

MC-Transaction on Biotechnology, 2023, Vol. 14, No. 1, e1

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

海洋深層水添加對水梨果皮之抗氧化性與生化分析研究

李卉筠、方 歆、江志明*

銘傳大學 健康科技學院 生物科技學系(中華民國 台灣 桃園市)

中文摘要

本研究使用 3 種海洋深層水 RO3 (含鈣)/300K (高鎂)/340K (高鎂鹽)，分別以 RO3 稀釋為 2000 倍，300K 稀釋為 540 倍和 340K 稀釋為 6180 倍為植物的最佳稀釋倍數來做實驗，而三種深層水稀釋成 3 種不同濃度，稀釋後的鹹度是相同的。從 TTC 細胞活性測定可看到，300K、340K 的活性強度維持較佳，而 DPPH 清除自由基能力分析，深層水的添加讓自由基減少，植物細胞不容易被破壞，因此添加深層水的植物細胞活性較對照組相對來的高，也減緩 MDA 的生成，使脂質過氧化程度降低。海洋深層水處理後可以讓水梨果皮細胞的組織活力上升，清除自由基的能力會提高。不論是添加 300K、340K 之海洋深層水，都能增加果皮的細胞活性。初步結果看來，海洋深層水處理水梨果皮後，可以讓非酵素型的抗氧化物質增加，提高清除自由基能力，讓果皮細胞的細胞膜受損能力降低，減緩老化的趨勢，組織活力較高可能增加蔬果保鮮能力。而 MDA 可得知細胞膜受損情形，由於並沒有測得抗氧化酵素的活性，只有測 DPPH (非酵素型)，故目前只能推測 MDA 可能有參與，以目前結果來看，海洋深層水確實能增加蔬果的保鮮。

關鍵字：水梨、海洋深層水、抗氧化物質、保鮮

通訊作者：江志明[cmchiang@mail.mcu.edu.tw]

收稿：2022-11-29 修改：2022-12-30 接受：2023-1-4 線上刊出：2023-1-15

前 言

梨為薔薇科(*Rosaceae*)梨亞屬(*Pomideae*)梨屬(*Pyrus*)多年生落葉果樹，梨屬有 30 多個種。水梨是僅次於蘋果和柑橘的第三大最常見的果樹，中國產梨佔世界梨總面積的 71.2%，為世界上最大的梨生產國(行政院農業委員會)。水梨果皮是果實加工成果肉期間的主要副產物之一，水梨的褐變病症受到收穫前因素(採摘日期、成熟度、果實大小和果袋的種類)和收穫後因素(冷卻時間、儲存溫度以及 CO₂ 和 O₂ 濃度)的影響^[1,2]。先前研究嘗試了許多不同的方法以降低水梨果皮褐變的發生，提高食用的質量。例如緩慢冷卻，冷調理。研究指出冷藏(緩慢冷卻)延遲了褐變

的開始，而卻不會改變褐變發生的速率^[3]。冷藏(0°C)之前在適當的溫度下(8–9°C)進行冷調理，會顯著抑制果皮和核心褐變，並減少在存儲和保質期內乙醇的積累^[4]。

「海洋深層水」(deep ocean water, DOW)是海平面 200 公尺以下海水，陽光無法穿透，具終年低溫、清澈乾淨、病原菌少等特性，並富含礦物質與營養鹽成分，水分子更小，適合人體吸收^[5, 6]。它通常具有以下特徵：A.終年穩定低溫。B.高純度和富含營養素。C.太陽輻射較低，細菌活動極少甚至沒有。D.植物性浮游生物的光合作用減少，隨著水深加深而降低營養物質的消耗和有機物分解，會使大量營養物質殘留。E.取之不盡用之不竭的再生性^[7]。DOW 中有眾多有益礦物質，包括鎂(Mg)，鈣(Ca)，鉀(K)，鉻(Cr)，硒(Se)，鋅(Zn)和鈦(V)，與其他水源相比 DOW 的礦物質含量較高^[8, 9]。許多研究已證明 DOW 對健康具有眾多潛在的益處。例如，增強酸奶的抗菌活性^[10]、增強浸泡在 DOW 中綠茶葉的抗氧化活性和兒茶素特性^[11]、DOW 與芝麻葉萃取物(SIE)的結合藉由內臟脂肪組織中的 AMPK 路徑活化來預防高脂飲食誘導的肥胖^[12]及抑制植物乙烯的生合成路徑^[13]。

