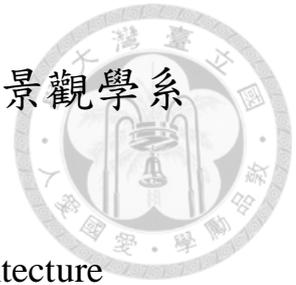


國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系



碩士論文

Department of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

褐化抑制物對結球萵苣主莖創傷後酚類含量變化

之影響

Effect of Browning Inhibitors on Phenolic Contents

in Wound Stem of Iceberg Lettuce

張乃文

Nai-Wen Chang

指導教授：王自存 博士

Advisor : Tsu-Tsuen Wang, Ph.D.

中華民國 105 年 2 月

February, 2016

## 誌謝



能夠完成碩班的種種挑戰首先最感謝的是我的指導教授 王自存老師於這段日子的教導與分享，從研究方向的討論到研究架構、實驗方法、實驗材料上的協助、論文撰寫與修改都耐心地給予指導和啟發，在生活上也常常與我們分享，不論是去果菜拍賣市場或是內湖花市或是聚餐，於此獻上最深的感謝與敬意。論文口試期間，特別感謝口試委員 楊雯如老師 與 林淑怡老師的鼓勵、建議和指正，使得本論文能更加完備，在此獻上感謝。

在實驗上，感謝穎華學姊的各種建議，以及無數次的電話救援；感謝立行彥達在 HPLC 儀器上所有幫助；謝謝榆蓓、偉晴、偉齊、璧甄學姊在實驗上的討論和建議，也謝謝嘉祐學長幫忙尋找藥品。在研究期間，感謝處理室所有人的幫助：超級翻譯機陳昱琬，在這段日子裏的各種當頭棒喝和陪伴；還有萵苣好 partner 楊婕，在切萵苣和磨萵苣時互相扶持，謝謝你們陪我一起走過做實驗和寫論文的日子，另外也感謝安迪郭無與倫比的娛樂效果；謝謝學弟瑪莉擔任切菜小助手和口試記錄員；謝謝歐姊、韋汶、穎華、阿汪學姊，感謝你們的幫忙和在樂華夜市吃炸魷魚的日子；謝謝伯偉的龍門客棧水餃和歌單，陪伴了不知名的夜晚，也感謝你的各種分析；謝謝瑄斐和我一起看冷門電影；謝謝 Leo ho、晨歲、國均、藝綸學長，謝謝你們為我的研究生活增添了色彩。謝謝台大園藝所所有的同學或是在這段日子裏出現的朋友，和我一起跑步、上課、聊天。

最後，感謝我的家人，爸媽和姊姊，還有臭麻吉，感謝你們經濟上與精神上的支持，讓我能專注於課業與研究，並且在回家時可以重新歸零，謝謝你們默默地支持著我。謝謝碩班期間所有的你們，謝謝你們的陪伴和支持，我愛你們。

## 摘要

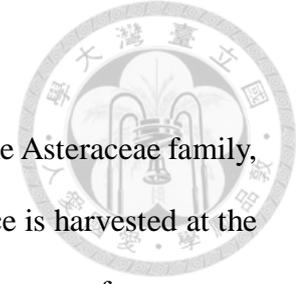


結球萵苣 (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) 為菊科萵苣屬作物，為國內冬季重要的外銷蔬菜。結球萵苣採收時由主莖基部切下，採收切面會於創傷後轉為紅褐色，當結球萵苣以完整葉球販售時，此切面褐化為影響外觀品質與商品價值的重要因素之一。已知創傷萵苣主莖內，受創傷誘導生成之酚類經酵素氧化後會聚合產生褐色物質，因而造成主莖切面褐化；以醋酸或含硫氫基化合物處理後，具有延緩主莖切面褐化之效果，而以含硫氫基化合物處理後會使外觀呈現偏黃色色澤。本研究探討創傷後主要造成結球萵苣主莖切片褐化的酚類物質種類與其含量變化，並進一步比較以不同延緩褐化藥劑處理後，其延緩外觀褐化之效果，以及褐化與酚類物質含量變化之關係。貯藏於 5°C 下之結球萵苣主莖切片，於創傷後第二天維管束即出現褐化徵狀，持續褐化過程中切面逐漸轉為紅褐色，其外觀 a\* 值變化趨勢與切片之總酚類含量、總咖啡酸含量變化趨勢相同，主要於創傷第四天以內增加。創傷後主要生成酚類為綠原酸 (chlorogenic acid)、萵苣酸 (chicoric acid) 與異綠原酸 (isochlorogenic acid)，為易被萵苣多酚氧化酶氧化的基質，並且造成褐化，同濃度下的萵苣酸經氧化後造成褐化的程度大於綠原酸。當綠原酸與萵苣酸同時存在時造成的褐化程度與個別濃度相關，彼此間並無交互關係；類黃酮並非萵苣多酚氧化酶易催化的基質，但與咖啡酸衍生物同時存在時，類黃酮可被醌類氧化並造成褐化。主莖切片創傷後首先生成綠原酸，萵苣酸與異綠原酸則是於創傷第二天後開始生成，三者含量皆於第四天以後達到最高，第四天後綠原酸含量開始下降，其於兩者含量則維持一定。萵苣主莖切片經 3% 醋酸處理後，其外觀可維持白色色澤至貯藏第八天，貯藏期間總酚類、總咖啡酸含量皆不因創傷而上升，顯示 3% 醋酸可抑制創傷後酚類物質生成，因而具有延緩切面褐化的效果。萵苣主莖切片經含硫氫基化合物 N-acetyl-L-cysteine (NAC) 與 L-cysteine hydrochloride (CysH) 以不同濃度處理後，經 2% NAC 處理之切片於創傷後第四天開始褐化且其外觀 a\* 值於第四天後開始上升，第八天切面為橘色；延緩褐化效果較佳的 3% NAC、2% CysH 與 3%

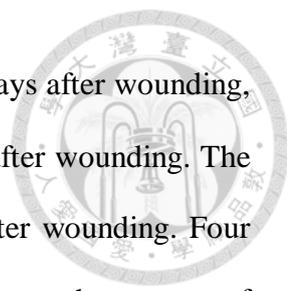


CySH 處理，皆且可延緩切片外觀  $a^*$  值不上升至第八天，第八天外觀具黃色色澤。主莖切片經 NAC 與 CySH 處理後，其延緩創傷後綠原酸、菊苣酸、異綠原酸含量開始上升時間的效果不同，兩種濃度下之 CySH 處理延緩菊苣酸含量上升的效果皆優於 NAC 處理，且 2% CySH 處理延緩綠原酸含量上升的效果也優於同濃度下的 NAC 處理，而 CySH 與 NAC 處理對延緩異綠原酸含量上升之效果相同。CySH 處理延緩莖主莖切片褐化的效果優於 NAC 處理的原因為其延緩菊苣酸與綠原酸含量上升的效果較佳。主莖切片經 NAC 與 CySH 處理後，其總類黃酮含量，除了 3% CySH 處理可延緩至第六天後開始上升，其餘三組皆於創傷第四天後開始上升，與對照組同時。延緩褐化效果較佳的 2% CySH 與 3% NAC 處理組的第八天含量約為對照組的 5 倍，3% CySH 處理組的含量約為對照組的 9.5 倍，而延緩褐化效果較差的 2% NAC 處理組則為對照組的 3 倍。由含硫氫基化合物處理結果顯示，此類化合物處理可藉由延緩咖啡酸衍生物含量上升而延緩外觀褐化，但處理後切片之類黃酮含量高於對照組，並且貯藏後外觀呈現黃色色澤。

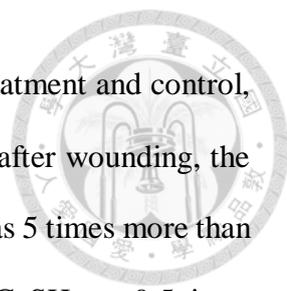
## Abstract



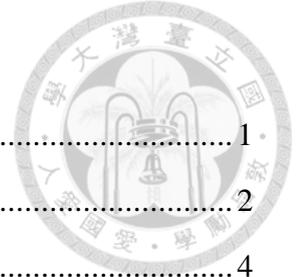
Iceberge lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata), belonging to the Asteraceae family, is an important cool-season crop for export in Taiwan. Iceberg lettuce is harvested at the bottom of stem and the cut surface turns from white to reddish-brown after storage. Browning of cut surface causes the quality loss and market value loss of head lettuce during postharvest. Wound-induced phenolic compounds in wound lettuce stem tissue are oxidized to *O*-quinones by polyphenol oxidase (PPO) and lead to the formation of browning pigment at the cut surface. Researches indicated that acetic acid or sulfhydryl compounds treatment can prevent the browning of cut surface, but sulfhydryl compounds treatment could cause the yellowish appearance of cut surface. In this study, the changes in phenolic compounds content that most contributed to the browning of cut surface after wounding were investigated. Furthermore, the effect of different chemical treatment on alleviating cut surface browning, and the changes in phenolic content of stem disk after wounding were studied in relation to browning. When stem disk of iceberg lettuce were stored at 5°C after wounding, browning appeared first in vascular bundle of stem disk, and then the cut surface turned red-brown. At the same time, the change in  $a^*$  value of stem disk was related to the total phenolic content and the caffeic acid derivatives content. Chlorogenic acid, chicoric acid and isochlorogenic acid were the main phenolic compounds that accumulated in the control stem disk after wounding, and were good substrate for iceberg lettuce polyphenoloxidase (PPO) in vitro. After oxidized by PPO, chicoric acid quinone could cause the deeper browning color than chlorogenic acid quinone. During in vitro oxidizing process, chlorogenic acid and chicoric acid were oxidized independently by PPO. However, flavonoids which are not good substrate for iceberg lettuce PPO could enhance the browning because flavonoids could be non-enzymatically oxidized by caffeic acid derivatives quinones when caffeic acid derivatives



exist. In the stem disk, chlorogenic acid were synthesized within 2 days after wounding, and then chicoric acid and isochlorogenic were synthesized 2 days after wounding. The content of the three caffeic acid derivatives were peak at 4 days after wounding. Four days after wounding, the content of chlorogenic acid declined, whereas the content of chicoric acid and isochlorogenic acid remained. The appearance of 3% acetic acid treated-stem disk maintained white after 8 days of storage, and the total phenolic content and the caffeic acid derivatives content remain low content after wounding. 3% acetic acid treatment could inhibit the phenolic synthesis which was induced by wounding; therefore, it was effective on inhibiting browning. After the stem disks were treated with sulfhydryl compounds, including N-acetyl-L-cysteine (NAC) and L-cysteine hydrochloride (CySH) at concentration of 2% and 3%, the color of wound stem disk turned orange or yellow during 8 days of storage. In 2% NAC treatment, when a\* value of the stem disk increased at 4 days after wounding, the stem disk appeared browning on cut surface, and the stem disk turned orange at 8 days after wounding. In 3% NAC, 2% CySH and 3% CySH treatment, which showed better inhibition of the browning, a\* value of the stem disk remained low during 8 days of storage, and finally the color of the stem disk turned yellow. The NAC and CySH treatments had different effect on delaying the increase in chlorogenic acid, chicoric acid and isochlorogenic acid content. The CySH treatment could delay the increase in chicoric acid content till 8 days after wounding, while the NAC treatment was less effective. 2% CySH treatment was more effective on delaying the increase in chlorogenic acid than 2% NAC treatment. On the delaying the increase in isochlorogenic acid content, the CySH treatments and the NAC treatments had the same effect. Therefore, the main difference of the effect on delaying browning between CySH and NAC treatment was the ability of delaying the increase in chlorogenic acid and chicoric acid content. 3% CySH treatment delayed the increase in flavonoid



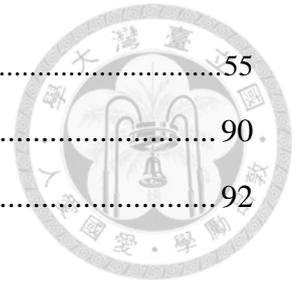
content to 6 days after wounding; In other sulfhydryl compounds treatment and control, the flavonoid content increased at 4 days after wounding. At 8 days after wounding, the flavonoids content in the disk treated with 3% CySH and 3% NAC was 5 times more than that in control; and the flavonoids content in the disk treated with 2% CySH was 9.5 times more than that in control, while the disk treated with 2% NAC treatment was 3 times more than in control. The result of sulfhydryl compounds treatments suggest that it delayed the browning of stem disk by delaying the increase in caffeic acid derivatives content ; however, the treated-disk had higher flavonoid content which affected the browning of stem disk, and finally had yellowish appearance.



## 目錄

誌謝.....	1
摘要.....	2
Abstract .....	4
第一章 前言 .....	13
第二章 前人研究 .....	15
一、 萵苣類蔬菜簡介.....	15
二、 萵苣主莖切面褐化現象 .....	16
三、 創傷與酚類生成.....	19
四、 影響萵苣主莖褐化程度的因子.....	23
五、 延緩褐化反應之處理技術 .....	29
六、 結球萵苣內咖啡酸衍生物質測定.....	31
第三章 材料與方法.....	33
二、 結球萵苣主莖切片與創傷後藥劑處理.....	34
三、 主莖切片外觀褐化變化觀察.....	35
四、 主莖切片酚類組成與含量分析 .....	35
五、 萵苣多酚氧化酶於植物體外氧化酚類標準品 .....	36
第四章 結球萵苣主莖切片創傷後酚類之生成與褐化間之關係 .....	38
一、 以 HPLC 層析方法分離主莖切片內酚類物質 .....	38
二、 確認創傷後萵苣主莖萃取液內主要酚類物質 .....	39
三、 萵苣內多酚氧化酶於植物體外氧化酚類物質與褐化之關係.....	40
四、 創傷後萵苣主莖切片褐化過程中酚類組成變化.....	44
五、 結論 .....	46
第五章 藥劑處理延緩褐化與酚類物質變化之關係.....	48
一、 醋酸處理對創傷萵苣主莖切片中酚類代謝之影響.....	48
二、 NAC 處理對創傷萵苣主莖切片中酚類代謝之影響 .....	49
三、 CySH 處理對創傷萵苣主莖切片中酚類代謝之影響 .....	51
四、 硫氫基化合物處理延緩褐化效果討論.....	52

五、結論.....	55
第六章 總結.....	90
參考文獻.....	92





## 圖目錄

圖 1. 咖啡酸衍生物與類黃酮物質生合成途徑 .....	27
圖 2. 不同褐化抑制溶液處理之主莖圓片在 5°C 下貯藏 8 天期間外觀之變化。 ..	57
圖 3. 創傷後於 5°C 下貯藏第四天之萬苳主莖切片萃取液經 HPLC 分離後偵測波長 320 nm 下所得層析圖。(A. 為主莖萃取液；B. 為標準品綠原酸與菊苳酸) .....	58
圖 4. 創傷後於 5°C 下貯藏第八天之萬苳主莖切片萃取液經 HPLC 分離後偵測波長 320 nm 下所得之層析圖與文獻層析圖比較。(A. 為創傷後主莖切片萃取液；B. 為文獻中創傷後萬苳中肋萃取液；C. 為文獻中創傷後萬苳中肋萃取液內相對應之酚類物質(modified from Tomás-Barberán et al., 1997).....	59
圖 5. 創傷後第八天萬苳主莖切片萃取液經不同 HPLC 梯度分離後之層析圖。(A. 為以 1.2% min <sup>-1</sup> 等梯度進行分離；B. 為以修正後梯度進行分離) .....	61
圖 6. 添加綠原酸與菊苳酸標準品於創傷後第四天之對照組主莖切片萃取液，經 HPLC 分離後所得之層析圖。(A. 為 40 µg/ml 綠原酸標準品與 20 µg/ml 菊苳酸標準品；B. 為創傷後第四天之對照組主莖切片萃取液；C. 為以標準品體積:樣品體積 (1:1) 添加後之混合溶液).....	62
圖 7. 添加綠原酸與菊苳酸標準品於創傷後第八天 3%CySH 處理組主莖切片之萃取液中，經 HPLC 分離後所得之層析圖。 .....	63
圖 8. 添加綠原酸與菊苳酸標準品於創傷後第八天 3%NAC 處理組主莖切片之萃取液中，經 HPLC 分離後所得之層析圖。 .....	64
圖 9. 綠原酸、菊苳酸與類黃酮標準品經結球萬苳葉片內多酚氧化酶氧化後褐化過程外觀之變化，由上而下分別為經過 0、3、10、25、55 分鐘。 .....	66
圖 10. 不同濃度之綠原酸、菊苳酸與芸香苷標準品經結球萬苳葉片多酚氧化酶於植物體外氧化後 40 分鐘之 (A) 溶液外觀 (B) 標準品溶液氧化後顏色值。 ...	67
圖 11. 標準品於波長 200-600 nm 間連續吸收光譜。 .....	68
圖 12. 綠原酸標準品 (20 µg/ml) 經萬苳主莖 PPO (30 U/ml) 氧化過程每隔五分鐘紀錄之吸收光譜變化，(右上)為波長 370-450 nm 間放大。 .....	69
圖 13. 菊苳酸標準品 (20 µg/ml) 經萬苳主莖 PPO (30 U/ml) 氧化過程每隔五分鐘紀錄之吸收光譜變化，(右上)為波長 370-450 nm 間放大。 .....	70
圖 14. 標準品溶液經萬苳葉片 PPO 氧化過程，於反應後 0、15、90、180、300、 .....	71

600、900、1200、1800 秒紀錄波長 270-450 nm 間之吸收光譜。(A.為 20 $\mu\text{g/ml}$ 綠原酸；B.為 20 $\mu\text{g/ml}$ 菊苣酸；C.為 30 $\mu\text{g/ml}$ 綠原酸與 30 $\mu\text{g/ml}$ 菊苣酸之混合溶液)。	71
圖 15. 標準品溶液經葛苣葉片 PPO 氧化過程，於反應後 0、15、90、180、300、秒於 (A)波長 320 nm 與 (B) 410 nm 下吸光值變化。	72
圖 16. 標準品溶液經葛苣葉片 PPO 氧化過程，於反應後 0、15、90、180、300、600、900、1200、1800 秒紀錄波長 270-450 nm 間之吸收光譜。(A.為 20 $\mu\text{g/ml}$ 芸香苷；B.為 20 $\mu\text{g/ml}$ 綠原酸與 20 $\mu\text{g/ml}$ 芸香苷之混合溶液；C. 為 20 $\mu\text{g/ml}$ 綠原酸與 40 $\mu\text{g/ml}$ 芸香苷之混合溶液)	73
圖 17. 標準品溶液經葛苣葉片 PPO 氧化過程，於反應後 0、15、90、180、300、秒於波長(A) 320 nm、(B) 410 nm、(C) 357 nm 下吸光值變化。	74
圖 18. 創傷後葛苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間 a*值與 b*值變化。	75
圖 19. 創傷後葛苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間總酚類含量變化。	76
圖 20. 創傷後葛苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間綠原酸、菊苣酸、異綠原酸 <sup>z</sup> 與主要咖啡酸衍生物總含量變化。(異綠原酸 <sup>z</sup> 由文獻推測定性，並以綠原酸標準曲線換算其濃度)。	77
圖 21. 創傷後經 3%醋酸處理之葛苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間 a*值與 b*值變化。	78
圖 22. 創傷後經 3%醋酸處理葛苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間總酚類含量變化。	79
圖 23. 創傷後經 3%醋酸處理葛苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間綠原酸、菊苣酸、異綠原酸 <sup>z</sup> 與主要咖啡酸衍生物總含量變化。(異綠原酸 <sup>z</sup> 由文獻推測定性，並以綠原酸標準曲線換算其濃度)。	80
圖 24. 創傷後經 2%及 3% NAC 處理之葛苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間 a*值與 b*值變化。	81
圖 25. 經 2%、3% NAC 處理之創傷葛苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間總酚類含量變化。	82
圖 26. 創傷後經 2%、3% NAC 處理之葛苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間綠原酸、菊苣酸、異綠原酸 <sup>z</sup> 與主要咖啡酸衍生物總含量變化。(異綠原酸 <sup>z</sup> 由文獻推測定性，並以綠原酸標準曲線換算其濃度)。	83

圖 27. 創傷後經 2% 及 3% CySH 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間 a* 值與 b* 值變化。.....	84
圖 28. 經 2%、3% CySH 處理之創傷萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間總酚類含量變化。.....	85
圖 29. 創傷後經 2%、3% CySH 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間綠原酸、菊苣酸、異綠原酸 <sup>z</sup> 與主要咖啡酸衍生物總含量變化。(異綠原酸 <sup>z</sup> 由文獻推測定性，並以綠原酸標準曲線換算其濃度).....	86
圖 30. 創傷後經 2%、3% CySH 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間主要總類黃酮含量變化。.....	87
圖 31. 創傷後經 2%、3% NAC 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間主要總類黃酮含量變化。.....	88

## 表目錄

表 1. 高效能液相層析*內綠原酸與菊苣酸標準品之標準曲線的迴歸方程式.....	65
表 2. 標準添加所得之定量誤差 .....	65
表 3. 不同濃度藥劑處理延緩各酚類含量開始上升時間之比較 .....	89



## 第一章 前言



結球萵苣 (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*, iceberg lettuce) 俗稱西生菜、美生菜，為菊科萵苣屬一年生作物。原產於地中海地區，喜冷涼氣候生長，富含多種維生素及礦物元素，具有適合生食及耐貯運的優點，常為沙拉食材之一。

2013 年全世界萵苣及苦苣之總產量為約 2,489 萬公噸，主要生產國家依次為中國、美國、印度、西班牙及義大利等國 (FAO, 2015)。根據聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 統計，近幾年世界蔬菜生產量中，萵苣排名約第 11 位，是全球生產量、食用量最高的蔬菜之一。

近年台灣飲食習慣改變，因此對作為沙拉食用的結球萵苣需求量攀升；台灣冬季適合種植結球萵苣，除可取代十字花科蔬菜生產面積、解決國內冬季蔬菜產量過剩、價格暴跌的問題，此時期適逢日本國內休耕期，因此具有外銷日本的潛力。2002 年由行政院農業委員會成立計畫，輔導農民成立產銷班，並以策略聯盟方式共同生產與運銷，供應國內需求以及外銷。2014 年台灣結球萵苣出口達 11,296 公噸，產值約 28 億新台幣，出口至日本占八成，一成至新加坡，其餘則是出口至韓國、中國大陸、香港、馬來西亞、阿拉伯聯合大公國 (行政院業委員會農業統計資料查詢)。

目前台灣萵苣外銷至日本的主要對象為大型速食業者，經截切後使用，近年來期望將完整葉球的萵苣販售至日本超級市場零售，以擴大日本外銷市場，因此貯藏期間外觀品質的要求提高，其中又以萵苣主莖切面褐化問題最受重視。萵苣採收時於主莖處切下，因採收造成的機械傷害會誘發萵苣重新合成酚類物質，並於切口附近被氧化形成褐色物質，使得萵苣於貯藏期間出現切面褐化 (butt discoloration) 的情形，因而降低商品品質與貯架壽命。

目前減輕萵苣切面褐化的方式可大略分為物理及化學性方法，物理方法可利用改變貯藏環境的大氣組成或熱處理；化學方法則以藥劑處理為主，常用藥劑為有機酸、抗氧化劑、半胱胺酸或其衍生物、含鈣化合物等等，許多研究也深入探討減輕萵苣切面褐化的機制。2000 年 Salveit 提出創傷誘導萵苣組織中酚類代謝改變，



因而造成組織褐化的可能途徑，顯示各種減輕褐化方法可能改變途徑中的某些步驟。洪 (2014) 以台灣生產之萵苣為材料，藉由物理或化學方法減輕主莖褐化程度，主莖圓片經藥劑處理後可以減輕貯藏期間的褐化程度，而使用不同藥劑及濃度則延緩褐化效果不同，其中以半胱胺酸衍生物處理後會改變切面外觀的顏色。本研究將探討創傷後萵苣主莖切片外觀褐化與其酚類組成及含量之關係，並進一步探討萵苣主莖切片，經不同減輕褐化藥劑處理後，其總酚類含量變化、萵苣內主要酚類組成與含量變化，藉此比較不同褐化抑制劑對創傷後萵苣酚類物質與褐化的影響。

## 第二章 前人研究



### 一、萵苣類蔬菜簡介

萵苣 (*Lactuca sativa* L.) 為菊科 (Asteraceae) 萵苣屬一年生草本植物，萵苣屬 (*Lactuca*) 其字根 lac 意即如牛奶般的多汁，而 sativa 則是被栽種之意 (Stearn, 1966)。萵苣最早栽種記錄是在地中海區域，其親本刺萵苣 (*L. serriola*) 原生地則位於地中海東部地區，喜於冷涼乾燥氣候生長 (Decoteau, 2007)。

#### (一) 萵苣種類

Nuez 與 Prohens (2008) 綜合萵苣之葉片型態、大小、質地、結球特性以及莖部形態，將其分為六類：

1. 包被型結球萵苣 (crisphead)：學名為 *Lactuca sativa* var. capitata，又稱 iceberg 或 head lettuce。發育初期葉寬漸大於葉長，葉片形態於 10~12 片本葉期轉為杯狀 (cup-shaped) 並相互重疊，外葉包裹新葉後形成緊實葉球，新葉於葉球內部形成後使葉球更加緊實。其生長適溫為 10~20°C，適合於台灣 10 月至翌年 4 月栽培，冬春季日夜溫差有利於結球，遇高溫則不易結球。
2. 抱合型萵苣 (butterhead)：又稱 cabbage lettuce。與包被型結球萵苣相似，但其結球特性會形成較小且較鬆散之葉球，外葉未完全包覆葉球。於歐洲具有日長敏感度、生長季節不同的栽培種。
3. 羅蔓萵苣 (romaine)：學名為 *Lactuca sativa* var. longifolia，又稱 cos lettuce。其葉子形態較長且外表粗糙，具有明顯較寬的葉肋，因此有質地相對較脆的特性。
4. 葉用萵苣 (leaf or leaf bunching lettuce)：學名為 *Lactuca sativa* var. crispa。其栽培種種類繁多，葉面大小、顏色、葉緣形態多樣；因其開放式生長 (open-growth) 特性，深綠色葉片比例較高，風味較強烈。

- 
5. 嫩莖萵苣 (stem lettuce)：學名為 *Lactuca sativa* var. *angustana* Hort. 或 var. *asparagina* Bailey，又稱 celtuce 或 asparagus lettuce。在花芽分化後，莖部抽長，於開花前採收，其長莖部粗厚且直立，經去皮後可食用。
  6. 拉丁萵苣 (latin lettuce)：又名 grassé lettuce。與羅曼萵苣相似，皆具有直立向上生長的特性，但葉長較短且口感較不脆。葉球頂部有時呈現閉合，質地與 bibb-type butterhead 相似。

