



公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：080404e200

行政院農業委員會林務局98年度科技計畫研究報告

計畫名稱： 民族植物台灣藜(*Chenopodium formosanum*
Koidz)應用與開發之研究 (第1年/全程2年)
(英文名稱) Application and developenent of the
compositions from *Chenopodium*
formosanum Koidz, an ethnobotanical
plant

計畫編號： 98農科-8.4.4-務-e2(Z)

全程計畫期間：自 98年7月1日 至 99年12月31日

本年計畫期間：自 98年7月1日 至 98年12月31日

計畫主持人： 蔡碧仁
研究人員： 許志鴻、葛孟杰、何美萱
執行機關： 國立屏東科技大學





公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：080404e201

行政院農業委員會林務局98年度科技計畫研究報告

計畫名稱：
(英文名稱) 台灣藜成分之應用與開發 (第1年/全程2年)
Application of the compositions from
Chenopodium formosanum Koidz

計畫編號： 98農科-8.4.4-務-e2(1)

全程計畫期間：自 98年7月1日 至 99年12月31日
本年計畫期間：自 98年7月1日 至 98年12月31日

計畫主持人：蔡碧仁
研究人員：許志鴻
執行機關：國立屏東科技大學





公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：080404e201

行政院農業委員會林務局98年度科技計畫研究報告

計畫名稱：
(英文名稱) 台灣藜成分之應用與開發 (第1年/全程2年)
Application of the compositions from
Chenopodium formosanum Koidz

計畫編號： 98農科-8.4.4-務-e2(1)

全程計畫期間：自 98年7月1日 至 99年12月31日

本年計畫期間：自 98年7月1日 至 98年12月31日

計畫主持人：蔡碧仁
研究人員：許志鴻
執行機關：國立屏東科技大學



982688_Conclude



一、中文摘要：

台灣藜(*Chenopodium formosanum*)，俗稱Djulis，為台灣原住民雜糧植物，色彩艷麗，營養價值豐富，並具有特殊機能性成份。本研究以台灣藜種實為原料，經由熱衝擊及厭氣處理，並使之發芽5天後，與香花、甜味劑等製成台灣藜GABA茶包，比較各種不同處理，對芽體中GABA含量之影響。結果顯示，熱衝擊與厭氣組合處理，台灣藜芽體之GABA含量最高，達到571.64 mg/100g DW)。熱衝擊可增加麩胺酸脫羧酶GAD之活性，使其活性在紅色品種達19.34 U/g，黃色品種達21.96 U/g，而GABA含量增加1.2倍。但是發芽5天後，其GAD活性皆有下降(紅色品種僅餘6.4 U/g，黃色品種為4.3 U/g)。而厭氣處理可避免GABA之裂解，故提高其累積量達1.5倍，二者組合可提高1.7倍。接著將上述最適發芽條件之台灣藜芽體，利用田口法，以品評分析為回應值，尋求茶包最佳比例，結果顯示，0.5g之台灣藜芽體、0.3g之香花與0.1g之甜味劑，接受度為最高。進一步將紅色品種台灣藜茶包進行三個月貯藏，發現貯藏過程中，紅色值(a值)無太大改變，但是茶湯顏色漸偏暗紅，主要因褐變指數(A420)有所提高所致。至於抗氧化力方面，以紅色品種台灣藜茶包抗氧化力較黃色品種為佳，其DPPH清除自由基能力達30.25%、FRAP還原能力達929.87 μ mole/ L，但是經貯藏後，DPPH清除能力略有下降，而FRAP還原能力及總酚方面則無顯著下降。所有樣品中，則以黃色品種台灣藜茶包之GABA含量較高，但也會略有降解。光照對台灣藜植株之影響方面，經由遮光之台灣藜植株，其機能性成分與抗氧化力皆較照光組為低，例如其DPPH清除自由基能力29.30% (對照組36.42%)，FRAP還原力為244.53 μ mole/ L(對照組307.20 μ mole/ L)，而總酚249.29 mg/100g(對照組297.53 mg/100g)，顯示光照對於台灣藜植株可能影響其酚類化合物，進而影響其抗氧化力。總之，台灣藜GABA茶包具有適口性，貯存三個月期間機能性成分略有降低，但仍值得發展。

關鍵字：台灣藜、GABA 茶包、抗氧化力





二、英文摘要：

Djulis (*Chenopodium formosanum*) is an aboriginal cereal plant in Taiwan. They are colorful and rich in nutrients as well as phytochemicals. In this study, we used the seeds of Djulis as materials and use their seedling with herb and sweeteners to make the GABA tea bag. The seeds were pretreated with heat shock and anaerobic treatment before germination. The effects of the pretreatment on the GABA content of the seedlings were investigated. Results showed that, the combination of heat shock and anaerobic treatment leads to the highest GABA content in the seedlings (571.64 mg/ 100g DW). This is similar with the changes of the GAD activity. The GAD activity increased after heat shock treatment (19.36 U/g for red Djulis and 21.96 U/g for yellow Djulis) and the GABA increased 1.2 folds. But the GAD decreased after five days germination (only 6.4 U/g left for red and 4.3 U/g for yellow). The anaerobic treatment may inhibit the degradation of GABA and increased their amount to 1.5 folds, while the combination of these two treatments may increase the GABA content to 1.7 folds. The seedlings after the best pretreatment were then made into GABA tea bag through Taguchi method. Results showed that, the best condition for making the tea bag were adding 0.5g Djulis seedling, 0.3g herb and 0.1g sweetener. During the 3 months storage, there were not much changes for the red color. However the tea color was a little darkening due to the increase of A420. As to the antioxidant capacity, red variety sample exhibited higher DPPH scavenging ability (30.25%) and FRAP (929.87 μ mole/ L) than that of yellow variety. But the DPPH scavenging ability decreased during storage, although not much changes were found in the FRAP and total phenols. The GABA in yellow variety was higher than that in red variety, but decreased during storage. For the influence of light on the Djulis plant, lower phytochemicals and antioxidant capacity was found in the plant grown in the dark. For example, the DPPH scavenging ability, FRAP and total phenols were 29.30% (control 36.42%), FRAP 244.53 μ mole/ L (control 307.20 μ mole/ L) and 249.29 mg/100g(control 297.53 mg/100g). It indicated that the light might affect the total phenols and lead to the lowering of antioxidant capacity. In conclusion, the GABA tea bag from Djulis with acceptable taste and storage stability is worthy of application in the industry.

Key words: Djulis, GABA tea bag, antioxidant capacity







三、計畫目的：

以省產台灣藜為原料，首先確定其 γ -胺基丁酸之分析條件。再探討不同前處理或發芽日數，對發芽台灣藜中， γ -胺基丁酸含量之影響，尋求發芽台灣藜最適 γ -胺基丁酸之生成條件。再以該富含 γ -胺基丁酸之發芽台灣藜，經由田口法，就發芽台灣藜添加量、甜味劑等條件，以及各種機能性香草，如菊花或玫瑰花等之添加，以調整風味，進行台灣藜GABA茶包最佳製程之探討。最後則進行台灣藜GABA茶包之貯存試驗，經由不同貯存條件，測定 γ -胺基丁酸、抗氧化力（自由基清除能力、還原能力）、色澤（甜菜色素含量、L a b 值）等品質之變化，確定台灣藜GABA茶包最適貯存條件。





四、重要工作項目及實施方法：

(1) 省產台灣藜 γ -胺基丁酸分析方法之確立先利用不同溶劑萃取 γ -胺基丁酸，並比較出最適萃取溶劑種類與比例，其中 γ -胺基丁酸之含量乃以LC/MS 加以分析定量。LC/MS分析條件如下:Column: Lichrosorb RP-18 (250×4.6 mm) Detector: 280 nm Mobile phase: MeOH (A): H₂O (B) = 62: 38 Flow rate: 1.0 ml/min Inject volume: 20 μ l (2) 不同前處理對省產台灣藜之 γ -胺基丁酸含量之影響將台灣藜於不同前處理後，發芽3-5天，分析不同的發芽程度，其 γ -胺基丁酸的含量，找出 γ -胺基丁酸含量最高的發芽條件。(3) 省產台灣藜GABA茶包開發將前述富含 γ -胺基丁酸之發芽台灣藜，搭配其他機能性食材以調整風味，以研發出兼具風味與機能性的沖泡茶包。試驗中乃利用田口法四因子三階層（發芽台灣藜添加量、調味副材料種類及比例等），探討台灣藜GABA茶包初步製作的可行性。並以品評分析產品品質（茶湯色澤、風味、整體接受性）及機能性成分（ γ -胺基丁酸，甜菜色素，多酚，抗氧化力），找出最佳的茶包製程。 a 色澤之測定:以色差計測定其L a b值。b甜菜色素分析台灣藜樣品以0.45 μ m過濾膜過濾，取20 μ l以高效能液相層析儀分析，條件如下:Column: RP-18 (250-4.6 mm id., Hitachi)。Flow rate: 1 ml/min。Mobile phase: formic acid in water 及acetonitrile。Detector: UV detector, 538。 c 多酚含量測定將台灣藜樣品液，以0.45 μ m膜過濾，取20 μ l以前述HPLC進行分析，再與標準品作比對。HPLC分析條件如下:Column: RP-18 (250-4.6 mm id., HITACHI), Flow rate: 1 ml/min Mobile phase: Acetic acid 與 acetonitrile Detector: UV detector, 280 nm 自由基清除能力測定取樣品利用酒精萃取後，加入新鮮配製之1 mM 1,1-diphenyl- β -picryl-hydrazyl (DPPH)之甲醇溶液1 mL，均勻混合，並靜置30分鐘後，於515 nm測其吸光值。以【1-（樣品吸光值/未加樣品之控制組吸光值）】× 100，得到清除自由基效應百分比。清除百分比愈高者，抗氧化性愈高。 e 還原能力測定該試驗原理為Fe³⁺ (tripyridylferriazine, 簡稱TPTZ)複合物，在含有抗氧化物質的情況下，可將Fe³⁺還原成Fe²⁺複合物，而Fe複合物在593 nm具有吸收波峰，呈藍綠色，可用來測定樣品的抗氧化能力 (Niemeyer and Metzler 2003)。取新鮮配製之FRAP試劑加入蒸餾水及樣品，震盪混合均勻，於37°C (4) 省產台灣藜GABA茶包貯存試驗利用前述開發之GABA茶包，就不同貯存條件如溫度（4、25°C）或光線（光照、避光）等，定期取出測定品質，觀察色澤、甜菜色素及多酚之抗氧化力、 γ -胺基丁酸等，以找出台灣藜GABA茶包最適貯存條件。貯存時各項品質分析如(4)。