於本研究中，嘗試以海洋深層水添加對於水梨果皮之抗氧化活性測定，添加不同濃度的 DOW，並觀察 DOW 添加對水梨果皮的清除自由基能力、脂質過氧化之影響，並分析深層海水於水梨果皮應用方面之潛力。

材料與方法

1. 水梨

本次研究使用市售台灣產的新興梨(*Pyrus pyrifolia* Nakai.)之鮮果皮並將新鮮水梨削皮，大小如圖一所示。新興梨為高接梨生產品種之一，海拔 1,500 公尺以上的山區，低溫期長，需低溫以滿足高品質溫帶梨開花結果^[14]，果皮呈青褐色，果形較大，一般較有菱、果點粗石細胞較多。冷藏可達數個月，是市面上最為普遍的高接梨品種。

第一天將新鮮水梨削皮均分成四組拍照記錄，再以三種稀釋後的海洋深層水(RO3、300K、340K)浸泡，對照組為無添加組，浸泡十分鐘後拍照記錄，並置於 4°C 冰箱保存，以模擬普遍家庭水果之保存方式。第一、二天分別取出進行梨皮氧化狀況觀察。

2. 海洋深層水

本實驗使用的海洋深層水(deep ocean water, DOW)購自於泓發樂活氏股份有限公司，成分包含鎂(Mg)，鈣(Ca)和鉀(K)等礦物質營養元素和超過 70 種和微量元素。研究使用 RO3、300K、340K 的 DOW，是從 250 至 1500 公尺 DOW 中所提取的礦物質營養物濃縮液。濃縮液之鹽份含量高，會造成植物細胞脫水，因此將 DOW 中的 RO3 鹽濃度作為基準，設為 1 倍，所以 300K 稀釋 0.27 倍，340K 稀釋 3.09

倍使三種海洋深層水達到相同的鹽濃度。進一步以此為依據測試適合植物生長的鹽濃度得到 RO3 稀釋 2000 倍，300K 為 2000×0.27 倍=540 倍，340K 為 2000×3.09 倍=6180 倍^[6, 13]。

3. TTC 活力測定

利用 TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 溶於水中呈無色之溶液，在種子組織中受活細胞中脫氫酵素還原作用形成 2,4,5-triphenyltetrazolium formazan (TTF)，呈穩定的紅色，因活組織細胞還原酵素的活性較強，還原酵素可使有機酸中氫離子與電子轉移，經還原後變為不溶於水的紅色 formazan 脂類，不會被空氣中的氧自動氧化；在死亡的組織細胞中，酵素活性缺乏而無法染色，因此組織細胞的呈色效果強弱，可用做判斷蔬果活力大小的標準，所以 TTC 被廣泛用做脫氫酶的測試^[15, 16]。依照《國際種子檢驗規章》TTC 染色合適濃度為 0.1%~1.0%，TTC 濃度越高，染色反應的速度較快，且染色結果保持時間較長，結果也越為明顯^[16]。本研究採用 TTC 濃度為 1.0%，因 TTC 溶液具感光性，故須避光，常溫放置 24 小時待其染色。取出樣本後以 ddH₂O 進行沖洗，刀片將其切碎，用 95% 乙醇萃取出紅色脂質，以 ELISA reader (U-2900, HITACHI) 偵測 OD485 nm 之吸光值^[6, 13]。

