solubilisés dans une

fiole jaugée de 500 mL avec de l'eau déminéralisée. L'absorbance du milieu réactionnel est lue après 15 minutes à λ = 660 nm. La calibration du phosphore est établie après préparation d'une solution mère de dihydrogéno-phosphate de potassium (c = 0,191 g/L, soit 43,48 mg/L de phosphore). Chaque échantillon dilué avec de l'eau à partir de cette solution mère est soumis à la réaction décrite ci-dessus. La courbe de calibration représente l'absorbance de la gamme de dilution à 660 nm en fonction de la concentration en phosphore.

La quantité de phosphore libre est finalement soustraite à la quantité de phosphore total déterminée après l'hydrolyse acide. On émet l'hypothèse que le phosphore libéré correspond au phosphore issu de l'acide phytique. Pour calculer le pourcentage massique de l'acide phytique à partir de la teneur en phosphore, la valeur de la concentration du phosphore libéré est multipliée par un facteur 3,5514. Ce facteur est dérivé du ratio des poids moléculaires du phosphore (MW = 30,97 g/mol) et de l'acide phytique (MW = 660 g/mol) et du nombre d'atomes de phosphore présents dans l'acide phytique (n = 6).

III.2.9. Evaluation de l'activité antioxydante d'extraits de germe de soja

- *Extraction de la fraction polaire des matrices dérivées du germe de soja*

Les réactifs et matériels nécessaires à l'extraction de la fraction polaire des matrices fermentées ou non fermentées du germe de soja sont décrits dans le **Tableau 16**. Un échantillon de granulométrie inférieure à 500 µm (50 mg) est dilué dans un mélange MeOH-H_2O (2/1 v:v, 500 µL) préalablement désoxygéné à l'azote. La solution est vortexée 1 minute, puis placée au bain à ultrasons pendant 30 minutes. Après centrifugation (5 min, 10000 rpm) à 4°C, le surnageant est filtré (0,45 µm) et collecté dans un tube à hémolyse référencé. Après trois répétitions de cette étape d'extraction, les surnageants sont rassemblés et séchés au speedvac à température ambiante pendant 6 à 8 heures.

Tableau 16. Réactifs et matériels pour extraire la fraction polaire du germe de soja.

Réactifs	Matériel
Méthanol (SDS) Eau déminéralisée ultrapure	Centrifugeuse (Heraeus Sepatech) Speedvac (Avantec) Vortex (Genie 2) Matériel courant de laboratoire

➢ *Capacité de piégeage du radical DPPH*

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•) est un radical organique stable présentant une absorption caractéristique à λ=523 nm dans un mélange MeOH/H_2O (2/1 v/v). Les antioxydants donneurs de proton, tels que les polyphénols, sont capables de réduire ce radical (DPPH•→ $DPPH_2$) (**Figure 12**), ce qui entraîne une diminution de son absorbance.

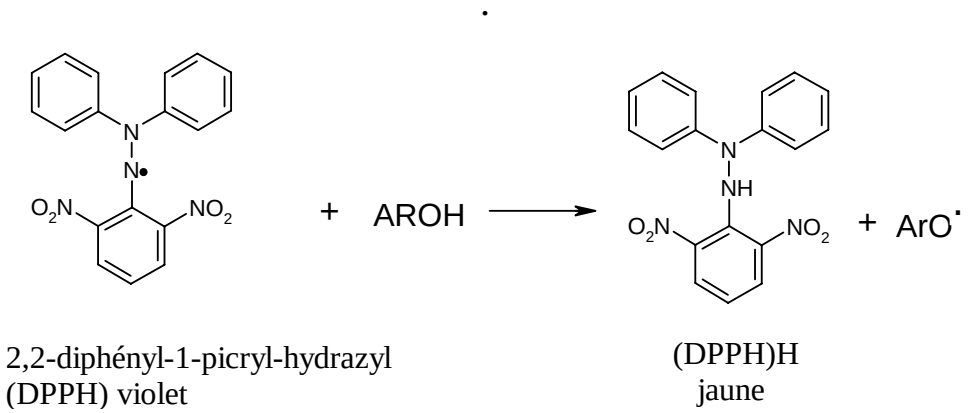


Figure 12. Réaction d'une structure polyphénolique avec le radical DPPH

La capacité antioxydante de molécules ou d'extraits est ainsi déterminée en évaluant le pourcentage d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH à 523 nm :

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (A_{test}/A_{contrôle})]\times 100$$

$A_{contrôle}$: Absorbance sans antioxydant

A_{test} : Absorbance avec antioxydant

Les réactifs et matériels nécessaires pour déterminer la capacité des extraits de germe de soja à piéger le radical DPPH sont décrits dans le **Tableau 17**. Les extraits secs sont solubilisés dans 5 mL d'une solution de MeOH-H_2O (2/1 v:v) préalablement désoxygénée à l'azote. Une solution de DPPH à 400 µM (MW=394,3 g/mol) est préparée en solubilisant 7,89 mg de DPPH dans 50 mL de EtOH. La solution est conservée à l'abri de la lumière. Dans des tubes à hémolyse en verre, une gamme de dilution est réalisée pour chaque extrait (dilutions 1/20, 1/10, 1/8, 1/5, ¼, ½). Les mélanges réactionnels (1 mL d'extrait + 1 mL de solution DPPH) sont placés à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Le λmax d'absorption est vérifié sur l'échantillon de contrôle. L'absorbance est mesurée à 523 nm. La référence est une solution d'éthanol. Un échantillon de vérification est préparé pour s'assurer que l'extrait n'absorbe pas à 523 nm.

Tableau 17. Réactifs et matériels pour l'essai DPPH•.

Réactifs	Matériel
Méthanol (SDS) Eau déminéralisée ultrapure Ethanol (SDS) 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•) (Sigma)	Vortex (Genie 2) Matériel courant de laboratoire Spectrophotomètre (UVIKON 931)

➢ *Activité réductrice sur le ferricyanure de potassium*

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice des extraits polaires de germe de soja fermenté est déterminée selon la méthode de Oyaizu (1986), basée sur la réaction chimique de réduction du Fer(III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fer(II). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

Les réactifs et matériels nécessaires à la détermination du pouvoir réducteur des extraits de soja sont décrits dans le **Tableau 18**. Les extraits polaires secs sont solubilisés dans 5 mL d'eau distillée, puis 0,5 mL de cette solution (ou H_2O pour l'échantillon de contrôle) sont mélangés avec 0,5 mL d'une solution à 1 % de ferricyanure de potassium et 0,5 mL d'un tampon phosphate (0,02 M, pH 7). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement, 0,5 mL d'une solution d'acide trichloroacétique 0,1% sont ajoutés. La solution est centrifugée pendant 5 min à 780g. Le surnageant (1,5 mL) est mélangé à 0,2 mL de chlorure de fer (0,1% dans H_2O). L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'activité réductrice de la L-cystéine est utilisée comme standard.

Tableau 18. Réactifs et matériels pour la détermination du pouvoir réducteur des extraits de soja.

Réactifs	Matériel
Eau déminéralisée Ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (Prolabo) Sodium-dihydrogénophosphate (Sigma) Di-sodium-hydrogénophosphate (Sigma) Acide trichloroacétique (Fluka) Chlorure de fer (Fluka) L-cystéine (Sigma)	Vortex (Genie 2) Centrifugeuse (Heraeus Sepatech) Spectrophotomètre (UVIKON 931) Matériel courant de laboratoire

➢ *Capacité de piégeage du radical anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$*

Le pouvoir antioxydant d'un extrait peut également être évalué par sa capacité à piéger des espèces oxygénées réactives telles que l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$. La méthode décrite par Robak et Gryglewski en 1988 est utilisée pour déterminer la capacité des extraits polaires de germe de soja fermentés et non fermentés à piéger le radical anion superoxyde en milieu tamponné phosphaté. Cette méthode est basée sur la réaction chimique de réduction du bleu de tétrazolium, dépendant directement de la présence de radicaux superoxydes. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 560 nm. Une diminution de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir antioxydant des extraits testés. Le pouvoir antioxydant de molécules ou d'extraits est ainsi déterminé en évaluant le pourcentage d'inhibition de l'absorbance du radical $O_2^{\bullet-}$ à 560 nm :

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (A_{test}/A_{contrôle})]\times 100$$

$A_{contrôle}$: Absorbance sans antioxydant

A_{test} : Absorbance avec antioxydant

Les réactifs et matériels nécessaires à la détermination de la capacité des extraits polaires de soja à piéger le radical anion superoxyde sont décrits dans le **Tableau 19**. Les extraits polaires secs sont solubilisés dans 5 mL d'eau distillée. Tous les réactifs sont préparés dans un tampon phosphate 100 mM (pH 7,4). Un échantillon de 50 µL (ou H_2O pour le contrôle) est mélangé avec 50 µL d'une solution de nitroblue tetrazolium (300 µM), 50 µL d'une solution de β-Nicotinamide Adénine Dinucléotide (β-NADH, 936 µM) et 50 µL d'une solution de méthosulfate de phénazine (120 µM). Les mélanges sont incubés à température ambiante pendant 5 min. L'absorbance est mesurée à 560 nm.

Tableau 19. Réactifs et matériels pour l'essai $O_2^{\bullet -}$.

Réactifs	Matériel
Eau déminéralisée Sodium-dihydrogénophosphate (Sigma) Di-sodium-hydrogénophosphate (Sigma) Nitroblue tetrazolium (Sigma) β-Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Sigma) Méthosulfate de phénazine (Sigma)	Vortex (Genie 2) Spectrophotomètre (UVIKON 931) Matériel courant de laboratoire

III.3. Essais de fermentation

III.3.1. Présentation des souches

Les souches utilisées pour les essais de fermentation du germe de soja sont des bactéries lactiques fournies par Chr. Hansen (Horsholm, Denmark) (**Tableau 20**). Pour des raisons de confidentialité, la composition précise des mélanges de souches n'est pas décrite. Avant utilisation, les souches sont stabilisées et congelées à -80 °C.

Tableau 20. Souches utilisées pour les essais de fermentation.

Souches	Noms des espèces
A	*Lactobacillus Helveticus*
B	*Streptococcus thermophilus*
C	*Lactococcus Lactis + Lactococcus Cremoris*
D	*Lactococcus Lactis + Lactococcus diacethylactis + Leuconostoc*

III.3.2. Influence du type de souche sur l'acidification du milieu

Les réactifs et matériels nécessaires pour préparer les milieux de fermentation sont décrits dans le **Tableau 21**. L'objectif est de sélectionner des souches permettant une acidification rapide du milieu de fermentation. Pour cela, une poudre de germe de soja (lot industriel Genibio soja-4-093, granulométrie 500 µm) est diluée à 15 % (p/v) dans 150 mL d'eau déminéralisée. Le mélange est pasteurisé à 65 °C pendant 30 minutes. Une solution est préparée pour un essai avec chacune des

souches ainsi qu'avec un mélange des 2 souches LHBO2 et STM6. Les lactobacilles sont en général anaérobie/aérobie facultatifs : ils peuvent croître en conditions d'anaérobiose et d'aérobiose. Les essais de fermentation réalisés au laboratoire seront conduits en conditions d'aérobiose. Le bouillon MRS, préalablement autoclavé à 121 °C pendant 15 minutes et maintenu en surfusion (45 °C) jusqu'à son utilisation, sert de témoin pour vérifier la bonne croissance des souches dans les conditions choisies de fermentation.

Le bouillon MRS et les solutions de germe de soja pasteurisé (150 mL) sont ensemencés avec chaque ferment (taux d'inoculation 1 %). Les cultures, réalisées dans des erlenmeyers de 500 mL, sont incubées à 37 °C sous faible agitation (60 rpm). Le pH de chaque culture est contrôlé à t = 0, 3, 6, 9, 24, 28, 32, 48 heures d'incubation. Après 48 heures d'incubation, les cultures réalisées sur le germe de soja sont pasteurisées à 65 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement, les échantillons sont lyophilisés et conservés à -20 °C.

Tableau 21. Réactifs et matériels pour préparer les milieux de fermentation.

Réactifs	Matériel
Bouillon MRS reconstitué à 55 g/L (AES, AEB140652) Eau déminéralisée	Table agitante (IKA Labortechnik) Matériel courant de laboratoire

III.3.3. Influence du taux d'inoculation sur l'acidification du milieu

Le second paramètre à déterminer est le taux d'inoculation optimal permettant une acidification rapide du milieu. Pour cela, une solution (2 L) de germe de soja (lot soja-4-104, granulométrie 500 µm) dilué à 15 % (p/v) dans de l'eau déminéralisée est pasteurisée à 65 °C pendant 30 minutes. Cette solution est répartie dans 8 Erlens de 500 mL en aliquotes de 150 mL. Les souches LHBO2 et STM6 sont inoculées à différentes concentrations (**Tableau 22**). Un suivi de l'acidification de chaque milieu est réalisé en mesurant régulièrement le pH pendant 28 h.

Tableau 22. Taux d'inoculation testés pour optimiser la fermentation.

Souches	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6	Essai 7	Essai 8
A (µL)	30	100	100	60	30	100	0	150
B (mg)	6	100	20	12	30	0	100	150

III.4. Développement analytique : Quantification des saponines du soja

III.4.1. Problèmes soulevés

Les saponines forment un groupe très diversifié de molécules amphiphiles particulièrement concentrées dans le germe de soja. Il est décrit dans la littérature que les graines de soja intactes contiennent deux groupes majeurs de saponines A et B, chacun contenant des structures acétylées, glycosylées et de nombreux isomères dont certains sont probablement des artéfacts libérés au cours des procédés de transformation du soja (Decroos *et al.*, 2005).

Les saponines du groupe A, exclusivement présentes dans le germe, existent au moins sous 8 structures différentes en fonction de leur degré d'acétylation et de glycosilation (**Figure 6**). Les saponines du groupe B, substituées ou non par un groupement 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP) se distinguent au minimum selon 10 structures différentes, à la fois dans les cotylédons et dans le germe. De plus, les liaisons covalentes entre les squelettes aglycones et les groupements acétylés ou DDMP sont faibles et sensibles au pH et à la température, ce qui rend difficile l'accès aux structures natives des saponines.

Pour ces raisons, il est difficile d'isoler ou de synthétiser des molécules purifiées de référence destinées aux tests biologiques ou aux calibrations analytiques. Cette grande diversité structurale et le manque de molécules de référence compliquent fortement leur identification et quantification. Il existe par conséquent peu d'informations précises concernant leur teneur et leur composition dans les différents compartiments de la graine de soja ainsi que dans les produits transformés.

La quantification précise de ces deux familles de composés s'est révélée cruciale pour mener à bien la caractérisation complète du germe de soja. C'est pourquoi deux procédures analytiques ont été développées au Laboratoire d'Agrophysiologie de Purpan afin de quantifier les saponines dans le germe et différentes matrices à base de soja, basées toutes les deux sur une méthode HPLC couplée à un détecteur UV et utilisables en analyses de routine. Grâce à ces deux méthodes, les teneurs en saponines des deux groupes A et B ont pu être déterminées dans plusieurs variétés de soja ainsi que dans des compléments alimentaires commerciaux et comparées avec les teneurs en isoflavones.

III.4.2. Méthode de quantification des saponines du groupe B

Tout d'abord, une première méthode basée sur une séparation analytique HPLC couplée à un détecteur UV à 205 nm a été développée pour quantifier les saponines appartenant au groupe B et les comparer avec les isoflavones dans différentes matrices à base de soja. La quantification des saponines conjuguées à un groupement 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP), basée sur une calibration externe, a été confirmée par une méthode calculatoire impliquant le ratio des masses moléculaires des formes conjuguées et non conjuguées après une étape d'hydrolyse alcaline libérant les fractions DDMP. L'hypothèse selon laquelle la saponine I pouvait être utilisée comme molécule standard de référence a été validée, ce qui a considérablement simplifié les analyses, tout en conservant la précision des résultats. Sa limite de détection a été évaluée à 0,065 µmol/g. Des teneurs totales en saponines du groupe B variant de 13,20 à 42,40 µmol/g dans le germe et de 2,76 à 6,43 µmol/g dans les cotylédons ont été observées dans 7 variétés de soja. Des coefficients de variation inférieurs à 7,9 % et 9,0 % ont été obtenus respectivement lors d'une étude de variabilité intra- et inter-jours. Les teneurs en saponines du groupe B dans différents compléments alimentaires dérivés du soja ont été comparées à celles des isoflavones afin d'évaluer la variabilité de ces 2 familles de composés bioactifs dans différentes matrices de soja.

Cette étude a fait l'objet d'une première publication :

Jane Hubert, Monique Berger, Jean Daydé (**2005**). "Use of a Simplified HPLC-UV Analysis for Soyasaponin B Determination: Study of Saponin and Isoflavone Variability in Soybean Cultivars and in Soy-Based Health Food Products". *J Agric Food Chem*, 53, 3923-30.

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 3923−3930 3923

Use of a Simplified HPLC–UV Analysis for Soyasaponin B Determination: Study of Saponin and Isoflavone Variability in Soybean Cultivars and Soy-Based Health Food Products

JANE HUBERT,[†] MONIQUE BERGER,*[,‡] AND JEAN DAYDÉ[‡]

Genibio Recherche, route de Toulouse 09190 Lorp Sentaraille, France, and UMR INRA/ESAP 1054 - Laboratoire d'agrophysiologie, Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, 31076 Toulouse Cedex 03, France

Soyasaponins are phytochemicals of major interest for health. Their identification and quantification remain difficult owing to the large number of structural isomers in soybeans and the lack of stable standards. In this study, a rapid method using high performance liquid chromatography (HPLC) using a UV detector (205 nm) was developed to identify and quantify soyasaponins belonging to group B and compare them with isoflavones in different soy materials. 2,3-Dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP)-conjugated soyasaponins were determined using external calibration or a molecular mass ratio after alkaline hydrolysis to cleave their DDMP moieties. The detection limit of soyasaponin I, used as a reference molecule to simplify the analysis, was 0.065 μmol/g. Soyasaponin contents in seven soybean varieties ranged from 13.20 to 42.40 μmol/g in the germ and from 2.76 to 6.43 μmol/g in the cotyledons. The within-day and between-days variation coefficients did not exceed 7.9 and 9.0%, respectively, for the major soyasaponins. Soyasaponin B quantification in different soy-based health supplements was reported along with measurements of their isoflavone content to provide information on the variability of these bioactive compounds among different types of soy food materials.

KEYWORDS: Soybean; soyasaponin; HPLC/UV

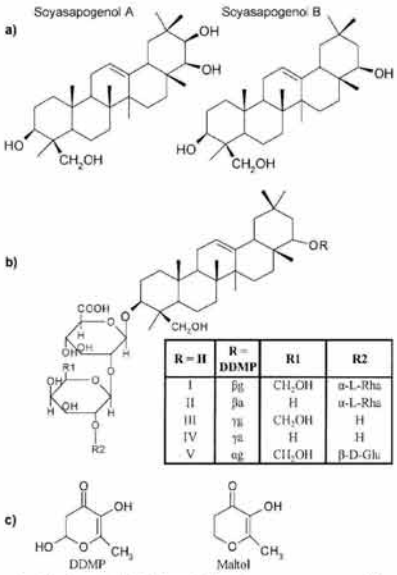
INTRODUCTION

Soybeans and soy-based food products are believed to have health-promoting properties. This was formally highlighted by the FDA Health Claim linking soy protein consumption with the prevention of cardiovascular disease (*1*). Thus, dietary supplements and soy foods have gained a considerable place on the market in recent years, with numerous claims linking their health-promoting effects to their isoflavone contents. Ongoing research has shown that isoflavones might be effective in reducing the risk of coronary heart diseases and several cancers (*2*−*5*). However, recent studies showed that these effects could be synergically working or mediated by other compounds in soy food products (*6*−*12*). Indeed, soy fractions also contain complex mixtures of potentially bioactive phytochemicals, such as lignans (*7*) or soyasaponins (*13*), which are less well-studied than isoflavones.

Soyasaponins may also present health protective effects including hypochosterolemic (*5*), anticarcinogenic (*14*, *15*), hepatoprotective (*16*), and antiviral activities (*17*). They are triterpenoid glycosides naturally occurring in native soybean seeds. According to their structure, soyasaponins are classified in two major groups, A and B (**Figure 1**). Soyasaponins A are supposed to be responsible for the undesirable bitter and astringent taste in soy food products (*18*). Group B saponins are monodesmosidic, having just one glycosylation site, and might be responsible for the health-contributing activities of soyasaponins (*13*, *19*). Kudou et al. (*20*) reported that the genuine soyasaponins (i.e., αg, βg, βa, γg, and γa) are the conjugations of 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP) and predominate their corresponding non-DDMP structures (i.e., V, I, II, III, and IV, respectively), formed as artifacts during heat treatment (**Figure 1**). Dietary supplements of soybean and soy food vary widely in active compounds owing to variations in raw materials themselves used for their processing. They are likely obtained from different sources such as whole seed, soy meal, or dehulling byproducts containing up to 99% of germs (*9*, *21*−*23*). Depending on the variety, growing location, cultivation year, and degree of maturity, soybean seeds contain about 0.2% dry weight isoflavones (*24*, *25*) and from 0.6% to as much as 6.2% dry weight saponins (*19*, *21*, *26*). Moreover, the seed parts present a large variability in their content and composition: Among soyasaponins B, soyasaponins V and αg together are found exclusively in the germ, while soyasaponins II and βa are mainly located in the cotyledons (*19*, *21*). Soyasaponin I and its DDMP corresponding form βg

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +0033-5-61152967. Fax: +0033-5-61153060. E-mail: m.berger@esa-purpan.fr.
[†] Genibio Recherche.
[‡] UMR INRA/ESAP 1054.

10.1021/jf047828f CCC: $30.25 © 2005 American Chemical Society
Published on Web 04/16/2005



R = II	R = DDMP	R1	R2
I	βg	CH_2OH	α-L-Rha
II	βa	H	α-L-Rha
III	γa	CH_2OH	H
IV	γa	H	H
V	αg	CH_2OH	β-D-Glu

Figure 1. Structures of (a) hydrophobic aglycone precursors of A and B soyasaponins; (b) DDMP- and non-DDMP soyasaponins B; and (c) structure of the DDMP group and of its corresponding maltol hydrolyzed form.

are detected in both parts. The ratio of soyasaponins B in the axis/cotyledon was found to be 9:1 (*27*).

Many analytical methods have been proposed for identification and quantification of soyasaponins. The major difficulties in their determination by high performance liquid chromatography (HPLC) are the lack of an efficient detection method appropriate for routine analysis and the laborious preparation of pure analytical standards owing to a large number of similar saponin glycosides. The early methods of quantification use UV detection (*18*, *20*, *28*). The maximum absorption wavelength of non-DDMP soyasaponins, which do not contain a prominent ultraviolet chromophore, is around 205 nm, and DDMP soyasaponins have their absorption maxima at 292 nm. An analytical method using UV detection of all the known group B soyasaponins at 205 nm was developed by Hu et al. (*29*). This analytical method requires the preparation of non-DDMP and DDMP soyasaponin purified standards. Other procedures use mass spectrometric detection to identify all DDMP and non-DDMP soyasaponins (*30*). The structural diversity was overcome by partial alkaline degradation followed by LC/ ESI-MS (*31*) or by complete acid hydrolysis to their principal aglycone forms, soyasapogenol A and B, followed by HPLC coupled with an evaporative light scattering detector instead of a UV detector (*27*, *32*). These analytical procedures often require an expensive apparatus, not appropriate for daily routine analysis. Thus, the first goal of this study was to develop and validate an economical, rapid, and accurate analytical method using HPLC/ UV to determine the composition of all soyasaponins belonging to group B, including the DDMP-conjugated (αg, βg, βa, γg, and γa) and their non-DDMP corresponding forms (V, I, II, III, and IV, respectively), with the same apparatus and the same type of analytical procedure as for isoflavone analysis. Since external calibration for all soyasaponins is expensive or impossible to obtain without isolation of preparative materials, the alternative of using the more common and stable soyasaponin I as a unique external standard was also investigated. This method was used to evaluate the composition and the variability of soyasaponin B in different parts of soybean seeds from seven varieties and to determine the content of isoflavones and saponins in different commercial dietary supplements, including soy isoflavone concentrates or soy extracts enriched in isoflavones, available in European and North American markets, mainly destinated for the use by menopausal women. We evaluated 15 different product capsules or tablets.

MATERIALS AND METHODS

Soybean Samples, Processed Soy Food Products, and Chemicals. Seven soybean varieties (Imari, Conrad, Savoy, Sponsor, Queen, Jack, and Loda) were obtained from field-grown experiments carried out in 2001 (Toulouse, France) and in 2002 (Champaign Urbana, USA). Germs were collected by hand from lyophilized seeds and ground with a mortar and pestle. Whole seed samples were finely ground (particle size < 200 μm) with a mill (IKA, Labortechnik, Germany). Dietary supplements were purchased locally. Duplicate samples of a combined mixture of 10 tablets or capsules of each supplement were ground and analyzed. A sample (2 kg) of soybean germs issued from an industrial load (unknown cultivar) was provided by Genibio (Saint Girons, France) and used as control sample. All samples were stored at −20 °C. HPLC-grade solvents and other chemical reagents with proper purity were used (SDS, Peypin, France). Purified standard soyasaponins I, II, and III were provided by Chromadex (Santa Ana, CA).

Identification and Quantification of Non-DDMP Soyasaponins I, II, and III by HPLC/UV Analysis. Each individual standard of soyasaponins I, II, and III (1.5 mg) was accurately weighted, dissolved in 0.5 mL of DMSO (SDS, Peypin, France), and adjusted to 10 mL with pure methanol. After a 20 min homogenization, each of the three stock solutions was submitted to serial dilutions (4, 10, 25, 50, 75, and 100 μg/mL) in pure methanol. The final concentrations were calculated with high accuracy by weighting the solutions (methanol density: 0.7915; DMSO: 1.1).

The calibration curves of individual soyasaponins I, II, and III were also established by serial dilution of the stock solutions in plant matrix. Finely ground soy germ (0.2 g) and whole seeds powders (0.5 g) were dissolved in 80% aqueous methanol (5 mL) and extracted for 2 h at room temperature. The residue was removed by centrifuging the extract at 12000*g* for 10 min and decanting the clear supernatant. The extracts were filtered through 0.45 μm filters (Acrodisc, Pall, NY) and separated into six aliquots (250 μL) in which 0, 50, 100, 150, 200, and 250 μL of the stock solution of purified standards were added, respectively. The solutions were made up to 500 μL with 80% aqueous methanol if needed.

The standard curves were established by plotting the peak area obtained from HPLC at 205 nm as a function of soyasaponin concentration expressed in micromoles per milliliter. The response factors were calculated by linear regression. The purity of each standard, specified by Chromadex on the certificate of analysis, was taken into account. Identities of soyasaponins were confirmed by HPLC retention times. The preparation of each serial dilution was replicated twice for each individual standard of soyasaponins I, II, and III. The filtered extracts and the standard preparations were analyzed by HPLC with a P4000 pump controller, AS3000 autosampler, and UV2000 detector (Spectra Physics Analytical Inc., Fremont, California, US). The analytical column, 250 × 4.6 mm i.d, 5 μm, Satisfaction RP-C_{18}-AB (Cluzeau, Sainte Foy La Grande, France) was kept at 30 °C in a thermal chamber. The mobile phases were 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient elution was carried out as described by Hu et al. (*29*): solvent B increased from 37 to 40% in 12 min, then increased to 48% in 25 min, and finally increased to 100% in 1 min and remained at 100% for 2 min. The gradient program recycled back to the initial state of 37% solvent B in 5 min. The injection volume was 50 μL, and the flow rate was 1 mL/

min. UV absorbance was monitored at 205 nm. Chromatograms were recorded and integrated with the SpectraSystem PC1000 software.

Determination of DDMP-Conjugated Soyasaponins. As shown by Gu et al. (*31*), when the DDMP-conjugated soyasaponins are degraded into their non-DDMP corresponding forms under basic conditions, the total molar content of soyasaponins remains constant. Thus, the response factor of the DDMP-conjugated soyasaponins was determined using the equivalence between the molar content of soyasaponins extracted under mild conditions or under alkaline conditions. The alkaline degradation procedure was conducted as described by Gu et al. (*31*) with minor modifications. Briefly, soy germs (0.2 g) were extracted with 80% aqueous methanol (5 mL) for 2 h at room temperature. The residue was removed by centrifugation and decantation of the clear supernatant. Each extract was filtered and divided in two aliquots. The first was directly analyzed by HPLC as described above, whereas, prior to analysis, the second was submitted to mild alkaline degradation as follows: 2 mL was mixed with 20 μL of KOH (5% v:v) for 15 min at room temperature. Acetic acid (50 μL) was added to neutralize and maintain the solutions between pH 4 and pH 6. Both DDMP and non-DDMP were detected at 205 nm.

Evaluation of the Precision. Two control samples were chosen for their very different saponin contents and composition: isolated soy germs (Genibio, St Girons, France) and whole seeds (i.e., Imari; Monsanto Deklab seeds, France) lyophilized and stored at 4 °C. These two control samples were used for each new run to confirm that the HPLC system was operating correctly and to provide the expected concentrations of the two known samples. Ten replications of the extraction procedure followed by HPLC analysis were carried out on each matrix within 24 h to evaluate the within-day variation. The procedure was replicated three times over a month to determine the between-days variation. The means, standard deviations, and coefficients of variation of within-day and between-days assays were calculated for each soyasaponin.

Isoflavone Analysis. The extracts were analyzed with the same column and apparatus used for soyasaponin B determination. UV absorbance was monitored at 260 nm. The mobile phases were 0.05% trifluoroacetic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient elution was carried out as reported by Murphy et al. (*25*) with minor modifications: solvent B increased from 0 to 15% in 2 min, then to 18% in 4 min, to 24.5% in 26 min, to 40% over 7 min, then to 50% in 1 min, and finally increased to 100% in 6 min. The gradient program recycled back to the initial state of 100% solvent A in 2 min. The column temperature was 30 °C. The injection volume was 10 μL, and the flow rate was 1.5 mL/min. Calibration curves were established with the six readily available standards daidzin, genistin, glycitin, daidzein, genistein, and glycitein (Chromadex, Santa Ana, CA). Their respective stock solutions and serial dilutions were prepared as described above for soyasaponins. Instead of using unstable conjugated-isoflavone standards, the response factors of the malonyl and acetyl forms were calculated from those of their corresponding glucoside forms, correcting them in a molecular mass ratio. We hypothesized that the absorption properties of a glucoside form at 260 nm should not be modified by a malonyl or an acetyl group and that their response factor was only dependent upon their molecular weight. This method is justified since a malonyl or an acetyl group does not contain an ultraviolet chromophore. This method can lead to a slight overestimation of the acetyl forms (*33*). However, the samples analyzed here generally did not contain high quantities of acetyl forms.

Data Analysis. ANCOVA with separate slope design, test for the homogeneity of slopes, estimation of variance components, and post hoc comparisons (Newman and Keuls) were made using the GLM procedure of the Statistica v.6.1 for Windows (StatSoft France, 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

External Calibration of Non-DDMP Soyasaponins I, II, and III Contents by HPLC/UV Analysis of the Purified Corresponding Standard. To ensure independent error determinations, separate stock solutions were prepared for each of the three commercially available soyasaponins (I, II, and III); they were then used to obtain calibration curves either in pure methanol or in germ or seed extracts, using the standard addition method. The latter method was applied to check the absence of interference with other compounds of the analyzed samples. All the serial dilutions were duplicated, and the complete trial (18 curves, with new stock solutions) was repeated one week later using new solvents. The linearity was very high, with $r^2 > 0.999$ for each of the 36 regression curves. The data analysis with the general MANCOVA model (separate slopes) did not show any significant difference between the slopes. Neither the matrix in which the calibrations were conducted (pure methanol or soybean extract) nor the structural differences of soyasaponins had an effect on the slope values. The mean response factors for soyasaponin I, II, and III were 18.8 ± 1.5, 18.9 ± 1.5, and 17.7 ± 1.5 area units/μmol, respectively. The intercepts in pure methanol were not different from zero ($p > 0.15$). The soyasaponin B response factors obtained at 205 nm in different matrixes ranged from 17.3 ± 1.5 to 19.2 ± 1.5 area units/μmol. These results corroborated with the hypothesis that all the non-DDMP soyasaponins could be determined using a unique calibration curve. This hypothesis is reinforced by a previous observation reported by Hu et al. (*29*), who found that the molar extinction coefficients at 205 nm for soyasaponins I, II, and V were very close. Similar conclusions between soyasaponins I and V were made using electrospray ionization (*31*) and between all the soyasaponins B using ELS detection (*32*).

The detection limit (LOD), defined as 3 times the signal (S) to noise (N) ratio (S/N) and the quantification limit (LOQ), defined as 10 times S/N, were 0.13 and 0.42 nmol, respectively, for soyasaponin I, which corresponds to 0.065 and 0.210 μmol/g in our dilution conditions. The noise was the signal width in blank injections realized between the sample injections. Noise peaks were integrated at the same time of elution as the soyasaponins, and a mean noise area was calculated. Recently, the LOD for soyasaponins I published with ELS detection were 0.04 nmol (*32*) and 12.3 μg/mL with 10 μL injection (i.e., 0.13 nmol) (*34*); thus the sensitivity of UV detection, even at the very low wavelength used here, is comparable to ELS detection.

The contribution of the calibration to the analytical error is generally estimated by the slope error σ_b. The variation coefficient of the slopes was <0.9% ($n = 6$), which indicates a good regression coefficient. Serial dilutions with low volumes can introduce an important variability, even if the accuracy of the dilution is reinforced by weighting the vials.

DDMP-Conjugated Soyasaponin Analysis through Alkaline Degradation. Owing to its chemical structure, the DDMP group can modify the absorbance properties of the soyasaponins. This experiment was carried out either on soy germs, since they have higher soyasaponin content, and significant levels of soyasaponins V and αg, or on whole seed extracts, for their higher relative soyasaponin βa content. Because of their very low level in our materials, the response factors of soyasaponin γa has not been determined. Ten separate replications of the extraction and alkaline degradation were done on the same preparation of ground soy germs or seeds, and the experiment was repeated a week later.

The alkaline hydrolysis was carried out to cleave the DDMP moieties of soyasaponins B. During this degradation, the total molar content of each pair of soyasaponins {I + βg}, {II + βa}, {III + γg}, {IV + γa}, and {V + αg} remain constant. The molar content (n) of a compound is obtained from the HPLC chromatogram with the following relationship: $n = A/(FD)$, where A is the area of the soyasaponin peak integrated from the chromatogram, F is the response factor of the compound,

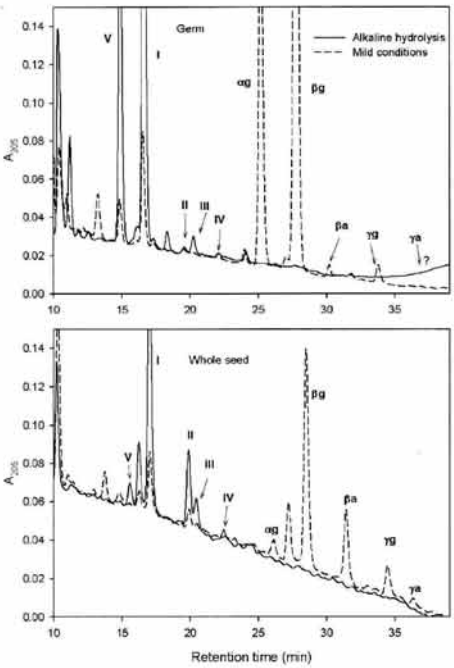


Figure 2. HPLC chromatogram (UV 205 nm) of the group B soyasaponins of soybean germ and whole seed extracted under mild conditions, before (dotted line) and after (continuous line) alkaline hydrolysis.

and D is the dilution factor. Thus, during the alkaline hydrolysis, the initial (n) and final (n') molar contents of each pair are linked by the following equation: $n_{DDMP} + n_{nDDMP} = n'_{DDMP} + n'_{nDDMP}$, from which the response factors (F_{DDMP}) of each DDMP soyasaponin can be expressed as a function of the corresponding non-DDMP response factor (F_{nDDMP}) and of an area depending ratio:

$$F_{DDMP} = F_{nDDMP}\,(DA'_{DDMP} - A_{DDMP})/(A_{nDDMP} - DA'_{DDMP})$$

where (A) and (A') correspond to the peak area before and after the alkaline degradation, and D is the dilution factor due to KOH and acetic acid addition. The area depending ratios ranged from 1.05 (CV = 9.8%, n = 10) to 1.20 (CV = 5.5%, n = 10) for the pairs {II + βa} and {I + βg}, respectively. The DDMP group slightly increases the response factor of the corresponding soyasaponin. These area ratios are similar to the ratios of the molar extinction coefficients given by Hu et al. (*29*). Consequently, a unique standard calibration curve was made for the five non-DDMP soyasaponins, and the DDMP soyasaponins were calculated using the mean calculated area ratios.

Quantification of Soyasaponins: Evaluation of Repeatability and Reproducibility. Considering that a unique calibration curve could be applied at 205 nm for the quantification of all the soyasaponins B, in agreement with Lin et al. (*32*), owing to its cost, stability, and sufficient concentration in soybean, soyasaponin I was selected as reference for quantification. All soyasaponins B were identified through calculation of their relative retention time. As shown on HPLC chromatograms in **Figure 2**, the group B soyasaponins were well resolved. The retention factor (k) of a molecule in RP-HPLC is determined with the equation $k = (t_r - t_m)/t_m$, where t_r is the retention time of the analyte, and t_m is the dead time or the retention time of a substance that is unretained on the column. The mean retention factors (k) of soyasaponins V, I, II, III, IV, αg, βg, βa, γg, and γa in germ or whole seed powder were 6, 6.6, 7.9, 8.3, 8.7, 10.6, 11.4, 12.7, 14.3, and 15.4, respectively.

The repeatability (within-day) and reproducibility (between days) were estimated by the replication of 10 analyses of two control samples, extracted from Imari seeds and isolated germs, 3 times over a month. First, as expected, the analysis of the two control samples shows (**Table 1**) that on an equal weight basis, the content of soyasaponins B in the germ is almost 10 times higher than in the whole seed. Like isoflavones, soyasaponins are particularly concentrated in soy germ (*21*, *35*). As it was expected, the soyasaponin V and its DDMP counterpart are mainly detected in the germ, whereas soyasaponins I and βg represent more than half of the total soyasaponins B either in the seed or in the germ fraction.

The repeatability and reproducibility results presented in **Table 1** indicate a good precision of the analytical procedure for the two types of control sample matrixes: the within-day variation was <7.9% for the four major soyasaponins in the germ (I, V, αg, and βg accounted for >96% of the total soyasaponins B) and <6.8% for the major soyasaponins in whole seed (I, αg, βg, and βa accounted for >84% of the total). Hu et al. (*29*) reported a within-day variation <9.8% and a between-days variation <14.3%, which is quite similar to our

Table 1. Between-Days (Reproductibility) and Within-Day (Repeatability) Variability in Germ and Whole Seed Analysis of Group B Soyasaponins[a]

	germ			whole seed		
soyasaponin B	means ± SD (μmol/g DW)	CV (%) between-days	CV (%) within-day	means ± SD (μmol/g DW)	CV (%) between-days	CV (%) within-day
I	1.70 ± 0.04[c]	4.6	2.1	0.27 ± 0.02[c]	3.8	5.7
II	0.06 ± 0.02			0.06 ± 0.03[b]	14.4	14.1
III	0.06 ± 0.02	20.0	33.7	0.02 ± 0.01	17.3	29.9
IV	0.08 ± 0.03[b]	30.0	70.6	0.01 ± 0.01		
V	0.64 ± 0.05[c]	3.0	7.9	0.06 ± 0.01[b]	2.0	18.7
βg	12.70 ± 0.32[c]	8.4	2.7	1.14 ± 0.05[c]	0.4	3.7
βa	0.16 ± 0.02[b]	6.0	12.8	0.40 ± 0.02[c]	3.7	4.1
γg	0.30 ± 0.03[c]	3.6	10.6	0.17 ± 0.02[c]	1.2	11.0
γa	ND			0.05 ± 0.01[b]	29.8	27.1
αg	5.42 ± 0.12[c]	9.0	2.4	0.27 ± 0.02[c]	5.2	6.8
total	21.13 ± 0.46	6.7	2.3	2.46 ± 0.11	0.7	4.4

[a] Analysis of 3 times 10 extractions; ND: not determined. [b] Above detection threshold (LOD). [c] Above quantification threshold (LOQ).

Table 2. Comparison of Isoflavones and Soyasaponins B Contents and Compositions in 7 Soybean Cultivars and 15 Dietary Supplements

		isoflavones								soyasaponines B							ratios	
		aglycone profile				conjugation profile					triglucosidic α-L-Rha		diglucosidic α-L-Rha		trigl β-D-Glu			
matrix		total (μmol g^{-1})	daidzein (%)	genistein (%)	glycitein (%)	malonyl (%)	acetyl (%)	glucosyl (%)	aglycone (%)	total (μmol g^{-1})	I + βg (%)	II + βa (%)	III + γg (%)	IV + γa (%)	V + αg (%)	DDMP (%)	triglucosid/ diglucosid (α-L-Rha)	isof/ sapo
soy germs	Imari	39.3	62.3	12.2	25.5	47.2	1.1	48.6	3.1	13.20	72.77	1.54	2.17	1.70	21.82	81.65	19.22	2.98
	Dwight	48.2	38.6	11.4	50.0	44.6	1.0	51.8	2.6	14.53	65.19	0.83	1.75	0.99	31.23	78.81	24.03	3.32
	Savoy	48.7	62.1	12.4	25.5	53.8	1.4	42.9	1.9	22.69	66.86	0.88	1.39	1.44	29.42	85.48	23.89	2.14
	Sapporo	49.2	62.2	13.1	24.7	55.5	1.0	41.6	2.0	28.29	68.08	1.40	1.78	1.47	27.27	87.73	21.38	1.74
	Sponsor	53.5	58.5	12.8	28.7	51.5	1.3	45.2	2.0	28.62	66.77	0.89	1.70	1.30	29.34	85.76	22.61	1.87
	Conrad	71.0	66.6	11.0	22.4	67.0	1.0	31.0	1.1	23.23	71.67	1.24	1.14	1.10	24.85	90.44	32.57	3.06
	Loda	75.1	64.3	9.4	26.3	65.7	0.9	32.0	1.4	42.40	68.81	1.24	1.15	1.24	27.56	88.78	29.36	1.77
soy cotyledons	Imari	6.1	34.9	62.8	2.3	41.7	2.8	51.3	4.3	2.76	57.75	9.34	10.78	6.87	5.26	82.80	4.37	2.22
	Dwight	6.9	48.5	49.5	2.0	43.9	2.5	48.4	5.2	2.99	57.14	6.95	10.03	4.18	1.70	84.52	5.92	2.32
	Savoy	7.7	40.0	58.3	1.7	48.3	2.6	46.2	2.8	3.17	53.90	2.56	8.48	5.88	9.18	87.73	5.32	2.43
	Sapporo	4.5	34.4	62.7	2.9	52.4	2.8	41.3	3.5	3.63	59.89	4.29	8.33	5.30	2.19	87.49	6.18	1.25
	Sponsor	7.6	32.9	65.0	2.1	47.8	3.0	45.8	3.4	3.34	54.91	1.40	12.39	9.14	2.17	84.42	3.54	2.28
	Conrad	9.2	37.8	60.3	1.9	64.0	2.4	32.3	1.3	4.14	54.72	0.43	7.70	5.58	1.57	94.80	6.41	2.22
	Loda	10.1	35.3	61.4	3.3	64.8	2.8	30.7	1.7	6.43	59.36	7.65	6.54	6.45	0.00	95.39	6.70	1.56
germ-based products[b]	P5	17.8[a]	60.0	11.3	28.7	3.6	41.7[a]	50.5	4.1	8.32	68.36	0.56	0.94	1.41	28.73	11.30	29.31	2.14
	P2	61.9	51.0	13.7	35.3	1.2	2.8	93.1	2.8	6.62	63.62	0.44	3.23	4.92	27.79	10.26	7.86	9.35
	P4	101.0[a]	54.1	15.6	30.3	1.8	12.4[a]	82.9	3.0	19.12	67.96	0.48	0.92	1.71	28.92	5.45	25.98	5.28
	P12	103.1	53.8	16.0	30.2	19.7	5.4	71.2	3.6	31.77	71.68	0.62	0.89	1.30	25.52	30.68	33.09	3.25
	P7	104.1	49.5	17.7	32.8	1.5	3.4	93.5	1.6	17.49	67.02	0.54	2.09	1.74	28.61	6.41	17.64	5.95
	P14	106.0	51.4	14.8	33.8	1.2	3.1	93.6	2.1	12.69	66.93	0.45	0.90	1.86	29.86	2.00	24.45	8.35
	P15	113.3	57.3	14.8	27.9	29.5	1.7	66.0	2.7	55.74	70.65	0.65	0.97	0.61	27.12	50.11	45.01	2.03
	P3	116.7[a]	56.5	16.1	27.4	1.5	10.4[a]	80.9	7.2	41.36	67.51	0.48	1.36	1.50	29.15	6.67	23.75	2.82
	P11	140.1	47.7	10.9	41.3	48.3	3.5	46.2	2.0	43.46	67.80	0.83	1.05	1.78	28.54	51.11	24.25	3.22
seed-based products[b]	P8	51.8	35.4	61.5	3.1	42.1	6.8	43.4	7.7	3.47	59.11	0.38	22.02	4.60	3.88	17.73	2.61	4.91
	P9	55.3	33.9	63.2	2.9	40.4	6.7	47.4	5.5	3.70	53.61	6.18	22.64	2.77	14.81	24.14	2.35	14.93
	P10	61.1	52.5	38.0	9.5	1.6	1.9	91.5	5.1	7.82	55.05	1.03	29.3	8.28	6.31	0.00	1.49	7.81
	P1	117.1	38.2	61.8	0.1	0.0	0.0	0.4	99.6	6.73	7.77	1.17	71.17	2.82	17.07	6.25	0.12	17.39
	P13	123.2	17.5	79.6	2.9	2.3	0.9	82.8	14.0	40.70	58.71	5.23	27.78	6.04	2.24	11.79	1.89	3.03
	P6	133.1[a]	38.2	52.1	9.7	1.2	10.0[a]	82.9	5.9	25.72	49.07	7.99	24.39	14.96	3.59	8.37	1.45	5.17

[a] Molar extinction coefficients of acetyl-glucosides are larger than other forms (*33, 43*). Products containing significant amounts of acetyl-isoflavones are slightly overestimated. [b] Commercial products are enriched isoflavone dietary supplements designed for menopausal women (European and North American markets).

results. Moreover, in the germ, the within-day variation did not exceed 3% for the soyasaponin I and its DDMP form. The between-days variation was <9 and <5.2% for the major components of the germ or the seed, respectively. This indicates a very good precision of the analytical procedure, considering the very low wavelength detection used. As demonstrated above, one of the major sources of between-days variability could be provided by the calibration error. The low amount of γa, saponins III, IV, and V in the seed explains the lack of accuracy concerning these molecules. These results are slightly better than the intraday and interday variability found recently with an HPLC/ELS detection (*32*), but the nonlinear response with ELS detection makes generally the quantification more difficult.