五、結果與討論：

(一) 省產台灣藜 γ -胺基丁酸(GABA)分析方法之確立

γ -胺基丁酸分析方法之建立乃先利用不同溶劑加以萃取，再找出最適萃取溶劑種類與比例，其中 γ -胺基丁酸之含量乃以LC/MS 加以分析定量。初步結果以75%酒精可得到最佳萃取率，故之後的試驗皆以75%酒精萃取 γ -胺基丁酸，並以迴流萃取管進行2次萃取，將2次萃取液經10000rpm、10分鐘離心後，取上層液混合，使用減壓濃縮機將酒精去除，使用NaOH溶解，即可得到GABA萃取液。將GABA萃取液，再加入pH8 buffer及1% HN試劑，可進行衍生化反應，再以HPLC 即可加以定量，並以GABA標準品加以比對。結果如圖1所示，GABA標準品約在2.9分鐘左右流出，HN試劑則在7分及14分鐘左右各有一個peak。以此為標準，以GABA (0, 100, 1000, 2000, 3000 ppm)製備GABA檢量線，結果如圖2所示，該檢量線R² 值為0.9879。

(二) 不同前處理對省產台灣藜之 γ -胺基丁酸含量之影響

根據文獻，前處理(熱衝擊、厭氣培養等)對GABA會有影響。吳等人曾指出經過厭氣培養後，佳業龍茶之GABA有明顯增加，而Mayer等人也指出，不同溫度對於GABA也有不同程度的影響。本研究將台灣藜種子經由熱衝擊，及厭氣處理後，使其發芽5天，接著利用HPLC進行檢測GABA之含量。由圖3可知，經過熱衝擊活化及厭氣組合處理者，可得到最高之GABA含量，推論是因為熱衝擊後，其GABA生合成關鍵酵素GAD被活化，而厭氣處理可使GABA轉換酵素失去活性，GABA得以累積，進而提高GABA含量。以紅色品種台灣藜為例，未發芽的台灣藜種實，其GABA為338.86 mg/100g，經過熱衝擊後可以提升1.2倍，達421.8 mg/100g，經過厭氣處理則能提升1.5倍左右(493.28 mg/100g)，將之組合處理後，更能提升至1.7倍(高達571.64 mg/100g)。至於發芽時間之影響，以紅色品種為例，由圖4可知，經發芽後，在第一天芽體，GABA含量先下降為45.08 mg/100g，但到第三天時，又上升達249.76 mg/100g，到第5天時更達到577.42 mg/100g。由於第一天的培養基中測得大量GABA，推測為發芽過程中，種子浸泡於水中，而使易溶於水之GABA流失於培養基中，故第一天的GABA含量顯著下降，但發芽後因GABA轉變至芽體上，不易被水浸泡而流失，故隨者苗的生長天數增加，GABA含量隨之增加的生長天數增加，GABA含量隨之增加。所有處理樣品中，GABA含量又以冬季黃色品種較高，第五天之GABA含量可達597.59 mg/100g (數據未列)。

GAD為產生GABA之關鍵酵素，其活性也會隨者各種不同處理而變化，由圖5可知，不論是黃色還是紅色品種，其GAD活性最適溫度為42°C，紅色品種之台灣藜種實經42°C熱衝擊後GAD活性可提升1.07倍達19.34 U/g，黃色品種則可達至21.96 U/g。表一顯示不同品種、季節及天數對GAD活性之影響，由表中可發現黃色品種之GAD活性高於紅色品種，而冬季品種台灣藜之GAD活性遠高於夏季品種(冬季紅色品種為19.34 U/g，夏季紅色品種則為10.45 U/g；冬季紅色品種為19.34 U/g，夏季黃色品種則為11.39 U/g)。其中，不同品種或季節之GAD活性皆隨者天數增加而有所降低。

台灣藜發芽後擁有豐富之GABA含量，由圖6可知，與其他原料之GABA相較，台灣藜之GABA含量(571.64 mg/100g)甚至高於有高GABA含量著稱之佳葉龍茶(518.88 mg/100g)，故為GABA良好天然來源，值得利用推廣。





(三) 省產台灣藜GABA茶包開發

將前述富含 γ -胺基丁酸之發芽台灣藜，搭配香花等製成台灣藜茶包。經由四因子三階層之田口法進行茶包製作(見表二及表三)，並以全體接受性為回應值(見圖7)，最佳比例為發芽台灣藜0.5g、香花0.3g、色素0.3g、甜味劑0.1g。並進一步測定該茶包之品質特性。

(四)、省產台灣藜GABA茶包貯存試驗

將前述最適條件之台灣藜茶包貯藏於25°C，並探討經過三個月貯藏後其機能性成分(GABA含量及總酚)、色澤及抗氧化力之變化。機能性成分結果如圖8所示，茶包中GABA之含量於貯藏期間略有下降，但在整體上都能維持在高GABA商品之基本標準以上(150mg/100g)，而總酚方面，隨著茶包貯藏時間越長，其含量也隨之增加，推測為在貯藏過程中，其組織結構隨者時間改變而使總酚釋放出來，造成總酚含量逐漸上升。為抗氧化力部分，DPPH清除自由基能力(圖9)方面略有下降，FRAP還原能力則變化不大(圖10)。圖11為茶包於室溫經三個月貯藏後，褐變指數(A420)與紅色值(Hunter a)之變化，顯然地，茶湯顏色並無太大變化。此可進一步由其Hunter a值與b值之變化(圖12)加以印證。可見經過三個月的室溫貯藏對台灣藜茶包有些微影響，但整體上還是具有不錯的機能性及抗氧化能力。表四為台灣藜GABA茶包儲藏期間機能性成分、抗氧化力與色澤相關性之分析，由表中可知茶包所泡出之茶湯，其明亮度與Hunter a值及chroma值有負相關，而Hunter a值與chroma呈現正相關，可見茶湯之彩度與甜菜色素(紅色值主要來源)息息相關。而GABA基本上與色澤或抗氧化力並無顯著相關，抗氧化力與茶包中酚類之變化相關性較大。

(五)、省產台灣藜光照試驗

對省產台灣藜植株進行光照試驗，結果如表五，可發現有遮光之台灣藜其抗氧化成分及總酚皆較照光者為低。照光之台灣藜DPPH清除自由基能力為36.42%，高於遮光之台灣藜(29.3%)。FRAP還原能力達307.2 μ mole/ L，也高於遮光之台灣藜。照光者總酚為297 mg/100g也高於遮光之總酚(249.29mg/100g)。文獻指出(Tsai et al., 2008)，光照對於植物之抗氧化成分如酚類有所影響，與本研究結果類似，推測光線對於台灣藜植株可能影響其機能性成分，進而影響其抗氧化力，此亦可從遮光之台灣藜葉緣略有萎縮彎曲的情形，加以觀察。(圖13)。





六、結論：

台灣藜GABA含量可利用熱衝擊及厭氣處理等前處理加以提高，因為熱衝擊可使麩胺酸脫羧酶(GAD)活性增加，而厭氣培養可抑制GABA轉胺酶(γ -aminobutyric acid transferase, 簡稱GABA-T)之活性，讓GABA無法轉換成琥珀酸半醛(Succinic semialdehyde)，進而提高了GABA累積的效果(吳 2004)，使其機能性效果也隨之增加。在台灣藜GABA茶包方面，利用田口法設計，並經過官能品評得知，台灣藜GABA茶包具有其特殊風味及良好口感，且經過三個月貯藏後，除了DPPH清除自由基能力與GABA含量略有下降外，其他機能性成分變化不大，且若簡單的調整花草即可變化出不同口味，可因應個人喜好自行搭配，因此，台灣藜GABA茶包深具開發之價值。光照試驗部分，經遮光處理後造成總酚下降，使其抗氧化力也隨之下降，顯示光照對於台灣藜植株機能性成分與抗氧化力皆有所影響。





七、參考文獻：

1. 吳宗諺。2004。不同產製條件對台灣佳葉龍茶 γ -胺基丁酸含量之影響。國立中興大學食品科學系碩士學位論文。
2. 吳佩樺、蔡碧仁。2007。不同品種及季節的之藜抗氧化活性之探討。穀類食品安全與健康國際研討會。屏東科技大學。
3. 許志鴻、戴士傑、蔡碧仁。2006。溫度與pH值對紅藜紅色素穩定性之影響。台灣食品科技學會第36次年會。基隆海洋大學。(95-農科-11-4-1-務-e2(3))
4. 許志鴻、蔡碧仁。2007。研磨對紅藜色素及抗氧化力之影響。穀類食品安全與健康國際研討會。國立屏東科技大學。
5. 許煥祺。2006。糙米經不同光源照射發芽後其理化特性及抗氧化活性之探討。國立中興大學食品科學系碩士學位論文。
6. Bown A.W, Hall D.E, MacGregor K.B, 2002. Insect Footsteps on Leaves Stimulate the Accumulation of 4-Aminobutyrate and Can Be Visualized through Increased Chlorophyll Fluorescence and Superoxide Production. *Plant Physiology* , Vol. 129, pp. 1430 - 1434.
7. Banerjee R ,Das M, Gupta S, Kapoor V , Ba 1S. 2008. Enzymatic polishing of rice
A new processing technology. *LWT - Food Science and Technology* 41 2079-2084.
8. Bai Q, Chai M, Gu Z , Cao X , Li Y , Liu K. 2009. Effects of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and c-aminobutyric acid accumulation in foxtail millet (*Setaria italica* L.) during germination. *Food and Chemical* 116 152 - 157.