## (二) 台灣結球萵苣生產與出口概況

台灣於 2001 年前種植的萵苣以葉用萵苣為主，近年來因飲食習慣改變，作為沙拉食用的結球萵苣需求量攀升，主要仰賴美國與澳洲進口；鄰近台灣的國家，如日本、新加坡、韓國亦為結球萵苣之進口國。台灣冬季適合結球萵苣生長，選擇其作為冬季裏作蔬菜，除了可以供應國內需求外，因適逢日本休耕期因此具有外銷日本的潛力 (何，2006)。另外，以結球萵苣取代十字花科蔬菜種植面積，亦可以解決國內冬季蔬菜產量過剩、價格暴跌之問題。綜合以上因素，2002 年開始由行政院農業委員會擬定計畫，輔導農民成立產銷班，並以策略聯盟方式共同生產與運銷，供應國內需求以及外銷 (何，2006)。

2002 年台灣結球萵苣總生產量合計約有一萬五千公噸，雲林縣為主要生產地，約占總產量之七成。2014 年結球萵苣出口量達 11,296 公噸，產值約為 28 億新台幣，出口至日本占八成，一成至新加坡，其餘則是出口至韓國、中國大陸、香港、馬來西亞、阿拉伯聯合大公國 (行政院農業委員會農業統計資料查詢)。

## 二、萵苣主莖切面褐化現象

褐化為造成完整葉球或輕度加工萵苣於採後貯藏期間品質劣變的主要因素之一 (Ilker *et al.*, 1977; Mateos *et al.*, 1993)。萵苣在田間採收時會由主莖部分切下並保留完整葉球，此一採收切口經過一段貯藏期間後會產生褐化的現象。完整葉球的



品質判斷指標之一即為觀察主莖切面是否產生褐化徵狀，因此延緩主莖切面褐化為目前完整萵苣葉球商品販售時之重要目標。

### (一) 褐化現象

褐化 (browning) 為園產品產生深色或褐色物質使其外觀褐化的現象，依反應過程中是否有酵素參與可分為非酵素型褐化 (non-enzymatic browning) 以及酵素型褐化 (enzymatic browning) 兩類。非酵素型褐化包含梅納反應 (maillard reaction)、抗壞血酸氧化反應 (oxidation of ascorbic acid)、焦糖化反應 (caramelization) 及單寧氧化等 (Mayer and Harel, 1979)，為加工食品中重要之褐化反應；而酵素型褐化則是造成園產品品質劣變與損耗的重要因素之一 (Vámos-Vigyázó, 1981)。

### (二) 酵素型褐化反應

酵素型褐化反應係由於細胞的隔室 (compartmentation) 受到破壞所導致，因胞器完整性遭受破壞後，在有氧的環境下，存在於植物細胞液胞 (vacuole) 內的酚類物質與酵素接觸，受到氧化後形成醌類 (quinone) 物質，醌類物質再以非酵素作用方式與其餘物質共同聚合後，形成黑色素 (melanins) 累積，因而造成園產品褐化 (Toivonen and Brummell, 2008；Yoruk and Marshall, 2003)。

園產品細胞隔室失去完整性的可能原因為老化、失水、生理障礙或碰傷、創傷等機械傷害所導致。老化、失水或生理障礙伴隨產生之褐化現象，主要為貯藏過程中細胞完整性逐漸崩解所導致。園產品在貯藏過程中因失水導致褐化之現象常出現於果實表皮，如：荔枝、紅毛丹 (rambutan) (梁和柯，2012；Landrigan *et al.*, 1996)。低溫導致的寒害也會伴隨褐化現象產生，貯藏過程中細胞完整性因受到生理代謝失調產生的物質影響，而逐漸崩解，因此間接導致酵素型褐化發生，如：發生寒害的香蕉果皮褐化、發生寒害的鳳梨內部果肉褐化 (Pantastico *et al.*, 1976；薛等，2009；)。



結球萵苣採收後之生理障礙主要有褐斑病 (brown stain)、粉紅中肋 (pink rib)、中肋變色 (rib discoloration)與鏽斑病 (russet spotting)，分別由不同環境與內在因子導致。鏽斑病主要是由低濃度乙烯誘導產生 (Morris *et al.*, 1974)，褐斑病則為高濃度二氧化碳誘導產生 (Stewart, 1978)，粉紅中肋則是因採收成熟度過高、貯運時間過久或高溫貯藏導致。

除了因老化、失水、生理障礙導致細胞完整性逐漸崩解，進而發生褐化外，園產品經碰撞、採收創傷或截切後，傷口附近細胞結構因立即遭受破壞，亦會發生酵素型褐化。常見的截切水果，如：蘋果、西洋梨，因其組織內具有一定量的酚類物質，於截切後數個小時內，其截切表面即會產生明顯的褐化現象；而相對酚類含量較低之萵苣，截切後必須貯藏一段時間後才會出現截切邊緣褐化的現象，主要原因為萵苣受創傷後會重新合成酚類物質，作為酵素型褐化之基質 (Ke and Saltveit, 1989)。

### (三) 多酚氧化酶

Burton (2003) 將具有氧化能力的酵素分為三大種類：和氧酶 (oxygenases)、氧化酶 (oxidases)、過氧化酶 (peroxidases)。Oxidase以氧分子作為電子接收者，並產生含氧高活性中間物 (reactive oxygen intermediate)，因此具有氧化能力；Peroxidase以過氧化氫作為電子接收者，於酵素內產生帶有自由基的原血紅素基 (heme-group)，再利用這些含氧高活性中間物氧化具有還原力的基質。氧化酶 (oxidases) 與過氧化酶 (peroxidases)，為藉由含氧高活性中間物氧化基質，因此相對oxygenase的氧化反應較不專一，氧化後的產物也較複雜。

Oxygenase則是利用氧分子，將一個氧原子或氧分子接入反應物的結構中，並且對反應物較專一。植物內可氧化酚類物質的酵素包含了屬於oxygenase的多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO, EC. 1.14.18.1)、漆氧化酶 (laccase)、脂氧酶 (lipoxygenase, EC. 1.13.11.12) 以及過氧化酶 (peroxidases, EC. 1.11.1.7)，而與園產品褐化相關的酵素主要為多酚氧化酶 (polyphenol oxidase) 與過氧化酶

(peroxidases) (Toma's-Barbera'n and Espi'n, 2001)。

過氧化酶 (peroxidases, POD, EC. 1.11.1.7) 參與褐化的程度仍不明瞭。在園產品內，過氧化酶將酚類物質氧化之能力受到過氧化氫濃度的限制，組織內PPO相對活性較高，故在一般情形下，PPO氧化酚類物質能力優於POD。但PPO與POD同時存在時具有協同效果 (synergistic effect)，當PPO氧化酚類過程中會產生過氧化氫，而於此種狀況下，POD即可利用過氧化氫以氧化酚類物質；另外POD也可利用PPO作用所產生之半醌中間體 (semiquinone intermediate) 代替過氧化氫作為電子接收者 (Murata *et al.*, 2002；Richard-Forget and Gauillard, 1997) 以進行氧化作用。因此在園產品內主要將酚類氧化之酵素為多酚氧化酶，但仍不能排除過氧化酶可能參與褐化之影響。

多酚氧化酶 (EC. 1.14.18.1) 為一群可將多酚類氧化成醌類 (*o*-quinone) 之酵素，主要存在於類囊體 (thylakoid) 膜上，其三級結構中含有銅離子作為輔基 (cofactor) 構成酵素的活性部位 (active site)，催化最佳的pH值範圍為5-7。多酚氧化酶主要作用的基質為酚類，在有氧環境下將酚類氧化為醌類，可依序分為兩步驟反應：(1)將單酚羥化為雙酚 (hydroxylation of monophenols to *O*-diphenols) (2) 將雙酚氧化為醌類 (oxidation of monophenols to *O*-quinone)。羥化反應的催化速率相較氧化反應較慢，產生無色雙酚類；氧化反應則產生有顏色的醌類物質 (Toivonen and Brummell, 2008)。

醌類為具有高活性的親電子分子 (electrophilic molecules)，易與自身或其他物質結合，如氨基酸、胜肽、蛋白質或醣類分子，聚合成高分子聚合物—黑色素，此為造成園產品褐色、紅色外觀之主要因子 (Mai and Glomb, 2013；Bittner, 2006)。

### 三、創傷與酚類生成

酚類物質為酵素型褐化反應之基質，而植物生合成酚類的關鍵步驟酵素—苯丙胺酸氨基裂解酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL, EC 4.3.1.24; Formerly EC

4.3.1.5)，其活性會因植物遭遇逆境而改變 (Dixon and Paiva, 1995)。

Ke 與 Salveit (1989) 指出結球萵苣中肋創傷後，多種酚類含量增加，經氧化後造成褐化現象，推測受傷的組織會產生創傷信號，此創傷信號會誘導 PAL 活性提高，進而使酚類含量增加。PAL 活性受影響程度隨距創傷位置增加而減少，且創傷程度越高則 PAL 活性越高 (Ke and Saltveit, 1989)。

#### (一) 創傷與創傷信號

創傷為一種植物逆境，當植物細胞或組織遭受破壞後，將影響生理代謝、增加失水速率，並使微生物較容易由傷口入侵，因此創傷發生後植物會修復受傷組織並產生防禦反應。植物於傷口處產生創傷信號後，信號傳遞至傷口附近組織以及全株植物，引發受傷部位的防禦反應 (defense response) 或系統防禦反應 (systemic defense response) 或者兩者皆有之。創傷信號可引發創傷相關基因表現，使受傷組織復原並進一步誘發防禦機制避免植物再次受到傷害，而創傷誘導的防禦反應包含：產生不具專一性防禦的酚類、蛋白酶抑制因子 (proteinase inhibitor) 或水解酵素 (hydrolytic enzyme)、生成植物防禦素 (phytoalexin) 來控制微生物入侵 (León *et al.*, 2001 ; O'Donnell *et al.*, 1996)。

植物中主要的創傷訊號為茉莉酸 (jasmonate)、甲基茉莉酸 (methyl jasmonate)、寡胜肽系統素 (oligopeptide systemin)、水楊酸 (salicylic acid)，另外如：離層酸 (abscisic acid)、乙烯 (ethylene)、寡糖 (oligosaccharide)、過氧化氫 (hydrogenperoxide) 於不同物種內亦可做為創傷訊號，並且創傷訊號間可能具有互關係 (cross talk)，進而引發不同防禦反應 (León *et al.*, 2001 ; O'Donnell *et al.*, 1996)。

Ke 與 Salveit (1989) 推測在萵苣中肋受到創傷後，會產生創傷信號使 PAL 活性上升，並以 PAL 活性受到影響範圍推測此創傷信號以  $5 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$  的速率向外擴散約 2.5 cm，且 PAL 活性受影響程度隨創傷距離增加而減少，並且創傷程度越高則 PAL 活性越高 (Campos-Vargas and Saltveit, 2002 ; Kang and Saltveit, 2003 ; Ke and

Saltveit, 1989)。部分植物於創傷後會生成大量乙烯並且誘發酚類生成，而萵苣於創傷後生成之乙烯量相對其他植物較微量，且其含量於創傷後 24 小時內會回復至創傷前之生成量 (Ke and Saltveit, 1989)。經 1-MCP (1-methylcyclopropene) 處理的萵苣於創傷後仍生成大量酚類並產生褐化現象，顯示萵苣於創傷後生成之微量乙烯並非主要的創傷信號 (Saltveit, 2004)。

創傷後萵苣藉由細胞膜上的磷脂訊號途徑 (phospholipid-signaling pathway) 產生創傷信號。磷脂訊號途徑 (phospholipid-signaling pathway) 為植物產生創傷信號茉莉酸 (jasmonate acid) 之途徑，對未創傷的完整萵苣外施濃度 1 mM 以下茉莉酸 (jasmonate) 或甲基茉莉酸 (methyl jasmonate) 並無法誘導 PAL 活性上升 (Campos-Vargas and Saltveit, 2002)；而藉由藥劑 1-phenyl-3-pyrazolidinone (1P3P)、diethyldithio-carbamic acid (DIECA)、正丁醇 (1-butanol) 或水楊酸 (salicylic acid) 抑制磷脂訊號途徑之中間產物生成後，可以使 PAL 活性及酚類含量不因創傷而上升，而延遲藥劑施用的時間則會使其抑制效果降低。上述結果顯示萵苣內並非以茉莉酸與甲基茉莉酸做為創傷信號，而是以磷脂訊號途徑的中間產物做為創傷信號 (Saltveit, 2005)。

## (二) 萵苣創傷後 PAL 活性變化

苯丙胺酸氨基裂解酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL, EC 4.3.1.5) 為植物利用苯丙胺酸 (phenylalanine) 生成 phenylpropanoid 的酵素，為植物生成二次代謝物酚類物質的關鍵步驟酵素。

PAL 催化苯丙胺酸裂解去氨基化 (deamination)，並生成反式肉桂酸 (*trans*-cinnamic acid)，而反式肉桂酸可再被植物轉化成其他酚類物質，如：酚酸 (phenolic acid)、木質素 (lignin)、類黃酮 (flavonoids)、花青素 (anthocyanins)、縮合丹寧 (condensed tannins) 等等。

PAL 為研究植物對逆境反應的重要關鍵酵素。在許多逆境環境下，植物會重



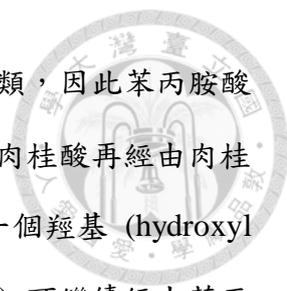
新生合成 PAL，藉此生成相對應的酚類來適應逆境，例如：當植物受到病原菌入侵時可能會生成香豆素 (coumarins) 或異黃酮 (isoflavones) 防禦，其他逆境如：創傷、紫外線照射、低溫、乙烯逆境，或是在缺氮、缺鐵、缺磷的情形下，也會生成相對應的酚類物質 (Dixon and Paiva, 1995)。植物遭遇逆境時，PAL 的表現亦受到各種與逆境相關的植物賀爾蒙調控，如：乙烯 (ethylene)、茉莉酸 (jasmonate)、甲基茉莉酸 (methyl jasmonate)、水楊酸 (salicylic acid) 等等 (Lafuente *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006)。

經 RT-PCR 分析，羅曼萵苣中肋具有可經創傷誘導的 PAL 基因 (*LsPAL1*)，10 °C 貯藏下，其轉錄表現於創傷後 12 小時達到最大，並且主要於傷口附近的表皮組織及維管束組織表現，PAL 活性則接續於創傷後 24 小時達到最大 (Campos *et al.*, 2004)。顯示萵苣於創傷後，創傷信號會誘導 PAL 基因 (*LsPAL1*) 表現，重新生成 PAL，使 PAL 活性上升。

### (三) 酚類物質合成途徑

次級代謝物可分成三類：酚類 (phenolics)、萜類 (terpenoids) 及含氮物質 (nitrogen-containing compounds)，次級代謝物在植物內並不直接參與生長與發育，其功能主要是用來抵禦草食動物或微生物感染、吸引動物幫助受粉或傳播種子、作為植物間競爭的物質或吸引微生物共生。於高等植物中，大部分酚類物質主要由莽草酸途徑 (shikimate pathway) 之終點產物—苯丙胺酸 (phenylalanine) 轉換而來，初級代謝 (primary carbon metabolism) 所產生的赤藻糖-4-磷酸 (erythrose-4-phosphate) 以及磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate) 經由莽草酸途徑後，可轉換為屬於芳香族胺基酸 (aromatic amino acid) 的苯丙胺酸 (phenylalanine) 與酪氨酸 (tyrosine)。

苯丙胺酸 (phenylalanine) 經苯丙胺酸氨基裂解酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL, EC 4.3.1.24; Formerly EC 4.3.1.5) 催化脫去氨基 (amino group) 後生成



反式肉桂酸 (*trans*-Cinnamic acid)，此為植物體內最初生成的酚類，因此苯丙胺酸氨基裂解酶 (PAL) 被視為植物生成酚類的關鍵步驟酵素。反式肉桂酸再經由肉桂酸 4-羥化酶 (cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H) 於苯環上接上一個羥基 (hydroxyl group) 轉變為香豆酸 (*p*-coumaric acid)。香豆酸 (*p*-coumaric acid) 可繼續經由苯丙途徑 (phenylpropanoid pathways) 生成木質素 (lignin) 前趨物、咖啡酸以及咖啡酰基衍生物 (caffeoyl derivatives)，如：綠原酸 (chlorogenic acid)；香豆酸輔酶 A (*p*-poumaric acid-CoA) 經查耳酮合成酶 (chalcone synthase) 即可生成查耳酮 (chalcone) 作為可衍生為類黃酮 (flavonoids)、花青素 (anthocyanins)、縮合丹寧 (condensed tannins) 的基本結構 (Taiz and Zeiger, 2006)。

#### 四、影響萵苣主莖褐化程度的因子

影響園產品創傷後褐化的程度可分為三個因素：(1)氧化基質：酚類的含量與種類、(2)多酚氧化酶活性、(3)氧化產物的褐化聚合環境

##### (一) 多酚氧化酶活性與褐化關係

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 為園產品內主要進行酵素型褐化反應之酵素，但 PPO 活性大小與創傷後褐化程度並無相關性 (Cantos *et al.*, 2001；Hisaminato *et al.*, 2001)。

Ke 與 Saltveit (1989) 指出萵苣內 PPO 活性並不受創傷影響，在萵苣中肋原本組織內或創傷後組織內的 PPO 皆有很高的活性，約為 PAL 活性的 100 倍且作用快速，因此創傷後生成之酚類皆足以被 PPO 氧化。

PPO 主要以兩種狀態存在於細胞內，分別為游離態 (soluble form) 或於類囊體膜上 (thylakoid membrane-bound)，於萵苣內以此兩種狀態存在之 PPO 的比例各占一半，創傷後於 5°C 下貯藏七天後只有少部份轉變為游離態，因此 PPO 存在狀態與創傷後褐化不具有相關性 (Cantos *et al.*, 2001)。萵苣組織內約有 57.5%-72% 的 PPO



以潛伏狀態 (latent form) 存在，於創傷後，細胞膜降解導致脂肪酸的釋放，並活化潛伏狀態的PPO，因栽培種的不同，於5°C下約需3.7~6.3天可達到PPO最大活性，同時間PPO總量並未增加，創傷後並未重新合成PPO，因此在創傷後PPO活性增加之主要原因為部分潛伏狀態的PPO被活化，即使萵苣中肋於創傷後PPO活性會隨貯藏期間增加，但品種間褐化程度與PPO活性並沒有相關性 (Mayer, 1986; Cantos *et al.*, 2001)。Hisaminato等 (2001) 也指出萵苣中肋經創傷後三天，PO活性與外觀褐化程度則無相關性，顯示PPO活性並非影響褐化程度的主要因素 (Cantos *et al.*, 2001; Hisaminato *et al.*, 2001)。

雖然PPO活性並非影響萵苣創傷後褐化程度的主要因素，但為造成褐化的必要因子，因此仍可以抑制PPO活性達到延緩褐化發生的效果。

## (二) 創傷後PAL活性與褐化關係

萵苣原有酚類含量不足以造成嚴重的褐化，因此於創傷後短時間內不會出現褐化的現象，但因創傷所產生的創傷訊號誘導PAL活性上升，進而使組織內酚類含量增加，經過多酚氧化酶氧化後，始產生嚴重褐化的現象 (Ke and Saltveit, 1989)。

創傷後PAL活性大小與活性上升所需時間受到創傷程度及貯藏溫度影響，並且創傷後PAL活性與外觀褐化程度具有相關性 (Hisaminato *et al.*, 2001; López-Gálvez *et al.*, 1996)。萵苣中肋以截切大小作為其創傷程度的區別，將截切大小由2.5×12 cm縮小至1×0.5 cm，PAL活性在5°C與10°C下分別提高2.5倍與3倍，顯示創傷程度越高，則其PAL受誘導後活性越高；創傷後在5°C下，PAL活性約於三天內達到最大，在10°C下則於一天內即可達到最大活性，並且在24小時內下降至原本活性大小，顯示在10°C下溫度較高時PAL活性變化較快，但活性大小與5°C下差異不大 (López-Gálvez *et al.*, 1996)。

2-Aminoindan-2-phosphonic acid (AIP) 為對PAL具有專一性的競爭型抑制劑，並且對萵苣PAL也有相同的抑制效果，在4°C下以10 mM AIP溶液浸泡可抑制PAL活性上升與組織內酚類含量上升，並且可以有效抑制萵苣中肋褐化，顯示控制創傷後



酚類生成為抑制褐化的關鍵因素(Hisaminato *et al.*, 2001 ; Peiser *et al.*, 1998)。

### (三) 創傷後萵苣生成酚類種類

創傷後萵苣內 PAL 首先催化生成反式肉桂酸 (*trans*-cinnamic acid)，此為植物生成最初之酚類，經過苯丙途徑 (phenylpropanoid pathway) 可生成其他同樣為 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> 結構的 hydroxycinnamic acid，如：阿魏酸 (ferulic acid)、芥子酸 (sinapic acid)、咖啡酸 (caffeic acid)，於植物內通常與有機酸酯化或以糖苷 (glycoside) 形式存在，形成 hydroxycinnamic acid derivatives，如：與奎寧酸 (quinic acid) 酯化形成的綠原酸 (chlorogenic acid)、與酒石酸 (tartaric acid) 酯化形成的卡夫塔酸 (caftaric acid) 與菊苣酸 (chicoric acid)，另外也會與蛋白質或細胞壁結合，只有少部分會以自由酸 (free acid) 的形式存在細胞 (Clifford, 2000)。

萵苣在創傷後生成的主要酚類為咖啡酸衍生物，雖然於結球萵苣葉內原本就含一定量之類黃酮，但因含量相對較創傷生成之咖啡酸衍生物較少，對創傷引起的褐化影響不大。結球萵苣葉內之類黃酮主要為槲皮素配醣體 (quercetin glycoside) 與木樨草素配醣體 (luteolin glycoside)，約含有 0.3 µg/g FW，創傷後含量會減少 (DuPont *et al.*, 2000 ; Mai *et al.*, 2013)。

#### (1) 與奎寧酸酯化之咖啡酸衍生物

綠原酸 (5-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid) 於許多植物內皆生成，如：番茄 (*Solanum lycopersicum*, tomato)、煙草 (*Nicotiana tabacum*, tobacco)、蘋果 (*Malus domestica*, apple)、西洋梨 (*Pyrus communis*, pear)、咖啡 (*Coffea arabica*, coffee) 與朝鮮薊 (*Cynara scolymus* L., artichoke) 等等。綠原酸在各物種內的合成路徑不盡相同，萵苣內是由 hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase (HQT) 利用 caffeoyl-CoA 與 quinic acid 生成綠原酸 (Hisaminato *et al.*, 2001 ; Ricarda *et al.*, 2004 ; Steck, 1968 ; Tomás-Barberán *et al.*, 1997)。在萵苣內綠原酸具有其他同分

異構物 (圖 1)，如: neochlorogenic acid (3-*O*-caffeoylquinic acid)、kryptochlorogenic acid (4-*O*-caffeoylquinic acid) (Clifford, 2000)。兩個 caffeoyl-CoA 與奎寧酸酯化之咖啡酸衍生物 (di-esters of caffeic acid) 可生成異綠原酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid, isochlorogenic acid) (Tomás-Barberán *et al.*, 1997)。

## (2) 與酒石酸化酯化之咖啡酸衍生物

菊苣酸 (dicaffeoyltartaric acid, chicoric acid)，為酒石酸 (tartaric acid) 與兩個 caffeoyl-CoA 酯化的咖啡酸衍生物，其生合成路徑由一個 caffeoyl-CoA 與酒石酸酯化產生的 caffeoyltartaric acid，再接上一個 caffeoyl-CoA 即生成菊苣酸 (圖 1)。菊苣酸與異綠原酸其結構較綠原酸複雜，生合成所需的催化步驟較多。

## (3) 咖啡酸衍生物與 PPO 親和性

酚類為 PPO 主要作用的基質，但 PPO 對不同酚類的專一性會因栽培種而異，例如：不同葡萄栽培種中的多酚氧化酶對咖啡酸 (caffeic acid)、綠原酸 (chlorogenic acid)、兒茶酚 (catechol)、兒茶素 (d-catechin) 親和性不同 (Yoruk and Marshall, 2003)。由  $K_m$  值大小來判斷對基質的親和性，結球萵苣內的 PPO 對綠原酸與咖啡酸的親和性大於兒茶酚與兒茶素；同時考慮親合性與催化速率， $V_m/K_m$  值以綠原酸最高，為兒茶酚與兒茶素的三倍，以咖啡酸的  $V_m/K_m$  值最小，顯示相對類黃酮，綠原酸為萵苣內極易被 PPO 氧化的酚類 (Altunkaya and Gökmen, 2008)。

## (四) 創傷後咖啡酸衍生物含量變化

不同種類的萵苣於創傷後主要生成酚類的種類及組成各不相同。萵苣中肋組織於創傷後三天，羅曼萵苣、結球萵苣、butter leaf 皆生成 caffeoyltartaric acid、菊苣酸 (3,5-dicaffeoyltartaric acid, chicoric acid)、綠原酸 (chlorogenic acid)、異綠原酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid, isochlorogenic acid)。創傷後三天以結球萵苣生成的總酚類量最低，其綠原酸含量增加 4.7 倍、異綠原酸增加 3.8 倍、菊苣酸增加 3 倍 (Tom

ás-Barberán *et al.*, 1997)。

萵苣不同部位組織創傷後生成的酚類物質組成不同。於紅色葉用萵苣品種 ‘lollo rosso’ 中，將葉部組織分為三個部分，分別為中肋組織、富含葉綠素的葉基組織、富含花青素的葉尖組織，創傷後於 5°C 下貯藏 14 天，中肋組織中酚酸含量增加為兩倍，主要生成為異綠原酸 (isochlorogenic acid)，且其花青素含量也上升；而其餘部位酚類含量則沒有顯著變化 (Ferrerres *et al.*, 1997)。