Soyasaponin and Isoflavone Contents in Different Soybean Varieties. The correlations between soyasaponin and isoflavone content and composition were investigated in seven different soybeans cultivars. The nine distinctive forms of soyasaponins (I, II, III, IV, V, αg, βg, βa, and γg) and the 12 soybean isoflavones (three aglycons and their conjugated forms) were analyzed as described above.

As shown in **Table 2**, depending of the cultivar, the total amount of soyasaponins B varied from 13.20 to 42.40 μmol/g DW and from 2.76 to 6.43 μmol/g DW in germs and cotyledons, respectively. The range of variation is the same for isoflavones content at the whole seed level, in agreement with previous works (*27*, *29*). The values of soyasaponins contents (*21*, *27*, *29*, *31*, *32*) as well as the isoflavone contents (*34*, *36*−*38*) reported here are in agreement with the results presented in the literature. In all the cultivars studied, soyasaponin I and its DDMP counterpart βg had the highest concentration, from 54 to 73% in soy germ or in cotyledons. Soyasaponin V was not detected in the cotyledons, whereas its concentration in germ represents from 22 to 31% of the total soyasaponins B. On the other hand, the trisaccharidic soyasaponin II (**Figure 1**) and its DDMP counterpart βa are more characteristic of the cotyledons. There is no significant correlation between soyasaponin and isoflavone concentrations in the germs ($r = 0.733$; $p = 0.06$) and in the cotyledons ($r = 0.686$; $p = 0.09$). This was in agreement with the previous works which did not find correlations at the whole seed level (*27*, *29*). The isoflavone-to-soyasaponin molar ratio varied from 1.3 to 3.3, whatever the seed part was considered and without any correlation between germ and cotyledons. This suggests some independence between the metabolic and the genetic control of secondary metabolism in these two seed fractions.

The malonyl-conjugated isoflavone forms are predominant in the seed, whatever seed part was analyzed. As reported in the literature, the malonyl forms represent 70−90% (w:w) of the total isoflavones, and the glucosides represent 10−25% (w:w) (*21*, *37*−*39*). The samples used for these assays corresponded to 2-year-old seeds stored at 20 °C. Consequently, the malonyl isoflavone contents are rather low and the glucoside and aglucon forms are rather high, as already described in other studies (*9*, *40*). It is generally considered that almost all the soyasaponins B are DDMP-conjugated in the seed (*21*, *29*). The seeds analyzed in this study presented at least 78.8% to more than 95% of DDMP soyasaponins, which indicates a good stability of these forms, compared with the malonyl isoflavones. Tsukamoto et al. (*21*) already stated that DDMP conjugates were not altered by high temperature during seed development. In contrast, significant conversion of DDMP soyasaponins βg to soyasaponins I was observed in peas during 9 months of storage (*41*).

Isoflavone versus Soyasaponins B Contents in 15 Soy-Based Health Supplements. Comparison of isoflavone and soyasaponin B contents and compositions in 15 soy-based health supplements are presented in **Table 2**. On the basis of their percentage of glycitein or soyasaponins V and αg contents, we can recognize the difference between the germ- and seed-based products. The range of soyasaponin B contents in commercial products is roughly the same as in the soybean cultivars but is considerably higher for the isoflavones content, which is expected, as these products are supposed to be isoflavone concentrates. We can observe higher soyasaponin concentration in the seed-based products. This indicates that the extraction process can greatly modify the isoflavone-to-saponin ratio, from 2.03 to 9.35, and from 3.03 to 17.39 in germ- or seed-based products, respectively (**Table 2**). Alcohol washing is known to result in the loss of the saponins in protein isolates, but other processes, like acid washes are not (*29*, *42*).

When soy is processed under mild conditions, malonylglucosides are converted into their β-glucoside forms, which are then converted into aglucones in the presence of β-glucosidase. In contrast, DDMP soyasaponins are quite stable under heat in solid matrixes, but they are converted into their non-DDMP form in soaked conditions (*29*). In the products analyzed here, higher malonyl contents generally correlate with higher DDMP contents. This could be explained by differences in the range of pH used or extracting temperature.

Some products showed a higher level of disaccharidic soyasaponins III and IV. These soyasaponins are produced by the loss of the third sugar (α-L-rhamnose) of soyasaponins I and II, respectively (**Figure 1**). Such degradations were observed under particular alkaline conditions or by enzymatic degradation (*18*, *20*, *31*, *43*). The trisaccharides (soyasaponins I and II) to disaccharides (soyasaponins III and IV) ratio was higher in the germs (from 19.22 to 32.57) than in the cotyledons (from 3.54 to 6.70); however, seed-based product P1 and germ-based product P2 had very low ratios, which could indicate that these products are processed under more drastic conditions.

In conclusion, we proposed a rapid, economical, and accurate HPLC/UV method for routine analysis of all group B soyasaponins, which allows the quantification of all isoflavones and soyasaponins B on the same extract, using the same apparatus. This work presents another identification method suitable not only for non-DDMP soyasaponins but also for the αg, βg, βa, and γg DDMP soyasaponins. The described method demonstrates an efficient separation and detection of the 10 group B soyasaponins and provides several advantages, including direct quantification of non-hydrolyzed soyasaponins, eliminating the use of unstable purified standards and avoiding purification steps. Soyasaponin concentration and composition depend on soybean variety and vary among commercial products. Soybean processing leads to changes in the composition of secondary metabolites compared with whole soybeans seeds. Many studies evaluating biological properties have been conducted using isolated fractions from soy materials, but attribution of functional effects or mechanism of action cannot be determined unless each phytochemical is evaluated individually. Soyasaponin content of a soy commercial product should be taken into consideration when discussing and evaluating the possible health effects of a soy-based product.

LITERATURE CITED

(1) Food and Drug Administration, F. D. A. Food labelling: Health claims: soy proteins and coronary heart disease. *Fed. Regist.* **1999**, *64*, 57700−57733.

(2) Sagara, M.; Kanda, T.; Njelekera, M.; Teramoto, T.; Armitage, L.; Birt, N.; Birt, C.; Yamori, Y. Effects of dietary intake of soy protein and isoflavones on cardiovascular disease risk factors in high risk, middle-aged men in Scotland. *J. Am. Coll. Nutr.* **2004**, *23*, 85−91.

(3) Nahas, E. P.; Neto, J. N.; De Luca, L.; Traiman, P.; Pontes, A.; Dalben, I. Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy. *Maturitas* **2004**, *48*, 372−380.

(4) McCue, P.; Shetty, K. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: A review. *Crit. Rev. Food Sci.* **2004**, *44*, 361−367.

(5) Lin, Y. G.; Meijer, G. W.; Vermeer, M. A.; Trautwein, E. A. Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 143−148.

(6) Greaves, K. A.; Wilson, M. D.; Rudel, L. L.; Williams, J. K.; Wagner, J. D. Consumption of soy protein reduces cholesterol absorption compared to casein protein alone or supplemented with an isoflavone extract or conjugated equine estrogen in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 820−826.

(7) Adlercreutz, H. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 364−73.

(8) Barnes, S. Role of phytochemicals in prevention and treatment of prostate cancer. *Epidemiol. Rev.* **2001**, *23*, 102−105.

(9) Uzzan, M.; Labuza, T. P. Critical issues in R&D of soy isoflavone − enriched foods and dietary supplements. *J. Food Sci.* **2004**, *49*, 77−86.

(10) Lucas, E. A.; Khalil, D. A.; Daggy, B. P.; Arjmandi, B. H. Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in Golden Syrian hamsters: A model of postmenopausal hypercholesterolemia. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 211−214.

(11) Arjmandi, B. H. Soy protein, saponins and plasma cholesterol − Reply to Dr. David Oakenfull. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2972−2972.

(12) Oakenfull, D. Soy protein, saponins and plasma cholesterol. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2971−2971.

(13) Lasztity, R.; Hidevegi, M.; Bata, A. Saponins in food. *Food Rev. Int.* **1998**, *14*, 371−390.

(14) Gurfinkel, D. M.; Rao, A. V. Soyasaponins: The relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr. Cancer* **2003**, *47*, 24−33.

(15) Berhow, M. A.; Wagner, E. D.; Vaughn, S. F.; Plewa, M. J. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutat. Res.* **2000**, *448*, 11−22.

(16) Kinjo, J.; Imagire, M.; Udayama, M.; Arao, T.; Nohara, T. Studies on the hepatoprotective drugs part 3 − Studies on the constituents of the leguminous plants part 56 − Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I−IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Med.* **1998**, *64*, 233−236.

(17) Kinjo, J.; Yokomizo, K.; Hirakawa, T.; Shii, Y.; Nohara, T.; Uyeda, M. Anti-herpes virus activity of fabaceous triterpenoidal saponins. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 887−889.

(18) Okubo, K.; Ijima, M.; Kobayashi, K.; Yoshikoshi, M.; Uchida, T.; Kudou, S. Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Biosci. Biotech. Bioch.* **1992**, *56*, 99−103.

(19) Shiraiwa, M.; Harada, K.; Okubo, K. Composition and structure of "Group B Saponin" in soybean seed. *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 911−917.

(20) Kudou, S.; Tonomura, M.; Tsukamoto, C.; Uchida, T.; Sakabe, T.; Tamura, N.; Okubo, K. Isolation and structural elucidation of DDMP-conjugated soyasaponins as genuine saponins from soybean seeds. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57*, 546−550.

(21) Tsukamoto, C.; Shimada, S.; Igita, K.; Kudou, S.; Kokubun, M.; Okubo, K.; Kitamura, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: Changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1184−1192.

(22) Kikuchi, A.; Tsukamoto, C.; Tabuchi, K.; Adachi, T.; Okubo, K. Inheritance and characterization of a null allele for group a acetyl saponins found in a mutant soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Breeding Sci.* **1999**, *49*, 167−171.

(23) Jackson, C. J. C.; Dini, J. P.; Lavandier, C.; Rupasinghe, H. P. V.; Faulkner, H.; Poysa, V.; Buzzell, D.; DeGrandis, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochem.* **2002**, *37*, 1117−1123.

(24) Wang, H.; Murphy, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1666.

(25) Murphy, P. A.; Song, T.; Buseman, G.; Barua, K.; Beecher, G. R.; Trainer, D.; Holden, J. Isoflavones in retail and institutional soy foods. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2697−2704.

(26) Fang, N. B.; Yu, S. G.; Badger, T. M. Comprehensive phytochemical profile of soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4012−4020.

(27) Rupasinghe, H. P. V.; Jackson, C. J. C.; Poysa, V.; Di Berardo, C.; Bewley, J. D.; Jenkinson, J. Soyasapogenol A and B distribution in soybean (*Glycine max* L. Merr.) in relation to seed physiology, genetic variability, and growing location. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5888−5894.

(28) Tsukamoto, C.; Kikuchi, A.; Kudou, S.; Harada, H.; Iwasaki, T.; Okubo, K. Genetic improvement of saponin components in soybean. In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention. I. Fruits and Vegetables*; Rosen, R. T., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1994; pp 372−379.

(29) Hu, J.; Lee, S. O.; Hendrich, S.; Murphy, P. A. Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2587−2594.

(30) Berhow, M. A.; Cantrell, C. L.; Duval, S. M.; Dobbins, T. A.; Maynes, J.; Vaughn, S. F. Analysis and quantitative determination of group B saponins in processed soybean products. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 343−348.

(31) Gu, L. W.; Tao, G. J.; Gu, W. Y.; Prior, R. L. Determination of soyasaponins in soy with LC-MS following structural unification by partial alkaline degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6951−6959.

(32) Lin, J.; Wang, C. An analytical method for soy saponins by HPLC/ELSD. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, C456−C462.

(33) Zhang, Y.; Wang, G. J.; Song, T. T.; Murphy, P. A.; Hendrich, S. Erratum. *J. Nutr.* **2001**, 129, 957−962.

(34) Ganzera, M.; Stuppner, H.; Khan, I. A. Simultaneous determination of saponins and isoflavones in soybean (*Glycine max* L.) by reversed-phase liquid chromatography with evaporative light-scattering and ultraviolet detection. *J. AOAC Int.* **2004**, *87*, 1189−1194.

(35) Shimoyamada, M.; Kudou, S.; Okubo, K.; Yamauchi, F.; Harada, K. Saponin distribution in soybean plants. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 77−81.

(36) Hoeck, J. A.; Fehr, W. R.; Murphy, P. A.; Welke, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Sci.* **2000**, *40*, 48−51.

(37) Lee, S. J.; Yan, W. K.; Ahn, J. K.; Chung, I. M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. *Field Crops Res.* **2003**, *81*, 181−192.

(38) Daydé, J.; Berger, M.; Theodorou, V. China & International Soy Conference & Exhibition, November 6−9 2002, Beijing, China; CISCE, 2002; pp 361−362.

(39) Carrao-Panizzi, M. C.; Simao, A. S.; Kikuchi, A. Effects of genotypes, environments and hydrothermal treatments on the isoflavone aglycone concentration in soybean grains. *Pesq. Agropec. Bras.* **2003**, *38*, 897−902.

(40) Hou, H. J.; Chang, K. C. Interconversions of isoflavones in soybeans as affected by storage. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 2083−2089.

(41) Daveby, Y. D.; Aman, P.; Betz, J. M.; Musser, S. M. Effect of storage and extraction on ratio of soyasaponin I to 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4-pyrone-conjugated soyasaponin I in dehulled peas (*Pisum sativum* L). *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *78*, 141−146.

(42) Anderson, R. L.; Wolf, W. J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 581S-588S.

(43) Kudou, S.; Tonomura, M.; Tsukamoto, C.; Uchida, T.; Yoshikoshi, M.; Okubo, K. Structural elucidation and physiological properties of genuine soybean saponins. In *Food phytochemicals for Cancer Prevention. I. Fruits and Vegetables*; Rosen, R. T. Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1994; pp 340−348.

(44) Murphy, P. A.; Barua, K.; Hauck, C. C. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. *J. Chromatogr. B.* **2002**, 777, 129−138.

Received for review December 23, 2004. Revised manuscript received March 15, 2005. Accepted March 21, 2005. This study was supported by grants from Genibio Company (Saint Girons, France), the Midi-Pyrénées Région and its health-food network, and the Organisation Nationale Interprofessionnelle des Oléagineux (ONIDOL). We thank all these institutions for financial support.

JF047828F

III.4.3. Méthode de quantification des sapogénols A et B, précurseurs aglycones des saponines du soja.

La méthode décrite ci-dessus donne accès à la quantification des saponines du groupe B qui se répartissent à la fois dans le germe et dans les cotylédons de la graine de soja. Par ailleurs, d'après les informations de la littérature, le germe de soja contiendrait à lui seul toutes les saponines du groupe A et leur concentration serait significativement plus élevée que la concentration des saponines B. Il apparaît donc intéressant de pouvoir quantifier simultanément les saponines des deux groupes A et B.

Une deuxième méthode analytique a donc été développée pour avoir accès à la totalité des saponines du germe de soja. Leur concentration a pu être déterminée à travers la quantification de leurs précurseurs aglycones, les sapogénols A et B par une méthode analytique simple et rapide de chromatographie haute performance en phase liquide couplée à un détecteur ultraviolet (HPLC-UV). Les variabilités intra-jour et inter-jours de la concentration totale des sapogénols ont été évaluées respectivement à 7,3 % et 10,9 % dans la graine entière et à 3,3 % et 4,7 % dans le germe. Les germes de 43 variétés de soja ont présenté une teneur totale en saponines variant de 32,8 µmol/g à 63,1 µmol/g. Une grande variabilité a également été observée dans 21 compléments alimentaires enrichis en isoflavones, s'élevant de 5,5 µmol/g à 107,8 µmol/g avec un ratio entre les saponines A et les saponines B variant de 0,3 à 8,6, indiquant que la nature de la matière première et le procédé industriel utilisés lors de l'élaboration de ces produits peuvent être totalement différents. Les résultats de cette étude suggèrent que les saponines du soja doivent être prises en considération lors de l'évaluation des effets biologiques des compléments alimentaires enrichis en isoflavones.

Cette méthode a fait l'objet d'une seconde publication :

Jane Hubert, Monique Berger, Jean Daydé (**2005**). "Validation of a high performance liquid chromatography – ultraviolet method to quantify soy sapogenols A and B in soy germs from different cultivars and in soy isoflavone-enriched supplements". *J Food Sci,* 70(8):C471-C477.

Validation of a High-performance Liquid Chromatography–Ultraviolet Method to Quantify Soy Sapogenols A and B in Soy Germs from Different Cultivars and in Soy Isoflavone-Enriched Supplements

JANE HUBERT, MONIQUE BERGER, AND JEAN DAYDÉ

ABSTRACT: An increasing number of studies investigating the health effects of soy phytochemicals has led to the commercialization of many soy-based products. Due to its particularly high concentration in many secondary metabolites, the use of soy germ as raw material is emerging for the processing of soy dietary supplements. However, the soybean seeds and germs do not exhibit the same major phytochemical profiles. This is particularly the case for soy saponins. Due to their structural diversity, the analysis of each individual soy saponin remains difficult. In this study, the total amount of these health-protective phytochemicals was determined through the quantification of their aglucon precursors, soy sapogenols A and B. A simple and rapid analytical method was developed using high-performance liquid chromatography coupled with an ultraviolet detection. The within-day and between-day variabilities of total soy sapogenol concentration were 7.3% and 10.9% in the whole seed and 3.3% and 4.7% in the germ, respectively. The total soy sapogenol contents investigated among the germs from 43 cultivars ranged from 32.8 μmol/g to 63.1 μmol/g. High amounts of soy saponins were also observed in several soy-based dietary supplements, from 5.5 μmol/g to 107.8 μmol/g, with an A/B ratio varying from 0.3 to 8.6, showing large differences between the raw materials and concentration process used. These results indicate that these compounds have to be clearly determined when discussing the biological activity of dietary supplements issued from soy.

Keywords: soybean, soyasapogenols, soyasaponin, HPLC/UV detection, dietary supplements

Introduction

Soy-based products have gained considerable interest due to the presence of several health-promoting components that provide potential effects against several diseases afflicting humans, including anticancer effects (Kwon and others 1998). Soy isoflavones have been investigated for the past 2 decades and are widely recognized for their antiestrogenic activity (Adlercreutz and others 1986), for their contribution in reducing the risk of cardiovascular diseases (Anthony and Clarkson 1996), lowering rates of prostate, breast, and colon cancers (Peterson and others 1998), and improving bone protection (Barham and others 1996). However, other components of soybean may be acting as well. In soy germ and whole soybean seed extracts, saponins are present in significant amounts, sometimes higher than the levels of isoflavones (Okubo and others 1994). Many studies have been conducted on the biological properties of soy saponins, including anti-hepatotoxicity (Miyao and others 1998; Rowlands and others 2002) and reduction of the intestinal absorption of cholesterol (Oakenful 2001). According to Malinow and others (1981) and Sidhu and others (1986), soy saponins seem to prevent the development of colon cancer and show an inhibiting effect on human carcinoma (HCT-15) cells, with significant reduction in their viability (Rao and Sung 1995). Even if these compounds have been reported to possess several health benefits, they are not well absorbed (Yoshikoshi and others 1995). However, after ingestion, saponins are present in high concentrations in the gastrointestinal (GI) tract (Fang and Yu 2004), and thus could be biologically active for the GI tract balance by acting indirectly through other mediators. The biological value of soy saponins is closely related to their chemical structure, which determines their polarity, hydrophobicity, and acidity. Saponins are glycosidic compounds of triterpenoid (C_{30}) sapogenin nucleus with 1 or more side chains of carbohydrates (Figure 1). They are divided into 2 major groups, A and B. Group B soy saponins are monodesmosidic, having just 1 glycosilation site, whereas group A soy saponins have 1 more hydroxyl group at C-21 and are either bisdesmosides at C-3 and C-22 or monodesmosides. Shiraiwa and Kudou (1991) identified 6 different group A saponins, with a characteristic acetyl group on the terminal sugar of the oligosaccharide chain, attached to the C-22 position. Group A acetylated saponins were initially regarded as undesirable metabolites, due to their bitter and astringent taste (Kitagawa and others 1988; Okubo and Ijima 1992), but they also show antioxidant properties (Jiang and others 1993). Moreover, specific effects of soy sapogenol A on the liver injury mediated by the immune response in concanavalin A-induced hepatitis have been studied in mice (Kuzuhara and others 2000). It was shown that soy sapogenol A reduced the number of infiltrating inflammatory cells in the liver and significantly lowered the elevated level of plasma tumor necrosis.

MS 20050190 Submitted 3/24/05, Revised 5/3/05, Accepted 6/18/05. *Author Hubert is with Genibio Recherche, Lorp Sentaraille, France. Authors Berger and Daydé are with UMR INRA/ESAP 1054 - Laboratoire d'agrophysiologie, Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, Toulouse, France. Direct inquiries to author Berger (E-mail: monique.berger@esa-purpan.fr).*

© 2005 Institute of Food Technologists
Further reproduction without permission is prohibited

On an equal weight basis, total soy saponins are more concentrated in the germ than in all other fractions of soybean seeds (Shimoyamada and Kudou 1990). The concentration of group A soy saponins in the cotyledons is quite low, but, on the contrary, it is particularly high in the germ. Because the germ represents only 2% of the whole soybean seed, soy saponins of group A are less well-studied than soy saponins B, which are present in both germ and cotyledons.

There is an increasing number of commercial products of isoflavone-enriched extracts from soy in the market of western countries. According to the process used during soy manufacturing, such as hydro-alcoholic extraction, these products could also be enriched in saponins. Thus, the soy materials used for their production need to be considered with attention. Some soy-based health supplements are prepared from soy germs, whereas others are prepared from whole seeds or cotyledons. Soy saponins exhibit different profiles and contents depending on the matrix used during the industrial process. The concentration of soy saponins in dietary supplements purchased for isoflavones has to be clarified when discussing the biological mode of action of these products.

The quantification of each individual soy saponin is difficult, due to the structural similarities between group A and group B saponins, which both possess labile forms that undergo structural changes under certain processing conditions (Rickert and Johnson 2004). However, acid hydrolysis of all A and B saponins yielded the corresponding aglucon forms, soy sapogenols A and B (Figure 1). Several methods have been reported for the quantification of sapogenols A and B, including solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with an evaporative light scattering detector (Rupasinghe and others 2003) or coupled with an electrospray ionization mass spectrometer (Gu and others 2002). Nevertheless, the use of mass spectrometric detection is too expensive for many laboratories. Consequently, development of effective and simple analytical procedures is needed. The most suitable method to have access to both group A and B soy saponins is to analyze their aglucon precursors. In our work, soy sapogenols were isolated from several soybean varieties and commercial soy-based products and subsequently quantified by HPLC coupled with ultraviolet (UV) detection without laborious purification and cleanup of the samples before assay. The rapidity, simplicity, and low cost of the method make feasible the analysis of a large number of samples. This study was undertaken to evaluate the variation of soy saponin contents in different cultivars. The distribution, recovery, and profiles of soy saponins in germs and cotyledons, and in commercial soy-based health supplements, were also evaluated.

Materials and Methods

Plant materials and chemicals

Seeds from 43 soybean varieties were obtained from the Euralis

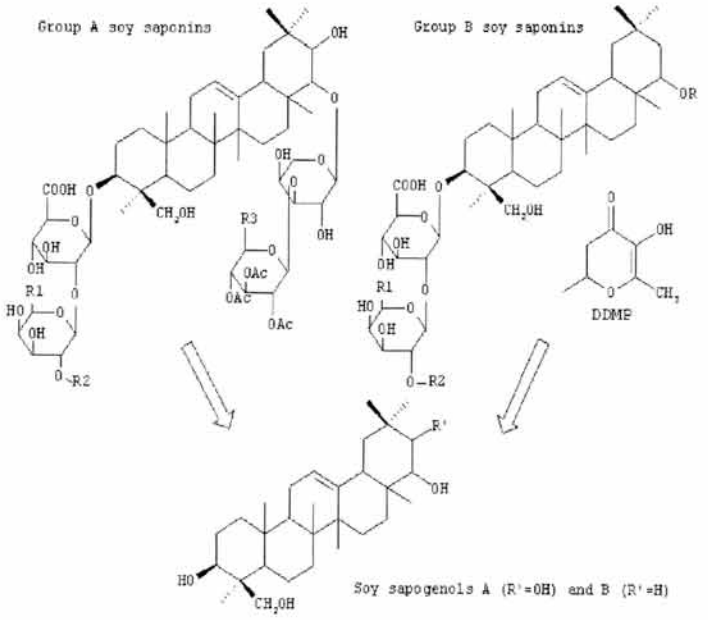


Figure 1—Structure of soy saponins A and B and their aglycone corresponding forms. Group B nomenclature is from Kitagawa and others (1998) with the nomenclature of Okubo and others (1993) in parentheses

Group A soy saponins	R1	R2	R3
acetyl A1 (Ab)	CH_2OH	β-D-glu	CH_2OAc
acetyl A2 (Af)	CH_2OH	H	CH_2OAc
acetyl A3 (Ah)	H	H	CH_2OAc
acetyl A4 (Aa)	CH_2OH	β-D-glu	H
acetyl A5 (Ae)	CH_2OH	H	H
acetyl A6 (Ag)	H	H	H

Group B soy saponins			
R=H	R=DDMP	R1	R2
I (Bb)	βg	CH_2OH	α-L-rham
II (Bc)	βa	H	α-L-rham
III (Bb')	γg	CH_2OH	H
IV (Bc')	γa	H	H
V (Ba)	αg	CH_2OH	β-D-glu

URLs and E-mail addresses are active links at www.ift.org

Table 1—Calibration data for soy sapogenols A and B

Calibration method	Soy sapogenol A			Soy sapogenol B		
	Response factor (μmol/mL)	R^2	LOD[a] (nmol)	Response factor (μmol/mL)	R^2	LOD[a] (nmol)
In pure methanol	1.040×10^7	0.9995	0.19	8.782×10^6	0.9999	0.55
In soy germ extract	1.043×10^7	0.9994	0.34	8.411×10^6	0.9999	1.21

[a]Limit of detection = 3 times the signal-to-noise ratio.

Society (Mondonville, France) in 2001. Germs were collected by hand from lyophilized seeds and ground with mortar and pestle. For the whole seed analysis, the lyophilized seeds were ground into a fine powder (particle size <200 μm) with a mill (IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Dietary supplements were purchased locally. Soybean germ samples issued from an industrial load were provided by Genibio (Saint Girons, France) and used as control samples. All the samples were stored at −20 °C. Concentrated hydrochloric acid, acetonitrile, methanol, and 1-propanol with HPLC purity were purchased from SDS (Peypin, France). Deionized water was generated from a Milli-Q analytical deionization system (Millipore, Saint Quentin Yvelines, France). Purified standards of soy sapogenols A and B were provided by Chromadex (Santa Ana, Calif., U.S.A.).

Extraction and hydrolysis of soy saponins

Finely ground soy germ powders (0.2 g), whole seed powders (0.5 g), or dietary supplement powders (0.1 g) were dissolved in 5 mL of 80% (v/v) aqueous methanol and extracted for 2 h at room temperature. The residue was removed by centrifuging the extract at 12000 g for 10 min and decanting the clear supernatant. The extracts were filtered through 0.20 μm (Acrodisc, Pall, N.Y., U.S.A.), and 4 mL of the supernatant was transferred into a hemolysis tube. Five milliliter of 1 *N* HCl in methanol was added. The solution was subjected to acid hydrolysis at 85 °C for 6.5 h in a water bath to release the aglucons from the soy saponins. Two simultaneous extraction and hydrolysis were carried out on the same powder sample to ensure the unfolding during the hydrolysis step. The solutions were cooled at room temperature and an aliquot was analyzed on a reverse-phase HPLC with a P4000 pump controller, an AS3000 autosampler, and a UV2000 SpectraSystem detector (Spectra Physics Analytical Inc., Fremont, Calif., U.S.A.). The analytical column, 250 × 4.6 mm inner dia, 5 μm, Satisfaction RP-C_{18}-AB (Cluzeau, Sainte Foy La Grande, France), was kept at 30 °C in a thermal chamber. Solvent A consisted of acetonitrile:1-propanol:water:acetic acid (80/6/13/0.1) and solvent B was 100% acetonitrile. The gradient elution was accomplished by a modification of the method described by Rupasinghe and others (2003): solvent A was pumped isocratically for 15 min, then solvent B increased to 100% in 2 min and remaining at 100% for 2 min. The gradient was recycled back to the initial state of 100% solvent A in 3 min. The injection volume was 50 μL and the flow rate 0.9 mL/min. UV absorbance was monitored at 205 nm. Chromatograms were recorded and integrated with SpectraSystem PC1000 software.

Soy sapogenol calibration

Standards (1 mg) were initially dissolved in pure methanol (10 mL). After 10 min of homogenization, each stock solution was submitted to serial dilution (20, 50, 80, 200, 300, and 400 μg/mL) using 100% methanol. Standard curves were obtained by plotting the soy sapogenol concentrations as a function of peak area recorded from HPLC chromatograms. The calibration curves of soy sapogenols A and B were also established by serial dilutions of the stock solutions in plant matrix. Six extracts of soy germ were prepared as described previously. Each of these 6 extracts was separated into 50 μL aliquots, each in which 0, 50, 100, 150, 200, and 250 μL of the stock solution of purified standards were respectively added. The solutions were filled up to 300 μL with 80% aqueous methanol. The response factors of soy sapogenols A and B were calculated by linear regression. Their identity was confirmed by HPLC retention times. Two replications of the stock solution preparations were performed for each external standard of soy sapogenol A and B.

Kinetics of soy saponin hydrolysis

To ensure a complete hydrolysis step, soy sapogenols A and B were quantified as a function of hydrolysis time. Ten samples of soy germ powder and 10 samples of whole seed powder were extracted in 80% aqueous methanol as described previously. After adding the 1 *N* HCl solution, each extract was subjected to acid hydrolysis at 85 °C. Samples were removed periodically (every 30 min during the 1st 3 h, and every hour up to 9 h), refreshed in a cold bath, and analyzed for soy sapogenol distribution. The heating experiment was repeated twice over a month.

Evaluation of precision and accuracy

Two control samples were chosen for their characteristic soy saponin contents and distribution: isolated soy germs (Genibio, St Girons, France), exhibiting significant amounts of soy saponins A and B, and whole soybean seeds (cv Imari, Monsanto Seeds, Montbequi, France), almost exclusively containing saponins B, lyophilized, and stored at 4 °C. Ten replications of the extraction procedure followed by acid hydrolysis and HPLC assay were carried out successively on each control sample to evaluate the within-day variation. The assay was replicated 3 times over a month to determine the between-day variation. The means, standard deviations, and coefficients of variation of within-day and between-days assays were calculated for each soy sapogenol. A control sample was analyzed before the 1st sample each day and at least once per 20 samples.

Results and Discussion

Validation of the calibration method

Separate stock solutions were prepared from the commercially available standards of soy sapogenols A and B. The results obtained from linear regression of the calibration curves are presented in Table 1, including the response factor, correlation coefficient, and limit of detection (LOD) of each soy sapogenol, either diluted in pure methanol or in a soy germ extract. This last method was used to ensure the absence of interference with other molecules in the extract analyzed. All serial dilutions were duplicated. This method gave high reproducibility and was free from interference from the matrix. Linearity of the 2 standards was very high, with R2 values greater than 0.999 over the concentration range injected (10 to 200 μmol/mL) in the different calibration conditions. The LOD, defined as 3 times the signal-to-noise ratio (S/N), was 0.34 nmol for soy sapogenol A and 1.21 nmol for soy sapogenol B in soy germ extracts, which corresponds to 0.17 μmol/g and to 0.60 μmol/g, re-

Table 2—Variability of soy sapogenol analysis in soy germ and whole seed

	Germ			Whole seed		
	Means[a] ± SD (μmol/g DW)	CV within days[b] (%)	CV between days[c] (%)	Means[a] ± SD (μmol/g DW)	CV within days[b] (%)	CV between days[c] (%)
Sapogenol A	23.47 ± 0.67	2.9	7.4	0.80 ± 0.19	6.7	11.3
Sapogenol B	21.58 ± 0.96	4.4	3.7	2.36 ± 0.16	7.1	5.4
Total	45.05 ± 1.58	3.3	4.7	3.16 ± 0.29	7.3	10.9
A/B	1.09 ± 0.02	4.5	3.2	0.34 ± 0.03	7.2	9.2

[a]n = 30.
[b]10 control samples were analyzed successively within a day.
[c]10 control samples were analyzed 3 times over a month.

spectively, according to the dilution conditions. The noise was the signal width in blank injections realized between the sample injections. Noise peaks were integrated at the same time of elution as the soy sapogenols. Thus, the UV detection used here, at a very low wavelength, presented a high sensitivity. The 2 soy sapogenols were well resolved, with a retention time difference of 4 min (Figure 2). Soy sapogenols A and B were eluted at 6.7 ± 0.2 min (n = 20) and 10.3 ± 0.2 min (n = 20), respectively. The peak identities were confirmed by adding a known amount of the corresponding standard in a soy extract, overlapping the expected soy sapogenol peaks in the resultant chromatogram.

Validation of the analytical procedure

Multiple hydrolysis times were tested on the soy germ reference sample to determine the hydrolysis efficiency. The kinetics of soy sapogenol formation during acid hydrolysis are presented in Figure 3. The amount of soy sapogenols obtained from soybean extracts was optimized by incubating them for 6.5 h at 85 °C. Before this time, the formation of the 2 sapogenols is not quantitative, whereas a too long hydrolysis step promotes their alteration. The best compromise to produce the optimal quantity of sapogenols in our dilution conditions without inducing their degradation was to stop the reaction after 6.5 h of hydrolysis.

Soy saponins were extracted from 10 samples of soy germs and 10 samples of whole seeds, hydrolyzed in their aglucon forms and then quantified with the HPLC method described previously. The precision and within-day and between d variabilities of the method were evaluated and are reported in Table 2. The within-day variability of the total amount of sapogenols in the whole seed was 7.3% and 3.3% in the germ, which indicates a good repeatability of the sample preparation. The between-day variabilities were 10.9% in the whole seed and 4.7% in the germ. Because the germ presents higher quantities of sapogenols than the cotyledons, the analytical variation is lower in this fraction. This method demonstrates that purification and cleanup, as described previously (Ireland and others 1986), can be eliminated for the determination of soy sapogenols A and B in soybean or in complex soy-food matrices. The elimination of the evaporation step before hydrolysis reduces the duration of sample preparation.

Soy sapogenol distribution in soy germs from different cultivars

Previous studies have been conducted to determine the soy saponin variation among cultivars (Gu and others 2002; Hu and others 2002), but these studies were carried out on whole soybean seeds, and particularly focused on saponins from group B. Nevertheless, soy saponins have been reported to be mainly located in the germ fraction of soybean seeds, with a total concentration 6 times higher than that in the cotyledons (Tani and others 1985).

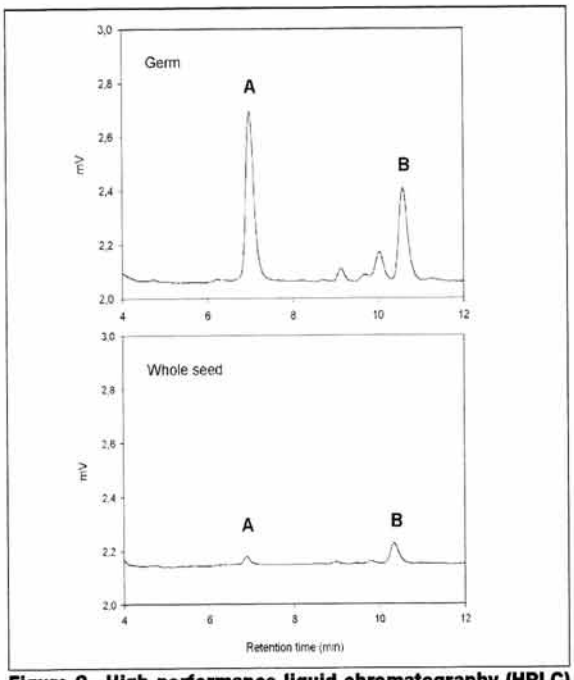


Figure 2—High-performance liquid chromatography (HPLC) profiles of soy sapogenols A and B in soybean germ and in the whole seed (UV = 205 nm)

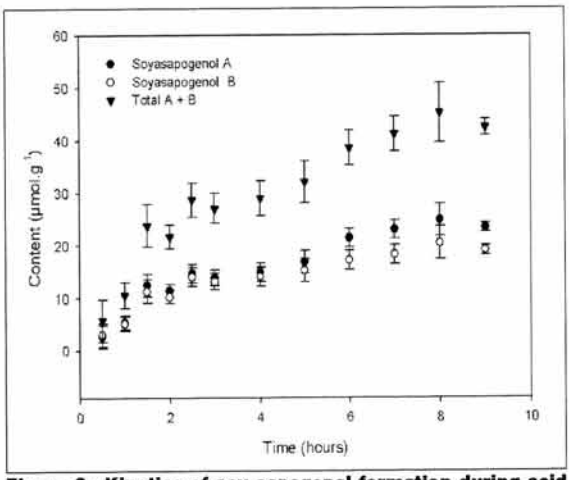


Figure 3—Kinetics of soy sapogenol formation during acid hydrolysis carried out on aliquots of a soy germ sample. Means ± SD.

URLs and E-mail addresses are active links at www.ift.org

Little information is available about the variability of soy saponin contents in soy germs from different cultivars, although the soy saponin profile in the germ can reflect the genetic characteristic of a variety (Tsukamoto and others 1994). In this study, soy saponins A and B were determined in the germs of 43 cultivars through the quantification of their corresponding aglucon precursors. The cultivars tested were field-grown in 2001 in 2 plots. There was a significant difference in total, but also in individual, soy sapogenol contents and soy sapogenol A/B ratio ($P < 0.001$) in soy germs from different genotypes; plot effect was not significant. The total soy sapogenol contents ranged from 32.8 μmol/g to 63.1 μmol/g (Table 3). The levels of individual soy sapogenol A and B varied from 15.0 μmol/g to 30.8 μmol/g, and from 14.7 μmol/g to 32.3 μmol/g, respectively. These quantities are slightly higher than those found by Kitagawa and others (1988) in the hypocotyls fraction, but are in agreement with those found in more recent studies (Tsukamoto and others 1994; Gu and others 2002). Our findings confirmed the very high concentrations of soy saponins in the germs compared with the whole seeds, which were found to contain, on average, 4.04 ± 0.91 μmol/g in different varieties in a previous study (Hu and others 2002). The ratio of group A to group B presents great variations, from 0.67 to 1.65, which indicates that the group A and B concentrations were not highly correlated ($r = 0.414$). Similarly, Rupasinghe and others (2003) reported differences in distribution of soy sapogenols A and B in the axes of 3 distinct seedling cultivars. Because the described method allows many analyses, it could be used to evaluate the environmental and genetic variability of soy sapogenols and thus the results obtained could supply basic information for breeding soybean cultivars with higher soy saponin A or soy saponin B contents.

Soy sapogenol determination in commercial soy isoflavone products

Many isoflavone extracts are sold as dietary supplements, and

Table 3—Sapogenol contents in the germs of 43 field-grown soybean cultivars[a]

Cultivar	Total (μmol/g)	Sapogenol A (μmol/g)	Sapogenol B (μmol/g)	A/B ratio
LOGAN	32.8 ± 2.2 A	17.6 ± 0.4 A → D	15.2 ± 1.9 A	1.16 ± 0.14 A → E
F88-1243	33.1 ± 3.7 A	17.0 ± 3.3 A B C	16.1 ± 1.0 A B	1.06 ± 0.19 A → E
YING NAN	33.5 ± 2.0 A	15.0 ± 2.2 A	18.5 ± 0.5 A B C	0.81 ± 0.13 A B
GENA	33.6 ± 0.3 A	18.8 ± 0.1 A → E	14.7 ± 0.2 A	1.28 ± 0.02 A → E
MACON	33.6 ± 5.6 A	18.9 ± 4.4 A → E	14.7 ± 1.5 A	1.28 ± 0.21 A → E
VICKERY	34.3 ± 0.9 A	15.5 ± 0.9 A B	18.8 ± 0.2 A B C	0.83 ± 0.05 A B C
SLOAN	34.4 ± 0.9 A	19.7 ± 0.7 A → F	14.7 ± 0.2 A	1.33 ± 0.03 A → E
ATLAS	34.8 ± 3.1 A B	19.8 ± 2.6 A → F	15.0 ± 1.0 A	1.32 ± 0.16 A → E
MIXER	35.4 ± 7.1 A B	20.4 ± 5.5 A → F	15.0 ± 2.1 A	1.36 ± 0.29 A → E
LINCOLN	35.9 ± 1.3 A B	20.6 ± 2.6 A → F	15.4 ± 2.2 A	1.37 ± 0.39 A → E
8729SE	36.6 ± 2.9 A B	20.0 ± 2.9 A → F	16.6 ± 5.1 A B	1.34 ± 0.58 A → E
MUKDEN	38.0 ± 2.1 A B C	18.4 ± 1.6 A → E	19.5 ± 1.3 A → E	0.95 ± 0.10 A → E
QUITO	38.6 ± 4.8 A → D	19.9 ± 4.0 A → F	18.6 ± 2.9 A B C	1.09 ± 0.26 A → E
CN5	38.6 ± 0.8 A → D	23.0 ± 0.2 A → H	15.6 ± 0.9 A B	1.47 ± 0.10 B → E
CENTURY	38.8 ± 4.1 A → D	19.1 ± 3.5 A → E	19.7 ± 0.6 A → E	0.97 ± 0.15 A → E
SAFRANA	39.1 ± 1.5 A → D	23.1 ± 2.8 A → H	16.0 ± 1.5 A B	1.47 ± 0.30 B → E
ALARIC	41.2 ± 1.9 A → E	18.6 ± 1.0 A → E	22.6 ± 0.9 A → F	0.82 ± 0.01 A B C
GIULETTA	41.2 ± 4.4 A → E	21.2 ± 3.3 A → G	20.0 ± 4.0 A → E	1.09 ± 0.27 A → E
J14	41.8 ± 3.1 A → F	18.4 ± 0.9 A → E	23.4 ± 2.3 A → G	0.79 ± 0.05 A B
MESSIDOR	41.8 ± 1.5 A → E	25.7 ± 0.9 C → H	16.1 ± 0.7 A B	1.60 ± 0.03 C D E
OPIUM	42.4 ± 0.2 A → F	24.0 ± 0.4 A → H	18.3 ± 0.6 A B C	1.31 ± 0.07 A → E
RPS815	42.7 ± 2.3 A → F	18.1 ± 2.2 A → D	24.6 ± 0.1 A → H	0.74 ± 0.09 A B
SONEL	42.8 ± 1.2 A → G	26.6 ± 0.9 C → H	16.2 ± 1.3 A B	1.65 ± 0.17 E
CN4	42.9 ± 3.2 A → G	17.7 ± 2.2 A → D	25.3 ± 1.7 B → H	0.70 ± 0.08 A B
WOLFSTHA	43.9 ± 3.7 A → G	22.0 ± 1.6 A → H	21.9 ± 2.1 A → F	1.01 ± 0.02 A → E
CN290	44.2 ± 10.5 A → G	20.5 ± 0.6 A → F	23.8 ± 9.9 A → H	0.94 ± 0.37 A → E
L1BC5	44.5 ± 6.0 A → G	26.5 ± 0.8 C → H	18.0 ± 6.9 A B C	1.61 ± 0.54 D E
BA YUE Z	45.0 ± 5.4 A → G	19.7 ± 1.8 A → F	25.3 ± 3.6 B → H	0.78 ± 0.04 A B
WEBER 84	45.0 ± 2.6 A → G	22.9 ± 4.3 A → H	22.1 ± 2.6 A → F	1.06 ± 0.29 A → E
MERIT	45.7 ± 2.4 A → G	22.5 ± 1.3 A → H	23.2 ± 1.1 A → G	0.97 ± 0.01 A → E
SPUTNIK	46.5 ± 5.8 A → H	24.9 ± 3.4 B → H	21.6 ± 2.4 A → F	1.15 ± 0.03 A → E
TRESOR	46.7 ± 14.5 A → H	27.5 ± 7.1 D → H	19.1 ± 7.5 A → D	1.48 ± 0.21 B → E
TOTEM	46.9 ± 14.2 A → H	26.8 ± 9.5 C → H	20.1 ± 4.7 A → E	1.31 ± 0.17 A → E
TF17A	48.9 ± 2.4 B → H	26.8 ± 0.5 C → H	22.1 ± 1.9 A → F	1.22 ± 0.08 A → E
CN2	49.1 ± 0.6 B → H	19.6 ± 2.1 A → F	29.5 ± 1.6 F G H	0.67 ± 0.11 A
ER HUANG	51.8 ± 6.5 C → I	24.5 ± 4.0 A → H	27.3 ± 2.5 C → H	0.89 ± 0.06 A → E
PANNONIA	52.4 ± 2.3 D → I	23.9 ± 1.4 A → H	28.5 ± 1.0 D → H	0.84 ± 0.03 A → D
GNOME	53.4 ± 2.4 E → I	27.1 ± 1.6 D → H	26.3 ± 3.6 C → H	1.05 ± 0.23 A → E
VNIIMK	55.6 ± 7.3 F → I	28.1 ± 4.3 E → H	27.5 ± 4.5 C → H	1.03 ± 0.17 A → E
TIAN E D	55.7 ± 1.8 F → I	29.3 ± 0.1 F G H	26.4 ± 1.9 C → H	1.11 ± 0.09 A → E
AGATA	56.5 ± 0.6 G H I	24.7 ± 2.1 B → H	31.8 ± 2.7 G H	0.78 ± 0.13 A B
DANUBIAN	58.8 ± 2.0 H I	30.2 ± 0.9 G H	28.6 ± 2.5 E → H	1.06 ± 0.12 A → E
S5606	63.1 ± 1.3 I	30.8 ± 0.8 H	32.3 ± 0.5 H	0.95 ± 0.01 A → E
CV[b]	9.8%	12.8%	13.8%	20.4%
LSD[b]	6.0	4.0	4.1	0.32

[a]For each cultivar, $n = 4$; duplicate samples from 2 plots. Mean values ± standard deviation. Letters indicate grouping after a Newman and Keuls test ($\alpha = 0.05$; A → F stands for means belonging to groups A B C D E F).
[b]Calculated with the analysis of variance (ANOVA) residual mean square.

