

行政院國家委員會專題研究計畫成果報告
幾丁聚糖—葡萄糖胺梅納反應產物的抗氧化性

Antioxidative activity of chitosan- glucosamine Maillard reaction products

計畫編號：NSC 89-2312-B-002-014

執行期限 88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：李錦楓 教授

執行機構：國立台灣大學食品科學研究所

一、中文摘要

此研究是以幾丁聚糖與葡萄糖胺、葡萄糖進行非酵素褐變的梅納反應，可得深褐色的產物，藉此改變幾丁聚糖的溶解性質，增加其應用性，同時研究此產物的抗氧化性，以清除自由基能力、捕捉超氧陰離子、還原力、金屬螯合能力等方法測定，期望經由此反應後的產物有好的抗氧化性質，並同時探討梅納產物的抑菌性質，使得幾丁聚糖在機能性食品有更好的發展空間。

關鍵字：幾丁聚糖、葡萄糖胺、梅納反應、
抗氧化

Abstracts

This research is to study the antioxidative activity of Maillard reaction products prepared by heating chitosan with glucosamine or glucose. By this reaction, chitosan can be improved its solubility in water. The antioxidative activity of Maillard reaction products was measured with scavenging free radical and superoxide anion, reducing power, and metal chelating power. In addition, the Maillard reaction products were studied in inhibiting growth of bacteria. We hope the products by Maillard reaction will show good antioxidative activity, and

develop more applications of chitosan as functional foods.

Key words: chitosan, glucosamine, Maillard reaction, antioxidative activity

二、緣由與目的

食品在加工或儲存過程中，為了防止食品氧化，常會加入人工抗氧化劑 butyl hydroxyanisol(BHA)、butylhydroxytolnene (BHT) 等，來抑制油脂氧化 (Dziezak, 1986)。因為人工抗氧化劑性質安定且價格便宜，所以目前還是常使用這些人工合成抗氧化劑來減少油脂氧化，然而天然維生素 E 也被應用，但是價格高，此外，若是大量食用人工抗氧化劑之動物可能會造成畸形胎，或引發癌症的發生 (Bran, 1975)，因此，天然抗氧物的研究逐漸受到重視。目前被研究報導的天然抗氧物已有相當多種類，如大豆豆渣 (Chen *et al.*, 1996)，魚貝類抽出物 (吳, 1998)，茶內多酚類 (Ho *et al.*, 1992) 穀類 (Dave and Giuseppe, 1996) 等。

梅納反應是在加工或儲藏過程中，因為食物內含還原糖與帶胺基分子產生的作用，其產物可以給予食物特殊香味與色澤。早年因發現梅納反應產物可以延緩食物中的脂質氧化速率 (Findley *et al.*, 1946) 再加上近年來根據流行病學的調查

與研究，發現人類的飲食生活型態與癌症發率有密切相關性 (Ames, 1983)，然而食物中的抗氧化物質除了可以減低食物因脂質氧化所造成的破壞，還可以抑制人類由於脂質氧化作用所引起的疾病或老化現象 (Ames, 1989)，因此也開始重視食物加熱過程中所產生梅納反應產物之抗氧化性 (Lingnert and Eriksson, 1981)。

幾丁質是自然界中分佈最廣，含量最多的多醣之一，廣泛的存在動植物及真菌中 (Knorr, 1984)，幾丁質是由 N-acetyl-D-glucosamine 以 β 1-4 糖苷鍵結合而成，結構類似纖維素高分子聚合物 (Stanley *et al.*, 1975)，幾丁質來源可由蝦、蟹加工及發酵工業中提供，而將幾丁質以高濃度熱鹼處理，進行去乙酰化，去除部分或是全部的乙酰基得幾丁聚醣；幾丁聚醣的應用範圍相當廣，如防腐、廢水處理、果汁澄清等 (陳, 1995；陳, 1998)，在生理機能方面也有一些報告指出幾丁聚醣有降低血清膽固醇、抗腫瘤、增加免疫力 (堀, 小原, 1990)，也可以利用添加到食品中吸附色素將之排出，以降低色素可能造成的毒性 (Knorr, 1982)；若在環境中有少許的金屬離子存在，會促進油脂的氧化，而幾丁聚醣有螯合金屬的能力 (Lerivrey *et al.*, 1986；Micera *et al.*, 1985)，因此，擬以幾丁聚醣為材料，探討其抗氧化性。

其次，以還原糖與胺基 (amino group) 進行梅納反應所得的產物，已被證實有抗氧化性 (Scott and Mohammed, 1995; Yen and Hsieh, 1995)，所以利用葡萄糖胺糖還原糖，與幾丁聚醣進行梅納反應，製成水溶性幾丁聚醣--- 2-葡萄糖胺糖化或葡萄糖化幾丁聚醣，研究其抗氧化性，期望經過梅納反應後的水溶性幾丁聚