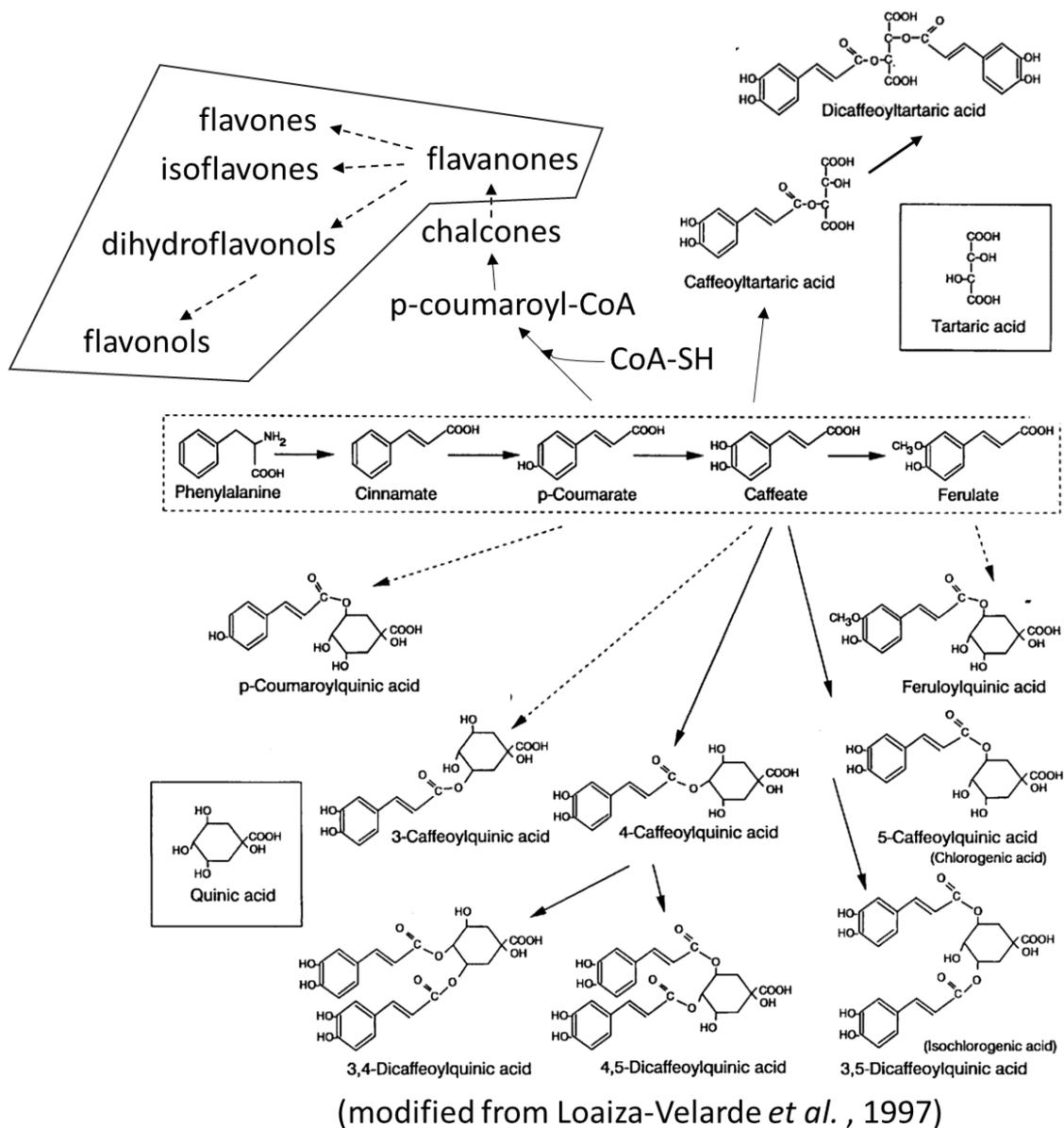


圖 1. 咖啡酸衍生物與類黃酮物質合成途徑

Fig. 1. Biosynthesis pathway of caffeic acid derivative and flavonoids





## 五、延緩褐化反應之處理技術

褐化為造成園產品劣變與商品外觀品質下降的主因之一，除了會降低消費者購買意願外也可能縮短貯架壽命 (shelf life)，甚至降低營養價值，其中截切產品受到褐化的影響更為直接因此以各種採後處理方法來延緩褐化，。

### (一) 調整包裝內氣體成份

氣調貯藏 (control atmosphere storage) 是調節氣體貯藏的簡稱，是指將貯藏環境內的氣體組成調整至目標比例，使之異於正常大氣的組成。通常藉由添加或移除特定氣體達到，以降低氧氣濃度或提高二氧化碳濃度來改變園產品原本的代謝速率 (Kader, 2002)。若是利用包裝材料本身對氣體通透性與園產品呼吸速率達到動態平衡，並在包裝內形成的特定氣體組成則稱為氣變包裝 (modified atmosphere packaging, MAP)。以氣變包裝使袋內的氧氣濃度維持氧於 0.2-0.5 kPa，可有效控制截切萵苣褐化，並且不會產生不良風味 (Martinez-Sanchez *et al.*, 2011)。

### (二) 熱處理

熱處理為園產品於貯藏前，經過短時間的高溫處理，可分為溫湯、蒸熱及熱風三種方法，多用於殺死檢疫害蟲或減輕寒害徵狀。植物經熱休克處理後會重新生成熱休克蛋白 (heat shock protein)，而創傷後萵苣經熱處理後會優先生成熱休克蛋白，使創傷誘導後的 PAL mRNA 無法被轉譯生成，因此熱處理也具有減輕褐化的效果 (Saltveit, 2000；Campos-Vargas *et al.*, 2005)。

### (三) 藥劑處理

常見的抗褐化藥劑種類包含抗氧化劑、有機酸、PPO 抑制劑及含鈣化合物。抗褐化藥劑延緩褐化的效果可能是綜合的結果。抗氧化劑延緩褐化的機制主要是將多酚氧化酶氧化產生的醌類再還原回雙酚結構，藉此減少醌類累積，因此當抗氧



化劑完全被氧化消耗後，酚類仍會被 PPO 氧化並導致褐化發生；也因此抗氧化劑延緩褐化的效果會因園產品種類與抗氧化劑濃度不同而改變，常見的抗氧化劑為抗壞血酸(ascorbic acid)、異抗壞血酸 (isoascorbic acid)、異抗壞血酸鈉 (sodium erythorbate)與含硫氫基化合物，而含硫氫基化合物除了具有還原力外，也具有抑制 PPO 的功能(Kuijpers, 2012; Martinez and Whitaker, 1995)。因 PPO 適合催化的 pH 範圍為 5-7，使用有機酸降低組織內 pH 值可使 PPO 活性降低，藉此達到延緩褐化的效果，常見的有機酸有檸檬酸 (citric acid)、醋酸 (acetic acid)及蘋果酸 (malic acid)，而檸檬酸亦具有螯合劑的功能，可使 PPO 活性中心內的銅離子無法作用。因褐化亦與細胞膜穩定性相關，含鈣化合物主要功能為維持細胞結構穩定來延緩褐化，並使截切產品維持其脆度與硬度 (Martinez and Whitaker, 1995)。

含硫氫基 (sulfhydryl group, -SH) 之化合物有半胱胺酸 (cysteine, Cys)、麩胱甘肽 (glutathione)、半胱氨酸鹽酸鹽 (L-cysteine hydrochloride, CysH) 及乙醯半胱胺酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC)，其延緩褐化的機制可能有三種：

- (1) 硫氫基與醌類(O-quinone)反應生成無色或淺黃色物質 (Pierpoint,1966 ; Richard *et al.*,1991 ; Richard *et al.*,1992)，使醌類無法聚合導致褐化。如：綠原酸經 PPO 氧化生成的醌類與 L-cysteine 反應後可生成 2-cysteiny-chlorogenic acid (Cabezas-Serrano *et al.*, 2013)。
- (2) 本身或與醌類反應的生成物具有抑制 PPO 活性特性

L-cysteine 抑制 PPO 活性程度因濃度而異 (Valero *et al.*, 1991 ; Ding *et al.*, 1998)。在枇杷內的 PPO，以 1 mM L-cysteine 可抑制 87%的活性 (Ding *et al.*, 1998)。另外，與醌類反應的生成物也可與 PPO 競爭活性部位，作為 PPO 競爭型抑制物 (competitive inhibition)，並抑制 PPO 作用，使酚類不被氧化成醌類 (Altunkaya and Gökmen, 2008)。

- (3) 本身具還原力可將醌類還原回雙酚 (Martinez and Whitaker, 1995)。



含硫氫基化合物與醌類反應生成無色物質，避免醌類聚合產生褐化，因此當硫氫基化合物被完全消耗後，氧化生成的醌類變會開始聚合並造成褐化，也因此特性，含硫氫基化合物延緩褐化的效果會因園產品種類及施用濃度而異，另外含硫氫基化合物延緩褐化的效果也會因 pH 值改變 (Cabezas-Serrano *et al.*, 2013 ; Molnar-Perl and Friedman, 1990)。

## 六、結球萵苣內咖啡酸衍生物質測定

結球萵苣因生食習慣與做為截切產品的特性，其貯藏後褐化現象有許多研究探討，如：創傷後褐化、乙烯誘導生理障礙鏽斑病褐化發生，褐化徵狀可出現於結球萵苣主莖、截切葉片與中肋邊緣，其褐化現象主要為咖啡酸衍生物經酵素氧化後產生的醌類物質聚合形成，因此萵苣組織內酚類物質組成為研究的方向之一。

Tomás-Barberán 等 (1997) 以甲醇與組織比例 2:1 (v/w) 均質萃取萵苣中肋組織，經不織布過濾後離心取上清液，上清液於 40°C 下濃縮，以 1 ml 50% (v/v) 甲醇回溶，經 0.45  $\mu$ m 濾膜過濾後進行 HPLC 分析，HPLC 分析條件為甲醇有機相與水相添加 5% 甲酸進行梯度分離，於波長 326 nm 下偵測結果，顯示結球萵苣中肋內存在 caffeoyl-CoA 與奎尼酸(quinic acid) 酯化形成的 3-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid)、4-caffeoylquinic acid (kryptochlorogenic acid)、5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)、3,4-dicaffeoylquinic acid、3,5-dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid)、4,5-dicaffeoylquinic acid，以及 caffeoyl-CoA 與酒石酸酯化形成的 caffeoyltartaric acid、dicaffeoyltartaric acid，但其主要成份為 caffeoyltartaric acid、綠原酸(chlorogenic acid)、異綠原酸 (isochlorogenic acid)、菊苣酸 (chicoric acid)，結球萵苣中肋於 5°C 下貯藏三天後，綠原酸含量為 15  $\mu$ g  $\cdot$  g<sup>-1</sup> FW 增加了 4.8 倍、異綠原酸含量約為 4  $\mu$ g  $\cdot$  g<sup>-1</sup> FW 增加了 3.8 倍、菊苣酸含量約為 10  $\mu$ g  $\cdot$  g<sup>-1</sup> FW 增加了 3 倍，而 caffeoyltartaric acid 含量則增加了 30%。

Hisaminato 等 (2001) 以兩倍重甲醇與組織均質，震盪 10 分鐘後過濾，濾液



進行減壓濃縮，濃縮後加入乙酸乙酯萃取，再進行減壓濃縮，以甲醇回溶後用 Sep-pak C18 層析純化，再經 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾得到樣品進行 HPLC 分離。HPLC 分析條件為為氟甲烷有機相與水相添加 5% 醋酸進行梯度分離，於波長 320 nm 下吸光，顯示含有主要成份為 caffeoyltartaric acid、綠原酸 (chlorogenic acid)、異綠原酸 (isochlorogenic acid)、菊苣酸 (chicoric acid)，經綠原酸標準曲線換算後濃度總和，萵苣中肋內總酚類含量第 0 天含量約為  $10\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ ，於  $4^{\circ}\text{C}$  下貯藏三天後總酚類含量開始上升，第八天含量約為  $35\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ ，總量增加為 3.5 倍。

兩者分析方法主要相差在於樣品前處理純化步驟與分離使用之流動相不同，以氟甲烷與水或甲醇與水進行梯度分離後，顯示萵苣中肋創傷後主要生成的酚類物質為咖啡酸衍生物，包含綠原酸、異綠原酸、菊苣酸。

## 第三章 材料與方法



### 一、試驗用材料、藥品與儀器

#### (一) 材料來源

新鮮結球萵苣品種為雲林縣麥寮鄉蔬菜產銷班第 47 班 (台灣生菜村)所栽種之 6 號，經第二果菜批發市場購入，運回台灣大學園產品處理研究室後放入 1 °C 冷藏庫中進行預冷，並待後續處理進行。

#### (二) 試驗藥品

1. Acetic acid (冰醋酸)：皓峯企業股份有限公司。
2. Aluminum Chloride: Sigma。
3. Chlorogenic acid (綠原酸)：Aldrich。
4. Chicoric acid (菊苣酸)：Aldrich。
5. N-acetyl-L-cysteine：Merck。
6. L-cysteine hydrochloride：Merck。
7. Formic acid (甲酸): Sigma-Aldrich。
8. Gallic acid (沒食子酸)：Sigma。
9. Methanol: HPLC grade 及 ACS 試藥級, Macron。
10. Rutin hydrates: Sigma。
11. Sodium dihydrogen phosphate dodecahydrate:

#### (三) 試驗儀器:

1. 色差儀：德國，Dr LANGE，LMG-160。
2. 切片機：美國，Chef's Choice，Electric food slicer 610。
3. 電子天平：瑞士，Mettler Toledo，AB104-S/FACT。
4. 分光光度計：日本，SHIMADZU，UV-1800。
5. 分光光度計紀錄軟體：日本，SHIMADZU，UVProbe Version 2.42。
6. -20°C 凍箱：美國，Kenmore Model-31205。



7. -80°C 凍箱：日本，Sanyo。
8. 超高速冷凍離心機：日本，HITACHI，CR21GⅢ。
9. 高效能液態層析系統：Intelligent HPLC system LC-800 series，Jasco。  
整套系統組成包含六個部分：
  - a. 幫浦 (pump)：日本，Jasco 公司，Model PU-980。
  - b. 層析管柱 (column)：Dikama Inspire™ C18 (5μm, 12nm，150 x 4.6 nm)。
  - c. 管柱恆溫器 (column oven)：台灣，立行科技有限公司。
  - d. 自動取樣器 (autosampler)：德國 SPF 公司，Model S-5200。
  - e. 紫外光測定儀：日本，Jasco 公司，875-UV。
  - f. 紀錄軟體：台灣，立行科技有限公司，EC2000。
10. 脫氣用濾紙 (移動相)：美國，PALL，FP-Vericel 及 Nylaflo (pore size：0.45μm，diameter：47mm)。
11. 脫氣用濾紙 (樣品)：美國，PALL，PTFE membrane (pore size：0.45μm，diameter：13mm)。
12. 減壓濃縮系統：
  - a. 水流抽氣幫浦：日本，Tokyo Rikakikai 公司，Eyela aspirator A-3S
  - b. 恆溫水浴振盪機：台灣，國洲儀器有限公司，Vapor-mix Model KC-12

## 二、結球萵苣主莖切片與創傷後藥劑處理

本研究以結球萵苣主莖圓片進行試驗，試驗方法修改自 Tomás-Barberán 等 (1997)。選用底部未有碰撞傷害或微生物感染之萵苣進行試驗。以不鏽鋼水果刀將主莖完整的自萵苣取下，利用切片機將底部厚度 0.5 公分部分切除，並將主莖裁切成厚度 0.5 公分之片狀並保留維管束，以去離子水洗去乳汁，並以擦手紙吸乾切片表面多餘水分。

將主莖切片分別浸泡於去離子水及不同濃度減輕褐化藥劑中，分別為醋酸 (acetic acid, AcA)、N-乙醯-L-半胱胺酸 (N-acetyl cysteine, NAC)、半胱胺酸鹽酸鹽 (L-cysteine hydrochloride, CysH)，浸泡五分鐘後取出切片並吸去表面殘餘溶液。將

經藥劑處理的切片置於加蓋直徑9公分塑膠培養皿中，並貯藏於5°C下。將藥品秤重溶解於去離子水定量成指定濃度後，置於4°C冷藏庫備用，處理項目可以分為：

(1)控制組：浸泡於去離子水中五分鐘

(2)醋酸(AcA)組：浸泡於3%(v/v)溶液中五分鐘

(3) N-乙醯-L-半胱胺酸(NAC)組：浸泡於3%(w/v)及2%(w/v)溶液中五分鐘

(4)半胱胺酸鹽酸鹽(CysH)組：分別浸泡於3%(w/v)及2%(w/v)溶液中五分鐘

於藥劑處理後第0、2、4、6、8天進行外觀顏色測量並取出貯藏於5°C的主莖切片以液態氮急速冷凍，存放於-20凍箱，待進行後續萃取及分析。

### 三、主莖切片外觀褐化變化觀察

貯藏於5°C下圓片於藥劑處理後第0、2、4、6、8天，拍照並以色差儀(color pen)測定主莖切片外觀顏色，結果以L、a\*、b\*值表示。

### 四、主莖切片酚類組成與含量分析

#### (一) 總酚類萃取

試驗方法參考 Campos-Vargas 和 Saltveit (2002) 之酚類萃取方法，以組織重量比甲醇體積 1:2 萃取 (w/v)。取 3 克冷凍萵苣主莖切片組織於研鉢內經液態氮研磨至粉狀，將組織粉末置於 50 ml 離心管內，再加入 6 ml 甲醇均勻混和，經 10 分鐘超音波震盪萃取後，以 15000 g 離心 25 分鐘，取上清液至 15 ml 離心管，再次離心取上清液，置於-20°C下待接續測定。

#### (二) 總酚類含量測定

試驗方法參考 Loaiza-Velarde 等(1997)、Campos-Vargas 和 Saltveit (2002)之萵苣組織萃取液內總酚類測定，測定萃取液於波長 320nm 下吸光值。將萃取液以甲醇等體積稀釋一倍後，以分光光度計測量萃取液於波長 320nm 下吸光值。萃取液於波長 320 nm 下的吸光值經由綠原酸標準曲線換算為含量，結果以 equivalent chlorogenic acid  $\mu\text{g/g}$  FW 表示。



### (三) 以 HPLC 分析主要酚類含量變化

#### 1. 萃取液前處理

萃取液於 40°C 水浴恆溫震盪機內，減壓濃縮 50 分鐘後以 0.5 ml 甲醇回溶，經 0.45  $\mu$ m 濾膜過濾得到樣品進行 HPLC 分析。

#### 2. HPLC 分析條件

試驗方法修改自 Tomas-Barberan 等(1997)之分離方法，管柱溫度維持於 40 °C，在流速 1 ml/min 下進行梯度分離。樣品之分析採用紫外光測定儀偵測波長 320 nm 下吸光。測得結果分別以綠原酸與菊苣酸標準品之標準曲線換算濃度，換算結果分別以  $\mu$ g chlorogenic acid/ g fresh weight 以及  $\mu$ g chicoric acid/ g fresh weight 表示；異綠原酸的分析結果以綠原酸標準曲線換算。

(1) 移動相: 移動相 A 為去離子水含有 5%(v/v)甲酸

移動相 B 為甲醇含 5%(v/v)甲酸

(2) 分離梯度: 90% 移動相 A 於 18 分鐘內等梯度降至 72% A，再經 14 分鐘以等梯度降至 65% A，接續於 22 分鐘內再降至 43% A。

### (四) 類黃酮含量測定

試驗方法參考 Pekal 與 Pyrzynska (2014)，取 0.5 ml 萃取液與 1 ml 2% (w/v) Aluminum Chloride methanol solution 混合均勻，避光靜置反應 10 分鐘後以分光光度計測定其於 430 nm 之吸光值。以 rutin hydrates 製作標準曲線。換算結果以  $\mu$ g /g fresh weight 表示。

## 五、萬苣多酚氧化酶於植物體外氧化酚類標準品

### (一) 萬苣主莖內多酚氧化酶之萃取

#### 1. 丙酮粉末:

取 60 g 未經藥劑處理的主莖切片，將組織切碎，以於 -20°C 下預冷的果汁機內加入 180 ml 冰冷丙酮，分次以高速均質一分鐘。以墊有濾紙的布氏漏斗經抽氣過

濾去除丙酮，再於漏斗中加入 100 ml 冰冷丙酮將破碎的組織攪拌均勻並抽氣過濾，重覆沖洗組織至丙酮濾液無色且組織中色素均被洗去呈現乳白色為止。將洗淨之組織倒入培養品內，利用真空乾燥機將組織完全乾燥即得到丙酮粉末，貯藏於-20℃下。

## 2. 多酚氧化酶萃取液:

取 0.205 g 丙酮粉末置於燒杯內，加入 40 ml 0.05 M Phosphate buffer (pH 6.8)，在冰浴中攪拌 20 分鐘。經雙層不織布過濾後，用高速離心機離心 10 分鐘 (4℃，~10,000 xg)，離心所得上清液即為酵素粗萃取液，置於冰浴中待用。

### (二) 綠原酸、菊苣酸、芸香苷經 PPO 氧化過程之吸收光譜分析

以萵苣主莖內 PPO 分別氧化 20 µg/ml 的綠原酸與菊苣酸，以分光光度計記錄波長 200-600 nm 間的吸光光譜，每間隔 5 分鐘測定一次連續吸收光譜。

以萵苣葉 PPO 酵素液氧化不同濃度下的酚類標準品溶液及其混合液，以分光光度計記錄波長 270-450 nm 間的吸光光譜，於反應後 0、15、90、180、300、600、900、1200、1800 秒紀錄連續吸收光譜。

### (三) 酚類標準品經 PPO 氧化後褐化顏色值之測量

於容量為 4 ml 的吸光液槽 (cuvette) 加入 1 ml 萵苣葉 PPO 酵素液與 2 ml 不同濃度酚類標準品反應並拍照紀錄褐化過程。氧化反應 40 分鐘後褐化外觀維持一定，於固定光源條件下拍照記錄，以軟體 ImageJ 進行影像顏色分析，將影像轉換為色彩空間 RGB 數值，再轉換以色彩空間 L\*、a\*、b\*數值表示。

## 第四章 結球萵苣主莖切片創傷後酚類之生成與褐化間之關係



結球萵苣於田間採收時會由主莖部分切下並保留完整葉球，此一採收切口經過一段貯藏期間後會產生褐化的現象，並使結球萵苣外觀品質與貯架壽命降低。結球萵苣主莖創傷後，組織內 PAL 活性會因創傷誘導而上升，因而生合成酚類物質，當酚類物質經 PPO 氧化後產生之醜類會聚合形成褐色物質，並逐漸造成褐化。本試驗欲了解創傷後結球萵苣主莖切片於 5°C 下貯藏期間，主要產生之酚類物質種類以及酚類物質含量變化；並藉由植物體外試驗，以結球萵苣多酚氧化酶 (PPO) 氧化不同酚類標準品溶液以及其混合溶液，進而探討酚類物質種類經 PPO 氧化後，與造成褐化程度之關係。

### 一、以 HPLC 層析方法分離主莖切片內酚類物質

萵苣主莖切片創傷後經去離子浸泡五分鐘後貯藏於 5°C 下，其切片外觀於創傷後第二天即出現維管束褐化，並於第四天外觀褐化程度加劇 (圖 2)，顯示與褐化相關的酚類物質含量於創傷後即開始增加；主莖切片內的總酚類含量 (圖 19) 於前四天快速增加，第四天後含量上升趨於平緩，與外觀褐化變化相似，而其總類黃酮含量則是於第四天後上升至第六天，第六天後則維持一定含量。因此進一步以 HPLC 分析創傷後萵苣主莖切片內主要所含的酚類物質種類。

HPLC 層析試驗方法參考 Tomás-Barberán 等 (1997)，使用 C<sub>18</sub> 層析管柱，改變移動相比例進行不同強度的沖提，使用有機相甲醇添加 5% 甲酸以及水相添加 5% 甲酸，以不同比例混合進行梯度分離。對照組外觀於第二天即出現明顯褐化徵狀 (圖 2)，並隨貯藏時間增加而褐化加劇，且前四天外觀褐化之變化明顯，顯示與褐化相關的酚類物質含量於創傷後即開始增加，因此取褐化變化明顯的創傷後第四天之主莖切片進行 HPLC 組成分析，對照組主莖貯藏後第四天之層析圖中有主要

三個訊號，與標準品滯留時間相對照，標準品綠原酸與菊苣酸經層析後其滯留時間分別為 10.89 分鐘與 22.16 分鐘 (圖 3)，與對照組主莖貯藏後第四天之層析圖 (圖 3) 中出現高峰的時間相符合，可確認首先沖提出的前兩個訊號分別為綠原酸與菊苣酸，而第三個主要訊號由文獻推測應為異綠原酸 (Tomás-Barberán *et al.*, 1997)。

分離起始條件為 10% 甲醇相經 40 分鐘等梯度升至 58% 甲醇相，甲醇比例以每分鐘 1.2% 上升，對照組貯藏後第八天的萃取液層析圖 (圖 4A) 含有三個主要訊號，經標準品滯留時間比對後沖提出的前兩個訊號分別為綠原酸與菊苣酸，與 Tomás-Barberán 等 (1997) 結果相似，而雖滯留時間相異，但因分子極性差異沖提出的相對時間比例相近，因此與文獻層析結果 (圖 4B) 對照後，沖提出的第三個訊號應為異綠原酸，後續高效能液相層析分析之異綠原酸結果以綠原酸標準曲線換算其含量。

在主要訊號綠原酸、菊苣酸、異綠原酸間，仍有其於含量較微量的訊號 (圖 4)，可能為異綠原酸的同分異構物 3,4-dicaffeoylquinic acid 或其他未知物質。於主要訊號間仍有不對稱的波峰，可能為重疊的波峰，因此降低甲醇比例上升速率，由每分鐘 1.2% 改為每分鐘上升 1%，並且分離時間中段的梯度則降為每分鐘 0.5% (圖 4)，沖提強度降低後，綠原酸與菊苣酸間重疊的訊號分離產生新的波峰，異綠原酸訊號前則出現新的波峰，雖主要訊號外的物質含量低，但為減少定量誤差，最後 HPLC 分離梯度修改為起始條件為 10% 甲醇，並以甲醇比例每分鐘 1% 之速率上升 18 分鐘，接續以每分鐘 0.5% 之速率上升 14 分鐘後，再維持以每分鐘 1% 之速率上升 22 分鐘，最後達到甲醇比例為 57%。

## 二、確認創傷後萬苣主莖萃取液內主要酚類物質

綠原酸與菊苣酸標準品經上述分離條件於 HPLC 內的滯留時間分別為 10.89 分鐘與 22.16 分鐘，與對照組第四天層析圖 (圖 3) 中出現高峰的時間相符合，因



