

美和學校財團法人美和科技大學

105 年度教師產學合作計畫

結案報告書

計畫名稱：紅藜酵素飲品及紅藜營養補充粉之品
質分析

計畫編號：105-FI-DBT-IAC-R-014

計畫期間：2016/09/01~2016/12/10

計畫主持人：吳裕仁

共同主持人：

研究助理：

經費總額：150,000 元

經費來源：財團法人工業技術研究院

一、介紹

本研究主要透過一些實驗檢測，經由紅藜加工衍生出來的健康食品或飲品，檢測項目包含 SOD-like 活性、總酚含量測試、總類黃酮含量測試、甜菜色素分析、抗氧化活性測定 FRAP(ferric reducing ability of plasma)還原力、DPPH 自由基清除力分析、總游離胺基酸以及還原力(Reducing power)測定等共 7 項檢測。

檢測樣品共兩樣，分別為紅藜酵素飲品以及紅藜營養補充粉，產品介紹如下：

(一). 紅藜酵素飲品

將紅藜與數十種蔬菜水果混合後，裝入發酵容器，並接種商業用酵母菌與乳酸菌，並就紅藜發酵液中 SOD-like 活性、總酚含量、抗氧化活性(FRAP 還原能力以及 DPPH 清除自由基能力)等變化加以調查。

(二). 紅藜營養補充粉

以紅藜粉末搭配其他抗氧化成分與機能性素材，共同製成易沖泡的粉末，針對其總甜菜紅色素、總游離胺基酸、總酚含量、總類黃酮含量以及抗氧化能力等作為評估標準。

二、樣品萃取

紅藜酵素飲品：將樣品先進行離心 30 分鐘(8000rpm)，將上清液倒至可密封之容器保存，以供後續實驗使用，其實驗過程如需稀釋皆用 RO 水。

紅藜營養補充粉：將樣品分別秤 10g 至兩個 100mL 的定量瓶，分別加入 RO 水與 95% 酒精各 80mL 後，將其搖晃均勻並超音波震盪 30 分鐘，最後分別定量至 100mL，再分別將水萃與酒萃樣品進行離心 30 分鐘(8000rpm)，將上清液倒至可密封之容器低溫保存，以供後續實驗使用，其實驗過程如需稀釋：水萃皆用 RO 水，酒萃皆用 95%酒精。

三、實驗結果與討論

(1) 超氧歧化酵素活性 (SOD-like) 測定：

SOD-like 活性測定使用 Sigma-Aldriche 公司之 SOD determination kit，利用黃嘌呤化酶(Xanthine oxidase)與 WST-1 試劑中的黃嘌呤作用，生成超氧陰離子並呈色於 450nm。取 20 μ L 樣品加入 200 μ L WST working solution、20 μ L Enzyme working solution，於 37 度靜置 20 分鐘，並於 450nm 下進行偵測。其 SOD 活性由抑制率推斷，活性單位以 U/mL 表示，公式如下：

SOD activity (inhibition rate %) = $\frac{[(\text{空白組吸光值} - \text{空白組背景值}) - (\text{實驗組吸光值} - \text{實驗組背景值})]}{(\text{空白組吸光值} - \text{空白組背景值})} \times 100$

實驗數據如下：

名稱	抑制率(%)	SOD濃度(U/mL)
SOD STD 200 U/mL	99.2	
SOD STD 100 U/mL	98.6	
SOD STD 50 U/mL	97.4	
SOD STD 10 U/mL	86.2	
紅藜酵素原液	96.6	相當於 SOD 濃度 50 U/mL
紅藜酵素稀釋2倍	77.7	
紅藜酵素稀釋5倍	59.6	
紅藜粉(酒萃)	69.4	
紅藜粉(水草)稀釋兩倍	95.5	

SOD 抑制率在達到一定濃度之後就不再呈線性，濃度達 10 U/mL 後其抑制率接近九成；紅藜酵素飲品抑制率 96.6%，換算成 SOD 活性濃度相當於 50 U/mL，水草的紅藜營養補充粉(稀釋兩倍)抑制率 95.5%，其換算後的 SOD 活性濃度也相當於 50 U/mL，這二種成品不管是紅藜酵素飲品或是紅藜營養補充粉其 SOD-like 活性皆很高。

