

70

國立宜蘭大學

農業推廣季刊

國立宜蘭大學農業推廣委員會 農業推廣(季刊)

中華民國 86 年 3 月創刊

通訊總號第 070 號 中華民國 103 年 12 月出刊

行政院農業委員會補助編印

發行人/邱奕志

主編/林世斌 陳莉臻

編輯/林怡慧

地址：260 宜蘭市神農路 1 段 1 號

電話：03-9357400#7613

傳真：03-9354152

E-Mail：aec@niu.edu.tw

金柑酒中酚類成分之抗氧化及抗發炎活性之研究

林世斌 陳莉臻*

國立宜蘭大學 食品科學系

一、前言

金柑 (kumquat) 別稱金棗，又名金橘，在分類上屬於芸香科 (Rutaceae)、柑橘亞科 (Aurantioideae) 之金柑屬 (Fortunella)，原產於中國長江流域及浙江、福建一帶，1906 年田代氏由日本引進台灣栽種 (呂，1993)，目前有寧波金柑 (*F. crassifolia* Swingle)、伊豆金柑 (*F. hindsii* Swingle)、圓實金柑 (*F. japonica* Swingle)、長實金柑 (*F. margarita* Swingle，日本稱之為 *nagami kumquat*)、長壽金柑 (*F. obovata* Tanaka) 及長葉金柑 (*F. polyandra* Tanaka) 等六種品種

(黃和陳，2011)。蘭陽平原雨量充沛、氣候陰濕形成適合金柑生長的环境，目前宜蘭縣的金柑總種植面積占全台 95% 以上，尤以員山鄉及礁溪鄉為大宗產區 (行政院農業委員會農糧署，2013)。已知金柑果實中富含維生素 C 及 A，也有豐富果膠 (pectin) 可助消化以及多酚類化合物 (phenolic compounds) 與類胡蘿蔔素等機能性成分，明朝李時珍本草綱目卷三十中亦記載：「金橘 (氣味) 酸甘、溫、無毒。主治：下氣快膈、止渴解醒、辟臭、皮尤佳」，文中指出金柑具潤喉、助消化之功效，且果皮效果最好，在日本金柑也常被作為藥材使用，皆說明金柑對人體健康的助益 (林，2000)。

柑橘類水果中富含的多酚種類為類黃酮，常以配醣體 (glycosides) 形式存在，且果皮的含量高於果肉，其含量與抗氧化力之間成正相關 (江，2007；黃，2008；徐，2009；Sadek et al., 2009；Wang et al., 2008)，但通常此類水果通常去皮、去籽食用，而金柑為唯一可連皮食用的柑橘類水果。因為金柑果皮富含精油而略帶苦味，果肉酸味強，以往大多製成如蜜餞等加工產品，近年來則改良栽培品種以推廣鮮食 (郭，2003；李，2004；農糧署，2011)。現行栽培品種以具豐產特性的長實金柑為主，其採收期適逢宜蘭的多雨季節，容易因採收與貯藏不當而造成損耗。由於金柑果實成熟時色澤金黃，當其產量高且無法以鮮食消費完畢時，除了製作蜜餞等加工品之外，亦可進行發酵製成酒

品，研究指出適度的酒精存在，有助於增加腸道對多酚的吸收性 (Ruf et al., 1995)。

二、金柑酒中多酚類含量與其抗氧化能力之關係

由於果皮精油成分具有抗菌活性(38-41)，易造成發酵菌種生長緩滯而影響酒品之品質，因此，我們開發以熱萃酒醪形式進行金柑酒的產製，解決精油抑制發酵問題並探討總多酚含量之變化情形。結果如圖一，不同熱萃時間（10、30 及 60 分鐘）的酒醪發酵過程中，各組總多酚含量初期皆比未發酵前減少（除了 EM10 之外），之後則隨著發酵時間增加而提高的趨勢。雖然熱萃處理的金柑酒醪之總多酚含量在發酵末期皆降低，不過仍舊高於未發酵的 control 組。

進一步測定分析發酵前的氧自由基吸收能力 (oxygen reactive capacity, ORAC) (圖二)，顯示加熱前處理可以提升酒醪的氧自由基吸收能力。結果發現金柑發酵後的總多酚和抗氧化力會增加，推測這應與微生物的生長代謝有關。加熱處理雖然會造成如單寧的多酚類降解，但也可以打斷了其他多酚類的鍵結，增加如非單寧酚、沒食子酸及類黃酮等成分，或因加熱的梅納反應生成具抗氧化力產物，致使抗氧化能力提高，此外金柑酒中存在的酚類化合物種類也會影響 ORAC 值的表現。