此確認對照組樣品中偵測到的即是綠原酸與菊苣酸，而與文獻層析結果對照後，推測第三個訊號為異綠原酸。為了更進一步確認綠原酸與菊苣酸之存在，於對照組主莖切片萃取液樣品內添加綠原酸與菊苣酸標準品，以 1:1 (v/v) 比例混和，由主莖切片外觀褐化結果來看(圖 2)，對照組於第四天後褐化外觀變化較小，因此以創傷後褐化變化最明顯的第四天主莖切片萃取液進行標準品添加，添加後層析圖(圖 6)顯示原本於 10.85 分鐘與 22.13 分鐘出現的波峰訊號相對異綠原酸訊號增強，且將添加後波峰訊號分別依綠原酸與菊苣酸標準曲線(表一)換算為添加後濃度，此濃度接近標準品濃度及樣品濃度減半之和。而切片經 NAC 與 CySH 藥劑處理後，其外觀(圖 2)於第八天切面才有明顯褐化的徵狀，因此以創傷後第八天主莖切片萃取液進行標準品添加，添加標準品後之層析結果(圖 7 與圖 8)顯示，確認層析提出的前兩個訊號為綠原酸與菊苣酸，而第三個主要訊號由文獻結果推測應為異綠原酸；將萃取液中目標物以外的萃取出視為基質，因受到基質干擾以及分離的效果影響，使得經不同藥劑處理後的主莖萃取液具有不同的定量誤差(表二)。

萬苣葉部組織經創傷後，萃取液以甲醇與水相添加 5% 甲酸進行梯度分離後，主要生成的酚類依滯留時間先後為綠原酸、菊苣酸、異綠原酸(Baur et al., 2004; Tomás-Barberán et al., 1997)；而以氰甲烷(acetonitrile)與水相添加 5% 醋酸的系統分離創傷後萬苣組織萃取液，也具有相似的結果(Mai and Glomb, 2013; Hisaminato et al., 2001)。另外綠原酸波峰前也會有少量 caftaric acid(Baur et al., 2004; Hisaminato et al., 2001)或 neochlorogenic acid 出現(Tomás-Barberán et al., 1997)。對照組萃取液層析圖(圖 4)顯示主要含有三種物質，與文獻相符合，而前兩個物質經由標準添加後確認為綠原酸與菊苣酸，第三個波峰對照文獻中與綠原酸、菊苣酸滯留相對位置，推測應為異綠原酸，且後續 HPLC 分析所得異綠原酸之波峰面積將以綠原酸標準曲線換算(Baur et al., 2004; Tomás-Barberán et al., 1997)。

### 三、萬苣內多酚氧化酶於植物體外氧化酚類物質與褐化之關係

創傷後萬苳主莖切片之萃取液經高效能液相層析分離之結果，以標準品添加及文獻層析圖比對後，確認萬苳主莖切片於創傷後生成的酚類主要為咖啡酸衍生物，分別為綠原酸、菊苳酸以及異綠原酸。文獻指出咖啡酸衍生物為易被多酚氧化酶氧化的基質且氧化後可導致明顯的褐化，但不同的咖啡酸衍生物經多酚氧化酶氧化後形成褐化的程度可能不同。因此進行植物體外試驗，以結球萬苳多酚氧化酶氧化綠原酸與菊苳酸標準品，並探討其經氧化後造成褐化程度的差異。同時，創傷後萬苳主莖切片於貯藏期間，除了咖啡酸衍生物含量的增加，其類黃酮含量於創傷四天後開始上升，因此亦探討類黃酮物質於咖啡酸衍生物同時存在時對褐化的影響。

#### (一) 咖啡酸衍生物經萬苳多酚氧化酶氧化與褐化之關係

咖啡酸衍生物在全波長掃描下主要吸收波長位於 320 nm 左右，由綠原酸 (chlorogenic acid) 與菊苳酸 (chicoric acid) 標準品的吸收光譜 (圖 11) 顯示主要吸收波長分別為 325 nm 及 326 nm，且咖啡酸也具有相似的吸收光譜。當一定量的綠原酸與菊苳酸標準品經主莖切片的多酚氧化酶氧化後轉變為醌類，其吸收光譜會改變，位於波長 320 下的吸光值會逐漸降低 (圖 12 與圖 13)，當綠原酸或菊苳酸皆被氧化為醌類後，不再於波長 320 nm 下有最高吸收波峰，且與一般酚類經氧化後生成的醌類相似，於波長 400 nm 左右下的吸光值會逐漸上升 (圖 12 與圖 13)，顯示結球萬苳主莖切片內的多酚氧化酶可將綠原酸與菊苳酸氧化。

不同濃度的綠原酸與菊苳酸標準品經萬苳 PPO 氧化後會形成不同褐化程度的溶液 (圖 9 與圖 10)，顯示萬苳 PPO 可氧化綠原酸與菊苳酸標準品並且造成褐色的外觀，將溶液外觀顏色值測定結果以 CIE-LAB 色彩空間系統表示，由 L 值代表溶液外觀明亮度，而 a\* 值與 b\* 值則可共同定義出色相。若 a\* 值為負值代表偏向綠色，正值則偏向紅色；b\* 值為負值代表偏向藍色，正值則偏向黃色

綠原酸與菊苳酸標準品溶液濃度越高，則經 PPO 氧化後褐化程度越明顯，其溶液外觀 L 值會降低，而 a\* 值與 b\* 則皆會上升 (圖 10)。在相同濃度下菊苳酸經

氧化後褐化程度較綠原酸高，由標準品溶液經 PPO 氧化後之外觀顏色值比較 (圖 10)，同濃度下的菊苣酸標準品溶液經氧化後，其 L 值低於同濃度下的綠原酸標準品溶液，且 a\*值與 b\*值皆高於同濃度下的綠原酸標準品溶液，顯示經 PPO 氧化後，菊苣酸造成褐化的程度會高於綠原酸。

含有 30  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸與 30  $\mu\text{g/ml}$  菊苣酸標準品混合物經 PPO 氧化後，其褐化程度 b\*值，介於 60  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸與 60  $\mu\text{g/ml}$  菊苣酸分別氧化後之結果(圖 9 與圖 10)。菊苣酸與綠原酸標準品混合溶液經 PPO 氧化過程 (圖 14) 顯示，其氧化過程與分別氧化的變化過程相似。咖啡酸衍生物氧化過程中吸光值之改變主要位於兩種波長下，分別為咖啡酸衍生物於波長 320 nm 下的吸光值降低，以及醌類產生後於波長 410 nm 下吸光值上升。混合溶液經 PPO 氧化過程中，於此兩種波長下的吸光值，皆介於標準溶液分別氧化的結果(圖 15)，顯示兩者在共同褐化的過程中並不會互相影響，褐化程度與濃度相關。

## (二) 咖啡酸衍生物與類黃酮混合物經萬苣多酚氧化酶氧化過程與褐化之關係

萬苣主莖切片內之咖啡酸衍生物含量於創傷後開始增加，已知咖啡酸衍生物為造成主莖切片褐化的主要物質，而其類黃酮含量於創傷第四天後開始上升，因此亦探討類黃酮含量與褐化之關係。已知結球萬苣內含有的類黃酮種類主要為槲皮素配醣體 (quercetin glycoside) 與木樨草素配醣體 (luteolin glycoside)，因此以屬於槲皮素配醣體 (quercetin glycoside) 的芸香苷進行植物體外氧化試驗。

20  $\mu\text{g/ml}$  芸香苷與結球萬苣 PPO 萃取液混合後，其標準溶液褐化程度不明顯，(圖 9 與圖 10)；其吸收光譜並未隨時間改變(圖 16)，並且於波長 410 nm 下的吸光值並未隨時間增加 (圖 17)，顯示結構屬於類黃酮的芸香苷並非結球萬苣 PPO 易催化的基質。

含有 20  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸與 20  $\mu\text{g/ml}$  芸香苷的標準品混合溶液，經 PPO 氧化後，可以形成明顯的褐化效果，其褐化程度與只含有綠原酸的標準溶液相比(圖 9)，其



溶液外觀的 L 值與 a\* 值相同，而 b\* 值則上升，顯示於綠原酸標準溶液內添加芸香苷並且經 PPO 氧化後，可使褐化後 b\* 值明顯增加，使溶液外觀顏色偏向黃色；含 20  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸與 20  $\mu\text{g/ml}$  芸香苷的標準品混合溶液經 PPO 氧化過程(圖 16)顯示，與只含有 20  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸的標準品溶液相比(圖 14)，其吸收光譜的變化速率較慢，而由芸香苷主要吸收波長 357 nm 下的變化(圖 17)來看，混合溶液的下降幅度大於單獨含有綠原酸的標準品溶液，顯示於混合溶液中，芸香苷會受到氧化。綜合外觀顏色值與氧化過程吸收光譜的變化結果顯示，顯示咖啡酸衍生物與芸香苷同時存在時，原本不易被 PPO 氧化的芸香苷，於混合溶液內可被氧化，並且造成外觀 b\* 值上升，同時使氧化過程中吸收光譜的變化速率變慢(圖 9 與圖 10)。而於同樣 20  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸下，提高芸香苷溶液的濃度至 40  $\mu\text{g/ml}$ ，雖然造成溶液外觀 L 值降低，以及 a\* 值與 b\* 值上升，但其主要造成 b\* 值的上升(圖 10)。菊苣酸與芸香苷之標準品混合溶液也具有相同的變化(圖 9、圖 10、圖 16、圖 17)，但於此混合溶液中，提高芸香苷溶液的濃度至 40  $\mu\text{g/ml}$  後對 b\* 值影響的效果不同。同樣含有 20  $\mu\text{g/ml}$  的咖啡酸衍生物與 20  $\mu\text{g/ml}$  芸香苷的混和溶液，與提高芸香苷濃度至 40  $\mu\text{g/ml}$  後的混和溶液外觀相比較，會造成不同程度 b\* 值的上升，於菊苣酸與芸香苷之標準品混合溶液中提高芸香苷濃度，相較於與綠原酸之標準品混合溶液，可使 b\* 上升幅度較高。經 PPO 氧化後顯示，於咖啡酸與芸香苷混合溶液中提高芸香苷濃度，主要會使 b\* 值增加，但其增加的幅度會因溶液內同時存在的咖啡酸種類而異，因此也顯示混合溶液氧化後造成褐化的效果較單一咖啡酸衍生物標準品溶液複雜。

Amaki 等 (2011) 指出，兒茶素與綠原酸同時存在且經 PPO 氧化的過程中，部份的兒茶素是受到綠原酸醌類 (chlorogenic acid quinone) 以非酵素式氧化，而綠原酸醌類將兒茶素氧化後，本身可被還原回綠原酸。因此，雖然類黃酮並非結球萵苣 PPO 易作用的基質，但於咖啡酸衍生物同時存在時，咖啡酸衍生物經氧化後產生的醌類，其高活性的特性可將類黃酮氧化，進而造成褐化。



#### 四、創傷後萵苣主莖切片褐化過程中酚類組成變化

##### (一) 創傷後萵苣主莖切片之外觀變化

萵苣主莖圓片經去離子水洗去乳汁並浸泡五分鐘後貯藏於 5°C 下八天，分別於貯藏第 0、2、4、6、8 天拍照紀錄外觀變化 (圖 2)，並以色差筆測量主莖切片外觀顏色值變化。外觀顏色值測定結果以 CIE-LAB 色彩空間系統表示，空間內 XYZ 軸三向線分別代表 a\* 值、b\* 值與 L 值，由此三個值共同定出外觀明亮度與色相。若 a\* 值為負值代表偏向綠色，正值則偏向紅色；b\* 值為負值代表偏向藍色，正值則偏向黃色。萵苣主莖切片經創傷後褐化過程中生成的物質於貯藏期間會使切口呈現紅褐色 (圖 2)，因此褐化嚴重程度可以由 a\* 值的變化作為褐化指標。主莖切片經創傷後貯藏於 5°C 下第二天其維管束最先出現褐化，並且外觀隨著貯藏天數增加而逐漸由粉紅色轉變為深褐色 (圖 2)。主莖切片外觀 a\* 值由原本負值變為正值，並於前四天快速增加，第六天後數值維持一定；b\* 值則是以一定速度增加至第八天 (圖 18)。綜合外觀與顏色值結果顯示，創傷後主莖切片由維管束開始褐化，褐化過程中 a\* 值與 b\* 值皆會隨貯藏期間增加而上升，而其中 a\* 值主要於前四天快速增加，與外觀變化相符合。

##### (二) 創傷後萵苣主莖切片之總酚類物質含量變化

結球萵苣在創傷後主要生成的酚類為咖啡酸衍生物，經 PPO 氧化後產生醌類聚合並造成褐化。創傷後主莖切片內的總酚類含量 (圖 19) 於前四天快速增加，第四天後含量上升趨於平緩，與外觀 a\* 值變化相似。總類黃酮含量則是於第四天上升至第六天，第六天後維持一定含量，約含有 11.9  $\mu\text{g/g}$  FW。

Tomas Barberan 等人 (1997) 指出創傷後萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏三天，其苯丙胺酸氨基裂解酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL) 活性會於創傷後 12 小時開始上升，並且於創傷後 48 小時達到高峰；而其總酚類含量則是於 24 小時至 48 小時快速上升，48 小時至 72 小時間總酚類含量上升速率減緩。與前人結果比較，本

試驗中總酚類含量會持續上升至第四天後維持一定含量，與前人結果貯藏三天的總酚類含量變化比較。本實驗總酚含量於第四天後上升速率才趨緩，可能原因為本實驗材料為具有維管束的主莖切片，因此創傷後 PAL 活性較高，進而使酚類生成較多。

### (三) 創傷後萵苣主莖切片之綠原酸、菊苣酸、異綠原酸含量變化

結球萵苣主莖切片於創傷後主要生成的咖啡酸衍生物為綠原酸、菊苣酸、異綠原酸，但三者含量上升的時間點與含量變化不同。

創傷後的萵苣主莖切片其綠原酸 (chlorogenic acid) 含量 (圖 20) 於創傷後即開始上升，並於第四天以後含量達到最高，約含有 13.2  $\mu\text{g/g}$  FW，相對第 0 天的含量 2.6  $\mu\text{g/g}$  FW，上升近五倍，接著於第四天後含量開始下降，於第八天含量降低至 6.0  $\mu\text{g/g}$  FW，約為初始含量的兩倍。

菊苣酸 (chicoric acid) 含量 (圖 20) 則是於創傷第二天後開始快速增加，於第四天以後含量達到最高，並維持一定的菊苣酸含量至第八天。第四天萵苣主莖切片內的菊苣酸含量為 10.7  $\mu\text{g/g}$  FW，相較第 0 天含量約上升三倍。異綠原酸 (isochlorogenic acid) 含量 (圖 20) 上升時間點及含量變化時間與菊苣酸相似。第四天萵苣主莖切片內的異綠原酸含量為 11.6  $\mu\text{g/g}$  FW，相較第 0 天含量約增加四倍。

三種主要咖啡酸衍生物之總含量變化 (圖 20) 為創傷後開始上升，並於第四天以後達到最大，隨後含量有些微下降，而第二天至第四天間增加的速率約為前兩天的兩倍。

前人研究顯示，萵苣是由 hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase (HQT) 利用 caffeoyl-CoA 與 quinic acid 生成綠原酸 (Hisaminato *et al.*, 2001; Ricarda *et al.*, 2004; Steck, 1968; Tomás-Barberán *et al.*, 1997)，再利用綠原酸生成異綠原酸，而菊苣酸生合成則是利用 caffeoyl-CoA 與 tartaric acid 先生成 caffeoyltartaric acid，再接上一個咖啡基後生成菊苣酸，因此異綠原酸與菊苣酸生成

所需催化步驟皆多於綠原酸(Tomás-Barberán *et al.*,1997)。由咖啡酸衍生物與類黃酮物質生合成途徑(圖 1)顯示香豆酸(*p*-coumarate)為生成咖啡酸衍生物以及類黃酮(flavonoids)的共同前趨物。

Tomás-Barberán 等指出創傷後萵苣主莖於 5°C 下會先利用 caffeoyl-CoA 與 quinic acid 生成綠原酸，其含量於創傷後 24 小時開始上升，而異綠原酸與菊苣酸含量則是於創傷後 48 小時才出現。與前人研究相比，本試驗中綠原酸含量於創傷後兩天內即上升，而菊苣酸與異綠原酸含量則是於創傷第二天以後開始上升，與前人結果順序相符，顯示萵苣主莖創傷後會先生成綠原酸，需經過一段時間後才會生成菊苣酸與異綠原酸。

而對照組於創傷第四天以後總類黃酮含量會上升(圖 30)，生成類黃酮的前趨物與 caffeoyl-CoA 的前趨物相同，為 coumaryl-CoA，因此生成咖啡酸衍生物與類黃酮會消耗相同的前趨物，且 coumaryl-CoA 轉化為類黃酮需要經過較多步驟的酵素催化，顯示萵苣主莖經創傷後會優先生成咖啡酸衍生物，與文獻相符合(Baur *et al.*, 2004; Ferreres *et al.*, 1997; Tomás-Barberán *et al.*, 1997)。

## 五、結論

HPLC 分離結果經文獻比對與標準添加後顯示，結球萵苣主莖切片於創傷後主要生成三種酚類物質，綠原酸、菊苣酸及異綠原酸。且以結球萵苣多酚氧化酶進行植物體外試驗，顯示綠原酸與菊苣酸標準品為易被萵苣 PPO 氧化的酚類物質，並且氧化後會造成明顯的褐化現象，而同濃度下的菊苣酸造成褐化的程度大於綠原酸。綠原酸與菊苣酸標準品經萵苣 PPO 氧化時並不會互相影響，最終造成的褐化程度與個別濃度相關。類黃酮則是不易被萵苣 PPO 氧化的酚類，但若與咖啡酸衍生物同時存在時，咖啡酸衍生物氧化後產生之醌類可經由非酵素氧化將類黃酮氧化，最終造成褐化。

創傷後萵苣主莖切面外觀  $a^*$  值於前四天快速上升，並於四天以後上升速度趨緩，其變化趨勢與總酚類含量變化以及 HPLC 測得的總咖啡酸衍生物含量的變化



趨勢相似，總酚類含量與總咖啡酸衍生物含量於前四天快速增加，四天後總酚類含量與總咖啡酸含量維持穩定。對照組中綠原酸含量於創傷後即開始增加，而菊苣酸與異綠原酸含量則是於創傷第二天以後開始增加，三者皆於第四天以後達到含量最高，綠原酸含量於第四天後含量開始減少，而菊苣酸與異綠原酸則是維持一定的含量。

因此創傷後兩天內造成褐化的主要物質為綠原酸經氧化產生的醌類，而第二天至第四天間則是由綠原酸與菊苣酸氧化產生的醌類聚合造成，四天後主要是由菊苣酸與異綠原酸氧化產生的醌類聚合導致；而第四天後類黃酮含量開始上升，此時咖啡酸衍生物也具有一定含量，因此類黃酮於組織內可能被醌類以非酵素方式間接氧化，進而影響主莖切片的褐化程度。

## 第五章 藥劑處理延緩褐化與酚類物質變化之關係

已有研究指出 (洪, 2014), 以各種延緩褐化藥劑處理未含維管束的結球萵苣主莖圓片, 其可有效延緩創傷後主莖圓片切面褐化所需的濃度與藥劑浸泡處理所需的時間。創傷後主莖圓片, 經 1.5% 及 3% 之醋酸溶液浸泡處理 5 分鐘後, 貯藏於 5°C 下有延緩褐化之效果, 並可維持正常色澤達 10 天。而經具有硫氫基 (sulfhydryl group, -SH) 的半胱胺酸(cysteine)衍生物藥劑處理結果顯示, 以 2% CySH 浸泡五分鐘後可延緩圓片褐化, 但會產生黃綠色外觀。以 3% NAC 浸泡五分鐘可使圓片第八天仍維持白色色澤, 而 2% NAC 處理則使圓片於第八天呈現黃綠色色澤 (洪, 2014)。顯示經半胱胺酸(cysteine)衍生物藥劑處理後延緩褐化的效果較差, 並會造成與對照組正常褐化情形下不同的外觀顏色。

創傷後萵苣主莖切片主要產生的酚類物質為咖啡酸衍生物, 包含綠原酸、萵苣酸、異綠原酸, 均屬於易被萵苣 PPO 氧化的基質, 並且其氧化後可造成明顯褐化, 其中萵苣酸氧化後造成褐化的程度大於綠原酸。由前一章得知, 創傷後萵苣主莖切片即開始生成綠原酸, 於創傷第二天以後才開始生成萵苣酸與異綠原酸。而創傷第四天以後總類黃酮含量開始上升, 且於同時間下存在一定濃度的咖啡酸衍生物, 因此類黃酮可被間接氧化並造成褐化。

本試驗將探討結球萵苣主莖切片經藥劑處理後, 延緩切面褐化的效果, 以及其對總酚類含量、總咖啡酸含量、個別酚類含量、總類黃酮含量變化之影響。以得知各種藥劑處理延緩褐化之效果與酚類物質含量間之關係。

### 一、醋酸處理對創傷萵苣主莖切片中酚類代謝之影響

醋酸在低濃度 1.5% 下處理五分鐘即可使主莖圓片外觀於 5°C 下維持正常色澤達 10 天, 其延緩褐化機制為可抑制 PAL 活性於創傷後而上升 (洪, 2014)。而本試驗以保留維管束的結球萵苣主莖切片為材料, 於創傷後具有較高的 PAL 活性,

因此採用 3% 醋酸浸泡五分鐘處理，並比較其外觀與酚類組成間之關係。

### (一) 外觀變化與總酚類物質含量之變化

創傷後萵苣主莖圓片經 3% 醋酸溶液處理後，其外觀可以維持白色色澤至第八天(圖 2)。其切面的  $a^*$  值與  $b^*$  皆維持不變至第八天(圖 21)，顯示 3% 醋酸處理可以有效抑制主莖切面褐化至第八天。

經醋酸處理後的主莖切片內原本具有一定的總酚類含量(圖 22)，創傷後受到氧化並減少，且維持極低含量至第八天。

### (二) 綠原酸、菊苣酸、異綠原酸含量變化

主莖切片經 3% 醋酸處理後可延緩創傷萵苣主莖切片其酚類含量不上升，切片內原本含有的含量被 PPO 氧化後，第二天後於高效能液相層析內則無訊號產生，含量低於可偵測極限，而其中綠原酸則仍保有極低的含量(圖 23)。

創傷後主莖切片經 3% 醋酸可有效延緩外觀褐化，使  $a^*$  值與  $b^*$  於創傷後仍維持不變，與前人結果相符 (洪, 2014; Tomás-Barberán et al., 1997)，雖然使用的材料為具有維管束的主莖圓片，3% 醋酸處理仍可有效延緩褐化。

創傷後主莖切片經 3% 醋酸處理後，其總酚類含量並未於 8 天貯藏期間內上升，且其外觀可維持白色色澤至第八天，顯示若創傷後組織內酚類含量降低，使得 PPO 可氧化的基質減少，即可以有效地延緩褐化。Tomás-Barberán 等人 (1997) 指出醋酸可降低萵苣莖部切片內 PAL 活性，即使將 PAL 回復至適合的環境仍不具活性，表示醋酸抑制 PAL 活性為不可逆。顯示醋酸處理是藉由抑制酚類生成來達到延緩褐化的效果。

## 二、NAC 處理對創傷萵苣主莖切片中酚類代謝之影響

N-乙醯-L-半胱氨酸 (N-acetyl cysteine, NAC) 為半胱氨酸衍生物，分子結構含有硫氫基，萵苣主莖切片經 NAC 處理後可以延緩褐化，於不同濃度下延緩效果不同。洪(2014)以去除維管束的萵苣主莖圓片作為材料，經 3% NAC 溶液浸泡五分鐘



後可維持圓片呈現白色色澤至第八天，而以 2% 處理後圓片則會逐漸轉變為黃綠色。本實驗採用留有維管束的主莖切片，以 2% 與 3% NAC 溶液浸泡五分鐘。

### (一) 外觀變化與總酚類物質含量變化

主莖切片經 2% NAC 處理後圓片於第四天維管束開始出現褐化(圖 2)，但其褐化顏色相對對照組為偏向黃色，於第六天切面也偏向黃色色澤，第八天圓片維管束與切面褐化更加明顯並轉為更深的橘色。以 3% 處理的主莖切片於第六天維管束才輕微褐化呈現黃色(圖 2)，而於第八天切面呈現黃色色澤。

主莖切片經兩種濃度處理後切面的  $b^*$  值上升速度與對照組無異，兩種濃度間造成的主要差異為  $a^*$  值上升的時間點。經 2% NAC 處理主莖切片的  $a^*$  值於第四天後開始上升，第六天時  $a^*$  值為對照組的一半，持續上升至第八天時  $a^*$  仍小於對照組；以 3% NAC 處理後  $a^*$  可維持不上升至第八天(圖 24)。

主莖切片經兩種濃度 NAC 處理後的主莖切片，可延緩其總酚類含量(圖 25)於創傷第二天後開始增加，且上升速度與對照組相近。其總類黃酮含量上升時間與對照組相同(圖 31)，於第四天後開始增加，貯藏至第 8 天後，3% NAC 處理組其含量為對照組的五倍，2% NAC 處理組其含量則為對照組的三倍。

### (二) 綠原酸、菊苣酸、異綠原酸含量變化

主莖切片經 2% NAC 處理後可以延緩綠原酸含量至第二天後才上升，並且綠原酸含量(圖 26)高峰也較對照組晚兩天到達，菊苣酸含量(圖 26)上升的時間與含量則不受影響，延緩異綠原酸含量(圖 26)上升的時間則較對照組晚兩天上升。經 3% NAC 處理後可延緩綠原酸、菊苣酸、異綠原酸含量至第六天後才開始上升，且至第八天含量上升約兩倍。

主莖切片經 2% NAC 處理後，三種咖啡酸衍生物含量總合(圖 26)較對照組晚兩天上升，於第四天後開始上升，於第六天以後含量達到最高；經 3% NAC 處理後，其總含量(圖 26)則是於第六天後開始上升，較對照組延緩六天上升。



### 三、CySH 處理對創傷萵苣主莖切片中酚類代謝之影響

半胱氨酸鹽酸鹽 (L-cysteine hydrochloride, CysH) 與 NAC 同為半胱氨酸衍生物，分子結構具有硫氫基，以不同濃度處理主莖圓片後其延緩褐化效果不同。洪 (2014) 以 2% CySH 浸泡五分鐘後可延緩圓片褐化，但會產生黃綠色外觀。本試驗採用濃度 2% 與 3% 的 CySH 溶液浸泡主莖切片五分鐘。

#### (一) 外觀變化與總酚類物質含量變化

主莖切片經 2% 半胱氨酸鹽酸鹽 (L-cysteine hydrochloride, CysH) 處理後圓片於第 6 天維管束開始轉變為黃色，於第八天維管束與切面呈現黃色；經 3% CySH 處理後則於第八天切面呈現黃色(圖 2)。以 CySH 處理後，兩種濃度下皆可使萵苣主莖切面 a\* 值維持不上升至第八天，b\* 值上升速率則與對照組相似，其中以 2% CySH 處理後的主莖圓片其 b\* 值於第八天大於對照組 (圖 27)。

