

商業酵素處理對咖啡渣多酚化合物萃取和抗氧化活性 之影響

何素珍、彭凱群、蘇敏昇*

元培醫事科技大學食品科學系

摘要

酵素水解可增加植物萃取物中可萃取之多酚化合物(polyphenolics)單體和低聚合物，此外，酵素還可催化有效成分轉化成活性更強的型式。因此，應用酵素水解可提升植物萃取物之生物和抗氧化活性。多酚化合物具有生物及抗氧化活性已被發現且已被廣泛的運用於各類產品。咖啡渣為食品加工的廢棄物，其組成成分主要有多酚化合物、脂質和木質素。咖啡渣除了可用於生產生物能源外，也可運用其富含之多酚化合物開發出具有高經濟價值之產品。本研究探討商業酵素 Viscozyme® L 或酵素組合處理對咖啡渣萃取物的總多酚化合物含量和抗氧化活性之影響。結果顯示，以濃度為 5% viscozyme®L 酵素作用溫度、時間與 pH 值分別為 50°C、24 小時與 pH 4.5 處理可增加咖啡渣萃取物 3 倍的總多酚含量。抗氧化活性相關活性，清除 DPPH 自由基清除能力，抗氧化能力，亞鐵離子螯合能力，皆有提升，而對萃取液總類黃酮含量及清除一氧化氮能力，沒有明顯增加。

關鍵詞：咖啡渣、酵素、多酚化合物、抗氧化

*通訊作者：蘇敏昇 E-mail: mssu@mail.ypu.edu.tw

元培醫事科技大學食品科學系

新竹市元培街 306 號

Effect of commercial enzyme treatment on the phenolics and antioxidant activities of spent coffee grounds

Su-Chen Ho, Kai-Cyun Peng, Min-Sheng Su*

Department of Food Science, Yuanpei University of Medical Technology

ABSTRACT

The application of enzymatic hydrolysis could increase polyphenolic monomers and oligomers content of plant extracts. The bioactivities and antioxidant activities of the enzyme treated plant extracts could be increased because of more extractable polyphenolics content. In addition, enzyme could convert an active compound to a compound with stronger activity. Polyphenolics have been found that these compounds have bioactivities and antioxidant activities and have been applied to many products. Spent coffee ground is the waste of food processing. Spent coffee grounds contain polyphenolics, lipids, and lignocelluloses. In addition to biodiesel, polyphenolics of spent coffee ground could be used to develop value-added products. This project investigated the effect of the commercial enzyme viscozyme® L on the extractable phenolic content and antioxidant activities of spent coffee ground extracts. The results indicate that the treatment with 5% viscozyme® L (pH 4.5) at 50°C for 24 hours produced a three-fold increase in the extractable phenolic content of spent coffee ground extract. For antioxidant activities, the DPPH scavenging ability, FRAP, and Fe²⁺ chelating ability were all increased.

Keywords: spent coffee grounds; enzyme, polyphenol; antioxidant activity

壹、前言

超氧自由基 (Superoxide anion radical)、過氧化氫 (Hydrogen peroxide)、氧化氮 (Nitric oxide)、氫氧自由基 (Hydroxyl radical) 及其所衍生的氧化活性分子, 如: 脂質過氧化物 (Lipid peroxide) 以及單氧自由基 (Single oxygen radical) 等均屬活性氧 (Reactive oxygen species; ROS) (Cerutti, 1991), 目前已知在所有的好氧性生物體均會產生 ROS。人體需要一些自由基來維持生理機能, 例如能量的生成、化合物的合成、免疫系統的運作、以及細胞間的信息傳遞等 (Pietta, 2000)。但如果有過剩的自由基則會傷害到 DNA 甚至細胞和組織等而導致疾病產生 (Cerutti, 1994; Halliwell, 1997)。富含多酚 (polyphenolics) 之蔬果的抗氧化及抗菌活性已被許多研究人員所提出 (Cowan, 1999; Vinson et al., 1998; Velioglu et al., 2001)。其中一些水果如藍莓、小紅莓、紅葡萄、草莓、櫻桃、梅子和李子等具有相當強之抗氧化力。上述水果之抗氧化力大部分來自於其多酚。多酚是由一群化合物所組成, 這些化合物廣泛的存在於自然界中, 包括 simple phenols、phenolic acids、quinones、flavones、flavonoids 和 flavonols 等。不同植物其多酚之組成不同。組成多酚之化合物其抗氧化及抗菌活性亦有所不同, 這是因為結構的差異。多酚化合物由於有其特殊之化學結構, 此特殊之結構提供其抗氧化活性、清除自由基之能力及抗菌活性。其抗氧化活性與結構中之氫氧基團的數量及鍵結位置有明顯關聯 (Wang et al., 1997; Cowan, 1999; Fukumoto and Mazza, 2000; Burda and Oleszek, 2001)。

植物多酚化合物常以水、乙醇、甲醇等溶劑為萃取溶劑或是利用 CO₂ 超臨界提取、微波和超音波等技術進行萃取。水萃取的成本低, 但萃取率也低, 而用有機溶劑萃取的成本高。植物中多酚化合物多以配糖體或聚合物方式存在, 此外, 多酚化合物幾乎都被以纖維素為主體的細胞壁所包圍, 因此不易萃取。於先前研究發現藍莓汁及其發酵產品經萃取後仍有一大部分多酚化合物存留於萃取渣中, 此現象也有其他研究報告指出 (Munoz et al., 2004; Duenas et al., 2007)。Duenas 等人 (2007) 研究指出應用酵素水解可增加植物萃取物中多酚化合物單體和低聚合物, 其抗氧化活性亦有提升。另外, 酵素還可催化有效成分轉化成活性更強的类型。酵素處理可以提高有效成分萃取的產率, 降低萃取過程的時間和能量耗損, 因而能大大降低萃取成本, 而且由於酵素方法萃取可以在常溫和非有機溶劑存在下進行, 得到的產物純度, 穩定性和活性都能提高。酵素方法萃取無需投入昂貴的設備, 而且酵素可固定化而大大降低萃取成本。因此酵素處理在提取植物有效成分的應用將會越來越廣泛。