4. DPPH 清除自由基能力分析

脂質在自行氧化的過程中會產生自由基而造成脂質酸敗，由抗氧化劑與 DPPH 自由基的反應，可知抗氧化劑在清除 DPPH 時會提供氫給 DPPH 自由基，進而達到抑制氧化與鏈鎖反應之進行^[17]。當 DPPH 自由基被清除愈多時，其吸光值則會下降愈多，利用相對於空白對照組的吸光值減少百分比，可判斷各樣品清除 DPPH 自由基能力之強弱。秤取 0.1 克果皮，置於預冷的研鉢中，加入液態氮並研磨後，以 95% 乙醇 0.5 mL 萃取，吸取 100 μ L 萃取物，加入 0.16 mM DPPH 900 μ L，避光搖晃 30 分鐘，以 ELISA reader 偵測 OD517 nm 之吸光值。每個樣本重複 3 次試驗^[18]。

公式：清除率 = $[1 - (\text{樣本吸光值}) / (\text{Blank 吸光值})] \times 100$

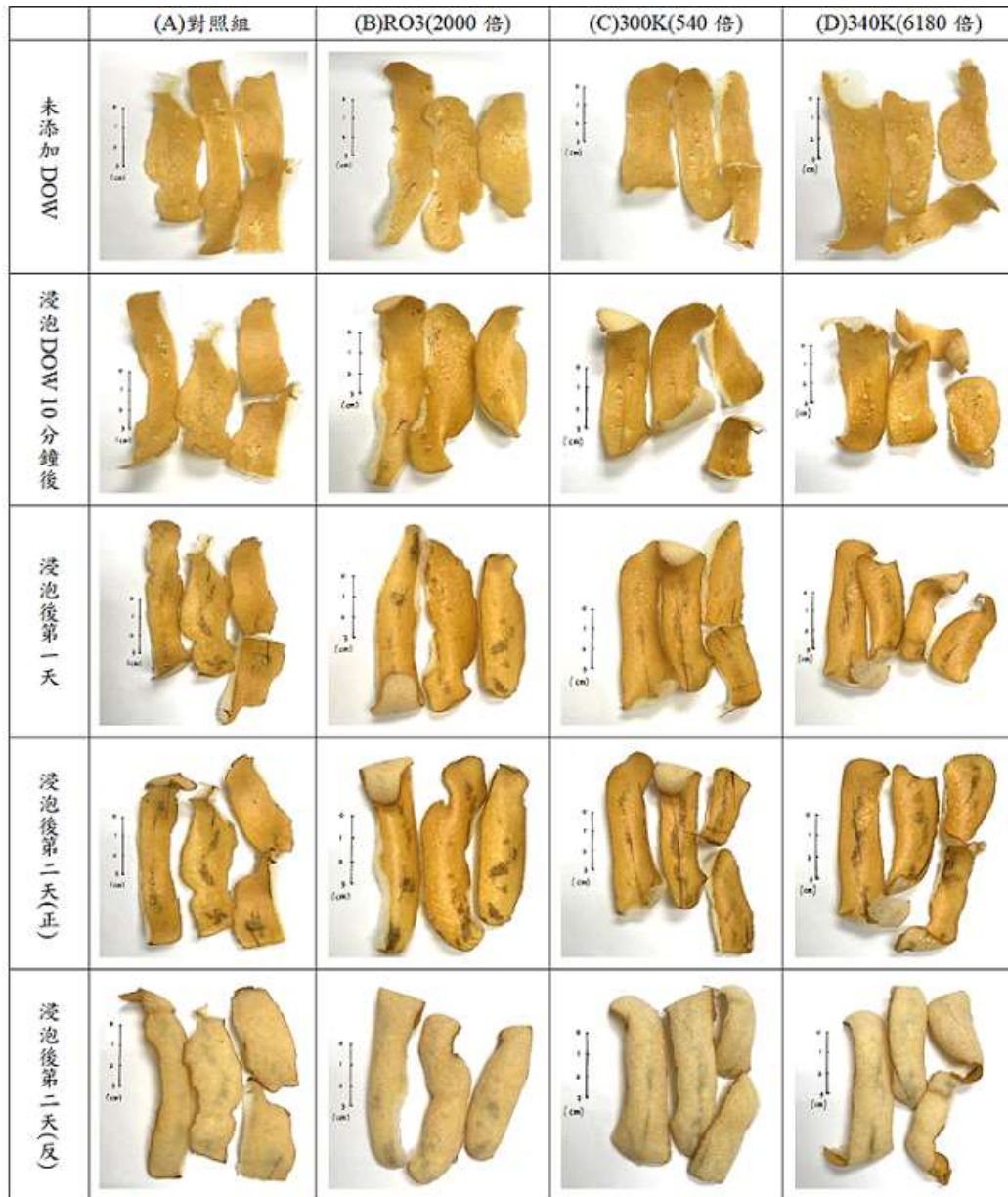
5. MDA 含量分析(脂質過氧化分析)