主莖切片經 2% CySH 處理後，可延緩其總酚類含量(圖 28)較對照組晚兩天上升，而 3% 處理組則於第六天後開始上升，較對照組晚六天上升。經 2% CySH 處理後其類黃酮含量(圖 30)於第四天後會快速增加，而 3% 處理組則是可延緩其含量於第六天後才有明顯的增加。貯藏第八天後其總類黃酮含量，2% CySH 含量約為對照組的 5 倍，3% CySH 處理組的含量約為對照組的 9.5 倍。

#### (二) 綠原酸、菊苣酸、異綠原酸含量變化

主莖切片經 2% CySH 處理後，可以延緩綠原酸含量於第二天後才開始上升，並且緩慢上升至第八天時含量增加為 2.6 倍，約為對照組於第四天最高含量的一半；經 3% CySH 處理後，則可以延緩綠原酸含量至第六天後才開始增加，於第八天達到與 2% 處理相近的含量(圖 29)。經兩種濃度的 CySH 處理後皆可以有效延緩菊苣酸含量不上升至第八天(圖 29)。

主莖切片經 2% CySH 處理後，可以延緩異綠原酸含量(圖 29)較對照組晚兩天上升，於第八天含量增加為 4.2 倍，小於對照組的五倍；而 3% 處理組中異綠原酸



含量則比 2% 處理組再晚兩天上升，含量約上升 2.3 倍。

三種咖啡酸衍生物含量總合於 2% CySH 處理組中，較對照組晚四天上升；而 3% CySH 處理組，則可延緩咖啡酸衍生物含量至第六天後才上升(圖 29)。

#### 四、硫氫基化合物處理延緩褐化效果討論

##### (一) 延緩外觀褐化效果

本試驗使用的 NAC 與 CySH 皆屬於 cysteine 衍生物，結構中含有硫氫基(-SH)，其硫氫基可將醌類還原為雙酚類、或與醌類結合形成新的物質、或可產生可抑制 PPO 活性的物質。但因結構不同，兩者於萵苣切片中作用的效果不同；NAC 處理於 3% 以上才具有延緩 a\* 上升的效果，而 CySH 處理延緩 a\* 值上升的濃度則是 2%，因此延緩 a\* 上升的效果以 CySH 處理較好，但經 CySH 處理後其 b\* 值上升較對照組高。

以主莖切片外觀開始出現褐化的先後評估延緩褐化效果的高低，依序為:3% CySH 於第八天開始出現、3% NAC 與 2% CySH 於第六天開始出現、2% NAC 處理組於第四天開始出現。

##### (二) 延緩總酚類含量、總咖啡酸衍生物含量、總類黃酮含量上升之效果與褐化間之關係

主莖切片經不同硫氫基化合物處理後可延緩其總酚類含量於創傷後不同天數上升。2% 與 3% NAC、2% CySH 處理組其總酚類含量較對照組晚兩天上升，3% CySH 處理組則較對照組晚四天上升，顯示 3% CySH 可有效延緩總酚類含量上升，其餘三組處理總酚類含量上升時間相同，但其開始出現褐化的時間卻不相同，顯示經硫氫基化合物處理後，以總酚類含量變化並無法解釋不同處理間褐化程度的差異。

主莖切片經硫氫基化合物處理後，延緩褐化效果較佳的三個處理分別為 3% NAC、2% CySH 與 3% CySH 處理。其中，主莖切片經 2% CySH 處理後，延緩總



咖啡酸衍生物含量上升之時間相對對照組可晚四天以上；而經 3% NAC 與 3% CySH 處理後皆可延緩六天以上。對照主莖切片外觀開始褐化的先後順序，顯示切片經硫氫基化合物處理後，以延緩總咖啡酸含量開始上升的時間點與延緩外觀褐化效果較相關。

由主莖切片外觀開始褐化的先後順序，比較不同處理間延緩褐化之效果，並對照褐化過程中酚類含量的變化。顯示相較總酚類含量變化，不同處理間之總咖啡酸衍生物含量變化與延緩褐化效果較相關。主莖切片經 3% NAC 與 2% CySH 處理後，其總酚類含量與總咖啡酸衍生物含量上升時間不一致，且此兩組產生的類黃酮含量較高，因此推測主莖切片經硫氫基化合物處理後，其總酚類含量與延緩褐化效果的相關性降低的原因，可能與類黃酮含量變化有關；標準品綠原酸與菊苣酸其最大吸收波長位於 320 nm，但若主莖切片萃取液含有其他酚類，例如：類黃酮，雖然類黃酮的最大吸收高峰並非位於波長 320 nm 下，但仍具有一定的吸光值，因此以波長 320nm 下吸光值換算所得的總酚類含量，除了包含咖啡酸衍生物，還可能包含其餘在此波長下有吸光的類黃酮物質或其餘物質。

以 NAC 或 CySH 處理可影響主莖切片內總類黃酮含量開始上升的時間或總類黃酮含量。對照組萬苳主莖切片之總類黃酮含量於第四天後有少量生成，第六天後含量維持一定。硫氫基化合物處理組中，主莖切片經 2% NAC、3% NAC、2% CySH 處理後，其類黃酮含量於第四天後開始上升，與對照組相同；而經 3% CySH 處理後，其類黃酮含量則是於第六天後才開始上升。主莖切片於創傷後第六天之總類黃酮含量由高至低依序為，2% CySH 處理組、3% NAC 處理組、2% NAC 處理組、對照組；而第八天含量由高至低依序為 2% CySH 處理組、3% NAC 與 3% CySH 處理組、2% NAC 處理組、對照組。因此，2% 與 3% NAC 處理以及 2% CySH 處理，只能影響主莖切片之總類黃酮生成的含量，而以 3% CySH 處理後，則可以延緩總類黃酮含量開始上升之時間。主莖切片其咖啡酸衍生物含量受到延緩的程度與總類黃酮含量可互相對應。主莖切片經 2% CySH 與 3% NAC 處理後，褐化程度與咖

啡酸衍生物含量受到延緩的效果相近，且兩者生成的類黃酮含量也相近，並且高於 2% NAC 處理組之總類黃酮含量。

綜合總咖啡酸衍生物含量與總類黃酮含量變化可以比較不同處理延緩褐化的效果高低。因咖啡酸衍生物氧化產生的醌類本身相互聚合或與組織內其餘物質結合為造成褐化的主要物質，但若組織內含有類黃酮可能會使褐化程度更加明顯，因此先以咖啡酸衍生物生成的時間點比較，再考慮總類黃酮含量變化，即可推測不同硫氫基化合物處理組的延緩褐化效果。

經硫氫基化合物處理後，延緩褐化效果較不佳的 2% NAC 處理組，其總咖啡酸衍生物含量晚對照組兩天開始上升，因此褐化程度較對照組低。3% NAC 處理組其總咖啡酸衍生物含量於創傷第六天後開始上升，2% CySH 組處理則是於創傷第四天後開始上升；且在第六天的 2% CySH 處理組其總類黃酮含量高於 3% NAC 處理組，造成其延緩褐化效果較 3% NAC 處理差。而以 3% CySH 處理組延緩效果最佳，於創傷第六天後其總咖啡酸衍生物與總類黃酮含量才開始上升，因此其延緩褐化效果為最佳。

### (三) 延緩主莖切片內綠原酸、菊苣酸、異綠原酸含量上升之效果與褐化間之關係

#### (1) 延緩綠原酸含量上升

主莖切片經 3% CySH 處理後，可以延緩其綠原酸含量至第六天後上升，與同濃度下的 NAC 處理之結果相似。而主莖切片經 2% CySH 處理後，其延緩綠原酸含量上升的效果，介於 3% NAC 處理與 2% NAC 處理之間，顯示 CySH 處理在較低濃度下延緩綠原酸含量上升的效果較同濃度下的 NAC 處理佳。

#### (2) 延緩菊苣酸含量上升

主莖切片經 2% 和 3% CySH 處理後，皆可以延緩其菊苣酸含量至第八天不上升，顯示 2% 以上的 CySH 處理可以有效延緩菊苣酸含量上升；而 NAC 處理延緩菊苣酸上升的效果與同濃度下的 CySH 處理相比，其延緩菊苣酸上升的效果較差。



### (3) 延緩異綠原酸含量上升

主莖切片不論經過 NAC 處理或 CySH 處理，其延緩異綠原酸含量上升之時間皆相同。在處理濃度 3% 下皆可以延緩至第六天後才上升，而在濃度 2% 下皆可以延緩至第四天後含量才會上升，顯示兩種含硫氫基化合物處理對延緩異綠原酸含量的效果相同。

顯示 CySH 與 NAC 處理，其延緩含量上升的效果會因咖啡酸衍生物種類而異，並且兩種處理主要的差異為延緩綠原酸與菊苣酸含量上升之時間。兩種濃度下的 CySH 處理皆可以有效延緩菊苣酸含量上升，且在濃度 2% 下，CySH 延緩綠原酸含量上升的效果較 NAC 處理佳。綜合以上結果，顯示以 CySH 處理萬苣主莖切片後，其延緩切片外觀褐化的效果優於 NAC 處理，是因其延緩菊苣酸與綠原酸含量上升的效果較佳。

## 五、結論

創傷後萬苣主莖切片主要生成的酚類物質為咖啡酸衍生物，經植物體外試驗顯示，為易被萬苣 PPO 氧化的基質且可造成明顯褐化，而不易被萬苣 PPO 催化的類黃酮物質，於咖啡酸衍生物同時存在時，可被醌類物質經非酵素氧化方式氧化，並造成褐化。因此探討不同藥劑處理後延緩褐化的效果，以及其對總酚類含量、總咖啡酸含量、個別酚類含量、總類黃酮含量變化的影響。

創傷後主莖切片經 3% 醋酸處理後，可抑制其 PAL 活性上升，進而延緩其總酚類含量於 8 天貯藏期間內不上升，並且其外觀可維持白色色澤至第八天，顯示若創傷後組織內酚類含量降低，使得 PPO 可氧化的基質減少，即可以有效地延緩萬苣主莖切片褐化。經硫氫基化合物處理後，其延緩外觀褐化的效果不同，由其開始出現褐化徵狀的時間先後，依序為第四天出現褐化徵狀的 2% NAC、第六天出現褐化的 3% NAC 與 2% CySH，以及第八天出現褐化的 3% CySH。



總酚類含量與總咖啡酸含量變化趨勢在 2% NAC 處理以及 3% CySH 處理組中開始上升的時間點相同；但於 3%NAC 以及 2%CySH 處理中，總酚類含量與總咖啡酸含量上升時間點則不一致，且此兩組產生的總類黃酮含量較高，推測總酚類含量與延緩褐化效果的相關性降低的原因可能為受到類黃酮或其餘物質干擾。因此，主莖切片經不同硫氫基化合物處理後延緩外觀褐化之效果，與其延緩總咖啡酸衍生物含量上升之效果較相關。

綜合主莖切片之總咖啡酸衍生物含量與總類黃酮含量變化可以比較不同硫氫基化合物處理延緩褐化的效果高低。延緩褐化效果較不佳的 2% NAC 處理組，其總咖啡酸衍生物含量晚對照組兩天開始上升，因此褐化程度較對照組低。主莖切片經 3% NAC 或 2% CySH 處理後，皆於第六天外觀出現褐化徵狀，其中以 2% CySH 處理後的維管束褐化較明顯；3% NAC 處理組其總咖啡酸衍生物含量於第六天後開始上升，2% CySH 組處理則是於第四天後開始，且在第六天的 2% CySH 處理組其總類黃酮含量高於 3% NAC 處理組，因而造成其減緩褐化效果較 3% NAC 差。而以 3% CySH 處理組延緩效果最佳，於創傷第六天後其總咖啡酸衍生物與總類黃酮含量才開始上升，因此其延緩褐化效果為最佳。

CySH 與 NAC 處理效果會因咖啡酸衍生物種類而異，兩種處理主要的差異為延緩綠原酸與菊苣酸含量上升。兩種濃度下的 CySH 處理皆可以有效延緩菊苣酸含量上升，且在濃度 2% 下，CySH 延緩綠原酸含量上升的效果較 NAC 處理佳。綜合以上顯示以 CySH 處理延緩莖主莖切片褐化的效果優於 NAC 處理的原因為其延緩菊苣酸與綠原酸含量上升的效果較佳，且於濃度 3% 下可延緩類黃酮含量開始上升的時間。

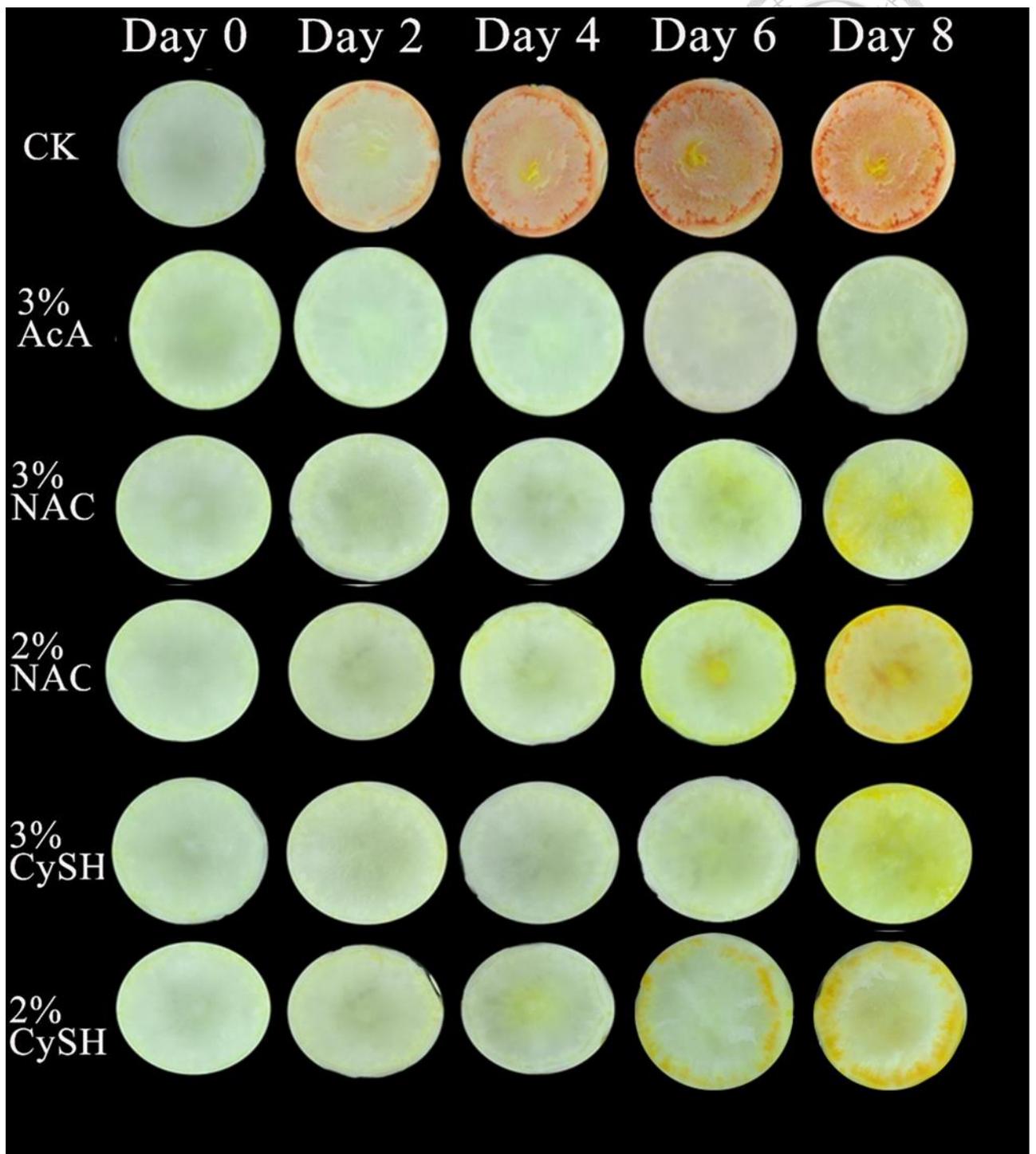


圖 2. 不同褐化抑制溶液處理之主莖圓片在 5°C 下貯藏 8 天期間外觀之變化。

Fig. 2. The appearance of stem disk treated with different browning inhibitor changed during 8 days storage at 5°C.

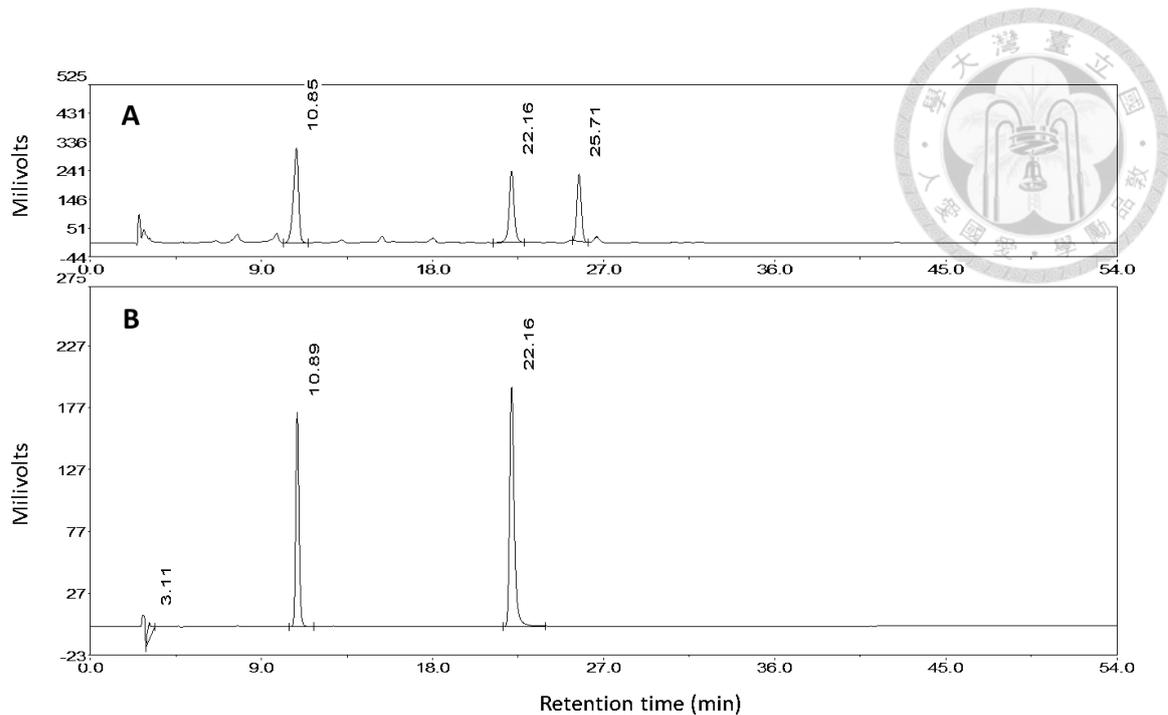


圖 3. 創傷後於 5°C 下貯藏第四天之萵苣主莖切片萃取液經 HPLC 分離後偵測波長 320 nm 下所得層析圖。(A. 為主莖萃取液；B. 為標準品綠原酸與菊苣酸)

Fig. 3. HPLC chromatogram of extracts of the wounded lettuce stem disk stored for 4 days at 5°C. (A : the extracts of the wounded lettuce stem disk ; B : chlorogenic acid standard and chicoric acid standard)

**column:** Dikama Inspire™ C18 (5 μm, 12 nm , 150 x 4.6 nm)

**mobile phase A:** water added with 5% formic acid (v/v)

**mobile phase B:** methanol added with 5% formic acid (v/v)

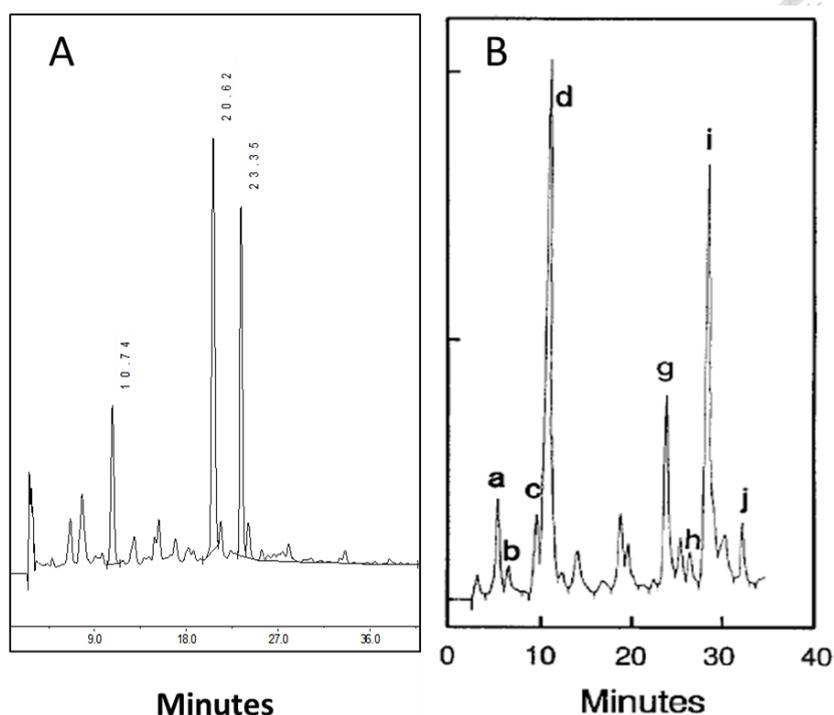
**flow rate:** 1 ml/min

**gradient:** 90% A → 72% A (at 18min) → 65% A (at 32min) → 43% A (at 54min)

**volume of injection:** 50 μl

**temperature:** 40°C

**detector:** UV detector at 320 nm



**C**

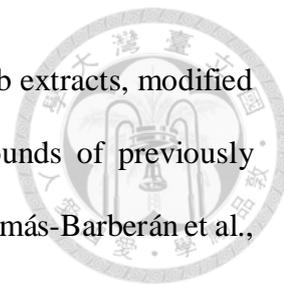
Compound (common name)
a 3-Caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid)
b Caffeoyltartaric acid*
c 4-Caffeoylquinic acid (kryptochlorogenic acid)
d 5-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)
e p-Coumaroylquinic acid
f Feruloylquinic acid
g Dicafeoyltartaric acid <sup>2</sup>
h 3,4-Dicafeoylquinic acid
i 3,5-Dicafeoylquinic acid (isochlorogenic acid)
j 4,5-Dicafeoylquinic acid

<sup>2</sup>Tentatively identified by comparison with previously reported chromatograms of lettuce extracts and by their UV spectra recorded with diode array detector. The structures were numbered following the IUPAC rules (Clifford, 1986).

圖 4. 創傷後於 5°C 下貯藏第八天之萵苣主莖切片萃取液經 HPLC 分離後偵測波長 320 nm 下所得之層析圖與文獻層析圖比較。(A. 為創傷後主莖切片萃取液；B. 為文獻中創傷後萵苣中肋萃取液；C. 為文獻中創傷後萵苣中肋萃取液內相對應之酚類物質(modified from Tomás-Barberán et al., 1997)

Fig. 4. The comparison between the HPLC chromatogram of the extracts of the wounded lettuce stem disk stored for 8 days at 5°C and the previously reported chromatogram of the extracts of the wounded midrib. (A : the extracts of the wounded lettuce stem disk ;

B : the previously reported chromatogram of wounded lettuce midrib extracts, modified from Tomás-Barberán et al., 1997 ; C : the corresponded compounds of previously reported chromatogram of wounded lettuce midrib, modified from Tomás-Barberán et al., 1997)



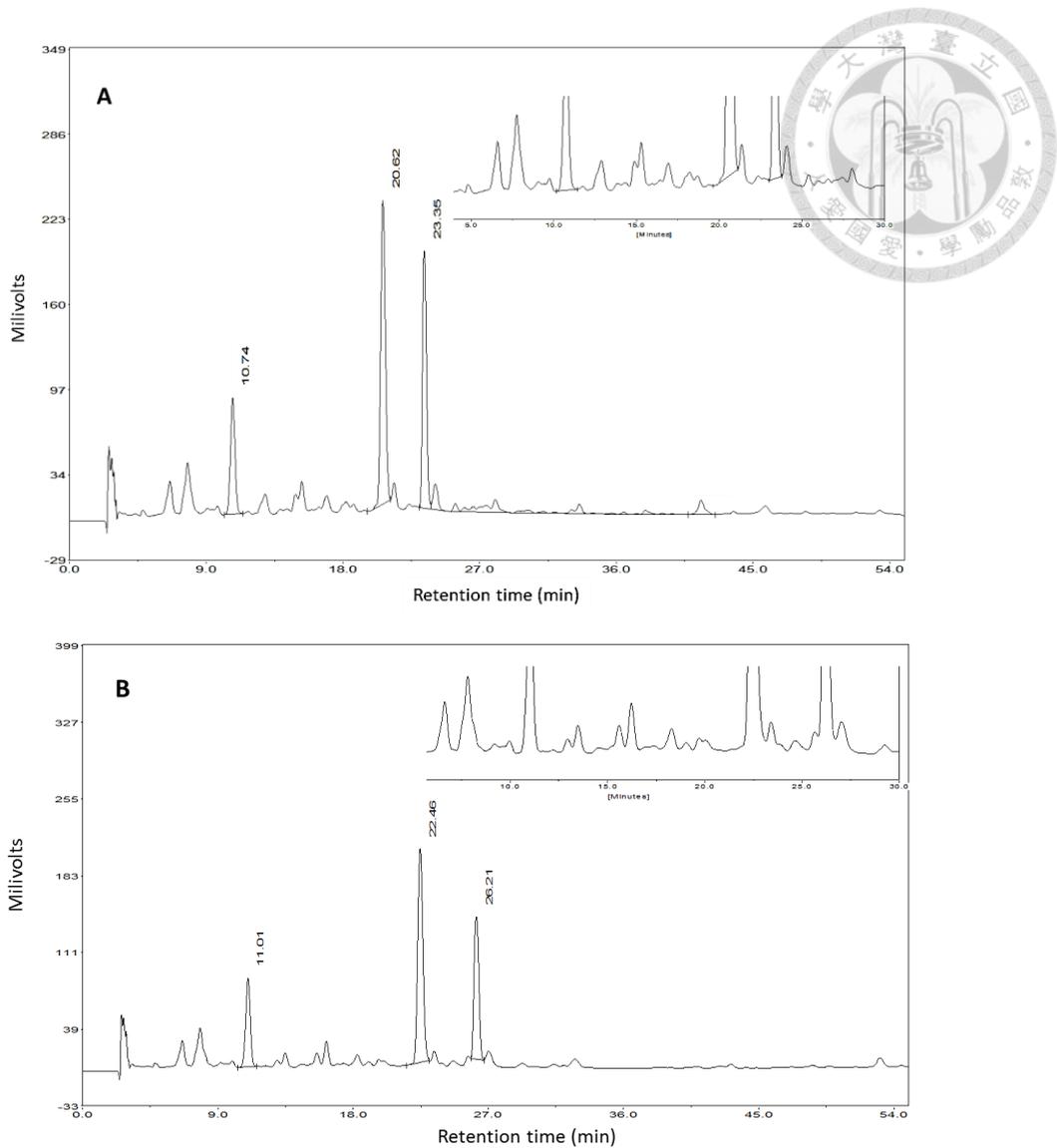


圖 5. 創傷後第八天萵苣主莖切片萃取液經不同 HPLC 梯度分離後之層析圖。(A. 為以  $1.2\% \text{ min}^{-1}$  等梯度進行分離；B. 為以修正後梯度進行分離)

Fig. 5. HPLC chromatogram of the extracts of the wounded lettuce stem disk stored for 8 days at  $5^{\circ}\text{C}$  with different separation gradient. (A : with gradient  $1.2\% \text{ min}^{-1}$  ; B : with gradient  $1\% \text{ min}^{-1}$  followed by  $0.5\% \text{ min}^{-1}$  between signal of chicoric acid and isochlorogenic acid.)