■公開
□不公開

行政院農業委員會林務局九十八年科技研究計畫 期末報告

統籌計畫名稱： 民族植物紅藜機能性成分之永續利用
統籌計畫編號： 98 農科-8.4.4-務-e2
統籌機關： 國立屏東科技大學

細部計畫名稱： 民族植物紅藜機能性成分之永續利用
細部計畫編號： 98 農科-8.4.4-務-e2(1)
細部計畫執行機關： 國立屏東科技大學
計畫主持人： 蔡碧仁 教授
計畫期間： 98 年 7 月 1 日 至 98 年 12 月 31 日

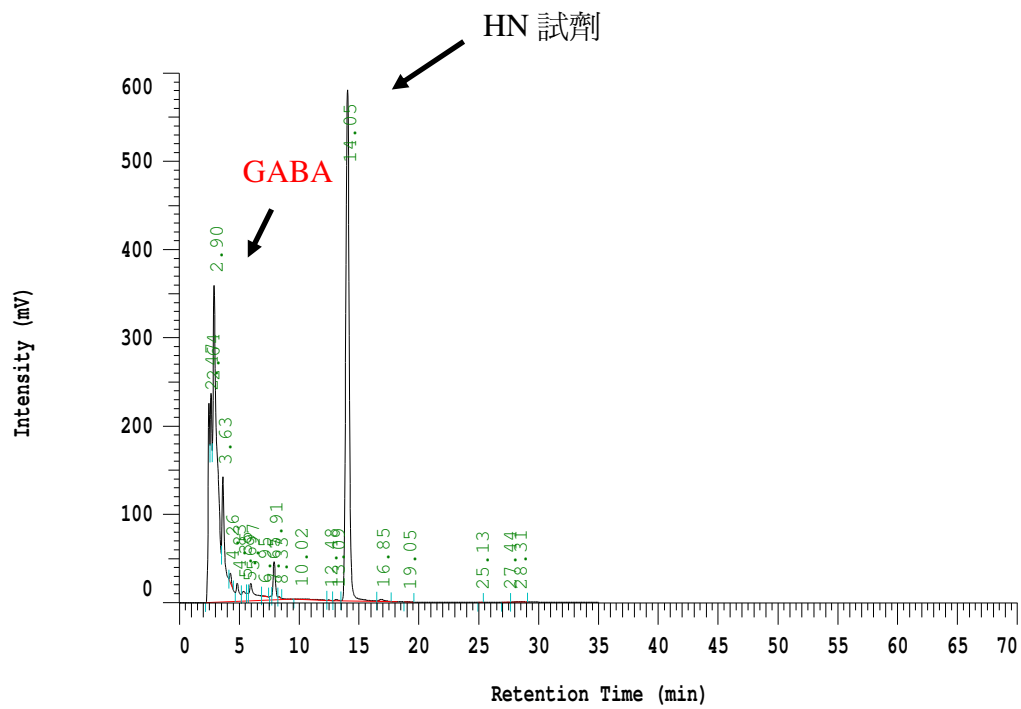


圖 1、GABA 之 HPLC 層析圖

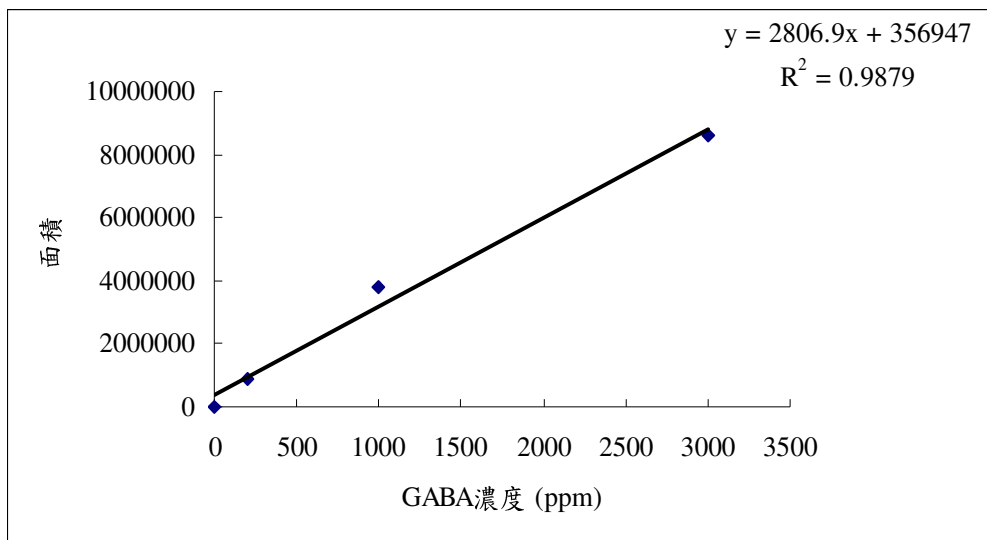


圖 2、GABA 之減量線。

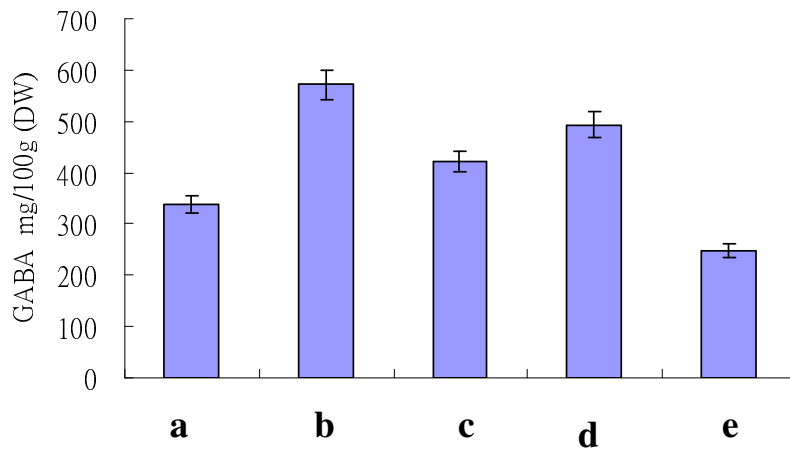


圖 3、不同前處理發芽後對台灣藜種子 GABA 含量之影響。

- a GABA 對照組 b 熱衝擊+厭氣處理
 c 只熱衝 d 厭氣處理
 e 遮光+熱衝擊+厭氣處理。

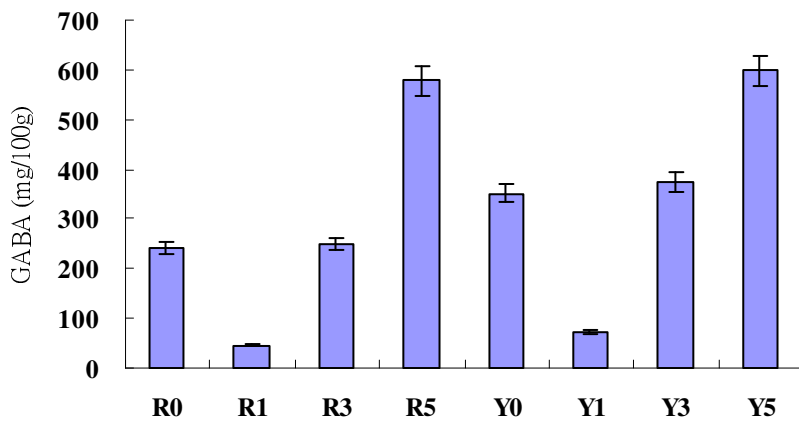


圖 4、不同發芽日數對台灣藜種子 GABA 含量之影響。

- R0 為紅色品種發芽第 0 天 R1 為紅色品種發芽第 1 天
 R3 為紅色品種發芽第 3 天 R5 為紅色品種發芽第 5 天
 Y0 為黃色品種發芽第 0 天 Y1 為黃色品種發芽第 1 天
 Y3 為黃色品種發芽第 3 天 Y5 為黃色品種發芽第 5 天

