

燕麥產品中 β -葡聚醣含量分析

吳白玟 謝元容 曾素香 高雅敏 闕麗卿 施養志

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

本研究探討添加不同比例葡萄糖、蔗糖或奶粉等成分之燕麥產品，對以AOAC 995.16方法檢測其 β -葡聚醣含量的影響，及其改善處理情形。檢體之 β -葡聚醣檢測值依葡萄糖添加量增加隨之提高，添加5%以上葡萄糖者，其 β -葡聚醣含量檢測值較未添加者高且有顯著差異。當添加葡萄糖於燕麥檢體之比例大於5%時，宜進行50%乙醇前處理後再測定 β -葡聚醣含量，其檢測值相較於同添加量未經乙醇前處理者穩定且與原燕麥對照組相近。添加奶粉或蔗糖之燕麥檢體，其 β -葡聚醣檢測值與未添加者均無統計差異。

關鍵詞： β -葡聚醣、燕麥、葡萄糖、乙醇前處理

前 言

燕麥及大麥等穀物中含 β -葡聚醣(β -glucan)，依研究顯示具調節血脂及免疫調節之功能⁽¹⁻²⁾，常作為該類產品申請健康食品之功效成分⁽³⁾。適用於穀物顆粒或未加糖之穀類加工品之AOAC 995.16方法⁽⁴⁾，常被援用為分析該項成分之檢驗依據。惟該方法強調若檢體中含高量葡萄糖則需經乙醇溶液前處理後再進行含量測定，但未提及高葡萄糖含量定義，對於含糖等多種成分之燕麥加工產品中 β -葡聚醣含量分析之影響狀況並無詳述。因此本研究探討燕麥產品添加葡萄糖、蔗糖及奶粉，對其 β -葡聚醣含量經AOAC 995.16方法檢測影響情形，以及配合不同濃度乙醇溶液前處理之改善效果。

材料與方法

本研究於試劑及試藥、檢體分析方法及 β -葡聚醣含量計算等，係依據AOAC 995.16方法，並增加乙醇處理步驟之探討。

一、儀器設備

- (一)離心機(Allegra 25R Centrifuge, Beckman Counter, 美國)
- (二)水浴鍋(SB1000, EYELA, 日本)
- (三)酸鹼度計(EL20, Toledo Mettler, 美國)
- (四)分光光度計(Cary 300-Bio UV-Visible Spectrophotometer, Varian, 美國)

二、材料

- (一)市售燕麥片、標示含糖及牛奶之即食燕麥產品及成人奶粉各乙件。
- (二)試驗材料配製
取約50 g燕麥片以粉碎機將其粉碎至可通過0.5 mm篩網(約35 mesh)，經下列調製方式製作粉末檢體(SA)備用。
 1. 5種奶粉燕麥檢體分別為添加0.5克-10克奶粉於燕麥粉末檢體(5克)中，混合均勻，使之奶粉與燕麥比例依次為0.1、0.3、0.6、1及2等。
 2. 5種蔗糖燕麥檢體分別為添加0.5克-10克蔗

糖於燕麥粉末檢體(5克)中，混合均勻，使之蔗糖與燕麥比例依次為0.1、0.3、0.6、1及2等。

3. 8種葡萄糖燕麥檢體分別為添加0.025克-10克葡萄糖於燕麥粉末檢體(5克)中，混合均勻，使之葡萄糖與燕麥比例依次為0.005、0.01、0.05、0.1、0.3、0.6、1及2等。

三、試劑及試藥

(一)葡萄糖、蔗糖、氫氧化鈉、磷酸二氫鈉、醋酸鈉等均為試藥特級以上，Megazyme β -glucan分析套組為Megazyme公司出品(Wicklow, Ireland)。

1. 試藥配製

(1)磷酸緩衝液(20 mM, pH 6.5)

3.12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加900 mL純水溶解，以100 mM氫氧化鈉調整pH至6.5 (約50 mL)，定量到1 L，4°C下儲存(2個月內使用)。

(2)醋酸緩衝液A (50 mM, pH 4.0)