Table 4—Soy saponin contents in commercial isoflavone-enriched supplements[a]

Soy product	Total (μmol/g)	Sapogenol A (μmol/g)	Sapogenol B (μmol/g)	A/B ratio	Mass equivalent saponin (%)
P1	59.4	12.0	47.5	0.25	5.5%
P2	50.5	12.9	37.6	0.34	4.7%
P3	36.0	9.2	26.7	0.35	3.3%
P4	20.7	6.8	14.0	0.49	1.9%
P5	12.7	4.2	8.5	0.49	1.2%
P6	25.7	8.9	16.7	0.54	2.4%
P7	10.6	4.0	6.6	0.61	1.0%
P8	107.8	43.0	64.8	0.66	10.0%
P9	39.5	19.6	19.9	0.99	3.7%
P10	42.0	21.9	20.0	1.09	3.9%
P11	14.0	7.5	6.5	1.15	1.3%
P12	74.9	41.2	33.7	1.23	7.0%
P13	6.8	3.6	3.2	1.24	0.6%
P14	90.5	51.5	39.0	1.32	8.5%
P15	6.5	3.5	3.1	1.62	0.6%
P16	53.8	33.6	20.2	1.66	5.0%
P17	46.8	32.2	14.6	2.25	4.4%
P18	54.7	38.2	16.5	2.32	5.1%
P19	21.8	15.5	6.4	2.43	2.0%
P20	23.8	20.8	2.9	7.10	2.2%
P21	21.9	19.6	2.3	8.64	2.1%
SE	2.2	1.3	1.2	0.31	

[a]Means from $n = 3$ analyses. Standard errors are calculated with the analysis of variance (ANOVA) residual mean square.

their consumption is increasing in many western countries. As reported previously, soybeans contain high levels of soy saponins, which could be either extracted simultaneously with isoflavones or removed during processing. This means that the nutritional value of soy-based products could be modified according to the process used. The potential presence of saponins in isoflavone-enriched supplements cannot be ignored. We investigated the soy saponin amounts in 21 commercial soy-based health supplements (Table 4). The method used in this study is particularly suitable for this type of samples: As the naturally occurring group A and B soy saponins are easily hydrolyzed during industrial processing, due to the pH and temperature conditions, it is appropriate to complete the hydrolysis of soy saponins, which is already partial in the products, and to quantify the total aglucon forms obtained. The total soy sapogenol concentrations in the soy isoflavone supplements ranged from 6.5 μmol/g to 107.8 μmol/g. The ratio of soy sapogenol A to B ranged from 0.25 to 8.64, reflecting the soy material used during processing. As noted earlier, a ratio higher than 0.6 is characteristic of a germ-based product, whereas a ratio under 0.5 is more characteristic of the soy sapogenol distribution in the whole seed. Thus, the products from P1 to P6 are probably prepared from whole soybean seeds. Considering that a 1:1 sapogenol:sugar ratio could be used to estimate the mass equivalent concentration of soy saponins (Ireland and others 1986), very high concentrations of soy saponins were detected in some products (7.0% in P12, 8.5% in P14, and 10.0% in P8). In contrast, some products, such as P4, contained a lower quantity of soy saponins (1.9%) than isoflavones (7.1% claimed, data not shown). Other products, such as P2, contained the same quantity of soy saponins (4.7%) as isoflavones (5% claimed). But the most surprising was when the amount of soyasaponins was very high compared with the amount of isoflavones. This was the case in product P14, which contained about 8.5% of soy saponins and only about 4% of isoflavones. These significant amounts of soy saponins in products which are supposed to be only isoflavone concentrates have to be taken in consideration. Soy saponins may interact with isoflavone biological activities or contribute to many of the health benefits attributed to isoflavones (Tongtong and others 2003).

Conclusions

We developed an easy and short method to quantify the 2 major groups of saponins present in soybeans. Although their distribution fluctuates among soy-based health products, their total concentration is often significant in soy isoflavone preparations. Their quantification is necessary in each commercial health supplement to provide better information concerning the bioactive compounds contained in these products.

Acknowledgments

We thank Alicia Ayerdi Gotor for kindly providing separated soygerm samples. This work was financially supported by GENIBIO (Saint Girons, France), the Midi-Pyrénées Région and its Health-Food Network, and the Organisation Nationale Interprofessionnelle des Oléagineux (ONIDOL).

References

Adlercreutz H, Fotsis T, Banwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T. 1986. Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets. J Steroid Biochem 25:791–7.

Anthony MS, Clarkson TB. 1996. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. J Nutr 126(1):43–50.

Barham HA, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. 1996. Dietary soybean proteins prevent bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. J Nutr 126:43–50.

Fang NB, Yu SG. 2004. Comprehensive phytochemical profile of soy protein isolate. J Agric Food Chem 52(12):4012–4020.

Gu LW, Tao G, Gu W, Prior RL. 2002. Determination of soyasaponins in soy with LC-MS following structural unification by partial alkaline degradation. J Agric Food Chem 50(24):6951–9.

Hu J, Lee SO, Hendrich S. 2002. Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography. J Agric Food Chem 50(9):2587–94.

Ireland P, Dziedzic SZ, Kearsley W. 1986. Saponin content of soya and some commercial soya products by means of high-performance liquid chromatography of the sapogenins. J Agric Food Chem 37:694–8.

Jiang Y, Zhong GG, Qi H, Ma XY. 1993. Antioxidative action of soyasaponin monomers I, A1, A2, and their inhibitory effects on action potential and beating of myocardiocytes in culture. Zhongguo Yao Li Xue Bao 4(3):269–73.

Kitagawa I, Taniyama T, Saito M. 1988. Structure of acetyl-soyasaponin A1, A2 and A3, astringent partially acetylated bisdesmoside of soyasapogenol A from American soybean, the seed of Glycine max L. Merrill. Chem Pharm Bull 36:2819–28.

Kuzuhara H, Nishiyama S, Minowa N, Sasaki K, Omoto S. 2000. Protective effects

URLs and E-mail addresses are active links at www.ift.org

of soyasapogenol A on liver injury mediated by immune response in a concanavalin A-induced hepatitis model. Eur J Pharmacol 391(1-2):175-81.
Kwon TW, Song YS, Kim JI, Honh JH. 1998. Current research on the bioactive functions of soyfoods in Korea. J Korean Soybean Dig 15:1-12.
Malinow MR, Connor WE, Mc Laughlin P, Stafford C, Lin DS, Livingston AL, Kohler GO, McNulty WP. 1981. Cholesterol and bile acid balance in *Macaca fascicularis*. Effects of alfalfa saponins. J Clin Invest 67:156-62.
Miyao H, Arao T, Udayama M, Kinjo J, Nohara T. 1998. Kaikasaponin III and soyasaponin I, major triterpene saponins of Abrus cantoniensis, act on GOT and GPT: influence on transaminase elevation of rat liver cells concomitantly exposed to CCl4 for 1h. Planta Med 64:5-7.
Oakenful D. 2001. Soy protein, saponins and plasma cholesterol. J Nutr 131(11):2971-2971.
Okubo K, Ijima M. 1992. Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. Biosci Biotechnol Biochem 56:99-103.
Okubo K, Kudou S, Uchida T, Yoshiki Y, Yoshikoshi M, Tonomura M. 1994. Soybean saponin and isoflavonoids. Structure and antiviral activity against human immunodeficiency virus in vitro. In: Rosen RT, editor. Food phytochemicals I: fruits and vegetables Washington, D.C.: American Chemical Society. p 330-9.
Peterson TG, Ji GP, Kirk M, Coward L, Falany CN, Barnes S. 1999. Metabolism of isoflavones genistein and biochanin A in human breast cancer cell lines. Am J Clin Nutr 68:1505-11S.
Rao AV, Sung MK. 1995. Saponins as anticarcinogens. J Nutr 125(3):717S-24S.
Rickert DA, Johnson LA. 2004. Improved fractionation of glycinin and beta-conglycinin and partitioning of phytochemicals. J Agric Food Chem 52(6):1726-34.
Rickert DA, Meyer MA, Murphy PA. 2004. Effect of extraction pH and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein isolate production. J Food Sci 69:C623-31.
Rowlands JC, Berhow MA, Badger TM. 2002. Estrogenic and antiproliferative properties of soy sapogenols in human breast cancer cells in vitro. Food Chem Toxicol 40:1767-74.
Rupasinghe HPV, Jackson CJC, Poysa V, Berardo CD, Bewley JD, Jenkinson J. 2003. Soyasapogenol A and B distribution in soybean (*Glycine max* L. Merr.) in relation to seed physiology, genetic variability, and growing location. J Agric Food Chem 51(20):5888-94.
Shimoyamada M, Kudou S. 1990. Saponin distribution in soybean plants. Agric Biol Chem 54:77-81.
Shiraiwa M, Kudou S. 1991. Composition and structure of "group A saponin" in soybean seed. Agric Biol Chem 55(4):315-22.
Sidhu GS, Oakenful DG. A mechanism for the hypocholesterolemic activity of saponins. Br J Nutr 55:643-9.
Tani T, Katsuki T, Kubo M, Arichi S, Kitagawa I. 1985. Histochemistry. V. Soyasaponins in soybean (*Glycine max* L. Merr.) seed. Chem Pharm Bull 33:3829-33.
Tongtong S, Lee SO, Murphy PA, Hendrich S. 2003. Soy Protein with or without isoflavones, soy germ and soy germ extract, and daidzein lessen plasma cholesterol levels in golden Syrian hamsters. Exp Biol Med (Maywood) 228(9):1063-8.
Tsukamoto C, Kikuchi A, Kudou S, Harada K, Iwasaki T, Okubo K. 1994. Genetic improvement of saponin components in soybean. Food phytochemicals for cancer prevention. Washington D.C.: American Chem Soc. I. Fruits and vegetables. 31:373-9.
Yoshikoshi M, Kahara T, Yoshiki Y, Ito M, Furukawa Y, Okubo K, Amarowicz R. 1995. Metabolism and nonabsorption of soybean hypocotyls saponins in the rat model. Acta Aliment 24(4):355-64.

III.4.4. Conclusion

Cette étape d'optimisation et de développements analytiques a permis de compléter les méthodes déjà existantes pour identifier et quantifier précisément l'ensemble des familles de molécules présentes dans le germe de soja.

L'optimisation de la méthode de calibration des isoflavones était nécessaire afin d'éviter une surestimation de leurs teneurs dans les différentes matrices qui seront étudiées dans ce programme de recherche. De même, l'adaptation des procédures de quantification des phytates et du facteur de Bowman-Birk aux matrices végétales, était nécessaire pour évaluer leurs teneurs dans le germe de soja, d'autant plus qu'aucune donnée relative à ce sujet n'est disponible dans la littérature. Enfin, le développement de deux méthodes HPLC-UV, simples et utilisables en analyses de routine, permettent d'accéder à chaque saponine appartenant au groupe B et de déterminer la teneur globale des saponines du groupe A. Tous ces outils seront utilisés dans ce qui va suivre pour déterminer avec précision la variabilité des teneurs et des profils de ces différents composés dans le germe de soja depuis la matière première jusqu'aux produits industriellement transformés chez GENIBIO.

Les deux publications validant le travail de développement analytique concernant les saponines, mettent en évidence que la concentration massique des saponines totales dans le germe de soja natif est de l'ordre de 5 %, ce qui représente une teneur 10 à 15 fois plus élevée que dans les cotylédons et qu'on en retrouve une quantité importante dans la plupart des extraits riches en isoflavones. Il serait intéressant de mener des recherches plus approfondies pour élucider le profil précis des saponines du groupe A. Une nouvelle méthode a été récemment publiée (Berhow *et al.*, 2006), mais elle n'est pas encore transposable à des contrôles analytiques de routine. La détermination de la répartition précise des saponines dans le germe de soja et dans les produits dérivés soumis à des tests d'évaluation d'activité biologique permettrait de relier les effets observés à des structures particulières et de clarifier certains résultats relatifs aux effets des extraits dérivés du germe de soja par rapport à ceux dérivés des graines entières.

IV. CARACTERISATION DU GERME DE SOJA NATIF ET DE SES PRODUITS DERIVES

IV.1. Contexte industriel

La société GENIBIO (Lorp Sentaraille, 09) développe des ingrédients innovants à base de germe de soja. La société NUTRITION & SOJA (Revel, 31) fournit des lots de germes entiers totalement tracés depuis le producteur, après avoir établi un cahier des charges très précis, notamment en ce qui concerne la teneur minimale en protéines des graines entières récoltées. Ces lots de matière première, labellisés Agriculture Biologique ou non, proviennent presque exclusivement de la région Midi-Pyrénées.

Cependant, les conditions environnementales (température et irrigation) et le facteur génétique (variétés) ont une forte influence sur la teneur en isoflavones dans la graine et dans le germe de soja (Daydé *et al.*, 2002). De même, les lots de germes sont généralement isolés des graines entières à partir d'un procédé industriel incluant entre autres un traitement thermique et une période de stockage plus ou moins longue, pouvant faire varier également la concentration des isoflavones. Ainsi, la garantie de teneur d'un ingrédient nécessite la prise en compte de cette variabilité dans la matière première.

Chez GENIBIO, après avoir été stabilisés par un traitement thermique, les lots de germes sont soumis à un procédé d'extraction conduisant à un ingrédient enrichi en isoflavones et autres composés biologiquement actifs possédant une forte valeur ajoutée. Dans ce contexte, la valorisation des propriétés santé du germe de soja a d'abord nécessité une étape de caractérisation précise des principaux composés potentiellement actifs présents dans la matière première native. L'évaluation de la variabilité de ces métabolites en termes de teneur et de composition a été déterminée dans les lots industriels reçus par GENIBIO au cours des années 2004 et 2005, ainsi que dans les extraits issus d'un procédé d'extraction destiné à produire une fraction enrichie en isoflavones.

IV.2. Caractérisation des lots industriels de germe de soja natif

La teneur et la composition des principaux métabolites présents dans le germe de soja natif ont d'abord été déterminées sur un ensemble de 23 lots industriels prélevés régulièrement chez GENIBIO INDUSTRIE au cours des années 2004 et 2005. Les résultats observés ont été comparés avec la teneur et la composition des mêmes métabolites présents dans la graine entière de soja. Pour cela, une poudre de référence de graines entières de soja (variété Imari, production 2004, conservée en sachets hermétiques à -20 °C), a été caractérisée avec les mêmes méthodes analytiques que celles utilisées pour la caractérisation des lots industriels de germe.

IV.2.1. Concentration des principaux métabolites du germe de soja natif

D'après les résultats reportés dans la littérature, le germe de soja présente un profil intéressant de macronutriments incluant 38-42 % de protéines, 11-22 % de lipides, 43 % de glucides et environ 5 % d'humidité (Weingartner, 1987).

Le **Tableau 23** présente le profil moyen des protéines, acides gras, isoflavones, saponines, phytostérols et tocophérols contenus dans les lots industriels de germe de soja natif. En comparaison avec la graine entière, il apparaît clairement que le germe est significativement plus concentré en isoflavones et en saponines.

Sur l'ensemble des 23 lots analysés, la teneur en isoflavones s'élève à 13,1 ± 1,2 mg/g (moyenne ± écart type) en équivalents aglycones, ce qui représente une teneur 5 fois plus élevée que celle relevée dans la graine entière qui ne contient que 2,5 ± 0,9 mg/g d'isoflavones totales. De même les saponines sont 15 à 20 fois plus concentrées dans le germe avec une teneur totale en équivalents aglycones de 20,9 ± 6,1 mg/g, soit 50,6 ± 7,6 mg/g de structures natives totales par rapport à 5,1 ± 1,8 mg/g détectées dans la graine entière. Les teneurs totales en phytostérols et en tocophérols, respectivement de 4,6 ± 1,6 mg/g et 0,35 ± 0,07 mg/g sur l'ensemble des 23 lots analysés, sont également significativement plus élevées que dans la graine entière qui contient 0,7 ± 0,2 mg/g de phytostérols totaux et 0,2 ± 0,1 mg/g de tocophérols totaux. Similairement à la graine entière, le germe de soja contient 38,5 ± 2,2 % de protéines totales, mais leurs compositions dans ces 2 compartiments sont probablement très différentes. Il n'existe pas d'information concernant la nature exacte des protéines contenues dans le germe, mais on peut imaginer que les 2 globulines les plus connues du soja, la conglycinine et la β-conglycinine, sont uniquement localisées dans les cotylédons qui sont des compartiments de réserve. Par ailleurs, la teneur en acides gras du germe de soja est plus faible, 92,3 ± 16,3 mg/g comparée à 134,1 ± 0,5 mg/g dans la graine entière. Les triglycérides représentent 92,0 % de l'huile des cotylédons et 70,0 % de l'huile du germe de soja (Yoshida *et al.*, 2003).

Tableau 23. Variabilité des principaux métabolites du germe de soja.

Composés analysés		isoflavones (mg/g éq. aglycone)	saponines (mg/g)	protéines (%)	fraction lipidique (%)	acides gras (mg/g)	phyto-stérols (mg/g)	Toco-phérols (mg/g)
Agriculture biologique	lot 1	12,3	38,2	38,5	14,6	73,2	4,5	0,38
	lot 2	12,1	73,3	37,9	15,7	91,2	5,9	0,43
	lot 3	13,7	54,2	36,1	12,4	82,9	4,9	0,48
	lot 4	12,9	48,1	37,2	10,9	72,3	3,1	0,39
	lot 5	13,0	51,6	38,6	17,3	118,9	4,3	0,40
	lot 6	12,5	54,5	38,3	15,2	116,7	3,9	0,35
	lot 7	13,5	53,7	38,7	16,1	111,9	5,9	0,36
	lot 8	13,9	50,2	39,5	16,5	88,3	4,8	0,33
	lot 9	12,3	45,0	39,0	12,8	89,6	4,5	0,26
	lot 10	12,1	42,9	39,2	16,0	99,3	3,4	0,39
	lot 11	11,5	50,5	39,5	12,7	105,9	4,8	0,31
	lot 12	12,8	44,1	39,1	14,0	93,5	3,9	0,35
	lot 13	15,2	46,3	38,5	11,8	109,2	5,5	0,45
	Moyenne	12,9	50,2	38,5	14,3	96,4	4,6	0,38
	Ecart type	1,0	8,5	1,0	2,0	15,5	0,9	0,06
Non agriculture biologique	lot 14	11,8	53,0	39,4	13,4	75,7	3,7	0,37
	lot 15	12,6	57,2	39,8	11,0	64,1	2,6	0,28
	lot 16	13,3	40,1	38,6	13,0	98,2	3,7	0,46
	lot 17	15,0	59,7	40,7	13,1	76,7	4,4	0,34
	lot 18	11,2	42,6	36,2	12,3	96,1	3,5	0,24
	lot 19	12,3	46,4	40,2	11,5	101,7	3,7	0,21
	lot 20	16,2	54,7	38,7	14,3	97,4	9,7	0,36
	lot 21	12,4	59,3	30,1	14,6	79,2	3,9	0,25
	lot 22	13,4	48,2	40,3	13,2	78,9	3,7	0,26
	lot 23	14,0	49,7	41,8	15,1	104,7	8,0	0,35
	Moyenne	13,2	51,1	38,6	13,2	87,3	4,7	0,31
	Ecart type	1,5	6,8	3,3	1,3	13,9	2,3	0,08
Total lots (n=23)	**Moyenne**	**13,1**	**50,6**	**38,5**	**13,8**	**92,3**	**4,6**	**0,35**
	Ecart type	**1,2**	**7,6**	**2,2**	**1,8**	**16,3**	**1,6**	**0,07**
	minimum	11,2	38,2	30,1%	10,9%	64,1	2,6	0,21
	maximum	16,2	73,3	41,8%	17,3%	118,9	9,7	0,48
	CV%	9,3%	15,1%	5,8%	13,2%	16,4%	34,3%	21,0%
Contrôle graine entière (Imari)	**Moyenne**	**2,5**	**5,1**	**43,5**	**20,0**	**135,6**	**0,7**	**0,20**
	Ecart type	**0,9**	**1,8**	**3,2**	**2,0**	**0,5**	**0,2**	**0,10**

Remarque : les écarts types relatifs aux teneurs des composés du germe représentent une variabilité inter-lots, alors que les écarts types relatifs aux teneurs des composés de la graine entière sont plus représentatifs d'une variabilité analytique puisque les analyses ont été réalisées sur une seule poudre de référence de variété Imari.

On peut noter que les teneurs en isoflavones reportées dans la littérature, de l'ordre de 20 à 30 mg/g (Liu, 1999 ; Schryver, 2002), sont plus élevées que celles présentées dans le **Tableau 23**. Ceci peut s'expliquer par le fait que la plupart des études reportant des concentrations d'isoflavones ne les expriment pas en équivalents aglycones, mais en concentrations massiques des formes natives glycosylées, générant ainsi une surestimation significative des concentrations obtenues. Ici, la concentration des isoflavones a été exprimée en équivalents aglycones qui correspondent aux structures biologiquement actives. La comparaison de la concentration des structures natives avec celle des structures aglycones, sera décrite plus loin lors de l'analyse détaillée de la composition des isoflavones du germe.

Concernant la variabilité des composés du germe de soja, on observe que les teneurs en protéines et en isoflavones totales restent particulièrement stables, puisque leur coefficient de variation d'un lot à l'autre n'excède pas 5,8 % et 9,3 %, respectivement. Les autres composés, notamment les saponines, phytostérols et tocophérols, présentent des concentrations plus variables, reflétées par un coefficient de variation supérieur à 20 % sur l'ensemble des 23 lots de germe analysés. Ces variations peuvent être liées aux caractéristiques génétiques et aux conditions environnementales accompagnant le développement des graines de soja à partir desquelles les germes ont été isolés.

Il a en effet été reporté dans la littérature que les variétés de soja ou les conditions de culture telles que le lieux, l'irrigation ou la température accompagnant la croissance des plantes et la maturation des graines de soja affectent significativement la concentration des phytostérols totaux dans la graine entière de soja (Vlahakis et Hazebroek, 2000), ce qui laisse supposer que l'accumulation des phytostérols dans la fraction germe dépend également des mêmes facteurs. De même une variation significative des teneurs en saponines a été observée entre différentes variétés et différents lieux de culture (Rupasinghe *et al.*, 2003).

On peut également noter que les teneurs relevées dans les lots de germe de soja issus ou non de l'agriculture biologique ne sont pas significativement différentes. Ceci peut s'expliquer par le fait que les lots envoyés à GENIBIO par NUTRITION & SOJA représentent des mélanges de nombreuses variétés de soja, rendant la composition et les teneurs des différents métabolites plus homogènes d'un lot à l'autre.

IV.2.2. Analyse détaillée des isoflavones et des saponines : variabilité des lots

Grâce à leur forte concentration et aux diverses propriétés biologiques qui leur ont été attribuées, les isoflavones et les saponines sont des métabolites secondaires du germe de soja particulièrement intéressants. Les profils précis des familles d'isoflavones dérivées de la daidzéine, de la glycitéine et de la génistéine, ainsi que les profils des saponines appartenant aux groupes A et B, observés sur l'ensemble des 23 lots industriels de germe, sont présentés dans le **Tableau 24**.

Tableau 24. Profil des isoflavones et des saponines dans le germe natif et la graine entière de soja.

Analyse des lots industriels de germe de soja (n=23)		Germe	Cotylédons*
Isoflavones totales	Concentration massique (mg/g)	17,8 ± 3,5	2,5 – 5
	Concentration massique (éq. aglycones mg/g)	13,1 ± 1,2	1,5 – 4,5
	Concentration molaire (µmol/g)	37,9 ± 6,9	4,5 – 10,1
Répartition des 3 familles d'isoflavones	% daidzéine	57,8 ± 3,9	32,9 – 48,5
	% glycitéine	27,9 ± 4,4	1,7 – 3,3
	% génistéine	14,3 ± 1,1	49,5 – 65,0
Profil de conjugaison des isolavones	% malonyles	58,2 ± 5,8	41,7 – 64,8
	% β-glucosides	36,8 ± 4,8	30,7 – 51,3
	% aglycones	3,6 ± 1,7	1,3 – 5,2
	% acétyles	1,4 ± 0,9	2,5 – 3,0
Saponines totales	Concentration massique (mg/g)	50,6 ± 7,6	2,5 – 6,0
	Concentration massique (éq. aglycones mg/g)	20,9 ± 6,1	1,0 – 3,0
	Concentration molaire (µmol/g)	45,3 ± 11,3	2,8 – 6,5
Répartition des groupes A et B	% saponines A	55,4 ± 6,1	-
	% saponines B	44,6 ± 2,7	≈ 100 %
	ratio A/B	1,4 ± 0,1	-
Profil de conjugaison des saponines du groupe B	I+βg (%)	64,1 ± 7,6	54,7 – 59,9
	II+βa (%)	1,3 ± 0,8	10,0 – 17,7
	III + γg (%)	1,7 ± 0,7	6,5 – 12,4
	IV+ γa (%)	0,4 ± 0,4	4,2 – 9,1
	V+ αg (%)	32,5 ± 8,2	0 – 9,1
	DDMP (%)	75,7 ± 11,5	82,8 – 95,4
	Trisaccharidiques / disaccharidiques	33,9 ± 10,4	4,4 – 6,7

* : Les valeurs reportées pour les cotylédons sont issues du travail présenté précédemment (Hubert et al., 2005a).

- *Distribution des isoflavones*

Les isoflavones du germe de soja sont non seulement plus concentrées que dans les cotylédons, mais présentent également un profil tout à fait spécifique. Dans les 23 lots industriels analysés, les dérivés de la daidzéine et de la glycitéine représentent respectivement 57,8 ± 3,9 % et 27,9 ± 4,4 % des isoflavones totales, alors que la génistéine ne représente que 14,3 ± 1,1 %. La graine entière au contraire est caractérisée par une teneur élevée en génistéine, de 49,5 à 65,0 %, suivie de la daidzéine, alors que la glycitéine ne représente que de 1,7 à 3,3 % des isoflavones totales. Cette répartition des familles d'isoflavones présente une variabilité très faible d'un lot à l'autre.

Dans la graine entière de soja, quelle que soit la fraction étudiée, les isoflavones existent naturellement sous forme de molécules glycosilées, les structures malonylglucosides et β-glucosides étant les structures prédominantes (Lee *et al.*, 2003) et les structures aglycones et acétylglucosides largement minoritaires. Les résultats présentés dans le **Tableau 24** confirment ces observations, puisqu'on trouve dans les lots de germes natifs 58,2 ± 5,8 % d'isoflavones malonylglucosides et 36,8 ± 4,8 % de β-glucosides, contre 3,6 ± 1,7 % d'aglycones et 1,4 ± 0,9 % d'acétylglucosides.

- *Distribution des saponines*

Les saponines sont également beaucoup plus concentrées dans le germe que dans les cotylédons, de 6,9 à 16,2 fois plus selon les valeurs reportées dans le **Tableau 24**. Sur l'ensemble des 23 lots analysés, leur concentration molaire totale est de 45,3 ± 11,3 µmol/g, ce qui représente une fraction massique importante, de l'ordre de 5 % par rapport à la matière sèche du germe.

Concernant la répartition des saponines dans les graines de soja, on observe que le germe contient à lui seul toutes les saponines A de la graine entière, alors que les saponines du groupe B se répartissent à la fois dans le germe et les cotylédons. Dans les lots de germe de soja reçus par GENIBIO, les saponines A représentent en moyenne 55,4 ± 6,1 % des saponines totales du germe, et les saponines B 44,6 ± 2,7 %. Cette répartition est particulièrement stable d'un lot à l'autre puisque le coefficient de variation du ratio saponines A/B est inférieur à 8,0 % sur l'ensemble des 23 lots de germe analysés. Ces valeurs sont en accord avec une étude récente menée sur des germes de soja issus de 8 variétés différentes dans lesquelles les saponines A représentent 56,8 ± 6,5 % des saponines totales et les saponines du groupe B 42,5 ± 6,5 % (Decroos *et al.*, 2005).

Etant donné que l'activité biologique des saponines dépend fortement de leur structure chimique (Kinjo *et al.*, 1998 ; Gurfinkel et Rao, 2003), il nous a semblé important d'étudier la variabilité de leur teneur et de leur composition dans les lots de matière première. Sur l'ensemble des 23 lots de germe analysés, les saponines du groupe B liées à un groupement DDMP représentent 75,7 ± 11,5 % des saponines B totales, ce qui confirme que, comme dans les cotylédons, ces structures sont les formes naturellement existantes dans le germe. Certains auteurs ont même émis l'hypothèse que les formes non-DDMP sont des artéfacts apparaissant au cours du traitement des graines de soja, en particulier dans le cas de traitements thermiques ou alcalins (Kudou *et al.*, 1993 ; Decroos *et al.*, 2005 ; Yoshiki *et al.*, 2005).

Ces résultats montrent que les conditions analytiques d'extraction utilisées dans ce travail permettent de préserver la grande majorité des structures natives des saponines conjuguées. Les germes de soja subissent un bref traitement thermique avant d'être broyés, ce qui peut expliquer la présence de 24,3 % de saponines B non-DDMP.

La saponine I et sa structure DDMP correspondante (βg) sont les saponines majoritaires du groupe B dans le germe de soja. Elles représentent 64,1 ± 7,6 % des saponines B totales. La saponine V et sa structure DDMP correspondante (αg) sont exclusivement présentes dans le germe et représentent 32,5 ± 8,2 % des saponines totales, alors que les saponines II et βa sont principalement localisées dans les cotylédons. C'est pourquoi on n'en trouve que 1,8 ± 0,3 % en moyenne dans les lots analysés. En comparaison, les autres saponines {III + γg} et {IV + γa} appartenant au groupe B sont largement minoritaires.

Dans cette étude, les saponines du groupe E n'ont pas été prises en considération dans la caractérisation du germe de soja, d'une part parce qu'elles sont minoritaires par rapport aux saponines des groupes A et B, et d'autre part parce qu'elles ne sont pas considérées comme des saponines natives du soja mais plutôt comme des artéfacts issus de la photo-oxydation des saponines du groupe B (Kudou *et al.*, 1994). Avec les procédures analytiques utilisées dans le cas de cette étude, les saponines E n'ont jamais été détectées dans aucun échantillon analysé.

Par ailleurs, aucune corrélation significative n'a été observée entre la concentration des isoflavones aglycones et des sapogénols A et B ($R<0.13$), ce qui est en concordance avec les observations d'une étude antérieure menée sur différentes variétés de soja cultivées dans différents lieux (Rupasinghe *et al.*, 2003).

IV.2.3. Analyse de la variabilité des composés lipidiques du germe de soja

Comme pour les isoflavones et les saponines, la répartition des composés lipidiques, incluant les tocophérols, phytostérols et acides gras, a été déterminée dans les 23 lots de germe de soja natif analysés, et comparée avec leur répartition dans la graine entière. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 25**.

Tableau 25. Comparaison des fractions lipidiques du germe de soja et des cotylédons.

		Germe de soja (Moyenne ± écartype, n=23)	**Cotylédons**
Fraction lipidique	Huile totale (%)	13,7 ± 1,8	20,0 ± 2,0
Composition des tocophérols	Total (mg/g)	0,35 ± 0,07	0,2 ± 0,1
	α-tocophérol (%)	37,4 ± 10,5	4 – 10
	β-tocophérol (%)	1,6 ± 0,7	1 – 3
	γ-tocophérol (%)	56,5 ± 8,7	60 – 66
	δ-tocophérol (%)	4,4 ± 3,4	24 – 29
Composition des phytostérols	Total (mg/g)	4,6 ± 1,6	0,7 ± 0,2
	Campestérol (%)	5,8 ± 2,0	20 – 25
	Stigmastérol (%)	5,6 ± 1,4	18 – 22
	β-Sitostérol (%)	69,9 ± 6,2	49 – 55
	Δ^5-avenestérol (%)	6,9 ± 6,7	1 – 2
	Δ^7-stigmastérol (%)	3,2 ± 2,6	2 – 3
	Δ^7-avenestérol (%)	5,8 ± 2,0	1 – 2
Composition des acides gras	Total (mg/g)	92,3 ± 15,1	134,1 ± 0,5
	Acide palmitique (%)	14,8 ± 1,2	18,4 – 21,3
	Acide stéarique (%)	3,8 ± 1,5	2,2 – 2,5
	Acide oléique (%)	10,0 ± 3,4	6,9 – 9,7
	Acide linoléique (%)	56,2 ± 2,5	59,3 – 63,5
	Acide linolénique (%)	15,1 ± 2,6	7,5 – 11,3

Le germe de soja contient 13,7 ± 1,8 % d'huile, composée à plus de 60 % d'acides gras poly-insaturés riches en acide linoléique et linolénique dont les propriétés pharmacologiques sont aujourd'hui reconnues. Le profil du germe de soja en acides gras est de 56,2 ± 2,5 % d'acide linoléique, suivi des acides linolénique, palmitique, oléique et stéarique représentant respectivement 15,1 ± 2,6 %, 14,8 ± 1,2 %, 10,0 ± 3,4 % et 3,8 ± 1,5 % des acides gras totaux. La quantité d'huile totale extraite du germe de soja est plus faible que celle des cotylédons, mais sa composition en métabolites secondaires potentiellement bénéfiques pour la santé humaine est particulièrement intéressante.

Les tocophérols, qui sont des antioxydants puissants appartenant à la famille de la vitamine E, sont significativement plus concentrés dans le germe que dans les cotylédons. Dans le germe, le γ-tocophérol reste majoritaire comme dans les cotylédons puisqu'il représente 56,5 ± 8,7 % des tocophérols totaux, mais l'α-tocophérol, représentant 37,4 ± 10,5 % des tocophérols totaux, est plus concentré dans l'huile du germe que dans les cotylédons, ce qui est intéressant puisque l'α-tocophérol possède le pouvoir vitaminique le plus important des 4 isomères.

Concernant les phytostérols, le germe de soja, avec une concentration de 4,6 ± 1,6 mg/g, est également plus riche que les autres compartiments de la graine de soja. Les phytostérols sont des composés intéressants puisque leur consommation a été associée à l'inhibition de l'absorption du cholestérol, et donc à une diminution des risques de maladie cardiovasculaire (Ostlund, 2004). Le β-sitostérol est le phytostérol majoritaire de l'huile de soja quelle que soit la fraction étudiée de la graine, mais il représente tout de même une fraction plus importante des phytostérols totaux dans le germe (69,9 ± 6,2 %) que dans les cotylédons (49 – 55 %).

IV.3. Caractérisation chimique et évaluation de la variabilité des extraits d'isoflavones

IV.3.1. Description du procédé industriel d'extraction

La nature du procédé industriel utilisé ainsi que les conditions telles que la température, la durée du traitement thermique, la combinaison des traitements avec des composés alcalins ou d'autres produits chimiques, déterminent l'élimination ou la rétention des composés présents dans la matière première. Dans cette partie de l'étude, la variabilité des métabolites secondaires identifiés dans le germe de soja natif a été évaluée à l'issue d'un procédé d'extraction développé par GENIBIO conduisant à un extrait enrichi en isoflavones. L'objectif était de déterminer l'impact de ce procédé sur la concentration et le profil des isoflavones, mais aussi sur d'autres composés susceptibles d'avoir été concentrés en même temps que les isoflavones, et pouvant déboucher sur de nouvelles applications dans le domaine de la diététique, de la cosmétique ou de la pharmacologie. Le procédé d'enrichissement développé par GENIBIO consiste en 3 étapes majeures :

Etape 1 : Extraction. Environ 100 kg de poudre de germe de soja débactérisé et de granulométrie inférieure à 500 µm sont extraits par une solution aqueuse d'acétone (80 % v/v) avec un rapport de dilution de 0,15 kg/L pendant 1 heure à température ambiante. Le type de solvant d'extraction et en particulier sa polarité influence significativement la concentration finale des isolavones dans l'extrait obtenu.

Le choix du solvant d'extraction est fonction de la concentration finale ciblée. Si la teneur initiale en isoflavones de la matière première est supérieure à 2 %, le solvant utilisé est une solution aqueuse d'éthanol à 80 %. Si cette teneur est inférieure à 2 %, le solvant utilisé est une solution aqueuse d'acétone, puisque l'utilisation d'acétone conduit à un meilleur rendement d'extraction par rapport à une solution hydro-alcoolique.

Dans le cas de notre étude, les lots de germe étudiés, prélevés chez Genibio en 2004 et 2005, étaient issus des récoltes de 2003 et 2004, années pendant lesquelles la période de maturation des graines de soja s'était accompagnée de température élevées. Pour cette raison, les teneurs en isoflavones dans les lots de matière première se sont rarement révélées supérieures à 2 % et les résultats présentés ici ne concernent que des lots ayant été extraits par une solution aqueuse d'acétone. Or, dans ce cas, les matières grasses contenues dans le germe de soja, solubles dans l'acétone, provoquent des perturbations lors de l'étape de séchage de l'extrait, induisant des pertes de rendement. Pour éviter ce phénomène, une étape de délipidation a donc été insérée avant l'étape d'extraction par un trempage du germe broyé pendant 30 minutes dans une solution d'acétone (100 %) dans un rapport de dilution de 0,15 kg/L, permettant ainsi d'éliminer l'huile du germe sans extraire les isoflavones et d'améliorer le rendement d'extraction.

Etape 2 : Atomisation. La poudre de germe de soja est ensuite égouttée pendant plusieurs heures et l'extrait obtenu est séché par un procédé d'atomisation. Le séchage par atomisation consiste à pulvériser la solution à sécher dans un courant de gaz chaud (180 °C) de manière à obtenir instantanément une poudre. Une installation de séchage par atomisation comprend plusieurs circuits : le circuit du produit liquide, le circuit d'air chaud et l'enceinte de séchage. L'organe de pulvérisation est constitué d'une turbine dont la vitesse de rotation est réglée à 35 Hz. La force centrifuge de la turbine éjecte et disperse le liquide dans l'enceinte de séchage. Le circuit d'air chaud commence par une aspiration de l'air atmosphérique à travers des filtres. L'air est ensuite réchauffé et soufflé par un ventilateur jusqu'au disperseur d'air qui mélange le gaz de séchage avec les particules de brouillard d'atomisation. L'atomisation permet un séchage rapide, puisque par la formation de fines gouttelettes, la pulvérisation de la solution augmente la surface d'échange du liquide à évaporer. La quantité d'extrait récupéré à partir de 100 kg de germe de départ à l'issue des étapes 1 et 2 est de l'ordre de 35-45 kg. La poudre ainsi obtenue après atomisation constitue l'extrait de germe de soja enrichi en isoflavones, appelée « extrait brut ». Il est conservé dans un endroit sec à l'abri de la lumière.

Etape 3 : Ajustement de la teneur en isoflavones. L'extrait brut est ensuite mélangé avec un ou plusieurs lots de poudre de germe de soja natif. Ce mélange constitue le véritable ingrédient final, qui, après une dernière étape de conditionnement en sachets, sera commercialisé sur le marché des compléments alimentaires. L'opération de mélange des extraits bruts avec du germe natif a pour but d'ajuster la concentration massique des isoflavones à une valeur cible (4-5 % , 6-6,5 % ou 7-7,5 %) selon la demande du client.

IV.3.2. Influence du procédé d'extraction sur le profil des isoflavones et des saponines

Il s'agit ici d'évaluer l'influence du procédé industriel d'extraction sur l'évolution des teneurs et de la composition, non seulement des isoflavones, mais aussi des saponines initialement présentes en concentration élevée dans le germe de soja natif et susceptibles d'avoir été concentrées en même temps que les isoflavones au cours du procédé. Les autres métabolites d'intérêt détectés dans le germe natif ne sont pas considérés ici car le procédé développé par Genibio destiné à concentrer les isoflavones, ne permet pas d'extraire les protéines qui sont insolubles dans le solvant d'extraction utilisé, ni les acides gras, les phytostérols et les tocophérols contenus dans la fraction lipidique éliminée lors de l'étape de délipidation.

- *Modification de la teneur et de la composition des isoflavones*

Le **Tableau 26** représente la teneur et la composition des isoflavones dans 18 lots d'extrait d'isoflavones (bruts ou mélangés) issus du procédé d'extraction développé par GENIBIO. Le procédé permet d'obtenir un extrait brut concentré en isoflavones de 113,0 à 227,1 µmol/g, soit une teneur massique de 5,0 % à 10,4 % (2,8 % à 7,0 % en équivalent aglycones).

En comparaison avec le germe natif, l'extrait final contient donc de 3,0 à 6,0 fois plus d'isoflavones que la matière première. La répartition des 3 familles d'isoflavones dérivées de la daidzéine, de la glycitéine et de la génistéine reste stable au cours du procédé d'extraction puisque les extraits bruts directement issus du procédé contiennent 55,7 ± 4,8 % de daidzéine, 30,2 ± 5,5 % de glycitéine et 14,1 ± 1,6 % de génistéine en moyenne sur l'ensemble des 9 extraits bruts analysés. Ce profil est original par rapport aux extraits traditionnellement fabriqués à partir de la graine entière, tout d'abord parce qu'il est particulièrement riche en daidzéine, seule isoflavone pouvant être métabolisée en équol et ensuite parce qu'il contient une teneur élevée en glycitéine, isoflavone exclusive du germe, dont les extraits issus des graines entières sont généralement dépourvus.

Tableau 26. Teneur et composition des isoflavones dans les extraits industriels d'isoflavones de soja

Lots		Isoflavones totales			Profil de conjugaison				Composition		
		total (mg/g)	éq. Aglyc. (mg/g)	total molaire (µmol/g)	Malo-nyles (%)	beta-gluco-sides (%)	Acé-tyles (%)	Agly-cones (%)	daidzein (%)	glycitein (%)	genistein (%)
1	Extrait brut	50,2	35,0	113,0	30,6	61,8	1,8	5,8	57,3	28,3	14,4
2		54,8	39,5	120,0	39,4	51,6	4,6	4,4	51,3	33,0	15,7
3		62,3	44,4	132,7	48,5	45,4	3,7	2,4	47,4	41,2	11,4
4		63,4	42,8	140,1	34,5	60,6	2,0	2,9	55,5	33,2	11,3
5		74,4	53,1	160,2	48,4	44,9	2,7	3,9	51,9	32,4	15,7
6		86,8	59,9	191,8	37,2	56,1	2,5	4,1	58,1	27,2	14,8
7		99,2	68,6	223,8	28,3	64,0	2,5	5,3	56,5	29,5	14,0
8		99,8	67,8	224,0	32,4	61,2	1,7	4,6	62,2	22,9	14,8
9		104,0	69,9	227,1	42,3	53,0	2,0	2,8	60,8	24,5	14,7
Moyenne		**77,2**	**53,4**	**170,3**	**38,0**	**55,4**	**2,6**	**4,0**	**55,7**	**30,2**	**14,1**
Ecart type		**20,8**	**13,6**	**47,0**	**7,3**	**7,1**	**1,0**	**1,2**	**4,8**	**5,5**	**1,6**
10	mélange ciblé à 4-5%	38,7	27,9	84,9	39,2	51,7	4,7	4,4	52,1	32,3	15,6
11		40,2	27,9	88,8	35,7	57,5	2,5	4,3	53,3	33,2	13,5
12		47,4	33,9	102,5	40,2	49,8	7,7	2,3	51,6	36,6	11,8
13		49,7	34,8	107,6	41,0	51,2	5,3	2,4	53,2	35,4	11,5
Moyenne		**44,0**	**31,1**	**95,9**	**39,0**	**52,6**	**5,0**	**3,3**	**52,5**	**34,4**	**13,1**
Ecart type		**5,4**	**3,8**	**10,8**	**2,3**	**3,4**	**2,2**	**1,2**	**0,8**	**2,0**	**1,9**
14	mélange ciblé à 6-6,5%	61,3	42,9	134,3	40,9	52,6	2,1	4,3	54,6	31,1	14,4
15		62,4	43,8	134,6	47,8	46,9	1,6	3,6	53,3	32,6	14,1
16		64,1	45,0	140,3	42,4	50,9	2,0	4,6	55,9	29,2	14,8
Moyenne		**62,6**	**43,9**	**136,4**	**43,7**	**50,1**	**1,9**	**4,2**	**54,6**	**30,9**	**14,5**
Ecart type		**1,4**	**1,1**	**3,4**	**3,6**	**2,9**	**0,3**	**0,5**	**1,3**	**1,7**	**0,4**
17	mélange ciblé à 7-7,5%	71,9	51,4	154,5	50,2	43,8	2,0	4,0	51,1	33,0	15,9
18		75,4	52,0	167,8	30,5	62,4	3,9	3,2	57,0	30,1	12,8
Moyenne		**67,0**	**46,7**	**147,1**	**39,4**	**53,7**	**3,1**	**3,9**	**54,6**	**31,4**	**14,0**
Ecart type		**19,9**	**13,2**	**44,8**	**6,6**	**6,4**	**1,6**	**1,0**	**3,7**	**4,3**	**1,6**

Les données concernant la répartition de chaque famille d'isoflavone dans un extrait destiné à la consommation sont essentielles puisque les dérivés de la daidzéine, de la glycitéine et de la génistéine ont des propriétés biologiques différentes. Le procédé d'enrichissement utilisé par GENIBIO permet de conserver les formes natives présentes dans la matrice végétale naturelle puisque l'extrait final contient plus de 95 % d'isoflavones conjuguées, liées à un groupement malonyle, acétyle ou β-glucoside. Ces fractions glycosilées seront naturellement libérées sous l'action des enzymes digestives à travers le système gastro-intestinal.

Cependant, le procédé d'enrichissement de cet ingrédient affecte le degré de conjugaison des isoflavones glycosilées. Les malonylglucosides, majoritaires dans les lots de germes natifs, ne représentent plus que 38,0 ± 7,3 % des isoflavones totales dans les extraits issus du procédé d'enrichissement. En parallèle, les structures β-glycosilées deviennent majoritaires à l'issue du

procédé d'enrichissement avec une teneur moyenne de 55,4 ± 7,1 %. L'instabilité des groupements malonyles en solution explique leur dégradation pendant le procédé d'extraction (Coward *et al.*, 1998 ; Jackson *et al.*, 2002).

Le degré de conjugaison des isoflavones est important puisqu'il existe une relation structure-activité selon le degré de conjugaison des molécules pouvant influencer leur biodisponibilité. Les modifications de matrice peuvent en effet affecter les concentrations circulantes des structures aglycones qui initient les processus de liaison aux récepteurs oestrogéniques requis pour stimuler la croissance des tumeurs au niveau des cellules mammaires (Allred *et al.*, 2005). Malheureusement, la plupart des études menées sur l'homme jusqu'à aujourd'hui n'accordent pas d'attention au profil précis des isoflavones contenues dans les produits testés cliniquement.

Les extraits bruts directement issus du procédé d'extraction sont mélangés avec du germe natif dans le but d'obtenir des ingrédients finaux contenant 4,0-5,0 % ; 6,0-6,5 % ou 7,0-7,5 % d'isoflavones totales. La teneur et la composition des isoflavones contenues dans ces mélanges sont également représentées dans le **Tableau 26**. Comme dans les extraits bruts, la répartition de chaque famille d'isoflavones (daidzéine, glycitéine et génistéine), reste stable depuis l'extrait brut jusqu'à la poudre finale mélangée, de même que la répartition des structures conjuguées, révélant que l'opération de mélange n'affecte pas la composition des isoflavones ni leur profil de conjugaison.