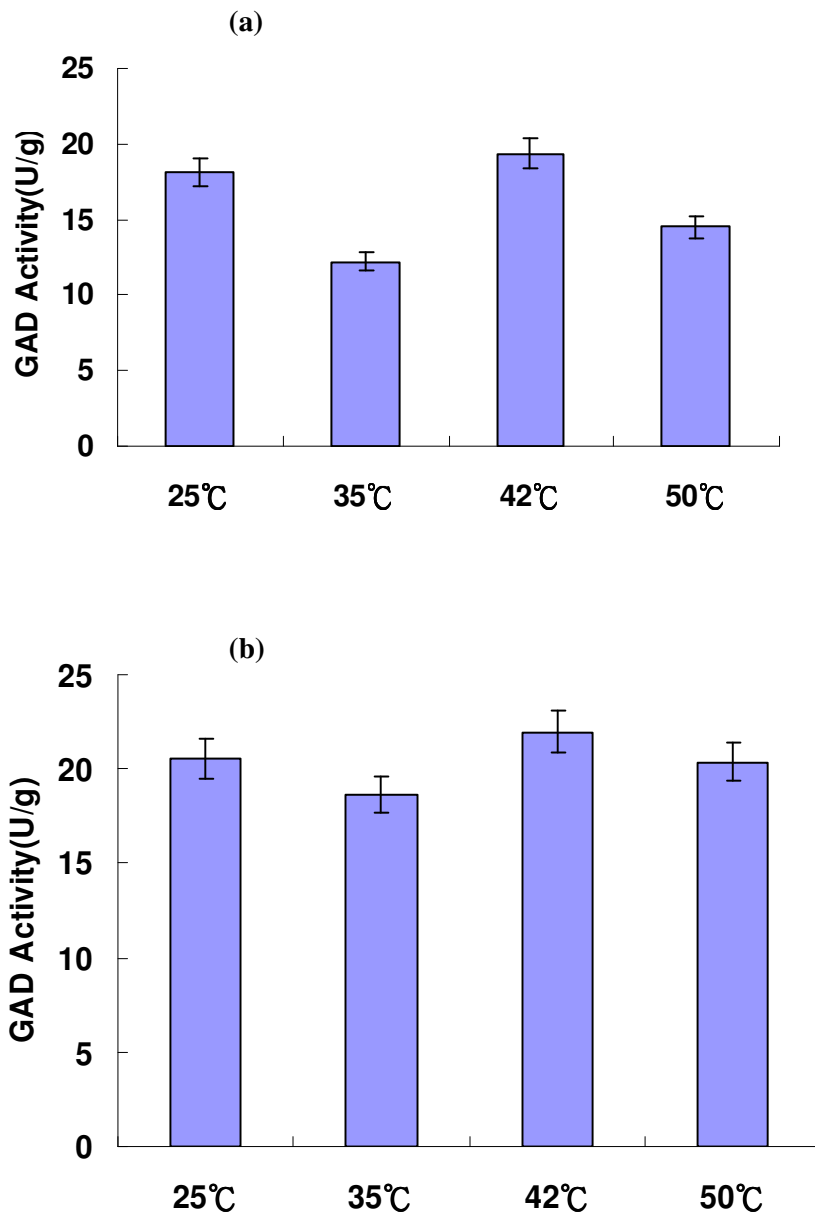


圖 5、不同溫度對台灣藜種子(a)紅色(b)黃色品種 GAD 活性之影響。

表一、不同品種、季節及天數對台灣藜 GAD 活性之影響

Day	Summer		Winter	
	Red	Yellow	Red	Yellow
0	10.45	11.39	19.34	21.96
1	9.45	9.28	9.08	7.52
3	9.27	7.52	7.74	4.95
5	8.84	6.53	6.4	4.3

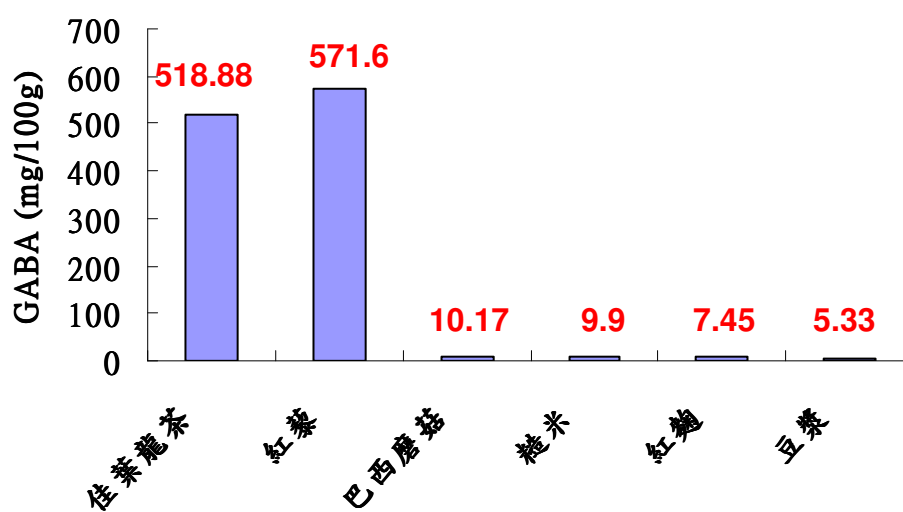


圖 6、台灣藜種子 GABA 含量與其他原料之比較

表二、試驗值交表 $L_9(3^4)$ 及其因子配置表

甜味劑	台灣藜芽體	色素	香花
0.05	0.1	0.1	0.1
0.05	0.3	0.2	0.3
0.05	0.5	0.3	0.5
0.1	0.1	0.2	0.5
0.1	0.3	0.3	0.1
0.1	0.5	0.1	0.3
0.15	0.1	0.3	0.3
0.15	0.3	0.1	0.5
0.15	0.5	0.2	0.1

表三、台灣藜 GABA 茶包製程控制因子

Control factor	Factor level		
	Level 1	level 2	level 3
1. 甜味劑	0.05	0.1	0.15
2. 台灣藜芽體	0.1	0.3	0.5
3. 色素	0.1	0.3	0.5
4. 香花	0.1	0.3	0.5