冰醋酸2.9 mL加900 mL純水溶解，以1M氫氧化鈉調整pH至4.0，定量到1 L，加入0.2克sodium azide，4°C下儲存(2個月內使用)。

(3)醋酸緩衝液B (200 mM, pH 4.0)

冰醋酸11.6 mL加900 mL純水溶解，以1M氫氧化鈉調整pH至4.0，定量到1 L，加入0.2克sodium azide，4°C下儲存(2個月內使用)。

(4)Lichenase酵素溶液(50 U/mL in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5)

使用Megazyme β -glucan分析套組。以20 mL磷酸緩衝液(pH 6.5)溶解稀釋為50 U/mL，分裝每管2-3 mL，冷凍-18°C下約24個月有效。

(5) β -glucosidase酵素溶液(2 U/mL in 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.0)

使用Megazyme β -glucan分析套組。以20 mL醋酸緩衝液(pH 4.0)溶解稀釋為2 U/

mL，分裝每管2-3 mL，冷凍-18°C下約24個月有效。

(6)葡萄糖氧化/過氧化酵素試劑(Glucose oxidase/peroxidase reagent, GOPOD)使用Megazyme β -glucan分析套組。

a. 將Glucose reagent buffer (50 mL)以蒸餾水稀釋至1 L。

b. 將Megazyme glucose reagent enzyme (20 mL)溶解後分裝避光低溫儲存(4°C約三個月內有效，使用時不必回溫，冷凍-20°C下約12個月有效)。

2. 葡萄糖檢量線及空白試劑組配製方法

(1)葡萄糖檢量線製作

將葡萄糖標準品儲存液(1.0 mg/mL in 0.2% benzoic acid)以醋酸緩衝溶液(50 mM, pH 4.0)稀釋為50、37.5、25、12.5及5%。取0.2 mL前述標準品溶液(相當於含100、75、50、25及10 μg 葡萄糖)，加入3.0 mL的GOPOD試劑，均勻混合，經50°C水浴20 min後，以分光光度計於510 nm測量吸光值。

(2)空白試劑組

取0.1 mL去離子水、0.1 mL的醋酸緩衝溶液(50 mM, pH 4.0)及3.0 mL的GOPOD試劑均勻混合，經50°C水浴20 min後，以分光光度計於510 nm測量吸光值。

四、分析方法

(一)檢體前處理

取約50 g燕麥片檢體以粉碎機將其粉碎至可通過0.5 mm篩網(約35 mesh)，作為粉末檢體(SA')備用。經本節二、(二)處理之檢體(SA)可省略此步驟。

(二)乙醇處理

精秤80-100 mg粉末檢體(SA或SA')，加入10 mL 10、30、50、78或95%乙醇水溶液，震盪均勻後，80°C水浴10 min，放置5 min平衡至室溫，以1000 rpm離心10 min，去除上清液，沉澱物再以10 mL 50、78或95%乙醇水

溶液重複同步驟清洗一次，作為乙醇處理檢體(SB)備用。

(三)檢體分析組及檢體空白組

1. 80-100 mg粉末檢體(SA或SA')或乙醇處理檢體(SB)，加入0.2 mL 50% v/v乙醇溶液分散檢體，並加入4.0 mL磷酸緩衝液(20 mM, pH 6.5)震盪均勻。
2. 於沸水中水浴2 min，震盪混勻，再次於沸水中水浴3分鐘。於50℃水浴下平衡5 min，加入0.2 mL lichenase (10U)，震盪均勻，50℃水浴60 min，每隔15 min震盪一次。
3. 加入5.0 mL醋酸緩衝液B (200 mM, pH 4.0)震盪混勻。
4. 放置5 min平衡至室溫，以1000 rpm離心10 min，各取0.1 mL上清液於分析試管若檢體呈色後吸光值大於1，則上清液以醋酸緩衝液A (50 mM, pH 4.0)稀釋後再取0.1 mL置於分析試管。
5. 其中一支加入0.1 mL β -glucosidase (0.2U)作為檢體分析組，另一支加入0.1 mL醋酸緩衝液A (50 mM, pH 4.0)作為檢體空白組。50℃水浴10 min。