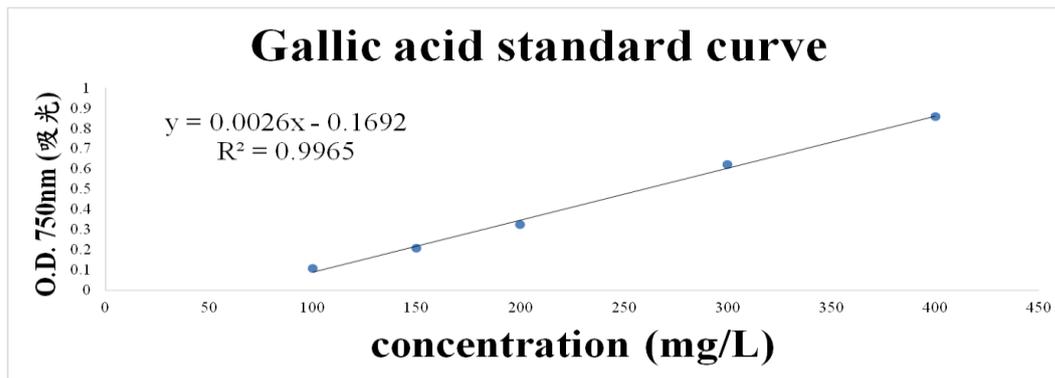
(2) 總酚含量測定：

a. 吸取 40 μL Gallic acid 不同濃度溶液放入離心試管，加入 400 μL 的 50% 酚

類指示劑，置於 35.0 $^{\circ}\text{C}$ 恆溫水槽中，靜置 5 分鐘。

b. 加入 320 μL 的 1M $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{w/w})$ ，在黑暗中靜置 35 $^{\circ}\text{C}$ 恆溫水槽 15 分鐘。

c. 用分光光度計設定吸收值(750 nm)波長，製作檢量線，如下圖。



標準品 Gallic acid 濃度分別為 100、150、200、300、400 (mg/L)。實驗數據如下：

名稱	總酚含量(mg/L) <已換算回稀釋倍數>
紅藜酵素稀釋2倍	652.5
紅藜粉酒萃	2200.8
紅藜粉水草	3512.3

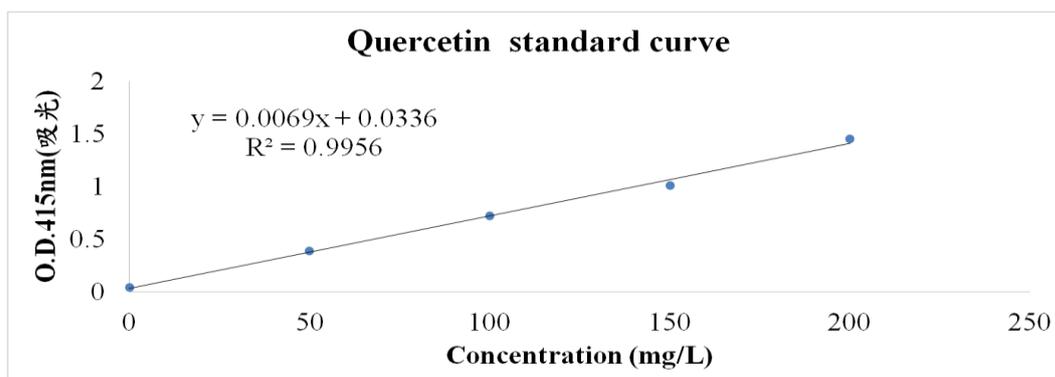
其樣品濃度換算，以 Gallic acid 當作標準品對照，所得之樣品上機濃度再化成稀釋倍數或樣品萃取體積，最終得到其樣品濃度。紅藜酵素飲品 652.5 mg/L，紅藜營養補充粉水草 3512.3 mg/L、酒萃 2200.8 mg/L。在總酚含量測定試驗中紅藜酵素飲品其總酚含量較少，推測紅藜酵素飲品是經過發酵後所形成的飲品其所含紅藜成分比紅藜營養補充粉少，所以在總酚含量測試中其含量較少。