商業酵素 Novozyme 188 為黑麴菌 (*Aspergillus niger*) 所萃取出的酵素, 其主要成分為 β -葡萄糖苷酶, β -葡萄糖苷酶作用水解結合於末端非還原性的 β -D- 葡萄糖

苷鍵，同時釋放出 β -D-葡萄糖和相應的配糖體，因此 β -葡萄糖苷酶可協助釋放以配糖體型式結合於纖維素之多酚化合物。Viscozyme[®] L 是多種酵素的混合物，含有很強的果膠裂解酶和各種碳水化合物酶，包括阿拉伯聚糖酶、纖維素酶、 β -葡萄糖苷酶、半纖維素酶和木聚糖酶等。該酵素還對支鏈型果膠類似物（如在大豆細胞壁中發現的纖維素）具有活性。商業 Viscozyme[®] L 是用經選育的麴黴屬（*Aspergillus aculeatus*）菌株生產的，可以用在蔬菜和水果加工中，能在溫和的條件下提取植物中的有價值的成分，如：色素、花青素、鞣酸類、抗氧化劑、番茄紅素或胡蘿蔔素，能更好地保護組分的營養和完整性。由於 Viscozyme[®] L 中不含澱粉酶和脂肪酶，在萃取過程中，植物組織中的這些營養成分不會受到影響。咖啡渣為即溶咖啡、罐頭咖啡工廠和咖啡店之廢棄物，年產相當可觀之量，因咖啡渣含油脂及木質纖維素等，所以一般咖啡渣不是丟棄就是用作土地和煙灰缸的填料、飼料和吸附劑。目前關於咖啡渣的研究相當有限，僅有：萃取得物之生物活性分析(Ramalakshmi et al., 2009)、油脂抽取和利用發酵生產酵素及代謝產物(Sangeetha et al., 2004)等。然而咖啡渣仍富含多酚化合物，萃取後可應於保健食品的發開，具有可再利用的價值。本研究目的為探討使用酵素水解處理後對咖啡渣的可萃取多酚含量及抗氧化能力之影響。

貳、研究方法

一、咖啡渣

本實驗中所使用之廢咖啡渣為元培醫事科技大學Let's Chat Café 咖啡廳所提供，廢咖啡渣經由烘箱乾燥後置於-20℃下供後續實驗使用。

二、商業酵素

本實驗使用酵素為商業酵素Novozyme 188(≥ 250 units/g)和Viscozyme[®]L (≥ 100 FBGU/g)，購自Sigma。

三、酵素篩選

參照商業酵素廠商建議條件及本實驗室先前有使用酵素處理對芋仔甘藷的抗氧化活性測試之最適條件(酵素濃度設定為5% viscozyme[®] L，酵素作用溫度、時間與pH值分別為50 ℃ 24小時與pH4.5)。取咖啡渣(10%)加入緩衝溶液(acetic acid/sodium hydroxide, 0.1 N, pH 4.5)，均質後加入商業酵素Novozyme 188(N) 和 Viscozyme[®] L (V)組合，50 ℃作用24小時後將樣品乾燥，待後續分析總多酚化合物含量。

四、乾燥咖啡渣酵素作用

乾燥咖啡渣(10%)於50℃，pH4.5下，添加 5% Viscozyme® L 酵素進行水解，作用24 小時後將樣品乾燥後，再以三種不同溶劑(甲醇、乙醇和水)萃取。

五、萃取

(一) 水萃取

乾燥樣本粉末用3:1(v/w)的二次離子水於室溫下萃取30分鐘後在4 ℃離心(2500 xg) 15分鐘。重複上述操作二次後，將上述三次之萃取液用置於旋轉式真空乾燥機將溶劑移除。將所得之萃取物置於-25 ℃冷凍庫。此萃取物將用於總多酚化合物含量及抗氧化活性之測定。

(二) 甲醇萃取

乾燥樣本粉末用 3:1(v/w)80% 甲醇溶液於室溫下萃取30分鐘後在4 ℃離心(2500g) 15分鐘。重複上述操作二次後，將上述三次之萃取液以旋轉式真空乾燥機將溶劑移除。將所得之萃取物置於-25 ℃冷凍庫。此萃取物將用於總多酚化合物含量及抗氧化活性之測定。

(三) 乙醇萃取

乾燥樣本粉末用3:1(v/w)80% 乙醇溶液於室溫下萃取30分鐘後在4 ℃離心(2500g) 15分鐘。重複上述操作二次後，將上述三次之萃取液以旋轉式真空乾燥機將溶劑移除。將所得之萃取物置於-25 ℃冷凍庫。此萃取物將用於總多酚化合物含量及抗氧化活性之測定。