利用脂質過氧化(lipid peroxidation)時，會產生 MDA，而 MDA 會與 TBA(硫代巴比妥酸)反應產生 TBARS 的原理。測量組織中脂質氧化的多寡，可作為脂質過氧化的指標^[6]。秤取果皮重量，置於預冷的研鉢中加入液態氮研磨，加入 5% TCA (trichloroacetic acid) 1 mL 均勻混合，吸到 1.5 mL tube 以 6,000 rpm 5 分鐘離心，取 200 μ L 上清液至新的 1.5 mL tube 內，加入 800 μ L 的 thiobarbituric acid buffer (20% TCA, 0.5% TBA) 混勻後，置於 95°C 水浴槽使其反應 30 分鐘，移至冰浴 5 分鐘終止反應，以 ELISA reader 偵測 OD532 nm 和 OD600 nm 之吸光值^[6, 13]。

公式：MDA 含量 = $(\text{OD532} - \text{OD600}) / 155$ (消光係數, mM⁻¹ cm⁻¹) * 1 (反應體積, 1 mL) / 1 (m, 光徑) * 5 (稀釋倍數) * 1000 (nmol/ μ mol) / 樣本鮮重(g)

結果

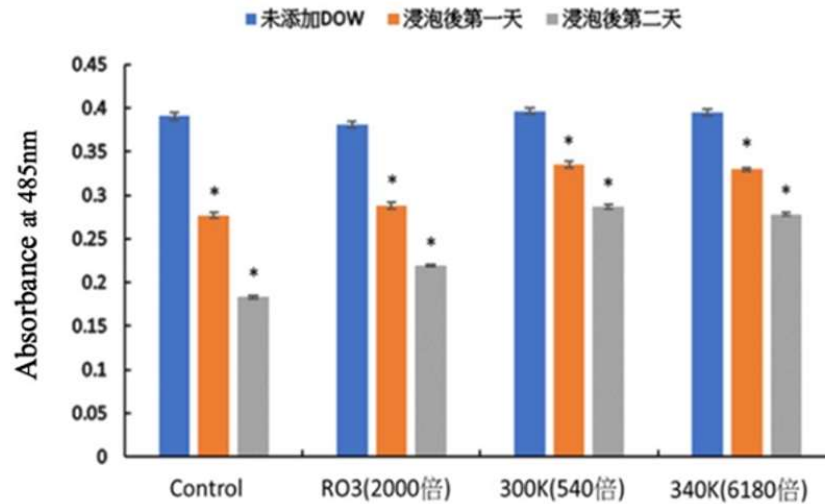
首先我們進行梨皮氧化狀況(褐化)觀察。發現在處理海洋深層水後二天，無添加的對照組果肉明顯比添加海洋深層水的褐化(圖一)。