(四)GOPOD呈色反應

取標準品組、空白試劑組、檢體空白組和檢體分析組，分別加入3.0 mL GOPOD試劑，於50℃水浴反應20分鐘，以分光光度計測O.D. 510 nm之吸光值。

五、檢體 β -葡聚醣含量計算(以葡萄糖計)

(一)葡萄糖重量對吸光值(標準品組吸光值減去空白試劑組吸光值)作圖，得到檢量線 $y = ax + b$

(二) β -葡聚醣(%，W/W)

$$= (\Delta E - b) / a \times \frac{9.4}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \times F$$

ΔE ：檢體分析組吸光值減去檢體空白組吸光值

F：稀釋倍數

W：檢體取樣重(mg)

$\frac{162}{180}$ ：由葡萄糖分子量換算成脫水葡萄糖的分子量比值

六、統計方法

每項三重複數據以SAS分析軟體進行ANOVA變異數分析，若有顯著差異($P < 0.05$)，則進行DUCAN分析。

結果與討論

一、不同成分對 β -葡聚醣含量測定之影響

(一)奶粉影響

奶粉中含高油脂及蛋白質，並不影響以AOAC 995.16方法分析燕麥中 β -葡聚醣含量所使用之酵素作用，無論是否添加奶粉或增加添加奶粉比例，其檢體空白組之吸光值低，並無基質干擾情形，且 β -葡聚醣含量檢測值與未添加者並無統計差異(表一)。

(二)蔗糖影響

蔗糖為加工食品中常見之添加物，其與葡萄糖同為小分子糖類，在AOAC 995.16方法測量 β -葡聚醣含量的過程中蔗糖分子不會被移除，蔗糖為葡萄糖與果糖以 α -(1 $\rightarrow$ 2)鍵結，但無法被 β -glucosidase水解與GOPOD試劑呈色，因此檢體空白組之吸光值低，並無基質干擾現象。無論是否添加蔗糖或增加蔗糖比例，其檢體之 β -葡聚醣含量檢測值與未添加者並無統計差異(表一)。

(三)葡萄糖影響

燕麥片經AOAC 995.16方法檢測之 β -葡聚醣含量之分析過程中，檢體經由懸浮、離心的處理步驟去除澱粉、纖維素等大分子醣類干擾物，並利用lichenase及 β -glucosidase將 β -glucan切成葡萄糖，以GOPOD試劑使葡萄糖呈色。當燕麥中添加葡萄糖，因葡萄糖無法在檢測過程中去除，也會與GOPOD試劑反應造成吸光值上升，且其檢體空白組之吸光值隨葡萄糖添加量增加而提高；為避免檢測值超出分光光度計之線性範圍，導致無法

表一、添加不同比例奶粉、蔗糖或葡萄糖對燕麥檢體之 β -葡聚醣含量檢測值之影響

品項	添加比例*							
	β -葡聚醣含量(g/100 g燕麥片)** (CV%)							
	0	0.005	0.01	0.05	0.1	0.3	0.6	1
奶粉	3.46 ^a (1.20)	—***	—	3.49 ^a (2.15)	3.46 ^a (1.25)	3.51 ^a (1.41)	3.44 ^a (1.01)	3.42 ^a (3.33)
蔗糖	3.43 ^a (1.82)	—	—	3.32 ^a (1.12)	3.46 ^a (3.34)	3.40 ^a (2.06)	3.34 ^a (2.61)	3.50 ^a (0.41)
葡萄糖	3.31 ^a (2.54)	3.42 ^{ab} (2.07)	3.52 ^{ab} (1.45)	3.86 ^b (1.05)	3.87 ^b (4.78)	4.73 ^c (0.84)	3.84 ^b (16.40)	3.60 ^{ab} (10.93)

* 添加奶粉、蔗糖或葡萄糖於燕麥之混合比例

**不同字母符號表示同品項不同檢體間之 β -葡聚醣含量具顯著差異(P < 0.05)

***未試驗

準確偵測吸光值，葡萄糖添加量大於5%之檢體，皆以醋酸緩衝液A (50 mM, pH 4.0)稀釋後，再進行 β -glucosidase處理及GOPOD呈色反應。為使檢體分析組之吸光值介於適當線性範圍內，當添加5%以上葡萄糖之燕麥檢體需經適當稀釋(2-16倍)，添加5%-60%以上葡萄糖檢體之 β -葡聚醣含量檢測值較未添加者(均已扣除空白組吸光值)為高且有顯著差異，而添加60%以上葡萄糖檢體(稀釋8-16倍)之CV值偏高(表一)。