六、總多酚化合物含量測定

使用Folin-Ciocalteu方法測定總多酚化合物含量。0.5毫升萃取物甲醇溶液(1 mg/ml)加7 毫升蒸餾水及0.5毫升 Folin-Ciocalteu 試液混合均勻後靜置3分鐘，然後加入0.2毫升飽和碳酸鈉溶液並加蒸餾水定量至10 毫升，於室溫下靜置120分鐘，測量725 nm吸光值。使用沒食子酸(gallic acid)作為標準品製作標準曲線，gallic acid濃度分別稀釋成0.0625、0.125、0.25、0.5 mg/ml，以同樣試劑及溶液進行反應，測量725 nm 吸光值，並製作其標準曲線做為對照，結果以每克樣本含 gallic acid毫克當量(GAE)來表示(mg GAE/g)。

七、總類黃酮含量測定

取0.5ml 萃取物甲醇溶液與1.5ml 95%乙醇、0.1ml 10%氯化鋁、0.1ml 1M的醋酸鉀和2.8ml蒸餾水充分混合，室溫下反應40分鐘後以415nm 測吸光度。使用槲皮素(Quercetin)作為標準品製作標準曲線，槲皮素分別稀釋成不同濃度以同樣試劑及溶液反應，測量415nm 吸光度，並繪製標準曲線做為對照，結果以每克樣本含槲皮素毫克當量(QE)來表示(mg QE/g)。

八、抗氧化力之測定

(一) DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 自由基清除能力測定

參考 Shimada 等 (1992) 之分析方法經部分修正而成。在 5 毫升 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 甲醇溶液(0.025 g/l)中，加入 0.1 毫升樣本萃取物甲醇溶液(1mg/ml)或甲醇(對照組)，置於室溫下 30 分鐘後，測量 517nm 吸光值。溶液褪色程度表示樣本自由基清除之能力。DPPH 自由基清除能力(%)用下列計算式計算：

$$\text{DPPH 自由基清除能力(\%)} = 100 \times (1 - \frac{\text{樣本吸光值}}{\text{未加樣品之控制組吸光值}})$$

(二) FRAP 測定

Acetate buffer (pH 3.6), 10 mM 2,4,6-tripyridil-s-triazine 溶於 40mM HCl 和 20mM FeCl₃ 以 10:1:1 新鮮配成反應試劑 (Decker and Welch, 1990)。將此反應試劑 900ul 加入 10ul 樣品溶液和 10ul 蒸餾水混合均勻並反應 30 分鐘後，使用分光光度計測 593nm 之吸光值。

(三)清除nitric oxide 能力之測定

參考 Marcocci 等 (1994) 之方法。萃取物甲醇溶液(1mg/ml)加入 10mM Sodium nitroprusside 的磷酸鹽緩衝液中，於室溫下反應 2 小時後，加入 Griess reagent (1% sulfanilamide 溶於 5% H₃PO₄ 及 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride)，混合後以分光光度計測 550 nm 之吸光值。清除 nitric oxide 能力(%)用下列計算式計算：

$$\text{清除nitric oxide能力(\%)} = 100 \times (1 - \frac{\text{樣本吸光值}}{\text{未加樣品之控制組吸光值}})$$

(四)亞鐵離子螯合能力之測定

參考 Decker and Welch (1990) 的方法加以修改。取 5 mL 萃取液，加入 2mM FeCl₂ 溶液 0.1mL 及 5mM ferrozine 溶液 0.2mL，反應 10 分鐘，於 562 nm 測其吸光

值。 Fe^{2+} 與ferrozine 所形成之複合物於562 nm有強的吸收，吸光值越低，表示對鐵離子的螯合能力越強。

螯合能力(%)=100 x [1 -(樣本吸光值/未加樣品之控制組吸光值)]

參、結果與討論

一、酵素篩選

廢咖啡渣添加商業酵素Novozyme 188(N)和Viscozyme® L (V)水解後，分析其總多酚含量，結果顯示總多酚含量有顯著提升(圖一)。未添加酵素水解廢咖啡渣萃取液總多酚含量為 1.49 ± 0.11 mg GAE/g，有添加Novozyme 188(N)、Viscozyme® L(V)和N+V混合酵素總多酚含量分別為 2.43 ± 0.13 mg GAE/g、 4.51 ± 0.18 mg GAE/g和 2.24 ± 0.13 mg GAE/g。數據顯示經由酵素水解處理廢咖啡渣能提高其可萃取總多酚含量1.5至3倍，其中以Viscozyme® L(V)總多酚含量最高。

二、酵素處理對咖啡渣萃取液總多酚含量之影響

乾燥咖啡渣基質(10%)於酵素作用溫度與pH值(分別為50 與pH4.5)下添加5% Viscozyme® L酵素進行水解，作用24小時後將樣品乾燥、三種不同萃取方式(甲醇萃取、乙醇萃取和水萃取)，分析總多酚化合物含量。酵素條件水解作用後咖啡渣總多酚化合物含量如圖二，結果顯示經酵素水解後，再以三種溶劑萃取的總多酚化合物含量皆有提高。未經或經過酵素水解後水萃取物的總多酚含量分別是 5.05 ± 0.15 mg GAE/g和 6.19 ± 0.17 mg GAE/g，甲醇萃取物的總多酚含量分別是 1.68 ± 0.11 mg GAE/g和 4.33 ± 0.13 mg GAE/g，乙醇萃取物的總多酚含量分別是 2.08 ± 0.17 mg GAE/g和 3.04 ± 0.15 mg GAE/g。在水萃取方面總多酚含量顯著提高，從 5.05 ± 0.15 mg GAE/g上升至 6.19 ± 0.17 mg GAE/g，甲醇萃取的總多酚化合物含量顯著提高從 1.68 ± 0.11 mg GAE/g上升至 4.33 ± 0.13 mg GAE/g，提高1.5倍左右，乙醇萃取物總多酚化合物含量則從 2.08 ± 0.17 mg GAE/g上升至 3.04 ± 0.15 mg GAE/g。結果顯示添加Viscozyme® L 酵素可有效破壞咖啡渣之細胞壁及糖苷鍵使得細胞中或與大分子結合之多酚化合物釋出，因此添加具破壁作用之纖維素酶，如Viscozyme® L酵素，對促進咖啡渣中之多酚化合物水萃取相當有助益。