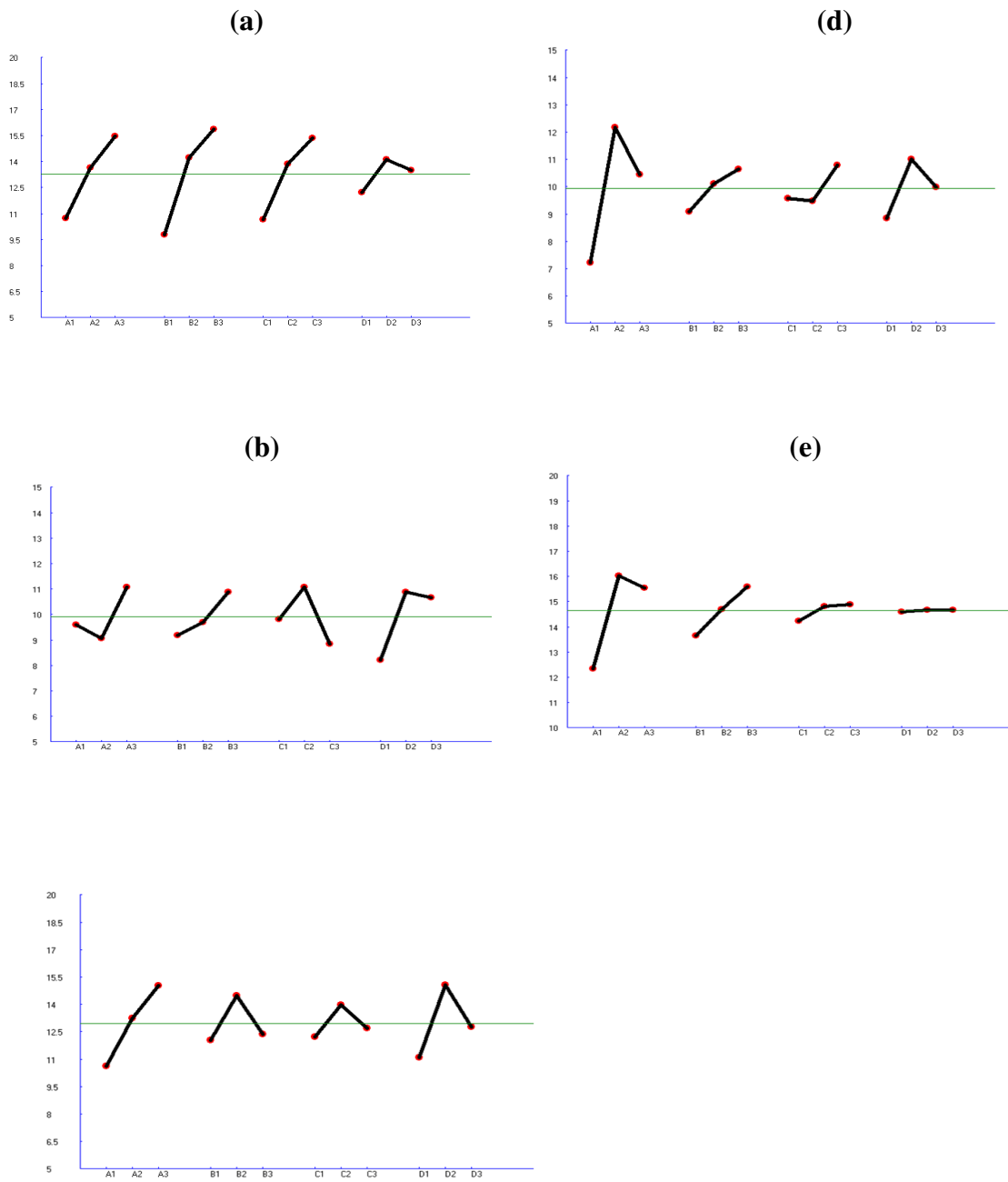


圖 7、台灣藜 GABA 茶包經田口法處理之 (a) 外觀 (b) 氣味 (c) 甜味 (d) 口感 (e) 整體接受度。

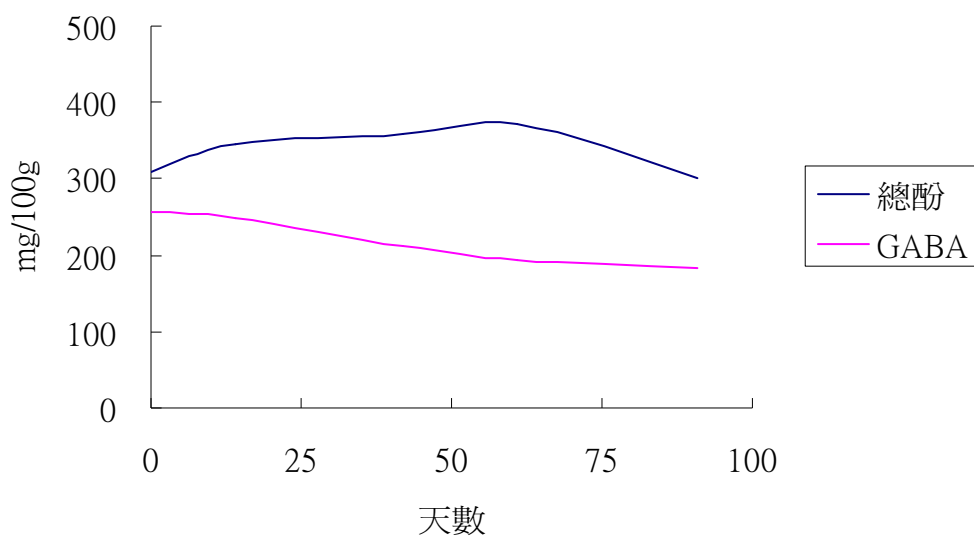


圖 8、不同貯藏天數對台灣藜茶包機能性成分之影響。

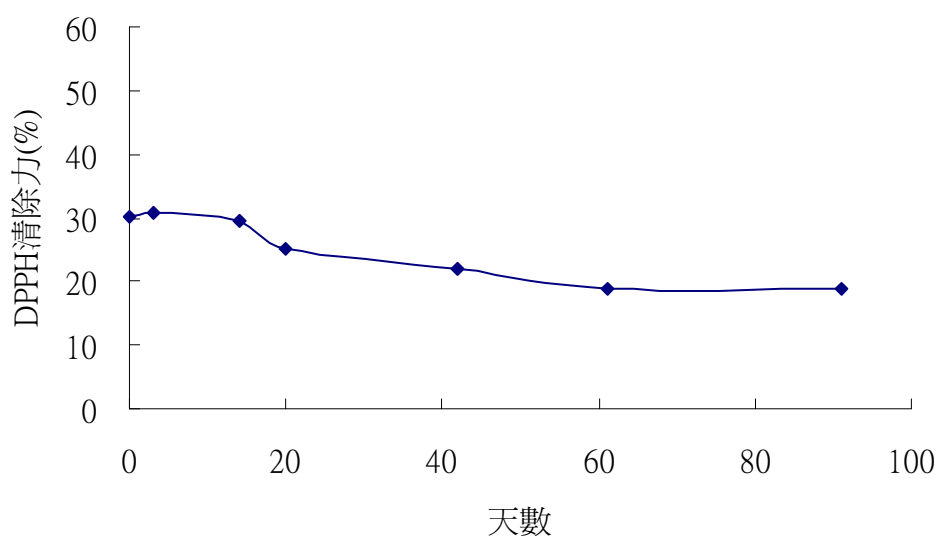


圖 9、不同貯藏天數對台灣藜茶包 DPPH 清除自由基能力之影響。

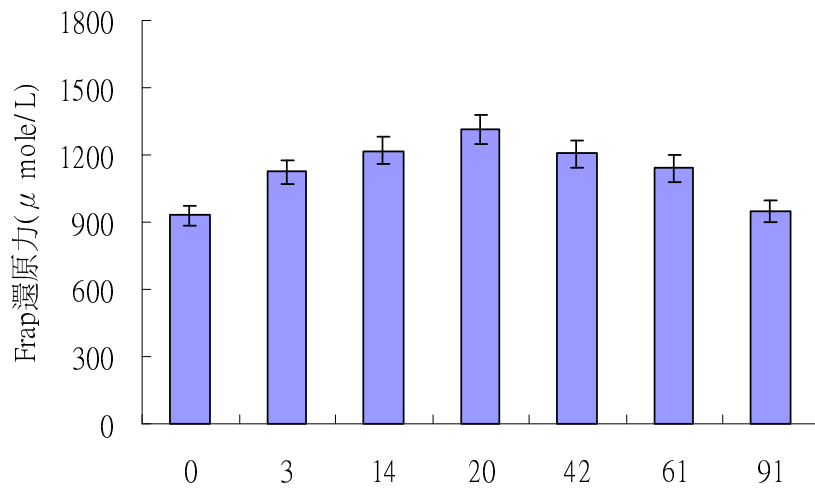


圖 10、不同貯藏天數對台灣藜茶包 FRAP 還原能力之影響。



圖 11、不同貯藏天數對台灣藜茶包 A₄₂₀ 及 Hunter a 值之影響。

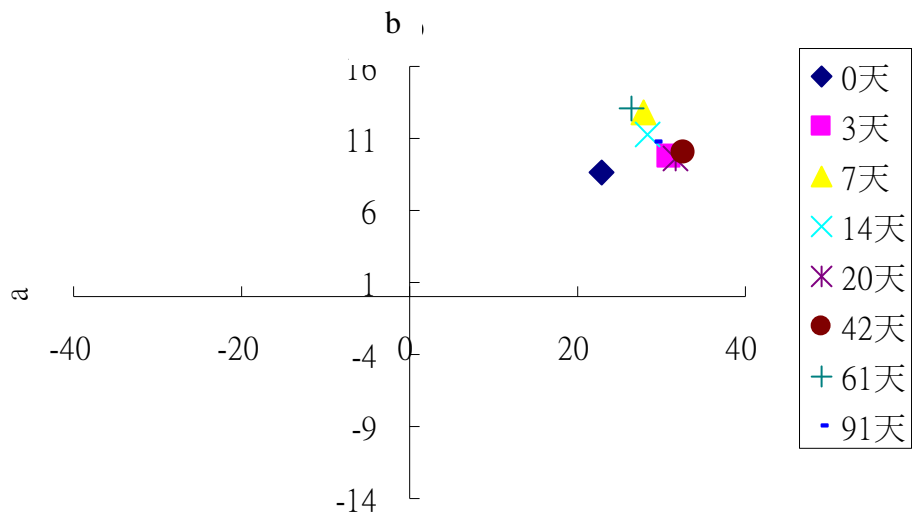


圖 12、台灣藜茶包於室溫貯藏三個月後，其 Hunter a 值與 b 值之變化。

表四、台灣藜 GABA 茶包儲藏期間機能性成分、抗氧化力與色澤相關性之分析

	Total phenol	DPPH	FRAP	A420	L	Hunter a	Hunter b	chroma	Hue angle	GABA
Total phenol	1	-0.84***	0.64 *	-0.25	-0.14	0.26	0.1	0.27	-0.09	0.17
DPPH		1	-0.44	0.3	-0.07	-0.17	0.14	-0.13	-0.22	0.09
FRAP			1	-0.01	-0.6*	0.46	0.53 *	0.56*	0.14	-0.06
A420				1	-0.65*	0.54 *	0.25	0.58 *	-0.1	-0.3
Hunter L					1	-0.82***	-0.44	-0.91 ***	0.13	0.12
Hunter a						1	-0.09	0.98 ***	-0.64*	-0.08
Hunter b							1	0.1	0.82 ***	-0.12
chroma								1	-0.48 *	-0.1
Hue angle									1	-0.05

表五、光線對台灣藜植株總酚及抗氧化力之影響

	未遮光	遮光
DPPH 清除自由基能力(%)	36.42%	29.30
FRAP 還原力(μ mole/ L)	307.20	244.53
總酚(mg/100g)	297.53	249.29



圖 13.台灣藜植株經(a)未遮光及(b)遮光處理之外觀。



公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：080404e202

行政院農業委員會林務局98年度科技計畫研究報告

計畫名稱： 環境因子對台灣藜抗氧化相關酵素活性之影響 (第1年/全程2年)
(英文名稱) Effect of environmental factors on antioxidant related enzymes activities of *Chenopodium formosanum*

計畫編號： 98農科-8.4.4-務-e2(2)

全程計畫期間： 自 98年7月1日 至 99年12月31日

本年計畫期間： 自 98年7月1日 至 98年12月31日

計畫主持人： 葛孟杰
研究人員： 何美萱
執行機關： 國立高雄大學





公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：080404e202

行政院農業委員會林務局98年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**環境因子對台灣藜抗氧化相關酵素活性之影響** (第1年/全程2年)
(英文名稱) **Effect of environmental factors on antioxidant related enzymes activities of *Chenopodium formosanum***

計畫編號：98農科-8.4.4-務-e2(2)