A: 起始條件 10% 甲醇相經 40 分鐘等梯度升至 58% 甲醇相，以  $1.2\% \text{ min}^{-1}$  上升

B: 起始條件 10% 甲醇相以  $1\% \text{ min}^{-1}$  上升 18 分鐘，再以  $0.5\% \text{ min}^{-1}$  上升 14 分鐘，最後以  $1\% \text{ min}^{-1}$  上升 22 分鐘。

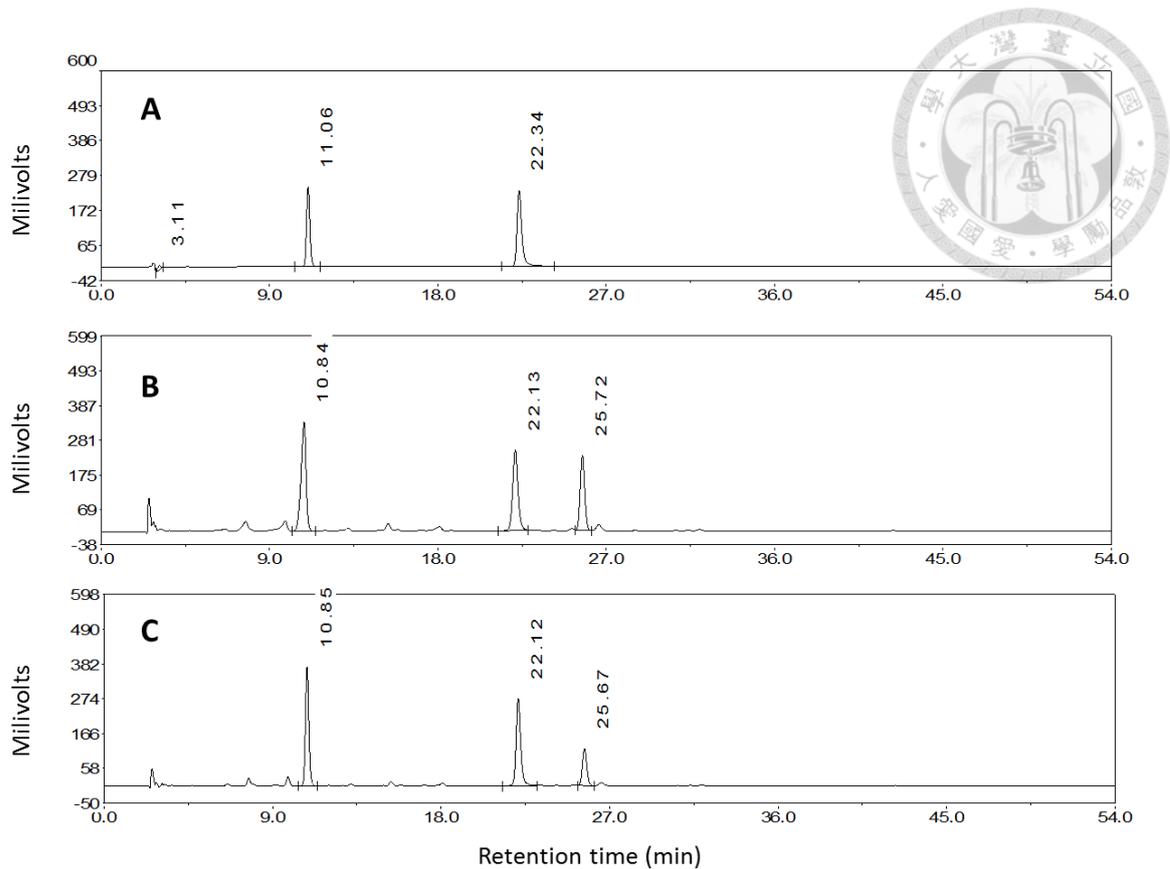


圖 6. 添加綠原酸與菊苣酸標準品於創傷後第四天之對照組主莖切片萃取液，經 HPLC 分離後所得之層析圖。(A.為 40  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸標準品與 20  $\mu\text{g/ml}$  菊苣酸標準品；B.為創傷後第四天之對照組主莖切片萃取液；C.為以標準品體積:樣品體積 (1:1) 添加後之混合溶液)

Fig. 6. HPLC chromatogram of the standard addition to the extracts of the 4-days-wounded control stem disk sample. (A: standards of 40  $\mu\text{g/ml}$  chlorogenic acid and 20  $\mu\text{g/ml}$  chicoric acid ; B: the extracts of 4-days-wounded control stem disk ; C: the mixture after 1:1(v/v) standard addition)

**column:** Dikama Inspire™ C18 (5  $\mu\text{m}$ , 12 nm , 150 x 4.6 nm)

**mobile phase A:** water added with 5% formic acid (v/v)

**mobile phase B:** methanol added with 5% formic acid (v/v)

**flow rate:** 1 ml/min

**gradient:** 90% A  $\rightarrow$  72% A (at 18min)  $\rightarrow$  65% A (at 32min)  $\rightarrow$  43% A (at 54min)

**volume of injection:** 50  $\mu\text{l}$

**temperature:** 40°C      **detector:** UV detector at 320 nm

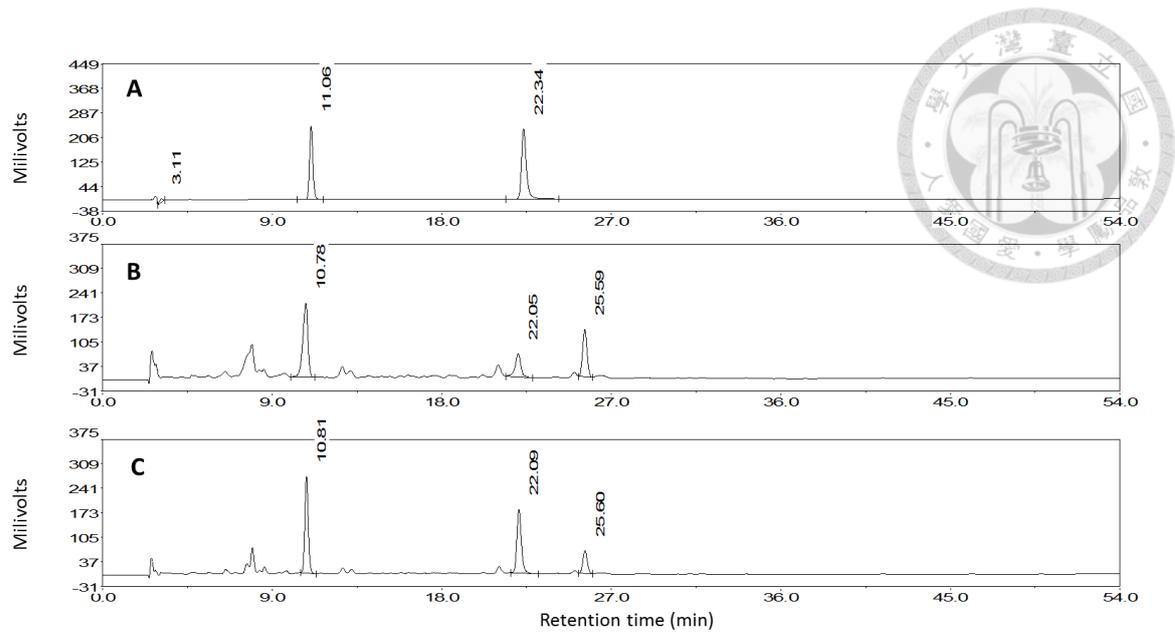


圖 7. 添加綠原酸與菊苣酸標準品於創傷後第八天 3%CySH 處理組主莖切片之萃取液中，經 HPLC 分離後所得之層析圖。(A. 為 40  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸標準品與 20  $\mu\text{g/ml}$  菊苣酸標準品；B. 為創傷後第八天 3%CySH 處理組之主莖切片萃取液；C. 為以標準品體積:樣品體積 (1:1) 添加後之混合溶液)

Fig. 7. HPLC chromatogram of the standard addition to the extracts of 8-days-3%CySH treated stem disk. (A: standards of 40  $\mu\text{g/ml}$  chlorogenic acid and 20  $\mu\text{g/ml}$  chicoric acid ; B: the extracts of 8-days-3%CySH treated stem disk ; C: the mixture after 1:1(v/v) standard addition)

**column:** Dikama Inspire™ C18 (5  $\mu\text{m}$ , 12 nm , 150 x 4.6 nm)

**mobile phase A:** water added with 5% formic acid (v/v)

**mobile phase B:** methanol added with 5% formic acid (v/v)

**flow rate:** 1 ml/min

**gradient:** 90% A  $\rightarrow$  72% A (at 18min)  $\rightarrow$  65% A (at 32min)  $\rightarrow$  43% A (at 54min)

**volume of injection:** 50  $\mu\text{l}$

**temperature:** 40°C      **detector:** UV detector at 320 nm

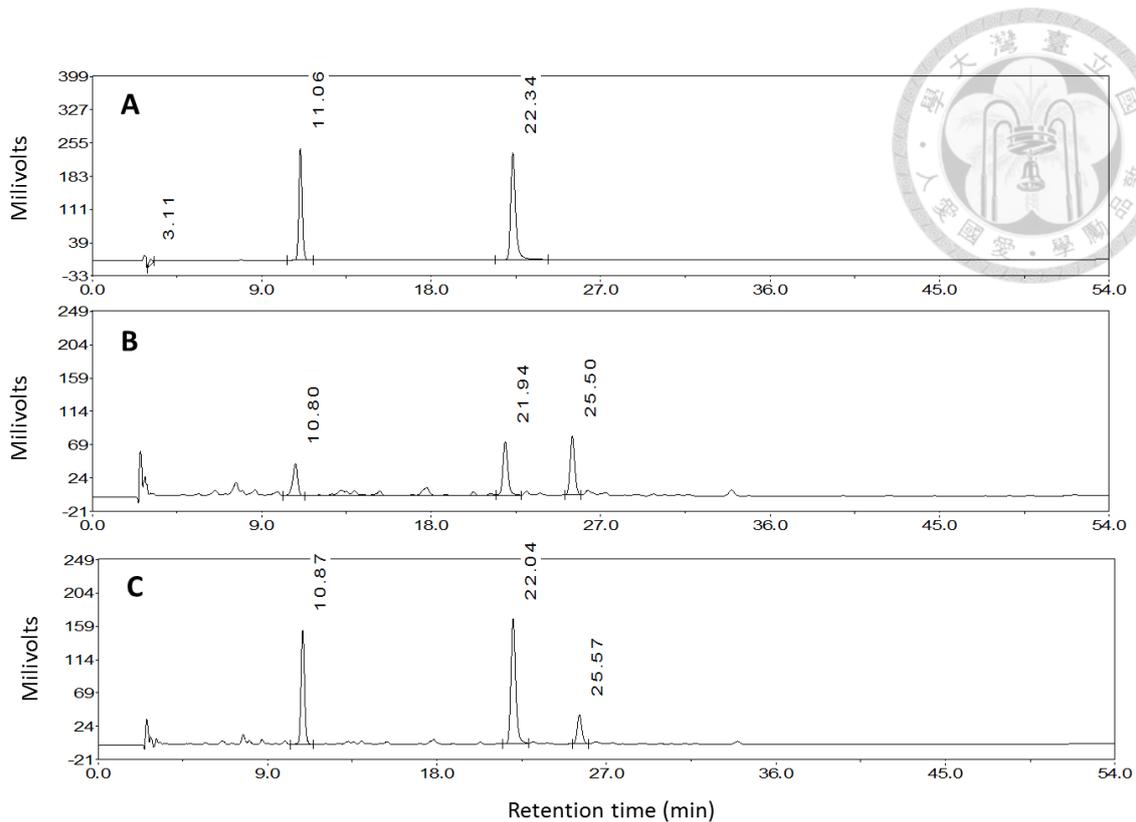


圖 8. 添加綠原酸與菊苣酸標準品於創傷後第八天 3%NAC 處理組主莖切片之萃取液中，經 HPLC 分離後所得之層析圖。(A.為 40  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸標準品與 20  $\mu\text{g/ml}$  菊苣酸標準品；B.為創傷後第八天 3%NAC 處理組之主莖切片萃取液；C.為以標準品體積:樣品體積 (1:1) 添加後之混合溶液)

Fig. 8. HPLC chromatogram of the standard addition to the extracts of 8-days-3%NAC treated stem disk. (A: standards of 40  $\mu\text{g/ml}$  chlorogenic acid and 20  $\mu\text{g/ml}$  chicoric acid ; B: the extracts of 8-days-3%NAC treated stem disk ; C: the mixture after 1:1(v/v) standard addition)

**column:** Dikama Inspire<sup>TM</sup> C18 (5  $\mu\text{m}$ , 12 nm , 150 x 4.6 nm)

**mobile phase A:** water added with 5% formic acid (v/v)

**mobile phase B:** methanol added with 5% formic acid (v/v)

**flow rate:** 1 ml/min

**gradient:** 90% A  $\rightarrow$  72% A (at 18min)  $\rightarrow$  65% A (at 32min)  $\rightarrow$  43% A (at 54min)

**volume of injection:** 50  $\mu\text{l}$

**temperature:** 40 $^{\circ}\text{C}$       **detector:** UV detector at 320 nm

表 1. 高效能液相層析\*內綠原酸與菊苣酸標準品之標準曲線的迴歸方程式  
 Table 1. Standard curve of standard chlorogenic acid and chicoric acid in HPLC.

標準品	Retention time (min)	適用濃度範圍 (µg/ml)	Regression equation (R <sup>2</sup> )
Chlorogenic acid (5-O-Caffeoylquinic acid)	10.89	0-80	Y = 75.174X - 82.434 R <sup>2</sup> = 0.9991
Chicoric acid (Dicafeoyltartaric acid)	22.16	0-80	Y = 107.43X + 151.12 R <sup>2</sup> = 0.9987

表 2. 標準添加所得之定量誤差

Table 2. Quantification error of standard addition

	Chlorogenic acid	Chicoric acid
CK	5.0%	7.2%
CySH	3.5%	2.8%
NAC	6.4%	11.0%

**column:** Dikama Inspire™ C18 (5 µm, 12 nm , 150 x 4.6 nm)

**mobile phase A:** water added with 5% formic acid (v/v)

**mobile phase B:** methanol added with 5% formic acid (v/v)

**flow rate:** 1 ml/min

**gradient:** 90% A → 72% A (at 18min) → 65% A (at 32min) → 43% A (at 54min)

**volume of injection:** 50 µl

**temperature:** 40°C

**detector:** UV detector at 320 nm

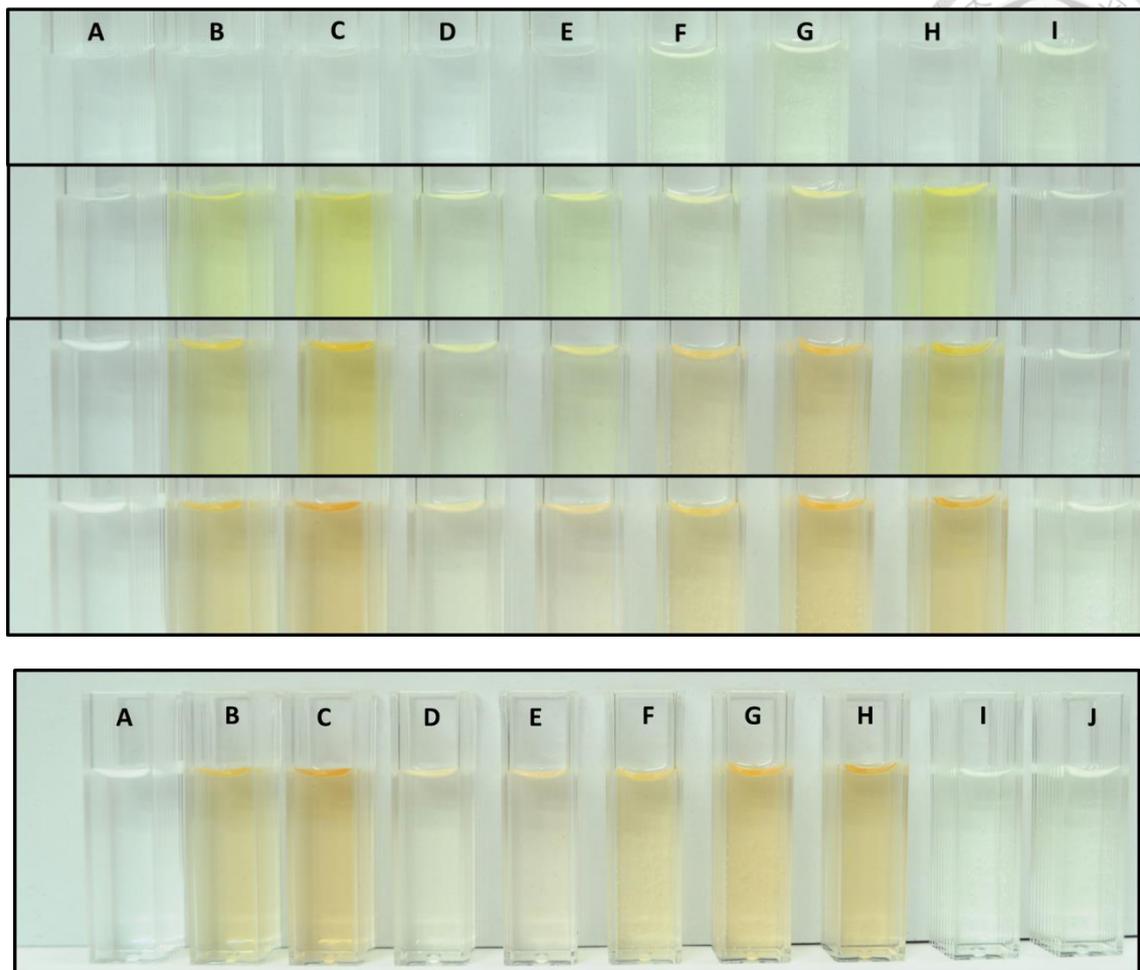


圖 9. 綠原酸、菊苣酸與類黃酮標準品經結球萵苣葉片內多酚氧化酶氧化後褐化過程外觀之變化，由上而下分別為經過 0、3、10、25、55 分鐘。

Fig. 9. Browning progress of chlorogenic acid, chicoric acid standard solution incubated with polyphenol oxidase for 0,3,10,25,55 min.

- (A) Polyphenoloxidase(PPO) in phosphate buffer , PH 6.8
- (B) 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chlorogenic acid and PPO
- (C) 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chicoric acid and PPO
- (D) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chlorogenic acid and PPO
- (E) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chicoric acid and PPO
- (F) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chlorogenic acid 、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rutin hydrate and PPO
- (G) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chicoric acid 、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rutin hydrate and PPO
- (H) 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chlorogenic acid 、30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chicoric acid and PPO
- (I) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rutin hydrate
- (J) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rutin hydrate and PPO

(A)



(B)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Compounds	CHL	CHI	CHL	CHI	CHL	RU	RU	RU	RU	RU
Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	60	60	20	20	30	20	20	20	40	40
					+		+	+	+	+
					CHI		CHL	CHI	CHL	CHI
					30		20	20	20	20
L	70	67	73	72	66	77	73	72	70	69
a*	-1	0	-5	-4	-1	8	-5	-2	-4	2
b*	28	35	16	18	34	-2	25	27	31	38

chlorogenic acid (CHL) / chicoric acid (CHI) / rutin hydrates (RU)

圖 10. 不同濃度之綠原酸、菊苣酸與芸香苷標準品經結球萵苣葉片多酚氧化酶於植物體外氧化後 40 分鐘之 (A) 溶液外觀 (B) 標準品溶液氧化後顏色值。

Fig. 10. Different concentration of chlorogenic acid, chicoric acid and rutin hydrate standard solution incubated with polyphenol oxidase from lettuce leaf tissue for 40 minutes (A) appearance of PPO oxidized standard solution (B) L a\* b\* value of PPO oxidized standard solution.

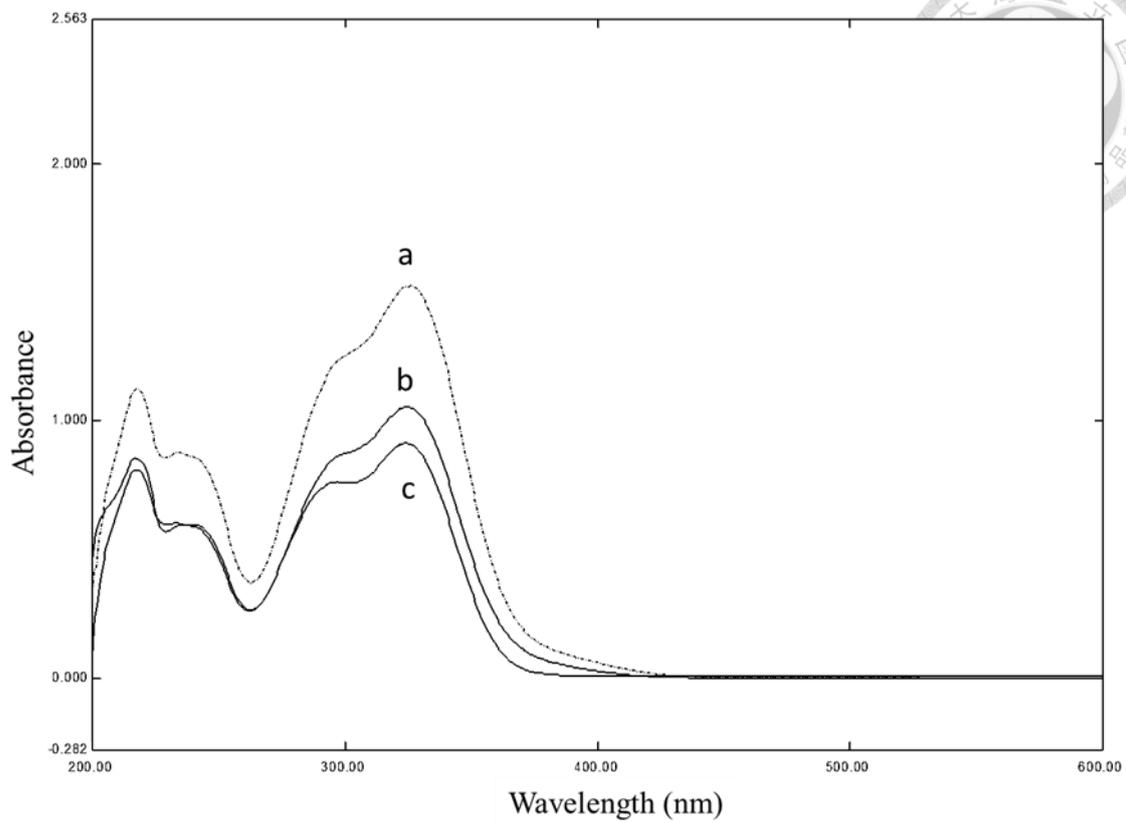


圖 11. 標準品於波長 200-600 nm 間連續吸收光譜。(a 為 20  $\mu\text{g/ml}$  菊苣酸；b 為 20  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸；c 為 10  $\mu\text{g/ml}$  咖啡酸)

Fig. 11. Absorption spectra of standard solution between wavelength 200-600 nm. (a: Chicoric acid, 20  $\mu\text{g/ml}$  ; b: Chlorogenic acid, 20  $\mu\text{g/ml}$  ; c: Caffeic acid, 10  $\mu\text{g/ml}$ )

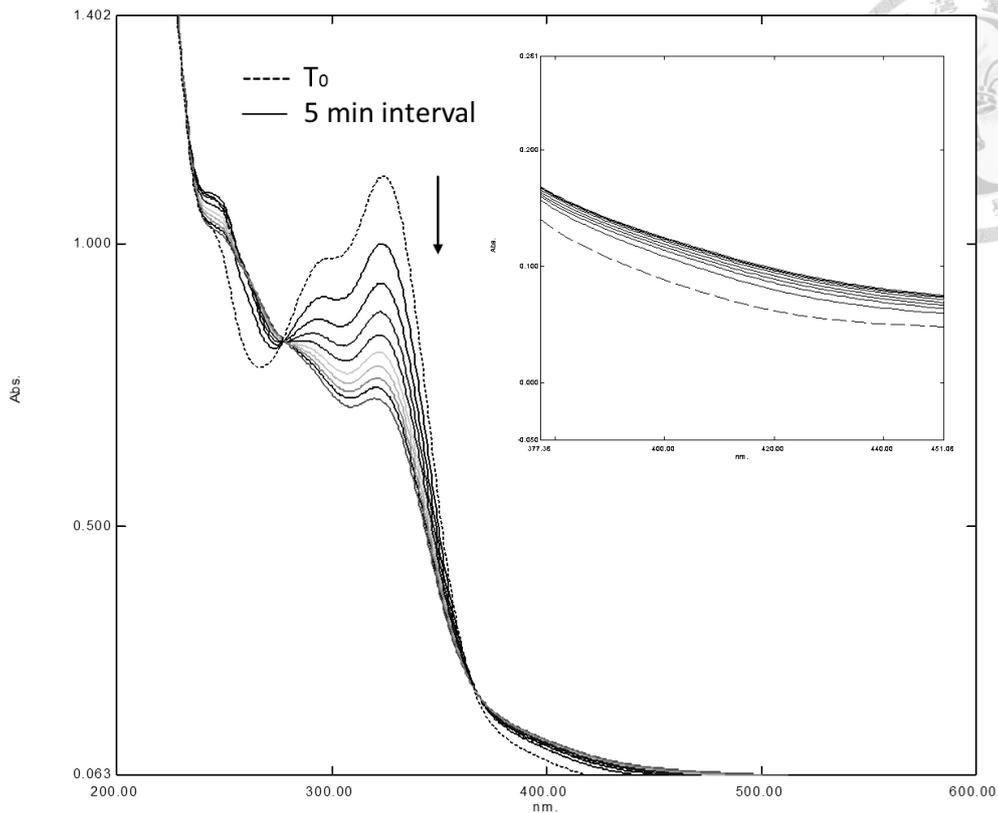


圖 12. 綠原酸標準品 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 經萬苣主莖 PPO (30 U/ml) 氧化過程每隔五分鐘紀錄之吸收光譜變化，(右上)為波長 370-450 nm 間放大。

Fig. 12. Absorption spectra of chlorogenic acid (20  $\mu\text{g/ml}$ ) incubated with polyphenol oxidase (30 U/ml) at every five minutes incubation times, (right) the zoom in the spectra between wavelength 370-450 nm.

