

中華民國第 59 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

052206

「黑金」-醬油製程中廢棄黑豆汁之研究

學校名稱：臺中市私立明道高級中學

作者： 高二 游黼上	指導老師： 王姍佩 吳宣萱
---------------	---------------------

關鍵詞：黑豆汁、抗氧化、感官品評

摘要

本研究利用醬油製程中廢棄的黑豆汁以期達到循環經濟之效益。結果得知廢棄的黑豆汁清除 DPPH 自由基、清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力與還原能力皆隨濃度提高而明顯上升，且濃度 2mg/ml 之萃取物高達 83%與對照組維生素 C 88%相近，故具優良的抗氧化能力。再者黑豆汁萃取物對黴菌無抑制生長的能力，但具有縮小豬脂肪細胞體積與促進油脂釋出的作用。最後利用黑豆汁原液添加 20%黑糖製成飲品並進行感官品評，結果顯示 20 歲以下族群，甘甜味與香氣喜好度最高，整體感覺良好，可用於保健飲品開發。故醬油製程中的黑豆汁不是廢棄物，而是可以善用的「黑金」，不僅可改善因自由基或氧化物所造成之傷害，還能符合永續農業、廢物再利用的目的，具有市場發展的潛力。

壹、研究動機

醬油是由黑豆製成，然而大家享受著醇香的醬油時，背後其實有著不為人知的浪費。之前我們去醬油工廠參訪時，看見黑豆在蒸煮過程中，有許多廢棄的黑豆水，經詢問以後，才知道所謂的「廢水」不過是蒸煮時用的水，事實上食用應該是沒有問題的。最近紅豆水非常流行，豆類的一些中醫療效開始被重視，例如中外學者對黃豆的研究相當的徹底而廣泛；抑或是最近所謂「喝的保養品」正是紅豆水。然而對黑豆的研究相對較少。上網查了一查資料，了解到黑豆為豆科植物大豆（學名：Glycinemax (L.) merr）的黑色種子，而明代李時珍《本草綱目》就有記載，黑豆有治腎病、利水下氣、活血、解毒的功能，黑豆自古被中國人認為因長得像腎，能夠滋養腎臟。黑豆補腎益陰、健脾利濕和除熱解毒的傳統療效。此外，研究表示黑豆含有豐富的異黃酮類、皂苷、花青素及維生素等可預防動脈血管硬化、抗肥胖(antiobesity)、抗老防衰等科學的醫療研究。而其衍生物「黑豆水」在醬油工廠一桶一桶的被當成廢棄物倒掉，假使黑豆水有與黑豆一樣的功能，那豈不是極大的浪費？另外深褐色的黑豆水排放到河川也有可能造成一些環境的污染。因此，想透過檢測黑豆水抗氧化

能力、抗菌能力以及抗發炎能力，來確認其療效，並了解其是否有重複利用的價值，將資源浪費降到最低，證明黑豆水有著不亞於紅豆水的療效，達成最大循環經濟效益並期待永續農業的發展。

化學課第三章化合物，老師在教如何畫路易士電子點式時，提到了自由基，自由基就是帶有不成對電子的粒子，與造成細胞病變甚至癌症有著許多的關聯。又在生物免疫學課程學到有些想法認為，長期連續的發炎，亦可能造成癌細胞的增生。研究這類天然產品的抗發炎療效也是極具意義的。若檢測過後廢棄的黑豆汁的確具有良好的健康價值，那希望推廣其產品化、大眾化。為達到此目的，我利用感官品評的方法對 20 歲以下同班同學施測，以調查黑豆汁配方的接受度以及喜好程度，分成六大面向(色澤、香氣、酸味、苦味、澀味、口感)進行喜好度調查，以利商品化，並達成循環經濟、廢物利用之最終目的。

貳、研究目的

本研究主要利用醬油工廠製作醬油過程中所產生廢棄的黑豆汁，進行以下實驗：

- 一、利用 DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)清除自由基的分析方法檢測黑豆汁萃取物的氧化能力
- 二、利用 ABTS⁺ (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力
- 三、利用還原力 (Reducing power)的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力
- 四、檢測黑豆汁萃取物對青黴菌和黑黴菌的抑菌能力
- 五、觀察黑豆汁萃取物對豬脂肪細胞的影響
- 六、黑豆汁飲品開發與感官品評

參、研究設備及器材





一、實驗樣本：

黑豆汁(由「○○醬油工廠」取得)

製作醬油的第一步驟必須把整粒黑豆進行蒸煮，蒸煮後會有大量的黑豆水廢棄倒掉。我們將利用此廢棄之黑豆水為樣品進行實驗。

二、研究設備

(一) 垂直式無菌操作台	(二) 減壓濃縮設備及真空幫浦
 <p data-bbox="300 1182 673 1258">圖 1-1、垂直式無菌操作台 (LS JW-5N)</p>	 <p data-bbox="890 1285 1198 1317">圖 1-2、減壓濃縮設備</p>
(三)ELISA Reader	(四) 桌上型高速離心機
 <p data-bbox="300 1935 708 1966">圖 1-3、ELISA (BioTek-Epoch)</p>	 <p data-bbox="836 1935 1410 1966">圖 1-4、高速離心機 (HERMLE/德 Z233MK2)</p>

(五) 冷凍乾燥機	(六) 恆溫培養箱
 <p data-bbox="300 616 576 651">圖 1-5、冷凍乾燥機</p>	 <p data-bbox="890 607 1289 642">圖 1-6、恆溫培養箱 (L-100)</p>
(七)複式顯微鏡	(八)振盪器(Vortex)
 <p data-bbox="300 1115 740 1151">圖 1-7、複式顯微鏡(OLYMPUS)</p>	 <p data-bbox="916 1126 1209 1162">圖 1-8、振盪器(LMS)</p>
(七) 其它器材	
<p data-bbox="236 1272 1431 1451">96 孔盤、培養皿、血清瓶、微量吸管、煤氣燈、Eppendorf、培養皿轉盤、錐形瓶、高壓滅菌釜、Rack、製冰機、乾浴器、水浴鍋、電子秤、量筒、秤量紙、牙籤、滅菌釜、冰箱 (- 20℃)、試管、離心管、針筒及小飛碟、載玻片、蓋玻片、蘇丹三號。</p>	

圖一、研究設備

三、實驗藥品與耗材

(一)DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)清除自由基的分析實驗

表一 DPPH 清除自由基分析實驗之藥品

實驗藥品、溶劑配置	容量
1. 1 mg/mL Vit C 溶液	1 mg/mL

(1) Ascorbic acid (5.7 mM) (sigma A7506-100G)	1 mg
(2) Methanol (MeOH)(AENCORE,ME0606-000000-72AE)	1 mL
2. 250 μ M DPPH 溶液	
(1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich D9132-1G)	0.00246 g
(2) 95 度優質酒精 (Alcohol)	25 mL

(二)ABTS⁺ (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)的分析實驗

表二 ABTS⁺分析實驗之藥品

實驗藥品、溶劑配置	容量
1. ABTS⁺ 溶液	21 mL
(1) 2.0 mM (ABTS) (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (SIGMA, A1888)	0.023 g/21 mL
(2) PBS (pH 7.4)	1 L
A. NaCl (Sodium chloride) (140 mM) (J.T.Baker, 3624-19)	8.18 g/L
B. KH ₂ PO ₄ (Potassium dihydrogen phosphate) (2 mM) (J.T.Baker, 7778-77-0)	0.27 g/L
C. Na ₂ HPO ₄ (Sodium phosphate dibase) (10 mM) (SHOWA, 1932-5250)	1.42 g/L
D. KCl (Potassium chloride) (2 mM) (Riedel-deHaën, 31248)	0.15 g/L
E. RO 水	1L
(3) 70 mM K ₂ S ₂ O ₈ 溶液	5 mL
A. K ₂ S ₂ O ₈ (Potassium peroxydisulfate) (SIGMA, 60489)	0.095 g/5 mL
B. RO 水	5 mL
2. Trolox 標準品溶液	1 mL
(1) Trolox 標準品溶液(32 mM) (SIGMA, 238813-5G) (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)	8 mg/mL
(2)Methanol (MeOH) (AENCORE,ME0606-000000-72AE)	1 mL

(三)還原力(Reducing power)分析實驗

表三 還原力分析實驗之藥品

實驗藥品、溶劑配置	容量
1. 1% 赤血鹽 (Potassium ferricyanide) 溶液	
(1) 赤血鹽 (Potassium ferricyanide) (K ₃ Fe(CN) ₆) (SHOWA)	0.5 g
(2) RO 水	49.5 mL

2. 10% 三氯醋酸 (Trichloroacetic acid)	
(1) 三氯醋酸 (TCA) (Trichloroacetic acid)	5 g
(2) RO 水	45 mL
3. 0.1% FeCl ₃ 溶液	
(1) 氯化鐵 (FeCl ₃) (Iron (II) chloride hexahydrate) (SIGMA - 236489)	0.01 g
(2) RO 水	9.99 mL
4. PBS	1 L
(1) Na ₂ HPO ₄ (Sodium phosphate dibase) (SHOWA ,1932-5250) (Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O) (SIGMA , S9390)	1.276 g/L (2.41 g/L)
(2) NaCl (Sodium chloride) (J.T.Baker , 3624-19)	8.2 g/L
(3) NaH ₂ PO ₄ (Sodium phosphate monobasic) (SIGMA, A0751) (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O) (Fluka ,71507) (NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O) (SIGMA ,71643)	0.11998 g/L (0.138 g/L) (0.156 g/L)
(4) RO 水	1 L
5. 1 mg/mL Vit C 溶液	1 mL
(1) Ascorbic acid (SIGMA , A7506-100G)	1 mg/mL
(2) Methanol (MeOH) (AENCORE , ME0606-000000-72AE)	1 mL

(四)抗菌試驗：

1.菌株

(1) 黑麴菌(*Aspergillus niger* ; BCRC31883)、青黴菌(*Penicillium digitatum* ; BCRC30820)

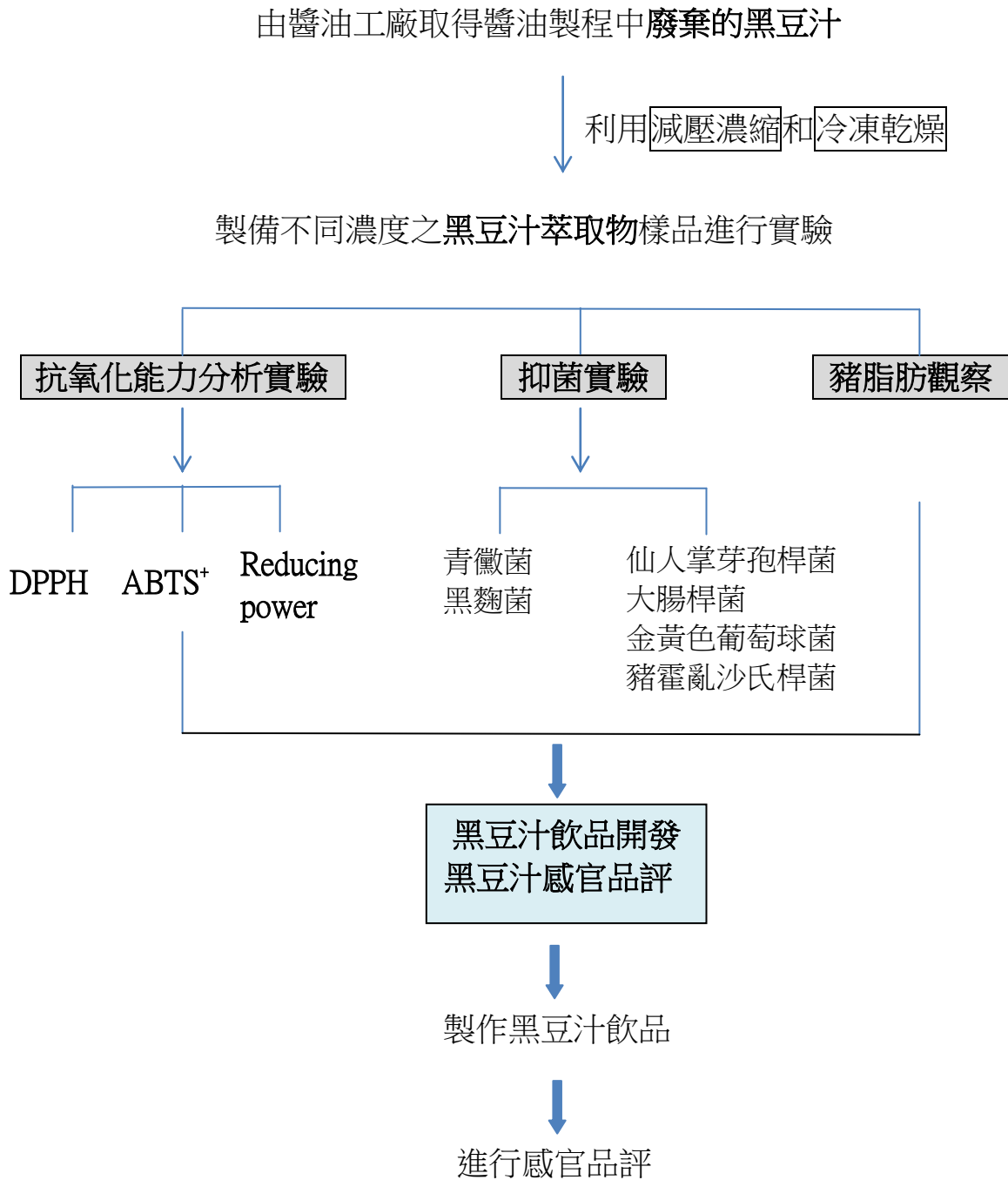
2.配製 PDA

表四 PDA 培養基之藥品

抗菌實驗	實驗藥品
(1) PDA 培養基(Potato Dextrose Agar)	馬鈴薯萃取物(potatp infusion) 20%
馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基	葡萄糖(glucose) 2%
	瓊脂(agar) 2%

肆、研究過程或方法

本研究採用的方法以流程圖方式顯示於圖二，並敘述如下：



圖二 醬油製程中廢棄黑豆汁之研究流程

一、利用 DPPH 清除自由基的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力

(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method)