全程計畫期間：自 98年7月1日 至 99年12月31日

本年計畫期間：自 98年7月1日 至 98年12月31日

計畫主持人：葛孟杰
研究人員：何美萱
執行機關：國立高雄大學





一、中文摘要：

許多環境因子如溫度與高鹽可在植物體內造成大量過氧化物產生；輕而影響植株生長勢，重則引起葉綠素崩解導致植物死亡。植物為了抵抗這些逆境，會活化許多抗氧化相關酵素如Ascorbate peroxidase (POD)、Superoxide dismutase (SOD)、Catalase (CAT) 來加以抵抗。今年度計畫目標在於分析環境因子如溫度與鹽害對台灣藜抗氧化酵素活性之影響。在高溫38°C處理方面，H₂O₂含量以處理六天的葉片為最高(136.9 nmol/g)，約上升32.6倍；以高溫處理6天後的植株POD與CAT活性為最高，分別上升1.9倍與1.4倍；高溫處理3天後SOD活性最高，約上升2倍。在鹽害處理方面，處理7天後的植株 POD活性為最高，約上升1.8倍；而CAT與SOD活性在高鹽處理14天後活性最高，分別上升2.1倍與2.8倍。綜合上述結果，台灣藜在環境逆境下會活化抗氧化相關酵素以排除過高之自由基。





二、英文摘要：

Some environmental factors, such as temperature and salt stress, can induce reactive oxygen species (ROS) generation in plant. ROS can damage the chlorophyll pigments and lead plant dead. In order to overcome these oxidant stresses, plant express some antioxidant related enzymes, such as Ascorbate peroxidase (POD), Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) to scavenge ROS. In this project, we study the effect of environmental factors on antioxidant related enzymes activities of *Chenopodium formosanum*. After 38°C treatment 6days, the H₂O₂ content of leaf increases 32.6 folds (136.9 nmol/g). The activities of POD and CAT increase 1.9 and 1.4 folds after heat treatment 6 days. The SOD activity increases 2 folds after 3 days 38°C treatment. In other hands, after 250mM salt treatment 14 days, the activities of CAT and SOD increase 2.1 and 2.8 folds. The POD activity increases 1.8 folds after 7 days 250mM salt treatment. According these results, we demonstrate that after temperature and salt stresses, *Chenopodium formosanum* enhances their antioxidant enzymes activities to scavenge ROS that induce by stresses.





三、計畫目的：

許多環境因子如溫度與高鹽可在植物體內造成大量過氧化物產生；輕而影響植株生長勢，重則引起葉綠素崩解導致植物死亡。植物為了抵抗這些逆境，會活化許多抗氧化相關酵素如Ascorbate peroxidase (POD)、Superoxide dismutase(SOD)、Catalase (CAT) 來加以抵抗。本計畫將分析環境因子對台灣藜抗氧化酵素活性的影響。台灣藜以不同濃度的環境因子如溫度與高鹽處理，並分析抗氧化酵素Ascorbate peroxidase (POD)、Superoxide dismutase(SOD)、Catalase (CAT)活性變化。





四、重要工作項目及實施方法：

一、分別將台灣藜種植於25、38°C或 0 mM、250mM NaCl環境中，並抽取其總量蛋白定量後分析Ascorbate peroxidase (POD)、Superoxide dismutase(SOD)、Catalase (CAT)活性變化。

二、Ascorbate peroxidase活性分析以50 mM磷酸緩衝液(pH 7.0) 萃取。1 ml reaction mixture裡含有50 mM potassium phosphate (pH 7.0), 0.5 mM ascorbate, 0.1 mM H₂O₂ 與 0.1 mM EDTA。此反應在 加入H₂O₂或Ascorbate peroxidase即進行記錄10-30秒內290 nm的吸光值變化。

三、Superoxide dismutase活性分析以50 mM磷酸緩衝液(pH 7.4)含有0.1mM EDTA萃取。利用 β -mercaptoethanol與 MnCl₂反應產生O₂⁻，SOD可以抑制O₂⁻將NADH氧化成NAD⁺而減緩340 nm吸光值的下降速率。1 unit 的SOD定義為抑制50% NADH吸光值下降。

四、Catalase活性分析以50 mM磷酸緩衝液(pH 6.8)萃取。取適量蛋白質粗抽液加入H₂O₂，量測H₂O₂在240 nm的下降速率。1 unit 活性定義為每分鐘H₂O₂下降1 nmol的速率。





五、結果與討論：

一、溫度對台灣藜葉片過氧化物含量之影響

過氧化物為植物反應逆境時所產生之重要訊息分子之一，透過過氧化物濃度的變化可調控逆境相關基因表現。由於上述因素，植物體內過氧化物濃度已被視為反應其是否處於逆境之指標。高溫對植物而言是一種環境逆境，在臨海地區的溫度上則高達37°C以上，許多植物皆無法生長，使得海邊的造景乏味枯燥。因此我們擬測試台灣藜在高溫的環境中是否能抵抗高溫而生存下來，日後將可應用於諸如此類環境的造景美觀之用。我們將台灣藜植株置於38°C培養箱中生長3天及6天後，分析其H₂O₂含量變化。台灣藜於播種後35天開始進行高溫處理，並於處理後3、6天分析葉片H₂O₂含量。如圖一所示，台灣藜未處於逆境時H₂O₂含量約為4.2 nmol/g。在高溫處理3天後上升至65.5 nmol/g；處理6後更高達136.9 nmol/g。因此在高溫處理3天及6天後台灣藜葉片過氧化物含量分別上升15.6倍與32.6倍。此結果顯示高溫處理的確會誘導台灣藜產生過氧化物，也說明台灣藜此時正處於高溫逆境中。台灣藜以38°C的高溫分別處理0天、3天、6天後，台灣藜的外觀有顯著的變化（圖二）。由照片可以看出，經38°C高溫處理後台灣藜的莖及葉片會逐漸變紅，處理3天及6天的葉片轉紅率分別為74.2%及85.1%。處理3天及處理6天的植株枯黃率分別為4.9%及9.5%（表一）。

二、溫度對台灣藜Ascorbate peroxidase (POD)活性之影響

許多環境因子如溫度可在植物體內造成大量過氧化物產生；輕而影響植株生長勢，重則引起葉綠素崩解導致植物死亡。植物為了抵抗這些逆境，會活化許多抗氧化相關酵素如Ascorbate peroxidase (POD)來加以抵抗。因此我們分析台灣藜於高溫處理後POD與CAT活性之變化。台灣藜於播種後35天開始進行高溫處理，並於處理後3、6天分析POD活性。結果如圖三所示，台灣藜未處於高溫逆境時POD活性約為5.1 U/mg protein。在高溫處理3天後上升至8.2 U/mg protein；處理6天後更高達9.7 U/mg protein。因此在高溫處理3天及6天後台灣藜POD活性分別上升1.6倍與1.9倍。此結果顯示台灣藜在處於高溫逆境時會活化其POD活性以消除過多之過氧化物來防止植株死亡。

三、溫度對台灣藜Catalase (CAT)活性之影響

植物在遭遇逆境後除了會誘導大量的POD以清除過氧化物之外，可能也會誘導大量的CAT以清除過量的H₂O₂。因此我們抽取高溫處理過不同天數的植株之總量蛋白質，然後進行專門清除H₂O₂的抗氧化酵素 - CAT的活性分析，以偵測台灣藜是否因為H₂O₂大量的生成使得CAT活性也跟著升高。結果顯示，在未以高溫處理的台灣藜植株其CAT活性為0.13 U/mg protein。以高溫處理3天後，其CAT活性略微上升，為0.14 U/mg protein；而以高溫處理6天後的植株CAT活性上升幅度較大，為0.18 U/mg protein（圖四）。因此在以高溫處理3天及6天後的台灣藜CAT活性分別上升了1.1倍及1.4倍。此結果顯示台灣藜在處於高溫逆境時會升高其CAT活性，但變化不大。

四、溫度對台灣藜Superoxide Dismutase (SOD)活性之影響

SOD的主要功能是将 . O₂- 轉化成過氧化氫及氧氣，以減輕自由基對細胞及組





織的傷害。在室溫下生長的control組其SOD活性為0.61unit；而以38°C高溫處理3天後，台灣藜的SOD活性增加為1.23unit；但是高溫處理後6天，其SOD活性降為0.83unit。所以以高溫處理3天及6天後的台灣藜SOD活性分別是控制組的2倍及1.36倍（圖五）。此結果顯示台灣藜在處於高溫逆境時會活化其SOD活性以消除過多之過氧化物來防止植株死亡。

五、高鹽對台灣藜Ascorbate peroxidase (POD)活性之影響

鹽害是造成可耕地面積縮小的主因之一，因此培育抗高鹽作物成為一重要之課題。鹽害可在植物體內造成大量過氧化物產生，進而導致植株死亡。前期計畫中顯示台灣藜富含抗氧化相關酵素，因此其可能具有高抗鹽害之能力。台灣藜於播種後35天開始進行高鹽處理，台灣藜以 250mM NaCl溶液連續澆灌7天及14後，萃取其總量蛋白分析其Ascorbate peroxidase(POD)活性。結果如圖六所示，台灣藜未處於鹽害逆境時POD活性約為5.9 U/mg protein。在高鹽處理7天後上升至10.2 U/mg protein；處理14天後為9.8 U/mg protein。因此在高鹽處理7天及14天後台灣藜POD活性分別上升1.8倍與1.7倍。此結果顯示台灣藜在處於鹽害逆境時會活化其POD活性因應環境之變遷。將種植35天的台灣藜植株分別以250 mM NaCl 溶液處理7天及14天後，其外表型態並無明顯差異（圖七）。但是隨著處理天數增加，高鹽處理的植株的一些葉片的尖端枯黃數也會增加。高鹽處理7天及14天的植株枯黃率分別為2.0 % 及6.6 %（表二）。