(3) 總類黃酮含量測定：

a. 取 0.25 mL Quercetin 不同濃度溶液，加入 0.75 mL 的 75% 乙醇、0.05 mL 的 10.0%

AlCl₃ 和 0.05 mL CH₃COOK，加入 1.4 mL 去離子水至黑暗中 35°C 水槽靜置 30 分鐘。

b. 用分光光度計設定吸收值(415nm)波長，製作檢量線，如下圖。



標準品 Quercetin 濃度分別為 50、100、150、200 (mg/L)。

實驗數據如下：

名稱	總類黃酮含量(mg/L) <扣Blank>	總類黃酮含量(mg/L) <無扣Blank>
紅藜酵素原液	38.2	109.8
紅藜粉酒萃	39.0	162.9
紅藜粉水草	39.7	160.7

其樣品濃度換算，以 Quercetin 當作標準品對照，所得之樣品上機濃度再回成樣品萃取體積，最終得到其樣品濃度。紅藜酵素飲品 38.2 mg/L，紅藜營養補充粉水草 39.7mg/L、酒萃 39.0 mg/L。總類黃酮含量測試紅藜酵素飲品與紅藜營養補充粉其含量相近。

(4) 抗氧化活性測定 FRAP(ferric reducing ability of plasma)還原力：

利用還原三價鐵能力，測試食品中抗氧化能力的實驗，在酸性環境下， Fe^{3+} 會因抗氧化物的作用還原成 Fe^{2+} ，利用(TPTZ)的呈色特性可在波長 593nm 下測得抗氧化物的還原能力。

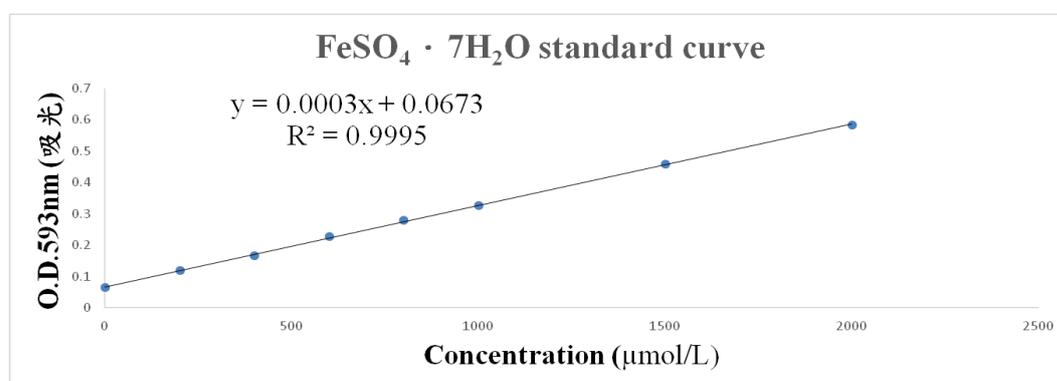
a. 新鮮FRAP溶液配置：

A液：取0.31g醋酸鈉與 1.6mL醋酸溶液用 H_2O 定量至100mL，B液：10 mmol/L TPTZ 與

40 mmol/L HCl用 H_2O 定量，C液：20 mmol/L 氯化鐵用 H_2O 定量，以10：1：1得FRAP混和反應液。

b. 取0.05 mL $FeSO_4$ 不同濃度溶液，加入1.5 mL FRAP混合反應液，再加入蒸餾水 0.15 mL，混合均勻至37°C恆溫水槽靜置30分鐘。

C. 用分光光度計設定吸收值(593nm)波長，製作檢量線，如下圖。



標準品 $FeSO_4$ 濃度分別為 200、400、600、800、1000、1500、2000 ($\mu\text{mol/L}$)。

實驗數據如下：

名稱	FRAP抗氧化活性(μmol/L) <扣Blank>	FRAP抗氧化活性(μmol/L) <無扣Blank>
紅藜酵素原液	3773.3	4023.3
紅藜粉酒萃	10390.0	11334.4
紅藜粉水草	10334.4	13245.6