(一)利用冷凍乾燥和減壓濃縮製備固體黑豆汁萃取物

- 1.減壓濃縮是利用減壓(真空)將溶液的沸點降低(例如：水，將其沸點自攝氏 100 度降至攝氏約 60 度)將溶液加熱到該沸點時，溶劑氣化後經由冷凝器收集，溶質比例提高、原來溶液中的溶劑量降低達到濃縮的目的。一般的減壓濃縮器材都會將置放原料的玻璃瓶旋轉，使溶液於瓶壁形成薄膜，讓溶劑更完整的汽化以取得更高濃度的原料。
- 2.冷凍乾燥是一個利用冷凍方式乾燥實驗原料的方法，又稱為「昇華乾燥」，常用來保存易腐壞的原料。冷凍真空乾燥的原理是利用樣品中的水分在高真空、低溫度的環境中，可以由固態的冰昇華成氣態的水蒸氣，再使水蒸氣冷凝成液態水而排除，藉以使水分脫離原料。冷凍真空乾燥過程中的熱量與質量的傳送，與材料本身熱傳導率、比熱、密度、凍結溫度等物性參數，以及凍結方式、凍結溫度、加熱方式、真空度等參數有關。針對不同的目標，必須有不同的設定。
- 3.本實驗所使用之黑豆汁取自於○○醬油工廠蒸煮黑豆之廢棄黑豆水，將以減壓濃縮機進行減壓濃縮，濃縮物再以冷凍乾燥之方式進行乾燥以取得黑豆汁之粉末，以作為本專題之實驗材料。

(二) 利用 DPPH 清除自由基的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力

- 1.材料：黑豆汁萃取物、甲醇、鋁箔紙、震盪機、移液器、細胞盤
- 2.測定樣品提供 H⁺離子來終止自由基的連鎖反應能力。DPPH 常用來評估抗氧化物的供氫能力，且在 517nm 處有一個特徵吸收峰。遇到自由基清除劑時，DPPH 的孤對電子會被配對而褪色，也就是在最大吸收波長處的吸光值變小，亦即被抗氧化物還原時吸光值會降低，吸光值愈低，表示抗氧化物的供氫能力愈強。因此，透過測定吸光值的變化可以檢視 DPPH 自由基的清除效果。

3.DPPH 自由基清除率檢測實驗流程如下：

- (1)取 100 μ L 樣品於 1.5mL 離心管中作為 Control，
取 100 μ L 乙醇於 1.5mL 離心管中作為 Blank。
- (2) 於各管中加入 400 μ L 的乙醇
- (3) 於各管中加入 500 μ L 的 DPPH 溶液
- (4) 震盪 5 秒後用小烏龜離心 5 秒，靜置避光 20 分鐘
- (5) 每孔取 200 μ L 溶液於 96-Wells 中，需做三重覆
- (6) 利用 ELISA Reader 測定吸光值 517nm
- (7) 計算為 $(1-(\text{Sample}/\text{Blank}))\times 100$

二、利用 ABTS⁺ (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力：測定固體樣品還原陽離子自由基的能力

(一)材料：黑豆汁萃取物、ABTS⁺ 溶液、Trolox 標準品溶液、ELISA (BioTek-Epoch)、水浴鍋、震盪機、離心機。

(二)原理：ABTS⁺經過氧化氫與過氧化酵素產生氧化反應，形成藍綠色水溶性的 ABTS⁺陽離子自由基，當 ABTS⁺陽離子自由基與抗氧化劑還原時，溶液顏色會變淺吸光值會降低或消失，因此當吸光值越低時，就表示樣品清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力越強。

(三)實驗步驟：

- 1.取固體樣品依照濃度設計溶於 1 mL 95% 酒精於 1.5 mL 離心管中
- 2.取 PBS (mL):ABTS⁺ (mL)溶液= 200:20, 220:20, 240:20 的濃度，每管於 96-Wells 注入三個孔，每孔 0.2 mL，以 737 nm 測定吸光值，並將 PBS:ABTS⁺溶液吸光值調整至 0.77~0.83 的吸光值範圍中。
- 3.取 10 μ L Trolox 8 mg/mL 標準品溶液於 1.5 mL 離心管中作為 Control
- 4.取 10 μ L PBS (pH 7.4) 於 1.5 mL 離心管中作為 Blank
- 5.取 10 μ L 固體樣品溶液 1.5 mL 離心管做為 Sample
- 6.於各管中加入 990 μ L 的 ABTS⁺，避光靜置 10 分鐘

- 7.每管於 96-well 注入三個孔，每孔 0.2 mL
- 8.以 OD 737 nm 測定其吸光值
- 9.計算為：
標準品計算公式 $((\text{Blank-control})/\text{Blank}) * 100$
樣品計算公式 $((\text{Blank-sample})/\text{Blank}) * 100$

三、利用還原力 (Reducing power)分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力

(一)材料：定量吸管、黑豆汁萃取物、sodium phosphate buffer、potassium ferricyanide、Trichloroacetic acid、離心機、ferric chloride。

(二)原理：以普魯士藍 $[\text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)_3]$ 之生成量作為指標。抗氧化劑將赤血鹽 $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 還原成黃血鹽 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ，黃血鹽再利用 Fe^{3+} 形成普魯士藍，藉由 700nm 處吸光值變化檢測還原力大小。

(三)還原力測定實驗步驟，並以 0.1% 抗壞血酸(L-Ascorbic acid)作為試驗對照組。

- 1.取不同濃度(g)之樣品，溶於 1 mL 95% 酒精中。
- 2.取 150 μL Vit C 1mg/mL 標準品溶液於 1.5mL 離心管中作為 Control
- 3.取 150 μL 滅菌水於 1.5mL 離心管中作為 Blank
- 4.取 150 μL 樣品溶液 1.5mL 離心管做為 Sample
- 5.於各管中分別加入 150 μL PBS 和 150 μL 1%赤血鹽
6. 50°C 水浴 20 分鐘，再冰浴 2 分鐘
- 7.於各管中加入 150 μL 10%TCA，震盪混勻，冷凍離心 (4°C，3000 rpm /10 分鐘)
- 8.各管取 500 μL 上清液更換至新的 1.5mL 離心管中
- 9.於各管中分別加入 600 μL RO 水和 120 μL 0.1% FeCl_3 ，靜置 10 min
- 10.每管於 96-Wells 注入三個孔，每孔 0.2 mL
- 11.以 OD 700 nm 測定其吸光值
- 12.計算為標準品計算公式 $((\text{control- Blank})/\text{control}) * 100$
樣品計算公式 $((\text{Sample- Blank})/\text{control}) * 100$

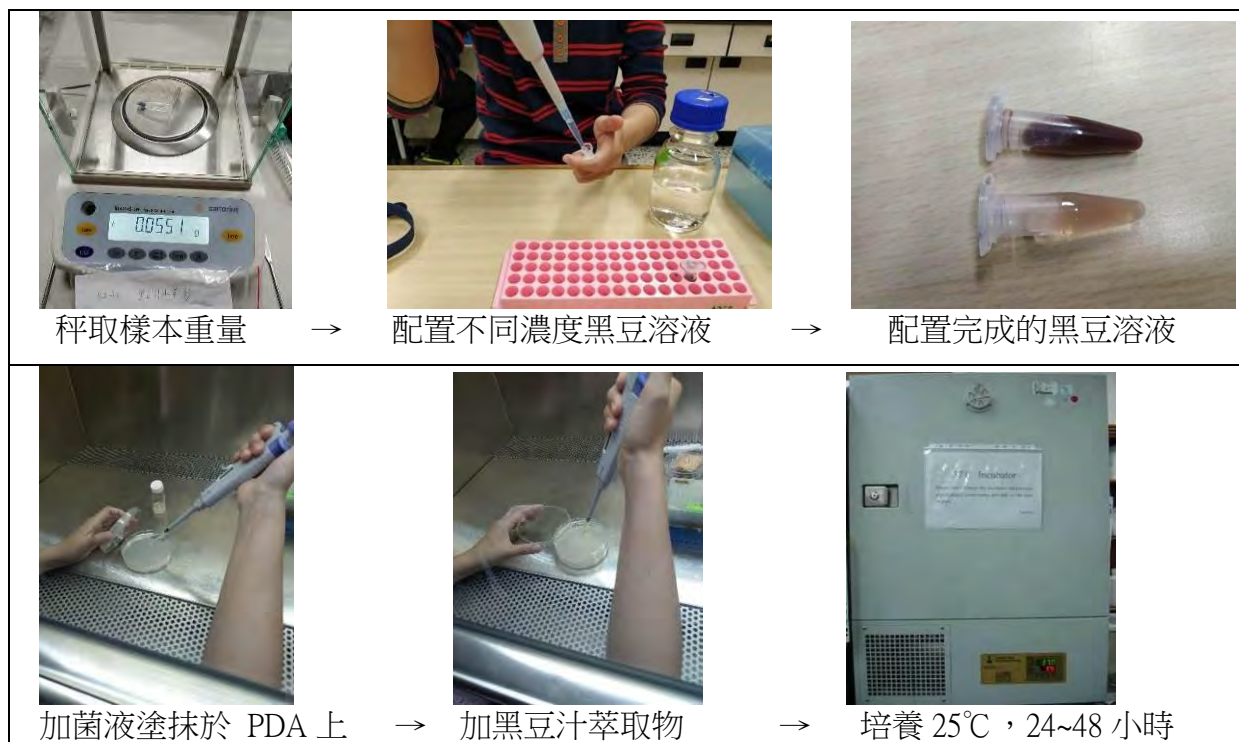
四、檢測黑豆汁萃取物對青黴菌和黑黴菌的抑菌能力

(一) 活化黴菌：黑麴菌(*Aspergillus niger*)、青黴菌(*Penicillium digitatum*)

- 1.於 9 cm PDA 平板底部寫上日期、菌名及測試溶液
- 2.使用定量吸管取 100 μ l 黴菌菌液，均勻塗抹於 PDA 上

(二) 添加樣品

- 1.取 30 μ l 黑豆汁萃取物溶液(濃度 2、20、200 mg/ml) 滴至已塗抹黴菌之 PDA 上
- 2.培養 25°C，24~48 小時，觀察並記錄



圖三 檢測黑豆汁萃取物對青黴菌和黑黴菌的抑菌實驗

五、觀察黑豆汁萃取物對豬脂肪細胞的影響

(一) 豬脂肪組織

- 1.豬脂肪組織切割成小塊。
- 2.將豬脂肪組織，分別以水(對照組)與 1 mg/ml、2 mg/ml、20mg/ml 之黑豆汁作用 10 分鐘。

(二)以複式顯微鏡觀察

- 1.取出脂肪組織塗抹在載玻片上，將載玻片上之水吸乾，並滴入兩滴蘇丹三號。
- 2.移至複式顯微鏡下以 40 倍、100 倍、400 倍觀察脂肪細胞的變化。

六、黑豆汁飲品開發與感官品評

(一)黑豆汁飲品：以黑豆汁為基底添加不同濃度 5%、10%、15%、20%的黑糖提供甜味，製成黑豆汁飲品。



圖四 黑豆汁飲品之製作

(二)製作感官品評表

以消費者喜好性來品評，採用七分制評分法進行喜好性評分，1 分代表非常不喜歡，2 分代表不喜歡，3 分代表稍微不喜歡，4 分代表普通，5 分代表稍微喜歡，6 分代表喜歡，7 分表示非常喜歡。品評項目包含色澤、香氣、甘甜味、酸味、苦味、澀味、口感及整體感受，依個人喜好程度予以評分。

表五 消費者喜好性品評之品評表

消費者喜好性品評之品評表

性別：男 女

年齡： 20歲以下 20~29 歲 30~39 歲 40~49 歲 50~59 歲 60 歲以上

品評說明:

您好! 本問卷為黑豆汁飲品開發之品評問卷，請依您的喜好程度勾選分數。

黑豆汁飲品編號：

	7分	6分	5分	4分	3分	2分	1分
品評項目	非常喜歡	喜歡	稍微喜歡	普通	稍微不喜歡	不喜歡	非常不喜歡
色澤							
香氣							
甘甜味							
酸味							
澀味							
整體感覺							

您對黑豆汁飲品的其他建議：

感謝您的品評!

伍、研究結果

一、利用 DPPH 清除自由基的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力

(一)利用冷凍乾燥和減壓濃縮製備不同濃度之黑豆汁樣品


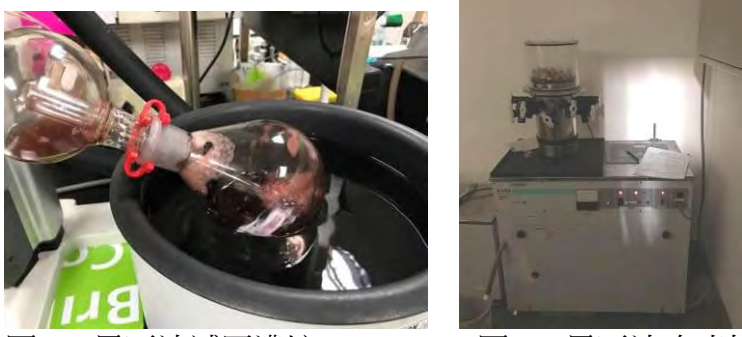
名稱	照片
廢棄之黑豆水	
減壓濃縮 冷凍乾燥	

圖 5-1 黑豆汁原液

圖 5-2 黑豆汁減壓濃縮

圖 5-3 黑豆汁冷凍乾燥

圖五 利用減壓濃縮和冷凍乾燥製備黑豆汁樣品

由醬油工廠取回之黑豆汁為深琥珀色液體，經減壓濃縮後為黏稠狀之固體，再利用冷凍乾燥後得到黑豆汁萃取物粉末，其萃取率為 1.159%，接下來以此作為實驗樣品。

(二)製備不同濃度之黑豆汁樣品

2mg 的濃縮後之黑豆粉末 + 1 毫升酒精

→ 即是濃度 2mg/ml 的樣本

取濃度 2mg/ml 的樣本溶液 20 μ l + 20 μ l 酒精

→ 即是濃度 1mg/ml 的樣本

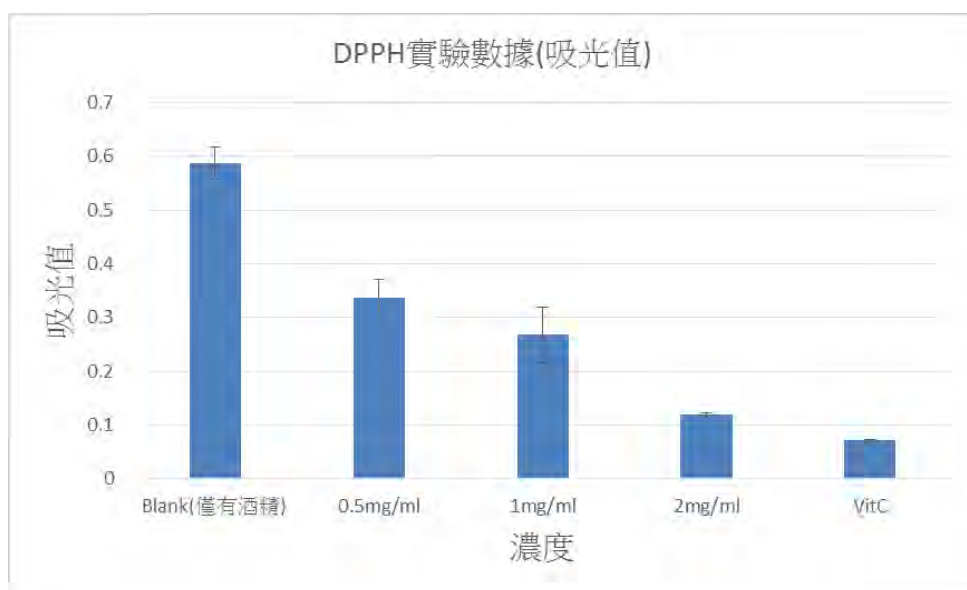
取濃度 1mg/ml 的樣本溶液 30 μ l + 30 μ l 酒精

→ 即是濃度 0.5mg/ml 的樣本

(三)利用 DPPH 清除自由基的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力

α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method

本實驗主要是測定不同種濃度的黑豆汁提供 H⁺ 離子來終止自由基的連鎖反應能力。並選用自由基清除能力強的 1mg/ml 維生素 C 做為此實驗的控制組進行比較。DPPH 之 Methanol 溶液在 517nm 下有較強的吸光值，被抗氧化物還原時吸光值會降低，吸光值愈低，表示抗氧化物的供氫能力愈強。