三、金柑酒中的酚類成分及其抗氧化活性

金柑含有常見於柑橘類水果的橙皮苷 (hesperidin)、香葉木苷 (diosmin)、芸香苷 (rutin)、槲皮素 (quercetin) 及山柰酚 (kaempferol) 等類黃酮，已證實具有抗菌、抗氧化、抗發炎、抗癌及預防心血管疾病等生物活性 (Hsu and Yen, 2006; Wang et al., 2007; Roowi and Crozier, 2011)。此外，金柑的類黃酮成分及含量與柑橘屬仍有些不同，如 acacetin 7-O-neo-hesperidoside (fortunellin)、acacetin 6-O-glucoside 及與黃烷酮糖苷 (flavanones glycoside) 鍵結之枸橼苷 (poncirin) 等 (Ogawa et al., 2001)，以及少見於其他柑橘類水果的 3,5 -di-C-β-D- glucopyranosyl-phloretin (DGPP) (Palowska et al., 2009)。以高效能液相層析儀 (HPLC) 進行發酵前後金柑酒醪的酚類組成分比較，由圖三顯示未發酵金柑酒醪的分析圖譜中含有四個主要成分波峰，而發酵後主要成分峰則變為三個。經比對發酵前後樣本波峰的相對位置，確認兩者除了第一個成分波峰相同，其餘波峰並不相同，顯示發酵操作確實會造成金柑成分改變，而不同熱萃時間的金柑酒醪在發酵後之分析圖譜並無差異。Ye 等人 (2009) 利用層析技術分析多酚類，也發現經由發酵後成分會發生變化，且透過微生物酵素轉換的代謝產物具有更佳的抗氧化能力。對照賴 (2013) 分析金柑水萃物並鑑定其酚類成分結果，金柑發酵前的四個主要成分分別為 DGPP、acacetin 8-C-neohesperidoside (margaritene,

MGT)、acacetin 6-C-neohesperidoside (isomargaritene, isoMGT)及 acacetin 7-O-neohesperidoside (fortunellin, FTN)。金柑發酵後的第一個成分仍為類黃酮中查爾酮類型的 DGPP，但原有的酚類成分均已未見，圖三(B)出現的兩個成分峰(分別稱為 UN2 及 UN3)尚未能鑑定出其化學結構，但藉由 Folin-Ciocalteu 法、金屬錯合呈色反應以及薄層層析 (TLC) 結果 (圖四)，可以確認兩者皆屬於類黃酮的黃酮類型化合物。雖然利用 LC-MS 得知兩成分的分子量同為 446Da，與目前已知的具生物性功能柑橘類黃酮物質皆無對應。雖然兩者的金屬錯合呈色以及螢光反應相同，但 TLC 展開時的高度不同，且 HPLC 圖譜顯示兩者波峰滯留時間不同，表示兩成分具有極性上的差異，所以兩成分可能互為同分異構物，但並非同一種化合物 (陳, 2011; 吳, 2014)。在 HPLC 分析圖譜顯示 UN2 及 UN3 應為單純波峰，但 NMR 結果指出 UN2 及 UN3 兩個劃分收集物並非單一物質，表示當中仍存有性質極其相似之物質，因此無法判讀其結構，仍須尋求其他的分離技術，才能完成 UN2-3 之化學結構分析。

在 ORAC 試驗結果顯示，金柑發酵前後的主要多酚如 DGPP、MGT、isoMGT、FTN、UN2 及 UN3 皆具有抗氧化活性 (圖五)。金柑發酵前後皆存在的 DGPP 是一種雙糖化形式之 phloretin，除了具有抗氧化性 (Sadek et al., 2009) 之外，亦證實可以有效抑制酪胺酸

酶的活性，達到調控黑色素的生成 (余，2011)。

四、金柑多酚的抗發炎活性

發炎反應是人體對抗外來物所啟動的一種防禦系統，適度的發炎有助於活化免疫細胞殺死入侵者，然而過度發炎會引發敗血症，導致組織細胞代謝異常、壞死，嚴重甚至死亡 (Bellingan, 1999)。目前研究也發現，過度發炎或持續性發炎會引發類風濕性關節炎、動脈粥狀硬化等心血管疾病 (cardiovascular disease)、糖尿病、阿茲海默氏症 (Alzheimer's disease)、癌症、過敏性反應 (hypersensitive) 及自體免疫疾病 (autoimmunity) 等慢性疾病 (Huang et al., 2004)。

存在金柑的主要類黃酮為黃酮、黃酮醇、黃烷酮、查爾酮與多甲氧基黃酮類型 (Sadek et al., 2009; Barreca et al., 2011)，已知具有抗氧化、抗發炎、抗病毒、抗寄生蟲、抗癌、降血脂及預防心血管疾病等生理活性 (江，2007；賴，2013；Kumamoto et al., 1985; Ogawa et al., 2001; Hsu and Yen, 2006; Roowi and Crozier, 2011)。

巨噬細胞在免疫系統中扮演重要角色，可以釋放 TNF- α 、IL-1、IL-6 以及誘發一氧化氮合成酶 (NO synthase) 大量表現而生成 NO 等，參與免疫反應、擴大感染部位之發炎反應 (Morrissette et al., 1999)，因此 NO 的生成量是評估發炎病程演進的重要指標之一 (Surh et al., 2001)。我們利用 RAW264.7 細胞模式探討這些金柑發酵前後的