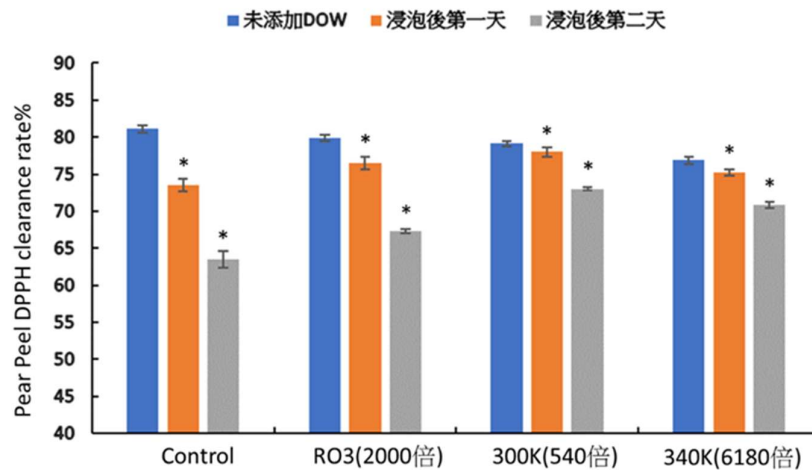
圖一、水梨果皮於室溫下浸泡稀釋後之海洋深層水外表型態觀察 (A) 對照組，未添加 DOW 液體之觀察；(B) RO3 (含鈣)，浸泡於稀釋 2000 倍 RO3 液體之觀察；(C) 300K (高鎂)，浸泡於稀釋 540 倍 300K 液體之觀察；(D) 340K (高鎂鹽)，浸泡於稀釋 6180 倍 340K 液體之觀察。

從圖二可看出水梨果皮的 TTC 活性測定結果，浸泡後第一天和未添加 DOW 的數據來看，添加 DOW 與對照組相比，活性強度維持較佳。浸泡後第二天和第一天

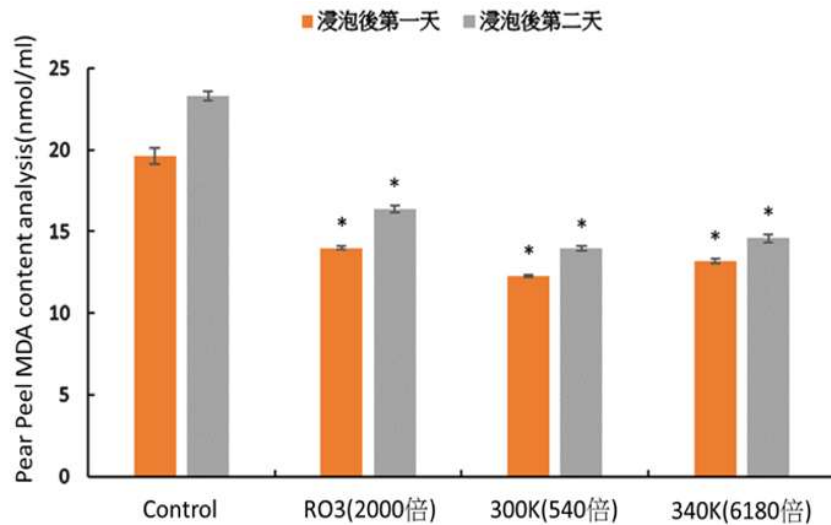
相比, RO3 細胞活性下降幅度較大(斜率較大), 300K、340K 的活性強度維持較佳。從圖三可知除了對照組外, 未添加 DOW 和添加後第一天相比皆提升清除自由基能力, 添加後第二天則可看出 300K、340K 深層水效果較顯著, 可以幫助水梨果皮增加清除自由基的能力。從圖四可知, 添加三種深層水對減緩 MDA 的生成, 均有顯著的幫助。所以從 TTC 細胞活性測定(圖二)來看, 因為添加深層水讓自由基減少(圖三), 植物細胞不容易被破壞, 因此添加深層水的植物細胞活性較對照組高, 也減緩 MDA 的生成(圖四), 使脂質過氧化程度降低。



圖二、利用 TTC 活性測定以浸泡 DOW 之市售新興梨的果皮分析 未添加 DOW (對照組)與浸泡 DOW 之水梨果皮, 放入含有 TTC 之溶液分別浸泡一天、兩天後取出分析紅色脂質含量。