圖六 不同濃度黑豆汁與 DPPH 作用在 OD517 nm 之吸光值

由圖六得知，0.5 mg/ml、1 mg/ml、2mg/ml 之黑豆汁與 DPPH 自由基作用在 OD517 nm 之吸光值分別為 0.3370 ± 0.0339 、 0.2676 ± 0.0514 、 0.1196 ± 0.0020 ，故隨著黑豆汁濃度的提高，吸光值也明顯降低，表示其抗氧化物的供氫能力愈強，其抗氧化能力愈強。

進一步，將其換算成 DPPH 自由基清除率，如下

1.標準品數據計算： $[1-(\text{Control}/\text{Blank})]*100\%$

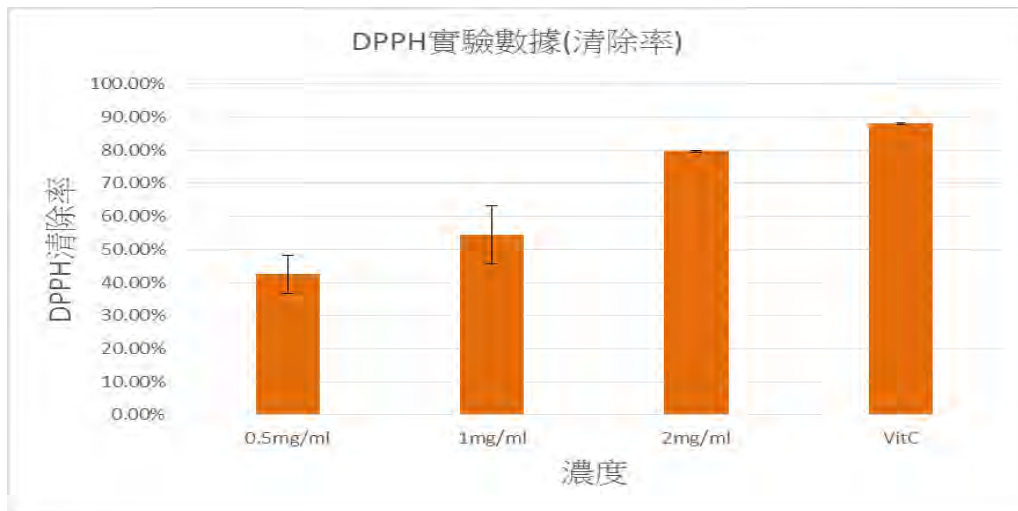
$$[1-(0.070667/0.586667)]*100\% \approx 88\%$$

2.樣品計算公式 $((\text{Sample}-\text{Blank})/\text{control})*100$

(1) 黑豆水 0.5mg/ml： $[1-(0.337/0.586667)]*100\% \approx 42.5\%$

(2) 黑豆水 1mg/ml： $[1-(0.267667/0.586667)]*100\% \approx 54.4\%$

(3) 黑豆水 2mg/ml： $[1-(0.119667/0.586667)]*100\% \approx 79.6\%$

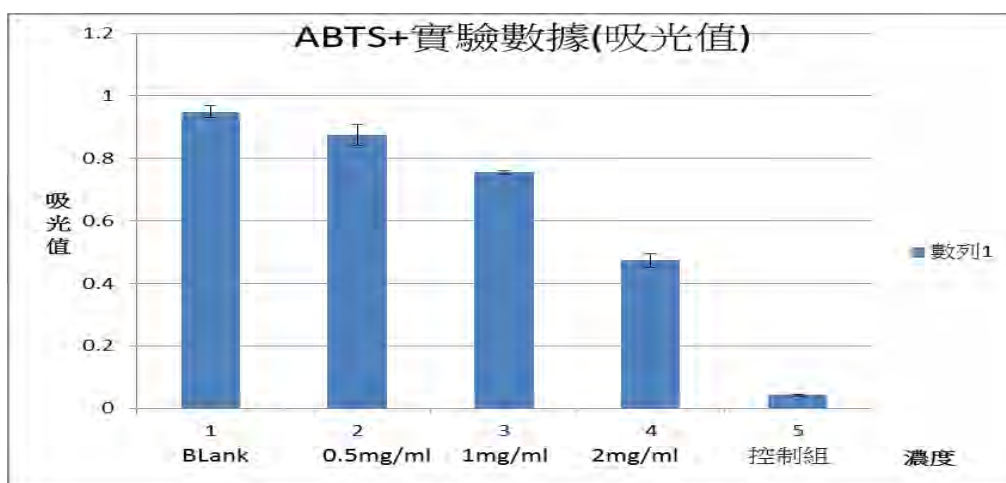


圖七 不同濃度黑豆汁對於 1 mg/mL VitC 溶液之提供氫離子終止自由基的連鎖反應能力

由圖七得知，0.5 mg/ml、1 mg/ml、2mg/ml 之黑豆汁的 DPPH 自由基清除能力分別為 42.5%、54.4%、79.6%，故隨著黑豆汁濃度的提高，DPPH 自由基清除率也明顯提高，而高濃度 2mg/ml 之黑豆汁的 DPPH 自由基清除力高達 79.6% 與維生素 C 對照組 88% 接近。表示 2mg/ml 之黑豆汁有很好的抗氧化能力。

二、利用 ABTS⁺ (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) 的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力：測定固體樣品還原陽離子自由基的能力

ABTS⁺ 經過氧化氫與過氧化酵素產生氧化反應，形成藍綠色水溶性的 ABTS⁺ 陽離子自由基。並選用 8mg/ml Trolox 做為此實驗的控制組進行比較。當 ABTS⁺ 陽離子自由基與抗氧化劑還原時，則溶液顏色會變淺，吸光值會降低或消失，故在 OD 737 nm 檢測其吸光值，當吸光值越低時，即表示樣品清除 ABTS⁺ 陽離子自由基的能力越強。



圖八 不同濃度黑豆汁萃取物與 ABTS⁺ 陽離子作用在 OD 737 nm 的吸光值

由圖八得知，0.5 mg/ml、1 mg/ml、2mg/ml 之黑豆汁與 ABTS⁺陽離子作用在 OD 737 nm 的吸光值分別為 0.855±0.0343、0.8193±0.0044、0.7073±0.0208，故隨著黑豆汁濃度的提高，吸光值也有降低的趨勢，表示其清除 ABTS⁺陽離子自由基能力有上升之現象，即抗氧化能力有愈強的趨勢。

進一步，將其換算成 ABTS⁺陽離子自由基清除率，如下

1. 標準品數據計算： $(\text{Blank}-\text{Control})/\text{Blank}*100\%$

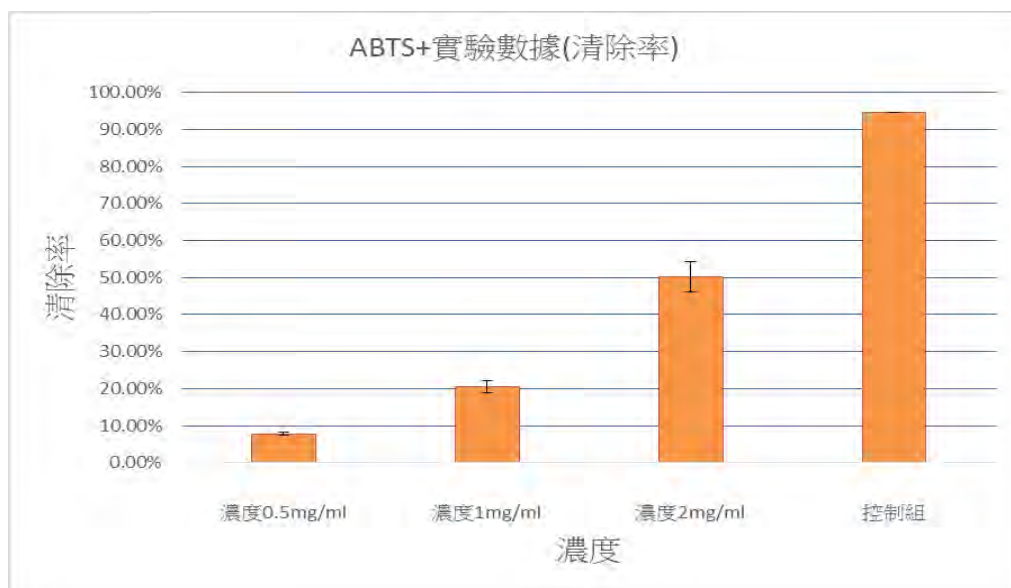
$$(0.907333/0.949333)*100\% \text{約等於 } 94.48\%$$

2. 樣品計算公式： $(\text{Blank}-\text{Sample})/\text{Blank}*100\%$

(1)黑豆水 0.5mg/ml： $(0.094333/0.949333)*100\%$ 約等於 7.77%

(2)黑豆水 1mg/ml： $(0.13/0.949333)*100\%$ 約等於 20.48%

(3)黑豆水 2mg/ml： $(0.242/0.949333)*100\%$ 約等於 50.17%

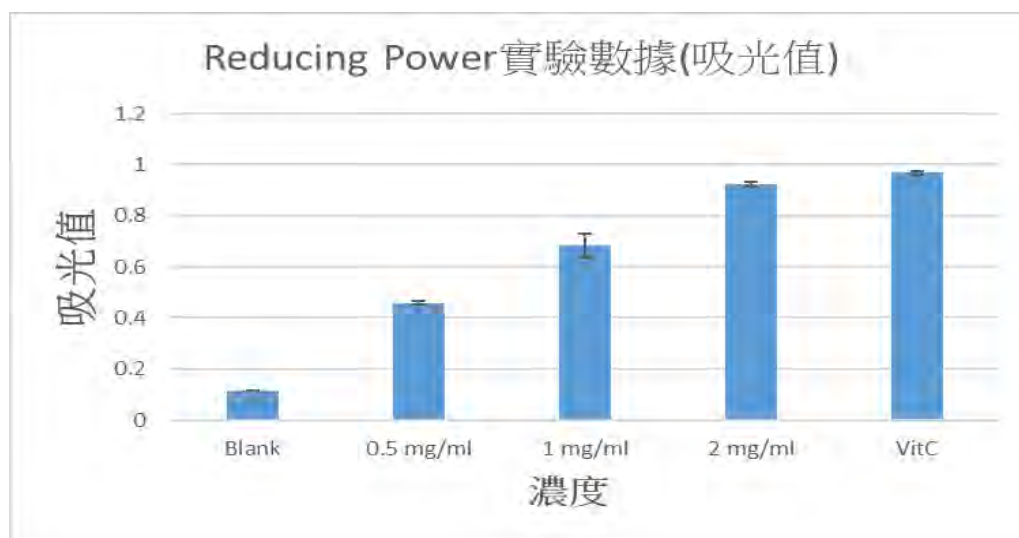


圖九 不同濃度黑豆汁之對於 8 mg/mL Trolox 標準品溶液之還原陽離子自由基的能力

由圖九得知，0.5 mg/ml、1 mg/ml、2mg/ml 之黑豆汁清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力的分別為 7.7745%、20.4800%、50.1791%，故隨著黑豆汁濃度的提高，清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力也明顯提高，而高濃度 2mg/ml 之黑豆汁清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力達 50.1791%，雖不及 Trolox 控制組的 94.48%，但也有相當的抗氧化能力。

三、利用還原力 (Reducing power)分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力

還原力在抗氧化的表現為具有還原過氧化物(peroxide)的能力，故可作為化合物是否具有抗氧化能力的指標。並選用 1mg/ml 維生素 C 做為此實驗的控制組進行比較。本實驗主要是測定不同種濃度的黑豆汁之還原力，生成量愈多，吸光值愈高，表示還原能力愈佳。



圖十 不同濃度黑豆汁在 OD 700 nm 之吸光值

由圖十得知，0.5 mg/ml、1 mg/ml、2mg/ml 之黑豆汁在 OD700 nm 之吸光值分別為 0.4590 ± 0.0088、0.6826 ± 0.0448、0.9230 ± 0.0088，故隨著黑豆汁濃度的提高，吸光值也明顯提高，表示其還原力愈佳。