三、酵素處理對咖啡渣萃取液總類黃酮含量之影響

乾燥咖啡渣以上述酵素作用條件和萃取方法進行水解與萃取，分析總類黃酮含量。在酵素條件水解作用後咖啡渣總類黃酮含量如(圖三)。結果顯示經由酵素

水解作用後，總類黃酮含量在任何一種萃取方式都無明顯提高。未經或經過酵素水解後水萃取物的總類黃酮含量分別是 3.32 ± 0.13 mg QE/g和 3.80 ± 0.15 mg QE/g，甲醇萃取物的總類黃酮含量分別是 2.38 ± 0.11 mg QE/g和 2.71 ± 0.13 mg QE/g，乙醇萃取物的總多酚含量分別是 2.3 ± 0.12 mg QE/g和 2.61 ± 0.13 mg QE/g。此結果顯示廢咖啡渣在加工或一般民眾沖泡中可能已釋放出多數的類黃酮，而使用酵素水解作用無法提高廢咖啡渣的總類黃酮含量。對此結果，推測類黃酮類化合物在結合式多酚化合物中佔比可能不高，綜合總多酚化合物含量及不同溶劑萃取結果推論，咖啡渣所含的結合式多酚化合物應以極性偏高之化合物，如酚酸居多。

四、酵素處理對咖啡渣萃取液清除DPPH 自由基能力之影響

DPPH為一種較穩定的自由基，其甲醇溶液在波長517nm下具有強的吸光效果，但DPPH被抗氧化劑(AH)還原或與另外一個自由基結合時，會使吸光值消失或降低(Brand et al., 1995)，此法可在短時間內測試大量樣品，低濃度下能具極佳的靈敏性，藉由測定波長於517nm下的吸光值即可判定待測樣品是否提供氫原子，具有清除自由基能力。乾燥咖啡渣以上述酵素作用條件和萃取方法進行水解與萃取，分析清除DPPH 自由基能力。在酵素條件水解作用後，咖啡渣清除DPPH 自由基能力如圖四。結果顯示經酵素水解作用後甲醇萃取物的去除DPPH 自由基能力有明顯提高。未經或經過酵素水解後水萃取物清除DPPH 自由基能力分別是 $80.28 \pm 0.56\%$ 和 $84.07 \pm 0.54\%$ ，甲醇萃取物的清除DPPH 自由基能力分別是 $51.43 \pm 0.38\%$ 和 $84.63 \pm 0.42\%$ ，乙醇萃取物的清除DPPH 自由基能力分別是 $59.16 \pm 0.55\%$ 和 $64.45 \pm 0.58\%$ 。水萃取物和乙醇萃取物清除DPPH 自由基能力無明顯提升，甲醇萃取物有明顯提高，清除率從 $51.43 \pm 0.38\%$ 增加到 $84.63 \pm 0.54\%$ ，增加有1.65倍之多。

五、酵素處理對咖啡渣萃取液FRAP能力之影響

三價鐵還原能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)，是種可用來評估食品中抗氧化成分含量的方法，可依FRAP 值來評選抗氧化食物。水果的總抗氧化力與多酚、花青素等抗氧化成分含量呈正相關。在酸性環境下， Fe^{3+} 會因抗氧化物的作用而還原成 Fe^{2+} ，利用其與2,4,6-tripyridyl -s-triazine (TPTZ) 的呈色特性可在波長593nm下測得，反映出抗氧化物的還原能力。乾燥咖啡渣以上述酵素作用條件和萃取方法進行水解與萃取，分析其還原力(FRAP)。水解並乾燥後之咖啡渣萃取液之還原力(以硫酸亞鐵當量表示，值越高表示還原力越強)如圖五。未經或經過酵素水解後水萃取物的還原力(FRAP)分別是 123.55 ± 0.87 mmol/g和 154.03 ± 0.95 mmol/g，甲醇萃取物的還原力(FRAP)分別是 25.61 ± 0.26 mmol/g和 80.57 ± 0.42 mmol/g，乙醇萃取物的還原力(FRAP)分別是 30.43 ± 0.28 mmol/g和 82.32 ± 0.45 mmol/g。結果顯示經由酵素水解作用後，三種咖啡渣萃取液的還原力(FRAP)

皆有顯著提高，水萃取物、甲醇萃取物和乙醇萃取物還原力分別從 $123.55 \pm 0.87 \text{mmol/g}$ 提高到 $154.03 \pm 0.95 \text{mmol/g}$ 、 $25.61 \pm 0.26 \text{mmol/g}$ 提高到 $80.57 \pm 0.42 \text{mmol/g}$ 和 $30.43 \pm 0.28 \text{mmol/g}$ 提高到 $82.32 \pm 0.45 \text{mmol/g}$ 。此結果顯示酵素水解能釋放出具有還原力的成份。