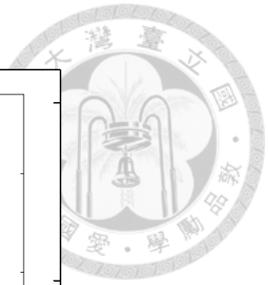
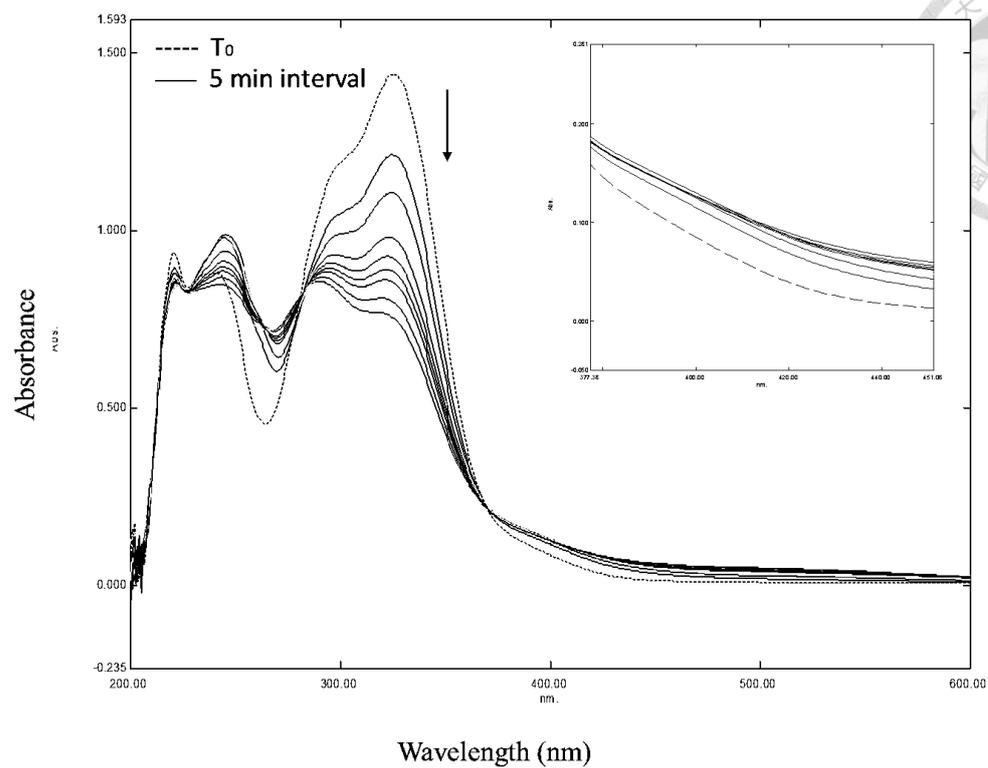


圖 13. 菊苣酸標準品 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 經萬苣主莖 PPO (30 U/ml) 氧化過程每隔五分鐘紀錄之吸收光譜變化，(右上)為波長 370-450 nm 間放大。

Fig 13. Absorption spectra of chicoric acid (20  $\mu\text{g/ml}$ ) incubated with polyphenol oxidase (30 U/ml) at every five minutes incubation times (right) the zoom in the spectra between wavelength 370-450 nm.

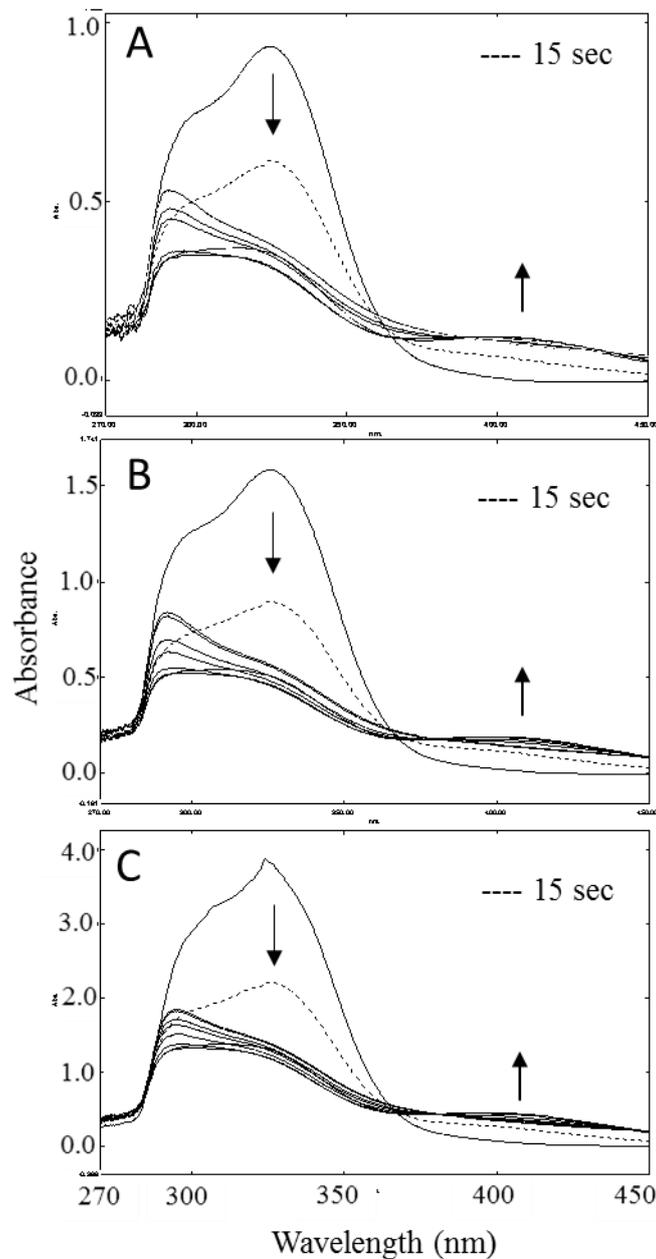


圖 14. 標準品溶液經葛苳葉片 PPO 氧化過程，於反應後 0、15、90、180、300、600、900、1200、1800 秒紀錄波長 270-450 nm 間之吸收光譜。(A. 為 20  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸；B. 為 20  $\mu\text{g/ml}$  菊苳酸；C. 為 30  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸與 30  $\mu\text{g/ml}$  菊苳酸之混合溶液)。

Fig. 14. Absorption spectra of standard solution incubated with polyphenol oxidase recorded at 0、15、90、180、300、600、900、1200、1800 seconds after oxidation between wavelength 370-450 nm. (A: 20  $\mu\text{g/ml}$  chlorogenic acid ; B: 20  $\mu\text{g/ml}$  chicoric acid ; C: mixture of 30  $\mu\text{g/ml}$  chlorogenic acid and 30  $\mu\text{g/ml}$  chicoric acid standard solution)

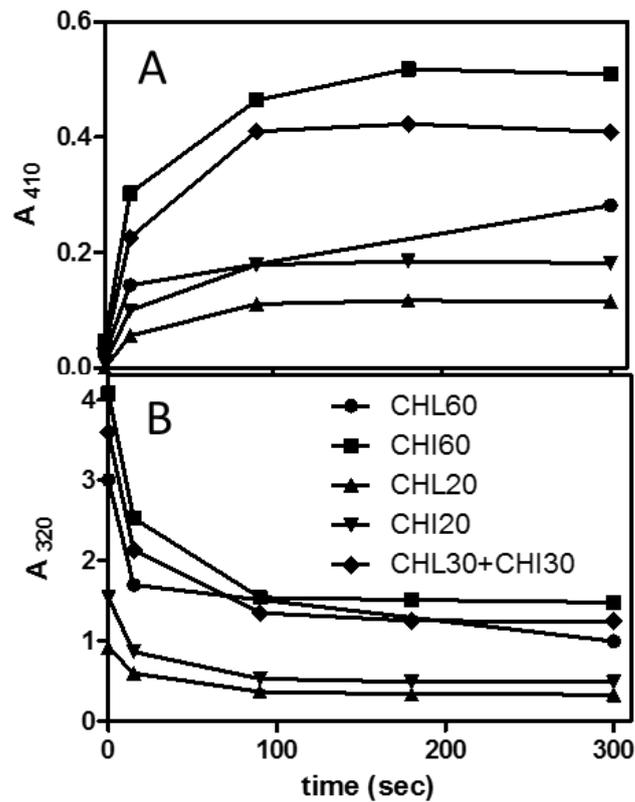


圖 15. 標準品溶液經萬苳葉片 PPO 氧化過程，於反應後 0、15、90、180、300、秒於 (A) 波長 320 nm 與 (B) 410 nm 下吸光值變化。

(CHL20: 20  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸標準品溶液；CHI60: 60  $\mu\text{g/ml}$  菊苣酸標準品溶液；CHL30+CHI30: 30  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸與 30  $\mu\text{g/ml}$  菊苣酸混合標準品溶液)

Fig. 15. Monitoring absorbance at (A) 320 and (B) 410 nm recorded at 0、15、90、180、300 seconds after standard solution incubated with polyphenol oxidase.

(CHL20: 20  $\mu\text{g/ml}$  chlorogenic acid ; CHI60: 60  $\mu\text{g/ml}$  chicoric acid ; CHL30+CHI30: mixture of 30  $\mu\text{g/ml}$  chlorogenic acid and 30  $\mu\text{g/ml}$  chicoric acid)

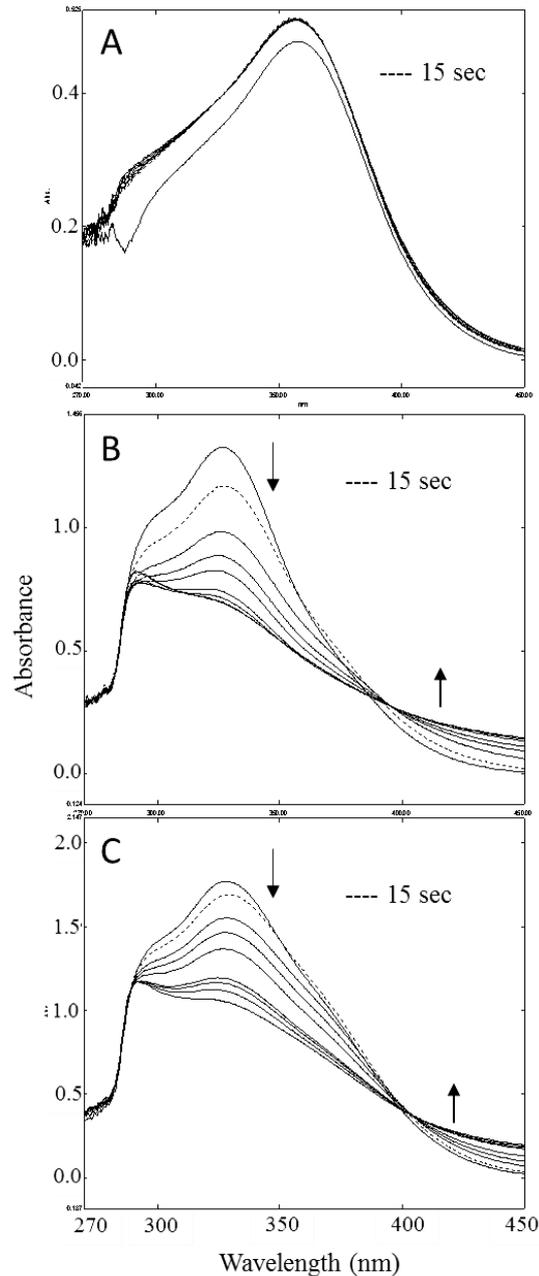


圖 16. 標準品溶液經葛苳葉片 PPO 氧化過程，於反應後 0、15、90、180、300、600、900、1200、1800 秒紀錄波長 270-450 nm 間之吸收光譜。(A. 為 20 µg/ml 芸香苷；B. 為 20 µg/ml 綠原酸與 20 µg/ml 芸香苷之混合溶液；C. 為 20 µg/ml 綠原酸與 40 µg/ml 芸香苷之混合溶液)

Fig. 14. Absorption spectra of standard solution incubated with polyphenol oxidase recorded at 0、15、90、180、300、600、900、1200、1800 seconds after oxidation between wavelength 370-450 nm. (A: 20 µg/ml rutin hydrate ; B: mixture of 20 µg/ml chlorogenic acid and 20 µg/ml rutin hydrate ; C: mixture of 20 µg/ml chlorogenic acid and 40 µg/ml rutin hydrate)

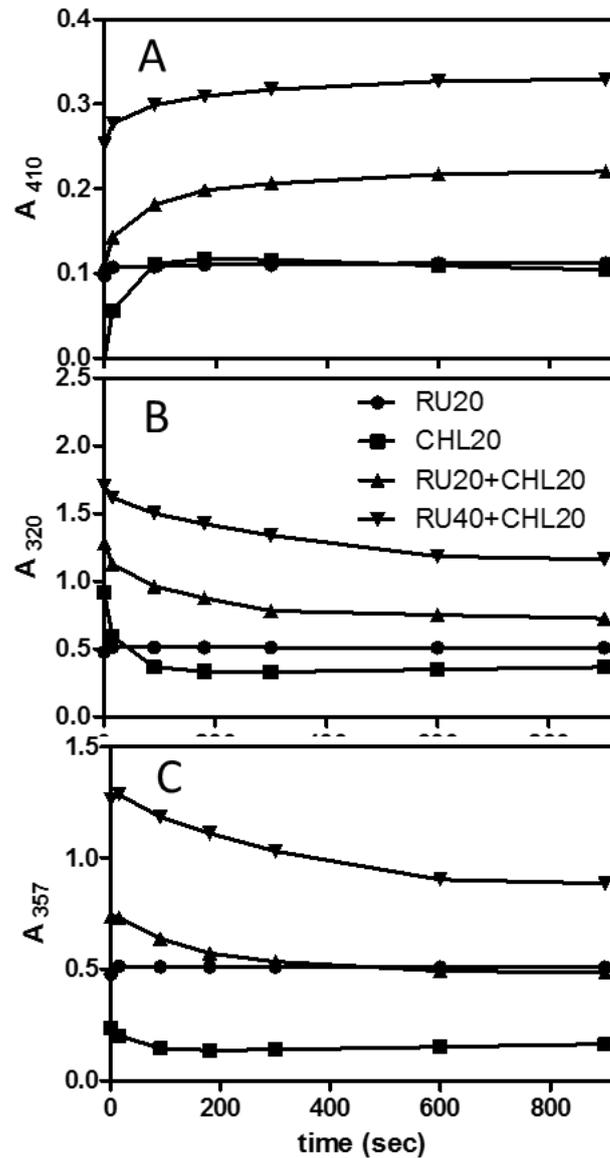


圖 17. 標準品溶液經葛苳葉片 PPO 氧化過程，於反應後 0、15、90、180、300、秒於波長(A) 320 nm、(B) 410 nm、(C) 357 nm 下吸光值變化。

(RU20: 20  $\mu\text{g/ml}$  芸香苷標準品溶液；CHL20: 20  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸標準品溶液；RU20+CHL20: 20  $\mu\text{g/ml}$  芸香苷與 20  $\mu\text{g/ml}$  綠原酸之混合標準溶液)

Fig. 17. Monitoring absorbance at (A) 320, (B) 410 nm, (C) 357nm recorded at 0、15、90、180、300 seconds after standard solution incubated with polyphenol oxidase.

(RU20: 20  $\mu\text{g/ml}$  rutin hydrate；CHL20: 20  $\mu\text{g/ml}$  chlorogenic acid；RU20+CHL20: mixture of 20  $\mu\text{g/ml}$  rutin hydrate and 20  $\mu\text{g/ml}$  chlorogenic acid)

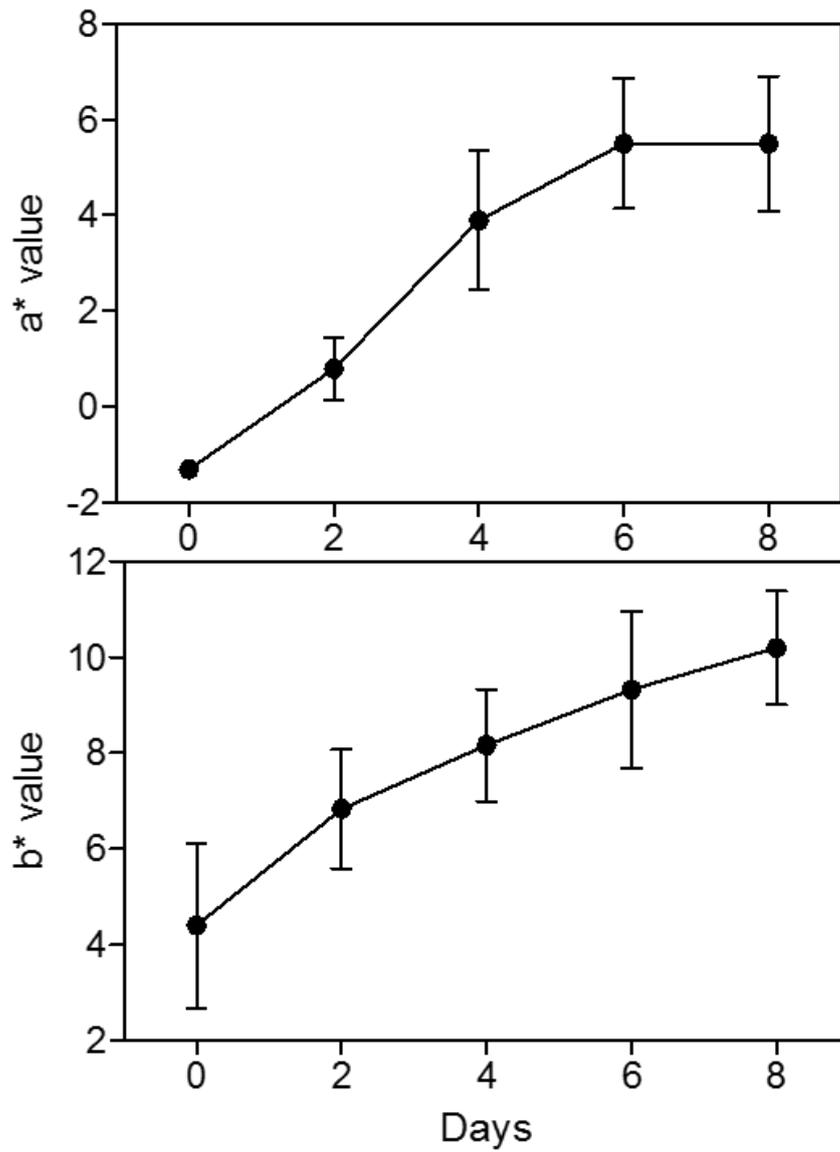


圖 18. 創傷後萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間 a\* 值與 b\* 值變化。

Fig. 18. The change in a\* and b\* value of control stem disk during 8 days storage at 5°C.

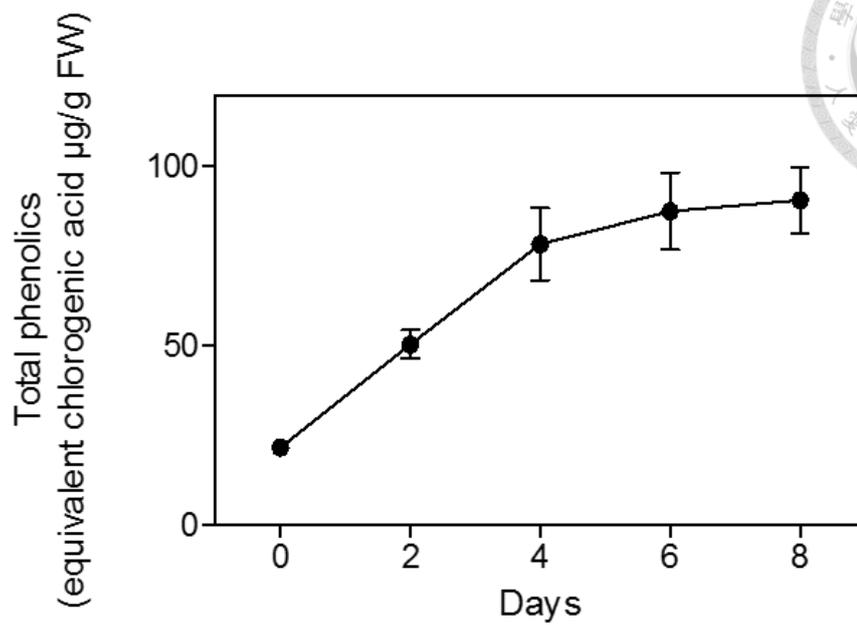


圖 19. 創傷後萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間總酚類含量變化。

Fig19. Change in total phenolics content of wounded lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C.

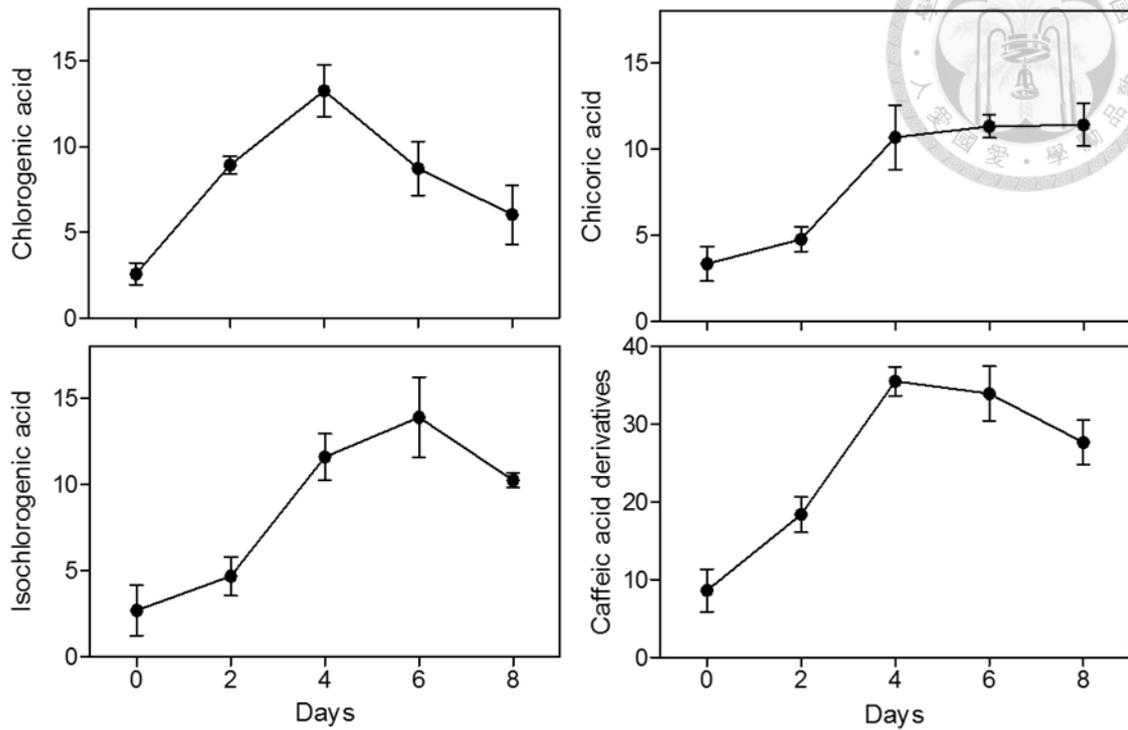


圖 20. 創傷後萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間綠原酸、菊苣酸、異綠原酸<sup>Z</sup>與主要咖啡酸衍生物總含量變化。(異綠原酸<sup>Z</sup>由文獻推測定性，並以綠原酸標準曲線換算其濃度)

Fig. 20. Change in chlorogenic acid content, chicoric acid content, isochlorogenic acid<sup>Z</sup> content and caffeic acid derivatives content of wounded lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C. (isochlorogenic acid<sup>Z</sup> was identified by reference, and was quantified by the standard curve of chlorogenic acid)

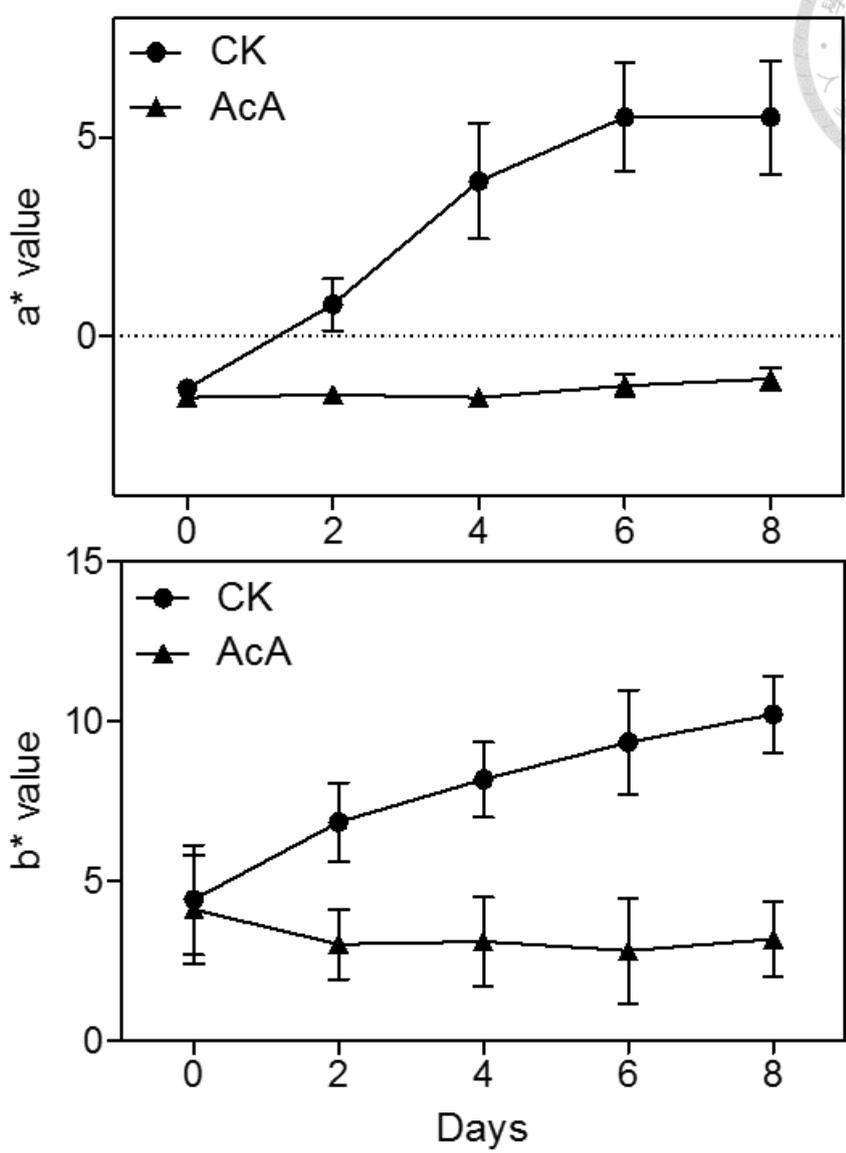


圖 21. 創傷後經 3%醋酸處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間 a\*值與 b\*值變化。

Fig. 21. The effect of 3% acetic acid on a\* and b\* value of stem disk during 8 days storage at 5°C.