醣有更好的抗氧化性。

三、結果與討論

1. 梅納褐變程度測定：

在 DD80% 幾丁聚醣-葡萄糖胺糖組中 (圖一(a))，在三種反應溫度下，隨著反應時間的增加，在 700nm 吸光值，也會隨之增加，此外，反應溫度越高，越易進行梅納褐變，於葡萄糖組 (圖一(b)) 也有類似情況，但在相同的反應條件下比較，以葡萄糖胺糖為還原糖較易進行梅納反應，這可能與葡萄糖胺糖上多了一個胺基有關。

2. 清除 α, α -diphenol- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力：

水溶性幾丁聚醣梅納產物，大致隨反應時間提高、反應時間增長，其清除能力會增加，即是梅納中末期之黃褐色產物較具清除 DPPH 自由基能力。在相同梅納反應條件下，以葡萄糖胺糖為還原糖之水溶性幾丁聚醣梅納產物 (圖二(a)) 有較佳的清除自由基能力。

3. 超氧陰離子清除：

由葡萄糖胺糖經梅納反應得到的產物 (圖三(a)) 隨反應時間增長而捕捉能力會漸漸提升，以不同還原糖進行反應，皆是以 50°C 反應條件得到的產物有較佳的捕捉能力，於相同反應溫度條件下，若反應時間短 (1~3 天)，以葡萄糖為還原糖的梅納產物捕捉能力較好 (圖三(b))，反應時間長時 (5~7 天)，則以葡萄糖胺糖為還原糖的梅納產物有較好的捕捉能力。

4. 還原力測定：

還原糖為葡萄胺糖之梅納產物(圖四(a))，大致隨著反應溫度的升高，反應時間的增加，越具有還原力，但在 40°C 反應產物則是隨反應時間增加而降低，在葡萄糖組的產物(圖四(b))則呈相反的結果，在反應溫度較低，反應時間較短的條件下，有較好的還原力表現，於相同反應條件下，以葡萄糖為還原糖之水溶性幾丁聚醣梅納產物有較佳的還原力。

5. 螯合金屬能力：

於螯合銅離子能力中，葡萄胺糖組的梅納產物之螯合銅離子能力(圖五(a))，隨反應溫度的增加、反應時間的增長，有較好的螯合能力，葡萄糖組(圖五(b))是以 60°C 產物有較佳的螯合能力，並隨反應時間的增加，螯合能力下降，在相同的反應溫度條件下，當反應時間較短時(1~3 天)，以葡萄糖為還原糖之水溶性幾丁聚醣梅納產物有較好的螯合銅離子能力，反應時間較長時(5~7 天)，則是還原糖為葡萄胺糖之水溶性幾丁聚醣梅納產物有較佳的螯合銅離子能力。至於螯合鐵離子方面(圖六)，在各種的反應條件下，如還原糖種類、胺基化合物、反應溫度、反應時間，對於產物的鐵離子螯合能力沒有太大影響，其能力皆介於 10~15%。

6. 抑菌能力測定：

水溶性幾丁聚醣梅納產物對於不同菌株有不同的抑菌能力，其中以對 *Sal. spp* 菌株能力最差約只能降低 1~2 對數值菌數，此外幾丁聚醣經過梅納反應作用程度

越高，所得到的產物之抑菌能力越差，在 40°C 反應溫度條件，以反應長時間的產物有較佳抑菌能力且對細菌的影響力大小為 *S.aureus*>*B.cereus* ≈ *E.coli*>*Sal.spp.* 而在 50°C 反應溫度中，以反應時間較短者有較好的抑菌能力。

四、計畫成果自評

水溶性幾丁聚醣梅納產物，具有梅納反應產物特有顏色與味道，但因為此次實驗並未除去反應中生成的鹽類，因此凍乾後的產物還多一些醋酸味，鄭(1999)指出經過透析處理過的水溶性幾丁聚醣梅納產物反而具有甜味，所以在凍乾之前去除鹽類，可以改善味道而可添加於食品增加風味。

水溶性幾丁聚醣梅納產物可用於食品添加物，經過不同條件處理所得梅納產物性質都有些不同，可以依所需要的性質，如防止油脂類食品氧化、去除一些食品中的金屬離子；或是利用梅納產物的抑菌性，生產較具所需能力的產物添加於食品中。