- *Modification de la teneur et de la composition des saponines*

En comparaison avec les isoflavones, l'effet des procédés de transformation industriels sur l'évolution du profil des saponines a été beaucoup moins décrit dans la littérature, principalement à cause des difficultés analytiques liées à la quantification des saponines. De plus, l'influence des procédés industriels d'extraction sur l'enrichissement éventuel des autres métabolites secondaires potentiellement actifs sont rarement considérés par les fabriquants de compléments alimentaires qui tendent à ne revendiquer que la teneur en isoflavones du produit final.

Dans notre étude, la mise au point des 2 méthodes de quantification des saponines du groupe B d'une part et des sapogénols A et B d'autre part nous a permis de caractériser les saponines dans les extraits de germe de soja enrichis en isoflavones, et de comparer leur teneur et leur profil par rapport au germe natif (**Tableau 27**).

Les teneurs en isoflavones et en saponines B dans les lots de germe de soja natifs ont été évaluées à 37,9 ± 6,9 µmol/g et 50,6 ± 7,6 µmol/g, respectivement. Les saponines sont des composés solubles dans l'alcool et l'acétone. A l'issue de l'étape d'extraction, leur teneur totale varie de 82,7 µmol/g à 194,8 µmol/g. Le procédé industriel utilisé par GENIBIO conduit donc à un extrait enrichi de 3,0 à 6,0 fois en isoflavones mais également de 1,6 à 4,3 fois en saponines. La fraction protéique pourrait jouer un rôle sur le rendement d'extraction des saponines. De possibles interactions

hydrophobes, liaisons hydrogènes ou ioniques pourraient expliquer que l'enrichissement en saponines est un peu plus faible que l'enrichissement en isoflavones dans l'extrait final de germe de soja (Shimoyamada *et al.*, 1998).

Tableau 27. Teneur et composition des saponines dans les extraits industriels de germe de soja.

Lots		Saponines totales			Répartition des groupes A et B			Profil de conjugaison des saponines du groupe B		
		Concen-tration massique (mg/g)	Eq. Aglyc. (mg/g)	Concen-tration molaire (µmol/g)	sapogenol A (%)	sapogenol B (%)	ratio A/B	I+beta g (%)	V+ alpha g (%)	% DDMP
1	Extrait brut	169,1	68,9	147,7	55,8	44,1	1,3	70	27	49,2
2		167,8	67,7	144,8	59,5	40,5	1,5	66	26	49,0
3		96,1	38,6	82,7	60,6	39,3	1,5	64	26	50,2
4		171,8	70,1	150,2	55,5	44,5	1,2	66	29	50,2
5		194,7	78	166,6	62,1	37,9	1,6	69	25	24,0
6		224,6	91	194,8	57,9	42,1	1,4	69	26	44,2
7		221,3	89,3	190,9	59,6	40,4	1,5	70	27	30,8
8		113,1	45,9	98,3	57,3	42,7	1,3	68	30	30,3
9		144,2	58	123,9	60,9	39,1	1,6	69	28	23,2
Moyenne		**167,0**	**67,5**	**144,4**	**60,0**	**40,0**	**1,4**	**70,0**	**30,0**	**40,0**
Ecart type		**44,0**	**17,8**	**38,1**	**2,3**	**2,3**	**0,1**	**2,3**	**1,6**	**11,7**
10	Mélange ciblé à 4-5% d'isof.	111,4	45,0	96,4	58,8	41,1	1,4	71	27	54,8
11		60,5	24,8	53,2	53,7	46,3	1,2	68	28	50,8
12		111,9	45,3	97,1	58,1	41,8	1,4	68	24	51,4
13		108,2	44,0	94,2	56,9	43,0	1,3	64	27	48,3
Moyenne		**98,0**	**39,8**	**85,2**	**60,0**	**40,0**	**1,3**	**70,0**	**30,0**	**50,0**
Ecart type		**25,1**	**9,9**	**21,4**	**2,2**	**2,3**	**0,1**	**3,0**	**1,6**	**2,7**
14	Mélange ciblé à 6-6,5% d'isof.	169,6	68,2	145,9	60,4	39,6	1,5	71	24	40,4
15		171,0	69,0	147,8	59,1	40,9	1,4	67	27	50,3
16		197,3	79,8	170,8	58,6	41,3	1,4	71	26	50,2
Moyenne		**179,3**	**72,4**	**154,8**	**60,0**	**40,0**	**1,5**	**70,0**	**30,0**	**0,5**
Ecart type		**15,6**	**6,4**	**13,8**	**0,9**	**0,9**	**0,1**	**2,5**	**1,3**	**0,1**
17	Mélange ciblé à 7-7,5% d'isof.	148,0	59,0	126,0	63,9	36,0	1,8	66	22%	15,8
18		174,9	70,7	151,3	58,8	41,1	1,4	65	26%	52,2
Moyenne		**161,4**	**64,8**	**138,7**	**60,0**	**40,0**	**1,6**	**70,0**	**20,0**	**30,0**
Ecart type		**1,9**	**8,3**	**17,9**	**0,1**	**0,1**	**0,2**	**0,1**	**0,1**	**30,0**

Le profil des saponines contenues dans les 9 lots d'extrait bruts de germe analysés est intéressant puisque les deux groupes de saponines A et B sont présents, conférant au produit les activités biologiques des deux familles de molécules. La répartition des 2 groupes de saponines A et B n'est pas significativement modifiée par cette étape : les saponines A, représentant 55,4 ± 6,1 % des saponines totales dans le germe natif restent majoritaires et représentent 60,0 ± 2,3 % dans l'extrait final. De même le ratio A/B est resté constant avec une valeur moyenne de 1,4 ± 0,1 avant ou après extraction, ce qui peut s'expliquer par les polarités voisines des deux groupes de molécules.

Certains procédés d'extraction conduisent à une altération des structures chimiques natives des saponines, induisant une modification de leur profil de conjugaison. Concernant les saponines du groupe B, on observe que la concentration des structures DDMP-conjuguées a diminué de 75,7 ± 11,5 % à 40,0 ± 1,7 % après l'extraction, indiquant que le groupement DDMP attaché au squelette aglycone a été libéré. Les molécules de maltol sont en effet sensibles en solution aux conditions de température ou de pH accompagnant l'extraction des saponines et les autres étapes du procédé (Massiot *et al.*, 1996 ; Berhow *et al.*, 2002) et il a plusieurs fois été décrit que sous l'influence d'un traitement thermique ou d'une augmentation du pH, les saponines du groupe B conjuguées avec un groupement DDPM (αg, βg, βa, γg, γa) sont converties en leur forme non-DDMP correspondante (V, I, II, III, IV) (Rickert, 2004 ; Yoshiki *et al.*, 2005).

Le **Tableau 27** présente également les profils des saponines majoritaires {I + βg} et {V + αg}. A l'issue du procédé d'extraction, la saponine βg et sa structure non-DDMP correspondante I représentent en moyenne 70,0 ± 2,3 % des saponines B par rapport à 64,1 ± 7,6 % détectées dans les lots industriels de germe natif, et la saponine αg et sa structure non-DDMP correspondante V représentent en moyenne 30,0 ± 1,6 % des saponines B par rapport à 32,5 ± 8,2 % détectées dans le germe natif. Ces valeurs non significativement différentes prouvent que le procédé d'extraction des isoflavones du germe de soja par une solution aqueuse d'éthanol ou d'acétone mené à température ambiante n'affecte ni les liaisons β-D-glucose, ni les liaisons α-L-Rhamnose des chaînes glycosilées des saponines du groupe B.

IV.3.3. Conclusion

Ce travail d'évaluation de la variabilité des composés actifs du germe de soja depuis la matière première native jusqu'à l'ingrédient obtenu par une extraction à l'acétone, met en évidence la nécessité de suivre l'évolution de l'ensemble des métabolites au cours de la transformation. Les résultats ont en effet montré que le procédé industriel développé par GENIBIO dans le but d'augmenter la teneur en isoflavones, conduit également à l'enrichissement de l'ingrédient final en d'autres composés potentiellement actifs, en particulier les saponines.

Ces observations soulignent l'importance de contrôler la composition des matrices végétales lorsqu'elles sont soumises à un procédé de transformation. L'impact des procédés sur les nombreuses substances contenues dans des matrices aussi complexes, sera en effet totalement différent selon la structure ou la polarité des composés à extraire ou à éliminer. De plus, dans le cas des matrices naturelles, ces composés sont eux-mêmes influencés par leur environnement moléculaire et soumis à des interactions pouvant se répercuter sur l'efficacité de leur extraction. On comprend alors que la caractérisation d'un produit final issu d'un procédé industriel ne peut pas se réduire à une seule famille de molécules. En s'appuyant sur l'étude de 25 produits commerciaux, les résultats décrits ci-après viendront renforcer ces observations, en montrant que les compléments alimentaires enrichis en isoflavones présentent des teneurs en composés bioactifs extrêmement variables.

IV.4. Caractérisation de compléments alimentaires commerciaux enrichis en isoflavones

IV.4.1. Objectif de l'étude

Il vient d'être montré que les extraits dérivés du germe soja contiennent une grande diversité de composés susceptibles d'intéragir avec les isoflavones et que leurs teneurs et leurs compositions dans l'ingrédient final sont fortement influencées par le type de procédé industriel utilisé.

De plus, dans le cas des extraits enrichis en isoflavones, l'origine de la matière première est un facteur très influent sur le profil de ces molécules et il peut arriver que des produits annonçant des teneurs totales équivalentes soient en réalité très différents au niveau du profil de leur composition. Les extraits issus de graines entières ou de cotylédons seront majoritairement composés des dérivés de la génistéine et de la daidzéine, alors que les compléments alimentaires fabriqués à partir de germe de soja seront riches en dérivés de la daidzéine et de la glycitéine mais faiblement concentrés en génistéine. Chaque produit présente donc un profil d'isoflavones tout à fait caractéristique de la fraction de la graine de soja utilisée au départ. Cependant, bien que les fournisseurs d'ingrédients communiquent clairement sur la typicité de leurs produits, ce n'est pas encore le cas des fabricants de compléments alimentaires. Par exemple, Arkopharma ne précise pas l'origine de Phytosoya, fabriqué à partir de germe, leader sur le marché français des compléments destinés à atténuer les troubles de la ménopause. Ainsi, les choix concernant la matière première et les différents traitements utilisés lors des procédés de fabrication se répercutent directement sur la composition des extraits commerciaux d'isoflavones.

De plus, une autre partie de ce travail de recherche s'est consacrée à l'étude de la variabilité des composés potentiellement actifs présents dans différents produits commerciaux à base d'isoflavones de soja. Cette étude a été réalisée sur 25 compléments alimentaires dérivés du soja, vendus en France et aux Etats-Unis et destinés à prévenir les symptômes liés à la ménopause. L'objectif était de souligner l'importante variabilité des nutriments et des métabolites secondaires présents dans des produits annonçant des teneurs identiques en isoflavones afin de relier clairement les effets biologiques annoncés ou supposés avec des familles de molécules potentiellement impliquées. Une variabilité importante de la composition des métabolites autres que les isoflavones pourrait en effet à elle seule expliquer une grande partie des effets contradictoires observés lors d'études cliniques ou épidémiologiques publiées dans la littérature. Une évaluation systématique de cette variabilité pourrait constituer un apport supplémentaire d'informations utile tant pour les fabricants de compléments alimentaires que pour les consommateurs.

Cette étude a fait l'objet d'une troisième publication :

Jane Hubert, François Paul, Jean Daydé, Monique Berger, (**2006**). "Composition variability in soy-derived dietary supplements designated for menopausal symptom prevention". *OCL,* 13(4):*in press*.

Composition variability in soy-derived dietary supplements designated for menopausal symptom prevention

Jane HUBERT[1,2]
François PAUL[1]
Jean DAYDE[2]
Monique BERGER[2]

[1] Genibio Recherche, Z.I du Couserans, 09190 Lorp Sentaraille, France
[2] Laboratoire d'agrophysiologie UMR 1054 INRA/ESA Purpan, 75 voie du TOEC, 31076 Toulouse, France
<monique.berger@esa-purpan.fr>

Abstract: *An increasing number of soy isoflavone supplements are commercialized and many investigations are conducted to define their real impact on human health. The presence of other compounds (soyasaponins, phytosterols, polyunsaturated fatty acids...) is rarely considered when discussing the bioactivity of an isoflavone-enriched product. Moreover, the process used can modify the phytochemical content and composition of the final product. This report evaluated the variability in content and composition of isoflavones as well as soyasaponins, proteins, fatty acids and α-galactooligosaccharides of 25 soy based dietary supplements. For isoflavones and soyasaponins, analyzed by high performance liquid chromatography coupled with an ultraviolet detector (HPLC/UV), the 'intra product' variability was investigated by analyzing two different lots of five of these 25 dietary supplements. Proteins were determined through the quantification of total nitrogen by an elementar analyzer, fatty acids by gaz chromatography, and α-galactooligosaccharides were analyzed using a refractive index detector.*

These components showed a high variability: the total isoflavone contents, expressed as aglycone equivalents, varied from 4.4 mg/g (16.7 μmol/g) to 95.3 mg/g (365.6 μmol/g), and the isoflavones/soyasaponins ratio varied from 0.9 (more saponins than isoflavones) to 12.9. In the same way, the protein contents ranged from 0.4 to 42.9%, and the lipid contents from 1.6 to 20%. A high variability was also observed in the profiles of these metabolites. All these differences allowed us to distinguish two main classes of dietary supplements; the whole seed based products, with genistein occurring as the major isoflavone, and the soy germ based products, with a low genistein but high glycitein content. Soy germ and whole seed based products displayed also very contrasted profiles for the other components. An additional variability, more related to the process used, was detected when the conjugation profiles were taken into account, as both heat and pH can selectively affect isoflavones and soyasaponins conjugation. Analyzing different lots revealed the importance of raw material and process cumulated variability: Total isoflavones displayed large decreases (30%) or increases (17%), and soyasaponin contents varied from 80% decrease to 30% increase. The characterization of the complex phytochemical mixture of a natural dietary supplement needs to be clarified since some active compounds may be responsible for additive, synergistic or antagonist effects only attributed to isoflavones. At least, given its influence on the end product composition, the information about the raw material origin (germ or whole seed) is of great interest.

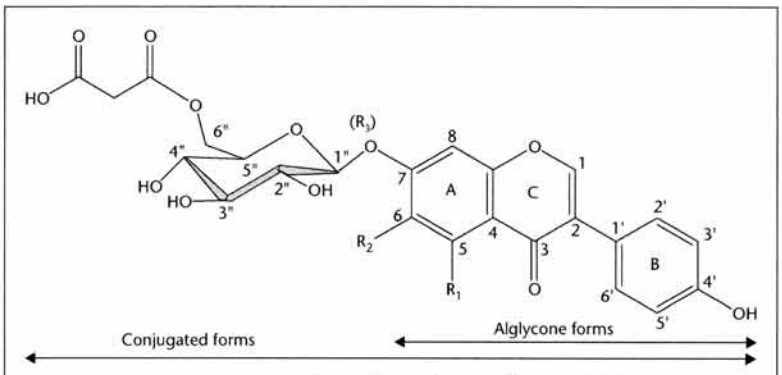
Key words: *isoflavones, dietary supplement, soy germ, soyasaponins*

Introduction

Several epidemiological and clinical studies associate significant health benefits with soy-derived product consumption. Benefits such as prevention of menopausal symptoms [1, 2], attenuation of bone loss during the menopausal transition [3], colon and breast cancer [4-8], and cardiovascular diseases [9] have been particularly attributed to the presence of isoflavones.

Isoflavones found in soybean and soy derived products have three distinct structural forms derived from the aglycone molecules genistein, daidzein, and glycitein, and specific structure related biological activity [10, 11]. The three aglycones may be derivatized to corresponding 7-O-β-glucosides (genistin, daidzin and glycitin), and subsequently malonylated (6''-O-malonylgenistin, 6''-O-malonyldaidzin and 6''-O-malonylglycitin) *(figure 1)*. The acetyl forms arise from malonyl conjugates mainly under heat treatments [12-14]. Consequently, each aglycone is represented by four conjugated forms, giving the twelve isoflavones found in soy based products. The variability of total isoflavones in soy foods or dietary supplements has been reported in several studies [15-17], but information concerning the variability of isoflavone profile in these products remains unclear. Most of the reviews and meta-analysis evaluating the effect of isoflavone treatments in menopausal symptoms have not taken into account neither the chemical identity of individual isoflavone molecules concentrated into the tested products nor the compositional ratio of isoflavones, nor their ability to be metabolized into a more efficient molecule such as equol [18, 19]. However, since only aglycones are absorbed, the conjugated forms are hydrolyzed in human gut, leading to a

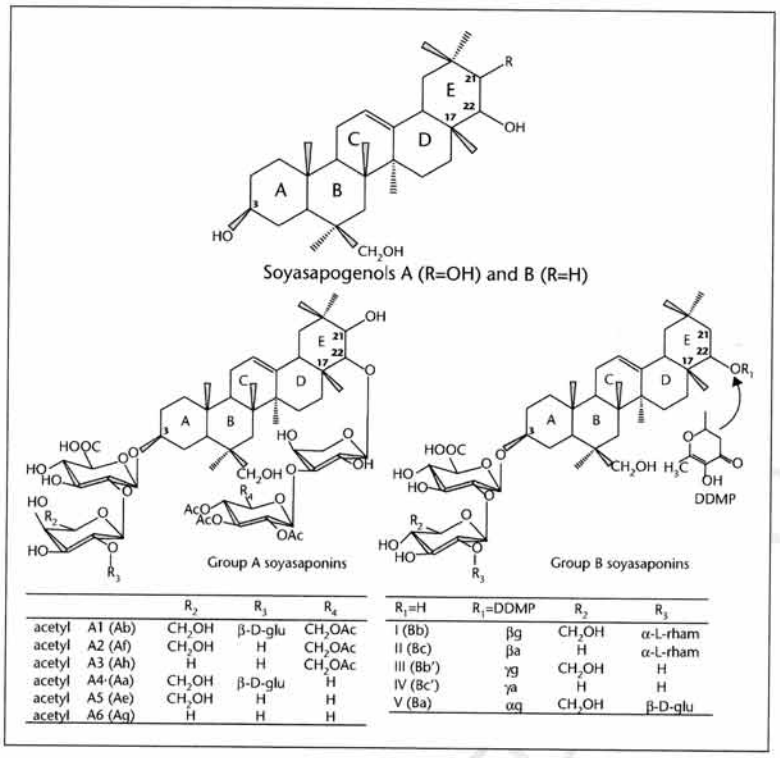
UNCORRECTED



	R_1	R_2	R_3
Daidzein	H	H	OH
Daidzin	H	H	O-gluc
Malonyl Daidzin	H	H	O-gluc-6"-O-malonyl
Acetyl Daidzin	H	H	O-gluc-6"-O-COOH
Genistein	OH	H	OH
Genistin	OH	H	O-gluc
Malonyl Genistin	OH	H	O-gluc 6"-O-malonyl
Acetyl genistin	OH	H	O-gluc 6"-O-COOH
Glycitein	H	OCH3	OH
Glycitin	H	OCH3	O-gluc
Malonyl Glycitin	H	OCH3	O-gluc 6"-O-malonyl
Acetyl Glycitin	H	OCH3	O-gluc 6"-O-COOH

Figure 1. *Structure of soybean isoflavones.*
The three aglycones forms (daidzein, or 4',7-dihydroxyisoflavone ; genistein, or 4',5,7-trihydroxyisoflavone; and glycitein, or 4',7-dihydroxy - 6-methoxyisoflavone) can be glycosylated, giving the 7-O-β-glycoside forms, and subsequently malonylated, giving the labile 6"-O-malonyl- β -glucosides. The acetyl forms are not genuine forms: they are produced after heat induced decarboxylation of the malonyl.

delayed bioavailability of the glycosides and consequently isoflavone pharmacokinetics, may strongly depend on the isoflavone composition of the soy based product absorbed [20, 21]. There are scarcely studies taking into account the presence of other components in isoflavone dietary supplements, despite their possible effects on human health even at low concentrations. Indeed, these compounds may confer additive, different or unsuitable biological properties to the isoflavone dietary supplements. For instance, decreased serum lipid levels may be dependent on interaction between isoflavones, saponins and proteins [22, 23].
Soyasaponins are almost as abundant as isoflavones in the soybean seed. They contain an aglycone (soyasapogenol A or B), linked to one (monodesmosidic) or two (bidesmosidic) oligosaccharidic chains *(figure 2)*. Soyasaponins A are mainly expressed in the germ. They are supposed to be responsible for undesirable bitter and astringent taste in soy-food products, through the presence of acetyl groups on the last sugar of their specific oligosaccharidic chain [24, 25]. Group B monodesmosidic soyasaponins might be responsible for the health contributing activities of soyasaponins [26, 27]. The genuine soyasaponins B (*i.e.* αg, βg, βa, γg and γa), are conjugated with a 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP)-group, and predominate their corresponding non-DDMP structures (*i.e.* V, I, II, III and IV respectively), formed as artifacts during heat or alkaline treatment [28]. Soyasaponin V and its corresponding DDMP form, αg, are found exclusively in the germ, while soyasaponins II and βa are mainly located in the cotyledons [27, 29]. Soyasaponins I and βg are the major soyasaponins in both parts of the seed. The ratio of soyasaponins in soygerm: cotyledon is around 9 : 1 [30]. The effects of soyasaponins on human health have received much less attention than isoflavones, and little is known about their bioavailability. This is mostly due to the lack of purified standards of the different conjugated forms of soyasaponins, and consequently to the awkward quantification of these forms. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that soyasaponins exert hypocholesterolemic [31], hepatoprotective [32], or anticarcinogenic [33] activities, suggesting that these phytochemicals may play a role in preventing human diseases.
It is also known that dietary polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have an effect on plasma lipid levels, cardiovascular and immune function, or neuronal development [34]. A recent study comparing the effect of an isoflavone extract alone or combined with a PUFAs supplement on menopausal symptoms, has shown a greater efficacy of the isoflavone plus PUFAs treatment, probably due to the ability of Omega-3 fatty acids to reduce the number of hot flushes through an action on neuronal membranes [35]. The fatty acids profile of the whole seed is generally reported to have high oleic (24%) and linoleic acid (54%), and low palmitic (11%) and linolenic acid (7%) contents [36], whereas in the germ, linolenic and linoleic acids represent about 17% and 53% of the fatty acids, respectively [37].
Soy peptides can also have hypocholesterolemic [38, 39], or anticarcinogenic activity [40]. Thus, variability of the dietary supplements in protein content or composition can also affect their biological activity.
The health effect of soybean compounds is closely related to the nature of their digested products. For example, only a third of the human population is able to metabolize the isoflavone daidzein into equol, which has a greatest phytoestrogenic and antioxidant activity than daidzein. This conversion is closely related to the nature of gastrointestinal microflora, which may in turn be influenced by dietary habits. It has been shown on an ovariectomized mice model that the combination of dietary fructo-oligosaccharides (FOS) with isoflavones prevent osteoporosis [41]. This suggest that particular components with proven prebiotic activity can influence the bioavailability of isoflavone, and consequently there biological effects. In the soybean seed, raffinose and stacchyose are the most



		R_2	R_3	R_4
acetyl	A1 (Ab)	CH_2OH	β-D-glu	CH_2OAc
acetyl	A2 (Af)	CH_2OH	H	CH_2OAc
acetyl	A3 (Ah)	H	H	CH_2OAc
acetyl	A4·(Aa)	CH_2OH	β-D-glu	H
acetyl	A5 (Ae)	CH_2OH	H	H
acetyl	A6 (Ag)	H	H	H

R_1=H	R_1=DDMP	R_2	R_3
I (Bb)	βg	CH_2OH	α-L-rham
II (Bc)	βa	H	α-L-rham
III (Bb')	γg	CH_2OH	H
IV (Bc')	γa	H	H
V (Ba)	αg	CH_2OH	β-D-glu

Figure 2. *Structure of soyasapogenol A, B and of their corresponding glycosylated forms.*
Group A soyasaponins are mainly found in soy germ. Their acetyl conjugations are thought to be responsible for the bitter or astringent taste of soyfoods. In the group B soyasaponins, the loss of the DDMP group is induced by heat or alkaline treatments. The non-DDMP forms are probably not genuine soyasaponins.

abundant α-galactooligosaccharides, and have been shown to exert an effect on the metabolic activity of the intestinal microflora [42].

Dietary supplements are produced from a great variety of soy raw materials, including meal extracts, whey concentrates, or germ extracts presenting variability in content and composition of potentially active compounds. Moreover, changes in the industrial process can modify the composition of the end product, underlying the need of precise information concerning the levels and nature of potentially active compounds in the dietary supplements in order to determine health claims.

The aim of this work was to (i) determine the variability in content and composition of potentially active components, such as saponins, proteins, fatty acids and α-galactooligosaccharides in 25 dietary isoflavone supplements (ii) evaluate the influence of process changes concerning 5 of these products.

Materials and methods

Soy based dietary supplements and chemicals

Twenty five soy isoflavone dietary supplements were purchased locally. For five out of them (P6, P7, P8, P9, P14), a sample coming from a different batch was purchased after a delay of 6 to 9 month. Before analysis, the products were stored in dry conditions, at 4°C. HPLC-grade solvents and other chemical reagents with proper purity were used (SDS, Peypin, France). Purified standards of daidzin, genistin, glycitin, daidzein, genistein, glycitein, soyasapogenol A and soyasapogenol B were provided by Chromadex (Santa Ana, CA, USA). Purified standard of arachidic acid, glucose, raffinose and stachyose were provided by Sigma Aldrich (Sigma, Steinheim, Germany).

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of isoflavones

Duplicate samples of ten tablets or capsules were ground. An aliquot (0.1 g) was extracted with 80% aqueous methanol (8 mL) for 2 h at room temperature. The residue was removed after centrifugation and decantation of the clear supernatant. The final solutions were filtered (0.2 µm, Acrodisc Syringe Filters, GHP membranes) and analyzed by HPLC with a P4000 pump controller, AS3000 autosampler and UV2000 detector (Spectra Physics Analytical Inc., Fremont, California, US). The analytical column, 250 × 4.6 mm i.d., 5 µm, Satisfaction RP-C_{18}-AB (Cluzeau, Sainte Foy La Grande, France) was kept at 30 °C. The mobile phases were 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient elution was carried out as reported by Murphy *et al.* [43] with minor modifications: solvent B increased from 0 to 15% in 2 min, then to 18% in 4 min, to 24.5% in 26 min, to 40% over 7 min, then to 50% in 1 min, and finally increased to 100% in 6 min. The gradient program recycled back to the initial state of 100% solvent A in 2 min. UV absorbance was monitored at 260 nm. The injection volume was 10 µL and the flow rate was 1.5 mL/min. Calibration curves were established using the β-glucosides and aglycone isoflavones standard molecules. Due to their unstable structure, the malonyl- and acetyl- conjugated isoflavones were not used as external standards. Their response factor was calculated from those of their corresponding β-glucoside forms, correcting them in a molecular mass ratio. Since the

malonyl- and acetyl- group do not contain an ultraviolet chromophore, we hypothesized that the absorption properties of the β-glucoside structures at 260 nm should not be modified by a malonyl- or an acetyl-conjugation, and that their response factor was only depending upon their molecular weight [44]. Isoflavone were expressed in their massic concentration as aglycone equivalents, as well as in μmol/g of Dry Weight, accordingly to the recommendations made after the Fifth International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease [19]. The extraction recovery of isoflavones was determined by repeating extractions from the residue left from pre-extractions, until the total isoflavone concentration remained constant. With a dilution coefficient of 4% (w/v), the extraction recovery of isoflavones was higher than 95% when extracted only one time.

HPLC analysis of soyasapogenols A and B

The aqueous-alcoholic extracts prepared for isoflavone determination were also used for the quantification of soyasapogenols A and B, as described in a previous study [45]. Briefly, each filtered extract (4 mL) was transferred into a hemolysis tube. A methanolic solution of 1 N HCl (5 mL) was added, and the mixture was submitted to acid hydrolysis at 85 °C for 6.5 h in a water bath to release the aglycone soyasapogenols from the soyasaponins. The extraction and hydrolysis steps were duplicated. After cooling at room temperature, the solutions were analyzed by reverse-phase HPLC with the same column and apparatus as used for isoflavone analysis. Solvent A consisted in acetonitrile: 1-propanol: water: acetic acid (80:6:13:0.1) and solvent B was 100% acetonitrile. Solvent A was pumped isocratically for 15 min. Then solvent B increased to 100% in 2 min and remained at 100% for 2 min. The gradient recycled back to the initial state of 100% solvent A in 3 min. The injection volume was 50 μL and the flow rate 0.9 mL/min. UV absorbance was monitored at 205 nm. An extern calibration was realized using the two purified standards of soyasapogenols A and B. To validate the analytical procedure, the extraction recovery was determined using betulin as internal standard, and multiple hydrolysis times were tested to determine the hydrolysis efficiency. The extraction recovery was higher than 90% after the extraction and acid hydrolysis step. The best compromise to produce the optimal quantity of sapogenols in our dilution conditions without inducing their degradation was to stop the reaction after 6.5 h of hydrolysis at 85 °C [45]. Prior to this time, the formation of the 2 sapogenols was not quantitative, whereas a longer hydrolysis promoted their alteration. Ten replications of the entire analytical procedure, carried out successively on the whole soybean seed and on the germ, led to a within-day variability of total soyasapogenols lower than 7.3% in the whole seed and 4.7% in the germ, which indicates a good repeatability of the sample preparation. The between-day variability was found lower than 10.9% by repeating the within-day assay 3 times over a month. These results were detailed in a previous study [45].

Quantification of total proteins

The total protein percentage in the different dietary supplements was determined according to the method of DUMAS [46] through the quantification of total nitrogen using an elementary analyzer (NA 2000 Nitrogen analyzer, Fisons Instruments, Milano, Italy). This method involves a total combustion of the matrix under oxygen, followed by a reduction of nitrogen oxides in N_2 and trapping sulphur components and excess oxygen by copper. The carrier gas was helium. The oxidation tube, containing Chromium oxide, cobalt oxide and quartz wool, was heated to 900 °C, while the reduction tube, containing copper and held back by the quartz wool, was heated to 750 °C. The total nitrogen level was determined using a catharometer detection (NA 2000, Nitrogen analyser, Fisons Instruments, Milano, Italy), which was kept in a thermal chamber at 60 °C. Pure methionine was used as standard, and the coefficient converting nitrogen content into total soy-derived proteins was 6.25. This method is validated on dairy products by the norm ISO 14891 (2002).

Gas chromatography analysis of fatty acids

The total lipidic fraction of each sample (10 g) was extracted in a soxhlet apparatus by a mixture of *n*-hexane/ chloroform (70: 30 v: v) under refluxing for 4 h. The solvents were then evaporated under vacuum at 45 °C. The extracted oils were stored at – 20 °C prior assay. Approximatively 0.1 g crude oil, and 1 mL of arachidic acid (1 mg/mL) used as internal standard were diluted in 5 mL NaOH (0.5 M in methanol) and submitted to saponification for 30 min at 65 °C. 2.5 mL of boron trifluoride (12% in MeOH) were added, and the methylation was achieved in a water bath for 3 min at 65 °C. After cooling, 5 mL of distilled water were added, followed by 10 mL *n*-hexane. After decantation, the organic phase containing the fatty acids was analyzed by capillary gas chromatography (GC 8000 series, Fisons, Milano, Italy) using a flame ionization detector (FID) at $P(H_2)$ 100 kPa and P(air) 60 kPa. Samples (1 μL) were introduced by direct injection into a 30 m × 0.25 mm i.d × 0.25 μm film thickness J&W Scientific capillary GC column (Cluzeau, Sainte Foy la Grande, France). The initial oven temperature of 185 °C increased at 5 °C/min to 200 °C where it was held for 20 min. Inlet and flame-ionization detector temperatures were 200 °C. Palimitic (16: 0), stearic (18: 0), oleic (18: 1), linoleic (18: 2) and linolenic (18: 3) acids were identified using their corresponding purified standards, and quantified through an internal calibration using arachidic acid (20: 0).

HPLC analysis of α-galactooligosaccharides

Stachyose, verbascose and raffinose are the only α-galactooligosaccharides found in soybean. An aliquot of each soy isoflavone dietary supplements (0.1 g) was diluted in distilled water (5 mL) and stirred for 1 hour at room temperature. The residue was removed after centrifugation and decantation of the clear supernatant. Extraction was duplicated for each sample. The final solutions were filtered (0.45 μm) and analyzed by HPLC (ICS-Bischoff, Toulouse, France) using a HDO C18 analytical column (250 × 4.6 mm i.d, 5 μm, Interchim, Montluçon, France). The mobile phase was distilled water, pomped isocratically at a flow rate of 0.5 mL/min for 21 min. The analytical column was finally washed with a solution of 20% MeOH for 5 min. The injection volume was 10 μL. The α-galactooligosaccharide contents were determined by a refractive index detector (ICS-Bischoff, Toulouse, France). A calibration curve was established using β-D-glucose and used for the quantification of the α-galactooligosaccharides stachyose, verbascose and raffinose.

Results

Isoflavone content and profile

Soy isoflavones are derived from 3 distinct aglycone molecules, daidzein, genistein and glycitein, thus, for each of them, the molar contents (μmol/g) of the conjugated forms were pooled and expressed as percentages of the total isoflavone concentrations. Total isoflavone concentrations, aglycone and conjugation profiles displayed great variability between the tested products *(table 1)*. The total isoflavone concentrations ranged from 16.7 μmol/g (P1) to 365.6 μmol/g (P12). The specific isoflavone profiles obtained for each product reflect the nature of the raw material used for processing. Indeed, a major distinction has been established between the whole seed *versus* germ based raw materials. In the germ, daidzein and glycitein conjugates represent 40-60% and 25-40%, respectively, of the total isoflavones, whereas in the cotyledons, genistein conjugates are largely predominant (45-65% of total isofla-

Table 1. *Isoflavone content and profile in 25 soy based dietary supplements.*

			Isoflavone profile				Conjugation profile		
		Total en µmol/g (mg/g aglycone equivalent)	**%daidzein**	**%genistein**	**%glycitein**	**%aglycones**	**%β-glycosides**	**%malonyl glycosides**	**%acetyl glycosides**
Soy germ based products	P1	16.7 (4.4)	59.0	12.8	28.2	3.7	52.2	3.5	40.7
	P19	37.3 (9.8)	65.1	10.6	24.3	4.6	50.1	3.9	41.3
	P21	40.5 (10.81)	50.9	14.8	34.3	6.7	56.0	4.4	32.9
	P25	60.6 (16.2)	50.8	14.0	35.1	3.0	93.2	1.1	2.7
	P24	63.6 (16.8)	59.0	14.1	26.9	4.7	58.2	2.2	34.9
	P23	67.6 (17.9)	63.0	9.3	27.7	5.8	55.2	7.8	31.2
	P14	**117.4 (31.2)**	**54.4**	**16.1**	**29.5**	**6.6**	**81.8**	**1.5**	**10.2**
	P14'	*101.0 (26.9)*	*54.1*	*15.6*	*30.3*	*3.0*	*82.9*	*1.8*	*12.4*
	P8	**149.8 (39.7)**	**57.8**	**14.5**	**27.7**	**4.4**	**63.3**	**30.3**	**2.1**
	P8'	*106.2 (28.2)*	*54.4*	*15.4*	*30.2*	*3.5*	*72.4*	*18.8*	*5.3*
	P2	114.8 (30.6)	52.4	15.9	31.7	1.3	94.3	1.3	3.0
Whole seed based products	P3	37.0 (9.8)	42.4	47.9	9.7	2.8	91.9	0.7	4.7
	P10	45.9 (12.2)	40.5	51.9	7.6	2.3	93.7	0.4	3.6
	P7	**50.6 (13.4)**	**33.3**	**64.4**	**2.3**	**8.0**	**44.7**	**42.7**	**4.6**
	P7'	*53.5 (14.2)*	*34.7*	*62.4*	*3.0*	*6.6*	*45.4*	*41.2*	*6.8*
	P6	**52.8 (13.9)**	**49.3**	**42.3**	**8.5**	**8.6**	**86.6**	**3.4**	**1.4**
	P6'	*61.9 (16.2)*	*59.6*	*29.8*	*10.5*	*13.6*	*82.6*	*2.5*	*1.4*
	P22	77.7 (20.6)	34.7	60.9	4.5	4.4	88.2	3.0	4.4
	P11	91.5 (24.3)	32.2	62.0	5.8	59.5	40.1	0.3	0.1
	P18	91.7 (24.3)	35.9	61.7	2.4	4.5	84.4	1.4	9.8
	P16	116.3 (30.9)	31.8	64.4	3.9	25.2	55.7	7.2	11.9
	P17	132.3 (35.3)	22.3	76.3	1.3	19.0	78.2	1.7	1.0
	P15	138.5 (36.7)	37.0	59.4	3.6	49.6	44.3	4.3	1.8
	P13	144.6 (38.5)	33.2	59.4	7.4	4.5	87.1	0.8	7.7
	P9	**205.1 (54.2)**	**43.1**	**49.7**	**7.1**	**7.1**	**84.6**	**0.8**	**7.6**
	P9'	*137.2 (36.2)*	*44.7*	*45.8*	*9.4*	*3.5*	*91.0*	*0.6*	*4.9*
	P20	245.7 (65.0)	37.5	61.7	0.9	91.4	8.0	0.2	0.4
	P4	292.0 (77.2)	43.4	48.3	8.3	3.3	89.8	1.7	5.2
	P5	292.1 (76.7)	54.8	38.1	7.1	7.1	87.0	1.5	4.4
	P12	365.6 (95.3)	66.1	27.6	6.3	5.3	64.0	26.0	4.7
SD		5.4 (1.4)	2.1	2.1	2.1	1.8	2.2	2.7	2.8

Values in mg/g were calculated using the aglycone molecular weights (254.24, 270.23 and 284.27 g, for daidzein, genistein and glycitein, respectively). According to their isoflavone composition, the dietary supplements were separated in two groups: the glycitein-rich soy germ based products, and the genistein-rich whole seed based products. In each group, the products were ordered by increasing total isoflavone contents (µmoles per g dry weight). Whatever their raw material origin, two batches from 5 out of these products were analysed (the pair is noted Pn, in bold, Pn' in italic). Profiles were given in percentage of the total isoflavone content (calculated with molar values). Conjugation profiles could be related to the process conditions encountered.

vones) [29, 47]. In 16 supplements tested (P3-P7; P9-P13; P15-P18; P20; P22), glycitein represents less than 10.5% of total isoflavone levels, suggesting that these products are issue from whole seeds or cotyledons. In contrast, glycitein level ranged from 24.3% to 35.1% of total isoflavone level in 9 products (P1-P2; P8; P14; P19; P21; P23-P25), indicating that these supplements are issued from soy germ. In this study, we have also shown a high variability in the conjugation profile of soybean isoflavones *(table 1)*. Indeed, the native soybean seeds contain predominantly malonylglycoside isoflavones and a minor percentage of aglycones. Industrial processing can strongly modify isoflavone profile in the end product. For instance, high temperature and pH conditions during processing induce the degradation of the malonyl- and acetyl-conjugated forms leading to β-glycosides [13]. Under more drastic treatments or fermentation processes, almost all conjugated isoflavones were converted into aglycones, and a toasting or roasting process at low moisture increases the acetylglycoside isoflavone concentration [48]. In 15 tested supplements more than 80% of β-glycoside isoflavones were observed *(table 1)*, suggesting that high temperature or pH were used during their processing. The 3 products containing more than 45% of aglycone isoflavones (P11, P15 and P20) were probably submitted to stronger treatments or fermentation processing. The 5 products containing more than 30% of acetylated isoflavones (P1; P19; P21; P23; P24) were probably toasted or roasted at low moisture concentration. Interestingly, the former originated from whole seed, whereas the latter originated from soy germ. This reflects the very different process encountered by these two fractions. Several studies have investigated the role of glycoside *versus* aglycone forms of isoflavones in metabolism and distribution of these compounds on animal and human models [49, 50]. It is generally accepted that aglycone forms are absorbed faster by the gut than glycoside forms [51]. On the other hand, De Pascual-Teresa *et al.* [52] have shown that plasma level of ingested isoflavones depends on the food matrix. Taken together these data, it seems important to provide qualitative and quantitative information concerning the levels of aglycone versus conjugated isoflavones in the dietary supplements.

The duplicate batches displayed about 30% decrease (P8 vs P8'; and P9 vs P9'), or 17% increase in total isoflavone content as in P6 vs P6'

Table 2. *Soyasaponin A and B contents and composition in 25 soy based dietary supplements.*

		Composition profile					Conjugation profile
		total soyasaponins µmol/g (mg/g)	**soyasaponin A µmol/g (mg/g)**	**soyasaponin B µmol/g (mg/g)**	**%(V+αg)**	**isoflavone /soyasaponin molar ratio (mass ratio)**	**%non-DDMP**
Soy germ based products	P1	15.8 (19.1)	8.5 (12.2)	7.3 (6.9)	28.7	1.1 (0.23)	87.7
	P19	39.5 (46.9)	19.6 (28.1)	19.9 (18.7)	30.9	0.9 (0.21)	93.0
	P21	36.7 (45.2)	21.5 (30.9)	15.2 (14.3)	25.0	1.1 (0.24)	89.0
	P25	24.7 (31.8)	17.2 (24.7)	7.5 (7.1)	28.2	2.5 (0.51)	89.4
	P24	37.1 (45.5)	21.3 (30.6)	15.8 (14.9)	21.9	1.7 (0.37)	100.0
	P23	37.5 (46.5)	22.6 (32.5)	14.9 (14.0)	22.2	1.8 (0.38)	93.1
	P14	**90.5 (110.7)**	**51.5 (74.0)**	**39.0 (36.7)**	**29.3**	**1.3 (0.28)**	**92.9**
	P14'	*62.0 (78.6)*	*40.9 (58.7)*	*21.1 (19.9)*	*29.4*	*1.6 (0.34)*	*96.1*
	P8	**91.1 (113.0)**	**54.9 (78.8)**	**36.3 (34.2)**	**26.5**	**1.6 (0.35)**	**65.8**
	P8'	*78.0 (94.5)*	*42.6 (61.2)*	*35.4 (33.3)*	*25.9*	*1.4 (0.30)*	*66.7*
	P2	48.9 (48.9)	34.0 (48.8)	15.0 (14.1)	27.5	2.3 (0.49)	96.2
Whole seed based products	P3	7.9 (9.2)	3.6 (5.2)	4.3 (4.1)	6.6	4.7 (1.06)	94.7
	P10	6.4 (6.5)	0.9 (1.3)	5.5 (5.2)	5.5	7.2 (1.88)	100.0
	P7	**5.8 (6.8)**	**2.8 (4.0)**	**3.0 (2.8)**	**4.1**	**8.7 (1.96)**	**79.9**
	P7'	*6.8 (8.0)*	*3.2 (4.6)*	*3.6 (3.4)*	*14.9*	*7.9 (1.78)*	*76.1*
	P6	**11.6 (13.1)**	**4.4 (6.3)**	**7.2 (6.8)**	**1.0**	**4.6 (1.06)**	**89.0**
	P6'	*11.9 (13.6)*	*4.8 (6.9)*	*7.1 (6.7)*	*6.4*	*5.2 (1.19)*	*100.0*
	P22	29.9 (32.4)	8.5 (12.2)	21.4 (20.2)	3.4	2.6 (0.64)	80.6
	P11	89.3 (104.5)	41.4 (59.5)	47.8 (45.0)	6.9	1.0 (0.23)	61.1
	P18	55.1 (58.2)	12.8 (18.4)	42.3 (39.8)	6.6	1.7 (0.42)	93.6
	P16	51.3 (55.6)	14.8 (21.3)	36.5 (34.4)	3.1	2.3 (0.56)	96.1
	P17	47.1 (49.0)	9.4 (13.5)	37.7 (35.5)	2.3	2.8 (0.72)	86.9
	P15	112.5 (112.5)	26.4 (37.9)	86.1 (81.1)	4.7	1.2 (0.31)	89.3
	P13	33.0 (35.2)	8.4 (12.1)	24.6 (23.2)	9.0	4.4 (1.09)	86.2
	P9	**149.9 (168.6)**	**55.2 (79.3)**	**94.8 (89.3)**	**8.0**	**1.4 (0.32)**	**100.0**
	P9'	*25.0 (26.4)*	*5.8 (8.3)*	*19.2 (18.1)*	*4.6*	*5.5 (1.37)*	*100.0*
	P20	25.7 (28.5)	8.9 (12.8)	16.7 (15.7)	3.7	9.6 (2.28)	96.1
	P4	64.5 (75.5)	29.9 (42.9)	34.6 (32.6)	9.3	4.5 (1.02)	100.0
	P5	59.3 (68.2)	25.0 (35.9)	34.3 (32.3)	9.2	4.9 (1.12)	96.5
	P12	28.3 (32.9)	12.7 (18.2)	15.6 (14.7)	6.5	12.9 (2.89)	97.8
SD		7.7 -	5.9 (8.5)	5.8 (5.5)	3.8	-	3.5

The products are ordered according to the raw material classification and isoflavone contents established in *table 1*. Considering their high representation (more than 60%) in each groups, values in mg par g are calculated using the molar value of soyasaponin A1 (1436 g) or soyasaponin I (942 g) for groups A and B, respectively. For 5 products, the 2 batches analysed were noted Pn, in bold, and Pn', in italic. The soyasaponin B (V+αg) percentage of total soyasaponins B contents differentiates the soy germ based from the whole seed based products. The aglycones soyasapogenols A, B and the total soyasaponin contents are expressed in µmoles per g dry weight.

(table 1). Such order of discrepancies has already been reported between claimed and observed isoflavone contents. In 2003, Bennetau-Pelissero et al. have observed a great variability of isoflavone contents in various french food supplements, as well as significant differences between batches from the same brand [53]. Two major causes are generally underlined: the raw material variability, and the absence of normalization of the isoflavone analysis [21]. In this study, the raw material variability, together with possible process adjustments appears to probably constitute the major cause of these discrepancies. Nevertheless, no complete raw material change, as soy germ *versus* whole seed, was observed in any product. Changes in the conjugation profile can indicate some heating modifications, as seen in P8 versus P8'. However, in these 5 products, the changes in isoflavones profiles are less important than in isoflavone contents.