六、酵素處理對咖啡渣萃取液清除一氧化氮(nitric oxide,NO)能力之影響

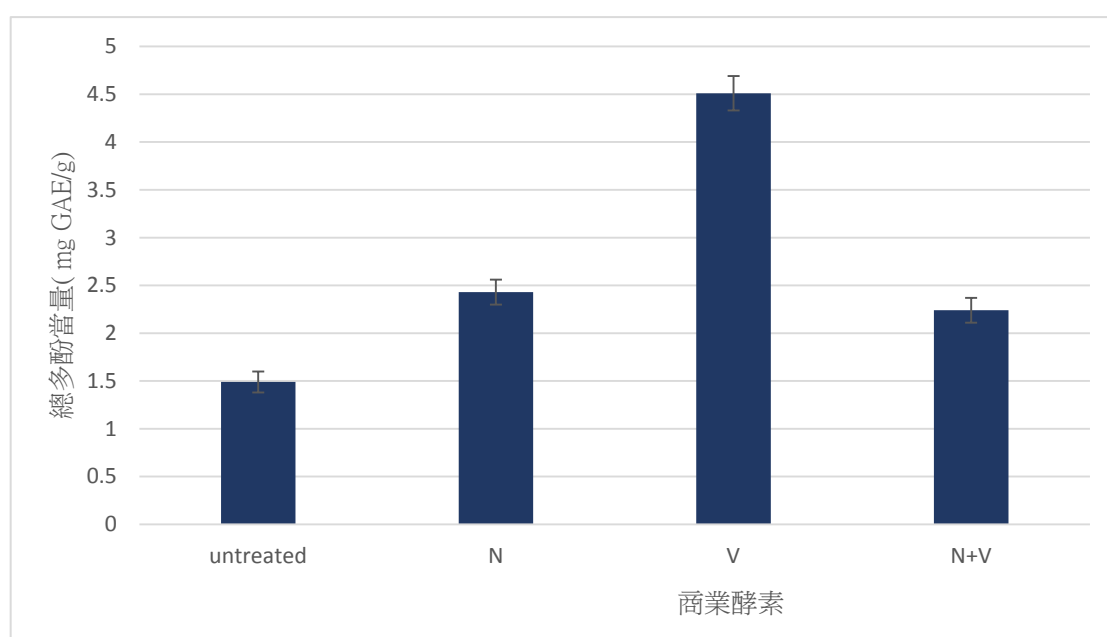
一氧化氮(NO)是一種滲透性的氣體，在生物體內是經由一氧化氮合成酶作用於精胺酸 (L-arginine)所產生。一氧化氮帶有不配對的電子，穩定性低，是種高活性的分子。在人體裡扮演了許多不同的角色，如與神經傳導及血管擴張有關。Griess在1879 年發表使用Griess試劑定量NO。當不穩定的NO產生時，很快的在組織中會氧化成穩定的產物-亞硝酸 (nitrite)，再利用Griess Reagent 進行呈色反應。乾燥咖啡渣以上述酵素作用條件和萃取方法進行水解與萃取，分析清除NO能力。水解並乾燥後之咖啡渣萃取液之清除NO能力(以百分清除率表示)結果如圖六所示。結果顯示經由酵素水解作用後咖啡渣清除NO能力在三種萃取液皆無顯著提升，未經或經過酵素水解後水萃取物的清除NO能力由 $9.41 \pm 0.09\%$ 增加至 $10.63 \pm 0.11\%$ ，甲醇萃取物由 $80.03 \pm 0.61\%$ 增加至 $81.3 \pm 0.59\%$ ，乙醇萃取物由 $24.31 \pm 0.14\%$ 增加至 $25.49 \pm 0.14\%$ 。此結果與總類黃酮類似，必須做進一步研究以釐清其原因。