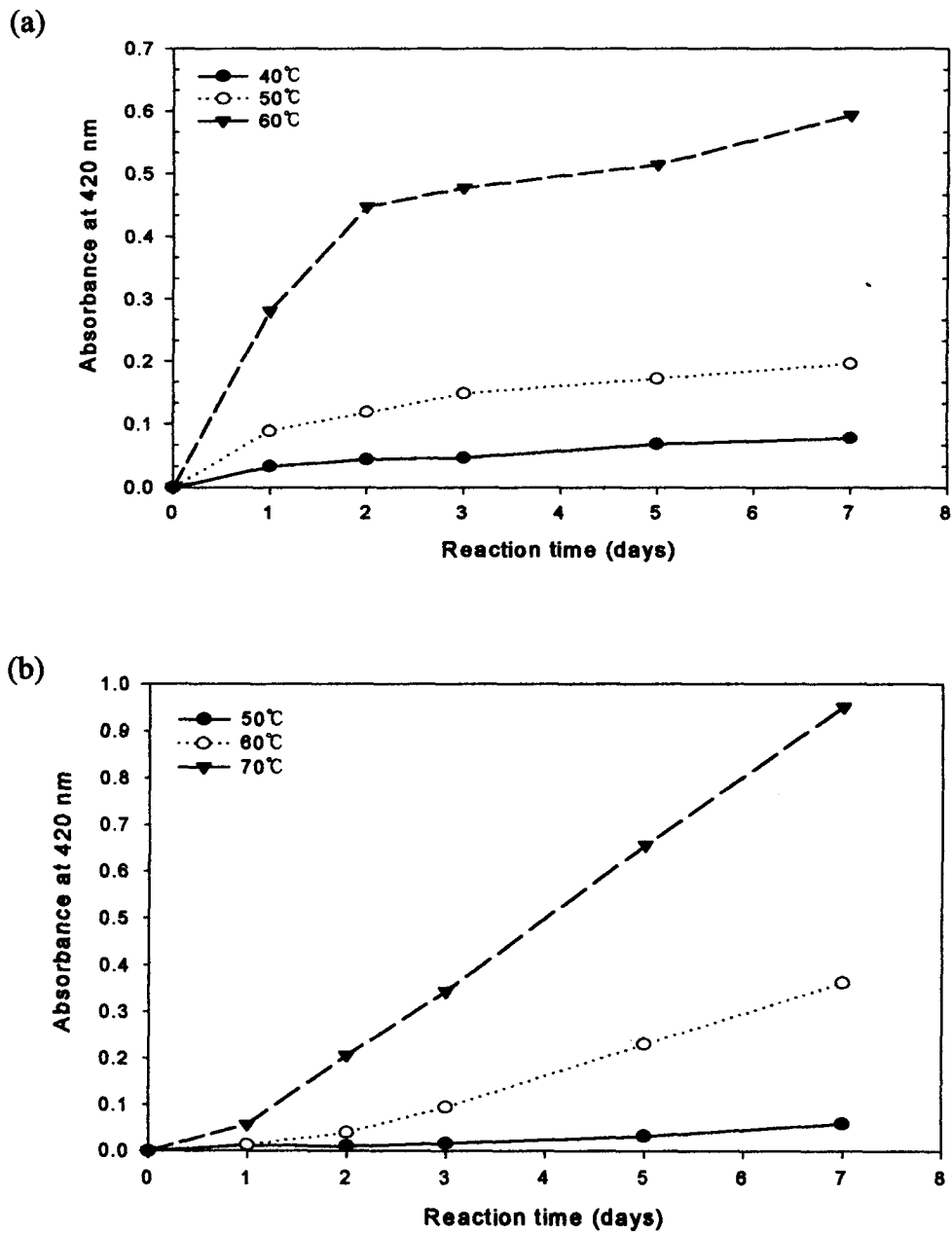
水溶性幾丁聚醣梅納產物在保健食品方面也有很好的發展潛力，由於幾丁聚醣已被證實具有許多的生理功能，而幾丁聚醣經過梅納反應所得產物也具有抗氧化性質，雖然對梅納產物的安全性有所質疑，在許多研究報告均指出梅納產物具有抗突變性與致癌性，但在 Yamaguchi (1986) 指出，將梅納產物在經過 ozonolysis 處理後，會去除原有的顏色與味道，可是產物原有的抗氧化力卻沒有改變，或許梅納產物經過這些處理後可以增加安全性，有利於在保健食品的應用。