進一步，將其換算成相對還原力，如下

1.標準品計算公式 $((\text{control} - \text{Blank}) / \text{control}) * 100\%$

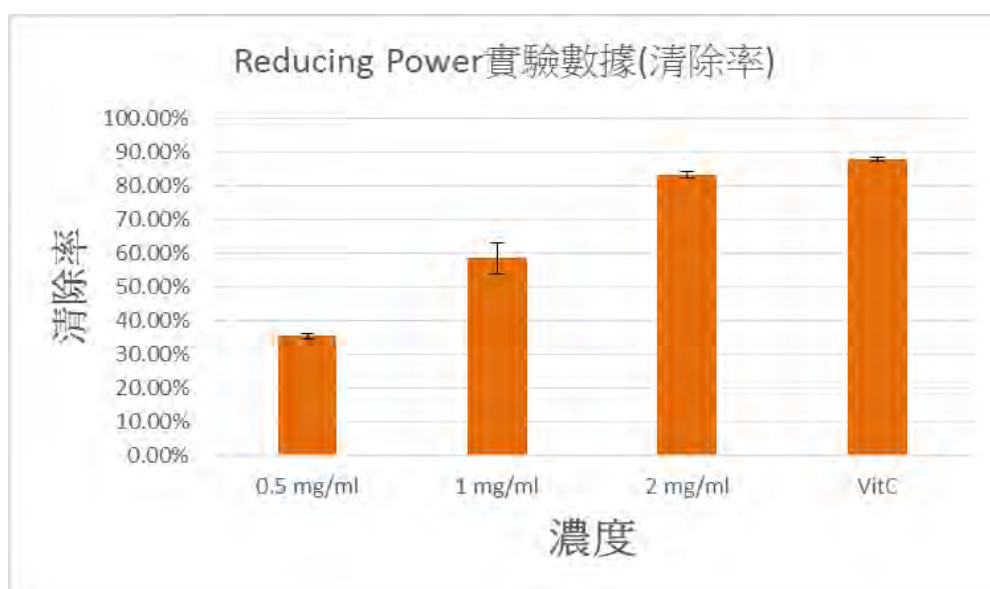
$$[(0.96833 - 0.115667) / 0.96833] * 100\% \approx 88.05\%$$

2.樣品計算公式 $((\text{Sample} - \text{Blank}) / \text{control}) * 100\%$

(1) 黑豆水 0.5mg/ml： $[(0.4590 - 0.115667) / 0.96833] * 100\% \approx 35.45\%$

(2) 黑豆水 1mg/ml： $[(0.6826 - 0.115667) / 0.96833] * 100\% \approx 58.55\%$

(3) 黑豆水 2mg/ml： $[(0.9230 - 0.115667) / 0.96833] * 100\% \approx 83.37\%$



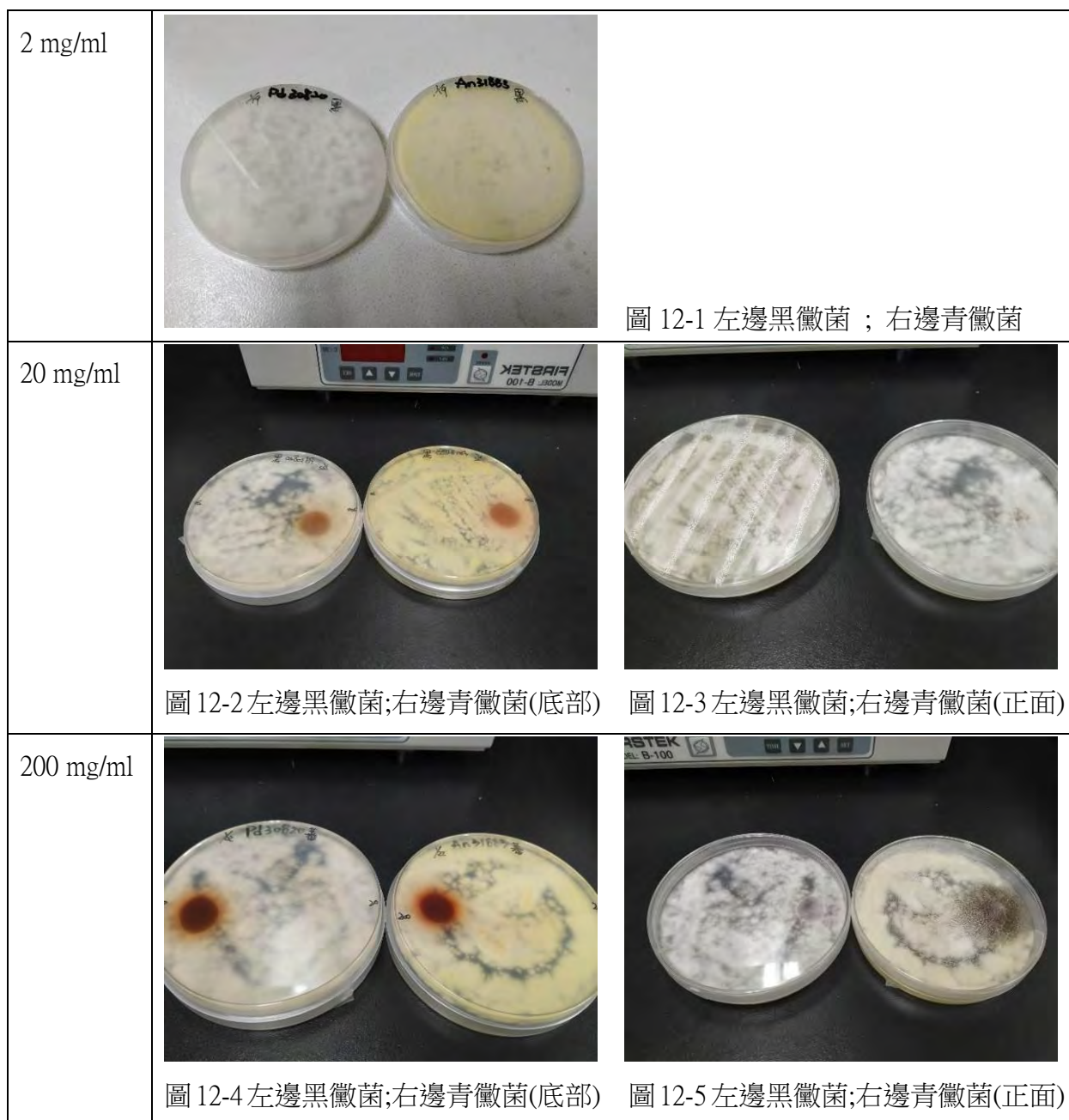
圖十一 不同濃度黑豆汁相對 1 mg/ml Vit C 之還原力

由圖十一得知，0.5 mg/ml、1 mg/ml、2mg/ml 之黑豆汁相對還原能力的分別為 35.45%、58.55%、83.37%，故隨著黑豆汁濃度的提高，相對還原能力也明顯上升之現象，而高濃度 2mg/ml 之黑豆汁的相對還原能力高達 83.37%與維生素 C 對照組 88.05%相當。表示 2mg/ml 之黑豆汁有很好的還原能力。

綜合圖七不同濃度黑豆汁萃取物清除 DPPH 自由基之能力、圖九不同濃度黑豆汁之清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力、圖十一不同濃度黑豆汁之還原能力結果可看出，廢棄的黑豆汁具有良好的抗氧化能力，且隨著黑豆汁濃度的提高，抗氧化能力也明顯上升之現象，因此若能將製成飲品，不僅可達到預防或改善因自由基或氧化物壓力所造成之傷害，還能符合循環經濟效益，亦可以達到廢物再利用的目的。

四、檢測黑豆汁萃取物對黴菌的抑菌能力

黑豆汁萃取物除了有良好的抗氧化能力外，是否還具有其他的功用？所以進一步了解其對黑麴菌(*Aspergillus niger* ; BCRC31883)、青黴菌(*Penicillium digitatum* ; BCRC30820)生長的影响。此實驗使用黑黴菌與青黴菌來進行黑豆汁萃取物的抑菌能力，黑豆汁萃取物若有抗菌能力，會出現「透明環」，表示此範圍黴菌無法生長。



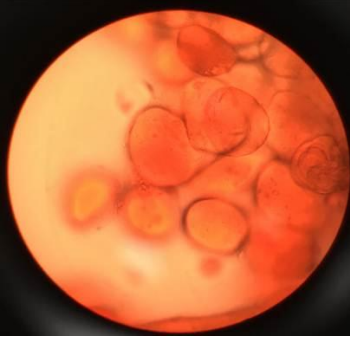

圖十二 黑豆汁萃取物對青黴菌和黑黴菌的抑菌能力


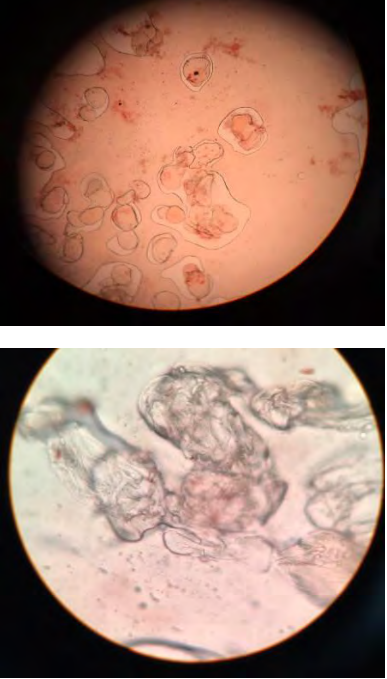
由圖十二結果可知，濃度 2 mg/ml、20mg/ml、200 mg/ml 的黑豆汁萃取物皆無法抑制

黑黴菌和青黴菌的生長，即未有抑菌環出現，故黑豆汁萃取物對黴菌生長沒有影響。因此可以推測黑豆汁內並不含有抑制該實驗菌株的成份，所以製作飲品的過程必須進行殺菌處理。

五、觀察黑豆汁萃取物對豬脂肪細胞的影響

文獻中提及黑豆具有抗肥胖(antiobesity)的功效，防止肥胖可由脂肪細胞數量減少和脂肪細胞體積縮小來觀察，那麼廢棄的黑豆汁對於脂肪細胞是否有影響呢？所以我們利用與人類相近哺乳類的豬脂肪細胞與不同濃度的黑豆汁作用，以複式顯微鏡在 100 倍和 400 倍下觀察形態是否產生變化。

濃度	圖片	描述
對照組	 <p style="text-align: right;">400X</p> <p>圖 14-1 正常脂肪細胞</p>	<p>對照組的正常脂肪細胞呈現圓球狀，經蘇丹三號染色後，細胞中央含有油脂的囊泡呈現紅色，細胞核被擠到細胞邊緣處，故較難看見細胞核。</p>
1 mg/ml	 <p style="text-align: right;">400X</p> <p>圖 14-2 添加 1 mg/ml 黑豆汁之脂肪細胞</p>	<p>加入 1 mg/ml 黑豆汁後，脂肪細胞表面稍有皺縮的現象，經蘇丹三號染色後，細胞內亦含有油脂的囊泡呈現紅色。</p>

2mg/ml	 <p style="text-align: right;">400X</p> <p>圖 14-3 添加 2 mg/ml 黑豆汁之脂肪細胞</p>	<p>加入 2 mg/ml 黑豆汁後，脂肪細胞表面有皺縮的現象，經蘇丹三號染色後，細胞內油脂囊泡的紅色較淺。</p>
20 mg/ml	 <p style="text-align: right;">100X</p> <p style="text-align: right;">400X</p> <p>圖 14-4 添加 20 mg/ml 黑豆汁之脂肪細胞</p>	<p>加入 20 mg/ml 黑豆汁後，脂肪細胞體積縮小，經蘇丹三號染色後，細胞內呈粉紅透明狀，推測有油脂被排出的現象。</p>

圖十三 觀察黑豆汁萃取物對豬脂肪細胞的影響

由圖十三可知，在含有黑豆汁的作用下，脂肪細胞表面開始皺縮，體積縮小且有釋出油脂的現象，並隨著黑豆汁濃度增加，豬脂肪細胞體積明顯縮小並有較多得油脂排出，故推測添加黑豆汁可減少油脂堆積在脂肪細胞中。

六、黑豆汁飲品開發與感官品評

若能將醬油工廠廢棄的黑豆汁做成消費者喜歡的保健食品，可以達到廢物利用之功效。所以我們將其製作成飲料，以走向商品化、大眾化為目標。感官品評是使用科學的方法使人能成為客觀檢測食品接受度與品質的工具。感官品評的結果可作為產品商品化的參考依據，因為一個品質良好的產品，若無法得到消費者的喜愛，便失去成為商品的潛力。

(一)黑豆汁飲品開發

直接將醬油工廠取得的黑豆汁原液，添加 5%、10%、15%、20%黑糖進行調配後，經家族成員的初步試飲結果，發現在添加 5%黑糖時甜味不夠，添加 10%、15%黑糖時甜度尚可但是豆味仍嫌太濃，而在 20%甜度時，豆味已經被甜味覆蓋過，接受度最高。因此，我們選擇添加 20%黑糖為黑豆汁飲品，再進行同班同學之感官品評。

(二)黑豆汁飲品之感官品評

我利用感官品評表對 40 位同學施測，以調查黑豆汁飲品的接受度以及喜好程度，分成色澤、香氣、酸味、苦味、澀味、口感等六大面向進行喜好度調查。下圖為部分品評樣本：

消費者喜好性品評之品評表							
性別： <input type="checkbox"/> 男 <input checked="" type="checkbox"/> 女							
年齡： <input checked="" type="checkbox"/> 20歲以下 <input type="checkbox"/> 20-29 歲 <input type="checkbox"/> 30-39 歲 <input type="checkbox"/> 40-49 歲 <input type="checkbox"/> 50-59 歲 <input type="checkbox"/> 60 歲以上							
品評說明： 您好！本問卷為黑豆汁飲品開發之品評問卷，請依您的喜好程度勾選分數。							
黑豆汁飲品編號：							
品評項目	7分 非常喜歡	6分 喜歡	5分 稍微喜歡	4分 普通	3分 稍微不喜歡	2分 不喜歡	1分 非常不喜歡
色澤		✓					
香氣		✓					
甘甜味		✓					
酸味			✓				
澀味			✓				
整體感覺		✓					
您對黑豆汁飲品的其他建議： 有醬油的豆香 很順口 會把它當成日常飲品食用							
感謝您的品評！							

消費者喜好性品評之品評表							
性別： <input checked="" type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女							
年齡： <input checked="" type="checkbox"/> 20歲以下 <input type="checkbox"/> 20-29 歲 <input type="checkbox"/> 30-39 歲 <input type="checkbox"/> 40-49 歲 <input type="checkbox"/> 50-59 歲 <input type="checkbox"/> 60 歲以上							
品評說明： 您好！本問卷為黑豆汁飲品開發之品評問卷，請依您的喜好程度勾選分數。							
黑豆汁飲品編號：							
品評項目	7分 非常喜歡	6分 喜歡	5分 稍微喜歡	4分 普通	3分 稍微不喜歡	2分 不喜歡	1分 非常不喜歡
色澤			✓				
香氣		✓					
甘甜味	✓						
酸味				✓			
澀味				✓			
整體感覺		✓					
您對黑豆汁飲品的其他建議： 味道獨特, I like it, 順口好喝~							
感謝您的品評！							

消費者喜好性品評之品評表

性別：男 女

年齡：20歲以下 20-29 歲 30-39 歲 40-49 歲 50-59 歲 60 歲以上

品評說明：
您好！本問卷為黑豆汁飲品開發之品評問卷，請依您的喜好程度勾選分數。

黑豆汁飲品編號：							
品評項目	7分 非常喜歡	6分 喜歡	5分 稍微喜歡	4分 普通	3分 稍微不喜歡	2分 不喜歡	1分 非常不喜歡
色澤		✓					
香氣			✓				
甘甜味			✓				
酸味		✓					
澀味				✓			
整體感覺		✓					

您對黑豆汁飲品的其他建議：
 感覺很營養 沒有負擔
 若有販售 會考慮購買
 感謝您的品評!