圖三、利用 DPPH 清除自由基分析以浸泡 DOW 之市售新興梨的果皮分析 未添加 DOW (對照組)與浸泡 DOW 之水梨果皮做 DPPH 清除率測定。



圖四、利用脂質過氧化分析以浸泡 DOW 之市售新興梨的果皮分析 未添加 DOW (對照組)與浸泡 DOW 之水梨果皮做脂質過氧化分析。

討 論

此次的研究結果顯示，海洋深層水處理後可以讓水梨的組織活力上升，清除自由基的能力會提高。不管是添加 300K、340K 之海洋深層水，都可以增加果皮的細胞活性。本實驗與謝惟竣等人的結果類似^[17]類似，當添加深層水後使植物內生抗氧化酵素與抗氧化物質含量增加^[19]，提高清除對植物有害自由基的能力。而在 MDA 的部分可以看出有添加深層水樣本的脂質過氧化含量明顯降低。初步結果看來，海洋深層水處理水梨果皮後，可以讓非酵素型的抗氧化物質增加(DPPH 測出為非酵素型物質)，非酵素型物質增加，提高清除自由基能力，讓果皮細胞的細胞膜受損能力降低，減緩老化的趨勢，組織活力較高可能可增加蔬果保鮮能力。目前測的是非酵素型物質。MDA 可得知細胞膜受損情形，因為並沒有測抗氧化酵素的活性，只有測 DPPH(非酵素型)，故只能推測 MDA 可能有參與，未來可測酵素型的抗氧化測定等。以目前結果來看，海洋深層水確實能增加蔬果的保鮮。對於評估水果和蔬菜的營養價值中，抗氧化劑活性在其中扮演著重要的角色^[20]，抗氧化劑目前被認為對於預防廣泛的人類疾病(包括癌症和心血管疾病)有益^[21]。此外，水果抗氧化劑的增加也可以延長保質期，從而提高適銷性水果的整體質量。

參考文獻

- [1] Guan J, Ji H, Feng Y, Li L, Sun Y, Si J: The correlation of peel browning spot with phenolics metabolism in huangguan pears. *Acta Agric Boreali Sin* 2005, 20, 80-83.
- [2] Lammertyn J, Aerts, M, Verlinden BE, Schotsmans W, Nicolai BM: Logistic regression analysis of factors influencing core breakdown in 'Conference'

pears. *Postharvest Biol Technol* 2000, 20, 25-37.

[3] Ma Y, Yang M, Wang J, Jiang CZ, Wang Q: Application of Exogenous Ethylene Inhibits Postharvest Peel Browning of 'Huangguan' Pear. *Front Plant Sci* 2017, 7,2029.

[4] Wang J, Wang Q: Effect of cold conditioning on postharvest fruit quality of Huangguan pear. *Food Ferment Ind* 2011, 37,235-239.

[5] 段文宏、張繼中、李佩娟、陳芝融：Effects of Deep Sea Water on the Growth of Hydroponically Cultivated *Chrysanthemum coronarium*。台東大學綠色科學學刊 2013，3，001-009。

[6] 謝惟竣、陳奕伸、吳慧中、潘淑芬、林冠宏、江志明：海洋深層水對小白菜及蕃茄細胞活性和抗氧化能力的分析。MC-TB 2020, 11, e1。

[7] 周滙翔：海洋深層水定義？深層海水特性大解說！2018, <https://mhealthorg.com/what-deep-ocean-water-is/>.

[8] Katsuda SI, Yasukawa T, Nakagawa K: Deep-sea water improves cardiovascular hemodynamics in kurosawa and kusanagi-hypercholesterolemic (KHC) rabbits. *Biol Pharma Bull* 2008, 31,38-44.

[9] Hwang HS, Kim HA, Lee S H, Yun J W: Anti-obesity and antidiabetic effects of deep sea water on ob/ob mice. *Marine Biotechnol* 2009, 11,531-539.

[10] Kang S M, Jhoo J W, Pak J I, Kwon I K, Lee S K, Kim GY: Effect of yogurt containing deep sea water on health-related serum parameters and intestinal microbiota in mice. *J Dairy Sci* 2015, 98,5967-5973.