五、参考文献

- [1] Ames, B.N. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*.35:1256-1264.
- [2] Ames, B.N. 1989. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.* 214:41-46.
- [3] Bran, A. M. 1975. Toxicology and Biochemistry of BHA and BHT. *JAOCS.* 52:372-375.
- [4] Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides Based on the antioxidative Peptide isolated from Digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 44:2619-2623.
- [5] Dave, O. B. and Giuseppe, M. 1996. Flavonoids and antioxidative activities in Buckwheat. *J. Agric. Food Chem.* 44:1746-1750.
- [6] Dziezak, J. D. 1986. Preservatives : antioxidant. *Food Technol.* 40:94-102.
- [7] Findley, J.D., Higinbottom, C., Smith, J.A.B. and Lea, C.H. 1946. The effect of preheating temperature on the bacterial count and storage life of whole milk powder spray-dried by the Krause process. *J. Dairy. Res.* 14:379-399.
- [8] Ho, C. T., Chen, Q., Shi, H., Zhang, K. Q. and Rosen, R. T. 1992. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Pre. Med.* 21:520-525.
- [9] Knorr, D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* 47:593.
- [10] Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food –a challenge for food research and development. *Food Technol.* 38:85.
- [11] Lerivrey, J., Dubois, B., Decock, P., Micera, G., Urbanska, J. and Kozlowski, H. 1986. Formation of D-glucosamine complexes with Cu(II), Ni(II) and Co(II) ions. *Inorg. Chim. Acta.* 125:187-190.
- [12] Lingnert, H. and Eriksson. 1981. Antioxidative effect of Maillard reaction products. *Prog. Food Nutri. Sci.* 5:453-466.
- [13] Matsugo, S., Mizuie, M., Matsugo, M., Ohwa, R., Kitano, H., and Konishi, T. 1998. Synthesis and antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Biochem. mol. biol. int.* 44:939-948.
- [14] Micera, G., Deiana, S., Dessi, A., Decock, P., Dubois, B. and Kozlowski, H. 1985. Copper(II) complexation by D-glucosamine Spectroscopic and potentiometric studies. *Inorg. Chim. Acta.* 107:45-48.
- [15] Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R. and Yoshikawa, S. 1983. Highly deacetylated chitosan and it properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 28:1909.
- [16] Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Iwami, K. 1966. Antioxidative action of indole compounds during the Antioxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo* 19:210-214.
- [17] Oyaizu, M. 1988. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shouhin Kogyo Gakkaishi* 35:771-775.
- [18] Robak, J. and Gryglewski, R. J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Bioch Pharm.* 37:837-841.
- [19] Scott, S. J. and Mohammed, A. 1995. Antioxidative activity of Maillard reaction products in cooked ground beef, sensory and TBA Values. *J. Food Sci.* 60:234-237.
- [20] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the Antioxidation of soybean Oil in cyclodextrinemulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40:945-948.
- [21] Stanley, W. L., Watters, G. G., Chan, B. and Mercer, J. M. 1975. Lactose and other enzymes bound to chitin with glutaraldehyde. *Biotech. Bioeng.* 17:315.
- [22] Toei, K. and Kohara, T. 1976. A

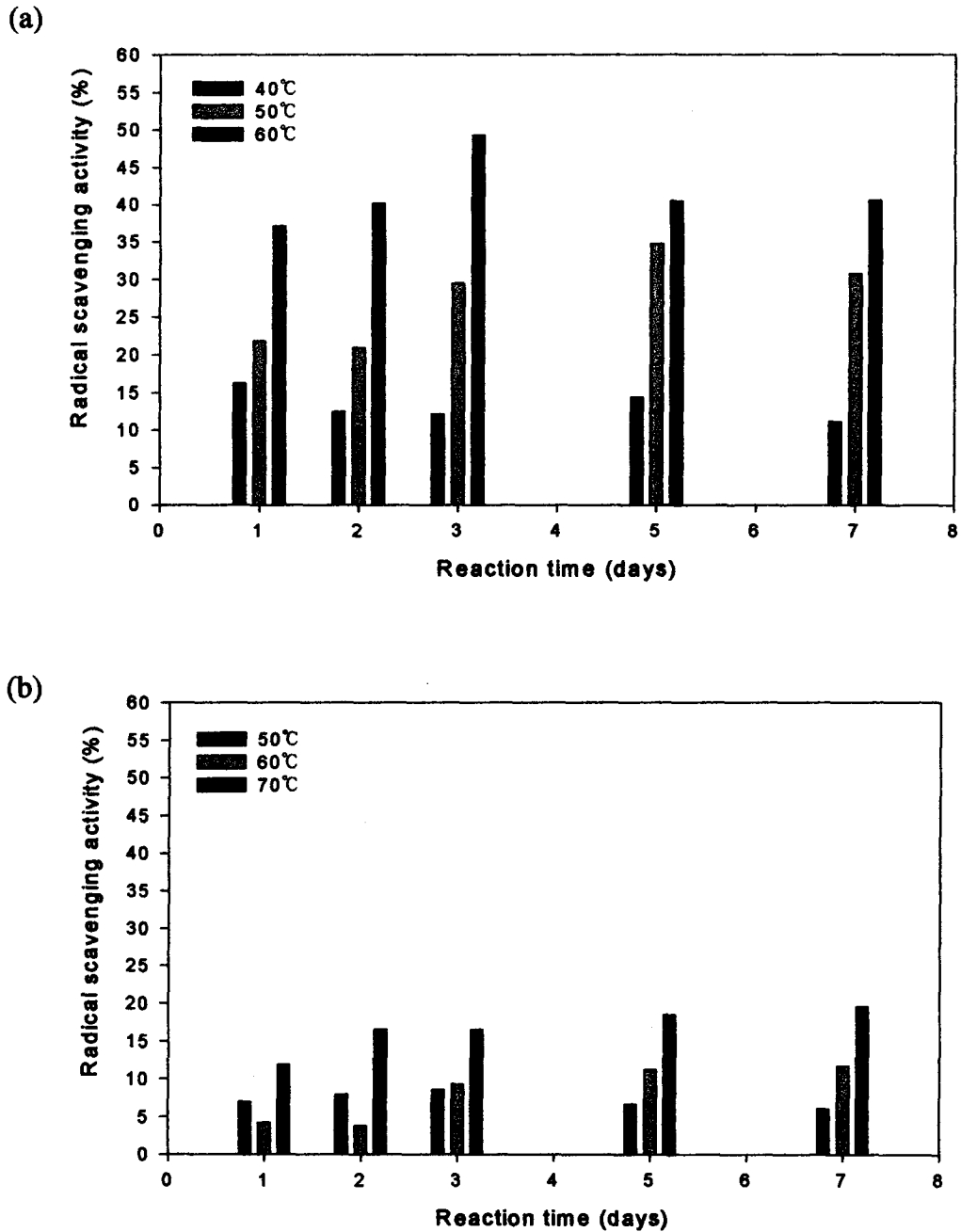
conductometric method for collid titrations.
Analytica Chimica. Acta. 83:59.