消費者喜好性品評之品評表

性別：男 女

年齡：20歲以下 20-29 歲 30-39 歲 40-49 歲 50-59 歲 60 歲以上

品評說明：
您好！本問卷為黑豆汁飲品開發之品評問卷，請依您的喜好程度勾選分數。

黑豆汁飲品編號：							
品評項目	7分 非常喜歡	6分 喜歡	5分 稍微喜歡	4分 普通	3分 稍微不喜歡	2分 不喜歡	1分 非常不喜歡
色澤		✓					
香氣			✓				
甘甜味		✓					
酸味				✓			
澀味			✓				
整體感覺			✓				

您對黑豆汁飲品的其他建議：
 味道略嫌單薄，不夠豐富
 整體而言可接受
 感謝您的品評!

圖十四 黑豆汁飲品之感官品評表
 表六 黑豆汁飲品之消費者喜好性品評結果

年齡	色澤	香氣	甘甜味	酸味	澀味	整體感覺
20-29	5.47 ± 1.10	5.86 ± 1.12	5.86 ± 1.26	4.50 ± 1.40	5.57 ± 1.09	5.63 ± 1.25

Data are mean scores (1 = extremely dislike, 4 = neither like nor dislike, 7 = extremely like) of consumers.

Data is expressed as means ± SD

由以上結果可知，除酸味項目(4.50 ± 1.40)普通以外，其餘各項測試之值皆在喜歡以上，其中甘甜味(5.86 ± 1.26)與香氣(5.86 ± 1.12) 喜好度最高，整體感覺佳。顯示此黑豆汁飲品於20歲以下之族群，具有高度接受度及良好的喜愛度。故可以此作為飲品基體再進行不同配方如添加枸杞子、紅棗等天然食品調整酸味與風味，以提高消費者體驗與喜愛。接下來需要擴大不同年齡層的族群進行施測，方能獲得大眾的喜好度與接受度。

陸、討論

- 一、黑豆汁樣品取自某醬油工廠，為製作醬油蒸煮黑豆時廢棄倒掉之黑豆水，若直接冷藏儲存，一星期即有腐敗的味道，可知在無殺菌的過程容易腐敗。故我們每次拿回之黑豆水立即濃縮乾燥成粉末狀備用。再者，腐敗的原因大多為微生物滋長，所以在抑制黴菌和細菌實驗中證實黑豆汁確實無法抑制微生物的生長，故製作黑豆汁飲品必須殺菌密封。
- 二、在廢棄的黑豆汁與豬脂肪細胞的實驗中，我們以複式顯微鏡觀察發現，在含有黑豆汁的作用下，脂肪細胞表面開始皺縮，體積縮小且有釋出油脂的現象，經討論後推測細胞縮小，可能因滲透壓變化造成，但是釋出細胞外的油脂需要進一步設計實驗檢測黑豆汁是否有溶解蛋白質與脂質的功能。
- 三、原本抗氧化實驗設計中，我們利用鐵離子螯合實驗測定固體樣品還原鐵離子的抗氧化能力，其原理 Fe^{2+} 是最具影響力的促氧化劑，Ferrozine 為被氧化物， Fe^{2+} 與 Ferrozine 會形成複合物，EDTA 為金屬螯合劑，可以與金屬離子螯合，使被氧化情況減少。吸光值愈高，表示試樣還原力愈強。但實驗結果無法呈現，因為我們發現黑豆汁含大量花青素，而花青素與 Ferrozine- Fe^{2+} 錯合物吸光峰值區間推測同為 OD562，會影響檢測出吸光值之準確度，因此無法利用這實驗進行抗氧化性評估。
- 四、進行的三個實驗分別為測試黑豆汁清除 DPPH 陰離子自由基、清除陽離子 ABTS⁺ 自由基及還原的能力，此三種實驗為針對不同面向作還原能力之測量。經文獻探討和老師討論所得結果為人體中大部分有害自由基為陰離子自由基，且此種試管實驗無法完全代表人體內狀況。另外，在管外實驗中的 DPPH 清除自由基的分析中須留意避光，如配置 1 mg/mL Vit C 溶液、250 μ M DPPH 溶液等所有盛裝器皿都須包覆鋁箔紙。且實驗進行時，需將室內燈光盡量關閉。各種藥品標示需清楚、明顯、易於分辨，避免有錯加疑慮。

五、文獻資料中黑豆富含大豆異黃酮、低聚醣、皂苷、花青素、天冬素、維生素 E 等成分，黑豆亦具有抗氧化、抗癌、抗肥胖及抗糖尿病等生理功效。由我們實驗結果得知醬油製程中廢棄的黑豆汁萃取物具有良好的抗氧化能力，此與文獻相同，推測醬油製程中廢棄的黑豆汁亦具有相同的某些成分與效果，此需要進一步利用高效液相層析法 (HPLC; *High Performance Liquid Chromatography*) 分析我們收集的黑豆汁成分，以確定其主要功能成分。

柒、結論

研究表示黑豆具有許多可防止如癌症、心腦血管疾病、肥胖症和糖尿病等疾病的成分，中醫也認為黑豆有解毒的功效，潛力無窮。本實驗由醬油工廠取回的廢棄黑豆汁為深琥珀色液體，經減壓濃縮、冷凍乾燥後為黑豆汁萃取物粉末，再製備成 0.5mg/ml、1mg/ml、2 mg/ml 和 20mg/ml 等不同濃度之黑豆汁萃取物樣品進行以下實驗以驗證其功效並製作成黑豆汁飲品進行感官品評，以期發展出市場喜愛的保健食品。

一、醬油製程中廢棄的黑豆汁萃取物具有良好的抗氧化能力，且隨著濃度提高抗氧化能力也明顯上升

- (一)利用 DPPH 清除自由基的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力，結果得知 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml 之黑豆汁的 DPPH 自由基清除能力分別為 42.5%、54.4%、79.6%，隨著濃度提高，DPPH 自由基清除率也明顯提高，而濃度 2mg/ml 之黑豆汁的 DPPH 自由基清除力高達 79.6%與維生素 C 對照組 88%接近。表示 2mg/ml 之黑豆汁有優良的抗氧化能力。
- (二)利用 ABTS⁺的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力，結果得知 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml 之黑豆汁清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力的分別為 7.7745%、20.4800%、50.1791%，故隨著濃度提高，清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力也明顯提高，而濃度 2mg/ml 之黑豆汁清除 ABTS⁺陽離子自由基的能力達 50.1791%，雖不及 Trolox 控制組的 94.48%，但也有相當的抗氧化能力。

(三)利用還原力分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力，結果得知 0.5mg/ml、1mg/ml、2mg/ml 之黑豆汁相對還原能力的分別為 35.45%、58.55%、83.37%，故隨著濃度提高，相對還原能力也明顯上升之現象，而濃度 2mg/ml 之黑豆汁的相對還原能力高達 83.37%與維生素 C 對照組 88.05%相當。表示 2mg/ml 之黑豆汁有很好的還原能力。

二、黑豆汁萃取物無抑制黴菌的能力，但具有縮小豬脂肪細胞體積與促進油脂排出的作用

(一)由結果可知，濃度 2mg/ml、20mg/ml、200 mg/ml 的黑豆汁萃取物對黑麴菌(*Aspergillus niger*) 和青黴菌(*Penicillium digitatum*)無抑菌的能力，所以黑豆汁飲品製作過程中必須殺菌密封。

(二)豬脂肪細胞實驗中，隨著黑豆汁濃度增加，豬脂肪細胞表面皺縮、體積縮小並有釋出油脂的現象，故推測添加黑豆汁可減少油脂堆積在脂肪細胞中。

三、黑豆汁感官品評結果優良，適合保健飲品之開發

感官品評的結果可作為產品商品化的參考依據，畢竟一個東西本質上再好，若無法得到人們的喜愛，便失去其價值。由調查分析結果可知，添加 20%黑糖的黑豆汁飲品於 20 歲以下之族群，除酸味項目(4.50 ± 1.40)為普通以外，其餘各項測試之值皆在喜歡以上，其中甘甜味(5.86 ± 1.26)與香氣(5.86 ± 1.12) 喜好度最高，整體感覺良好接受度高。

綜合以上結果可看出，廢棄的黑豆汁具有優良的抗氧化能力與對抗豬脂肪細胞的現象，且製成黑豆汁飲品，接受度與喜好度高。黑豆汁萃取物 2mg/ml 的抗氧化能力約有 80% 與對照組 1mg/ml 維生素 C 有 88.05%抗氧化能力對應，再參考衛生福利部國民健康署國人膳食營養素參考攝取量維生素 C 每日為 100 毫克，換算回收的廢棄黑豆汁原液濃度高達 11.59 mg/ml，所以我們直接將其調味製成的飲品，只需 20 毫升即具有相對每日維生素 C 的抗氧化能力，所以醬油製程中廢棄的黑豆水並非毫無用處，而是可以多加利用的「黑金」，一天一瓶黑豆汁不僅可達到預防或改善因自由基或氧化物壓力所造成之傷害和抑制脂肪細胞堆積油脂，還能符合循環經濟效益，亦可以達到廢物再利用的目的，具有良好

的市場發展潛力。

未來展望

本實驗利用 DPPH、ABTS⁺、總還原力三種管外實驗 (in vitro) 檢測黑豆汁萃取物具有優良的抗氧化能力，接下來我們將利用 TBARS in NRK-52E 進行細胞內實驗 (in vivo) 檢測黑豆汁萃取物是否也具有優良的細胞內抗氧化能力，進一步以 MTT assay 分析黑豆汁對於免疫細胞 RAW264.7 cell 存活率的影響並檢測黑豆汁對 RAW264.7 cell 的抗發炎能力，以確認黑豆汁多方面的益處與療效。在這次實驗中已將黑豆汁作成飲品，若能以加了黑糖的黑豆汁作為健康食品的基體，再加入如枸杞子、龍眼乾、紅棗等的天然食品調配，提高風味與功效，並擴大測試不同年齡層族群的感官品評，以開發成大眾喜歡的健康保健食品，此能將製作醬油過程中廢棄的黑豆汁資源浪費降到最低，達成最大循環經濟效益並發展永續農業的目標。

捌、參考資料

- 一、趙大衛、楊遠波、劉仲康、辛致煒(2014)。第二章生物科學與食品。應用生物(36-46頁)。台南市：翰林出版事業股份有限公司。
- 二、Clouatre, D.(民90)譯者/林榆。葡萄籽: 心血管的救星、抗氧化的奇兵。台北市: 世茂。。
- 三、鄭貽文(2008)。不同茶樹品種(系)與採製方式對茶葉兒茶素、咖啡因含量與抗氧化能力之影響[摘要]。國立中興大學農藝學系所碩士論文，已出版。民100年7月28日取自「臺灣博碩士論文知識加值系統」：<http://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/gs32/gswweb.cgi?o=dnclcdr&s=id=%22096NCHU5417015%22.&searchmode=basic>(編號:096NCHU5417015)。
- 四、李家維、焦傳金、張春梅、薛如娟、梁光裕(2017)。第二章植物的構造與功能。基礎生物(45-83頁)。新北市：龍騰文化事業股份有限公司。
- 五、陳雅玲、楊傑超(2016)。基礎化學(一)全 課堂講義。氧化與還原。龍騰文化。
- 六、DPPH Radical Scavenging Capacity of Phenolic Extracts from African Yam Bean (Sphenost

ylis stenocarpa) 。 Food and Nutrition Sciences, 2012, 3, 7-13

七、 Reducing power: the measure of antioxidant activities of reductant compounds? Journal Redox Report.2004;9(4):213-7

八、 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol Med.1999 May;26 (9-10):1231-7

九、 Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators Toxicology Reports 2 (2015) 721 - 72

十、 Neil A. Campbell、Jane B. Reece(2009)。第35章植物的構造、生長與發育。生物學(837-865頁)。台灣培生教育出版股份有限公司，偉明圖書有限公司。

十一、 郭育宏(2015)。水溶性幾丁聚凍飲開發及其抗氧化能力之評估， 2015年1月，國立高雄海洋科技大學碩士論文。

十二、 李俊易(2014)。薄葉牛皮消抗氧化、抗菌與抗發炎活性之研究， 2015年1月，國立屏東科技大學博士論文。

十三、 周萍、李新勝、馬超、安東、王朝川、孟曉峰 (2014)。金針菇菇根抗氧化活性研究。 34，6， 中國果菜，41-43，2014年9月2日，萬方資料庫。

十四、 李穎宏、陳志宗、陳正敏、林怡如(2014)。農業新知。高雄區農業專訊，第89期，2014年9月出版。

十五、 李雯琪(2014)。何首烏飲品開發與其抗氧化能力之評估。2014年1月，國立高雄海洋科技大學碩士論文。

【評語】 052206

1. 用製作醬油黑豆蒸煮水與其抗氧化性之應用。
2. 實驗主題稍欠創意。
3. 作者對原料濃縮處理與組成分對抗氧化性影響宜再深入探討。
4. 實驗內容豐富性應可再加強。