六、高鹽對台灣藜Catalase (CAT)活性之影響

台灣藜以 250mM NaCl溶液連續澆灌7天及14後，萃取其總量蛋白分析其Catalase (CAT)活性。結果如圖八所示，以自來水澆灌的control 組植株的CAT活性為0.07 U/mg protein。而以高鹽溶液澆灌7天後及14天後的植株其CAT活性都有上升，但差異不大，分別為0.14 U/mg protein及0.15 U/mg protein。因此台灣藜以高鹽處理7天及14天後的CAT活性分別上升了2倍及2.1倍。

七、高鹽對台灣藜Superoxide Dismutase (SOD)活性之影響

台灣藜以 250mM NaCl溶液連續澆灌7天及14後，萃取其總量蛋白分析其Superoxide Dismutase (SOD)活性。沒有施以處理的台灣藜植株其SOD活性為0.45Uunit；而以250mM NaCl溶液分別澆灌7及14天後，其SOD活性分別升高為0.86unit及1.24unit。所以在以高鹽溶液處理7天及14天後台灣藜SOD活性分別是未處理植株的1.91倍與2.76倍（圖九）。此結果顯示，在台灣藜植株處於鹽害逆境時可能會產生大量ROS，因此需要SOD去清除這些過氧化物以維持植株生存。





六、結論：

藜科植物在抗逆境上如乾旱或適應貧瘠土地的能力非常優良，其生長期短，並擁有豐富之抗氧化酵素活性。ROS對植物的傷害頗大，植物在生長代謝時或多或少都會因電子的滲漏而產生ROS。ROS與脂質作用則會產生脂質過氧化，造成細胞膜通透性改變進而影響到細胞的生存。植物有其自己一套的抗氧化防禦系統，以將ROS的傷害降至最低。抗氧化防禦系統中包含有酵素系統，如：Superoxide dismutase (SOD)、Catalase (CAT)、Ascorbate peroxidase (POD) 等。台灣藜的抗氧化能力也很有可能是使之可以在生活在逆境環境中的一個重要因素。因此，我們模擬台灣藜在高溫、高鹽（如海埔新生地）等逆境環境中生長，並測試葉片的H₂O₂含量作為其活化ROS的指標；同時亦測試葉片之抗氧化酵素活性，分析台灣藜在不同環境、不同天數處理下所產生的抗氧化能力。

植物在逆境中會大量誘導出一些過氧化物做為訊息傳遞分子。因此測試过氧化物的含量將是植物是否處於逆境的指標。高溫處理3天後及6天後的H₂O₂ 含量分別上升了15.6及36.6倍。結果顯示，台灣藜處於高溫逆境下確實會造成H₂O₂ 含量上升，也說明了此時台灣藜處於高溫逆境中。由於植物在逆境下會在體內累積過多的過氧化物，這些過氧化物對植物體有一定程度的傷害。因此植物體會有自己一套的抗氧化防禦系統，其中抗氧化酵素POD，CAT與SOD即為其中之一。在POD方面，高溫與高鹽環境因子處理下的台灣藜植株與未處理的植株相比，POD活性都有升高的趨勢。其中以高溫處理後，台灣藜之POD活性升高幅度最大，處理3天及處理6天後從control組的1.6倍上升到1.9倍，顯示了長時間的高溫處理會使台灣藜處於較大的氧化逆境中；高鹽處理7天及14天後兩者的POD活性並無顯著的差異，處理14天者反而有些微下降的趨勢，顯示了鹽處理的確會使得台灣藜POD活性上升，但是卻不會因為在長時間的處理下而誘導出更多的POD。CAT在高溫處理3天後的活性還未見明顯上升，但是處理6天後CAT活性卻有大幅度的升高，顯示了CAT 在長時間高溫環境下會被誘導出來以清除H₂O₂。而CAT在高鹽度環境下活性也會上升，但處理7天及處理14天後的結果並沒有差異太大，因此可以說CAT確實會因為高鹽的逆境下被誘導出來，但是卻不會因處理時間較長而誘導出更多的CAT。在SOD方面，高溫處理3天及6天後的台灣藜SOD活性分別是control組的2倍及1.36倍。而以250mM NaCl溶液分別澆灌7及14天後，台灣藜SOD活性分別是未處理植株的1.91倍與2.76倍。此結果顯示，在台灣藜植株處於高溫與高鹽逆境時可能會產生大量ROS，因此需要SOD去清除這些過氧化物以維持植株生存。

八八風災重創南部原鄉，諸多土地崩塌流失，致使諸多部落面臨遷村及重建窘境。如何協助飽受風災之苦的原住民走出傷痛重建家園，已成為政府以及民間企業團體重要課題。然而在原住民傳統文化以及實際面臨之經濟困境之間，政府與各原住民族卻一直無法取得共識。透過原生植物台灣藜之復育及利用，結合部落傳統文化推動者及學界擅長之研發行銷專長，可逐步建構屬於台灣原鄉特有之植物文化產業，協助部落重生。在林務局計畫支持之下，我們開發出抗菌手工香皂等台灣藜應用產品。此外，考慮部落原住民對於農林加工產業的接受度與執行能力，我們進一步利用其發現的酵素活性及逆境原理，正進行矮化及改變花朵與葉片顏色試驗；初步





成果顯示在處理3天後整株台灣藜會轉成紅色，顯示台灣藜或許可以取代聖誕紅成為聖誕節應景花卉。上述發現技術門檻不高，原住民部落可以輕易執行達到活化台灣藜園藝花卉產業的目的以增加收入。我們將陸續把相關技術移轉給屏東縣來義鄉、瑪家鄉與霧台鄉排灣族、魯凱族等這次88水災受創嚴重的部落，希望讓他們藉著老天的恩賜與祖先智慧重新站起來。





七、參考文獻：

- 王惠娟 2005. 紅藜不同發育階段光合作用潛力及相關生理活動之變化。國立屏東科技大學森林系 碩士論文
- 朱格麟 1995. 藜科植物的起源、分化和地理分布。植物分類學報 34:486-504。
- 吳佩樺 2007. 不同品種及生長季節之紅藜抗氧化活性的探討。國立屏東科技大學 食品科學系研究所 碩士論文
- 張芳銘 1997. 台灣食用藜之研究。台灣大學農藝學研究所碩士論文
- 潘素美、葉志新(1997)台灣食用藥用菇超氧歧化酶含量之比較。中國農業化學會誌 35:209-219。
- Aikens J. , Thomas A. 1991 Perhydroxyl Radical (HOO') Initiated Lipid Peroxidation Journal of Biological Chemistry 266 : 15091-15098
- Bannister, J.V., Bannister, W.H. and Rotils, G. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. CRC Crit. Rev. Biochem. 22:110-180.
- Beevers H. 1979. Microbodies in higher plants. Annu Rev Plant Physiol 30 : 159-193
- Bryan D. 1996 Oxidative Stress Posted on the Internet (<http://www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm>)
- Fenton, H.J.H. 1894. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. J. Chem. Soc. 65:899.
- Fenton, H.J.H. 1899. Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. Proc. Chem. Soc. 25:224.
- Foyer C . 1993. Ascorbic acid. In: Alscher RG and Hess JL (eds) Antioxidants in higher plants. CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, pp. 31 - 58
- Haber, F. and Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. Royal Soc. A. 147:332.
- Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. Nutr. Reviews 52 : 253-265
- Havir E.A. and McHale N.A. 1987. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. Plant





- Physiol. 84 : 450-455
- Lyubenova L. Nehnevajova E. Herzig R. & Schröder P. 2009 Response of antioxidant enzymes in *Nicotiana tabacum* clones during phytoextraction of heavy metals Environ Sci Pollut Res. 16 : 573-581
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR. 1994. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. Plant Cell. 6:65-74
- Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 267 : 1445-1449
- Scandalios J. G. 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. Plant Physiol. 101 : 7-12
- Tolbert N.E. 1982 Leaf peroxisomes. Ann NY Acad Sci 386 : 254-268
- Tottempudi K. Prasad, Marc D. Anderson, Barry A. Martin, and Cecil R. Stewart 1994. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. Plant Cell. 6 : 65-74



	control	處理 3 天	處理 6 天
枯黃率	0.4%	4.9%	9.5%
轉紅率	0%	74.2%	85.1%

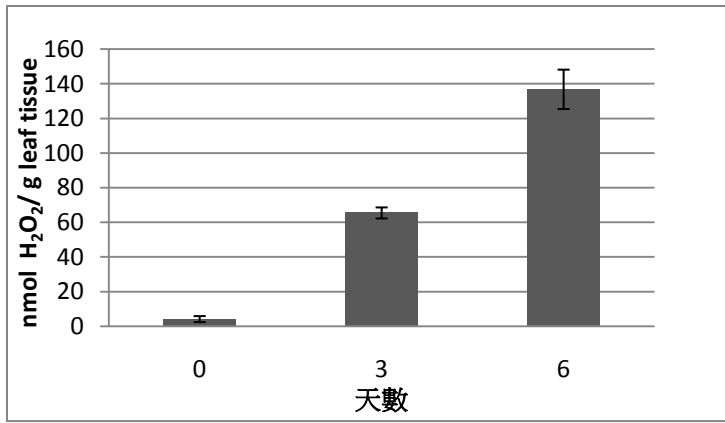
表一、38°C 高溫處理 0 天、3 天、6 天後台灣藜葉片之枯黃率及轉紅率。

*枯黃率的計算為枯黃葉片除以全株葉片總合所得之結果；轉紅率計算方式為變紅葉片除以全株葉片總合所得之結果。

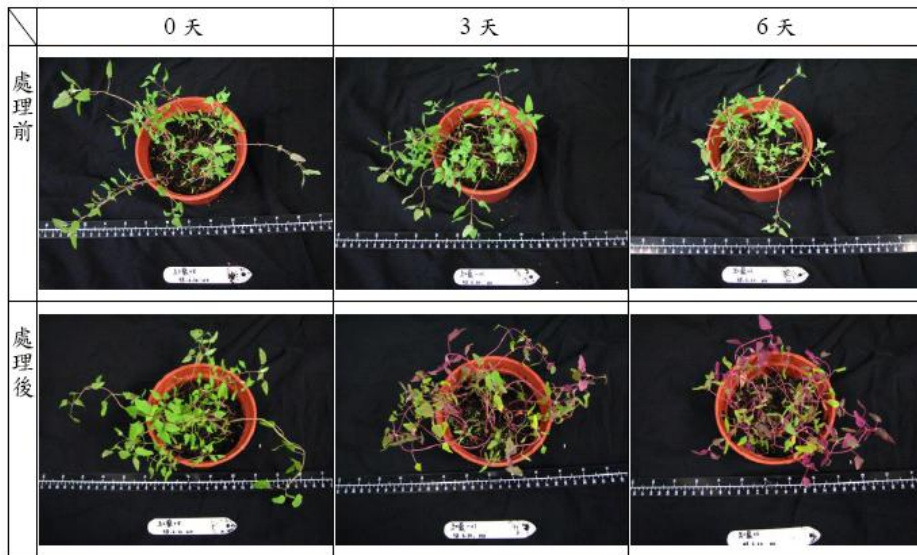
	control	處理 7 天	處理 14 天
枯黃率	0.4%	2.0%	6.6%