- [23] Yamaguchi, N. 1986. Antioxidative activities of oxidation products prepared from melanoidins. *Dev. Food Sci.* 13:291.
- [24] Yen, G. C., and Hsieh, P. P. 1995. Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products. *J. Sci. Food Agric.* 67:415-420.
- [25] 鄭映雪, 1999, 水溶性幾丁聚醣梅納反應產物之生物理化特性, 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- [26] 陳怡傑. 1998. 水溶性幾丁聚醣在水產養殖廢水處理之研究. 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- [27] 陳懿慧. 1995. 幾丁聚醣應用於葡萄柚汁澄清之探討. 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- [28] 吳蕙君. 1998. 魚貝類抽出物抗氧化性之探討. 國立台灣海洋大學水產食品科學系碩士論文。
- [29] 堀上之, 小原勝義. 1990. キトサンの食品への應用. *食品工業* 30:25.



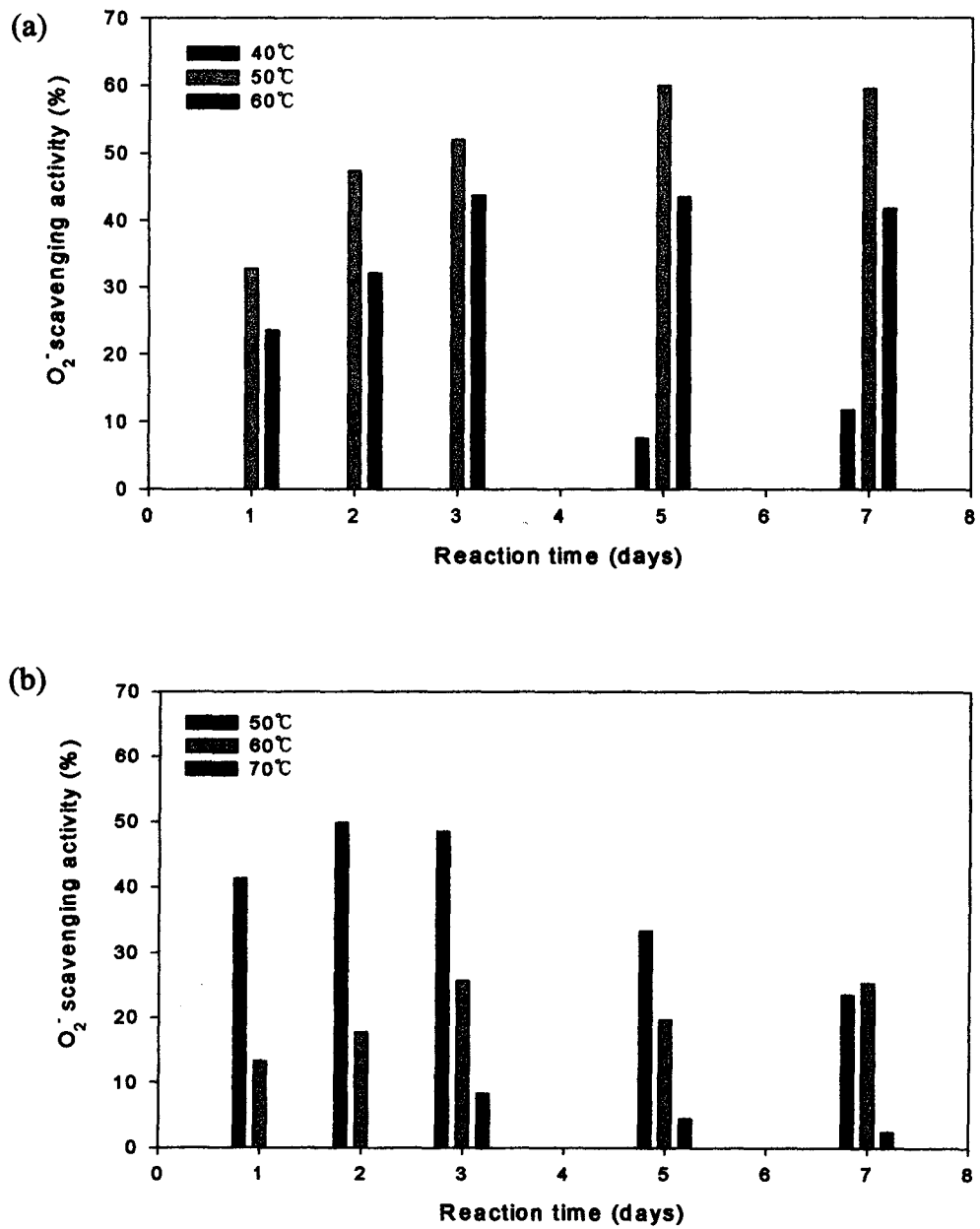
圖一、在不同溫度下，DD 80%幾丁聚糖-葡萄糖胺糖(a)或葡萄糖(b)梅納反應產物之波長 420 nm 吸光值。