其樣品濃度換算，以 FeSO₄ 當作標準品對照，所得之樣品上機濃度再回成稀釋倍數或樣品萃取體積，最終得到其樣品濃度。紅藜酵素飲品 3773.3 μmol/L，紅藜營養補充粉水草 10334.4 μmol/L、酒萃 10390.0 μmol/L。在 FRAP 抗氧化能力測試中紅藜營養補充粉其抗氧化能力比紅藜酵素飲品強。

(5) DPPH 清除力測試：

脂質受到氧化的過程中會產生自由基，而引發連鎖反應加速脂質本身的氧化。由抗氧化劑與 DPPH (diphenylpicryl-hydrazyl) 自由基的反應式 (DPPH+AH(抗氧化劑) → DPPH+HA)，可得知抗氧化劑在清除 DPPH 時會提供氫給 DPPH 自由基。

- 取 2.5 mL 的樣品，加入 1.0 mL 新鮮配製的 0.6 mM DPPH 的反應液，均勻混合避光靜置 30 分鐘。
- 用分光光度計設定吸光值(517 nm)波長。以甲醇取代樣品作為控制組，樣品吸光值越低表示樣品清除 DPPH 自由基的能力越強。
- 計算清除率(scavenging effects) = $[1 - (\text{樣品反應後於} 517 \text{ nm 吸光值} / \text{控制組於} 517 \text{ nm 吸光值})] \times 100$ 。

實驗數據如下：

名稱	DPPH清除力分析(%)
Vit-C (1.6mg/mL)	97.4
紅藜酵素稀釋10倍	47.4
紅藜粉 酒萃	90.1
紅藜粉 水草 稀釋2X	29.3

利用 Vit-C 具有極高的自由基清除率，當作每次實驗的對照；紅藜酵素飲品，因有顏色干擾，故稀釋 10 倍做檢測，其最後換算 DPPH 清除率為 47.4%。紅藜營養補充粉酒萃之萃取液換算 DPPH 清除率為 90.1%。紅藜營養補充粉水草之萃取液因有顏色干擾，故稀釋兩倍換算 DPPH 清除率為 29.3%。在 DPPH 清除能力測試中紅藜營養補充粉其 DPPH 清除能力比紅藜酵素飲品強。

(6) 總游離胺基酸：

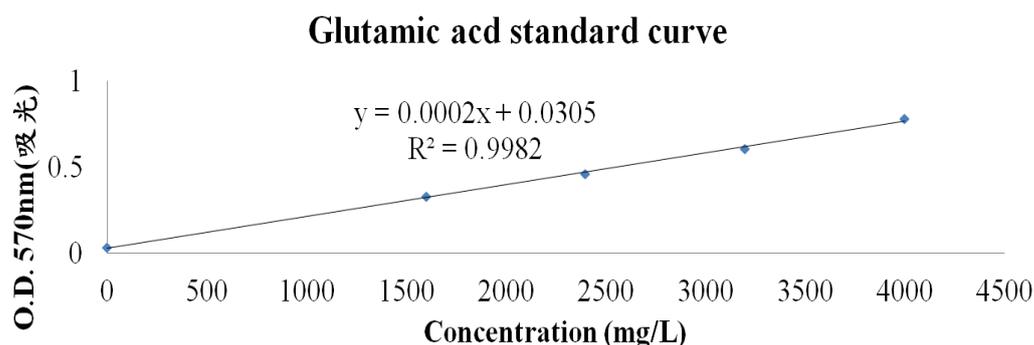
將樣品分裝至不同容器，採用常溫與 40°C 保存之條件，進行 0 小時 12 小時與 24 小時之時間差採樣萃取。萃取方式：同標題二、紅藜營養補充粉之萃取方式。

a. 取 Glutamic acid 不同濃度溶液至 15mL 的離心管中，加入新鮮配置 0.25mL 的

25mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝溶液，再加入 0.25mL 的 0.5% Ninhydrin 反應液混合

均勻，於沸水中加熱 15 分鐘加速反應；靜置冷卻後，加入 11mL 的 R0 水定

b. 用分光光度計設定吸收值(570nm)波長，製作檢量線，如下圖。



標準品 Glutamic acid 濃度分別為 1600、2400、3200、4000 (mg/L)。

實驗數據如下：

(紅藜酵素飲品)