七、酵素處理對咖啡渣萃取液亞鐵離子螯合能力之影響

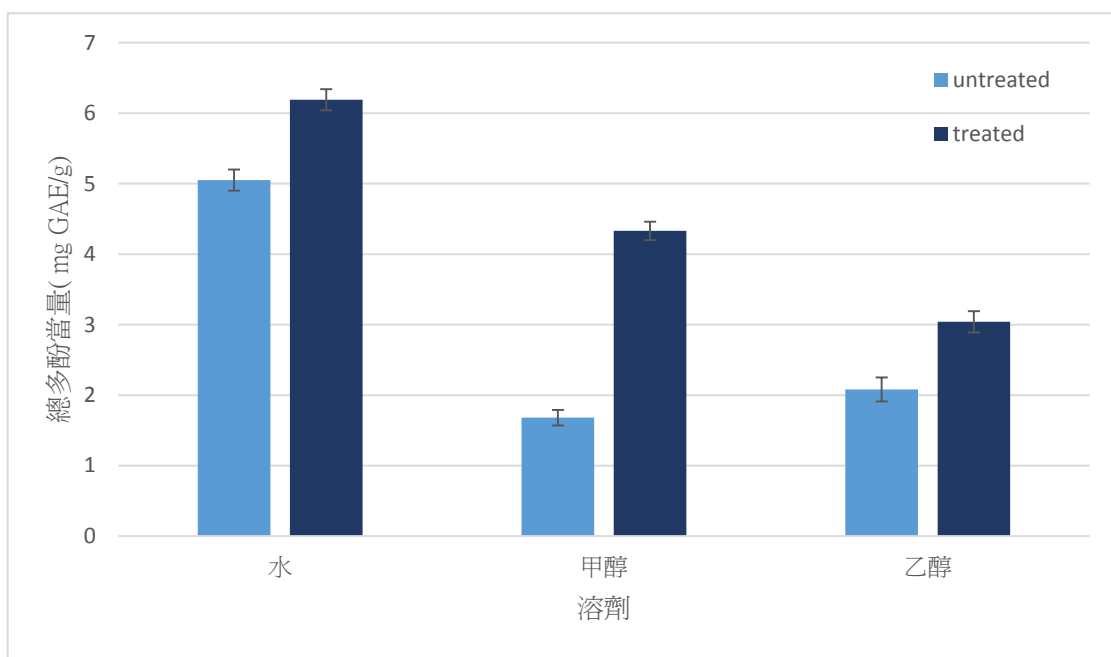
除了自由基之外，脂質氧化的起始反應也有可能經由金屬離子的催化而發生。金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要因素，藉由氧化還原的循環作用，少量的金屬離子便可有效的催化自由基的產生，加速脂質氧化的進行，因此具有螯合金屬離子能力之化合物，亦可避免金屬離子所誘導的脂質過氧化作用 (Yamaguchi et al., 1998)。乾燥咖啡渣以上述酵素作用條件和萃取方法進行水解與萃取，分析其亞鐵離子螯合能力(以百分螯合能力表示)。酵素水解作用後咖啡渣萃取液之亞鐵離子螯合能力結果如圖七所示。結果顯示，酵素處理對咖啡渣甲醇及乙醇萃取液的亞鐵離子螯合能力有提升。未經或經過酵素水解後水萃取物的螯合能力分別是 $10.72 \pm 0.09\%$ 和 $11.66 \pm 0.11\%$ ，甲醇萃取物的螯合能力分別是 $15.12 \pm 0.15\%$ 和 $37.78 \pm 0.22\%$ ，乙醇萃取物的螯合能力分別是 $47.95 \pm 0.21\%$ 和 $65.38 \pm 0.46\%$ 。數據顯示水萃取物的螯合能力無顯著的變化，在甲醇萃取物和乙醇萃取物的螯合能力由 $15.12 \pm 0.15\%$ 增加至 $37.78 \pm 0.22\%$ 和 $47.95 \pm 0.21\%$ 增加至 $65.38 \pm 0.46\%$ ，分別增加 2.5 和 1.36 倍。此結果顯示，酵素處理對咖啡渣之有機溶劑萃取的亞鐵離子螯合能力有提升。

肆、結論

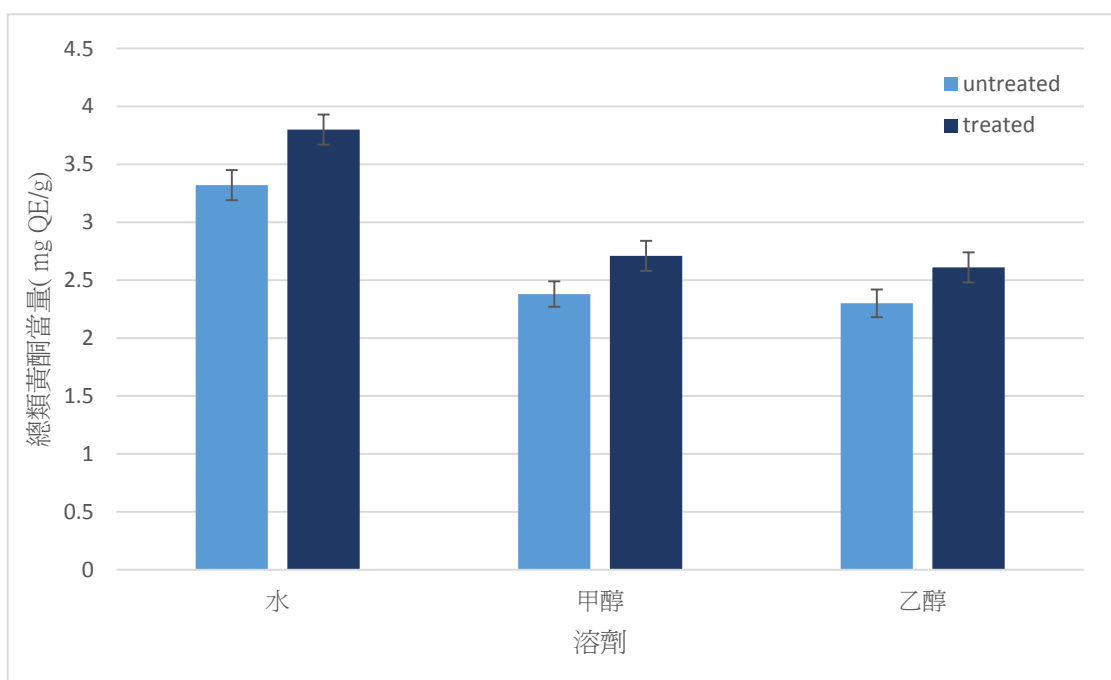
實驗結果顯示，在咖啡渣最適酵素水解試驗，酵素水解皆能提高萃取物的總多酚化合物含量。總多酚化合物含量分析結果顯示經酵素水解後萃取物(水萃取、甲醇萃取和乙醇萃取)的總多酚化合物含量皆有提高，在總類黃酮含量結果顯示經由酵素水解作用後任何一種萃取方式總類黃酮含量並無明顯提高。在抗氧化活性方面，去除DPPH自由基能力、還原力(FRAP)和亞鐵離子螯合能力皆有提升，而清除一氧化氮能力，沒有明顯增加。