Soyasaponin content and composition

The total soyasaponin contents in the 25 dietary supplements ranged from 5.8 µmol/g (P7) to 149.9 µmol/g (P9), with total soyasaponins A ranging from 0.9 µmol/g (P10) to 55.2 µmol/g (P9) and total soyasaponins B ranging from 3.0 µmol/g (P7) to 94.8 µmol/g (P9) *(table 2)*. These results revealed a higher variability in saponin than in isoflavone contents among the products tested. Soyasaponin concentrations were lower than those of isoflavones in 21 products (isoflavone to soyasaponin ratio from 1.2 to 12.9), but in similar or slightly higher concentration than isoflavones in 4 products tested (P1, P19, P21, P11 had ratios between 0.9 and 1.1). The soyasaponin profiles also reflected the origin of the raw material used. The products supposed to be issued principally from soy germ due to their isoflavone profiles, contained on average 27% of (V + αg) soyasaponins B, as well as high amounts of soyasaponins A. In

contrast, products supposed to be issued from whole soybean seeds contained lower levels of soyasaponins A, which are more characteristic of the soy germ fraction [54, 55]. Duplicate batches of the same product can exhibit higher variations in soyasaponin than in isoflavone contents: 80% or 30% decrease in P9 versus P9', or P14 versus P14', respectively. Thus, soyasaponin contents are more influenced by the industrial processing condition used or by variations in the raw material. During processing, the 2,3-Dihydro-2,5-Dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP)-conjugated soyasaponins αg, βg, βa, γg, γa, considered as the naturally occurring saponins in native soybean [28], are mostly converted to their respective non-DDMP counterparts saponins V, I, II, III, and IV, due to the high lability of the DDMP group at high temperature and alkaline pH [48]. These non-DDMP soyasaponins represented on an average 89.8% of the total soyasaponins B in the 25 dietary supplements analyzed. Information concerning their presence and concentration in the soy isoflavone dietary supplements available in the market is of great interest, since the levels of soyasaponins found in the dietary supplements were of the same order as the active doses reported in the litterature [56]. Indeed the daily intake of triterpene saponins used in traditional practice range from a minimum of 60 mg to about 600 mg, what provides an indication of a both safe and effective dosage on the base of traditional practice. Furthermore, it is possible that isoflavones and soyasaponins act through multiple discrete pathways to affect the host health, and that low concentrations of each compound can act synergistically [57]. However, more research is needed to understand the mechanisms of action involved in this interaction.

Quantification of total proteins

The protein contents ranged from 0.4% (P3) to 42.9% (P20) *(table 3)*. Among the dietary supplement tested, 11 products contain less than 10% proteins, whereas four others contain more than 30% proteins, indicating significant differences in protein contents from one product to another, whatever the origin of the raw material used. The native soybean seed contains up to 48% proteins, consisting in a mixture of α-, β-, and γ-conglycinins, glycinin, and other globulins, ranging in molecular weight from 140 to 300 KDa and differing in physicochemical properties according to their structure [58]. The levels of proteins in the dietary supplements were highly dependent on the processing conditions. High temperature and pH increase protein solubilization and therefore increase protein recovery, what also promotes saponin extraction. A water washing treatment concentrates the proteins by removing very polar phytochemicals and oligosaccharides, whereas an ethanol washing treatment substantially decreases the concentration of these polar lipophilic phytochemicals [48]. As reported in a recent study [13], soy molasses, which were earlier considered only for their economical and caloric properties, are now used for the production of isoflavone ingredients, resulting in products presenting high protein levels. In contrast, an aqueous-alcohol washed isoflavone extract contains low protein concentration. Soy proteins have been the focus of many investigations concerning their health promoting properties. It is widely recognized and confirmed by numerous human studies that soy protein consumption results in significant lowering of serum cholesterol levels [59-61], as well as in a reduction in systolic and diastolic blood pressure in persons with hypertension [62]. On the other hand, it has been observed that isoflavone enriched products consumed by premenopausal women lowered LDL cholesterol by 7.6 to 10% [63], and play an active role in the prevention of cardiovascular diseases [64]. Thus, soy proteins in soy isoflavone concentrates could provide an additional effect on the serum lipid profile. Today, it remains not clear if the hypocholesterolemic effects of a soy-based diet are dependent of the proteins themselves, through the action of active oligopeptides produced in the intestinal tract, or if these benefits may be attributed to oestrogenic activity of the isoflavones [65]. In addition, other effects of soyasaponins on serum lipid profiles have been reported to be dependent on the presence of dietary protein [23], suggesting a possible interaction between saponins, glycinin, and β-conglycinin through hydrophobic interaction, hydrogen bonding or ionic bonding [66]. However in this study we have not determined specific peptides presenting health properties.

Table 3. *Total protein and lipidic fractions in 25 soy isoflavone dietary supplements.*

	Product	Total proteins g/100g DW	Total lipids g/100g DW
Soy germ based products	P1	16.1	10.2
	P19	33.5	11.6
	P21	36.7	14.5
	P25	3.9	15.3
	P24	1.4	7.4
	P23	8.9	21.8
	P14	21.3	10.5
	P8	10.8	15.2
	P2	5.7	3.8
Whole seed based products	P3	0.4	1.6
	P10	6.7	2.3
	P7	18.4	19.4
	P6	6.0	19.4
	P22	34.9	4.1
	P11	7.5	4.1
	P18	26.1	4.6
	P16	12.1	10.2
	P17	11.5	5.3
	P15	10.5	10.4
	P13	1.4	8.4
	P9	6.4	3.6
	P20	42.9	3.9
	P4	3.4	6.6
	P5	2.3	5.6
	P12	3.1	3.0
SD		1.2	2.2

The products are classified and ordered as in *table 1*. Protein contents were determined by the DUMAS method, and lipid contents were calculated after *n*-hexane extraction under reflux. The contents are expressed in g per 100g DW.

Determination of fatty acids

Most of the 25 dietary supplements analyzed were defatted products, since only 11 products contained more than 10% lipids *(table 3)*. Among these 11 non-defatted products, 4 were too waxy for their fatty acid profile determination. Consequently, only 7 products were used for fatty acid profile determination *(table 4)*. The average composition of fatty acids in the non-defatted dietary supplements issued from soy gems was 19.9% palmitic acid (16: 0), 10.8% stearic acid (18: 0), 9.9% oleic acid (18: 1), 48.3% linoleic acid (18: 2), and 11.1% linolenic acid (18: 3), reflecting typical composition of refined soygerm oil [37]. The fatty acid profile of the whole seed is generally reported to be higher in oleic (24%) and linoleic acid (54%), and lower in palmitic (11%) and linolenic acid (7%) [36]. This indicates that some soy isoflavone dietary supplements are particularly concentrated in fatty acids, such as P8 which contains 79.3 ± 3.7 mg/g of total fatty acids, while others are totally devoided of lipids. Linoleic acid (18: 2) is the predominant plant-derived dietary polyunsaturated fatty acid, and it was found predominantly in all the analyzed products. The high contents of fatty acids in some of the dietary

Table 4. *Fatty acid composition of soy isoflavone dietary supplements.*

Product	Total oil %	Palmitic acid 16:0 (mg/g)	Stearic acid 18:0 (mg/g)	Oleic acid 18:1 (mg/g)	Linoleic acid 18:2 (mg/g)	Linolenic acid 18:3 (mg/g)	Total fatty acids (mg/g)	SFA (% total FA)	PUFA (% total FA)
P1*	10.2%	14.6 ± 0.9	11.1 ± 0.7	5.4 ± 0.2	23.3 ± 1.1	3.5 ± 1.1	57.9 ± 0.7	44.4%	46.3%
P19*	11.6%	7.2 ± 0.4	3.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1	25.0 ± 0.5	5.9 ± 0.1	46.2 ± 1.1	22.3%	66.9%
P21*	14.5%	10.3 ± 1.7	5.5 ± 0.4	8.5 ± 0.9	34.7 ± 5.3	8.4 ± 1.2	67.4 ± 9.7	23.4%	63.9%
P23*	21.8%	16.4 ± 1.4	12.2 ± 0.9	5.0 ± 0.1	19.8 ± 1.3	4.1 ± 0.4	57.5 ± 4.0	49.7%	41.6%
P14*	10.5%	8.2 ± 0.2	4.6 ± 0.1	6.6 ± 0.1	28.5 ± 0.5	7.0 ± 0.1	54.9 ± 0.8	23.3%	64.7%
P8*	15.2%	14.5 ± 1.0	3.5 ± 0.1	6.3 ± 0.4	43.9 ± 1.8	11.1 ± 0.4	79.3 ± 3.7	22.7%	69.4%
P7**	19.4%	8.1 ± 1.2	5.6 ± 0.6	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.10 ± 0.02	15.4 ± 1.5	89.0%	6.5%

n = 2, FA : Fatty Acid, SFA: Saturated Fatty Acids, PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids. *: soy germ based product ; **: whole seed based product. These only 7 products had enough and significant lipids amounts (cf. *table 3*).

supplements analyzed in this study may confer additional properties to these products, as polysinsaturated fatty acids can have heath promoting activity, even at very low doses [67]. It has been shown in a recent study that postmenopausal women suffering from hot flushes and ingesting two capsules per day providing 60 mg of isoflavones and also two capsules containing a polyunsaturated fatty acid supplement for 24 weeks showed highly significant reductions in the number of hot flushes. These results indicated that polyunsaturated fatty acids may contribute to the effects generally attributed to the isoflavones at the same level of intake.

Quantification of α-galactooligosaccharides

Native soybean seeds contain high concentrations of two α-glycosidic galactooligosaccharides, raffinose (0.1-0.9%) and stachyose (1.4-4.1%) [68]. The total α-galactooligosaccharide contents in the 25 soy isoflavone dietary supplements ranged from non-detected to 88.8 mg/g, reflecting a high variability of α-galactooligosaccharide concentration in the products tested *(table 5)*. Stachyose, which structurally contains a fructose, a glucose, and a galactose was more concentrated than raffinose which contains one more galactose, in all the products analyzed. For a long time, these compounds were considered undesirable because some flatulence problems associated with human consumption of soy products were attributed to oligosaccharides. However, recent reports have shown that soy oligosaccharides do not alter significantly the nutrient digestibility, and in contrast they may constitute a powerful prebiotic [69]. Indeed, many products containing stachyose and raffinose are commercialized for their prebiotic properties. Prebiotics may enhance the effects of isoflavones by converting the inactive isoflavone glycoside to the biologically active aglycones [70], or by influencing the biosynthesis of equol, an interesting daidzein metabolite which is more estrogenic and more antioxidative than daidzein [71, 72]. The intestinal conversion of daidzein to equol has been the focus of great interest, and dietary carbohydrates have been indicated as a factor that may determine equol production [73, 74]. Soy oligosaccharides have an impact on the metabolic activity of intestinal microflora, and are implicated in the prevention of colon cancer. These complex sugars stimulate the growth of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species in the large intestine, and increase the production of short chain fatty acids [75]. Since the active phytoestrogenic isoflavones present an aglycone structure generated by the bacteria of the large intestine, ingestion of soy oligosaccharides may influence the plasmatic concentration of isoflavones [76]. It has also been shown *in vivo* that a diet containing less than 22.4 g of stachyose/kg body weight and less than 2 g of raffinose/kg did not alter digestibility or increase flatulence, indicating that a low intake of soy oligosaccharides did not exert undesirable effects compared with a high intake [77]. In another recent study, patients with seasonal allergic rhinitis treated with 600 mg of soy sauce polysaccharides showed a significant reduction in the total symptom score [78]. Thus, the presence of raffinose and stachyose, even in low quantity in the dietary supplements may influence the biological effects attributed to isoflavones, or exert independent biological activity. Their amounts in the commercial products need to be determined.

Conclusion

In this study, we have shown that soy-derived dietary supplements contain highly variable amounts of isoflavones, soyasaponins, proteins, fatty acids, and α-galactooligosaccharides. The content and composition

Table 5. *Quantification of α-galactooligosaccharides in 25 soy isoflavone dietary supplements.*

	Product	Stachyose (mg/g)	Raffinose (mg/g)	Total α-galactooligo-saccharides (mg/g)
Soy germ based products	P1	29.0	7.0	36.0
	P19	60.3	15.1	75.4
	P21	71.2	16.8	88.0
	P25	1.2	1.2	2.4
	P24	15.7	5.6	21.3
	P23	ND	2.0	2.0
	P14	63.8	15.9	79.7
	P8	69.9	16.8	86.8
	P2	ND	ND	ND
Whole seed based products	P3	3.6	2.1	5.7
	P10	3.6	0.8	4.5
	P7	48.8	14.8	63.5
	P6	3.9	2.4	6.4
	P22	50.9	10.3	61.2
	P11	0.6	0.6	1.2
	P18	47.3	14.7	62.0
	P16	7.5	2.2	9.7
	P17	11.0	3.1	14.1
	P15	5.5	2.1	7.7
	P13	ND	ND	ND
	P9	0.4	0.5	0.9
	P20	9.6	1.8	11.4
	P4	3.4	1.6	5.0
	P5	0.9	0.7	1.6
	P12	4.4	1.5	5.8
SD		5.2	5.6	7.3

The products were ordered as defined in *table 1*. (ND : below detection limit).

of these compounds depend on several factors, including the nature of the raw material and the industrial processing conditions that may influence the extraction of particular phytochemicals, or modulate their conjugation profile. Even at low concentration, these compounds may have significant health consequences if their bioavailability is very high or if they act synergistically or as antagonists. Consequently, the determination of a precise and global profile of phytochemicals in the soy-derived supplements as well as studies concerning the biological effects of their interaction, are needed in order to establish right claims and avoid unsuitable side effects associated with their use.

Acknowledgments. *The authors thank Françoise Labalette, from the Organisation Nationale Interprofessionnelle des Graines et Fruits Oléagineux (ONIDOL).*

REFERENCES

1. BRYANT M, CASSIDY A, HILL C, POWELL J, TALBOT D, DYE L. Effect of consumption of soy isoflavones on behavioural, somatic and affective symptoms in women with premenstrual syndrome. *Br J Nutr* 2005; 93: 731-9.
2. ZHANG Y, WANG G-J, SONG T, MURPHY PA, HENDRICH S. Differences in disposition of the soybean isoflavones, glycitein, daidzeine and genistein in human with moderate fecal isoflavone degradation activity. *J Nutr* 1999; 129: 957-62.
3. ALEKEL DL, ST GERMAIN A, PETERSON CT, HANSON KB, STEWART JW, TODA T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 844-52.
4. MASKARINEC G, FRANKE AA, WILLIAMS AE, *et al.* Effects of a 2-year randomized soy intervention on sex hormone levels in premenopausal women. *Canc Epidemiol Biomark Prev* 2004; 13: 1736-44.
5. VALACHOVICOVA T, SLIVOVA V, BERGMAN H, SHUHERK J, SLIVA D. Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kappa B/AP-1-dependent and -independent pathways. *Int J Oncol* 2004; 25: 1389-95.
6. ZHENG W, DAI Q, CUSTER LJ, *et al.* Urinary Excretion of Isoflavonoids and the Risk of Breast Cancer. *Canc Epidemiol Biomark Prev* 1999; 8: 35-40.
7. ROWLAND I. Soy and colorectal cancer. In: Descheemaeker K, Debruyne I, eds. *Soy and Health 2000*. Tiensesteenweg 91/3010 Leuven/Belgium: Garant Publishers, 2001: 55-60.
8. LI YW, AHMED F, ALI S, PHILIP PA, KUCUK O, SARKAR FH. Inactivation of nuclear factor kappa B by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis mduced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6934-42.
9. WISEMAN H, O'REILLY JD, ADLERCREUTZ H, *et al.* Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F-2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 395-400.
10. SIMONS AL, RENOUF M, HENDRICH S, MURPHY PA. Human gut microbial degradation of flavonoids: Structure-function relationships. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4258-63.
11. SUETSUGI M, SU LL, KARLSBERG K, YUAN YC, CHEN S. Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 981-91.
12. LACOMBE S, THÉODOROU-BAYLE V, LA DROITTE P, DAYDÉ J. Les isoflavones du soja dans la filière aliment santé. *OCL* 2000; 7: 287-94.
13. UZZAN M, LABUZA TP. Critical Issues in R&D of Soy Isoflavone - enriched Foods and Dietary Supplements. *J Food Sci* 2004; 49: 77-86.
14. JACKSON CJC, DINI JP, LAVANDIER C, *et al.* Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Proc Biochem* 2002; 37: 1117-23.
15. FRANKE AA, HANKIN JH, YU MC, MASKARINEC G, LOW SH, CUSTER LJ. Isoflavone levels in soy foods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 977-86.
16. UMPHRESS ST, MURPHY SP, FRANKE AA, CUSTER LJ, BLITZ CL. Isoflavone content of foods with soy additives. *J Food Comp Anal* 2005; 18: 533-50.
17. SETCHELL KDR, COLE SJ. Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4146-55.
18. WILLIAMSON-HUGHES P, FLICKINER B, MESSINA M, EMPIE M. Isoflavone supplements predominantly containing genistin/genistein reduce hot flushes: A critical analysis of published studies. *Proccedings of the 6th Int. symp. on the role of soy in preventing and treating chronic disease.* Chicago, IL USA, Oct. 30-Nov 2, 2005.
19. ERDMAN JW, BADGER TM, LAMPE JW, SETCHELL KDR, MESSINA M. Not all soy products are created equal: Caution needed in interpretation of research results. *J Nutr* 2004; 134: 1229S-1233S.
20. CASSIDY A, BROWN JE, HAWDON A, *et al.* Factors affecting the bioavallability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr* 2006; 136: 45-51.
21. SETCHELL KDR, BROWN NM, DESAI P, *et al.* Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 2001; 131: 1362S-1375S.
22. OAKENFULL D. Soy protein, saponins and plasma cholesterol. *J Nutr* 2001; 131: 2971.
23. POTTER S, BAUM J, TENG H, STILLMAN R, SHAY N, ERDMAN J. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1375S-1379S.
24. DECROOS K, VINCKEN JP, HENG L, BAKKER R, GRUPPEN H, VERSTRAETE W. Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* 2005; 1072: 185-93.
25. OKUBO K, IJIMA M, KOBAYASHI K, YOSHIKOSHI M, UCHIDA T, KUDOU S. Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992; 56: 99-103.
26. LASZTITY R, HIDEVEGI M, BATA A. Saponins in food. *Food Rev Int* 1998; 14: 371-90.
27. SHIRAIWA M, HARADA K, OKUBO K. Composition and structure of "Group B Saponin" in soybean seed. *Agric Biol Chem* 1991; 55: 911-7.
28. KUDOU S, TONOMURA M, TSUKAMOTO C, *et al.* Isolation and structural elucidation of DDMP-Conjugated soyasaponins as genuine saponins from soybean seeds. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; 57: 546-50.
29. TSUKAMOTO C, SHIMADA S, IGITA K, *et al.* Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 1184-92.
30. RUPASINGHE HPV, JACKSON CJC, POYSA V, BERARDO C. DI, Bewley JD, Jenkinson J. Soyasapogenol A and B distribution in soybean (Glycine max L. Merr.) in relation to seed physiology, genetic variability, and growing location. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 5888-94.
31. LEE SO, SIMONS AL, MURPHY PA, HENDRICH S. Soyasaponins lowered plasma cholesterol and increased fecal bile acids in female golden Syrian hamsters. *Exp Biol Med* 2005; 230: 472-8.
32. KINJO J, IMAGIRE M, UDAYAMA M, ARAO T, NOHARA T. Studies on the hepatoprotective drugs part 3 - Studies on the constituents of the leguminous plants part 56 - Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Med* 1998; 64: 233-6.

33. GURFINKEL DM, RAO AV. Soyasaponins: The relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr Cancer* 2003; 47: 24-33.

34. BENATTI P, PELUSO G, NICOLAI R, CALVANI M. Polyunsaturated fatty acids: Biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr* 2004; 23: 281-302.

35. CAMPAGNOLI C, ABBA C, AMBROGGIO S, PERIS C, PERONA M, SANSEVERINO P. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) might reduce hot flushes: an indication from two controlled trials on soy isoflavones alone and with a PUFA supplement. *Maturitas* 2005; 51: 127-34.

36. HUI YH. Soybean oil, in Bailey's Industrial Oil and Fat Products. In: Hui YH, ed. *Edible Oil and Fat Products: Oils and Oil Seeds*. New York: John Wiley & Sons, 1996: 497-601.

37. SCHRYVER T. Increasing health benefits using soy germ. *Cereal Foods World* 2002; 47: 185-8.

38. LOVATI MR, MANZONI C, GIANAZZA E, *et al.* Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J Nutr* 2000; 130: 2543-9.

39. SIRTORI CR, LOVATI MR. Soy proteins and cardiovascular disease. *Curr Ather Rep* 2001; 3: 47-53.

40. DE LUMEN BO. Lunasin: A cancer-preventive soy peptide. *Nutr Rev* 2005; 63: 16-21.

41. OHTA A, UEHARA M, SAKAI K, *et al.* Combination of dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized mice. *J Nutr* 2002; 132: 2048-54.

42. SMIRICKY MR, GRIESHOP CM, ALBIN DM, WUBBEN JE, GABERT VM, FAHEY GC. The influence of soy oligosaccharides on apparent and true ileal amino acid digestibilities and fecal consistency in growing pigs. *J Anim Sci* 2002; 80: 2433-41.

43. MURPHY PA, SONG T, BUSEMAN G, *et al.* Isoflavones in retail and institutional soy foods. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 2697-704.

44. HUBERT J, BERGER M, DAYDE J. Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination: Study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 3923-30.

45. HUBERT J, BERGER M, DAYDE J. Validation of a high-performance liquid chromatography-ultraviolet method to quantify soy sapogenols A and B in soy germs from different cultivars and in soy isoflavone-enriched supplements. *J Food Sci* 2005; 70: C471-C477.

46. BUCKEE GK. Determination of total nitrogen in Barley, Malt and Beer by Kjeldahl procedures and the DUMAS combustion method. Collaborative trial. *J Inst Brew* 1994; 100: 57-64.

47. DAYDÉ J, BERGER M, THEODOROU V. Screening and breeding soybeans for isoflavone content and composition. Proceedings of the *IV International Soybean Processing and Utilization Conference (ISPUC IV)*. Feb 29-Mar 5, Foz do Iguassu, PR, Brasil, Embrapa. 2004.

48. RICKERT DA, JOHNSON LA, MURPHY PA. Improved fractionation of glycinin and beta-conglycinin and partitioning of phytochemicals. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 1726-34.

49. KING RA, BURSILL DB. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 867-72.

50. WATANABE S, YAMAGUCHI M, SOBUE T, *et al.* Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (Kinako). *J Nutr* 1998; 128: 1710-5.

51. IZUMI T, PISKULA MK, OSAWA S, *et al.* Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 1695-9.

52. DE PASCUAL-TERESA S, HALLUND J, TALBOT D, et al. Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. J Nutr Biochem 2005; OnlineFirst. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.04.008.

53. BENNETAU-PELISSERO C, ARNAL-SCHNEBELEN B, LAMOTHE V, *et al.* ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chem* 2003; 82: 645-58.

54. HU J, LEE SO, HENDRICH S, MURPHY PA. Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 2587-94.

55. SHIMOYAMADA M, HARADA K, OKUBO K. Saponin composition in developing soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill, cv. Mikuriyaao). *Agric Biol Chem* 1991; 55: 1403-5.

56. SHI J, ARUNASALAM K, YEUNG D, KAKUDA Y, MITTAL G, JIANG Y. Saponins from edible legumes: Chemistry, processing, and health benefits. *J Med Food* 2004; 7: 67-78.

57. WALKER M. In: *Soybean isoflavones lower risk of degenerative diseases*. Townsend Lett. Doct. Patients, 1994: 374-8.

58. KILARA A. Harwaler VR Denaturation. In: Nakai S, Modler H, eds. *Food Proteins-Properties and characterization*. New York: VCH, 1996: 71-165.

59. DURANTI M, LOVATI MR, DANI V, *et al.* The {alpha}' Subunit from Soybean 7S Globulin Lowers Plasma Lipids and Upregulates Liver {beta}-VLDL Receptors in Rats Fed a Hypercholesterolemic Diet. *J Nutr* 2004; 134: 1334-9.

60. HOIE LH, GRAUBAUM HJ, HARDE A, GRUENWALD J, WERNECKE KD. Lipid-lowering effect of 2 dosages of a soy protein supplement in hypercholesterolemia. *Adv Ther* 2005; 22: 175-86.

61. NAGATA C, TAKATSUKA N, KURISU Y, SHIMIZU H. Decreased serum total cholesterol concentration associated with high intake of soy products in Japanese men and women. *J Nutr* 1998; 128: 209-13.

62. HE J, GU DF, WU XG, *et al.* Effect of soybean protein on blood pressure: A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2005; 143: 1-9.

63. MERZ-DEMLOW BE, DUNCAN AM, WANGEN KE, *et al.* Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1462-9.

64. TIKKANEN MJ, WÄHÄLÄ K, OJALA S, VIHMA V, ADLERCREUTZ H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3106-10.

65. CROUSE JR, MORGAN T, TERRY JG, ELLIS J, VITOLINS M, BURKE GL. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med* 1999; 159: 2070-6.

66. SHIMOYAMADA M, IKEDO S, OOTSUBO R, WATANABE K. Effects of soybean saponins on chymotryptic hydrolyses of soybean proteins. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4793-7.

67. DEMAISON L, MOREAU D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease-related mortality: a possible mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 463-77.

68. HYMOWITZ T, COLLINS FI, PANCZER J, WALCKER WM. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agnon J* 1972; 64: 613-6.

69. TOMOMATSU H. Health effects of oligosaccharides. *Food Technol* 1994; 48: 61-5.

70. ALI AA, VELASQUEZ MT, HANSEN CT, MOHAMED AI, BHATHENA SJ. Modulation of carbohydrate metabolism and peptide hormones by soybean isoflavones and probiotics in obesity and diabetes. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 693-9.

71. ARORA A, NAIR MG, STRASBURG GM. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys* 1998; 356: 133-41.

72. MITCHELL JH, GARDNER PT, MCPHAIL DB, MORRICE PC, COLLINS AR, DUTHIE GG. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys* 1998; 360: 142-8.

73. LAMPE JW, KARR SC, HUTCHINS AM, SLAVIN JL. Urinary equol excretion with a soy challenge: Influence of habitual diet. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 335-9.

74. ROWLAND I, WISEMAN H, SANDERS T, ADLERCREUTZ H, BOWEY E. Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 304-8.

75. SLAVIN JL. Health benefits of oligosaccharides. *J Nutrac Funct Med Foods* 1999; 1: 43-55.

76. TAMURA M, HIRAYAMA K, ITOH K. Effects of soy oligosaccharides on plasma and cecal isoflavones, and cecal enzyme activities in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2003; 49: 168-71.

77. YAMKA RM, HARMON DL, SCHOENHERR WD, *et al.* In vivo measurement of flatulence and nutrient digestibility in dogs fed poultry by-product meal, conventional soybean meal, and low-oligosaccharide low-phytate soybean meal. *Am J Vet Res* 2006; 67: 88-94.

78. KOBAYASHI M, MATSUSHITA H, TSUKIYAMA R, SAITO M, SUGITA T. Shoyu polysaccharides from soy sauce improve quality of life for patients with seasonal allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled clinical study. *Int J Mol Med* 2005; 15: 463-7.

UNCORRECTED PROOF

IV.4.2. Bilan des travaux relatifs à la caractérisation du germe natif et de ses produits dérivés

Cette étape de caractérisation analytique a mis en évidence que le germe de soja constitue une matière première originale aux regards de sa richesse et de sa composition en métabolites secondaires d'intérêt biologique. L'évaluation de la variabilité des extraits d'isoflavones fabriqués par GENIBIO a montré que le choix du procédé industriel est un facteur qui se répercute, non seulement sur la teneur finale des molécules ciblées (isoflavones), mais aussi sur d'autres composés, susceptibles d'être éliminés du produit final (phytostérols, tocophérols), ou au contraire d'être concentrés simultanément aux isoflavones. Ceci a été observé en particulier pour les saponines dont les teneurs dans les extraits d'isoflavones se sont révélées très élevées. Enfin, l'analyse de plusieurs compléments alimentaires disponibles dans le commerce et ingérés par un grand nombre de femmes ménopausées, a mis en évidence des profils très différents selon leurs origines et leurs procédés de fabrication. Les compléments analysés présentent en effet des teneurs et des compositions d'isoflavones très variables, ainsi que des profils très différents autant pour les isoflavones que pour les autres métabolites. Par conséquent, ces produits ne peuvent pas tous posséder les mêmes propriétés. La source de matière première (germes, cotylédons ou mélanges), ainsi que le procédé de fabrication sont des paramètres clés qui devraient être contrôlés systématiquement et reliés à la composition finale des compléments alimentaires dérivés du soja. Dans le contexte scientifique actuel où les effets réels (positifs ou négatifs) et les mécanismes d'action des extraits d'isoflavones ne sont pas encore parfaitement clarifiés, cette étude vient renforcer la nécessité de connaître parfaitement la composition des produits du soja soumis à des tests biologiques évaluant l'activité des isoflavones.

V. DEVELOPPEMENT D'UN INGREDIENT FERMENTE A BASE DE GERME DE SOJA

V.1. Objectifs industriels

Comme cela a été décrit dans les chapitres précédents, le germe de soja est une source importante de fibres alimentaires, d'oligosaccharides, de minéraux, de vitamines et d'autres composés mineurs possèdant des propriétés oestrogéniques, antioxydantes ou anti-inflammatoires. Il a également été montré que les ingrédients issus d'un procédé d'extraction destiné à la fabrication de compléments alimentaires enrichis en isoflavones, présentent une composition intéressante en autres molécules biologiquement actives. Cependant, les procédés de fabrication de ces extraits génèrent une quantité importante de co-produits non valorisés. Dans le cas du procédé industriel développé par GENIBIO, la production de l'extrait brut d'isoflavones s'accompagne de l'élimination de la fraction lipidique contenant entre autres les acides gras, les tocophérols et les phytostérols, ainsi que de la fraction protéique. L'ensemble de ces pertes constitue de 50 à 60 % de la masse du germe natif.

Etant donné que, selon les résultats issus du travail de caractérisation analytique, la composition globale du germe de soja s'est révélée intéressante en termes de nutriments et de métabolites secondaires biologiquement actifs, l'objectif de GENIBIO a été de trouver une piste de valorisation de la matrice entière du germe de soja, permettant de conserver le potentiel biologique de la matière première dans sa globalité.

Cependant, la matrice entière du germe de soja présente le désavantage d'être amère et astringente. Les composés soupçonnés d'être responsables de ces propriétés sensorielles indésirables incluent les isoflavones (Kudou *et al.*, 1991), ainsi que les saponines, en particulier celles du groupe A dont l'amertume serait liée à leurs structures acétylées (Okubo *et al.*, 1992). D'autres travaux plus récents ont suggéré au contraire que les isoflavones ne sont ni amères, ni astringentes (Robinson *et al.*, 2004), ces propriétés indésirables étant plutôt liée à la présence de phytates (Al-Mahfuz *et al.*, 2004). Les complexes enzymatiques des lipoxygénases, en catalysant l'oxydation des lipides, seraient aussi impliqués dans la formation de molécules hydroperoxydées qui, par scission ou par dismutation, génèrent une odeur et des arômes désagréables (Orthoefer, 1978). Le dilemme à résoudre est donc que la plupart des composés possédant une activité biologique intéressante sont souvent associés à des propriétés organoleptiques indésirables ou à une activité antinutritionnelle. Augmenter la concentration des phytonutriments amers dans un but préventif ou thérapeutique devient alors incompatible avec l'attente des consommateurs d'un point de vue sensoriel.

Dans ce sens, GENIBIO s'est proposé d'explorer la possibilité de fermenter le germe de soja en vue de valoriser la matrice entière du germe tout en améliorant ses propriétés organoleptiques. Le choix s'est porté sur une fermentation lactique car ce procédé présente de nombreux avantages. C'est une méthode traditionnelle reconnue pour sa capacité de conservation des aliments. La production d'acide lactique par les microorganismes engendre en effet une acidification naturelle progressive du milieu fermenté, empêchant ainsi les contaminations d'origine bactérienne et conférant au produit final une meilleure stabilité. Un tel procédé présente également l'avantage d'être très économique, de préserver les nutriments et d'améliorer la digestibilité des aliments. Ainsi, au cours de la fermentation lactique du germe de soja, l'action des microorganismes pourrait provoquer des modifications biochimiques ciblées au niveau du profil de certaines substances actives, tout en conservant ses qualités nutritionnelles et en offrant de nouvelles possibilités en termes de saveurs, d'arômes et de textures.

Une poudre fermentée issue du germe de soja pourrait constituer un ingrédient innovant puisque très peu de produits fermentés à partir du germe sont actuellement connus. Seul « Aglymax », ingrédient principal du produit Effisoy qui est un extrait fermenté de germe de soja fabriqué par FermaHealth (Division de Nichimo International), a été valorisé au Japon pour sa forte teneur en isoflavones aglycones.

L'objectif a donc été de développer à l'échelle industrielle un ingrédient fermenté à partir des lots de germe de soja broyés afin de valoriser toute la matière première sans générer de co-produits, d'en améliorer les propriétés organoleptiques et éventuellement de provoquer la synthèse de nouvelles molécules bioactives. La capacité antioxydante du nouvel ingrédient fermenté sera ensuite étudiée parallèlement à l'évolution des métabolites secondaires potentiellement actifs initialement présents dans le germe de soja.

V.2. Développement du procédé de fermentation

Des essais préalables en laboratoire ont été réalisés pour optimiser les différents paramètres du procédé de fermentation, en particulier pour déterminer le type de ferment lactique et le taux d'inoculation les plus appropriés pour une acidification rapide du milieu fermenté. La cinétique d'acidification est en effet un élément clé du procédé de fermentation puisque un taux d'acidification suffisant et atteint rapidement permet d'éviter les contaminations microbiennes et réduit significativement le coût de la production industrielle. De plus, la stabilité de l'ingrédient final est assurée par l'efficacité de ce processus d'acidification.

V.2.1. Influence du type de souche et du taux d'inoculation sur l'acidification du milieu

Les quatre souches de bactéries lactiques (A, B, C et D) sélectionnées par GENIBIO ont été testées au laboratoire pour leur potentiel d'acidification, l'objectif étant de déterminer laquelle permet une acidification rapide du milieu de fermentation. Après inoculation du germe de soja par chaque ferment, un suivi d'acidification a été réalisé pendant 48 h, l'objectif étant d'obtenir un pH final compris entre 4 et 5. Les courbes d'acidification obtenues sont présentées sur la **Figure 13**.

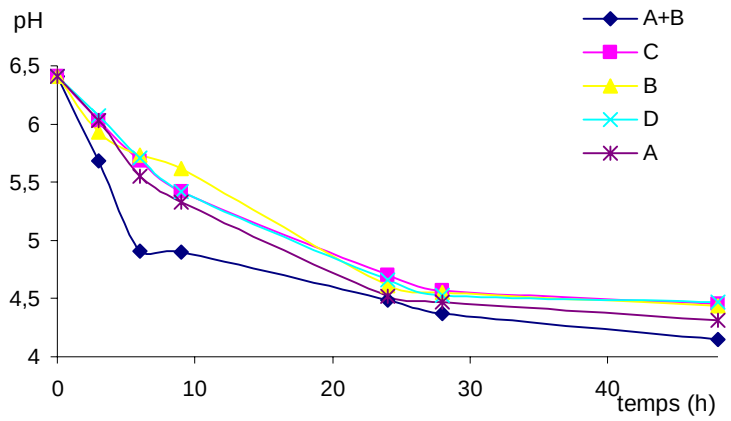


Figure 13. Capacité d'acidification des différentes souches testées

Les souches testées individuellement présentent un temps de latence trop long et un niveau final d'acidification compris entre 5,5 et 5,7 après 6 heures d'incubation, et entre 4,3 et 4,4 après 48 heures. Par contre, la fermentation réalisée en présence des deux ferments combinés A et B est plus efficace, puisque le pH atteint 4,9 après 6 heures d'incubation et 4,1 après 48 heures d'incubation, ce qui démontre un phénomène de protocoopération entre ces deux souches : l'une des 2 souches déclenche la fermentation pour fournir des nutriments à l'autre qui assure ensuite l'acidification finale.

Le taux d'inoculation optimal a ensuite été déterminé en inoculant les souches A et B à différentes concentrations. La fermentation présentant le meilleur compromis entre le taux d'inoculation, la rapidité d'acidification et la valeur finale du pH correspond à une inoculation du germe de soja par 100 µL de la souche A et 20 mg de la souche B pour 150 mL de milieu à fermenter, soit un taux d'inoculation de $1,5.10^8$ UFC/mL pour la souche A et de $7,4.10^7$ UFC/g pour la souche B. Dans ces conditions, le pH atteint une valeur inférieure à 5,0 après 5 heures d'incubation. Grâce à ce mélange de souches, la durée de fermentation est courte, ce qui permet de diminuer le coût de production, d'éviter des contaminations éventuelles par des moisissures ou par des bactéries pathogènes, et de diminuer le risque de développement accidentel d'une microflore responsable d'un goût amer ou d'une odeur désagréable. Le pH acide du milieu fermenté permet ainsi d'obtenir un produit final parfaitement stabilisé.

V.3. Influence de la fermentation sur les propriétés organoleptiques et la composition du germe de soja

V.3.1. Critères organoleptiques

Les caractéristiques sensorielles d'un produit commercial sont cruciales puisqu'elles sont directement jugées par le consommateur. L'un des objectifs de GENIBIO était de valoriser la matrice entière du germe de soja tout en améliorant sa saveur, son arôme et sa texture, de sorte que, même si l'ingrédient final est associé ou utilisé comme simple additif dans une autre matrice, sa contribution à une diminution des qualités organoleptiques du produit final commercialisé, soit la plus limitée possible. Les différents paramètres du procédé, incluant le choix des souches ainsi que la durée de fermentation ont été optimisés à l'échelle industrielle et ont permis de répondre à cet objectif puisque le goût amer et astringent du germe fermenté a été largement diminué par rapport à la poudre de germe natif. Cette amélioration sensorielle a fait l'objet d'une validation interne chez GENIBIO par un groupe de 9 personnes qui ont toutes distingué l'amélioration gustative. L'action des microorganismes a donc permis de modifier positivement les qualités organoleptiques du germe de soja. Le goût du germe de soja, initialement amer, dégage après fermentation une note légèrement acide caractéristique de la plupart des produits inoculés par des bactéries lactiques. L'évolution du profil des principaux métabolites du germe de soja, détaillée ci-après, pourrait permettre de relier l'amélioration des qualités sensorielles du germe avec l'élimination, la rétention ou l'apparition de ces composés spécifiques.

V.3.2. Modification de la composition du germe de soja

L'influence du procédé de fermentation lactique du germe de soja sur sa composition en macronutriments et en métabolites secondaires a été déterminée. Les profils précis des poudres de germe fermenté et non fermenté ont été établis par une caractérisation analytique approfondie et sont présentés dans le ***Tableau 28****.*

Tableau 28. Influence d'un procédé de fermentation lactique sur la composition du germe de soja.

Macronutriments et métabolites secondaires		Germe de soja non fermenté*	Germe de soja fermenté**
Protéines (% massique)		36,3 – 40,7	37,0 – 40,0
Lipides (% massique)		12,0 – 15,6	12,0 – 15,0
Glucides (% massique)		26 - 32	16
Minéraux (% massique)		4 - 5	4 - 5
Fibres (% massique)		10	10
Isoflavones	Total (µmol/g)	37,9	46,7
	Total (% massique, éq aglycone)	1,3	1,2
	Daidzéine (% éq aglycone)	57,8	55,2
	Glycitéine (% éq aglycone)	27,9	32,1
	Génistéine (% éq aglycone)	14,3	12,7
	β-glucosides (%)	36,8	11,3
	Malonylglucosides (%)	58,2	36,9
	Acétylglucosides (%)	1,4	1,9
	Aglycones (%)	3,6	50,0
Saponines	Total (µmol/g)	45,3	44,2
	Total (% massique)	5,1	5,1
	Saponines A (% éq aglycone)	55,4	52,0
	Saponines B (% éq aglycone)	44,6	48,0
	DDMP (% des saponines B)	75,7	45,8
Tocophérols	Total (% massique)	0,04	0,01
Phytostérols	Total (% poudre)	0,5	0,5
Saccharose (% poudre)		5,2	0,5
α-galacto-oligosaccharides	Stachyose (% poudre)	9,0	6,2
	Verbascose (% poudre)	0,3	0,3
	Raffinose (% poudre)	1,3	0,5
Phosphore	Phosphore libre (% poudre)	0,17	0,35
	Acide phytique	0,85	0,55
Facteur de Bowman-Birk	Eq, BBI inhibition trypsine (%)	2	2
	Eq, BBI inhibition chymotrypsine	0,5	0,5
Acides organiques	Acide lactique (% poudre)	Non détecté	5,81
	Acide acétique (% poudre)	Non détecté	0,11

* : La composition du germe de soja non-fermenté corespond à la moyenne des 23 lots industriels de germe natifs analysés précédemment.
** : La composition du germe de soja fermenté correspond à la moyenne de 4 essais de fermentation.

- *Modifications du profil des isoflavones*

Rappelons que les trois familles d'isoflavones (daidzéine, glycitéine et génistéine) existent majoritairement sous leur structure malonylglucoside et β-glucoside dans le germe de soja natif. D'après le **Tableau 28**, la concentration totale des isoflavones est conservée avant et après fermentation, indiquant que ces composés phénoliques ne sont pas dégradés au cours du procédé ou métabolisés en d'autres substances non-identifiées.

Les pourcentages relatifs de chaque famille d'isoflavone (daidzéine, glycitéine et glycitéine) sont maintenus, indiquant que les structures moléculaires de base de chaque famille restent stables pendant la fermentation. On observe cependant des modifications importantes au niveau de leur profil de conjugaison. Les formes aglycones, ne représentant que 3,6 % des isoflavones totales dans le germe natif, deviennent majoritaires après fermentation, au détriment des formes malonylglucosides et β-glucosides qui ne représentent plus que 36,9 % et 11,3 % des isoflavones totales dans le germe fermenté.

Les isoflavones conjuguées ont donc été transformées en leur forme aglycone correspondante sous l'action de microorganismes possédant une activité β-glucosidase, ce qui peut être un avantage puisqu'il a été décrit dans la littérature que les structures aglycones sont plus facilement assimilées par l'organisme que les structures glycosides et que les isoflavones issues de produits fermentés présentent une meilleure biodisponibilité (Hutchins *et al.*, 1995 ; Izumi *et al.*, 2000).

- *Modification du profil des α-galactooligosaccharides*

Les α-galactooligosaccharides représentent 10,6 % de la masse sèche du germe de soja natif, le stachyose étant largement majoritaire suivi du raffinose et du verbascose. Après fermentation, leur teneur totale est de 7,0 % du germe, indiquant qu'une partie de ces sucres a été consommée par les bactéries lactiques. Contrairement aux α-galactooligosaccharides, le saccharose a été presque entièrement consommé au cours du procédé de fermentation, sa teneur initiale dans le germe non fermenté étant de 5,2 %, et sa teneur finale à l'issue du procédé de 0,5 %. Parallèlement à la diminution des glucides totaux, une quantité importante d'acide lactique a été libérée par les microorganismes, représentant 5,8 % de la masse sèche du germe en fin de fermentation.

La réduction significative des α-galactooligosaccharides est un avantage du produit fermenté, puisque la mauvaise digestibilité des produits dérivés du soja leur a souvent été attribuée (Leske *et al.*, 1993). Leur dégradation partielle constitue aussi un avantage si l'on considère des travaux plus récents valorisant les α-galactooligosaccharides pour leur pouvoir pré-biotiques (Smiricky *et al.*, 2002). Une faible proportion d' α-galactooligosaccharides pourrait donc améliorer l'activité métabolique de la microflore intestinale sans altérer la digestibilité des nutriments.

➢ *Influence de la fermentation sur les saponines, phytostérols et tocophérols*

Les teneurs totales en saponines, phytostérols et en minéraux n'ont pas été affectées par le procédé de fermentation développé chez GENIBIO. Cependant, une modification du profil de conjugaison des saponines du groupe B liées à un groupement DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4*H*-pyran-4-one) a été observée, leur concentration ayant varié de 75,7 % des saponines B totales dans le germe natif à 45,8 % dans le germe fermenté, ce qui suggère que l'amélioration du goût dans la poudre fermentée peut être en partie due à la libération de molécules de maltol, reconnues pour leur arôme « caramélisé » (**Figure 14**).

Par ailleurs, une réduction significative de la teneur en tocophérols a été observée, pouvant s'expliquer par la faible stabilité de ces composés, même sous faible accroissement de température et au contact de l'oxygène.

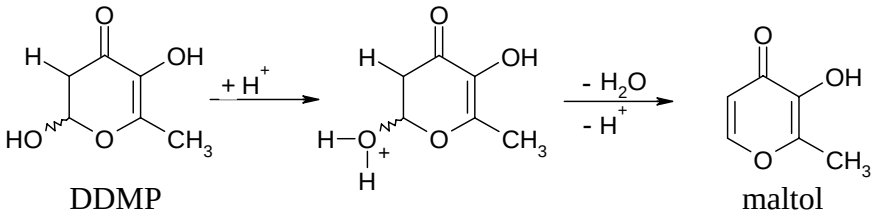


Figure 14. Mécanisme de libération du maltol en milieu acide

➢ *Modification de la teneur en acide phytique*

L'acide phytique contenu dans les rations alimentaires réduit la biodisponibilité des minéraux, en particulier celle du calcium, du fer et du zinc, et cet effet dépend fortement des procédés de transformation utilisés par les industries agroalimentaires. Afin de l'éliminer, certains procédés incluent l'ajout de phytases capables de dégrader les complexes formés entre les phytates et les protéines, ce qui permet d'augmenter la biodisponibilité du phosphore. Une autre alternative consiste à sélectionner des variétés de soja pauvres en phytates qui seront utilisées comme matière première. Cependant, ces deux méthodes résultent en une augmentation du coût de production de l'ingrédient final. La question était donc de savoir si le procédé de fermentation développé par GENIBIO permet de diminuer la concentration de l'acide phytique et par conséquent d'augmenter la biodisponibilité du phosphore.

Dans le germe de soja natif, des complexes hydro-solubles sont naturellement formés entre les protéines et l'acide phytique, et leur interaction dépend fortement du pH. D'après le **Tableau 28**, la concentration massique de l'acide phytique dans le germe de soja natif est de 0,85 %, et de 0,55 % dans la poudre finale fermentée, indiquant que le germe de soja a perdu environ un tiers de sa teneur en phytates.

Ainsi, la fermentation lactique du germe de soja conduit à un produit dont la teneur en acide phytique est plus faible que dans la matière première non-fermentée. Cette dégradation pourrait résulter d'une action combinée des 6-phytases présentes dans la matrice végétale et des 3-phytases d'origine microbienne (Reddy et Pierson, 1994), ce qui suppose une synergie potentielle entre les enzymes présentes dans le germe de soja et les microorganismes utilisés pour déclencher le processus de fermentation. Cependant, les méthodes de caractérisation analytique utilisées dans ce travail ne nous ont pas permis de déterminer les modifications éventuelles du degré d'hydrolyse des phytates et de déterminer la formation éventuelle d'inositol triphosphate (InsP3) dont le potentiel préventif vis-à-vis du cancer de la prostate ont été décrits dans la littérature (Singh et Agarwal, 2005).