二、不同濃度乙醇溶液前處理之結果

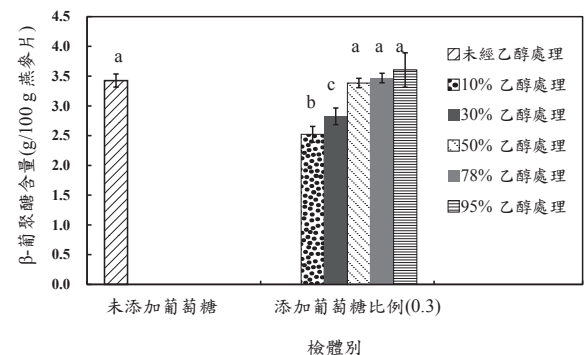
由於不同分子量大小之水溶性醣類分子對乙醇溶液的溶解度不同，分子量大小之水溶性醣類在濃度較低的乙醇溶液即被沉澱，分子量小之醣類分子則在乙醇濃度較高時溶解度才降低，利用此原理，以適當濃度之乙醇溶液前處理步驟，去除檢體中分子量較低之水溶性醣類分子干擾⁽⁵⁾。為改善添加葡萄糖造成燕麥中 β -葡聚醣含量檢測值偏高且CV值大之情況，以添加30%葡萄糖之燕麥檢體為例，比較以不同濃度之乙醇溶液進行前處理，對 β -葡聚醣檢測值之影響。

使用10-95%之5種不同濃度之乙醇溶液，對30%葡萄糖燕麥檢體進行乙醇前處理之結果顯示，經10或30%乙醇溶液處理之30%葡萄糖燕麥檢體其 β -葡聚醣含量較未經乙醇處理且未添加葡萄糖之燕麥檢體為低，並有統計上差異。另以50、78及95%乙醇溶液處理添加葡萄糖之燕麥檢體，其 β -葡聚醣含量與經乙醇處理且未添加葡萄糖

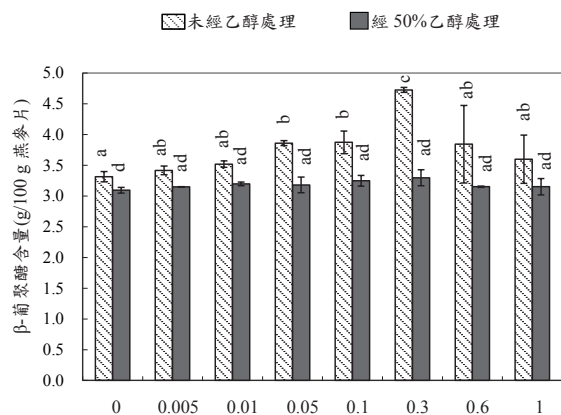
之燕麥檢體皆無顯著差異，表示50、78及95%等3種濃度之乙醇溶液處理效果並無差異。此乃因經10或30%乙醇溶液處理之30%葡萄糖燕麥檢體，於四、(二)之乙醇處理步驟中，去除來自葡萄糖干擾外，部分 β -葡聚醣溶於水而未沉澱，於清洗步驟中流失，使得 β -葡聚醣檢測值較低。考量分析成本及可有效排除葡萄糖干擾效果，選擇50%乙醇溶液作為對含葡萄糖檢體進行前處理之乙醇濃度(圖一)。

三、50%乙醇溶液前處理之改善效果

比較0-100%之8種不同葡萄糖添加量之同濃度燕麥檢體，經50%乙醇處理及未經乙醇處理之效果，當葡萄糖添加比例大於5%之 β -葡聚醣含量檢測值顯示有統計差異，即以50%乙醇溶液處理



圖一、比較添加未葡萄糖之燕麥檢體(0.3 : 1, w/w)以不同濃度乙醇溶液處理情形，不同字母符號表示不同檢體間之 β -葡聚醣含量具顯著差異(P < 0.05)