紅藜酵素原液	總游離胺基酸含量(mg/L)
0 hour (Room Temp.)	2085.8
25°C (Room Temp.) 24 hours	1997.5
40°C (Oven) 12 hours	2010.8
40°C (Oven) 24 hours	1967.5

其樣品濃度換算，以 Glutamic acid 當作標準品對照。由於紅藜酵素飲品無稀釋，故所得之樣品上機濃度即為樣品濃度，紅藜酵素飲品 0h-25°C (2085.8

mg/L)，24h-25°C (1997.5 mg/L)，12h-40°C (2010.8 mg/L)，24h-40°C (1967.5 mg/L)。由結果判斷，溫度對於紅藜酵素飲品總游離胺基酸影響並不大。

(紅藜營養補充粉)

紅藜粉末水萃	總游離胺基酸含量(mg/L)
0 hour (Room Temp.)	34325.0
25°C (Room Temp.) 24 hours	30158.3
40°C (Oven) 24 hours	29108.3

其樣品濃度換算，以 Glutamic acid 當作標準品對照。所得之樣品上機濃度再回成樣品萃取體積，最終得到其樣品濃度。紅藜營養補充粉-水萃 0h-25°C (34325.0 mg/L)，24h-25°C (30158.3 mg/L)，24h-40°C (29108.3 mg/L)。溫度對於紅藜營養補充粉之總游離胺基酸影響並不大。

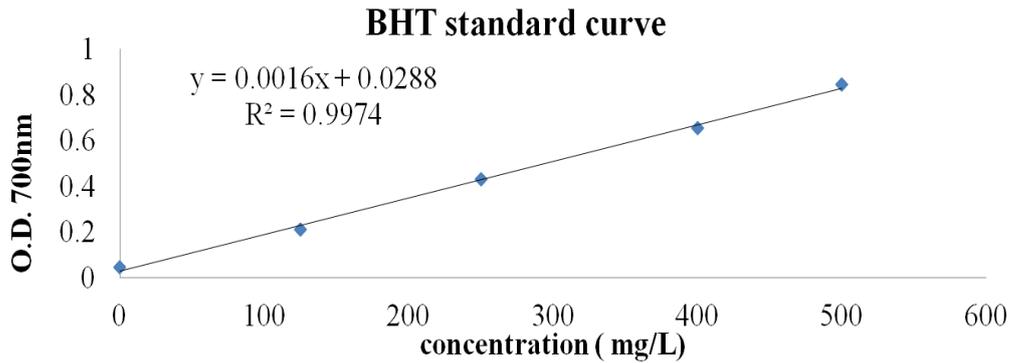
紅藜營養補充粉-酒萃，實驗結果低於偵測範圍，故不列入計算。

由實驗結果可以得知紅藜營養補充粉其所含游離胺基酸比紅藜酵素飲品多。

(7)還原力(Reducing power)檢測：

還原力檢測原理，即將待測物中的赤血鹽($K_3Fe(CN)_6$) 逐漸還原成黃血鹽($K_4Fe(CN)_6$)，最後黃血鹽再與 Fe^{3+} 反應作用，生成普魯士藍，並在 700 nm 波長中測定其吸光值，檢測普魯士藍之最終生成量，用來作為試樣的還原力。

- 取0.25 mL BHT不同濃度溶液，加入0.25 mL(0.2M pH=6.6)磷酸緩衝溶液與0.25 mL的1 % 赤血鹽，於50°C恆溫水槽中20分鐘。
- 加熱完成後快速冷卻，並加入0.25 mL的10%三氯醋酸以3000rpm離心10分鐘，取上層澄清液0.5 mL至新的離心管，再加入去離子水0.5 mL及0.1%氯化鐵0.1 mL，混合均勻避光反應10分鐘。
- 用分光光度計設定吸收值(700nm)波長，製作檢量線，如下圖。