表二、250 mM NaCl 高鹽處理 7 天、14 天後台灣藜葉片之枯黃率。

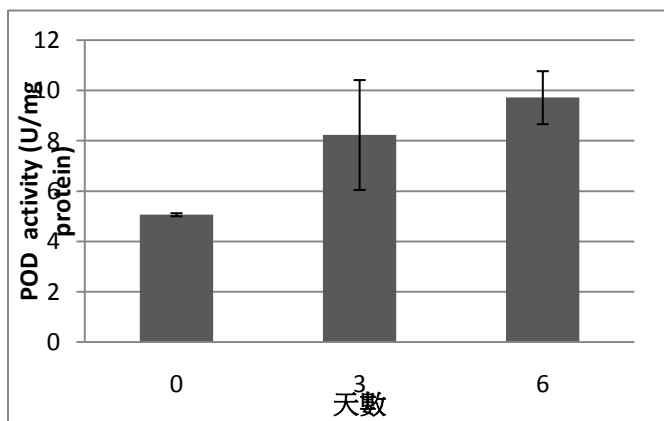
*枯黃率的計算為枯黃葉片除以全株葉片總合所得之結果。



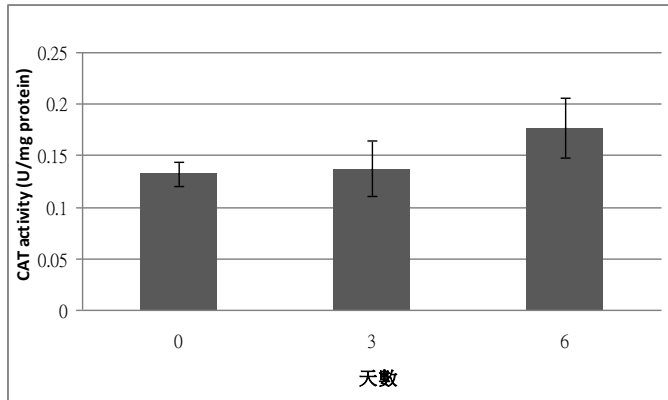
圖一、台灣藜在溫度處理3、6天後及未處理的植株其H₂O₂含量。



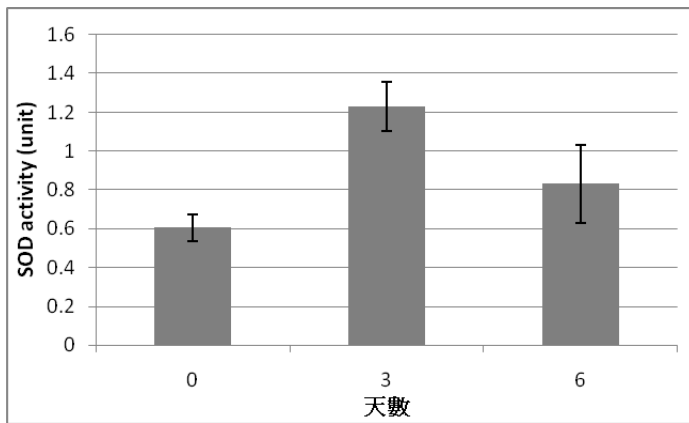
圖二、台灣藜以高溫 38°C 分別處理 0 天、3 天、6 天後葉片的外觀圖。



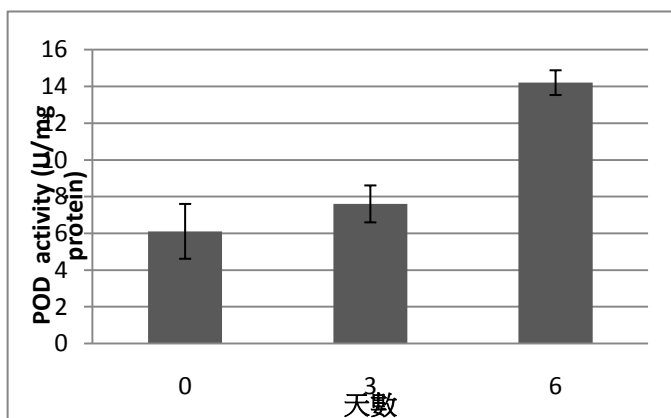
圖三、溫度處理 3 天、6 天及未處理之台灣藜 POD 活性。



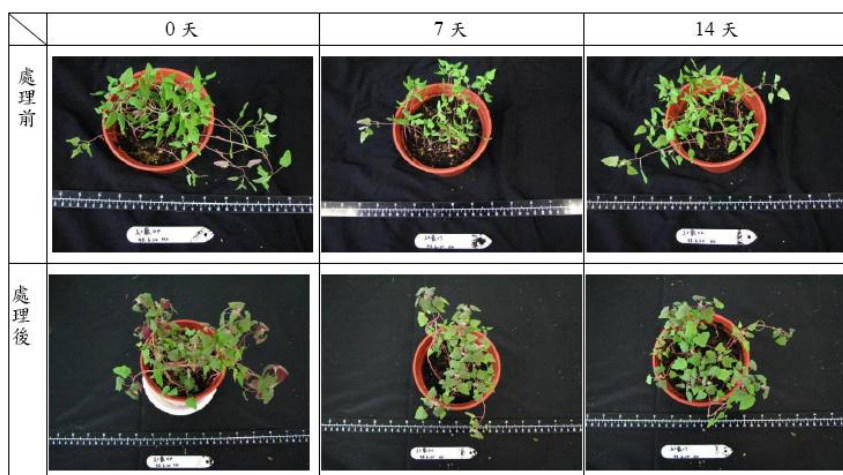
圖四、溫度處理 3 天、6 天及未處理之台灣藜 CAT 活性。



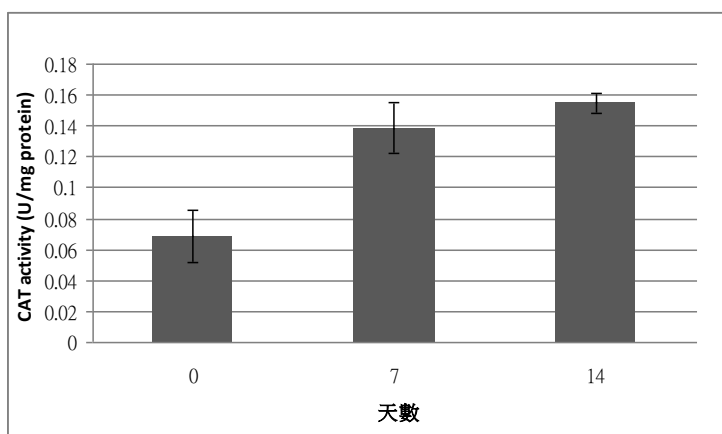
圖五、溫度處理 3 天、6 天及未處理之台灣藜 SOD 活性。



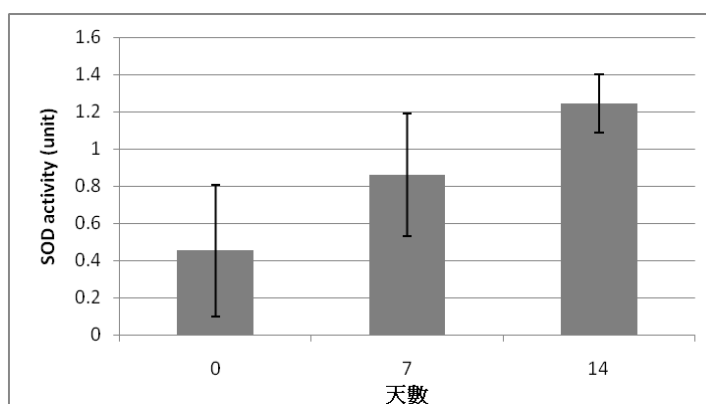
圖六、鹽處理 7 天及 14 天與未處理之台灣藜的 POD 活性。



圖七、台灣藜以高鹽處理後葉片外觀圖。由左至右分別是未以 250mM NaCl 高鹽溶液處理及分別處理 7 天、14 天。



圖八、台灣藜以 250mM 高鹽處理後的 CAT 活性。



圖九、台灣藜以 250mM 高鹽處理後的 SOD 活性。