V.3.3. Bilan des essais de fermentation

Le procédé de fermentation lactique du germe de soja développé par GENIBIO à l'échelle industrielle, a permis de valoriser la matrice entière du germe de soja sous la forme d'un ingrédient dont les critères organoleptiques par rapport au germe de soja natif ont été largement améliorés et dont la composition en métabolites secondaires reste particulièrement intéressante. Il est apparu intéressant à ce stade de déterminer l'évolution de critères biologiques ciblés ayant pu être améliorés entre la matière première native et le germe fermenté. En s'appuyant sur les données bibliographiques relatives aux effets bénéfiques des molécules présentes dans le germe de soja, l'évaluation de l'activité antioxydante de l'ingrédient fermenté s'est révélée comme une piste d'étude particulièrement prometteuse…

V.4. Evaluation de l'activité antioxydante du nouvel ingrédient fermenté

V.4.1. Implication des processus oxydatifs dans le développement des cancers et des maladies cardiovasculaires

La relation potentielle existant entre les mécanismes de stress oxydant et le développement de cancers fait actuellement l'objet de nombreuses investigations. Les espèces oxygénées réactives, telles que le radical anion superoxyde, le radical hydroxyle ou le peroxyde d'hydrogène, sont la cause d'importants dégâts oxydants dans tous les systèmes vivants et interviennent dans les mécanismes de développement des cancers, de l'artériosclérose, de la cataracte ou de l'hypertension (Frenkel, 1992 ; Seidman *et al.*, 1999).

De nombreuses études sont actuellement menées sur les antioxydants naturels issus de l'alimentation. Des molécules antioxydantes telles que les vitamines A, C et E, les polyphénols ou le sélénium sont capables d'atténuer la toxicité des radicaux libres à la fois *in vitro* et *in vivo* grâce à leur potentiel antioxydant. Les extraits végétaux contenant plusieurs familles de métabolites secondaires présentent une forte activité antioxydante, suggérant qu'une majeure partie de cette activité est due à la combinaison de plusieurs substances (Liu, 2004). De plus, les produits fermentés traditionnels dérivés des graines entières de soja ont souvent été associés à un effet protecteur vis-à-vis des maladies liées au stress oxydant. Etant donné sa richesse en divers métabolites secondaires, il est apparu intéressant d'explorer les capacités antioxydantes du germe de soja et de comparer ces propriétés avant et après fermentation.

V.4.2. Objectif de l'étude

En combinant les résultats issus de la revue bibliographique et de la caractérisation analytique complète du germe de soja, il apparaît que les principaux composés potentiellement antioxydants présents dans le germe de soja seraient les suivants:

- Les tocophérols, qui sont des composés phénoliques appartenant à la famille de la vitamine E, présents en quantité significative dans la fraction lipidique du germe de soja et pouvant contribuer à son pouvoir antioxydant global.
- Les isoflavones, dont la capacité antioxydante pourrait être liée à la position et au nombre de groupements hydroxyles présents sur leur noyau phénolique.
- Les saponines appartenant aux groupes A et B, dont le pouvoir antioxydant a également été décrit dans la littérature.

Le germe de soja contient donc un ensemble diversifié de substances potentiellement antioxydantes. La dernière partie de ce travail de recherche a donc consisté à étudier parallèlement les évolutions au cours du procédé de fermentation des propriétés antioxydantes de l'ingrédient développé par GENIBIO et sa composition en métabolites secondaires.

Cette étude a fait l'objet d'une quatrième publication (en cours d'examen) :
Jane Hubert, Monique Berger, Françoise Nepveu, François Paul, Jean Daydé (**2006**). "Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ". *J. Agric. Food Chem.*

PUBLICATION 4

Effects of Fermentation on the Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of Soy Germ

ABSTRACT

Fermented soy foods are associated with protective effects towards free-oxygen related diseases. Soy germ is a remarkable source of bioactive phytochemicals which offers an interesting alternative as starting ingredient for fermented products. The present work covers the compositional changes occurring in soy germ during a lactic acid fermentation. The antioxidant properties of periodically taken fermented extracts were evaluated using different methods, and correlated with the concentration and conjugation modifications of isoflavones, saponins, phytosterols and tocopherols. Our results demonstrated that fermented soy germ extracts exhibit a higher inhibition effect against the superoxide anion radical, and slighter but significant ferric-reducing and DPPH radical scavenging effects compared with raw soy germ. When looking into the antioxidant activities of purified standard molecules, we showed that isoflavones were not the only compounds contributing to the antioxidant capacity of soy germ. Tocopherols and soyasapogenol B were the most effective as free radical scavengers, and β-sitosterol showed the highest ferric-reducing activity. Compared with the usual whole seed-based products, fermented soy germ provide interesting characteristics including the improvement of its sensory properties while preserving its remarkable combination of antioxidant phytochemicals.

KEYWORDS : fermented soybean germ; isoflavone; soyasaponin; tocopherol; β-sitosterol; antioxidant

INTRODUCTION

A large number of traditional fermented soybean products have been consumed for thousands of years in Asian countries and have reached progressively the occidental markets. Fermentation is widely used in the food industry not only to improve the sensory characteristics of a product, but also to eliminate certain undesirable constituents, make nutrients more accessible while preserving and even improving the nutritional properties. In addition to be natural, nutritious and safe, epidemiological studies have shown that traditional fermented soybean products exhibit a potent anticarcinogenic effect (1). Other works conducted on animal models have suggested significant biological activities in the prevention of gastric disorders (2), coronary heart diseases (3) and cancer (4). These effects have been partly attributed to the stronger antioxidant properties of fermented soybean products compared with unfermented ones (5). Most of the research concerning the health promoting antioxidant properties of soybean focused on the role of isoflavones (6), even though soybean is an important source of other naturally occurring potential antioxidants, including soyasaponins, tocopherols and phytosterols.

Twelve chemical structures of isoflavones are detected in high level in soybean seeds. The aglycone molecules daidzein, glycitein and genistein may be conjugated with a 7-O-β-glucoside, a 6''-O-malonylglucoside or a 6''-O-acetylglucoside group (**Figure 15**).

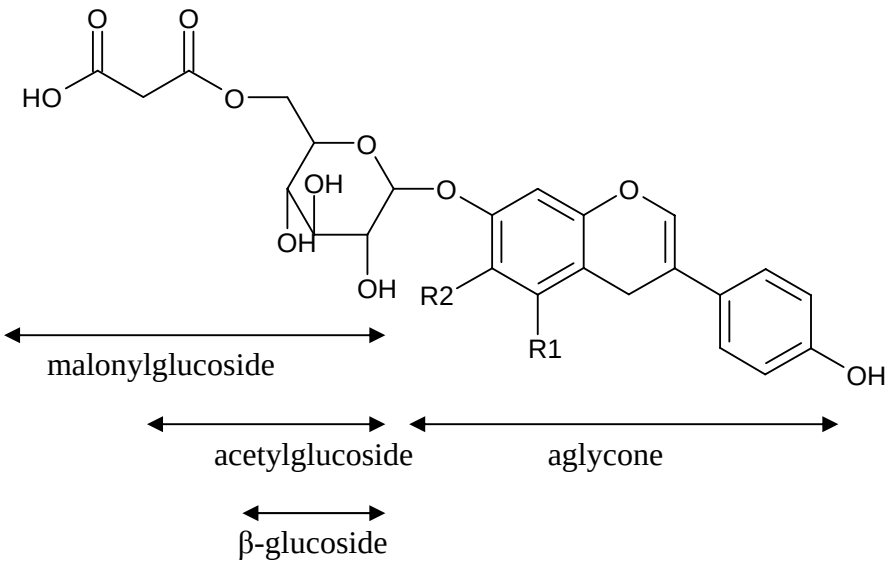
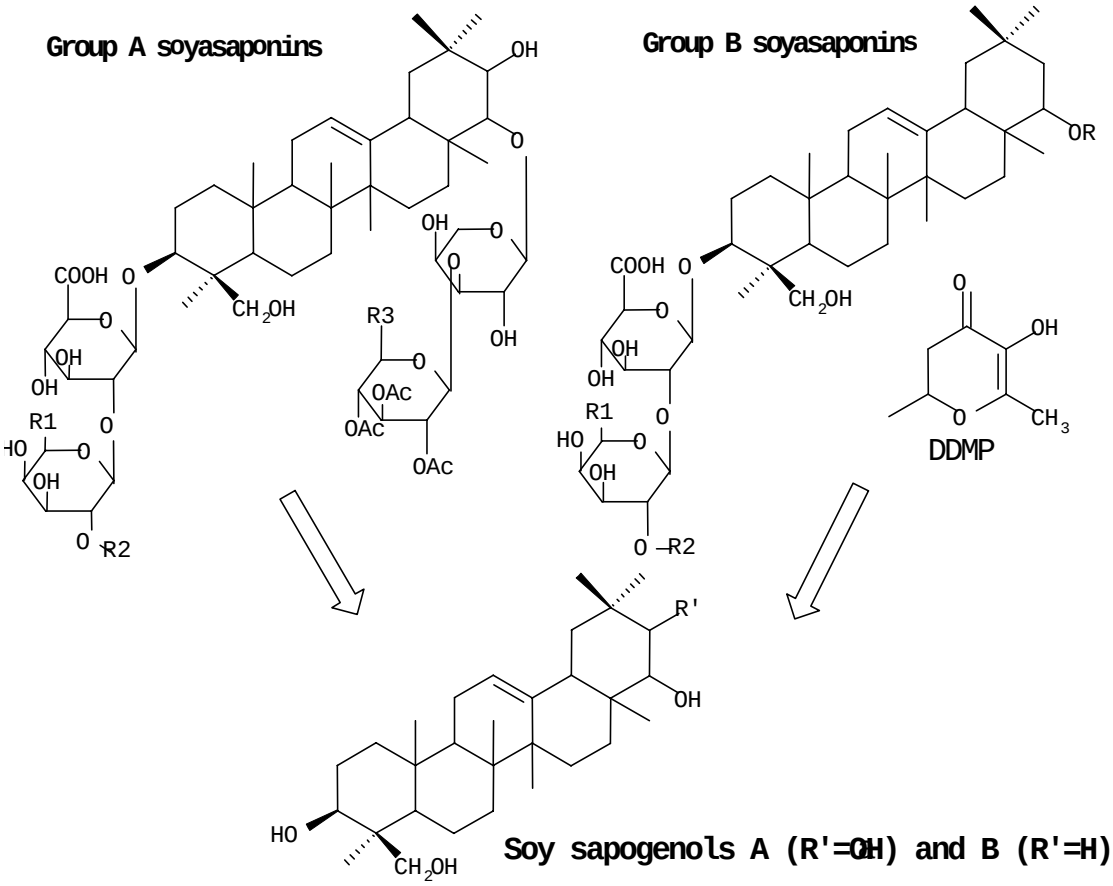


Figure 15. Structures of soybean isoflavones (daidzein: $R_1 = R_2 = H$; glycitein: $R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$; genistein: $R_1 = OH$, $R_2 = H$)

These bioactive phenolic compounds may play a crucial role in the prevention of oxidation-related diseases including atherosclerosis (7), hypertension (8), breast cancer (9), or inflammatory bowel syndrome (10). Soyasaponins are another class of natural glycosides found in soybean seeds and soy-derived products. These triterpenoid molecules are divided into two major groups A and B, each containing an aglycone fraction linked to one or more oligosaccharide chains (**Figure 16**).



Group A soyasaponins			
	R_1	R_2	R_3
A1	CH_2OH	β-D-glu	CH_2OAc
A2	CH_2OH	H	CH_2OAc
A3	H	H	CH_2OAc
A4	CH_2OH	β-D-glu	H
A5	CH_2OH	H	H
A6	H	H	H

Group B soyasaponins			
R = H	R = DDMP	R_1	R_2
I	βg	CH_2OH	α-L-rham
II	βa	H	α-L-rham
III	γg	CH_2OH	H
IV	γa	H	H
V	αg	CH_2OH	β-D-glu

Figure 16. Structures of soyasaponins A and B and aglycone corresponding forms

The effects of soyasaponins on human health have received much less attention than isoflavones, even if they have been shown to exert hypocholesterolemic, anticarcinogenic activities (11), as well as a beneficial effect against liver injury (12). Tocopherols (Vitamine E) are lipid soluble molecules also present in significant amount in soybean seeds. They have been extensively studied for their strong antioxidant activity, especially for their roles in preventing disorders of the skin, eye, lungs, and other lipid-rich body constituents by inhibiting cell membrane and DNA damages induced by free radicals (13). It should be underlined that the polar fraction of soybean oil contains also phytosterols in addition to the well-recognized antioxidant tocopherols. The β-sitosterol was found to decrease lipid peroxidation of platelet membranes *in vitro* (14). Depending on the pH and temperature conditions, a fermentation process may dramatically modify the content and the composition of these bioactive compounds (15).

Most of the traditional fermented soy foods, such as tempeh, miso, soy sauces, natto, tofu, or soymilk are produced from whole soybean seeds or from purified soy proteins. By contrast, very few fermented foods are produced from soy germ, although this fraction is a higher source of antioxidant and antiproliferative phytochemicals than all other parts of the seed (16). Soy germ, which accounts only for 2% of the total seed weight, is naturally 6- to 10-fold more concentrated in total isoflavones than cotyledons, with a specific isoflavone distribution containing 40-60 % daidzein, 25-40 % glycitein and 5-20 % genistein, while genistein represents 45-60 % of total isoflavones in the cotyledons (17). Several works have also reported very high concentrations of total soyasaponins in soy germ, with a 9-fold higher amount of group B soyasaponins in the germ compared with cotyledons, and the group A soyasaponins exclusively found in the germ (18). The oil extracted from the germ is also more concentrated in phytosterols and tocopherols.

However, the undesirable sensory properties provided by these compounds, including bitterness and astringency, have limited the consumption of soy germ-derived products for a long time (19). Some processors of soymilk have even tried to remove the germ from the starting raw material to avoid off-flavors in the final product, but this process is in opposition with the conservation of beneficial nutriments. Thus, fermentation appears as a good alternative since the innumerable chemical reactions occurring during the incubation period result in the generation of specific aroma and different new substances.

In this study, we hypothesized that due to its particular phytochemical profile, a fermented soy germ extract should provide significant nutritional improvement and more interesting biological properties than the usual whole seed-derived fermented products. Several reports have underlined the release of antioxidant compounds during a fermentation process (20). The enzymatic conversion of the conjugated isoflavones into the respective bioactive aglycone structures has been the focus of many studies (21), but the effect of fermentation on other metabolites has never been described. The present work covers the changes that occur to phytochemicals in term of concentration and composition when soy germ was fermented by three strains of lactic acid bacteria. The degradation kinetics of glucoside compounds including isoflavones and soyasaponins, as well as the evolution of phytosterol and tocopherol concentrations, were investigated as a function of incubation time during 48 hours. Three different methods, including the DPPH radical scavenging activity, the inhibition of the superoxide anion radical $O_2^{\bullet -}$, and the ferric-reducing antioxidant activity, were applied on periodically taken fermented samples in order to establish a correlation between the compositional changes occurring in soy germ and the antioxidant activity evolution. Purified molecules were also tested in order to identify the substances potentially implicated in the antioxidant properties of soy germ, and to determine in which way a fermentation process may alter, maintain or improve these beneficial characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Fermentation conditions. Soybean germs issued from an industrial load were provided by Genibio (Lorp-Sentaraille, France). A sample of finely ground powder was suspended in ultra-pure distilled

water at a ratio of 150 g/L. The mixture was heated and stirred for 30 min at 65 °C to dissolve solid particles. A 150 mL reconstituted solution was prepared for three fermentation experiments using three standardized mixtures of lactic acid bacteria (named A, B, and C for confidential reasons). The three soy-based medium were inoculated at 1 % (w/v) with each bacterial mixture A, B, and C and incubated at 37 °C for 48 h under slow stirring at 60 rpm. Samples were removed periodically (1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 10 h, 24 h, and 48 h). All samples were then pasteurized at 65 °C for 15 min, lyophilized and stored at –20 °C until isoflavones, saponins, phytosterols and tocopherols analyses and antioxidant assays.

Isoflavone analysis. Isoflavones were quantified as a function of fermentation time. Each taken sample (0.1 g) was dissolved in 80% aqueous methanol (10 mL) and extracted for 2 h at room temperature. The residue was removed by centrifugation at 12000 g for 10 min and decantation of the clear supernatant. Each extract was filtered (0.45 µm) and analyzed by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with a P4000 pump controller, AS3000 autosampler and UV2000 detector monitored at 260 nm (Spectra Physics Analytical Inc., Fremont, California, US). The analytical column (250 × 4.6 mm i.d, 5 µm, Satisfaction RP-C_{18}-AB Cluzeau, Sainte Foy La Grande, France) was kept at 30 °C and operated at a flow rate of 1.5 mL/min. The injection volume was 10 µL. The mobile phase was 0.05% trifluoroacetic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient elution was carried out as reported in a previous study (22). This procedure was duplicated for each sample. The aglycone structures (daidzein, genistein, glycitein), as well as the corresponding β-glucoside conjugated forms (daidzin, genistin and glycitin) were quantified by an external calibration. The response factors of the 6''-*O*-malonylglucosides and 6''-*O*-acetylglucosides were calculated from those of the corresponding β-glucoside forms, correcting them in a molecular mass ratio (22).

Soyasaponin analysis. Soyasaponins belonging to the groups A and B were also analyzed as a function of incubation time. Soyasaponins B were first analyzed on the same hydro-alcoholic extract, with the same chromatographic column and solvents as used for isoflavone determination. UV absorbance was monitored at 205 nm. The gradient elution, identification and calibration methods of all soyasaponins B were precisely described in a previous study (22). The injection volume was 50 µL and the flow rate was 1 mL/min. Total soyasaponins A were then quantified through the analysis of the corresponding aglycone fraction. Soyasapogenol A was analyzed by submitting the hydro-alcoholic extract to an acid hydrolysis at 85 °C for 6.5 h, to release the sapogenol from the conjugated saponin structures. The extraction and hydrolysis steps were duplicated for each sample. UV absorbance was monitored at 205 nm. Solvent A consisted of acetonitrile : 1-propanol : water : acetic acid (80/6/13/0.1 v/v/v/v) and solvent B was 100% acetonitrile. Solvent A was pumped isocratically for 15 min. Then solvent B increased to 100% in 2 min and remained at 100% for 2 min. The injection volume was 50 µL and the flow rate 0.9 mL/min. Soyasapogenols were identified and quantified using an external calibration as described in a previous study (18).

Tocopherol analysis. Lipids containing tophopherols and phytosterols were extracted in a soxhlet apparatus by using *n*-hexane under refluxing for 4 h. The solvent was then evaporated under vacuum at 45 °C. The extracted oils were stored in the dark at -20 °C. For tocopherol quantification, duplicate

samples of the extracted germ oil (50 mg) were transferred into a 5 mL brown volumetric flask, and dissolved in 100% *n*-hexane. The chromatographic separation of α-, β-, γ-, and δ-tocopherols was achieved on a normal phase equisorb silica column (250 × 4.0 mm i.d, 5 µm, Cluzeau, Sainte-Foy-La-Grande, France) coupled with a fluorometric detector monitored at an excitation wavelength of 290 nm and an emission wavelength of 330 nm (multi λ, Waters 2475, Milford, MA). The mobile phase was *n*-hexane/propan-2-ol (99.5/0.5 v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The injection volume was 20 µL. Each tocopherol quantification was based on an external calibration using the standard molecules of α-, β-, γ-, and δ-tocopherols (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Phytosterol analysis. Duplicate samples of the extracted soy germ oil (100 mg) was diluted in a 5 % KOH solution in ethanol (10 mL) and submitted to a saponification at 65 °C for 15 min. The mixture was cooled by adding distilled water (5 mL) and the nonsaponifiable matter was extracted on an aluminum oxide (10 g) column (MP Biochemicals, Eschwege, Gemany) by eluting 5 mL ethanol and 30 mL ether. The extracted solution was evaporated under vacuum and dissolved in 1-methylimidazole (5 µL) and *N*-methyl-*N*-trimethylsilylheptafluoro-acetamide (100 µL) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Silylation was achieved at 105 °C for 15 min. The different soybean phytosterols (campesterol, stigmasterol, β-sitosterol, and Δ-7-avenesterol) were quantified by capillary gas chromatography (GC 8000 series, Fisons, Milano, Italy) using a flame ionization detector (FID) at $P(H_2)$=100 kPa and P(air)=60 kPa. Each sample was directly injected (1 µL) into a 30 m × 0.25 mm i.d × 0.25 µm film thickness Zebron capillary GC column (Phenomenex, Paris, France). The initial oven temperature of 240 °C increased at 4 °C/min to 320 °C where it was held for 10 min. Inlet and flame-ionization detector temperatures were 320 °C. The carrier gas was N_2 at 130 kPa. Betulin was used as internal standard (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Extraction of the antioxidant polar fraction. The periodically taken fermented and non-fermented soybean powders (50 mg) were diluted in a MeOH-H_2O solution (500 µL, 2/1 v:v) and extracted for 30 min at room temperature. After centrifugation (1500 g, 5 min, 4 °C), the supernatant was filtered (0.45 µm). This extraction step was repeated three times. The collected supernatants were evaporated and dissolved either in a MeOH-H_2O solution (2/1 v:v, 4 mL) for the DPPH assay, or in ultra pure distilled water (4 mL) for the other tests measuring the reducing power or the superoxide anion radical scavenging activity.

Measurement of the DPPH radical-scavenging activity. The antioxidant activity was first evaluated using the stable 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl nitrogen-centered radical (DPPH•) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) as a scavenging target. Each polar extract was submitted to serial dilution (0.2, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg/mL) in a MeOH-H_2O solution (1 mL, 2/1 v:v), and mixed with an ethanolic DPPH solution (1 mL, 400 µM). Following a 30 min incubation period in the dark at room temperature, the ability of the extracts to scavenge the radical DPPH was assessed by measuring the absorbance at 523 nm (UVIKON 931 spectrophotometer, Trappes, France). The inhibition percentage of the DPPH absorbance was calculated by the following equation: Scavenging activity (%) = $[A_a – A_b]/A_a$, where A_a is the absorbance of the control mixture, and A_b is the absorbance of the solution containing the tested extract. This method was also tested on the individual purified standards of isoflavones aglycones (daidzein, genistein, and glycitein), and β-glucosides (daidzin, genistin, and glycitin), non-DDMP

soyasaponins I, II and III (Chromadex, Santa Ana, CA, USA), β-sitosterol, stigmasterol, α-tocopherol and δ-tocopherol (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). Each standard was diluted (20, 50, 75, 100, and 150 µg/mL) in a MeOH-H_2O solution (1 mL, 2/1 v:v), and submitted to the DPPH assay as for the fermented soy germ extracts.

Measurement of the reducing activity. The reducing activity of the extracts was determined according to the method of Oyaizu (1986) (24). Each polar extract was submitted to serial dilution (0.2, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg/mL) in distilled water. The resulting samples or distilled water as control (0.5 mL) were mixed with 0.5 mL of a 1 % potassium ferricyanide solution (Prolabo, Paris, France) and 0.5 mL of a sodium phosphate buffer solution (0.02 M, pH = 7.0). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. After 0.5 mL of a 10 % trichloroacetic acid solution (w/v) was added, the mixture was centrifuged at 780*g* for 5 min. The upper layer (1.5 mL) was mixed with 0.2 mL of a 0.1 % ferric chloride solution. The absorbance was measured at 700 nm. A higher absorbance of the mixture indicated a higher reducing activity. The reducing activity of cysteine was used as reference. This method was also tested on the individual purified standards of isoflavones, soyasaponins, phytosterols and tocopherols cited above. Each standard was submitted to serial dilution (20, 50, 75, 100, and 150 µg/mL) in distilled water and submitted to the reducing activity assay.

Measurement of superoxide anion radical scavenging activity. The ability of the extracts to scavenge the superoxide anion radical $O_2^{\bullet-}$ was determined according to the method of Robak and Gryglewski (1988) (25). All reagents were prepared in a sodium phosphate buffer solution (100 mM, pH 7.4). Each soy germ extract was submitted to serial dilution (0.2, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg/mL) in distilled water. The resulting samples or distilled water as control (50 µL) were mixed with a nitrobluetetrazolium solution (NBT, 50 µL, 300 µM), a β-nicotinamide adenine dinucleotide solution (β-NADH, 50 µL, 936 µM) and a phenazine methosulfate solution (50 µL, 120 µM). The final mixtures were incubated at room temperature for 5 min. The absorbance was measured at 560 nm. NBT is a yellow compound that, under double reduction, generates an insoluble blue diformazan precipitate. NBT is reduced directly by superoxide radicals generated by β-NADH. The inhibition of the NBT reduction in the solution shows the capacity of an extract to inhibit superoxide anion radical production. The superoxide anion radical scavenging activity of the sample was calculated according to the following equation: Scavenging activity (%) = $[A_a - A_b]/A_a$, where A_a is the absorbance of the control mixture, and A_b is the absorbance of the solution containing the tested extract. This method was also tested on the individual purified standards of isoflavones soyasaponins, phytosterols and tocopherols cited above. The three antioxidant activity measurement methods were validated by an assay of reproducibility conducted on two reference samples : One fermented soy germ powder and one raw soy germ sample, both issued from an industrial lot. By repeating 3 times during 3 different days the extraction of the polar fraction followed by the three antioxidant assays, we found a variation coefficient lower than 10%, whatever the method tested. This value was considered during the antioxidant activity measurements on the periodically taken soy germ extracts fermented with the three lactic acid strains.

RESULTS

Modification of isoflavone composition during fermentation. The structural isoflavone changes caused by enzymatic hydrolysis occurring in the soy germ extracts during fermentation are shown in **Figure 17**. The initial raw soy germs contained 39.0 ± 2.5 µmol/g of total isoflavones, with β-glucosides, malonylglucosides, aglycones and acetylglucosides accounting for 46.9 %, 44.5 %, 7.3 % and 1.3 %, respectively. The typical distribution of soy germ isoflavones, with daidzein, glycitein and genistein derivates occurring respectively for 62.4 %, 25.7 % and 11.9 % of the total isoflavones, remained constant over 48 h, with a standard deviation lower than 3.7 % for the repartition of the three isoflavone families over the whole incubation period, indicating that isoflavones were not converted into other microbial-induced metabolites, and that the strains A, B and C were not able to metabolize daidzein into equol. The HPLC analysis of the periodically removed fermented samples revealed an increase of the aglycone forms (**Figure 17**), with various kinetics depending on the microorganism composition. After 48 h incubation at 37 °C, the aglycones accounted for 62.7 %, 75.2 %, and 75.3 % of total isoflavones when soy germ was combined with the strains A, B, and C, respectively. At the same time, the concentrations of the malonyl-, acetyl- and β-glucosides isoflavones were significantly reduced. The final fermented soy germ extracts contained less than 22 % malonylglucosides, 15 % β-glucosides, and 2 % acetylglucosides whatever the strain tested.

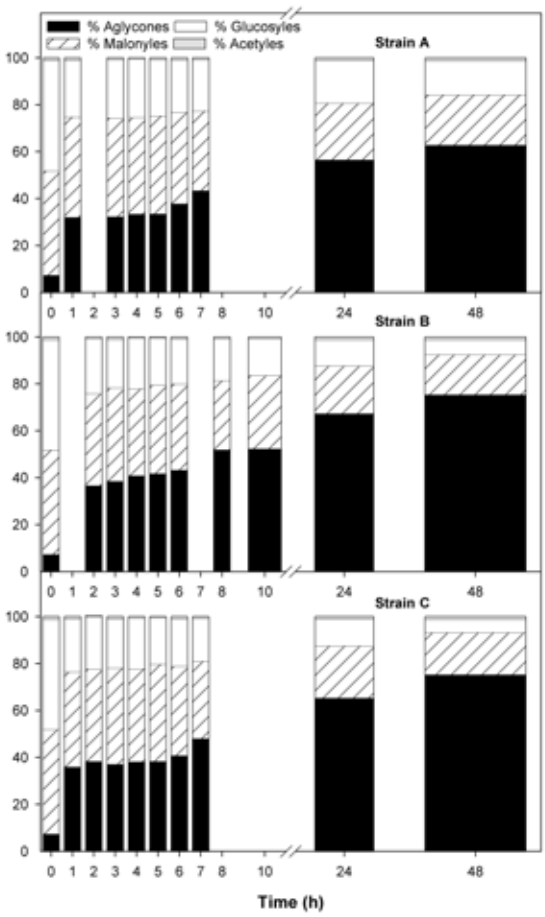


Figure 17. Degradation kinetics of glycosilated isoflavones in soy germ fermented with three lactic acid bacteria strains.

Modification of soyasaponin composition during fermentation. The total amount of soyasaponins B in the initial non fermented soy germ powder was 20.1 µmol/g, with the total 2,3-Dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4*H*-pyran-4-one (DDMP)-conjugated forms accounting for 14.8 µmol/g. The major soyasaponin pairs {I + βg} and {V + αg} accounted for 13.9 µmol/g and 5.4 µmol/g in the native soy germ, respectively. The other soyasaponins II, III, IV, βa, γg, and γa were largely minor and represented together only 4.2% of total soyasaponins belonging to the group B. As for isoflavones, the conjugation profile of soyasaponins B was modified during the incubation period. The amount of DDMP-conjugated soyasaponins decreased drastically from 14.8 µmol/g to 2.1 µmol/g when soy germ was fermented with the mix A, to 9.0 µmol/g with the mix B, and to 2.9 µmol/g with the mix C, indicating that all the lactic acid bacteria tested were able to cleave the DDMP-moieties, releasing a maltol molecule. From the beginning to 10 h of incubation, the total concentration of soyasaponins B decreased from 20.1 µmol/g to a value comprised between 11.2 µmol/g (strain A) and 14.4 µmol/g (strain C), mainly because of the degradation of soyasaponin I and its DDMP corresponding form βg (**Figure 18**).

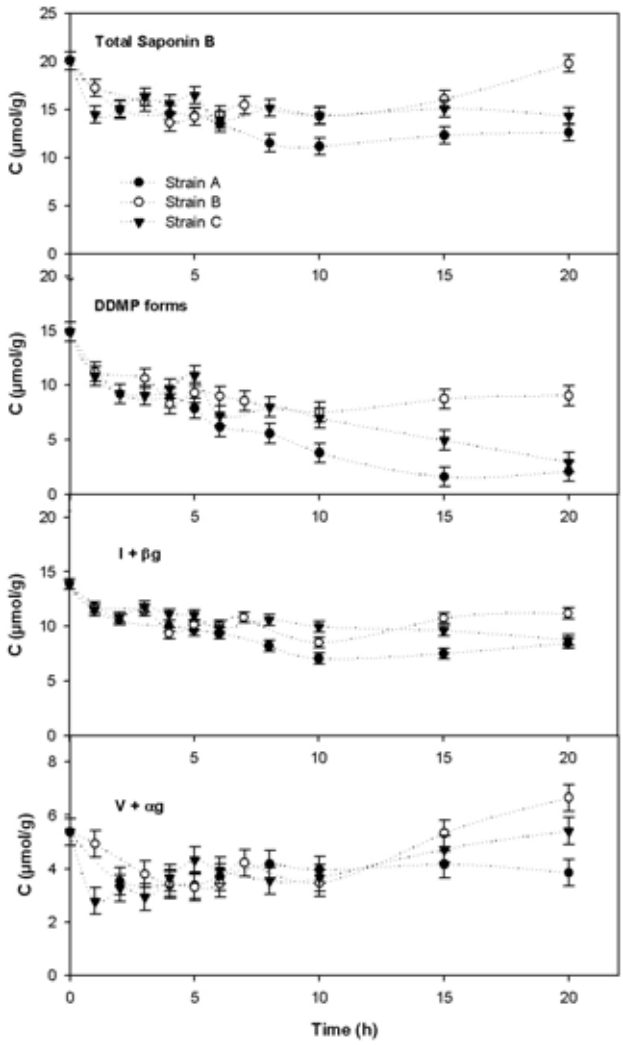


Figure 18. Group B soyasaponin profile evolution during soy germ lactic acid fermentation.

These trisaccharidic glycosilated soyasaponins may have lost their terminal sugar by enzymatic hydrolysis and convert into other unidentified structures. However, the concentration of soyasaponins V and αg remained constant during this period in the three culture media. From 10 h to 48 h, the total concent of soyasaponins B remained unchanged when soy germ was incubated with the strains A and C, reaching a final value of 12.6 µmol/g and 14.3 µmol/g, respectively. By contrast, an unexpected increase in the major soyasaponins {I + βg} and {V + αg} was observed from 10 h to 48 h when the soy germ was incubated with the strain B, with a final concentration of 19.8 µmol/g total soyasaponins. This could be explained by the deglycosilation of particular soyasaponins belonging to the group A. It has been reported that after deglycosilation, soyasaponins A4 and A1 become structurally similar to soyasaponin V belonging to the group B and elute at the same retention time during HPLC analyses, what can explain the increased concentration of soyasaponins {V + αg } (15). Unfortunately, due to the lack of purified standard molecules and the difficulty to quantify the various structures of conjugated soyasaponins A, the degradation kinetics of the glycosidic fraction was not studied. By measuring the final concentration of soyasapogenol A, we access to the total amount of soyasaponins belonging to the group A, that is 27.3 µmol/g in the initial raw soy germ. This amount was unchanged at the end of the fermentation experiment, whatever the strain tested.

Effect of fermentation on tocopherol and phytosterol contents. Tocopherol and phytosterol contents were significantly reduced during fermentation in the three culture systems (**Table 1**). Raw soy germs contained 0.36 mg/g of total tocopherols, with 47.5% α-tocopherol, 0.3% β-tocopherol, 2.2% γ-tocopherol, and 50.0% δ-tocopherols. At the end of the incubation period, the total amount of tocopherols accounted only for less than 0.08 mg/g whatever the strain tested. Changes in phytosterol concentrations were also observed, depending on the culture system (**Tableau 29**).

Tableau 29. Tocopherol and phytosterol contents after lactic acid fermentation of soy germ determined by HPLC (see experimental section).

tocopherols	alpha (mg/g)	beta (mg/g)	gamma (mg/g)	delta (mg/g)	**Total (mg/g)**	**Total (µmol/g)**
molecular weight (g/mol)	430.7	416.7	416.7	402.7		
unfermented	0.17	ND	0.01	0.18	**0.36**	**0.87**
strain A	0.03	ND	0.01	ND	**0.05**	**0.09**
strain B	0.03	0.01	0.04	0.01	**0.08**	**0.19**
strain C	0.04	ND	0.01	ND	**0.05**	**0.12**
phytosterols (mg/g)	Campestérol (mg/g)	Stigmastérol (mg/g)	b-Sitostérol (mg/g)	d-7Avenstérol (mg/g)	**Total (mg/g)**	**Total (µmol/g)**
molecular weight (g/mol)	400	412	414	412		
unfermented	0.13	0.2	3.7	0.13	**4.17**	**10.06**
strain A	0.1	0.16	1.83	0.22	**2.31**	**5.59**
strain B	0.13	0.21	2.29	0.39	**3.01**	**7.31**
strain C	0.03	0.08	0.87	0.11	**1.09**	**2.64**

ND: Non Detected. Values are the mean of duplicate analyses.

Raw soy germs contained 4.17 mg/g total phytosterols, with more than 80% β-sitosterol. After 48 h, phytosterols were partly removed. When incubated with the strain A, the final soy germ extract contained 2.31 mg/g phytosterols, 3.01 mg/g with the strain B, and only 1.09 mg/g when incubated with the strain C. Nevertheless, the relative proportion of the individual phytosterols was not significantly altered, with β-sitosterol accounting for 75.9% to 79.0% of total phytosterols, campesterol for 3.1% to 4.3%, stigmasterol for 6.8% to 7.2%, and Δ-7-avenesterol for 9.7% to 12.9%. Several factors might be attributed to the phytosterol loss, including oxidation or dehydration.

DPPH radical scavenging activity of fermented soy germ extracts. The DPPH radical scavenging activities of the three fermented soy germ culture medium as a function of incubation time are shown in **Figure 19**.

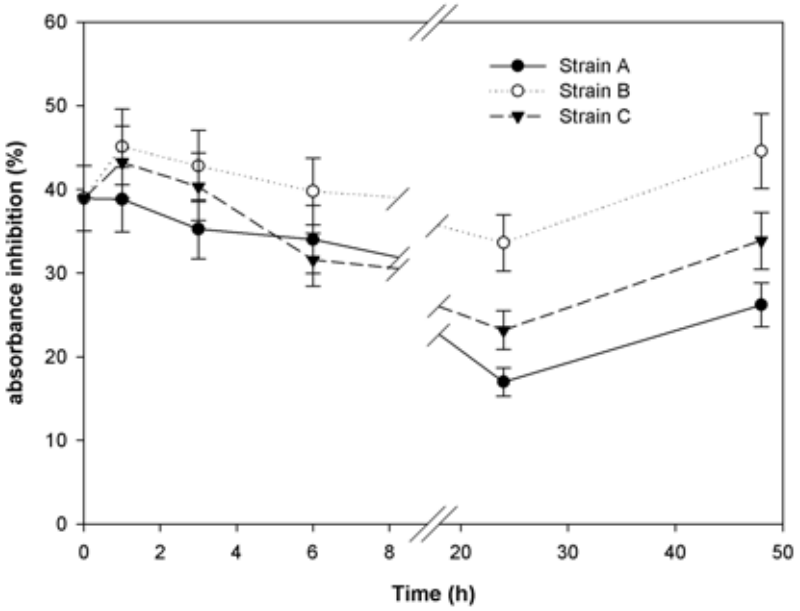


Figure 19. DPPH radical scavenging activity of fermented soy germ extracts (c = 1g/L, λ = 523 nm)

It was found that raw soy germ inhibited the absorbance of DPPH by 39 % at a concentration of 1 g/L (λ = 523 nm). During the first hour, the scavenging effect increased slightly when soy germ was inoculated by the strains B and C, while remained constant when inoculated by the strain A. Then, the DPPH scavenging effect of the three fermented culture medium until 24 h decreased from 39% to 17% when soy germ was incubated with the strain A, from 45% to 34 % with the strain B, and from 43% to 23% with the strain C. A slight increase was finally observed from 24 h to 48 h in the three culture medium. Soy germ fermented with the strain B showed the strongest final scavenging effect with a 45% DPPH absorbance inhibition compared with 26% and 34% when soy germ was fermented with the strains A and C, respectively.

Ferric reducing power of fermented soy germ extracts. The ferric-reducing antioxidant activities of the periodically taken fermented soy germ extracts were evaluated for each strain as a function of incubation time. As shown in **Figure 20**, the three culture medium had a similar trend during the whole experiment, but the fermented soy germ extracts exhibited a different evolution of reducing activity compared with the DPPH scavenging effect. The initial ferric-reducing power of raw soy germ, expressed as an equivalent amount of cystein (59.7 µM), was globally maintained until 6 hours of incubation, followed by a significant decrease until the end of the experiment. From 6 h to 48 h of incubation, the reducing power decreased from 61.5 to 9.7 µM cystein equivalents when soy germ was incubated with the strain A, from 55.4 to 27.3 µM with the strain B, and from 61.1 to 17.9 µM with the strain C. Thus, our fermentation conditions induced an important reduction of soy germ reducing power if the incubation period is longer than 6 h.

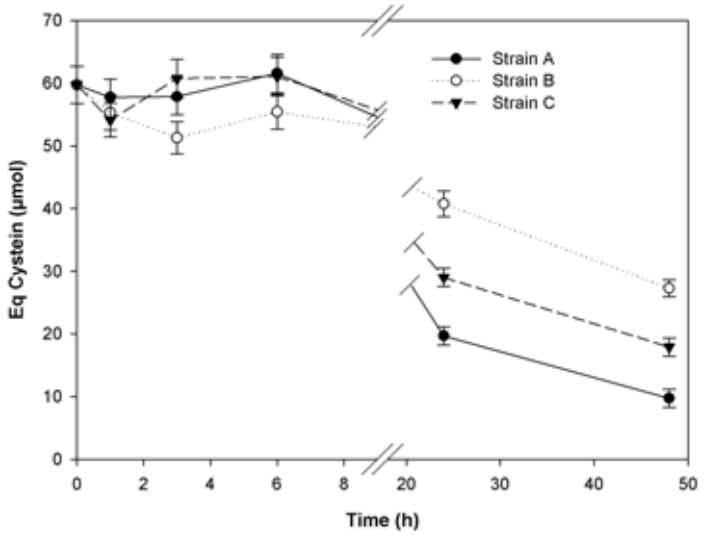


Figure 20. Time-dependent reducing activity of soy germ fermented with various strains

Superoxide anion radical ($^{\bullet}O_2^-$) scavenging activity of fermented soy germ extracts. The ability of the fermented soy germ extracts to scavenge the superoxide anion radicals was also investigated during the fermentation experiment. Raw soy germ inhibited the production of superoxide anion radicals by 25 % at 0.2 g/L. As shown in **Figure 21**, the evolution trend of oxygen-radical scavenging activity in the three culture medium were very similar during the whole incubation period, with a high increase from the beginning to 6 h, followed by a weaker, but significant increase until 48 h. The final values of the superoxide radical absorbance inhibition were 80.2%, 92.9%, and 86.9% when soy germ was incubated with the mixes A, B, and C, respectively.

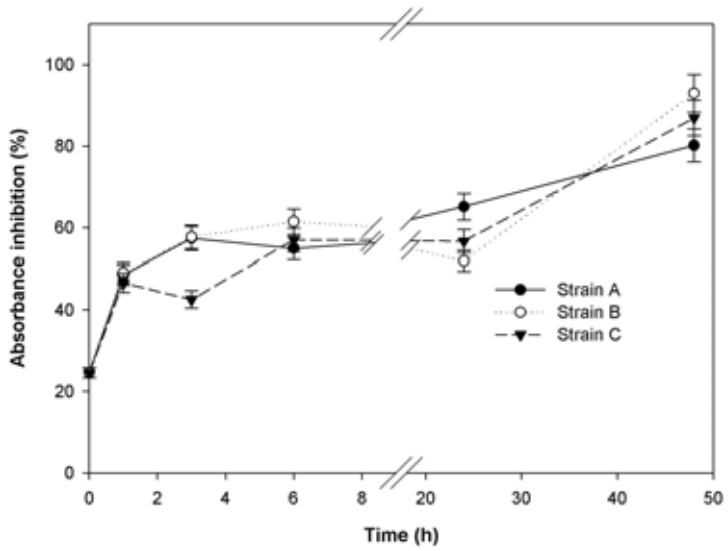


Figure 21. Oxygen-radical scavenging activity of fermented soy germ extracts (c = 0.2 g/L)

Antioxidant activity of purified standard molecules. In an attempt to correlate the antioxidant activity of the periodically taken extracts with the evolution of soy germ phytochemicals during fermentation, we also tested the antioxidant activity of purified standard molecules present in high levels in soy germ (**Tableau 30**).

Tableau 30. Antioxidant activity of purified soy germ secondary metabolites

nom	DPPH absorbance inhibition (%)	ferric-reducing antioxidant activity (mM cystein equivalent)	Oxigen-radical scavenging activity (%)
α-tocopherol	41	0.35	>90
α-tocopherol	74	0.19	>90
β-sitosterol	<10	1.51	<10
daidzeine	16	0.68	40
glyciteine	<10	1.07	53
genisteine	13	0.39	46
daidzine	17	0.10	63
glycitine	<10	0.07	59
genistine	<10	0.63	73
sapogenolA	10	0.37	41
sapogenolB	44	0.85	<10
saponineI	<10	0.42	18
saponineII	<10	1.18	<10
saponine III	<10	0.14	<10

Values are the mean of duplicate analyses

These compounds included α- and δ-tocopherols, β-sitosterol, daidzein, glycitein, genistein, and their β-glucoside corresponding forms daidzin, glycitin and genistin, as well as soyasapogenols A and B, soyasaponin I, II and III. It was found that δ-tocopherol was the most effective in scavenging the DPPH radical with a 74% absorbance inhibition at a concentration of 0.5 mg/mL, followed by soyasapogenol B and α-tocopherol which exerted respectively 44% and 41% absorbance inhibition at the same concentration. Soyasapogenol A was less effective than soyasapogenol B, with only a 10% absorbance inhibition. Genistein and daidzein exerted a similar effect (13% and 15% absorbance inhibition, respectively), while glycitein was less effective (3%). In comparison, the β-glucoside conjugated isoflavones daidzin, genistin and glycitin, as well as the non-DDMP conjugated soyasaponins I and II and β-sitosterol were less active towards the DPPH radical, with an inhibition effect lower than 2 %. Different trend were observed between the DPPH radical scavenging and the ferric-reducing activities. The reducing power at 0.5 mg/mL was in the order of β-sitosterol > soyasaponin II ≈ glycitein > soyasapogenol B > daidzin ≈ daidzein > genistein > soyasapogenol A. The other purified standards were very less effective. By contrast with the DPPH assay, α- and δ-tocopherols did not exhibit any reducing activity under these assay conditions. β-sitosterol, which was not able to scavenge the DPPH radical, showed the highest reducing activity compared with the other standard molecules (1.5 mM cystein equivalents). The reducing power of β-glucoside isoflavones were weaker than that of the corresponding aglycones. As for the DPPH assay, α- and δ-tocopherols were the most effective molecules in scavenging the superoxide anion radical $O_2^{\bullet-}$ with an absorbance inhibition higher than 90% at a concentration of 0.05 mg/mL, followed by the β-glucoside isoflavones genistin, daidzin, and glycitin which exerted respectively 73%, 63%, and 59% absorbance inhibition at the same concentration. The isoflavones aglycones exhibited also a significant activity, with an absorbance inhibition of 46%, 40%, and 53% for genistein, daidzein, and glycitein, respectively. In comparison, the soyasaponins and phytosterols were less active towards $O_2^{\bullet-}$.

DISCUSSION

Fermented soy foods are associated with many protective effects towards a wide variety of diseases related to aging process or radical damages. These health benefits have been attributed to the antioxidant capacity improvement of particular compounds structurally modified or released after bacterial hydrolysis. Numerous soy-derived fermented products are commercially available, most of which are made from the whole soybean seeds or soy protein isolates. However, extracts using isolated soy germ, normally a waste product from soybean processing due to its off-flavour, could offer an interesting alternative as starting material for fermented ingredients, since this fraction is a naturally higher source of bioactive phytochemicals than all other parts of soybean seeds. Moreover, the radical scavenging capacity of soy germ extracts was observed much higher than those of cotyledon extracts (26). Raw soy germ was particularly concentrated in total isoflavones, saponins from the groups A and B, phytosterols and tocopherols, which all have demonstrated potential antioxidant activities. In this study, we hypothesized that due to its specific phytochemical profile, fermentation of soy germ might result in both taste improvement and enhancement of antioxidant properties.