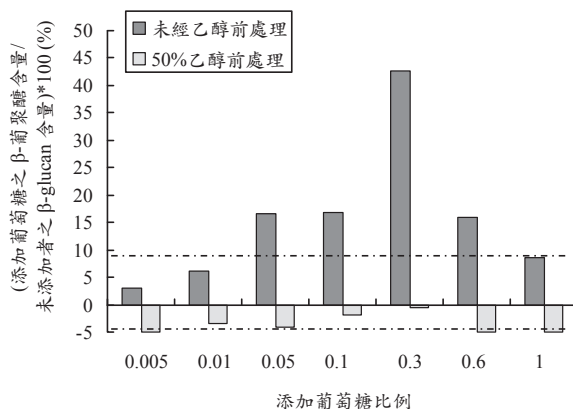
圖二、添加不同比例葡萄糖之燕麥檢體之β-葡聚醣檢測值及經50%乙醇溶液前處理之改善情形，不同字母符號表示與未添加及未經乙醇處理檢體之β-葡聚醣含量具顯著差異(P < 0.05)

添加比例大於5%葡萄糖之檢體，可去除干擾得到穩定之β-葡聚醣檢測值(圖二)，其β-葡聚醣含量檢測值較未添加葡萄糖之燕麥檢體低0.5-5.0%；添加葡萄糖比例大於5%且未經50%乙醇處理者，其β-葡聚醣含量檢測值較未添加葡萄糖者可高達10%以上(圖三)。故當添加葡萄糖於燕麥檢體之比例大於5%時，宜進行50%乙醇前處理後再測定β-葡聚醣含量，其檢測值相較於未處理者穩定且與原燕麥對照組相近。

市售標示含糖及牛奶(未標示含葡萄糖)之即食燕麥產品，分別以AOAC 995.16方法及經50%乙醇溶液前處理所檢測之β-葡聚醣含量，分別為2.64 g/100g及2.32 g/100g，皆於其β-葡聚醣含量標示2.3-3.5 g/100g之內。

結 論

以AOAC 995.16方法檢測添加葡萄糖比例大於5%之燕麥產品其β-葡聚醣檢測值會有高估現象，宜以50%乙醇前處理予以改善。然而添加蔗糖或奶粉均不影響β-葡聚醣之含量測定。



圖三、經乙醇前處理與否之添加葡萄糖之燕麥檢體其β-葡聚醣檢測值與未添加者之差異情形

參考資料

1. Vetvicka, V., Dvorak, B., Vetvickova, J., Richter, J., Krizan, J., Sima, P. and Yvin, J. C. 2007. Orally administered marine (1→3)-beta-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International journal of biological macromolecules*. 40(4): 291-298.
2. European Commission. 2011. Regulation No 1160/2011 - on the authorisation and refusal of authorisation of certain health claims made on foods and referring to the reduction of disease risk. *Official Journal of the European Union*. L296: 26-28.
3. 食品藥物管理署。2013。衛福部審核通過之健康食品一覽表。[<http://consumer.fda.gov.tw/Food/InfoHealthFood.aspx?nodeID=162>]。
4. AOAC. 2005. β-D-glucan in oats, streamlined enzymatic-spectrophotometric method. AOAC Official Method 995.16.
5. McCleary, B. V. and Nurthen, E. 1986. Measurement of (1→3)(1→4)-β-D-glucan in malt, wort and beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 92: 168-173.

Determination of β -Glucan in Oats

PAI-WEN WU, YUAN-JUN HSIEH, SU-HSIANG TSENG, YA-MIN KAO,
LIH-CHING CHIUEH AND DANIEL YANG-CHIN SHIH

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

The individual influence of glucose, sucrose and milk powder on the determination of β -glucan in oat products by the AOAC 995.16 method was studied. The absorption response increased as the glucose amount increased. The detected amounts of β -glucan in oat products had significant differences when more than 5% glucose was added. In this situation, pretreatment with 50% ethanol resulted in steadier data. Added sucrose or milk powder in oat products did not influence the determination of β -glucan.

Key words: μ -Glucan, oat, glucose, ethanol treatment