摘要

本研究利用醬油製程中廢棄的黑豆汁以期達到循環經濟之效益。實驗結果得知廢棄的黑豆汁清除DPPH自由基之能力、清除ABTS⁺陽離子自由基的能力與還原能力皆隨濃度提高而明顯上升，且濃度2mg/ml之黑豆汁萃取物高達83%與對照組維生素C 88%相近，故其具有優良的抗氧化能力。再者黑豆汁萃取物雖無抑制黴菌生長的能力，但具有縮小豬脂肪細胞體積與促進油脂釋出的作用。最後利用黑豆汁原液添加20%黑糖製成飲品並進行感官品評，結果顯示20歲以下族群，甘甜味與香氣喜好度最高，整體感覺良好，可用於保健飲品開發。故醬油製程中的黑豆水不是廢棄物，而是可以善用的「黑金」，其不僅可改善因自由基或氧化物所造成之傷害，還能符合永續農業、廢物再利用的目的，具有市場發展的潛力。

壹、研究動機

醬油是由黑豆製成，然而大家享受著醇香的醬油時，背後其實有著不為人知的浪費。高一參訪醬油工廠時，看見黑豆在蒸煮過程，有許多廢棄的黑豆水，經詢問以後，才知道所謂的「廢水」不過是蒸煮時用的水，事實上食用應該是沒有問題的。最近紅豆水非常流行，豆類的一些中醫療效開始被重視，例如中外學者對黃豆的研究相當的徹底而廣泛；抑或是最近所謂「喝的保養品」正是紅豆水。然而對黑豆的研究相對較少。上網查了一查資料，了解到黑豆為豆科植物大豆的黑色種子，而明代李時珍《本草綱目》記載，黑豆有治腎病、利水下氣、活血、解毒的功能，黑豆自古被中國人認為因長得像腎，能夠滋養腎臟。黑豆補腎益陰、健脾利濕和除熱解毒的傳統療效。此外，研究表示黑豆含有豐富的異黃酮類、皂苷、花青素及維生素等可預防動脈血管硬化、抗肥胖、抗老防衰等科學的醫療研究。

製造醬油的衍生物「黑豆水」在工廠一桶一桶的被當成廢棄物倒掉，假使黑豆水有與黑豆一樣的功能，那豈不是極大的浪費？另外深褐色的黑豆水排放到河川也有可能造成一些環境的污染。因此，想透過檢測黑豆水抗氧化能力、抗菌能力以及抗發炎能力，來確認其療效，並了解其是否有重複利用的價值，將資源浪費降到最低，證明黑豆水有著不亞於紅豆水的療效，達成最大循環經濟效益並期待永續農業的發展。

貳、研究目的

本研究主要利用醬油工廠製作醬油過程中所產生廢棄的黑豆汁，進行以下實驗：

- 一、利用DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)清除自由基的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力
- 二、利用ABTS⁺(2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力
- 三、利用還原力(Reducing power)的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力
- 四、檢測黑豆汁萃取物對青黴菌和黑黴菌的抑菌能力
- 五、觀察黑豆汁萃取物對豬脂肪細胞的影響
- 六、黑豆汁飲品開發與感官品評

參、研究設備及器材

一、實驗樣本

廢棄黑豆汁
(由「○○醬油工廠」取得)

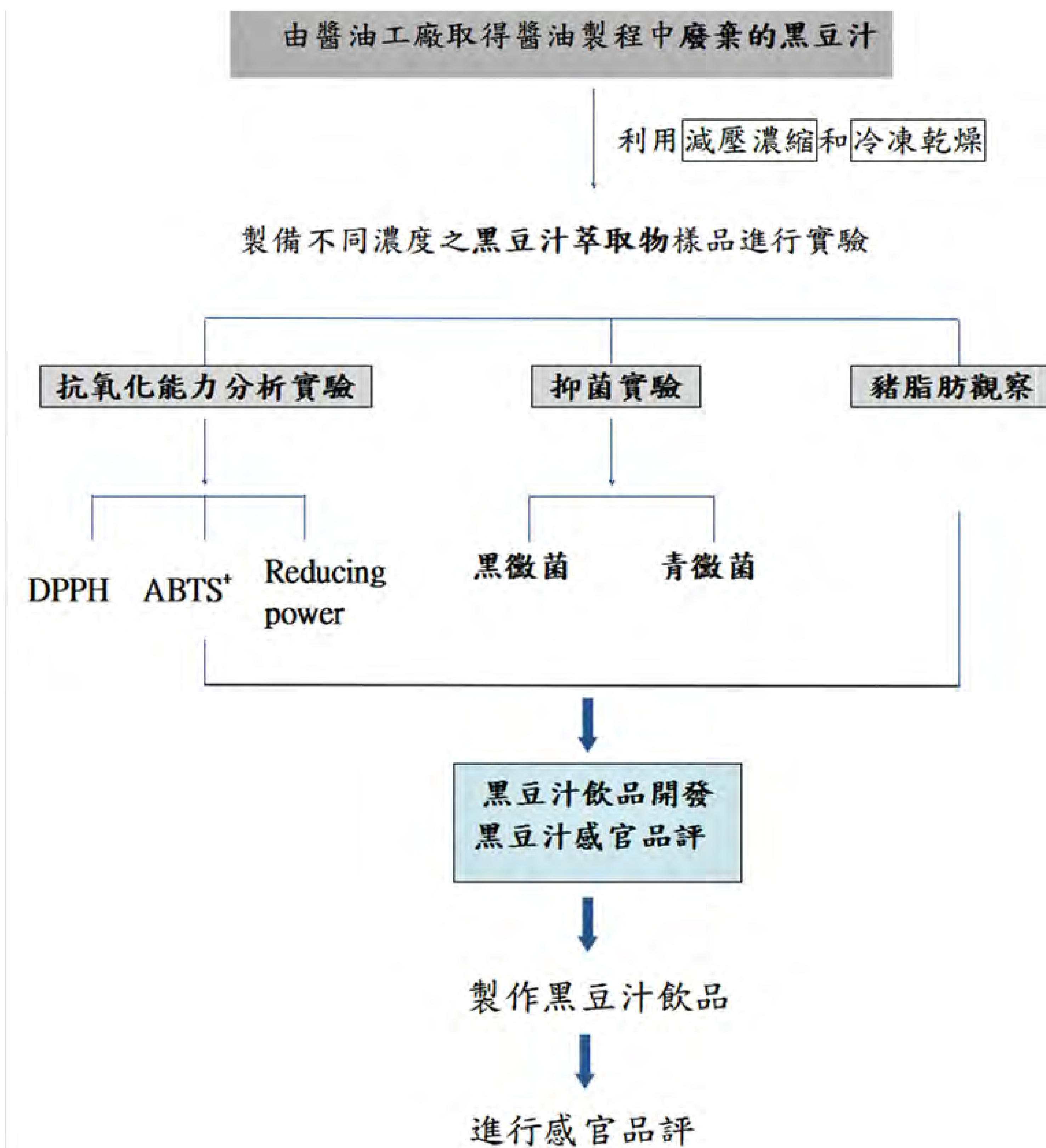
二、研究設備

減壓濃縮設備及真空幫浦、垂直式無菌操作台、ELISA Reader、振盪器、冷凍乾燥機、溫培養箱、複式顯微鏡、桌上型冷凍離心機、高速離心機、96孔盤、培養皿、血清瓶、微量吸管、煤氣燈、Eppendorf、培養皿轉盤、錐形瓶、高壓滅菌釜、Vortex、Rack、製冰機、乾浴器、水浴鍋、電子秤、量筒、秤量紙、牙籤、滅菌釜、冰箱、試管、離心管、針筒及小飛碟、載玻片、蓋玻片、蘇丹三號。

三、實驗藥品與耗材

DPPH清除自由基分析實驗之藥品
ABTS⁺分析實驗之藥品
還原力分析實驗之藥品
PDA培養基

肆、研究過程與方法



伍、研究結果

一、利用DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)清除自由基的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力

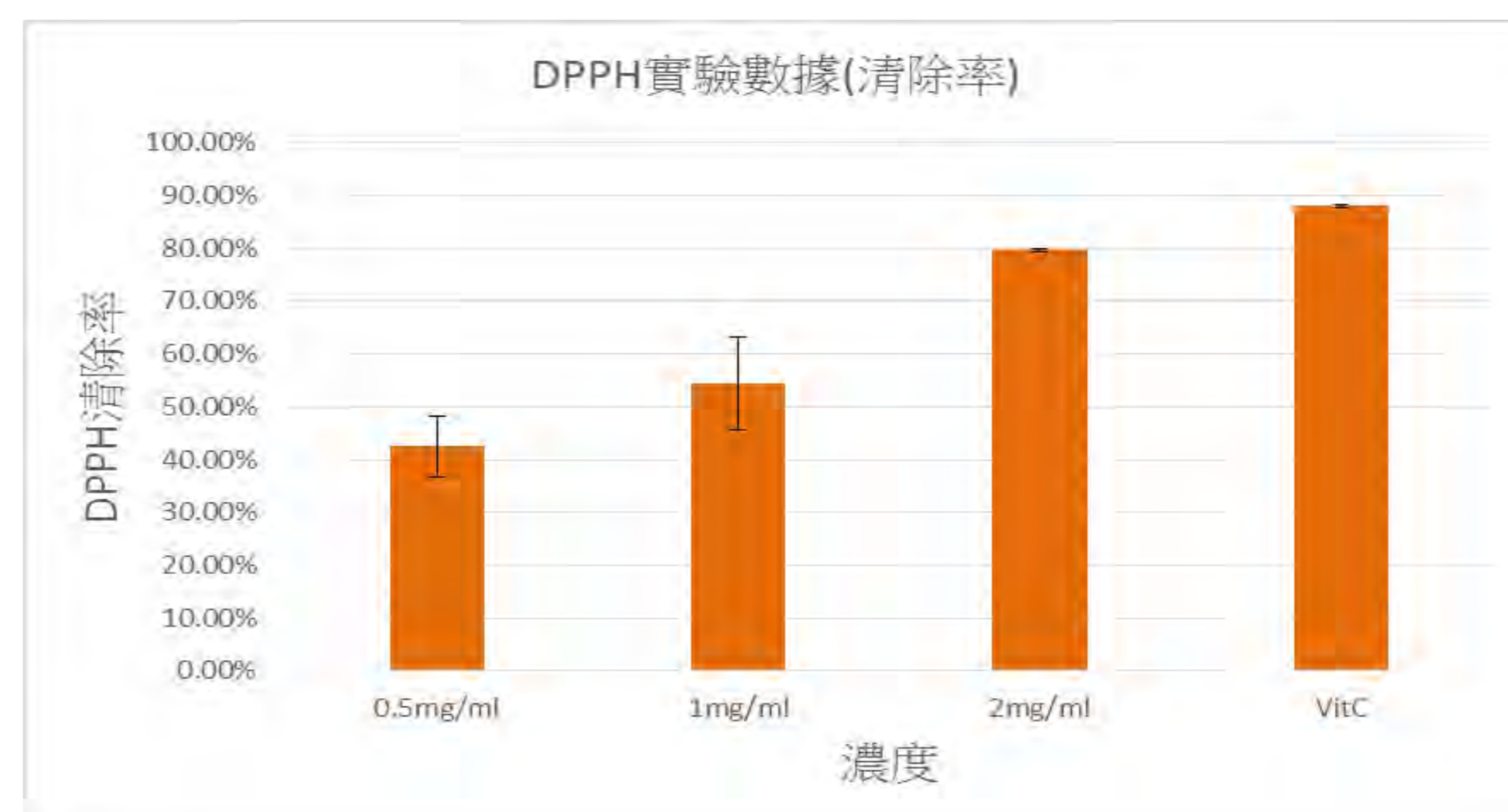
(一) 利用冷凍乾燥和減壓濃縮製備不同濃度之黑豆汁樣品

名稱	照片
廢棄之黑豆水	 黑豆汁原液
減壓濃縮 冷凍乾燥	 黑豆汁減壓濃縮 黑豆汁冷凍乾燥

圖一 利用減壓濃縮和冷凍乾燥製備黑豆汁樣品

由醬油工廠取回之黑豆汁為深琥珀色液體，經減壓濃縮後為黏稠狀之固體，再利用冷凍乾燥後得到黑豆汁萃取物粉末，其萃取率為1.159%。

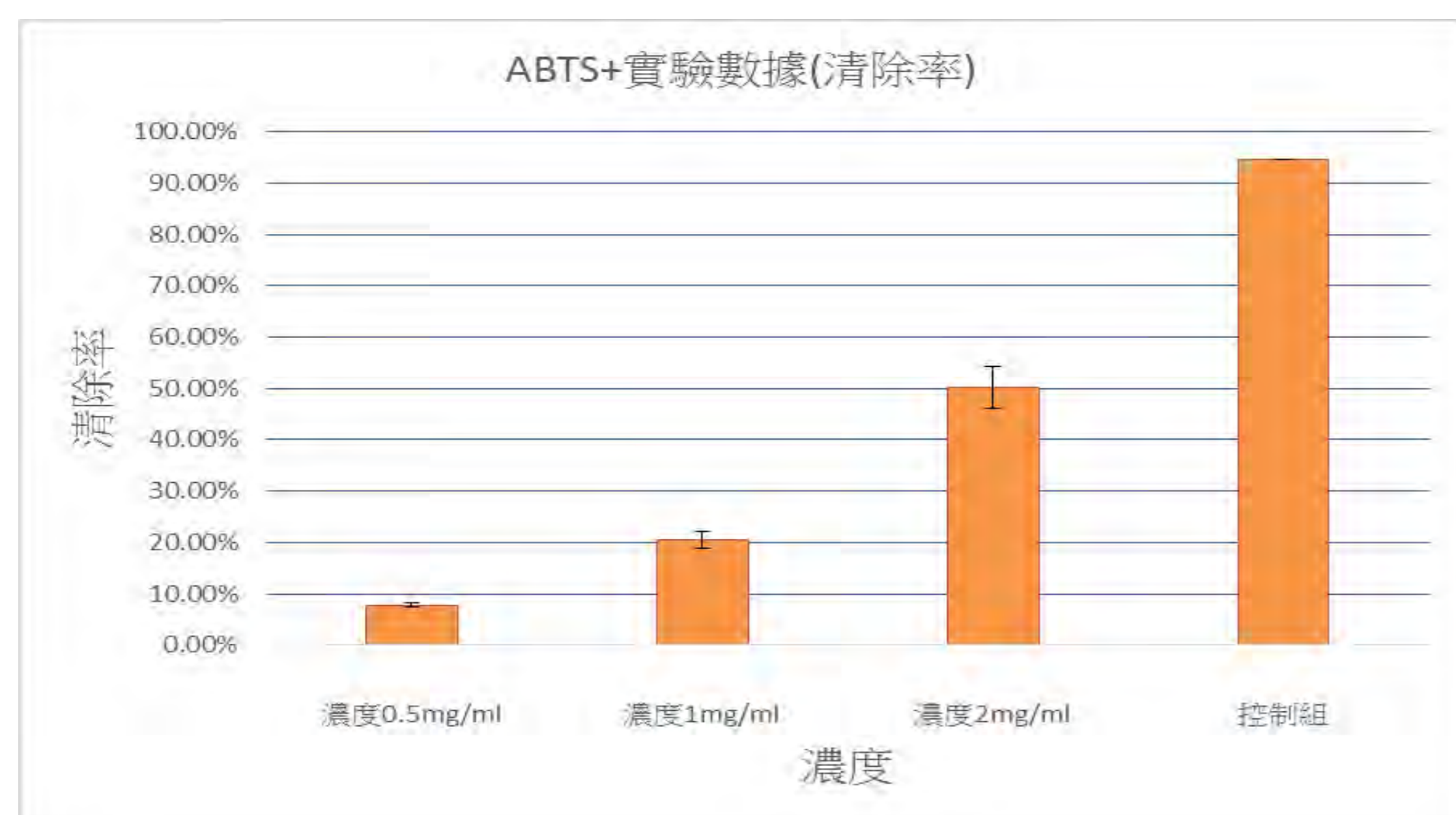
(二) 利用DPPH清除自由基的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力