[11] Bae MS, Lee SC: Effect of deep sea water on the antioxidant activity and catechin content of green tea. *J Med Plants Res* 2010, 4,1662-1667.

[12] Yuan H, Chung S, Ma Q, Ye L, Piao G: Combination of deep sea water and *Sesamum indicum* leaf extract prevents high-fat diet-induced obesity through AMPK activation in visceral adipose tissue. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2016, 11,338-344.

[13] Lin KH, Huang MY,Xie WJ, PAN S F, Chen YS, Wu HC, Lin HH, Chiang C M: Influences of sea water on the ethylene-biosynthesis, senescence- associated gene expressions, and antioxidant characteristics of *Arabidopsis* plants. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2021, 49,12205.

[14] 徐信次、黃和炎：寄接梨之栽培管理。台南區農業改良場技術專刊 2000，89-8 (No.106)。30 頁。

[15] 關穎、吳泳標、林奕雲、張國霞、張勝卿：一種基於多種微生物的急性毒性測定方法。生態科學 2016，35，6-13。

[16] 曹蒙、繆恆鋒、趙明星、阮文權：脂肪酶強化水解餐廚油脂促進厭氧消化。食品與生物技術學報 2018，37，977-986。

[17] 謝惟竣：海洋深層水濃縮液測試蔬果保鮮的成效與原因探討。銘傳大學碩士論文 2018。

- [18] 沈馨仙、郭旻奇、張思平、鍾佳玲、楊榮季：抗氧化劑及常見之抗氧化活性評估方法。藥學雜誌 2010，26，132-137。
- [19] Cristina S, Zuzana K, Alberto P, Flavia NI, Riccardo I: Irrigation with Diluted Seawater Improves the Nutritional Value of Cherry Tomatoes. *J Agric Food Chem* 2008, 56, 3391-3397.
- [20] Rice-Evans CA, Miller J N, Paganga G: Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 1996, 20, 933-956.
- [21] La Vecchia C: Mediterranean epidemiological evidence on tomatoes and the prevention of digestive-tract cancers. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997, 218, 125-128.

Anti-Oxidation and Biochemical Analysis of Deep Ocean Water Adjunction to Pear Peel

Hui-Yun Li , Hsin Fang , Chih-Ming Chiang*

Department Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University,
(Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)

Abstract

In this study, three types of deep ocean water (DOW) RO3 (containing calcium) / 300K (high magnesium) / 340K (high magnesium salt) were diluted 2000 times with RO3, 540 times with 300K and 6180 times with 340K, respectively. Three types of DOW are diluted to three different concentrations, and the salinity after dilution is the same. From the TTC cell activity measurement that the activity maintenance of 300K and 340K is better. The analysis of DPPH free radical scavenging ability, the addition of DOW reduces free radicals. Therefore, the activity of plant cells added with DOW is relatively higher than the control group, and it reduces the generation of the production of MDA and reduces the degree of lipid peroxidation. DOW treatment can increase the tissue vitality of pear peel cells and increase the ability to scavenge free radicals. Whether it is adding 300K or 340K DOW, it can increase the cell activity of the peel. Preliminary results suggest that after deep ocean water treatment of the pear peel, non-enzyme-type antioxidants can be increased, the ability to scavenge free radicals can be reduced, the ability to damage the cell membrane of the peel cells can be reduced, and the tendency of aging can be retarded. Increase the fresh-keeping ability of fruits and vegetables. The activity of antioxidant enzymes has not measure, only DPPH (non-enzymatic) was measure. At present, it can only speculate that MDA may be involved. According to the current results, DOW can indeed increase the preservation of fruits and vegetables.

Keyword: peel, deep ocean water, antioxidants, preservation

Corresponding author: Chih-Ming Chiang [cmchiang@mail.mcu.edu.tw]

Received 29 Nov 2022/Revised 30 Dec 2022/Accepted 4 Jan 2023/Online published 15 Jan 2023

MC-Transaction on Biotechnology, 2023, Vol. 14, No. 1, e1

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.