After fermentation, the total amounts of isoflavones and soyasaponins were globally maintained, conferring to the final soy germ extracts a more interesting composition and additional biological value compared with the traditional fermented soy foods made from whole soybean seeds, which are largely less concentrated in these bioactive phytochemicals. We observed that the incubation of soy germ with lactic acid bacteria in the three culture systems led to considerable changes in the isoflavone and soyasaponin conjugation profiles. A progressive conversion of all glycosilated isoflavone structures into aglycones occurred during the whole incubation period, suggesting that the microorganisms tested had a β-glucosidase activity. In parallel, the concentration of biologically inactive isoflavones malonylglucosides and β-glucosides were significantly reduced. These results are in agreement with previous works reporting that fermented soybean foods contain traditionally aglycones as predominant isoflavone structures (21). This is of great interest since the chemical structure of each isoflavone determines its bioavailability and thus its biological activity. Several scientists have reported that isoflavone aglycones in soy foods are absorbed more efficiently through the gastrointestinal tract than their respective glucosides in humans (27). By contrast, other works have suggested that conjugated isoflavones are more bioavailable because the β-glucosidic moiety may act as protecting group to prevent biodegradation of isoflavones before reaching the gut (28). In this fermentation experiment, it becomes possible to control the final concentration of the bioactive aglycones by choosing a specific incubation time for the bioconversion of conjugated isoflavones. Saponins are another class of soybean glycosilated compounds that were structurally influenced by the fermentation process, what is also interesting since the biological activity of soyasaponins depends highly on their overall conformation, mainly given by the length, the number, and the composition of the sugar side chain (11). We observed that the native soyasaponins conjugated with a 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4*H*-pyran-4-one (DDMP) group were progressively converted as a function of incubation time into their non-DDMP counterpart. All the lactic acid bacteria tested were able to cleave the DDMP-moieties of the group B soyasaponins to release a maltol molecule, what can improve the taste of the final fermented soy germ extract, since a sweet flavor has been attributed to the presence of free maltol molecules (19). In contrary to isoflavone structure modifications, the absence of soyasapogenols A and B in the three culture medium at the end of the experiment revealed that soyasaponins were not fully deglycosilated. We only observed that the contents of trisaccharidic glycosilated soyasaponins {I + βg} and {V + αg} decreased slightly depending on the culture system and incubation time, probably due to the loss of their terminal sugar by enzymatic hydrolysis and conversion into other unidentified structures. The well-recognized bioactive phytosterols and tocopherols accounted respectively for 4.17 mg/g and 0.36 mg/g in raw soy germ. After 48 h incubation, more than 85 % of the initial tocopherols were destroyed, whatever the strain tested. This loss could be attributed to the incubation temperature (37 °C) and to the presence of oxygen initially dissolved in the incubation medium, which promote their alteration. This oxidation process occurs in any oxygen-enriched environment where substrates are exposed to ultraviolet light or heat. A significant proportion of phytosterols was also removed during fermentation depending on the culture system. In an attempt to maintain the content and composition of phytosterols in a fermented soy germ product, the strain B was the most suitable.

After looking into the concentration and compositional changes of isoflavones, saponins, phytosterols and tocopherols during the fermentation experiment, the total antioxidant capacity of the periodically taken fermented soy germ extracts was evaluated using three different assays. The first model of scavenging the stable radical DPPH was sensitive enough to show that fermented soy germ extracts contain active principles possessing an H-donor ability decreasing the absorbance of DPPH at 523 nm. The results, expressed as a relative inhibition percentage of the DPPH absorbance, demonstrated that both crude and fermented soy germ extracts exhibited a significant radical scavenging activity, indicating that certain substances in soy germ may function as free radical scavenger to convert free radicals into harmless substances. However, this activity was modulated by the incubation time and the nature of microorganism. The fermentation process induced a slight decrease from 6 h to 24 h in the DPPH scavenging activity of the taken extracts compared with raw soy germ, followed by another increase. In the same way, the ferric-reducing antioxidant activity was globally maintained in the three culture medium from the beginning to 6 h incubation, then decreasing until 48 h. Similar trend were observed in the reducing power of the soy germ extracts fermented with the strains A and C, while the strain B was more active. Interestingly, the periodically taken fermented samples tested in the present study exerted a stronger effect against the superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) than against the stable radical DPPH. Raw soy germ in the three culture medium provided a potent scavenging effect towards $O_2^{\bullet-}$. In comparison, the extracts fermented with the three lactic acid bacteria exhibited a stronger effect. This is particularly important because despite their mild reactive properties in biological systems, superoxide anion radicals are considered as potential intracellular precursors of more aggressive and deleterious reactive oxygen species implicated in various pathological mechanisms, such as carcinogenesis, sclerosis, heart or autoimmune diseases 0. We observed that the extract fermented with the strain A showed a slightly weaker antioxidative effect towards $O_2^{\bullet-}$. These results suggest that the compositional changes of soy germ phytochemicals caused significant elevation of superoxide anion radical scavenging effect.

Isoflavones are considered as potential therapeutic agents against various diseases involving oxidative stress due to their hydrogen or electron donating ability. Their activity should depend highly on the number and position of available hydroxyl groups which determines the stabilization of the resulting phenoxyl radicals formed by hydrogen donation. By testing the antioxidant capacity of purified standards, we found that glycosilated compounds showed a weaker scavenging effect on DPPH than the corresponding aglycone structures. Genistein and daidzein exerted significant and similar scavenging effects regarding the three antioxidant assays, what is in agreement with a recent study showing that genistein and daidzein exhibit a strong radical inhibition capacity (30). In comparison, glycitein showed a different activity, probably due to the presence of a methoxyl group on its phenolic ring. The liberation of the aglycones daidzein, glycitein and genistein through the catalytic action of β-glucosidase during fermentation should lead to an enhancement of antioxidant activity. The relationship between antioxidant capacity of the periodically taken fermented extracts and the evolution of isoflavone composition are shown in **Figure 22**. After 48 h of fermentation, the relative amount of aglycones in soy germ fermented with the strain B, which showed the highest final DPPH

scavenging activity than the other culture medium, increased from 7.3% of total isoflavones at the beginning to 75.2%, compared with 62.7% when soy germ was fermented with the strain A, which showed the lowest DPPH scavenging activity. However, although phenol compounds are considered as strong DPPH scavengers, we did not find any correlation between the content of isoflavones aglycones and the DPPH scavenging activity or the reducing power during the whole incubation period of soy germ (R<0.2, data not shown). This can be explained by the poor hydrogen-donor capacity of isolavones compared with other phenolic compounds (31). This indicates that isoflavones are not the major compounds contributing to the DPPH radical absorbance of soy germ. By contrast, we observed a good linear correlation between the concentration of isoflavone aglycones and the scavenging effect of the superoxide anion radical (R = 0.7805) in the three culture medium, what concords with a recent study where isoflavones inhibited ultraviolet light-induced oxidative DNA damage by a superoxide dismutase-like mechanism (32). Thus, the increasing superoxide scavenging activity during fermentation might be attributed to the increasing concentration of isoflavones aglycones progressively released from their glucosides corresponding structures.

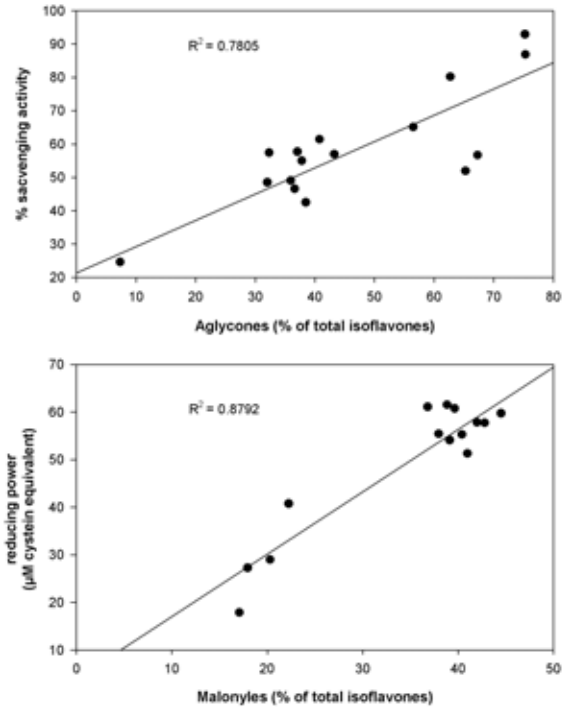


Figure 22. Correlation between antioxidant activity and the contents of aglycone and malonylglucoside isoflavones.

Soy germ is a natural matrix containing a great diversity of other phytochemicals in addition to isoflavones that may contribute to the overall antioxidant properties. When looking into the antioxidant activity of purified standard molecules, we showed that soyasaponins, phytosterols and tocopherols exhibited a strong activity. Regarding the DPPH assay, we found that δ-tocopherol, followed by α-tocopherol, showed the highest effect among all the purified standards tested. In comparison, the

other purified standards of isoflavones, saponins and phytosterols were less active, suggesting that the reduction of DPPH scavenging capacity observed during the fermentation experiment in the three culture medium could be related to the drastic degradation of tocopherols, and that tocopherols may play a more potent role than isoflavones in the radical scavenging effect of soy germ. On the other hand, δ- and α-tocopherols, which were the most active as free radical scavengers, showed the lowest reducing power, indicating that vitamin E function primarily as a chain-breaking antioxidant rather than a powerful reductor compounds. The small difference between δ-tocopherol and α-tocopherol is related to the position of hydroxyl groups on the phenolic ring. This is in agreement with a previous study demonstrating that vitamin E rapidly scavenged hydroxyl radicals, but scavenged other oxidant species at a relative low rate (33). In contrary, β-sitosterol was a very bad free radical scavenger but showed the highest reducing activity toward potassium ferricyanide. We noted that soyasapogenol B had a more potent activity in scavenging DPPH than isoflavones and conjugated soyasaponins. It would be interesting in further research to find specific microorganisms that would be able to cleave the glucuronide bond of glycosilated soyasaponins to release the free aglycones soyasapogenols A and B. We also found that isoflavones standards did not exhibit the strongest reducing power, but a high linear correlation appeared between the concentration of the malonylglucoside isoflavones and the reducing power of the fermented extracts (R = 0.8792) (**Figure 22**). Thus, the degradation of the malonylglucoside isoflavones may also be responsible for the decreased reducing power of soy germ during fermentation.

These results showed that in addition to isoflavones, other phytochemicals including soyasaponins, phytosterols, and tocopherols may contribute together to the overall antioxidant properties of soy germ, and the major part of total antioxidant activity may be due to their combination. Although a fermentation process result in a slight loss of DPPH radical scavenging activity and ferric reducing power in soy germ, similar trends should be observed during the fermentation of cotyledons. Thus, we can suppose that the antioxydant pool of fermented soy germ remains much higher than the antioxydant pool of the other usual fermented foods made from cotyledons. As shown in **Figure 23**, both fermented and non-fermented soy germ exhibit higher levels of antioxidant phytochemicals including isoflavones, soyasaponins, tocopherols and phytosterols compared with cotyledons. Isolated soy germ may be regarded as a suitable natural ingredient for the elaboration of fermented products due to its remarkable content of bioactive compounds and significant antioxidant capacity. In our fermentation conditions, it appeared that a 6 h incubation period of soy germ with the three lactic bacteria tested led to a soy germ extract possessing very interesting characteristics, that is, a low pH reflecting a good stability of the final product, improved sensory properties, higher bioactive aglycone isoflavones, conserved amonts of soyasaponins, phytosterols and tocopherols, and effective antioxidant properties.

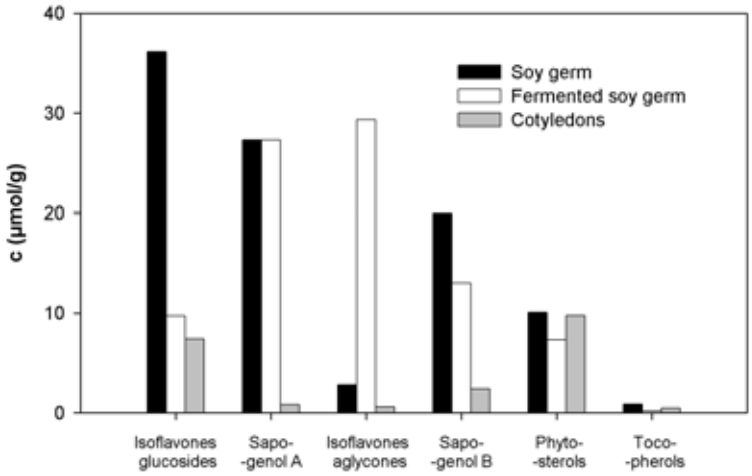


Figure 23. Comparison of antioxidant phytochemical composition in raw soy germ, fermented soy germ and soy cotyledons.

In conclusion, soy germ provides a synergistic combination of several potential antioxidant substances that may find some protective applications against the decline of physiological function involving oxidative damage. Our fermentation process resulted in considerable changes in the conjugation profile of the glycosilated isoflavones and soyasaponins, thus modifying significantly the biological activity of the fermented extracts. By controlling each step of the process, particularly the incubation time, it became possible to predict the final profile of isoflavones and saponins, but also to prevent the degradation of tocopherols and phytosterols. The lactic acid bacteria tested in this study could be used as functional starters cultures for the improvement of the sensory characteristic of soy germ while maintaining the antioxidant capacity of the final product. Further research is now needed to further understand the antioxidant mechanisms of each soy germ phytochemical, and to clarify the possible synergistic effects that may be responsible for the potent antioxidant and anticancer activities of soy germ.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from Genibio Company (Lorp-Sentaraille, France), the Midi-Pyrénées Région, and its health-food network. We thank all these institutions for financial support.

LITERATURE CITED

(1) Nair, V. Soy and cancer survivors: dietary supplementation with fermented soy nutraceutical, Haelan951 in patients who survived terminal cancers. *Townsend letter for doctors and patients, Nov 2004, by Vijaya Nair.*

(2) Kiers, J. L.; Meijer, J. C.; Nout, M. J. R.; Rombouts, F. M.; Nabuurs, M. J. A.; Van de Meulen, J. Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets. *J. Applied Microbiol.* **2003**, 95(3), 545–552.

(3) Yokota, T.; Hattori, T.; Ohishi, H.; Hasegawa, K.; Watanabe, K. The effect of antioxidant-containing fraction from fermented soybean food on atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *Lebensmit. Wissenschaft Technol.* **1996**, 29(8), 751–755.

(4) Ohta, T.; Nakatsugi, S.; Watanabe, K.; Kawamori, T.; Ishikawa, F.; Morotomi, M.; Sugie, S.; Toda, T.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. Inhibitory effects of bifidobacterium-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones. *Carcinogenesis*, **2000** 21(5), 937–941.

(5) Ren, H.; Liu, H.; Endo, H.; Takagi, Y.; Hayashi, T. Anti-mutagenic and anti-oxidative activities found in chinese traditional soybean fermented products *furu*. *Food Chem.* **2006**, 95, 71–76.

(6) Ruiz-Larrea, M. B.; Mohan, A. R.; Paganga, G.; Miller, N. J.; Bolwell, G. P.; Rice Evans, C. A. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Rad. Res.* **1997**, 26, 63–70.

(7) Samman, S.; Wall, P. M. L.; Chan, G. S. M.; Smith, S. J.; Petocz, P. The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis* **1999**, 147, 277–283.

(8) Park, E.; Shin, J. I.; Park, O. J.; Kang, M. H. Soy isoflavone supplementation alleviates oxidative stress and improves systolic blood pressure in male spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2005**, 51(4), 254–259.

(9) DiSilvestro, R. A.; Goodman, J.; Dy, E.; Lavalle, G. Soy isoflavone supplementation elevates erythrocyte superoxide dismutase, but not plasma ceruloplasmin in postmenopausal breast cancer survivors. *Breast Cancer Res. Treatment* **2005**, 89(3), 251–255.

(10) Wiseman, A. Crohn's disease leading to bowel cancer may be avoided by consumtpion of soya isoflavones: Adjunct-chemotherapy with oxaliplatin. *Med. Hypotheses.* **2006**, 66(5), 934–935.

(11) Gurfinkel, D. M.; Rao, A. V. Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr. Cancer* **2003**, 47, 24–33.

(12) Kuzuhara, H.; Nishiyama, S.; Minowa, N.; Sasaki, K.; Omoto, S. Protective effects of soyasapogenol A on liver injury mediated by immune response in a concanavalin A-induced hepatitis model. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, 391(1-2), 175–181.

(13) Niki, E. and Noguchi, N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc. Chem. Res.*, **2004**, 37(1), 45–51.

(14) Van Rensburg, S.; Daniels, W. M.; Van Zyl, J. M.; Taljaard, J. J. A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and melatonin on *in vitro* lipid peroxidation. *Metab. Brain Dis.* **2000**, 15, 257–265.

(15) Rickert, D. A.; Meyer, M. A.; Murphy, P. A. Effect of extraction pH and temperature on isoflavone and saponin partitioning and profile during soy protein isolate production. *J. Food Sci.* **2004**, 69(8), 623–631.

(16) Schryver, T. Increasing health benefits using soy germ. *Cereal Food World*, **2002**, 47(5), 185–188.

(17) Daydé, J.; Berger, M.; Theodorou, V. Variation of soybean isoflavones content and composition. *China & international Soy Conference & Exhibition, November 6-9 2002, Beijing, China, CISCE,* **2002**, pp 361–362.

(18) Hubert, J.; Berger, M.; Daydé, J. Validation of a HPLC-UV method to quantify soy sapogenols A and B in soy germs from different cultivars and in soy isoflavone-enriched supplements. *J. Food Sci.*, **2005**, 70(7), C471–C477.

(19) Okubo, K.; Ijima, M.; Kobayashi, K.; Yoshikoshi, M.; Uchida, T.; Kudou, S. Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **1992**, 56, 99–103.

(20) Pyo, Y. H.; Lee, T. C.; Lee, Y. C. Effect of lactic acid fermentation on enrichment of antioxidant properties and bioactive isoflavones in soybean. *J. Food Sci.* **2005**, 70(3), S215–S220.

(21) Tsangalis, D.; Ashton, J. F.; McGill, A. E. J.; Shah, N. P. Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by beta-glucosidase-producing bifidobacteria. *J. Food Sci.*, **2002**, 67(8), 3104–3113.

(22) Hubert, J.; Berger, M.; Daydé, J. Use of a Simplified HPLC-UV Analysis for Soyasaponin B Determination: Study of Saponin and Isoflavone Variability in Soybean Cultivars and in Soy-Based Health Food Products. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53(10), 3923–3930.

(23) Zhang, Y.; Wang, G. J.; Song, T. T.; Murphy, P. A.; Hendrich, S. Erratum : Differences in disposition of the soybean isoflavones, glycitein, daidzein and genistein in humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. *J. Nutr.* **2001**, 131(1), 147–148.

(24) Oyaizu, M. Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr.* **1986**, 44, 307–315.

(25) Robak, J.; Gryglewski, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37, 837–841.

(26) Monje, M. C. ; Berger, M. ; Farines, V. ; Reybier, K. ; Verger, A. ; Daydé, J. ; Theodorou, V. ; Nepveu, F. Antioxidant pool in soybean seeds and by products. *NAFAS*, **2004**, 3(6), 127–32.

(27) Izumi, T.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in high amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1695–1699.

(28) Zubik, L.; Meydani, M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, 77(6), 1459–65.

(29) Halliwell, B.; Cross, C. E. Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. *Env. Health Persp.* **1994**, 102(10), 5–12.

(30) Ruffer, C.; Kulling, S. E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54(8), 2926–2931.

(31) Mitchell, J. H.; Gardner, P. T.; McPhail, D. B.; Morrice, P. C.; Collins, A. R.; Duthie, G. G. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemicals and biological model systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 360, 142–8.

(32) Russo, A.; Cardile, V.; Lombardo, L.; Vanella, L.; Acquaviva, R. Genistin inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, 17(2), 103–108.

(33) Yu, W.; Zhao, Y.; Xue, Z.; Jin, H.; Wang, D.; Liang, X.; Hu, T. Antioxidant activity of natural vitamin E extracted from soybean sludge as assessed by chemiluminescence. *J. Sci. Food Agric.*, **2002**, 82(2), 230–233.

V.4.3. Bilan de l'étude sur les propriétés antioxydantes du germe de soja fermenté

Le procédé de fermentation lactique développé par GENIBIO a donc permis, non seulement d'améliorer les critères organoleptiques de l'ingrédient final par rapport au germe de soja natif, mais également de préserver ses qualités nutritionnelles et son potentiel biologique en terme de capacité antioxydante. Ce procédé s'est en effet traduit par de nombreuses modifications de la composition du germe, notamment au niveau du profil de conjugaison des isoflavones et des saponines, conférant au produit fermenté une combinaison intéressante de plusieurs molécules antioxydantes.

Ce nouvel ingrédient fermenté dérivé du germe de soja pourrait ainsi trouver une application préventive vis-à-vis de certaines maladies causées par des dégâts oxydants, et fera l'objet d'une évaluation préclinique à l'aide de modèles physiopathologiques animaux appropriés et caractérisés par un stress radicalaire (inflammation, Ischémie …).

VI. CONCLUSION GENERALE

Ce travail de recherche s'est consacré à l'étude des voies de valorisation du germe de soja en tant que matière première naturelle particulièrement riche en métabolites secondaires biologiquement actifs. La revue bibliographique de la première partie de ce manuscrit a mis en évidence que la composition des extraits naturels dérivés du germe ou des graines entières de soja est très complexe et que les résultats contradictoires relatifs à l'évaluation biologique de ces extraits sont fortement liés au fait que la composition globale des fractions testées est souvent ignorée.

Une première étape de développement analytique nous a permis de mettre au point et d'optimiser les méthodes manquantes pour la caractérisation la plus complète possible du germe de soja et de ses produits dérivés. La diversité et la complexité structurale de certaines familles de composés rendent en effet difficiles leur identification et leur quantification. Les saponines, en particulier, ont nécessité l'optimisation de 2 méthodes basées sur une séparation analytique HPLC/UV, simples et utilisables en analyses de routine. L'étude des lots de matière première reçus par GENIBIO, a montré que cette matière première est une source importante de protéines, d'acides gras polyinsaturés précurseurs des omégas 3 et 6, d'oligosaccharides, de vitamines et de minéraux, mais aussi de métabolites secondaires possédant des propriétés oestrogéniques, antioxydantes ou anti-inflammatoires et impliqués dans la prévention du développement de différentes maladies.

Le profil des isoflavones dans le germe présente l'originalité d'être majoritairement composé de daidzéine, seule isoflavone pouvant être métabolisée en équol, dont le pouvoir estrogénique et antioxydant ont été démontrés, ainsi que de glycitéine, alors que la graine entière est caractérisée par une forte teneur en génistéine. La glycitéine, exclusivement détectée dans le germe, mériterait des études plus approfondies évaluant ses effets biologiques propres. Le profil des saponines est également particulier dans le germe, puisqu'il contient à lui seul toutes les saponines du groupe A, et une fraction importante des saponines du groupe B.

La composition des métabolites secondaires identifiés dans le germe de soja natif a ensuite été déterminée à l'issue d'un procédé d'extraction développé par GENIBIO conduisant à une fraction enrichie en isoflavones, l'objectif étant d'évaluer l'impact de ce procédé non seulement sur la concentration et le profil des isoflavones, mais aussi sur ceux d'autres composés susceptibles d'avoir été éliminés, partiellement retenus ou concentrés. L'analyse de nombreux lots industriels a révélé que les extraits finaux contiennent non seulement de 3 à 6 fois plus d'isoflavones que la matière première, avec une répartition stable des 3 familles d'isoflavones par rapport au germe natif et une préservation des structures natives glycosylées, mais aussi de 1,6 à 4,3 fois plus de saponines, avec un profil intéressant contenant les deux groupes A et B, conférant aux extraits les activités biologiques potentielles des deux familles de molécules.

Les compléments alimentaires commerciaux enrichis en isoflavones analysés pour leurs teneurs en isoflavones, saponines, protéines, α-galactooligosaccharides et acides gras, ont révélé des compositions très variables selon leur origine (germes, cotylédons, mélanges) et leur procédé de fabrication. Les résultats de cette étude suggèrent que, bien que la plupart des propriétés du soja

reportées dans la littérature soient associées à la présence d'isoflavones, d'autres substances biologiquement actives peuvent contribuer ou jouer le rôle de médiateurs des effets observés. Dans ce contexte, les effets de la matrice entière du germe de soja sont à considérer avec plus d'attention que ceux de molécules individuelles, puisque, même présents en faible quantité, ces composés peuvent agir en synergie ou inhiber les effets des isoflavones. Par conséquent, la caractérisation précise des extraits de soja faisant l'objet d'études cliniques s'avère absolument nécessaire afin d'établir des recommandations justes et éviter d'éventuels effets inattendus associés à leur consommation.

Au vu des débats très controversés concernant la réalité des effets et surtout la sécurité des traitements à base d'isoflavones de soja et dans le but d'utiliser la globalité de la « matrice germe », sans générer de co-produits difficilement valorisables, GENIBIO s'est proposé d'explorer une autre piste de valorisation de sa matière première. Le choix s'est porté sur une fermentation lactique car ce procédé alimentaire, en plus d'être très économique, présente l'avantage de stabiliser l'ingrédient final *via* la production d'acide lactique par les microorganismes, de préserver les nutriments et éventuellement de provoquer la synthèse de nouvelles molécules bioactives.

Ainsi, la caractérisation complète du germe de soja après fermentation a révélé de nombreuses modifications au niveau de la composition des métabolites par rapport au germe natif. Ce procédé de fermentation lactique a permis de valoriser la matrice entière du germe de soja sous la forme d'un ingrédient dont les critères organoleptiques par rapport au germe de soja natif ont été largement améliorés et dont la composition en métabolites secondaires reste particulièrement intéressante. L'étude de l'évolution des isoflavones a révélé des modifications importantes de leur profil de conjugaison, les formes conjuguées ayant été transformées en leur forme aglycone bioactive correspondante sous l'action des microorganismes possédant une activité β-glucosidase. Une libération des groupements DDMP à partir des saponines du groupe B a également été observée. Le procédé de fermentation a permis de préserver la concentration totale des principaux composés potentiellement bénéfiques du germe de soja et de réduire significativement la concentration des phytates, responsables d'une diminution de la biodisponibilité des minéraux, ainsi que des α-galactooligosaccharides, considérés comme des facteurs antinutritionnels responsables d'une mauvaise digestibilité si leur teneur est trop élevée. Cependant, leur présence, même en faible quantité, confère au produit fermenté un potentiel effet prébiotique.

Enfin, l'évaluation des propriétés antioxydantes du germe de soja natif et de l'ingrédient fermenté a mis en évidence que grâce à sa forte teneur en métabolites secondaires par rapport aux cotylédons, le germe de soja fermenté possède un important pouvoir antioxydant en plus de l'amélioration de ses qualités nutritionnelles et organoleptiques. La préservation, voire l'amélioration des propriétés antioxydantes des extraits fermentés, évaluées sur trois modèles *in vitro*, a été reliée à l'évolution de la teneur et de la composition des isoflavones, saponines, phytostérols et tocophérols. Cette étude a montré que les isoflavones ne sont pas les seules molécules antioxydantes contenues dans le germe de soja. Les substances actives contenues dans le germe de soja pourraient donc agir

en synergie contre le déclin des fonctions physiologiques engendré lors des processus de stress oxydants.

La fermentation lactique du germe de soja associée à une caractérisation biochimique complète, font du produit final un ingrédient prometteur dans le domaine de l'alimentation diététique. Une étude *in vivo* réalisée sur un modèle physiopathologique animal, suivie d'un essai clinique, seront nécessaires pour valider son potentiel biologique vis-à-vis de maladies particulières liées au stress oxydant (inflammation, ischémie …). De telles possibilités d'applications permettraient de s'éloigner du contexte actuellement très controversé du marché des isoflavones.

De plus, les compléments alimentaires enrichis en isoflavones destinés à prévenir les troubles de la ménopause ne représentent qu'une part minoritaire du marché de la filière des produits à base de soja. Etant donné que les effets biologiques de la plupart des métabolites secondaires du germe de soja ne sont pas encore élucidés, les applications potentielles de cette matière première dans les secteurs de l'agroalimentaire, de la cosmétique ou de la phytothérapie, sont encore loin d'être totalement explorées.

VII. TABLE DES ILLUSTRATIONS

VII.1. Liste des tableaux

Tableau 1. Profil des acides aminés de la graine de soja. 16
Tableau 2. Profil des acides gras contenus dans les graines de soja. 18
Tableau 3. Composition des minéraux dans différentes fractions de la graine de soja. 20
Tableau 4. Composition des vitamines du germe et de la graine entière de soja. 21
Tableau 5. Principales études impliquant les isoflavones dans la prévention des cancers. 30
Tableau 6. Principales études évaluant l'effet des isoflavones vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. 32
Tableau 7. Etudes impliquant d'autres composés que les isoflavones dans la prévention des cancers. 48
Tableau 8. Réactifs et matériels nécessaires à l'analyse des protéines. 55
Tableau 9. Réactifs et matériels nécessaires pour extraire l'huile des graines de soja. 55
Tableau 10. Réactifs et matériels pour l'analyse des acides gras. 56
Tableau 11. Réactifs et matériels nécessaires à l'analyse des isoflavones. 57
Tableau 12. Réactifs et matériels pour l'analyse des phytostérols. 59
Tableau 13. Réactifs et matériels pour l'analyse des tocophérols. 60
Tableau 14. Réactifs et matériels pour la détermination du facteur de Boman-Birk. 61
Tableau 15. Réactifs et matériels pour l'analyse des phytates. 62
Tableau 16. Réactifs et matériels pour extraire la fraction polaire du germe de soja. 63
Tableau 17. Réactifs et matériels pour l'essai DPPH•. 64
Tableau 18. Réactifs et matériels pour la détermination du pouvoir réducteur des extraits de soja. 65
Tableau 19. Réactifs et matériels pour l'essai $O_2^{\bullet -}$. 66
Tableau 20. Souches utilisées pour les essais de fermentation. 66
Tableau 21. Réactifs et matériels pour préparer les milieux de fermentation. 67
Tableau 22. Taux d'inoculation testés pour optimiser la fermentation. 67
Tableau 23. Variabilité des principaux métabolites du germe de soja. 93
Tableau 24. Profil des isoflavones et des saponines dans le germe natif et la graine entière de soja. 95
Tableau 25. Comparaison des fractions lipidiques du germe de soja et des cotylédons. 97
Tableau 26. Teneur et composition des isoflavones dans les extraits industriels d'isoflavones de soja 101
Tableau 27. Teneur et composition des saponines dans les extraits industriels de germe de soja 103
Tableau 28. Influence d'un procédé de fermentation lactique sur la composition du germe de soja. 123
Tableau 29. Tocopherol and phytosterol contents after lactic acid fermentation of soy germ. 138
Tableau 30. Antioxidant activity of purified soy germ secondary metabolites 141

VII.2. Liste des figures

Figure 1. Description macroscopique de la graine de soja. 14
Figure 2. Comparaison structurale des phyto-oestrogènes du soja et du 17-β-oestradiol 22
Figure 3. Diagramme simplifié de la distribution anatomique des récepteurs oestrogéniques ERβ 22
Figure 4. Structure et conjugaison des 3 familles d'isoflavones du soja 23
Figure 5. Métabolisme de la daidzéine 26
Figure 6. Structure des saponines du soja. 35
Figure 8. Structure chimique de la vitamine E. 40
Figure 9. Structure des sphingolipides. 41
Figure 10. Structure de l'acide phytique. 43
Figure 11. Procédés usuels de transformation des graines de soja 49
Figure 12. Réaction d'une structure polyphénolique avec le radical DPPH 64
Figure 13. Capacité d'acidification des différentes souches testées 121
Figure 14. Mécanisme de libération du maltol en milieu acide 125
Figure 15. Structures of soybean isoflavones 130
Figure 16. Structures of soyasaponins A and B and aglycone corresponding forms 131
Figure 17. Degradation kinetics of glycosilated isoflavones in fermented soy germ. 136
Figure 18. Group B soyasaponin profile evolution during soy germ lactic acid fermentation. 137
Figure 19. DPPH radical scavenging activity of fermented soy germ extracts (c = 1g/L, λ = 523 nm) 139
Figure 20. Time-dependent reducing activity of soy germ fermented with various strains 140
Figure 21. Oxygen-radical scavenging activity of fermented soy germ extracts (c = 0.2 g/L) 141
Figure 22. Correlation between antioxidant activity and isoflavone composition 145
Figure 23. Comparison of antioxidant phytochemical composition in cotyledons, raw and fermented soy germ.. 147

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.

Abel M., Suzuki O., Tasaki K., Tominaga K., Wakasa H. (**1996**). Analysis of lectin binding properties on human Burkitt's lymphoma cell lines that show high spontaneous metastasis to distant organs in SCID mice. *Pathol Int*, 46:977-983.

Abel S., DeKock M., Smuts C.M., de Villiers C., Swanevelder S., Gelderblom W.C. (**2004**). Dietary modulation of fatty acid profiles and oxidative status of rat hepatocyte nodules: effect of different n-6/n-3 fatty acid ratios. *Lipids*, 39(10):963-76.

Adams K.F., Lampe P.D., Newton K.M., Ylvisaker J.T., Feld A., Myerson D., *et al.* (**2005**). Soy protein containing isoflavones does not decrease colorectal epithelial cell proliferation in a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 82(3):620-6.

Adlercreutz H. (**2002**). Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol*, 3(6): 364-73.

Adler-Nissen J. (**1978**). Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food. *Ann Nutr Alim*, 32:205-16.

Akaza H., Miyanaga N., Takashima N., Naito S., Hirao Y., Tsukamoto T., Mori M. (**2002**). Is daidzein non-metabolizer a high risk for prostate cancer? A case-controlled study of serum soybean isoflavone concentration. *Jap J Clin Oncol*, 32(8): 296-300.

Allred C., Twaddle N.C., Allred K.F., Goeppinger T.S., Churchwell M.I., Ju Y.H., Helferich W.G., Doerge D.R. (**2005**). Soy processing affects metabolism and disposition of dietary isoflavones in ovariectomized BALB/c mice. *J Agric Food Chem*, 53(22):8542-50.

Al-Mahfuz A., Tsukamoto C., Kudou S., Ono T. (**2004**). Changes of astringent sensation of soy milk during tofu curd formation. *J Agric Food Chem*, 17(52):7070-4.

Anderson J.W., Johnstone B.M., Cook-Newell M.E. (**1995**). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*, 333: 276-282.

Ando T., Maitani Y., Yamamoto T., Takayama K., Nagai T. (**1998**). Nasal insulin delivery in rabbits using soybean-derived sterylglucoside and sterol mixtures as novel enhancers in suspension dosage forms. *Biol Pharm Bull*, 21(8):862-5.

Andres A., Duplantier M., Eutamène H., Nepveu F., Berger M., Daydé J., Surel O., Fioramonti J., Bueno L., Théodorou V. (**2002**). Effets des matrices riches en isoflavones de soja sur deux modèles d'inflammation digestive. *Symposium Aliment Santé, 2002, Toulouse.*

Anthony M., Clarkson T.B., Bullock B.C., Wagner J.D. (**1997**). Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17:2524-31.

Arici A., Bukulmez O. (**2004**). Phyto-estrogens and the endometrium. *Lancet*, 364:2081-2.

Armstrong W.B., Kennedy A.R., Wan X.S., Atiba J., McLaren C.E., Meyskens F.L. (**2000**). Single dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 9:43-47.

AsterCephac (**2000**). Consumer test to evaluate the efficacy of SoyLife dosed at 2 × 30 mg isoflavones on reducing the hot flushes felt by menopausal women. *Royal Schouten Group of the Nederlands, Giessen, the Nederlands*.

Atkinson C., Frankenfeld C.L., Lampe J.W. (**2005**). Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med*, 230(3):155-70.

B.

Badger T.M., Ronis M.J., Simmen R.C., Simmen F.A. (**2005**). Soy protein isolate and protection against cancer. *J Am Coll Nutr*, 24(2):146S-149S.

Baum J.A., Teng H., Erdman J.W. (**1998**). Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 68(3):545-51.

Bennetau-Pelissero C., Arnal-Schnebelen B., Lamother V., Sauvant P., Sagne J.L., Vebruggen M.A., Mathey J., Lavialle O. (**2003**). ELISA as a new method to measure genistein and daidzein in food and human fluids. *Food Chem,* 82(4): 645-658.

Bennetau-Pelissero C., Latonnelle K.G., Lamothe V., Shinkaruk-Poix S. (**2004**). Screening for oestrogenic activity of plant and food extracts using in vitro trout hepatocyte cultures. *Phytochem Anal*, 15:40-45.

Bennetts H., Underwood E.J., Shier F.L. (**1946**). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia. *Aust Vet J*, 22:2-12.

Berhow M., Cantrell C.L., Duval S.M., Dobbins T.A., Maynes J., Vaughn S.F. (**2002**). Analysis and quantitative determination of group B saponins in processed soybean products. *Phytochem Anal*, 13(6): 343-348.

Berhow M., Kong S.B., Vermillion K.E., Duval S.M. (**2006**). Complete quantification of group A and group B soyasaponins in soybeans. *J Agric Food Chem*, 54(6):2035-44.

Berra B. (**2002**). Dietary sphingolipids in colorectal cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*, 11: 193-197.

Bhardwaj H., Hamama A.A., Rangappa M., Joshi J.M., Sapra V.T. (**2003**). Effects of soybean genotype and growing location on oil and fatty acids in tofu. *Plant Foods for Human Nutr*, 58(3): 197-205.

Birk Y. (**1985**). The Bowman-Birk Inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Int J Pept Protein Res*, 25:113-131.

Birk Y., Gertler A., Khalef S. (**1967**). *Biochim Biophys Acta*, 147, 402–404.

Blair H.C., Jordan S.E., Peterson T.G., Barnes S. (**1996**). Variable effect of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 61:629-37.

Bloedon L.T., Jeffcoat A.R., Lopaczynski W. (**2002**). Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 75:126-136.

Bonina F., Puglia C., Avogadro M., Baranelli E., Cravotto G. (**2005**). The topical protective effect of soybean-germ oil against UVB-induced cutaneous erythema: an *in vivo* evaluation. *Arch Pharm*, 338(12):598-601.

Bramley P., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxborough H.E. (**2000**). Vitamin E. *J Sci Food Agric*, 80:913-38.

Brandon D., Bates A.H., Friedman M. (**2004**). Immunoassays for Bowman-Birk and Kunitz soybean trypsin inhibitors in infant formula. *J Food Sci*, 69(1):11-15.

Breinholder P., Mosca L., Lindner W. (**2002**). Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices. *J Chromatogr B*, 777(1-2):67-82.

Brooks S.P., Oberleas D., Dawson B.A., Belonje B., Lampi J. (**2001**). Proposed phytic acid standard including a method for its analysis. *AOAC Int*, 84(4):1125-9.

Brown N., Lamartinière C.A. (**2000**). Genistein regulation of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor expression in the rat uterus and vagina. *Cell growth and differentiation*, 11:255-260.

Buckee G.K. (**1994**). Determination of total nitrogen in Barley, Malt and Beer by Kjeldahl procedures and the DUMAS combustion method. Collaborative trial. *J Inst Brew*, 100: 57-64.

Buring J., Hennekens C.H. (**1997**). Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Nutr Rev*, 55:S53-S60.

C.

Cai Q., Wei H. (**1996**). Effect of dietary genistein on antioxydant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer*, 25 :1-7.

Campagnoli C., Abba C., Ambroggio S., Peris C., Perona M., Sanseverino P. (**2005**). Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) might reduce hot flushes: an indication from two controlled trials on soy isoflavones alone and with a PUFA supplement. *Maturitas,* 51(2):127-134.

Cao F., Jin T.Y., Zhou Y.F. (**2006**). Inhibitory effect of isoflavones on prostate cancer cells and PTEN gene. *Biomed Environ Sci*, 19(1):35-41.

Chang W., Yu C.Y., Lin T.W., Wang P.H., Tsai Y.C. (**2006**). Soyasaponin I decreases the expression of alpha2,3-linked sialic acid on the cell surface and suppresses the metastatic potential of B16F10 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 341(2):614-9.

Chen A., Berhow M., Tappenden K.A., Donovan S.M. (**2005**). Genistein inhibits intestinal cell proliferation in piglets. *Pediatr Res*, 57:192-200.

Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K. (**1996**). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*, 44:2619-23.

Chen Y., Huang S.C., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K. (**2005**). Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis*, 26(7):1296-306.

Cheng S., Shaw N.S., Tsai K.S., Chen C.Y. (**2004**). The hypoglycemic effects of soy isoflavones on postmenopausal women. *J Women's health*, 13(10):1080-6.

Choi S.K., Adachi M., Utsumi S. (**2004**). Improved bile acid-binding ability of soybean glycinin A1a polypeptide by the introduction of a bile acid-binding peptide (VAWWMY). *Biosci Biotechnol Biochem*, 68(9):1980-3.

Chompreedra P., Fields M.L. (**1984**). Effect of heat and fermentation on amino acids, flatus producing compounds, lipid oxidation and trypsin inhibitor in blends of soybean and corn meal. *J Food Sci*, 49:563.

Choong Y., Lin H.J., Chen C.W., Wang M.L. (**1999**). A rapid gas chromatographic method for direct determination of free sterols in animal and vegetable fats and oils. *J Food Drug Anal*, 7(4):279-90.

Cicero A., Minardi M., Mirembe S., Pedro E., Gaddi A. (**2004**). Effects of a new low dose soy protein/beta-sitosterol association on plasma lipid levels and oxidation. *Eur J Nutr*, 43(5):319-22.

Clark J. (**1996**). Tocopherols and sterols from soybeans. *Lipid technol*, 8:111-14.

Constantinou A.I., Lantvit D., Hawthorne M., Xu X., van Breemen R.B., Pezzuto J.M. (**2001**). Chemopreventive effects of soy protein and purified soy isoflavones on DMBA-induced mammary tumors in female Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer*, 41(1-2):75-81.

Coward L., Smith M., Kirk M., Barnes S. (**1998**). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr*, 68(6): 1486S-1491S.

Crouse J., Morgan T.M., Terry J.G., Ellis J., Vitolins M., Burke G.L. (**1999**). A randomized trial comparing the effects of casein with that of soy proteins containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoprotein. *Arch Intern Med*, 159:2070-2076.

D.

Dalais F., Meliala A., Wattanapenpaiboon N., Frydenberg M., Suter D.A., Thomson W.K., Wahlqvist M.L. (**2005**). Effects of a diet rich in phytoestrogens on prostate-specific antigen and sex hormones in men diagnosed with prostate cancer. *Urology*, 64(3):510-5.

Dang Z.C., Audinot V., Papapoulos S.E. (**2003**). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem*, 278(2):962-7.

Daydé J., Berger M., Theodorou V. (**2004**). Screening and breeding soybeans for isoflavone content and composition. *IV International Soybean Processing and Utilization Conference (ISPUC IV), Foz do Iguassu, PR, Brasil.*

Daydé J., Berger M., Theodorou V. (**2002**). Variation of soybean isoflavones content and composition. *China & international Soy Conference & Exhibition, November 6-9 2002, Beijing, China.*

Daydé J., Lacombe S. (**2000**). Variation of isoflavone content and composition in soybean seeds and related products. Dawn of the Innovative Era for Soybeans - *Third International Soybean Processing and Utilisation Conference - October 15-20, Tsukuba, Ibaraki, Japan.*

De Boever P., Wouters R., Verstraete W. (**2001**). Combined use of Lactobacillus reuteri and soygerm powder as food supplement. *Lett Applied Microbiol*, 33(6): 420-424.

De Lumen B.O. (**2005**). Lunasin : A cancer preventive soy peptide. *Nutr Rev*, 63:16-21.

De Mejia E.G., Bradford T., Hasler C. (**2003**) The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutr Rev* 61(7):239-46.

Decroos K., Eeckhaut E., Possemiers S., Verstraete W. (**2006**). Administration of equol-producing bacteria alters the equol production status in the simulator of the Gastrointestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *J Nutr*, 136(4):946-52.

Decroos K., Vanhemmens S., Cattoir S., Boon N., Verstraete W. (**2005**). Isolation and characterization of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol*, 183:45-55.

Decroos K., Vincken J.P., Heng L., Bakker R., Gruppen H., Verstraete W. (**2005**). Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A*, 29;1072(2):185-93.

Demaison L., Moreau D. (**2002**). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease-related mortality: a possible mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*, 5:463-477.

Di Nardo A., Wertz P., Giannetti A., Seidenari S. (**1998**). Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 78:27-30.

Di Virgilio A., Iwami, K., Wätjen W., Kahl R., Degen G.H. (**2004**). Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicology Letters,* 151(1): 151-162.

DiSilvestro R.A., Goodman J., Dy E., Lavalle G. (**2005**). Soy isoflavone supplementation elevates erythrocyte superoxide dismutase, but not plasma ceruloplasmin in postmenopausal breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat*, 89(3):251-5.

Dittmann K., Toulany M., Classen J., Heinrich V., Milas L., Rodemann H.P. (**2005**). Selective Radioprotection of normal tissues by Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) in mice. *Strahlenther Onkol*, 181(3):191-196.

Doerge D., Sheehan D.M. (**2002**). Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones. *Environ Health Perspect*, 110:349-53.

Duncan A., Merz-Demlow B.E., Xu X., Phipps W.R., Kurzer M.S. (**2000**). Premenopausal equol excretors show plasma hormone profile associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev*, 9:581-6.

Dyrskog S., Jeppensen P.B., Colombo M., Abudula R., Hermansen K. (**2005**). Preventive effects of a soy-based diet supplement with stevioside on the development of the metabolic syndrome and type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Metabolism*, 54(9):1181-8.

E.

Eldridge A.C., Kwolek W.F. (**1983**). Soybean isoflavones: Effect of environment and variety on composition. *J Agric Food Chem*, 31:394-396.

Ellington A.A., Berhow M., Singletary K.W. (**2005**). Induction of macroautophagy in human colon cancer cells by soybean B-group triterpenoid saponins. *Carcinogenesis*, 26(1): 159-167.

Ellington A.A., Berhow M., Singletary K.W. (**2006**). Inhibition of Akt signaling and enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 27(2):298-306.

Engelman H.M., Alekel D.L., Hanson L.N., Kanthasamy A.G., Reddy M.B. (**2005**). Blood lipid and oxidative stress responses to soy protein with isoflavones and phytic acid in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 81(3): 590-596.

F.

Fan S., Meng Q., Auborn K., Carter T., Rosen E.M. (**2006**). BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells. *Br J Cancer*, 94(3):407-26.

Faure E., Chantre P., Mares P. (**2002**). Effects of a standardized soy extract on hot flushes: a multicenter, double-bind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*, 9:329-334.