圖二 不同濃度黑豆汁對於1 mg/mL VitC 溶液之提供氫離子終止自由基的連鎖反應能力

0.5、1、2mg/ml黑豆汁的DPPH自由基清除能力為42.5%、54.4%、79.6%，高濃度2mg/ml 之黑豆汁的DPPH自由基清除力高達79.6%與維生素C對照組88%接近。

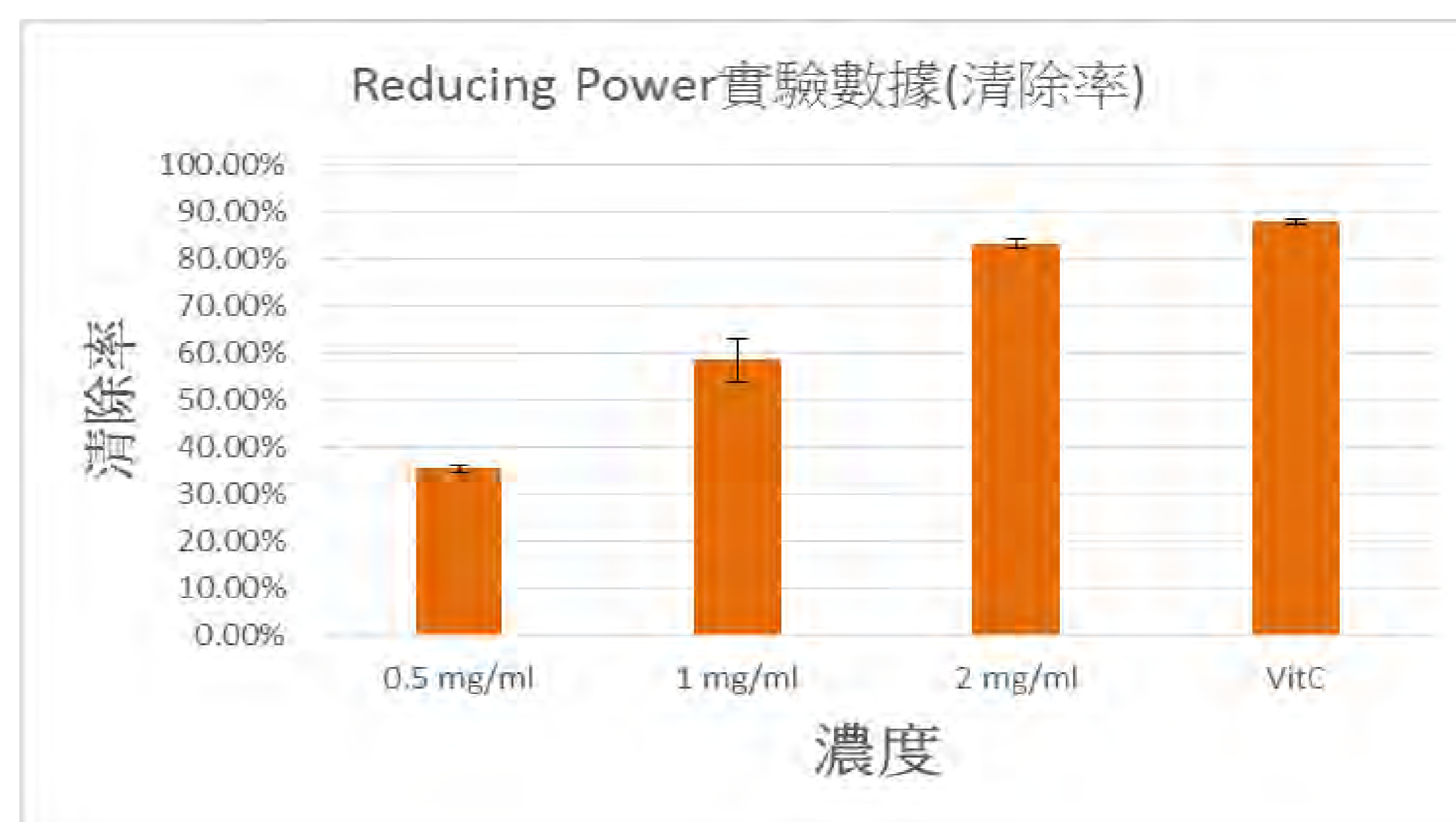
二、利用ABTS⁺ (2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)的分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力：測定固體樣品還原陽離子自由基的能力



圖三 不同濃度黑豆汁之對於8 mg/mL Trolox標準品溶液之還原陽離子自由基的能力

0.5、1、2mg/ml 之黑豆汁清除ABTS⁺陽離子自由基的能力的分別為7.7745%、20.4800%、50.1791%，高濃度2mg/ml 之黑豆汁清除ABTS⁺陽離子自由基的能力達50.1791%，有良好的抗氧化能力。

三、利用還原力 (Reducing power)分析方法檢測黑豆汁萃取物的抗氧化能力

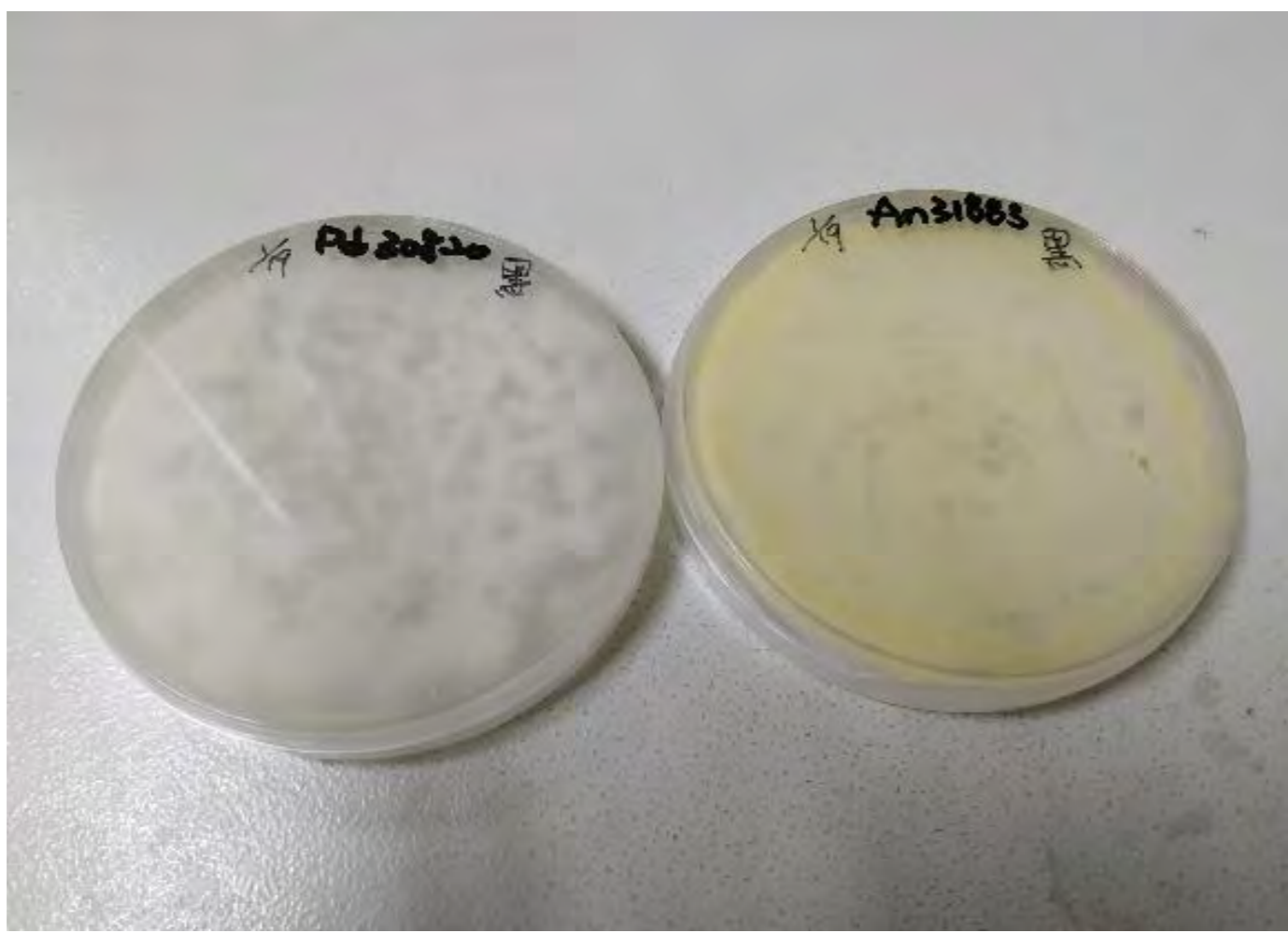
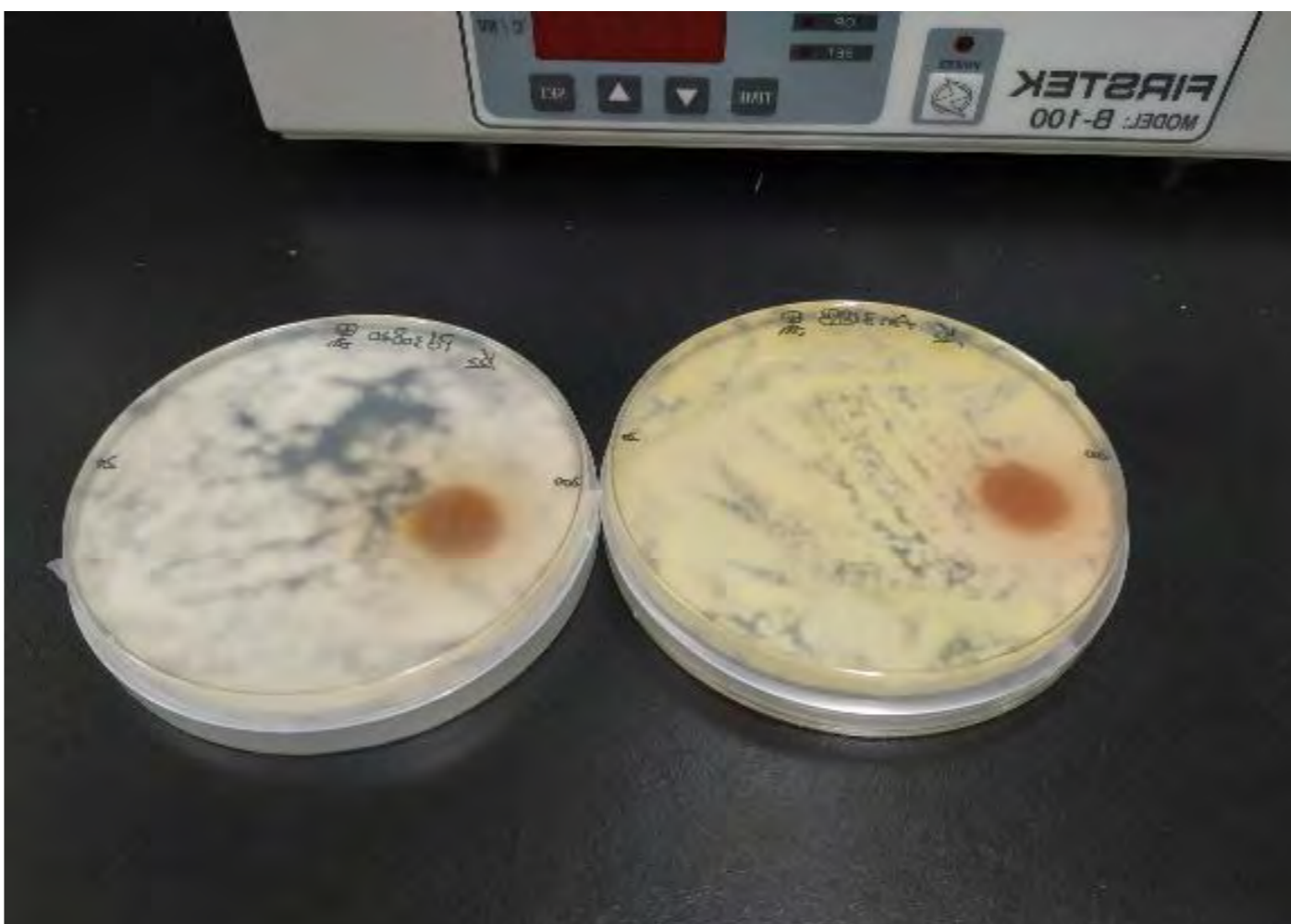
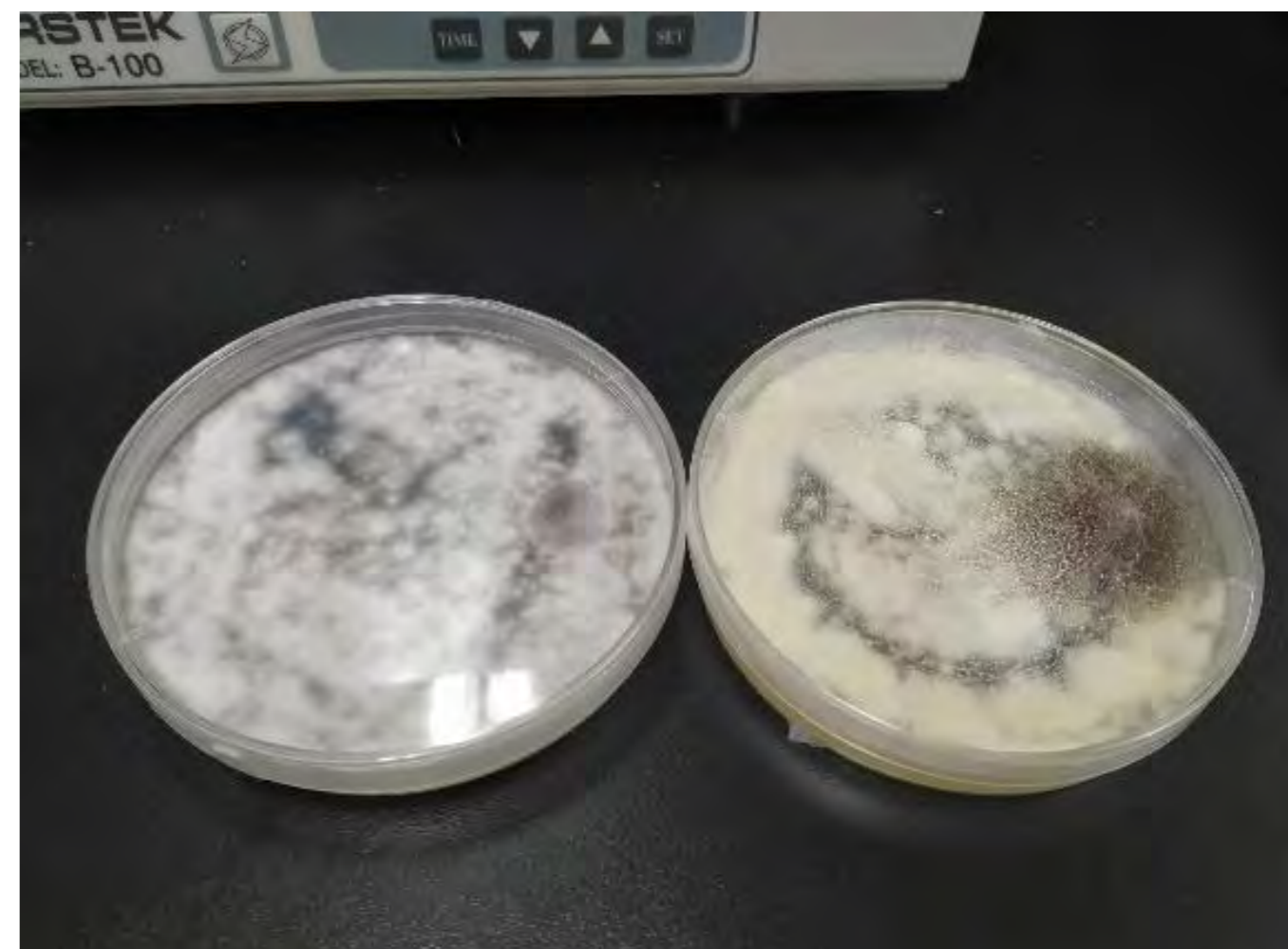