標準品BHT濃度分別為125、250、400、500 (mg/L)。

實驗數據如下：

名稱	還原力濃度(mg _{BHT} /L)
紅藜酵素原液	519.7
紅藜粉末	
酒萃	3651.2
水萃	1772.1

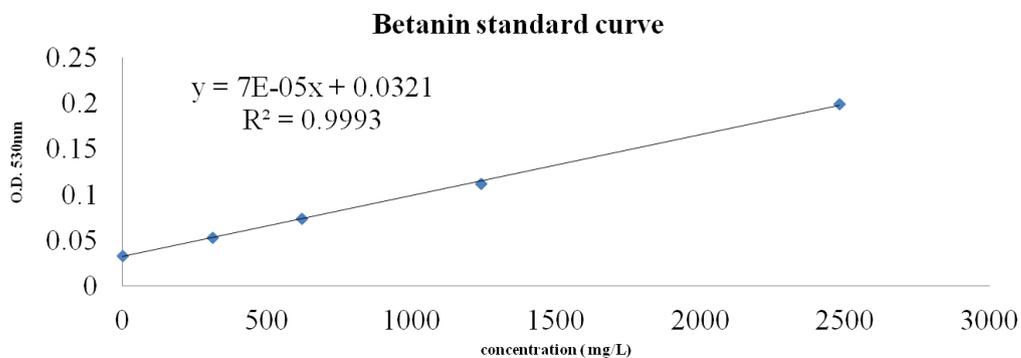
其樣品濃度換算，以 BHT 當作標準品對照，所得之樣品上機濃度再回成樣品萃取體積，最終得到其樣品濃度。紅藜酵素飲品 519.7 mg/L，紅藜營養補充粉水萃 1772.1 mg/L、酒萃 3651.2 mg/L。

在還原力測試中紅藜營養補充粉其抗氧化能力比紅藜酵素飲品強。

(8)甜菜色素檢測：

a. 取0.15 mL Betanin不同濃度溶液，直接利用分光光度計設定吸收值(530nm)

波長，製作檢量線，如下圖。



標準品Betanin 濃度分別為310、620、1240、2480 (mg/L)。

實驗數據如下：

名稱	甜菜色素(mg _{Betanin} /L)
紅藜酵素原液	16400.0
紅藜粉末	
酒萃	1771.4
水草	6271.4

其樣品濃度換算，以 Betanin 當作標準品對照，所得之樣品上機濃度再回成樣品萃取體積與稀釋倍數，最終得到其樣品濃度。紅藜酵素飲品 16400.0 mg/L，紅藜營養補充粉水草 6271.4 mg/L、酒萃 1771.4 mg/L。

(備註:紅藜酵素飲品本身帶有顏色，故有稀釋10X與20X做為吸光值測試，最終兩種稀釋倍數之結果，並無太大差異，故取稀釋10X之濃度當最後數據。)

在甜菜素分析中紅藜酵素飲品所含甜菜色素較紅藜營養補充粉多。

四、結論

本計畫中所使用的兩個樣品，分別為紅藜酵素飲品與紅藜營養補充粉，其紅藜酵素飲品是與數十種水果經過酵母菌與乳酸菌發酵所得，在抑制SOD活性的實驗結果中具有高度的抑制率，總酚的含量表現上比紅藜營養補充粉稍微差，其補充粉水草總酚含量最高達3512.3 mg/L。

在總類黃酮的表現量上，兩項產品則含量差不多，分別為酵素飲品39.2 mg/L、補充粉-水草39.7 mg/L、補充粉-酒萃39.0 mg/L。而在FRAP抗氧化活性、DPPH清除力以及還原力的表現結果，在紅藜營養補充粉與紅藜酵素飲品相比之下則高出數倍、甚至數十倍之多，推測紅藜酵素飲品其發酵之紅藜含量比紅藜營養補充品少，所以其在FRAP抗氧化活性、DPPH清除力以及還原力的表現結果都比紅藜營養補充品差。並且在游離胺基酸含量紅藜營養補充品比紅藜酵素飲品高出許多，推斷紅藜酵素飲品所含紅藜教補充品少。另外紅藜酵素飲品甜菜色素分析中其含量比紅藜營養補充品高出非常多，推測可能加發酵過程中放入含高甜菜色素水果如紅色火龍果一起發酵，才能測出如此高之甜菜色素。