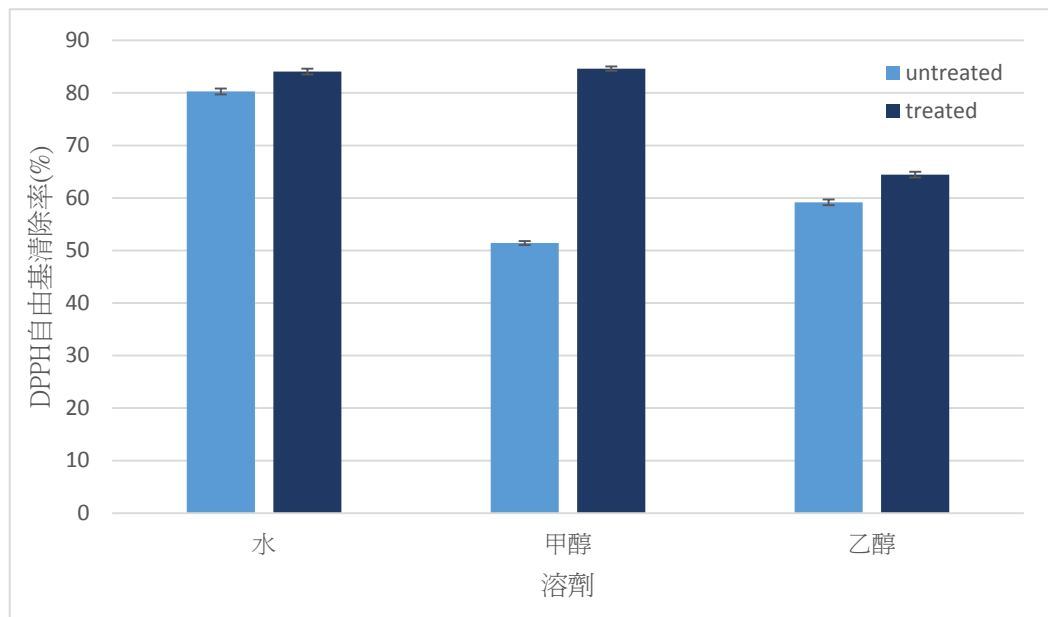
圖一、不同商業酵素處理對咖啡渣萃取液總多酚含量之影響



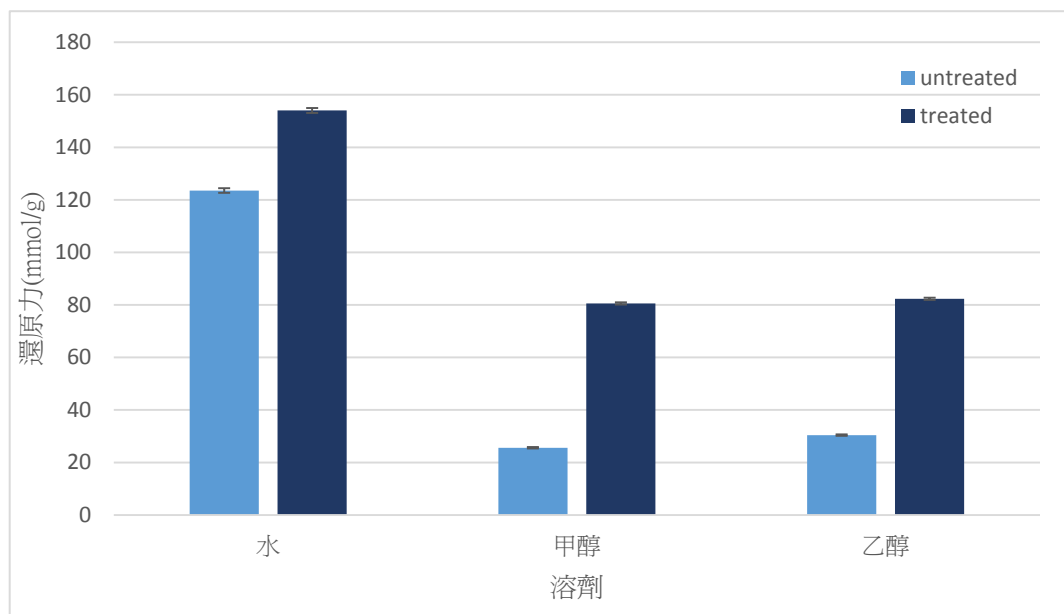
圖二、溶劑對商業酵素處理前後之咖啡渣萃取液總多酚含量之影響



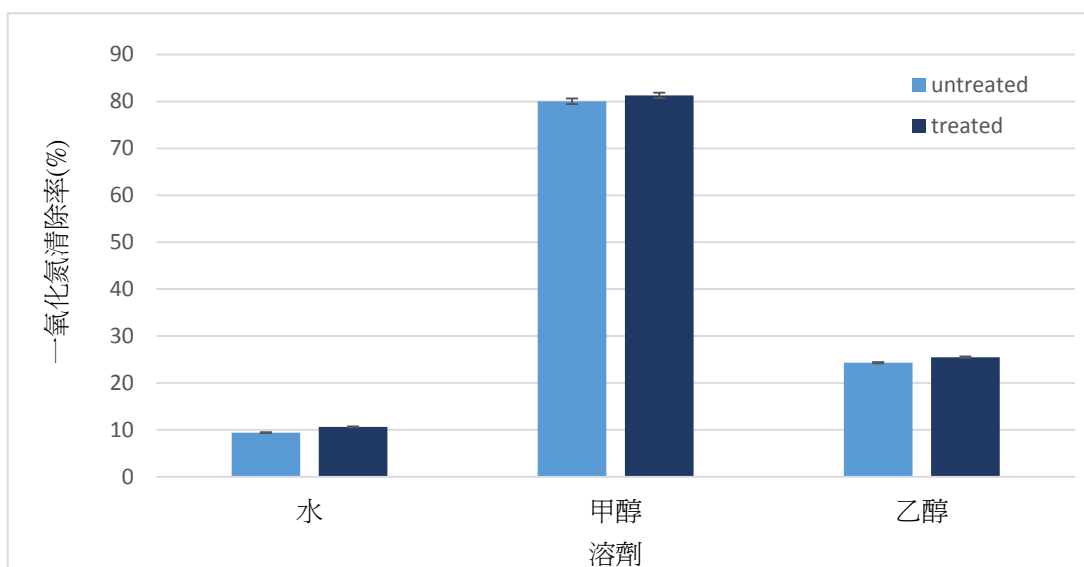
圖三、溶劑對商業酵素處理前後之咖啡渣萃取液總類黃酮含量



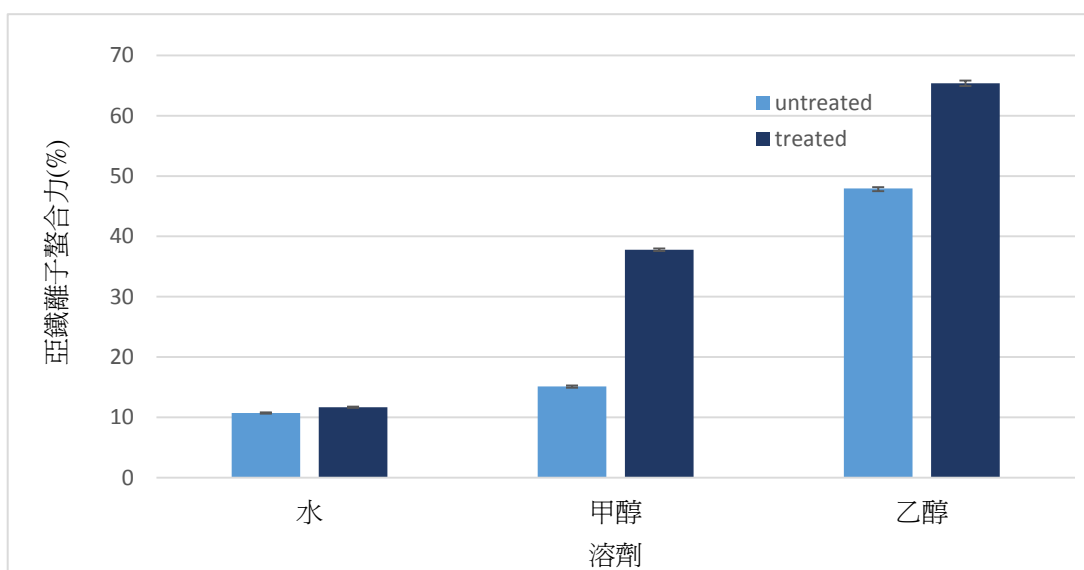
圖四、溶劑對商業酵素處理前後的咖啡渣萃取液清除DPPH自由基能力之影響



圖五、溶劑對商業酵素處理前後的咖啡渣萃取液還原力之影響



圖六、溶劑對商業酵素處理前後的咖啡渣萃取液清除一氧化氮能力之影響



圖七、溶劑對商業酵素處理前後的咖啡渣萃取液亞鐵離子螯合力之影響

參考文獻

Burda, S. and Oleszek, W. (2001), Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995), Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm-Wiss. U. Technol.*, 28, 25-30.

- Cerutti, P. A. (1994), Oxy-radicals and cancer, *The Lancet*, 344, 862-863.
- Cowan, M. M. (1999), Plant Products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-583.
- Decker, E.A. and Welch, B. (1990), Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 674-677.
- Duenas, M., Hernandez, T., and Estrella, I. (2007), Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by the action of exogenous enzymes effect on their antioxidant activity, *Food Chemistry*, 86, 90-97.
- Fukumoto, L. R. and Mazza, G. (2000), Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Griess, P. (1879), Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt, Ueber einige azoverbindungen, *Chem. Ber.* 12, 426-8.
- Halliwell, B. (1997), Antioxidants and human diseases: a general introduction, *Nutrition Reviews*, 55, 44-52.
- Marcocci L., Packer L., Droy Lefaix, M.T., Sekaki, A., Gardès-Albert M. (1994), Antioxidant action of Ginkgo biloba extracts EGb 761, *Methods Enzymol*, 234, 462-475.
- Munoz, O., Sepulveda, M. and Schwartz, M. (2004), Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from chilean wine, *Food Chemistry*, 87, 487-490.
- Pietta, P. (2000), Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.*, 63, 1035-1042.
- Ramalakshmi, K., Rao, L.J.M., Takano-Ishikawa, Y., Goto, M. (2009) Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems, *Food Chemistry*, 115, 79-85.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N. & Prapulla, S.G. (2004), Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products, *Appl Microbiol Biotechnol*, 65, 530-537.

Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T. (1992), Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 945–948.

Vinson, J. A., Hao, H., Su, X. and Zubik, L. (1998), Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3630-3634.

Wang, H., Cao, G. H. and Prior, R. L. (1997), Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 304-309.

Yamanaka N, Oha O, Nagao S. (1998), Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 405, 186-90.