Field F., Born E., Mathur S.N. (**1997**). Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J Lipid Res*, 38:348-360.

Fleming R. (**2003**). What effect, if any, does soy protein have on breast tissue? *Integr Cancer Ther*, 2(3):225-8.

Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K (**2002**). The biological action of saponins in animal systems: a review. *J Nutr*, 88:587-605.

Frank L., Meyskens J.R. (**2001**). Development of Bowman-Birk Inhibitor for chemoprevention of oral head and neck cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 952:116-123.

Frankenfeld C., McTiernan A., Aiello E.J., Thomas W.K., LaCroix K., Schramm J., Schwartz S.M., Holt V.L., Lampe J. (**2004**). Mammographic density in relation to daidzein-metabolizing phenotypes in overweight, postmenopausal women. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev*, 13(7):1156-62.

Fredman P. (**1998**) Sphingolipids and cell signaling. *J Inherit Metab Dis,* 21:472-480.

Frenkel K. (**1992**). Carcinogen-mediated oxidant formation and DNA damage. *Pharmacol Ther*, 53:127-166.

Friedman M., Brandon D.L., Bates A.H., Hymowitz T. (**1991**). Comparison of a commercial soybean cultivar and an isoline lacking the Kunitz trypsin inhibitor: composition, nutritional value, and effects of heating. *J Agric Food Chem*, 39:327-335.

Fukushima D. (**1991**). Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, technology and nutrition. *Food Rev Int*, 7:323-351.

G.

Garmy N., Taïeb N., Yahi N., Fantini J. (**2005**) Interaction of cholesterol with sphingosine: physicochemical characterization and impact on intestinal absorption. *J Lipid Res*, 46:36-45.

Genovese M.I., Hassimotto N.M.A., Lajolo F.M. (2005). Isoflavone Profile and Antioxidant Activity of Brazilian Soybean Varieties. *Food Sci Tech Int*, 11(3): 205-211.

Golbitz P. (**1995**). Traditional soy foods: processing and products. *J Nutr*, 125(3S):570.

Goodman M., Wilkens L.R., Hankin J.H., Lyu L.C., Wu A.H., Kolonel L.N. (**1997**). Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. *Am J Epidemiol*, 146(4):294-306.

Grubber C., Tshugguel W., Schneeberger C., Hubert J. (**2002**). Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, 346:340-351.

Gurfinkel D.M., Rao A.V. (**2003**). Soyasaponins: The relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr. Cancer,* 47, 24-33.

Gutierrez-Zepeda A., Santell R., Wu Z., Brown M., Wu Y., Khan I., Link C.D., Zhao B., Luo Y. (**2005**). Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic Caenorhabditis elegans. *BMC Neurosci*, 6:54.

H.

Hallund J., Bügel S., Tholstrup T., Ferrari M., Talbot D., Hall W.L., Reimann M., Williams C.M., Wiinberg N. (**2006**). Soya isoflavone-enriched cereal bars affect markers of endothelial function in postmenopausal women. *British J Nutr*, 95: 1120-1126.

Hamada J. (**1996**). Isolation and Identification of the multiple forms of soybean phytases. *JAOCS*, 73(9):1143-51.

Hamanaka S., Hara M., Nishio H., Otsuka F., Suzuki A., Uchida Y. (**2002**). Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J Invest Dermatol*, 119:416-423.

Harland B.F., Morris, E.R. (**1995**). Phytate : A good or a bad food component ? *Nutr Res*, 15(5): 733-754.

Hayashi K., Huang H., Hiraoka N., Ikeshiro Y. (**1997**). Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication in vitro. *Planta Med*. 63(2):102-105.

He J., Gu D., Wu X., Chen J., Duan X., Chen J., Whelton P.K. (**2005**). Effect of soybean protein on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*, 143(1):74-75.

Hedlund T., Van Bokhoven A., Johannes W.U., Nordeen S.K., Ogden L.G. (**2006**). Prostatic fluid concentrations of isoflavonoids in soy consumers are sufficient to inhibit growth of benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. *Prostate*, 66(5):557-566.

Heinonen S., Hoikkala A., Wahala K., Adlercreutz H. (**2003**). Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 87(4-5): 285-299.

Hermansen K., Hansen B., Jacobsen R., Clausen P., Dalgaard M., Dinesen B. (**2005**). Effects of soy supplementation on blood lipids and arterial function in hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr*, 59(7):843-850.

Hiai S., Oura H., Nakajima T. (**1976**). Color reaction of some sapongenins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29:116-121.

Hickey J., Bartke A., Winters T., Henry N., Banz W. (**2005**). Effects of soy protein and soy phytochemicals on mammary tumor development in female transgenic mice overexpressing human pituitary growth hormone. *J Med Food*, 8(4):556-559.

Hoie L., Morgenstern E.C., Gruenwald J., Graubaum H.J., Busch R. (**2005**). A double-blind placebo-controlled clinical trial compares the cholesterol-lowering effects of two different soy protein preparations in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Nutr*, 44(2):65-71.

Hotchkiss C.E., Weis C., Blaydes B., Newbold R., Delclos K.B. (**2005**). Multigenerational exposure to genistein does not increase bone mineral density in rats. *Bone*, 37(5):720-727.

Hu C.C., Hsiao C.H., Huang S.Y., Fu S.H., Lai C.C., Hong T.M., Chen H.H., Lu F.J. (**2004**). Antioxidant activity of fermented soybean extract. *J Agric Food Chem*, 52(18):5735-5739.

Huan P., Tsai W.J., Kuo S.M. (**2003**). Estrogen response element-independent regulation of gene expression by genistein in intestinal cells. *Biochim Biophys Acta-Gene Struct Expression*, 1627(2-3): 63-70.

Hubert J., Berger M., Daydé J. (**2005a**). Use of a simplified HPLC-UV analysis for soyasaponin B determination : study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. *J Agric Food Chem*, 18(53): 3923-3930.

Hubert J., Berger M., Daydé J. (**2005b**). Validation of a high performance liquid chromatography – ultraviolet method to quantify soy sapogenols A and B in soy germs from different cultivars and in soy isoflavone-enriched supplements. *J Food Sci*, 70(7):C1-C7.

Hubert J., Paul F., Daydé J., Berger M. (**2006**). Composition variability in soy-derived dietary supplements designated for menopausal symptom prevention. *O.C.L.*, 13(4):in press.

Hutchins A., Slavin J.L., Lampe J.W. (**1995**). Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan 13 excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J Am Diet Assoc*, 95:545.

Hutchins A.M., McIver I.E., Johnston C.S. (**2005**). Hypertensive crisis associated with high dose soy isoflavone supplementation in a post-menopausal woman: a case report. *BMC Women Health,* 5(1):9.

Hymowitz T., Collins F.I., Panczer J., Walker W.M. (**1972**). Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agron J*, 64: 613-616.

I. / J.

Ikeda T., Udayama M., Okawa M., Arao T., Kinjo J., Nohara T. (**1998**). Partial hydrolysis of soyasaponin I and the hepatoprotective effects of the hydrolytic products. Study of the structure-hepatoprotective relationship of soyasapogenol B analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 46(2):359-361.

Itoh T., Tamura T., Matsumoto T. (**1973**). Sterol composition of 19 vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc*, 50:122-125.

Izumi T., Piskula M.K., Osawa S., Obata A., Tobe K., Saito M. (**2000**). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in high amounts than their glucosides in humans. *J Nutr*, 130: 1695-1699.

Jackson C., Dini J.P., Lavandier C., Rupasinghe H.P.V., Faulkner H., Poysa V., Buzzell D., Degrandis S. (**2002**). Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochem*, 37(10): 1117-1123.

Jenab M., Thompson L.U. (**2000**). Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis. *Carcinogenesis*, 21:1547-1552.

Jenkins D.J.A., Kendall C.W.C., Jackson C.J.C., Connelly P.W., Parker T., Faulkner D. (**2002**). Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr*, 76: 365-372.

Jeong H.J., Park J.H., Kim S.Y., Lam Y., de Lumen B.O. (**2003**). Characterization of Lunasin isolated from soybean. *J Agric Food Chem*, 51:7901-7906.

Jha H.C., Von Recklinghausen G., Zilliken F. (**1985**). Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem Pharmacol*, 29:1367-1369.

Joannou G., Kelly G.E., Reeder A.Y., Waring M.A., Nelson C. (**1995**). A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J Steroid Biochem Molec Biol,* 54(3-4): 167-184.

Joy S., Siow R.C.M., Rowlands D.J., Becker M., Wyatt A.W.; Aaronson P.I., Coen C., Kallo I., Jacob R., Mann G.E. (**2006**). The isoflavone equol mediates rapid vascular relaxation: Ca^{2+}-independent activation of eNOS/Hsp90 involving ERK1/2 and Akt phosphorylation in human endothelial cells. *J Biol Chem*, in press.

Ju Y., Fultz J., Allred K.F., Doerge D.R., Helferich W.G. (**2006**). Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. *Carcinog*enesis, 27(4):856-863.

Jun H.S., Kim S.E., Sung M.K. (**2002**). Protective Effect of Soybean Saponins and Major Antioxidants Against Aflatoxin B1-Induced Mutagenicity and DNA-Adduct Formation. *J Med Food*, 5(4) :235-240.

Jung M., Min D.B. (**1990**). Effects of alpha, gamma and delta-tocopherols on oxidative stability of soybean oil. *J Food Sci*, 55:1464-1465.

K.

Kang J., Sung M.K., Kawada T., Yoo H., Kim Y.K., Kim J.S., Yu R. (**2005**). Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer lett*, 230(2):219-227.

Kawahima K. (**1972**). Effect of crude platycodin on gastric secretion and experimental ulcerations in rats. *Chem Pharm Bull*, 20(4):755-758.

Kelly G.E., Joannou G.E., Reeder A.Y., Nelson C., Waring M.A. (**1995**). The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1): 40-43.

Kennedy A.R., Billing P.C., Wan X.S., Newberne P.M. (**2002**). Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*, 43(2):174-186.

Kennedy A.R., Kritchevsky D., Shen W.C. (**2003**). Effects of spermine-conjugated Bowman-Birk inhibitor (Spermine BBI) on carcinogenesis and cholesterol biosynthesis in mice. *Pharm Res*, 20(12):1908-1910.

Kennedy A.R., Wan X.S. (**2002**). Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Prostate* 50:125-133.

Kerwin S.M. (**2004**). Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods. *Current Medicinal Chemistry - Anti-cancer agents* 4:263-272.

Kim H., Nelson-Dooley C., Della-Fera M.A., Yang J.Y., Zhang W., Duan J., Hartzell D.L., Hamrick M.W., Baile C.A. (**2006**). Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *J Nutr*, 136(2):409-414.

Kim M., Gutierrez A.M., Goldfarb R.H. (**2002**). Different mechanisms of soy isoflavones in cell cycle regulation and inhibition of invasion. *Anticancer Research*, 22(6C): 3811-3817.

Kim S., Kim H.H., Kim J.Y., Kang Y.I., Woo H.J., Lee H.J. (**2000**). Anticancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins. *Biofactors*, 12(1-4):151-155.

King R. (**1998**). Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. *Am J Clin Nutr*, 68:1496S-1499S.

Kinjo J., Imagire M., Udayama M., Arao T., Nohara T. (**1998**). Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Med* 64(3):233-236.

Ko S., Kim C.J., Kim H.R., Kim C.T., Chung S.H., Tae B.S., Kim I.H. (**2003**). Tocol levels in milling fractions of some cereal grains and soybean. *J Am Oil Chem Society*, 80(6):585-589.

Kobayashi H., Yoshida R., Kanada Y., Fukuda Y., Yagyu T., Inagaki K., Kondo T., Kurita N., Suzuki M., Kanayama N., Terao T. (**2005**). Dietary supplementation of soybean kunitz trypsin inhibitor reduces lipopolysaccharide-induced lethality in mouse model. *Shock*, 23(5):441-447.

Kobayashi M., Matsushita H., Tsukiyama R., Saito M., Sugita T. (**2005**). Shoyu polysaccharides from soy sauce improve quality of life for patients with seasonal allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled clinical study. *Int J Mol Med*, 15(3):463-467.

Koepke J., Ermler U., Warkentin E., Wenzl G., Flecker P. (**2000**). Crystal Structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 angstrom resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *Molecular Biol*, 298(3):477-491.

Kok L., Kreijkamp-Kaspers S., Grobbee D.E., Lampe J.W., Van der Schouw Y.T. (**2005**). Soy isoflavones, body composition, and physical performance. *Maturitas*, 52(2):102-110.

Koratkar R., Rao A.V. (**1997**). Effect of soya bean saponins on azoxymethane-induced preneoplastic lesions in the colon of mice. *Nutr Cancer*, 27(2):206-209.

Korhonen H., Pilhanto A. (**2003**). Food-derived bioactive peptides: Opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des*, 9(16):1297-1308.

Koshiyama I., Fukushima D. (**1976**). Identifiction of the 7S globulin with b-conglycinin in soybean seeds. *Phytochem*, 15:157-159.

Kudou S., Fleury Y., Welti D.H., Magnolato D., Uchida T., Kitamura K., Okubo K. (**1991**). Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL). *Agric Biol Chem*, 55(9): 2227-2233.

Kudou S., Tonomura M., Tsukamoto C., Uchida T., Sakabe T., Tamura N., Okubo K. (**1993**). Isolation and structural elucidation of DDMP-Conjugated soyasaponins as genuine saponins from soybean seeds. *Biosci Biotechnol Biochem,* 57(4): 546-550.

Kudou S., Tonomura M., Tsukamoto C., Uchida T., Yoshikoshi M., Okubo K. (**1994**). Structural elucidation and physiological properties of genuine soybean saponins. Food phytochemicals for *cancer prevention. I. Fruits and vegetables, Huang M, Osawa T, Ho C and Rosen RT. Washington, DC, American Chemical Society*: 340-348.

Kulling S., Rosenberg B., Jacobs E., Metzler M. (**1999**). The phytoestrogens coumoestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lynphocytes. *Arch Toxicol*, 73:50-54.

Kumagai H., Shizawa Y., Sakurai H. (**1998**). Influence of phytate Removal and Structural Modification on the calcium-binding Properties of Soybean Globulins. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62 (2):341-346.

Kunimoto S., Murofushi W., Kai H., Ishida Y., Uchiyama A., Kobayashi T. (**2002**). Steryl glucoside is a lipid mediator in stress-responsive signal transduction. *Cell Struct Funct*, 27(3):157-162.

Kurowska E.M., Carroll K.K. (**1994**). Hypercholesterolemic responses in rabbits to selected groups of dietary essential amino acids. *J Nutr,* 1994;124:364–370.

Kuzuhara H., Nishiyama S., Minowa N., Sasaki K., Omoto S. (**2000**). Protective effects of soyasapogenol A on liver injury mediated by immune response in a concanavalin A-induced hepatitis model. *Eur J Pharmacol*, 391(1-2):175-181.

Kwok K., Basker D., Niranjan K. (**2000**). Kinetics of sensory quality changes in soymilk during thermal processing by parametric and non-parametric data analyses. *J Sci Food Agric*, 80(5):595.

L.

Lam Y., Galvez A.F., De Lumen B.O. (**2003**). Lunasin suppresses E1A-mediated transformation of mammalian cells but does not affect cell proliferation rate of normal and established cancer cell lines. *Nutr Cancer*, 47:88-94.

Lampe J.W., Karr S.C., Hutchins A.M., Slavin J.L. (**1998**). Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217:335-339.

Larionova N., Vartanov S.S., Sorokina N.V., Gladysheva I.P., Varfolomeyev S.D. (**1997**). Conjugation of the Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor with hydroxyethylstarch. *Appl Biochem Biotechnol*, 62(2):175-182.

Latti E. (**1995**). Special topic: New research and development in moisture retention mechanism and moisturizing agents: Phyto-ceramides and their applications. *Fragr J*, 23(81):1-14.

Lee S., Ahn J.K., Kim S.H., Kim J.T., Han S.J., Jung M.Y., Chung I.M. (**2003**). Variation in isoflavones of soybean cultivars with location and storage duration. *J Agric Food Chem*, 51: 3382-3389.

Lee S., Simons A.L., Murphy P.A., Hendrich S. (**2005**). Soyasaponins lowered plasma cholesterol and increased fecal bile acids in female golden Syrian hamsters. *Exp Biol Med*, 230(7):472-478.

Leske K., Jevne C.J., Coon C.N. (**1993**). Effect of oligosacharide additions on nitrogen-corrected true metabolizable energy of soy protein concentrate. *Poult Sci*, 72:664-668.

Li Y., Ahmed F., Ali S., Philip P.A., Kucuk O., Sarkar F.H. (**2005**). Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res* , 1;65(15):6934-6942.

Lin C.Z., Ma H.T., Zou S.X., Wang G.J., Chen W.H., Han Z.K. (**2005**). Effect of soy isoflavones on cAMP/PKA pathway in breast cancer cells of the rat. *Sheng Li Xue Bao*, 57(4):517-522.

Lin Y., Meijer G.W., Vermeer M.A. (**2004**). Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. *J Nutr*, 134(1):143-148.

Liu B., Edgerton S., Yang X., Kim A., Ordonnez-Ercan D., Mason T. (**2005**). Low-dose dietary phytoestrogen abrogates Tamoxifen-associated mammary tumor prevention. *Cancer Res*, 65(3):879-886.

Liu K., Brown E.A. (**1996**). Fatty acid compositions in newly differentiated tissues of soybean seedlings. *J Agric Food Chem*, 44:1395-1398.

Liu K. (**1999**). Soybeans: Chemistry, Technology and utilization. *2nd ed. Aspen Publishers, Gaitherrsburg, MD*.

Liu R. (**2004**). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J Nutr*, 134:3479S-3485S.

Lovati M.R., Manzoni C., Castiglioni S. (**2005**). 7S globulin peptide and cholesterol homeostasis: *in vitro* and *in vivo* data. *6th International Symposium on the Role of Soy in Preventing and treating Chronic Disease*. *October 30-November 2, Chicago, USA.*

Lozovaya V., Lygin A.V., Ulanov A.V., Nelson R.L., Daydé J., Widhohn J.M. (**2005**). Effect of temperature and soil moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. *Crop Sci*, 45:1934-1940.

Lukaczer D., Deann J.L., Lerman R.H., Darland G., Schiltz B., Tripp M., Bland J.S. (**2006**). Effect of a low glycemic index diet with soy protein and phytosterols on CDV risk factors in postmenopausal women. *Nutr*, 22(2):104-13.

Lund T., Munson D.J., Haldy M.E., Setchell K.D.R., Lephart E.D., Handa R.J. (**2004**). Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feeback. *Biol Reprod*, 70:1188-1195.

M.

Ma Y., Chiriboga D., Olendzki B.C., Nicolosi R., Merriam P.A., Ockene I.S. (**2005**). Effect of soy protein containing isoflavones on blood lipids in moderately hypercholesterolemic adults: a randomized controlled trial. *J Am Coll Nutr*, 24(4):275-285.

Macdonald R., Guo J., Copeland J., Browning J.D., Sleper D., Rottinghaus G.E., Berhow M. (**2005**). Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *J Nutr*, 135(5):1239-1242.

Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. (**2005**). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nut*, 81:230S-242S.

Manzoni C., Lovati M.R., Gianazza E., Morita Y., Sirtori C.R. (**1998**). Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. II. α-α' rich commercial soy concentrate and α' deficient mutant differently affect low-density lipoprotein receptor activation. *J Agric Food Chem*, 46(7):2481-2484.

Manzoni M.S., Rossi E.A., Carlos I.Z., Vendramini R.C., Duarte A.C., Damaso A.R. (**2005**). Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats. *J Nutr*, 21(10):1018-1024.

Massiot G., Dijoux M.G., Lavaud C. (**1996**). Saponins and artifacts. *Adv Exp Med Biol*, 405:183-192.

Matsuo M. (**2004**). Low-salt O-miso produced from Koji fermentation of oncom improves redox state and cholesterolemia in rats more than low-salt soybean-miso. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 50(5):362-366.

Meinke D., Chen J., Beachy R.N. (**1981**). Expression of storage-protein genes during soybean seed development. *Planta*, 153:130-139.

Merrill A.H., Schmelz E.M., Dillehay D.L., Spiegel S., Shayman J.A., Schroeder J.J., Riley R.T., Voss K.A., Wang E. (**1997**). Sphingolipids – The enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:208-225.

Messina M. (**1999**). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr*, 70(3): 439S-450S.

Mezei O., Chou C.N., Kennedy K.J. (**2002**). Hepatic cytochrome p450-2A and phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein mRNA are induced in gerbils after consumption of isoflavone-containing protein. *J Nutr*, 132(9):2538-2544.

Minamiyama Y., Takemura S., Yoshikawa T., Okada S. (**2003**). Fermented grain products, production, properties and benefits to health. *Pathophysiology*, 9: 221-227.

Mitchell J., Gardner P.T., McPhail D.B., Morrice P.C., Collins A.R., Duthie G.G. (**1998**). Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemicals and biological model systems. *Arch Biochem Biophys*, 360:142-148.

Morris C., Morris L.D., Kennedy A.R., Sweeney H.L. (**2005**). Attenuation of skeletal muscle atrophy via protease inhibition. *J Appl Physiol*, 99(5):1719-1727.

Murphy P.A., Song T., Buseman G., Barua K. (**1997**). Isoflavones in soy-based infant formulas. *J Agric Food Chem*, 45:4635-8.

N.

Nagata C., Shimizu H., Takami R., Hayashi M., Takeda N., Yasuda K. (**1999**). Hot flushes and other menopausal symptoms in relation to soy product intake in Japanese women. *Climateric*, 2: 6-12.

Nagata C., Ueno T., Uchiyama S., Urata K., Nagao Y., Shibuya C., Kashiki Y., Shimizu H. (**2005**). Urinary excretion of equol and the risk of brast cancer in Japanese women. *6th International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*, 2005 29 oct – 2nd nov, Chicago, IL, USA.

Nakamori T. (**2002**). Antiobesity effects of soy proteins and soy peptides. *Food Style*, 21(5):86-88.

Nakashima H. (**1989**). Inhibitory effect of glycosides like saponin from soybean on the infectivity of HIV in vitro. *AIDS* 3: 655-658.

Nakaya M., Tachibana H., Yamada K. (**2005**). Isoflavone genistein and daidzein up-regulate LPS-induced inducible nitric oxide synthase activity through estrogen receptor pathway in RAW264.7 cells. Biochem Pharmacol, 71(1-2):108-114.

National Research Council (**2000**). Dietary reference intakes for vitamine C, vitamine E, selenium, and carotenoids. *National Academy Press, Washington, DC*.

Nestel P., Yamashita T., Sasahara T., Pomeroy S., Dart A., Komesaroff P., Owen A., Abbey M. (**1997**). Soy isoflavones improve systemic arterial compliances but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Artherioscler Thromb Vasc Biol*, 17:3392-3398.

Nielsen N.C. (**1990**). Modification of protein content in soybean to improve seed quality. In: Janick J, Simon JE (eds) *Advances in new crops. Timber Press, Portland.*

O. / P.

Oakenfull D. (**2001**). Soy protein, saponins and plasma cholesterol. *J Nutr*, 131(11): 2971-2971.

Oakenfull D., Sidhu G.S. (**1990**). Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolemia? *Eur J Clin Nutr*, 44: 79-88.

Ogawara H., Akiyama T., Watanabe A.S., Ito N., Kobori M., Seoda Y. (**1989**). Inhibition of tyrosine protein kinase activity by synthetic isoflavones and flavones. *J Antibiotics 42*: 340-342.

Oh Y., Sung M.K. (**2001**). Soybean Saponins Inhibit Cell Proliferation bySuppressing PKC Activation and Induce Differentiation ofHT-29 Human Colon Adenocarcinoma Cells. Nutr *Cancer*, 39(1):132-138.

Ohno Y., Naganuma T., Ogawa T., Muramoto K. (**2006**). Effect of lectins on the transport of food factors in caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem*, 54(2):548-553.

Okubo K., Iijima M., Kobayashi Y., Yoshikoshi M., Uchida T., Kudou S. (**1992**). Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Biosci Biotechnol Biochem*, 56:99-103.

Okubo K., Kudou S., Uchida T., Yoshiki Y., Yoshikoshi M., Tonomura M. (**1994**). Soybean saponin and isoflavonoids: structure and antiviral activity against human immunodeficiency virus in vitro. Food phytochemicals for cancer prevention. *I. Fruits and vegetables. M. Huang, T. Osawa, C. Ho and R. T. Rosen. Washington, DC, American Chemical Society***:** 330-339.

Okubo K., Yoshiki Y. (**1996**). Oxygen-radical-scavenging activity of DDMP-conjugated saponins and physiological role in leguminous plant. *Adv Exp Med Biol*, 405:141-154.

Orthoefer F. (**1978**). Processing and utilization. In: Soybean physiology, agronomy, and utilization. *Eds Norman, GA Academic Press. New York, USA*.

Ostlund R. (**2004**). Phytostérols and cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 15:37-41.

Oyaizu M. (**1986**). Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nut*, 44:307-315.

Park E., Shin J.I., Park O.J., Kang M.H. (**2005**). Soy isoflavone supplementation alleviates oxidative stress and improves systolic blood pressure in male spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 51(4):254-259.

Park J.H., Jeong H.J., De Lumen B.O. (**2005**). Contents and bioactivities of lunasin, Bowman-Birk inhibitor, and isoflavones in soybean seed. *J Agric Food Chem*, 53:7686-7690.

Parkin D. (**1989**). Cancers of the breast, endometrium and ovary: geographic correlations. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 25:1917-1925.

Pena-Ramos E., Xiong Y.L. (**2002**). Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *J Food Sci*, 67(8):2952-2956.

Perez J., Ware M.A., Chevalier S., Gougeon R., Shir Y. (**2005**). Dietary omega-3 fatty acids may be associated with increased neuropathic pain in nerve-injured rats. *Anesth Analg*, 101(2):444-448.

Petri Nahas E., Nahas Neto J., De Luca L., Traiman P., Pontes A., Dalben I. (**2004**). Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy. *Maturitas*, 48(4):372-80.

Pettus B.J., Chalfant C.E., Hannun Y.A. (**2002**) Ceramides in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1585:114-125.

Pfeiffer E., Graf E., Gerstner S., Metzler M. (**2006**). Stimulation of estradiol glucuronidation: a protective mechanism against estradiol-mediated carcinogenesis? *Mol Nutr Food Res*, 50(4-5):385-389.

Phillips, K., Ruggio, D.M., Ashraf-Khorassani, M. (**2005**). Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J Agric Food Chem*, 53(24):9436-9445.

Pollard M., Wolter W., Sun L. (**2000**). Prevention of induced prostate-related cancer by soy protein isolate/isoflavone-supplemented diet in Lobund-Wistar rats. *In Vivo*, 14:389-392.

Potter S. (**1998**). Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. *Nutr Rev*, 56(8):231-235.

Potter S., Baum J.A., Teng H.Y., Stillman R.J., Shay N.F., Erdman J.W. (**1998**). Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nut* 68(6): 1375S-1379S.

Potter S.M., Jimenez-Flores R., Pollack J., Lone T.A., Berber-Jimenez M.D. (**1993**). Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. *J Agric Food Chem*, 41: 1287-1291.

Pryor W. (**2000**). Vitamine E and heart disease: Basic science to clinical intervention trials. *Free Rad Biol Med*, 28:141-161.

Q. / R.

Qi R., Song Z.W., Chi C.W. (**2005**). Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochim Biophys Sin*, 37(5):283-292.

Reddy N., Pierson M.D. (**1994**). Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. *Food Res Int*, 27:281.

Rickard S.E., Thompson L.U. (**1997**). Interactions and biological effects of phytic acid. *Antinutrients and Phytochemicals in Food*, 662:294-312.

Ricketts M.L., Moore D.D., Banz W.J. (**2005**). Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. A review. J Nutr Biochem. 2005;16(6):321-330.

Rieu D. (**2006**). The use of soy in infant and child feeding. *Arch Pediatr*, 13(6):536-538.

Rliwinski L., Folwarczna J., Janiec W., Grynkiewicz G., Kuzyk K. (**2005**). Differential effects of genistein, estradiol and raloxifene on rat osteoclasts in vitro. *Pharmacol Rep*, 57(3):352-359.

Robak J., Gryglewski R.J. (**1988**). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol*, 37, 837-841.

Roberfroid M.B. (**2000**). A European consensus of scientific concepts of functional foods. *Nutr*, 16(7-8):689-691.

Robinson K., Klein B.P., Lee S. (**2004**). Utilizing the R-index measure for threshold testing in model soy isoflavone solutions. *J Food Sci*, 69(1): 221-224.

Rodrigues H.G., Diniz Y.S., Faine L.A. (**2005**). Antioxidant effect of saponin: potential action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis. *Int J Food Sci Nutr*, 56(2):79-85.

Romieu I., Tellez-Rojo M.M., Lazo M., Manzano-Patino A., Cortez-Lugo M., Julien P., Belanger M.C., Hernandez-Avila M., Holguin F. (**2005**). Omega-3 fatty acid prevents heart rate variability reductions associated with particulate matter. *Am J Respir Crit Care Med*, 172(12):1534-1540.

Rossi M., Negri E., Talamini R., Bosetti C., Parpinel M., Gnagnarella P., Franceschi S., Dal Maso L., Montella M., Giacosa A., La Vecchia C. (**2006**). Flavonoids and colorectal cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(8): 1555-1558.

Rowell C., Carpenter M., Lamartinière C.A. (**2005**). Chemoprevention of breast cancer, proteomic discovery of genistein action in the rat mammary gland. *J Nutr*, 135: 2953S-2959S.

Rowland I., Wiseman H., Sanders T., Adlercreutz H., Bowey E. (**1999**). Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. *Biochem Soc Trans,* 27:304-308.

Rowlands J., He L., Hakkak R., Ronis M.J., Badger T.M. (**2001**). Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *J Nutr*, 131(12):3281-3287.

Rowlands M., Berhow M., Badger T. (**2002**). Estrogenic and antiproliferative Properties of soy sapogenols in human breast cancer cells in vitro. *Food Chem Toxicol*, 40(12):1767-1774.

Roy D.M., Schneeman B.O. (**1981**). Effect of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol, bile acids and pancreatic enzymes in mice. *J Nutr,* 111:878–885.

Ruiz-Larrea M.B., Mohan A.R., Paganga G., Miller N.J., Bolwell G.P., Rice-Evans C.A. (**1997**). Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Rad Res*, 26:63-70.

Rupasinghe H.P.V., Jackson C.J.C., Poysa V., DiBerardo C., Bewley J.D., Jenkinson J. (**2003**). Soyasapogenol A and B distribution in soybean (*Glycine max L. Merr.*) in relation to seed physiology, genetic variability, and growing location. *J Agric Food Chem*, 51(20):5888-5894.

Russo A., Cardile V., Lombardo L., Vanella L., Acquaviva R. (**2006**). Genistin inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells. *J Nutr Biochem*, 17(2):103-108.

S.

Sakamoto K., Vucenik I., Shamsuddin A.M. (**1992**). [H^3]Inositol Hexaphosphate (Phytic Acid) is absorbed and distributed to various tissues in rats. *Review : Nutrient Metabolism : Phytic Acid absorption in rats*:713-720.

Samman S., Wall P.M.L., Chan G.S.M., Smith S.J., Petocz P. (**1999**). The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women. *Atherosclerosis*, 147:277-283.

Sato H., Ito K., Sakai K., Morinaga Y., Tashima I., Sukegawa E., Shimasaki H., Itakura H. (**2001**). Effects of soybean-germ oil on reducing serum cholesterol levels in a double-blind controlled trial in healthy humans. *J Oleo Sci*, 50:649-655.

Schryver T. (**2002**). Increasing health benefits using soy germ. *Cereal Food World*, 47(5): 185-188.

Seidman M.D., Quirk W.S., Shirwany N.A. (**1999**). Reactive oxygen metabolites, antioxidants and head and neck cancer. *Head Neck*, 21(5):467-479.

Setchell K.D.R., Brown N.M., Desai P.B., Zimmer-Nechimias L., Wolfe B., Jakate A.S., Creutzinger V., Heubi J.E. (**2003**). Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr*, 133(4): 1027-1035.

Setchell K.D.R., Brown N.M., Zimmer-Nechemias L., Brashear W.T., Wolfe B.E., Kirschner A.S., Heubi J.E. (**2002**). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 76(2): 447-453.

Setchell K.D.R., Cassidy A. (**1999**). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*, 129(3):758S-767S.

Setchell K.D.R., Faughnan M.S., Avades T., Zimmer-Nechemias L., Wolfe B.E., Brashear W.T. (**2001**). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*, 131:1362S-1375S.

Setchell K.D.R., Faughnan M.S., Avades T., Zimmer-Nechemias L., Wolfe B.E., Brashear W.T. (**2003**). Comparing the pharmakokinetics of daidzein and genistein with the use of [13C]labelled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 77:411-419.

Shi J., Arunasalam K., Yeung D., Kakuda Y., Mittal G., Jiang Y. (**2004**). Saponins from Edible Legumes: Chemistry, Processing, and Health Benefits. *J Med Food*, 7(1):67-78.

Shimizu K., Tamagawa K., Takahashi N., Takayama K., Maitani Y. (**2003**). Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid-loaded liposomes contained sterylglucoside mixture. *Int J Pharm*, 258(1-2):45-53.

Shimoyamada M., Ikedo S., Ootsubo R., Watanabe K. (**1998**). Effects of soybean saponins on chymotryptic hydrolyses of soybean proteins. *J Agric Food Chem*, 46(12): 4793-4797.

Shiraiwa M., Harada K., Okubo K. (**1991a**). Composition and structure of "Group A Saponin" in soybean seed. *Agric Biol Chem*, 55(2): 315-322.

Shiraiwa M., Harada K., Okubo K. (**1991b**). Composition and structure of "Group B Saponin" in soybean seed. *Agric Biol Chem*, 55(4): 911-917.

Sidhu G.S., Oakenfull D. (1986). A mechanism for the hypocholesterolemic activity of saponins. *Br J Nutr* 55(3):643–649.

Simons A.L., Renouf M., Hendrich S., Murphy P.A. (**2005**). Metabolism of Glycitein (7,4'-Dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) by human gut microflora. *J Agric Food Chem*, 53(22): 8519-8525.

Sinclair A., Attar Bashi N.M., Li D. (**2000**). What is the role of a-linolenic acid for mammals? *Lipids* 37:1113-1123.

Singh A.V., Franke A.A., Blackburn G.L., Zhou J.R. (**2006**). Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 66(3):1851-1858.

Singh R., Agarwal R. (**2005**). Prostate cancer and inositol hexaphosphate: efficacy and mechanisms. *Anticancer Res*, 25(4):2891-2903.

Slavin J., Jacobs D., Marquart L. (**1997**). Whole grain consumption and chronic disease: Protective mechanisms. *Nutr Cancer*, 27:14-21.

Slavin J., Karr S.C., Hutchins A.M., Lampe J.W. (**1998**). Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion. *Am J Clin Nutr*, 68:1492S-1495S.

Slavin J.L. (**1999**). Health benefits of oligosaccharides. *J Nutraceuticals, Functional Med foods*, 1(4): 43-55.

Slominski B. (**1994**). Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial preparation of alpha-galactosidase and beta-fructofuranose: Potential for use as dietary additives. *J Sci Food Agric*, 65:323-330.

Smiricky M.R., Grieshop, C.M., Albin D.M., Wubben, J.E., Gabert, V.M., Fahey G.C. (**2002**). The influence of soy oligosaccharides on apparent and true ileal amino acid digestibilities and fecal consistency in growing pigs. *J Anim Sci*, 80:2433-2441.

Snyder H.E., Kwon T.W. (**1987**). *Soybean utilization. New York*, p346.

Song T., Barua K., Buseman G., Murphy P.A. (**1998**). Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am J Clin Nutr*, 68(6): 1474S-1479S.

Sperling P., Warnecke D., Heinz E. (**2004**) Plant sphingolipids. *Lip Met Membrane Biogen*, 6:337-381.

Stephenson T.J., Setchell K.D.R., Kendall C.W., Jenkins D.J., Anderson J.W., Fanti P. (**2005**). Effect of soy protein-rich diet on renal function in young adults with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Nephrol*, 64(1):1-11.

St-Onge M.P., Jones P.J.H. (**2003**) Phytosterols and human lipid metabolism: Efficacy, safety, and novel foods. *Lipids* 38(4): 367-375.

Strom B., Schinnar R., Ziegler E.E., Barnhardt K.T., Sammel M.D., Macones G.A. (**2001**). Exposure to soy-based formula in infancy and endocrinological and reproductive outcomes in young adulthood. *JAMA*, 286:807-814.

Strom S.S., Yamamura Y., Duphorne C.M. (**1999**). Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case control study using a new data base. *Nutr Cancer* 33:20-25.

Sullards M., Lynch A.H., Merrill A.H., Adams J. (**2000**). Structure determination of soybean and wheat glucosylceramides by tandem mass spectroscopy. *J Mass Spectrom*, 35, 347-353.

Sun C., Yuan J.M., Wang X.L., Gao Y.T., Ross R.K., Yu M.C. (**2004**). Dietary soy and increased risk of bladder cancer: a prospective cohort study of men in Shangai, China. *Int J Cancer*, 112:319-323.

Symolon H., Schmelz E.M., Dillehay D.L., Merrill A.H. (**2004**). Dietary soy sphingolipids suppress tumorigenesis and gene expression in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice and Apc(Min/+) mice. *J Nutr*, 134(5): 1157-1161.

T.

Takahashi R., Ohmori R., Kivose C., Momiyama Y., Ohsuzu F., Kondo K. (**2005**). Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprtein oxidation. *J Agric Food Chem*, 53(11):4578-4582.

Tamura N., Hirayama K., Itoh K. (**2003**). Effects of soy oligosaccharides on plasma and cecal isoflavones, and cecal enzyme activities in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 49(3):168-171.

Texeira S., Potter S.M., Weigel R., Hannum S., Erdman J.W., Hasler C.M. (**2000**). Effect of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 weeks on blood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr*, 71:1077-1084.

Tiziani S., Vodovotz Y. (**2005**). Rheological characterization of a novel functional food: tomato juice with soy germ. *J Agric Food Chem*, 53(18):7267-7273.

Tomomatsu H. (**1994**). Health effects of oligosaccharides. *Food Technol,* 48(10):61-65.

Totta P., Acconcia F., Virgili F., Cassidy A., Weinberg P.D., Rimbach G., Marino M. (**2005**). Daidzein-sulfate metabolites affect transcriptional and antiproliferative activities of estrogen receptor-beta in cultured human cancer cells. *J Nutr*, 135(11):2687-2693.

Tovar A., Torre-Villalvazo I., Ochoa M., Elias A.L., Ortiz V., Aguilar-Salinas C.A., Torres N. (**2005**). Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res*, 46(9):1823-1832.

Trautwein E.A. (**2003**) Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol*, 105 (3-4):171-185.

Tsukamoto C., Shimada S., Igita K., Kudou S., Kokubun M., Okubo K., Kitamura K. (**1995**) Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J Agric Food Chem,* 43(5):1184-1192.

U. / V. / W.

US FDA (**2000**). 21 CFR Pt 101 Food labelling: Health Claims, plant sterol/stanol esters and coronary heart disease. *Food Reg*, 65: 54685-54731.

Verbruggen M.A., van Rooijen J.J.M., van der Vat B.J.C. (**2002**). Isoflavone analysis in soy and soy produts – Results of a ring test. *J Nutr*, 132:595S.

Verhoeven M.O., van der Mooren M.J., van der Weijer P.H., Verdegem P.J., van der Burgt L.M., Kenemans P., CuraTrial Research Group (**2005**). Effect of a combination of isoflavones and *Actaea racemosa Linnaeus* on climacteric symptoms in healthy symptomatic perimenopausal women: a 12-week randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Menopause*, 12(4):412-420.

Vesper H., Schmelz E.M., Nikolova-Karakashian M.N., Dillehay D.L., Lynch D.V., Merrill A.H. (**1999**). Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J Nut*, 129(7), 1239-1250.

Vessby B. (**1994**). Implication of long-chain fatty acid studies. *Inform*, 5:182-185.

Vis E., Geerse G.J., Klaassens E.S., van Boekel M.A., Alink G.M. (**2005**). Possible mechanism behind the differenial effects of soy protein and casein feedings on colon cancer biomarkers in the rat. *Nutr Cancer*, 51(1):37-44.

Vlahakis C., Hazebroek J. (**2000**). Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: effects of genetics, planting location, and temperature. *JAOCS*, 77(1):49-53.

Vucenik I., Shamsuddin A.M. (**1994**). [H^3]Inositol Hexaphosphate (Phytic Acid) is rapidly absorbed and metabolized by Murine and Human Malignant Cells In Vitro. *Review : Nutrient Metabolism : Phytic Acid Uptake by cancer cells*: 861-868.

Wan X.S., Meyskens F.L., Armstrong W.B., Taylor T.H., Kennedy A.R. (**1999**). Relationship between protease activity and neu oncogene expression in patients with oral leukoplakia treated with the Bowman-Birk Inhibitor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8: 601-608.

Wang H., Murphy P.A. (**1994**). Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. *J Agric Food Chem*, 42:1674-1677.

Wang X., Quinn P.J. (**2000**). The location and function of vitamin E in membranes. *Mol Membr Biol*, 17:143-156.

Ware J.H., Wan X.S., Kennedy A.R. (**1999**). Bowman-Birk Inhibitor suppresses production of superoxyde anion radicals in differentiated HL-60 cells. *Nutr Cancer*, 33(2):174-177.

Wätjen W.M., Michels G., Steffan B., Niering P., Chovolou Y., Kampkötter A., Tran-Thi Q.H., Kahl R. (**2005**). Low concentrations of flavonoids are protective in Rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J Nutr*, 135(3): 525-531.

Watkins B.A., Reinwald S., Li Y., Seifert M.F. (**2005**). Protective actions of soy isoflavones and n-3 PUFAs on bone mass in ovariectomized rats. *J Nutr Biochem*, 16(8):479-488.

Wei H., Bowen R., Cai Q., Barnes S., Wang Y. (**1995**). Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine: Blackwell Scientific Inc*.

Weingartner K. (**1987**). Processing, Nutrition and utilization of soybeans. In: Soybeans for the Tropics. *Research Production and Utilization; Eds Singh et al., Int Institute of Tropical agriculture, IITA. John Wiley & Sons. Interscience Production*.

West S., Hilpert K.F., Juturu V., Bordi P.L., Lampe J.W., Mousa S.A., Kris-Etherton P.M. (**2005**). Effects of including soy protein in a blood cholesterol-lowering diet on markers of cardiac risk in men and in postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *J Womens health (Larchmt)*, 14(3):253-262.

Widyarini S., Allanson M., Gallagher N.L., Pedley J., Boyle G.M., Parsons P.G. (**2006**). Isoflavonoid photoprotection in mouse and human skin is dependent on metallothionein. *J Invest Dermatol*, 126(1):198-204.

Wiseman A. (**2006**). Crohn's disease leading to bowel cancer may be avoided by consumption of soya isoflavones: adjunct-chemotherapy with oxaliplatin. *Med Hyp*, 66(5):934-935.

Wiseman H., Casey K., Bowey E., Duffy R., Davies M., Rowland I.R. (**2004**). Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *Am J Clin Nutr*, 80(3): 692-699.

Wong W.W. (**2001**). Effects of soy isoflavones on blood lipids, blood pressure, and biochemical markers of bone metabolism in postmenopausal women. *4th International Symposium on the role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*

Wong W.W., Smith E.O., Stuff J.E., Hatchey D.L., Heird W.C., Pownell H.J. (**1998**). Cholesterol-lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr*, 68(6):1385S-1389S.

Wu A., Wan P., Hankin J., Tseng C.C., Yu M.C., Pike M.C. (**2002**). Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis*, 23(9):1491-1496.

X. / Y. / Z.

Xu X., Wang H., Murphy P.A., Cook L., Hendrich S. (**1994**). Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than genistein in adult women. *J Nutr*, 124: 825-832.

Yamka R., Harmon D.L., Schoenherr W.D., Khoo C., Gross K.L., Davidson S.J., Joshi D.K. (**2006**). *In vivo* measurement of flatulence and nutrient digestibility in dogs fed poultry by-product meal, conventional soybean meal, and low-oligosaccharide low-phytate soybean meal. *Am J Vet Res*, 67(1):88-94.

Yan W., Fei R., Wang W., Qi X., Wei L., Cong X., Wang Y. (**2003**). Influence of soybean-derived sterylglucoside and amphipathic polyethylene glycol on the cellular delivery and aniosotropy of different cationic liposomes. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 35(3):324-328.

Yoshida H., Hirakawa Y., Murakami C., Mizushina Y., Yamade T. (**2003**). Variation in the content of tocopherols and distribution of fatty acids within soya bean seeds (*Glycine max L.*). *J Food Comp Anal*, 16:429-440.

Yoshida H., Takagi S. (**1999**). Antioxidative effects of sesamol and tocopherols at various concentrations in oils during microwave heating. *J Sci Food Agric*, 79:220-226.

Yoshiki Y., Takagi S., Watanabe M., Okubo K. (**2005**). Fractionation of soybean functional glycosides from soy-waste based on the chemical reaction of soyasaponin beta-g. *Food Chem*, 93:591-597.

Yoshikoshi M., Kahara T., Ito M., Furukawa Y., Okubo K. (**1995**). Metabolism and nonabsorption of soybean hypocotyl saponins in the rat model. *Acta Alimentaria*, 24(4): 355-364.

Yoshikoshi M., Yoshiki Y., Okubo K., Seto J., Sasaki Y. (**1996**). Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts. *Planta Med*, 62(3) :252-255.

Zaizen Y., Higuchi Y., Matsuo N., Shirabe K., Tokuda H., Takeshita M. (**2000**). Antitumor effects of soybean hypocotyls and soybeans on the mammary tumor induction by N-methyl-n-nitrosourea in F344 rats. *Anticancer Res*, 20(3A): 1439-1444.

Zhan S., Ho S.C. (**2005**). Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am J Clin Nutr*, 81(2):397-408.

Zhang X., Kiechle F.L. (**2004**) Glycosphingolipids in health and disease. *Annals clin Lab Sci* 34(1):3-13.

Zhang Y., Wang G.J., Song T.T., Murphy P.A., Hendrich S. (**1999**). Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate isoflavone degradation activity. *J Nutr*, 129:957.

Zheng W., Dai Q., Custer L.J., Shu X.O., Wen W.Q., Jin F., Franke A.A. (**1999**). Urinary Excretion of Isoflavonoids and the Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8:35-40.

Zhou J., Yu L., Mai Z., Blackburn G.L. (**2004**). Combined inhibition of estrogen-dependent human breast carcinoma by soy and tea bioactive components in mice. *Int J Cancer*, 108(1):8-14.

Zhou J.R., Erdman J.W. (**1995**). Phytic acid in health and disease. Critical review in Food Sci Nutr, 35:495-508.