Fig.1 Absorbance at 420 nm of the DD 80% chitosan-glucosamine(a) or glucose(b) Maillard reaction products obtained at different reaction temperatures.



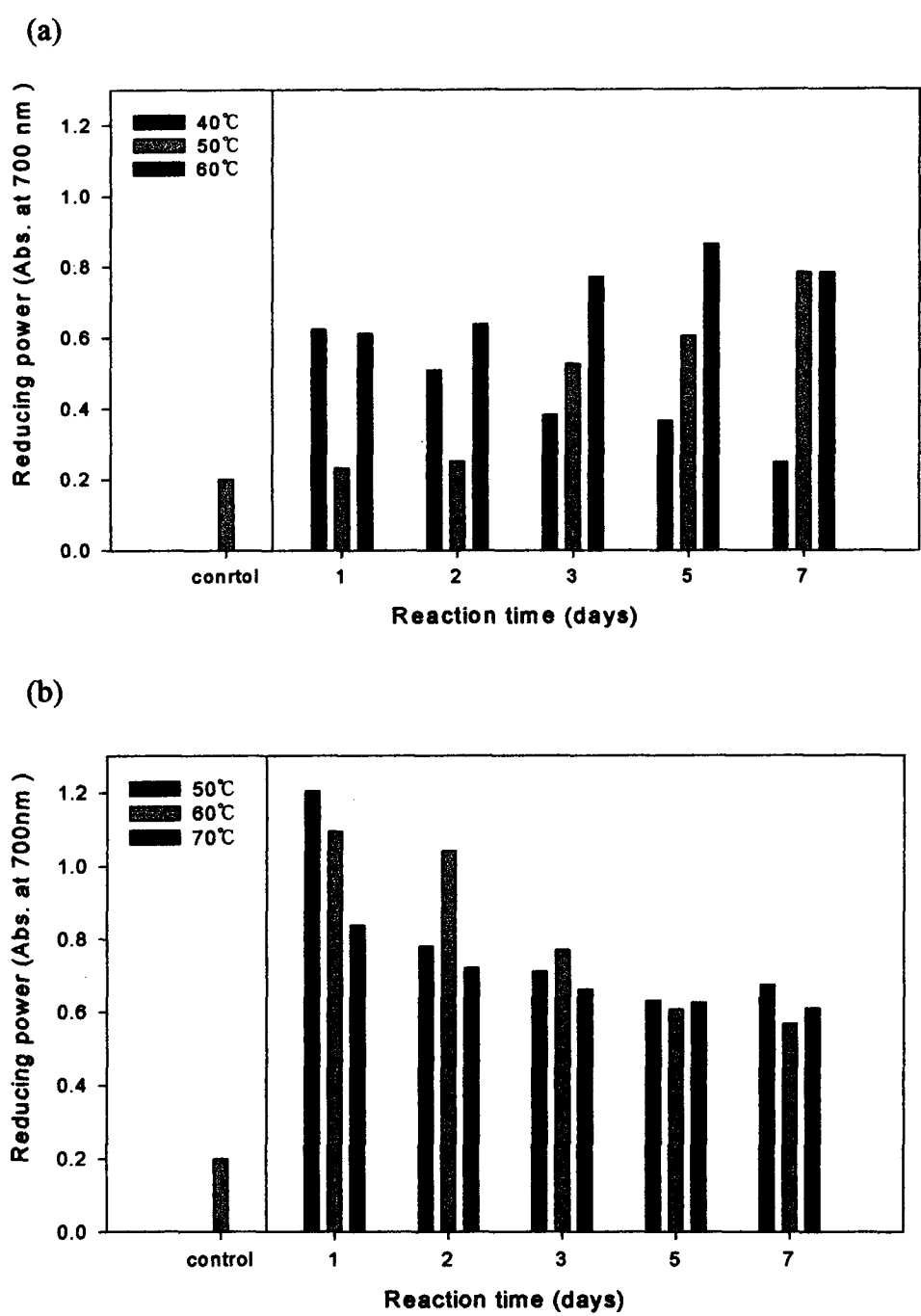
圖二、在不同溫度下，DD 80%幾丁聚糖-葡萄糖胺糖(a)或葡萄糖(b)梅納反應產物清除 DPPH 自由基能力 (%)。 (樣品濃度為 1%)