圖四 不同濃度黑豆汁相對1 mg/ml Vit C之還原力

0.5、1、2mg/ml 之黑豆汁相對還原能力的分別為35.45%、58.55%、83.37%，高濃度2mg/ml之黑豆汁的相對還原能力高達83.37%與維生素C對照組88.05%相當。

綜合以上結果，不同濃度黑豆汁萃取物清除DPPH自由基之能力、清除ABTS⁺陽離子自由基的能力、還原能力結果可看出，廢棄的黑豆汁具有良好的抗氧化能力，且隨著黑豆汁濃度的提高，抗氧化能力也明顯上升之現象，因此若能將製成飲品，不僅可達到預防或改善因自由基或氧化物壓力所造成之傷害，還能符合循環經濟效益，亦可以達到廢物再利用的目的。




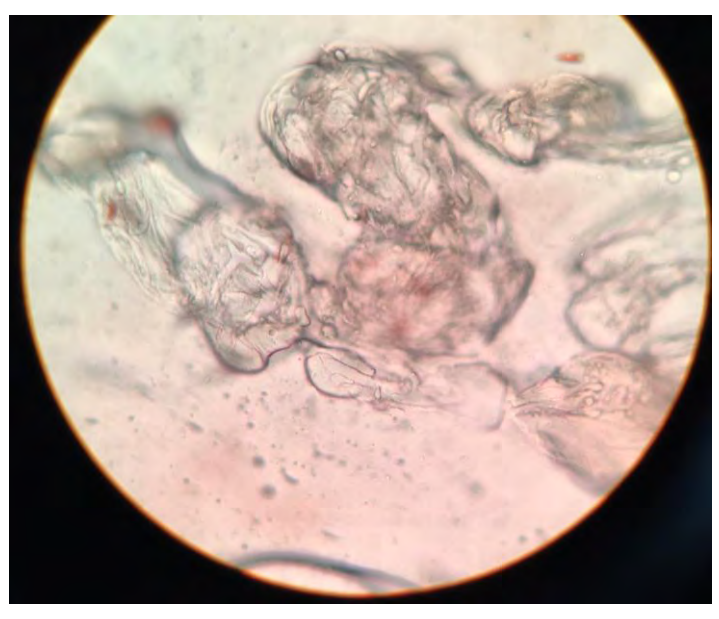
四、黑豆汁萃取物對青黴菌和黑黴菌的抑菌能力檢測

濃度	2 mg/ml	20 mg/ml	200 mg/ml
結果	 左邊黑黴菌；右邊青黴菌	 左邊黑黴菌；右邊青黴菌	 左邊黑黴菌；右邊青黴菌

圖五 黑豆汁萃取物對青黴菌和黑黴菌的抑菌能力

由結果可知，濃度2mg/ml、20mg/ml、200mg/ml的黑豆汁萃取物皆無法抑制黑黴菌和青黴菌的生長，即未有抑菌環出現，故黑豆汁萃取物對黴菌生長沒有影響。黑豆汁不具有抑制黴菌之效果，所以製作飲品的過程必須殺菌處理。

五、觀察黑豆汁萃取物對豬脂肪細胞的影響

濃度	對照組	1 mg/ml	2 mg/ml	20 mg/ml
圖片				
400x				
結果	脂肪細胞呈現圓球狀經蘇丹三號染色後，細胞中央含有油脂的囊泡呈現紅色。	脂肪細胞表面稍有皺縮的現象，經染色後，細胞內亦含有油脂的囊泡呈現紅色。	脂肪細胞表面有皺縮的現象，經染色後，細胞內油脂囊泡的紅色較淺。	脂肪細胞體積縮小，經染色後，細胞內呈粉紅透明狀，有油脂被排出的現象。

圖六 觀察黑豆汁萃取物對豬脂肪細胞的影響

在黑豆汁的作用下，脂肪細胞表面出現皺縮，體積縮小且釋出油脂，並隨著黑豆汁濃度增加，豬脂肪細胞體積明顯縮小並有較多得油脂排出，故推測添加黑豆汁可減少油脂推積在脂肪細胞中。

六、黑豆汁飲品開發與感官品評

表一 黑豆汁飲品之消費者喜好性品評結果

年齡	色澤	香氣	甘甜味	酸味	澀味	整體感覺
20-29	5.47±1.10	5.86±1.12	5.86±1.26	4.50±1.40	5.57±1.09	5.63±1.25

Data are mean scores (1 = extremely dislike, 4 = neither like nor dislike, 7 = extremely like) of consumers.

Data is expressed as means ± SD

由結果可知，除酸味項目(4.50 ± 1.40)普通以外，其餘各項測試之值皆在喜歡以上，其中甘甜味(5.86 ± 1.26)與香氣(5.86 ± 1.12)喜好度最高，整體感覺佳。顯示此黑豆汁飲品於20歲以下之族群，具有高度接受度及良好的喜愛度。接下來擴大不同年齡層的族群進行施測，方能獲得大眾的喜好度與接受度。

陸、討論

- 一、在廢棄的黑豆汁與豬脂肪細胞的實驗中，我們以複式顯微鏡觀察發現，在含有黑豆汁的作用下，脂肪細胞表面開始皺縮，體積縮小且有釋出油脂的現象，經討論後推測細胞縮小，有可能因滲透壓變化造成，但是釋出細胞外的油脂需要進一步設計實驗檢測黑豆汁是否有溶解蛋白質與脂質的功能。
- 二、原本抗氧化實驗設計中，我們利用鐵離子螯合實驗測定固體樣品還原鐵離子的抗氧化能力，但實驗結果無法呈現，因為黑豆汁含大量花青素，而花青素與Ferrozine-Fe²⁺錯合物吸光峰值區間推測同為OD562，會影響檢測出吸光值之準確度，因此無法利用這實驗進行抗氧化性評估。
- 三、文獻資料中黑豆富含大豆異黃酮、低聚糖、皂苷、花青素、天冬素、維生素E等成分，亦具有抗氧化、抗癌、抗肥胖及抗糖尿病等功效。由實驗結果得知廢棄的黑豆汁萃取物具有良好的抗氧化能力，與文獻相同，推測醬油製程中廢棄的黑豆汁亦具有相同的某些成分與效果，需要進一步以高效液相層析法(HPLC)分析收集的黑豆汁成分，以確定其主要功能成分。

柒、結論

- 一、醬油製程中廢棄的黑豆汁萃取物具有良好的抗氧化能力，且隨著濃度提高抗氧化能力也明顯上升
0.5、1、2mg/ml 之黑豆汁的DPPH自由基清除能力分別為42.5%、54.4%、79.6%、清除ABTS⁺陽離子自由基的能力的分別為7.7745%、20.4800%、50.1791%、相對還原能力的分別為35.45%、58.55%、83.37%。故隨著黑豆汁濃度的提高，抗氧化能力也明顯上升且高濃度2mg/ml之黑豆汁抗氧化力與維生素C相當。
- 二、黑豆汁萃取物無抑制黴菌的能力，但具有縮小豬脂肪細胞體積與促進油脂排出的作用
(一)濃度2、20、200 mg/ml的黑豆汁萃取物與黑黴菌和青黴菌作用下，未出現抑菌環，故黑豆汁萃取物無法抑制黴菌生長，所以黑豆汁飲品製作過程中必須殺菌密封。
(二)在豬脂肪細胞實驗中，隨著黑豆汁濃度增加，豬脂肪細胞表面皺縮、體積縮小並有釋出油脂的現象，故推測添加黑豆汁可減少油脂推積在脂肪細胞中。
- 三、黑豆汁感官品評結果優良，適合保健飲品之開發
感官品評的結果可作為產品商品化的參考依據，由調查分析結果可知，顯示添加20%黑糖的黑豆汁飲品於20歲以下之族群，除酸味項目(4.50 ± 1.40)為普通以外，其餘各項測試之值皆在喜歡以上，其中甘甜味(5.86 ± 1.26)與香氣(5.86 ± 1.12)喜好度最高，整體感覺良好接受度高。

綜合以上結果可看出，廢棄的黑豆汁具有優良的抗氧化能力，將其製成黑豆汁飲品，不僅可達到預防或改善因自由基或氧化物壓力所造成之傷害與油脂累積之現象，還能符合循環經濟效益，亦可以達到廢物再利用的目的，具有良好的市場發展潛力。

未來展望

我們將利用TBARS in NRK-52E進行細胞內實驗(in vivo)檢測黑豆汁萃取物在細胞內是否亦有優良的抗氧化能力，進一步以MTT assay分析黑豆汁對於免疫細胞RAW264.7 cell存活率的影響並檢測黑豆汁的抗發炎能力。最後調整黑豆汁飲品，加入枸杞子、龍眼乾、紅棗等的天然食品調配，提高風味與功效，並擴大測試不同年齡層族群的感官品評，以開發成大眾喜歡的健康保健食品，此能將製作醬油過程中廢棄的黑豆汁資源浪費降到最低，達成最大循環經濟效益並發展永續農業的目標。

玖、參考資料

- 一、趙大衛、楊遠波、劉仲康、辛致煒(2014)。第二章生物科學與食品。應用生物(36-46頁)。台南市：翰林出版事業股份有限公司。
- 二、李家維、焦傳金、張春梅、薛如娟、梁光裕(2017)。第二章植物的構造與功能。基礎生物(45-83頁)。新北市：龍騰文化事業股份有限公司。
- 三、DPPH Radical Scavenging Capacity of Phenolic Extracts from African Yam Bean (*Sphenostylis stenocarpa*)。Food and Nutrition Sciences, 2012, 3, 7-13
- 四、Reducing power: the measure of antioxidant activities of reductant compounds? Journal Redox Report. 2004;9(4):213-7
- 五、Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999 May;26 (9-10):1231-7
- 六、Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators Toxicology Reports 2 (2015) 721 - 72
- 七、Neil A. Campbell、Jane B. Reece(2009)。第35章植物的構造、生長與發育。生物學(837-865頁)。台灣培生教育出版股份有限公司，偉明圖書有限公司。
- 八、郭育宏(2015)。水溶性幾丁聚凍飲開發及其抗氧化能力之評估，2015年1月，國立高雄海洋科技大學碩士論文。
- 九、李俊易(2014)。薄葉牛皮消抗氧化、抗菌與抗發炎活性之研究，2015年1月，國立屏東科技大學博士論文。
- 十、丁李雯琪(2014)。何首烏飲品開發與其抗氧化能力之評估。2014年1月，國立高雄海洋科技大學碩士論文。