主要多酚如 DGPP、MGT、isoMGT、FTN、UN2 及 UN3 對減少 NO 生成的效果，發現均可降低 RAW264.7 細胞 NO 的生成量，顯見金柑及其發酵酒品具有抗發炎的潛力存在。

五、結語

金柑酒藉由微生物轉換方法（即發酵操作）之後，可以提升當中生物活性成分的含量及功能性，且經由體外細胞模式發現具有抗氧化及抗發炎之潛力存在，顯示金柑極具保健功效之開發潛力，初步提供金柑的保健理論基礎。期望透過這些研究成果，有助於提升宜蘭地區推廣金柑產業的效益，也能改善金柑季節性產銷問題與大陸金柑傾銷之衝擊。

參考文獻

行政院農業委員會農糧署，2013，農情報告資源網—縣市作物查詢，

http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp。

江佩錚，2007，不同成熟度金柑抗氧化活性及其有效成分之研究。國

立宜蘭大學食品科學系碩士論文，宜蘭，台灣。

李國明，2004，金柑無毒化種苗生產檢疫與繁殖技術應用。花蓮區農

業專訊，48：5-8。

余明雯，2011，金桔果皮抗氧化性及抑制酪胺酸酶活性成分之分析。

國立宜蘭大學食品科學系碩論文，宜蘭，台灣。

呂樵鏘，1993，宜蘭特產—金柑，果農合作 543: 8-9，台灣省青果運銷合作社，台北，台灣。

林欣榜，2000，水果篇：金柑，治感冒良方，p. 44，鄉間小路，台北，台灣。

吳郁盈，2013，金柑醱酵液減脂活性成分分離及其機制之探討。國立宜蘭大學食品科學研究所碩士論文，宜蘭，台灣。

徐雅秀，2009，金柑及金桔抗氧化活性成分之萃取與分析。國立宜蘭大學食品科學系碩論文，宜蘭，台灣。

陳雅君，2011，金柑酵母菌醱酵液主成分及其生物活性分析之研究。國立宜蘭大學食品科學研究所碩士論文，宜蘭，台灣。

郭信厚，2003，台灣蔬果園水果篇，田野影像，台北，台灣。

黃敬如，2008，金柑不同溶劑連續萃取物之抗氧化及抗發炎活性。國立宜蘭大學食品科學系碩士論文，宜蘭，台灣。

黃阿賢、陳祈男，2011，金柑的種類與形態。農業試驗所嘉義分所編印 87: 9-12。

賴義均，2013，乾燥處理對未成熟金柑酚類化合物之分布及抗氧化活性之影響。國立宜蘭大學食品科學系碩論文，宜蘭，台灣。

Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U. and Gattuso, G. 2011. Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) juice: Flavonoid distribution

- and antioxidant properties. *Food Research International* 44: 2190-2197.
- Bellingan, G. 1999. Inflammatory cell activation in sepsis. *Br. Med. Bull.* 55: 12-29.
- Hsu, C. L. and Yen, G. C. 2006. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Molecular Nutrition and Food Research* 50: 1072-1079.
- Huang, M. T., Ghai, G. and Ho, C. T. 2004. Inflammatory process and molecular targets for anti-inflammatory nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3: 127-139.
- Kumamoto, H., Matsubara, Y., Iizuka, Y., Okamoto, K. and Yokoi, K. 1985. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in kinkan (*Fortunella japonica*) peelings. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 2613-2618.
- Morrisette, N., Gold, E. and Aderem, A. 1999. The macrophage--a cell for all seasons. *Trends in Cell Biology* 9: 199-201.
- Ogawa, K., Kawasaki, A., Omura, M., Yoshida, T., Ikoma, Y. and Yano, M. 2001. 3',5'-Di-C- β -glucopyranosylphloretin, a flavonoid characteristic of the genus *Fortunella*. *Phytochemistry* 57: 737-742.
- Pawlowska, A. M., Camangi, F., Bader, A. and Braca, A. 2009. Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chemistry* 112:858-862.
- Roowi, S. and Crozier, A. 2011. Flavonoids in tropical citrus species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 12217-12225.
- Ruf, J. C., Berger, J. L. and Renaud, S. 1995. Platelet rebound effect of alcohol withdrawn and wine drinking in rats. Relation to tannins and lipid peroxidation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15: 140-144.
- Sadek, E., Makris, D. and Kefalas, P. 2009. Polyphenolic composition and antioxidant characteristics of kumquat (*Fortunella margarita*) peel fractions. *Plant Foods for Human Nutrition* 64: 297-302.
- Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K. and Lee, S. S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research: Fundamental and*

Molecular Mechanisms of Mutagenesis 480-481: 243-268.

Wang, Y. C., Chuang, Y. C. and Hsu, H. W. 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. Food Chemistry 106: 277-284.

Wang, Y. C., Chuang, Y. C. and Ku, Y. H. 2007. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. Food Chemistry 102: 1163-1171.

Ye, H., Xu, H., Yu, C., Dai, Y., Liu, G., Xu, W. and Yuan, S. 2009. Hydroxylation of naringin by *Trichoderma harzianum* to dramatically improve its antioxidative activity. Enzyme and Microbial Technology 45: 282–287.