Fig.2 DPPH free radical scavenging activity (%) of the DD 80% chitosan-glucosamine(a) or glucose(b) Maillard reaction products obtained at different reaction temperatures. (sample concentration:1%)



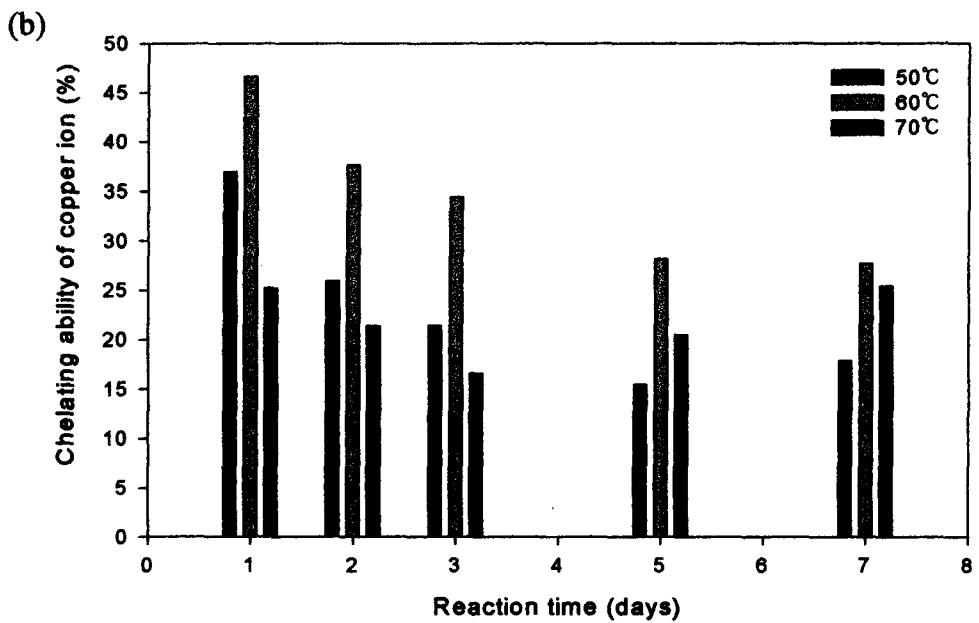
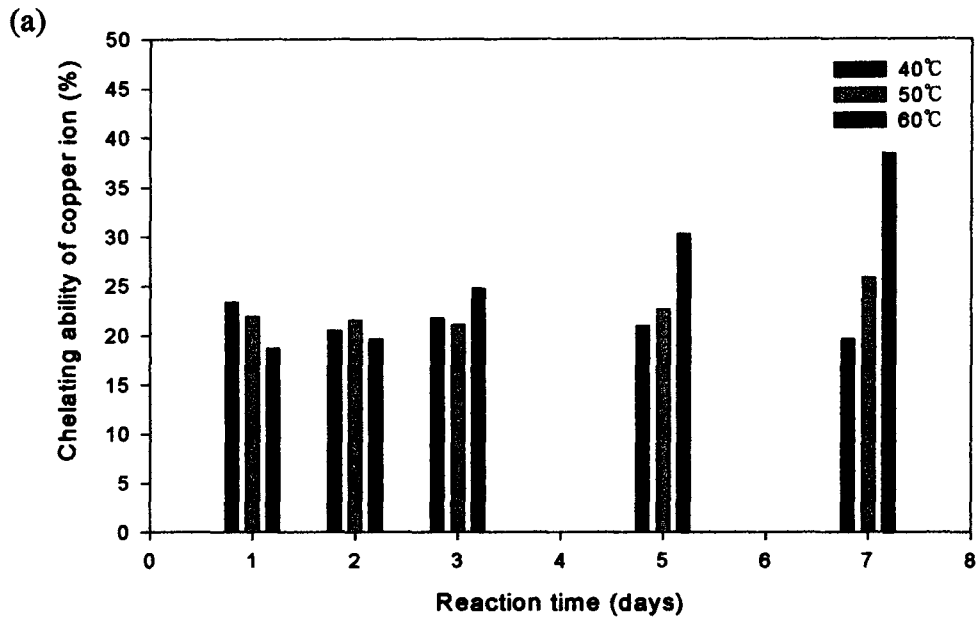
圖三、在不同溫度下，DD 80%幾丁聚糖-葡萄糖胺糖(a)或葡萄糖(b)梅納反應產物捕捉超氧陰離子能力 (%)。 (樣品濃度為 1%)

Fig. 3 The superoxide anion scavenging activity (%) of the DD 80% chitosan-glucosamine(a) or glucose(b) Maillard reaction products obtained at different reaction temperatures. (sample concentration:1%)



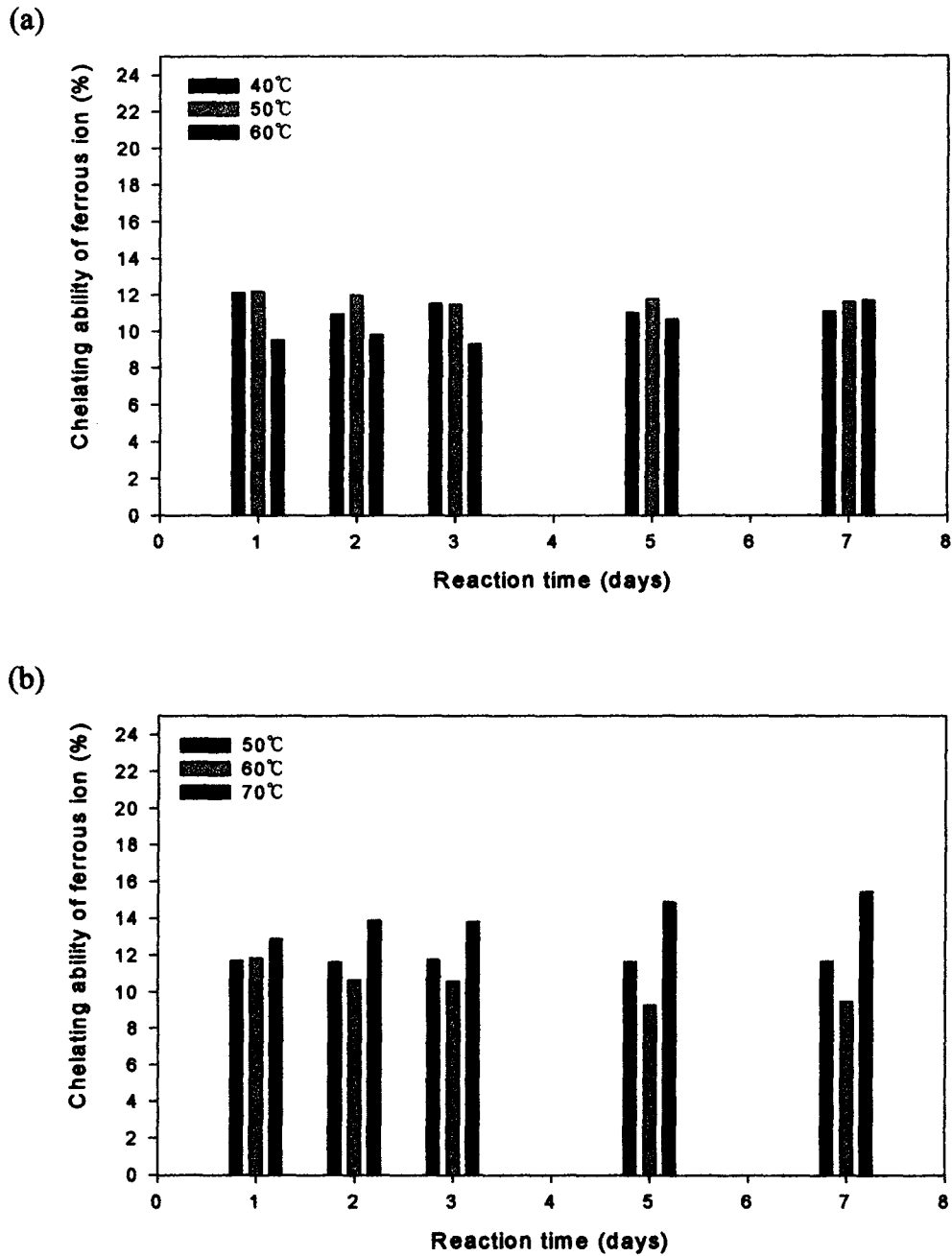
圖四、在不同溫度下，DD 80%幾丁聚糖-葡萄胺糖(a)或葡萄糖(b)梅納反應產物還原能力。(樣品濃度為 1%)

Fig.4 The reducing power of the DD 80% chitosan-glucosamine(a) or glucose(b) Maillard reaction products obtained at different reaction temperatures. (sample concentration:1%)



圖五、在不同溫度下，DD 80%幾丁聚糖-葡萄糖胺糖(a)或葡萄糖(b)梅納反應產物之銅離子螯合能力(%)。(樣品濃度為1%)

Fig.5 The Cu^{2+} chelating ability (%) of the DD 80% chitosan-glucosamine(a) or glucose(b) Maillard reaction products obtained at different reaction temperatures. (sample concentration: 1%)



圖六、在不同溫度下，DD 80%幾丁聚糖-葡萄糖胺糖(a)或葡萄糖(b)梅納反應產物之鐵離子螯合能力(%)。(樣品濃度為1%)

Fig.6 The Fe^{2+} chelating ability (%) of the DD 80% chitosan-glucosamine(a) or glucose(b) Maillard reaction products obtained at different reaction temperatures. (sample concentration: 1%)