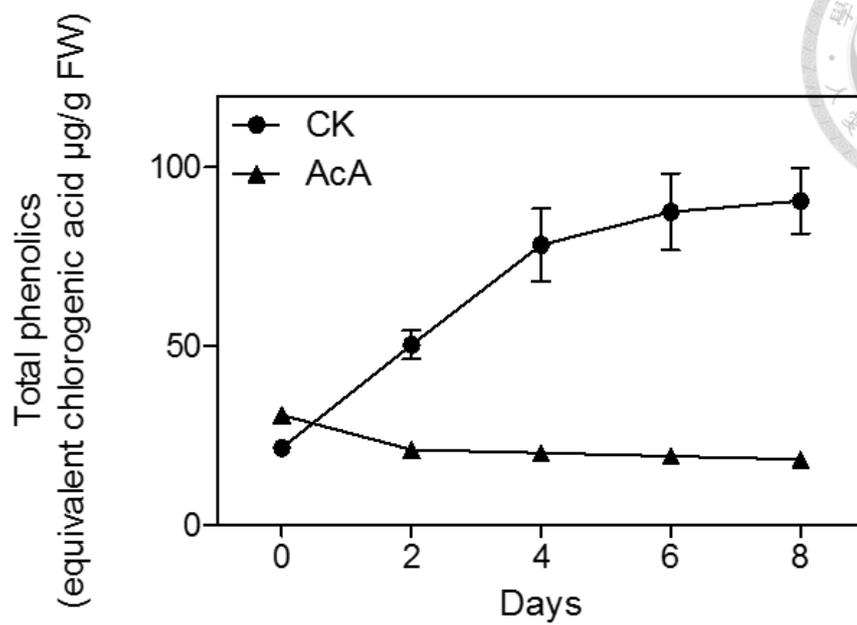


圖 22. 創傷後經 3% 醋酸處理萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間總酚類含量變化。

Fig. 22. Effect of 3% acetic acid on total phenolics content of wounded lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C.

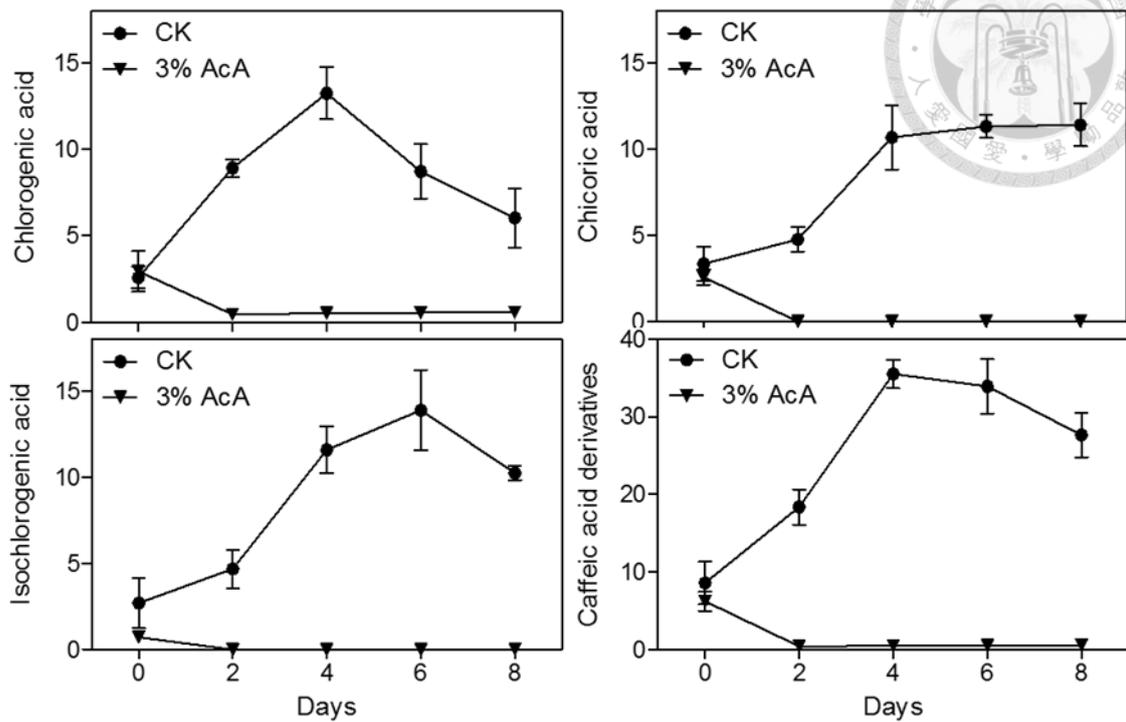


圖 23. 創傷後經 3% 醋酸處理萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間綠原酸、菊苣酸、異綠原酸<sup>Z</sup> 與主要咖啡酸衍生物總含量變化。(異綠原酸<sup>Z</sup> 由文獻推測定性，並以綠原酸標準曲線換算其濃度)

Fig. 23. Change in chlorogenic acid content, chicoric acid content, isochlorogenic acid<sup>Z</sup> content and caffeic acid derivatives content of 3% acetic acid treated lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C. (isochlorogenic acid<sup>Z</sup> was identified by reference, and was quantified by the standard curve of chlorogenic acid)

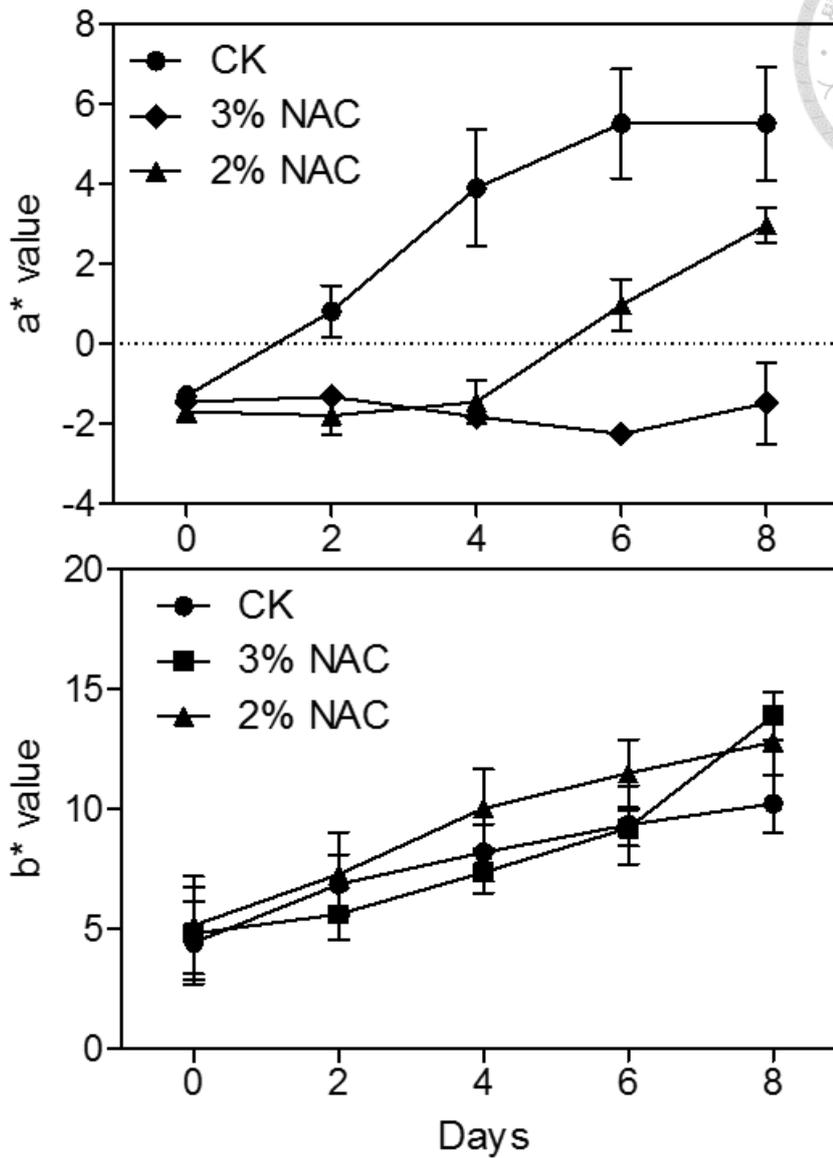


圖 24. 創傷後經 2% 及 3% NAC 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間 a\* 值與 b\* 值變化。

Fig. 24. The effect of 2% and 3% N-acetyl-cysteine on a\* and b\* value of stem disk during 8 days storage at 5°C.

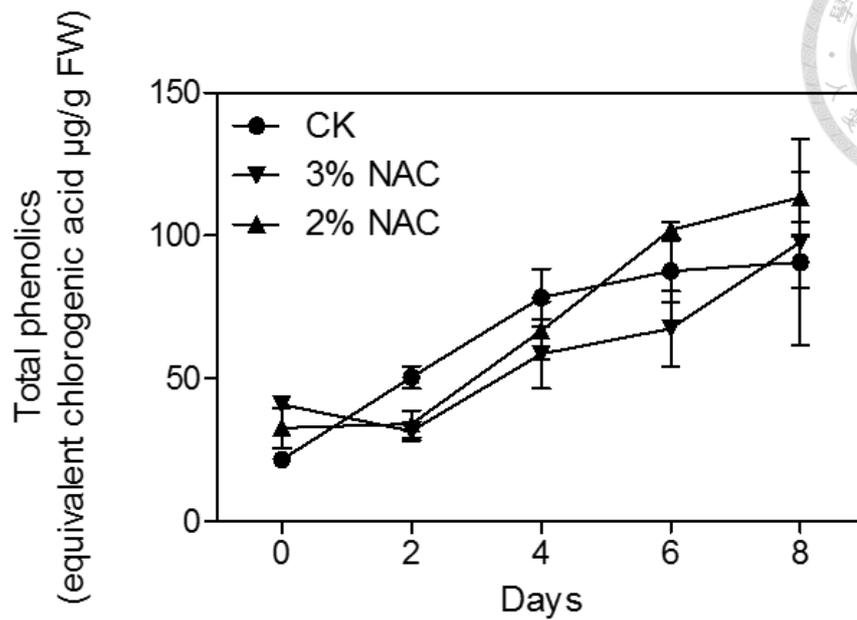


圖 25. 經 2%、3% NAC 處理之創傷萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間總酚類含量變化。

Fig. 25. Effect of 2%、3% NAC on total phenolics content of wounded lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C.

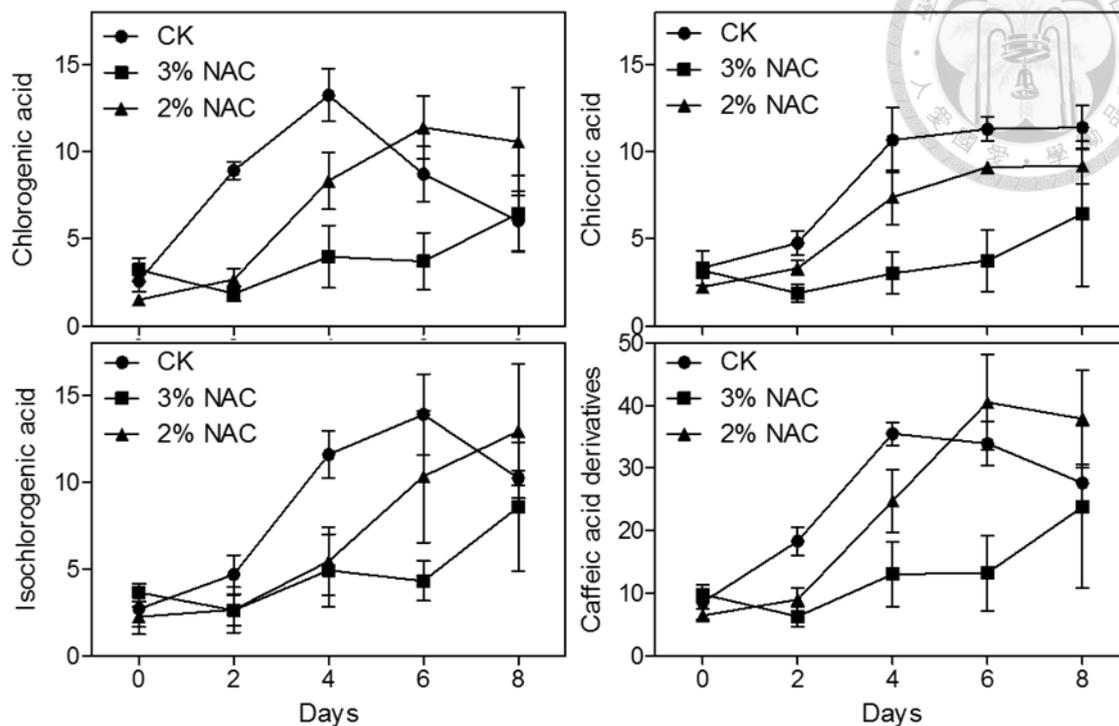


圖 26. 創傷後經 2%、3% NAC 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間綠原酸、菊苣酸、異綠原酸<sup>Z</sup>與主要咖啡酸衍生物總含量變化。(異綠原酸<sup>Z</sup>由文獻推測定性，並以綠原酸標準曲線換算其濃度)

Fig. 26. Change in chlorogenic acid content, chicoric acid content, isochlorogenic acid<sup>Z</sup> content and caffeic acid derivatives content of 2% & 3% NAC treated lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C. (isochlorogenic acid<sup>Z</sup> was identified by reference, and was quantified by the standard curve of chlorogenic acid)

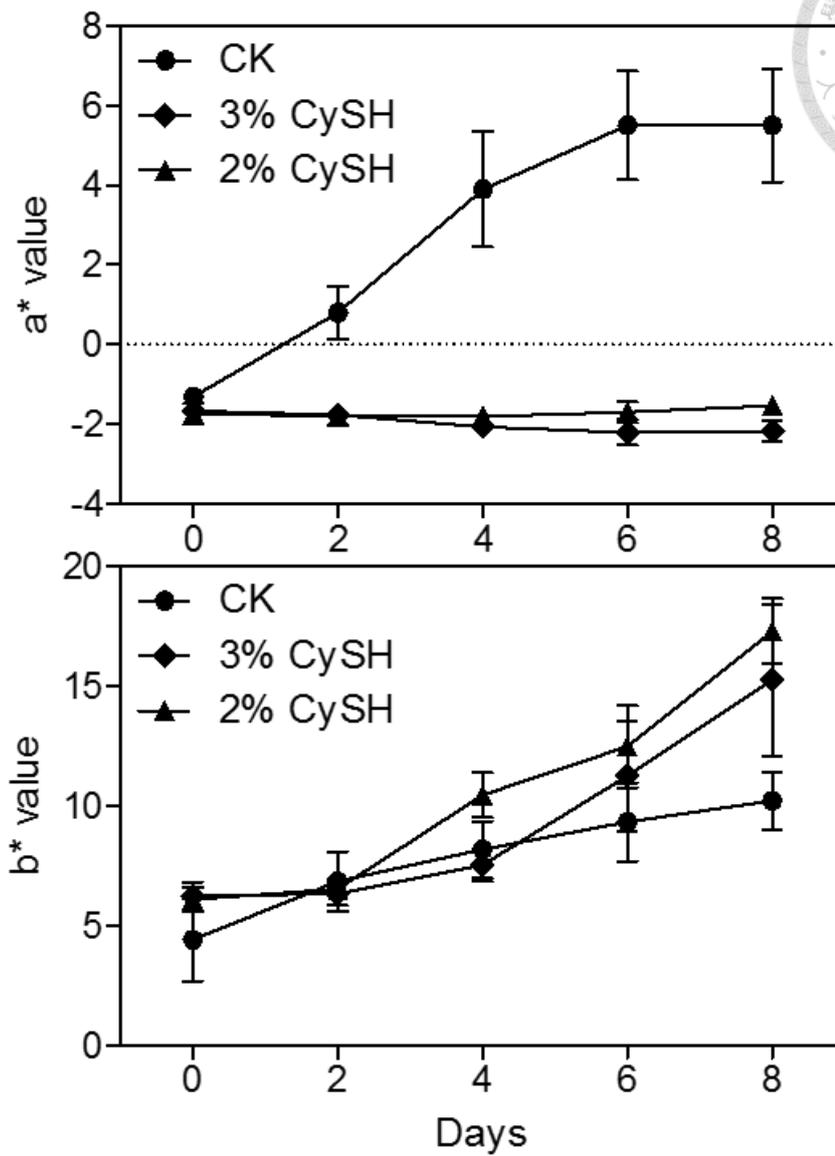


圖 27. 創傷後經 2% 及 3% CySH 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間 a\* 值與 b\* 值變化。

Fig. 27. The effect of 2% and 3% L-cysteine hydrochloride on a\* and b\* value of stem disk during 8 days storage at 5°C.

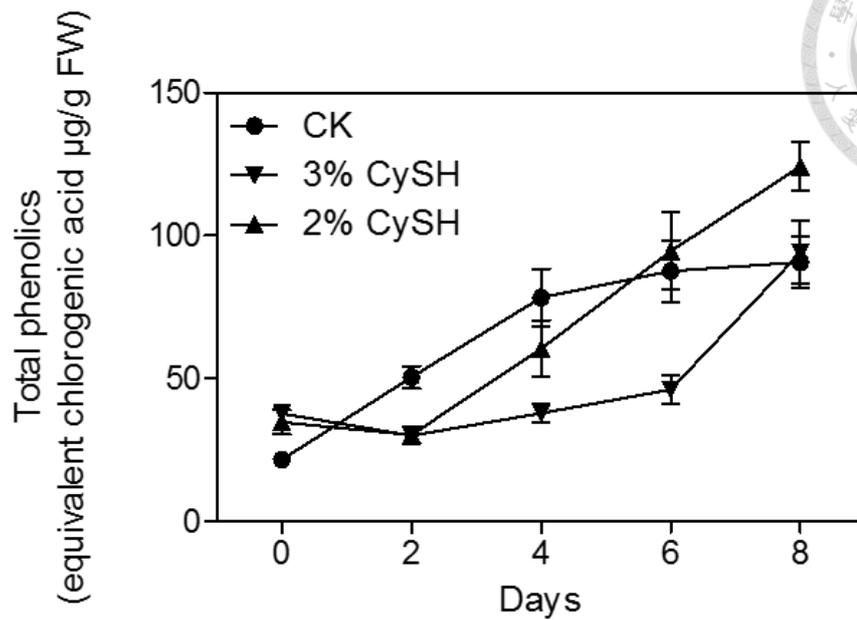


圖 28. 經 2%、3% CySH 處理之創傷萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間總酚類含量變化。

Fig. 28. Effect of 2%、3% CySH on total phenolics content of wounded lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C.

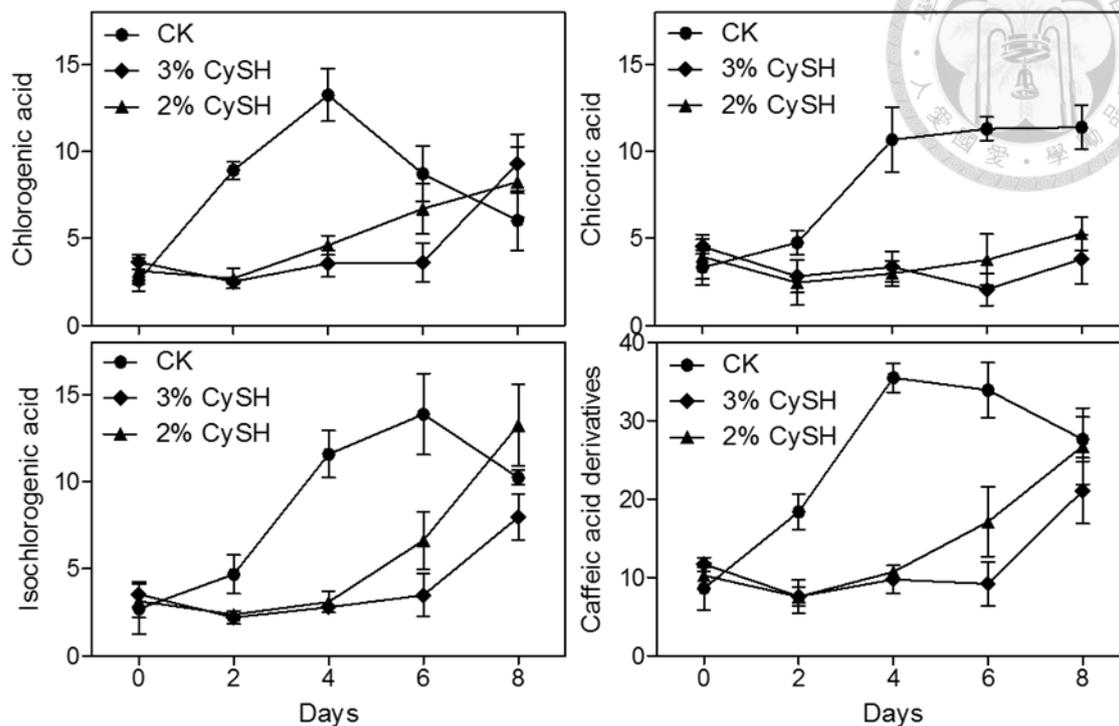


圖 29. 創傷後經 2%、3% CySH 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間綠原酸、菊苣酸、異綠原酸<sup>Z</sup>與主要咖啡酸衍生物總含量變化。(異綠原酸<sup>Z</sup>由文獻推測定性，並以綠原酸標準曲線換算其濃度)

Fig. 29. Change in chlorogenic acid content, chicoric acid content, isochlorogenic acid<sup>Z</sup> content and caffeic acid derivatives content of 2% & 3% CySH treated lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C. (isochlorogenic acid<sup>Z</sup> was identified by reference, and was quantified by the standard curve of chlorogenic acid)

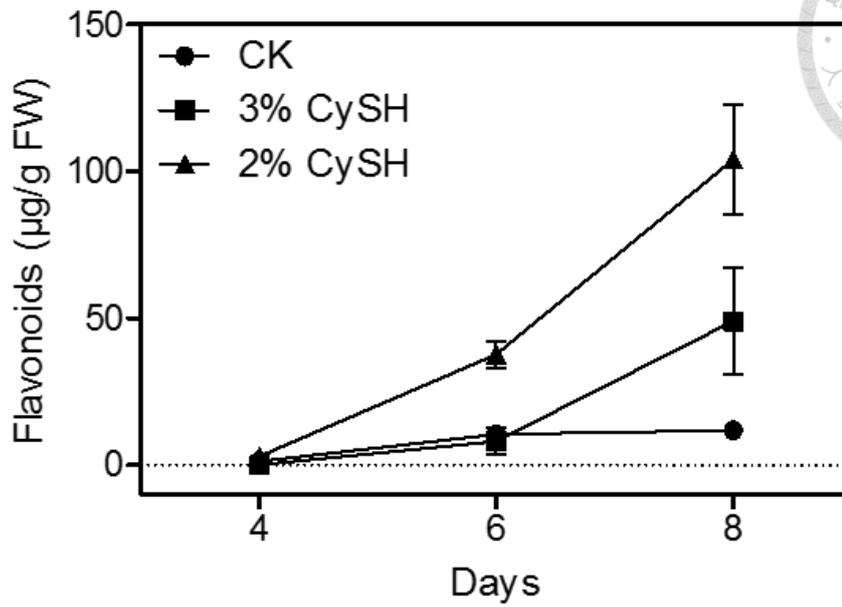


圖 30. 創傷後經 2%、3% CySH 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間主要總類黃酮含量變化。

Fig. 30. Change in total flavonoids content of 2% & 3% CySH treated lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C.

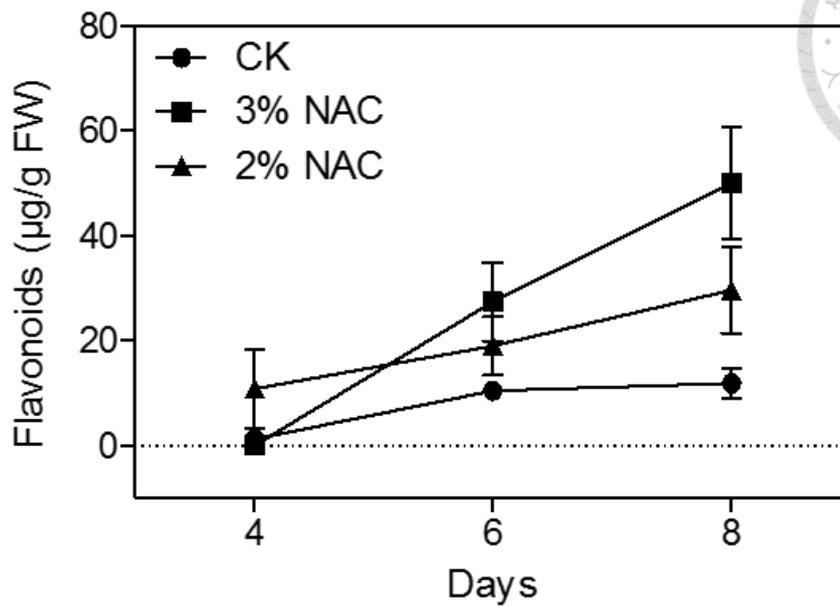


圖 31. 創傷後經 2%、3% NAC 處理之萵苣主莖圓片於 5°C 下貯藏 8 天期間主要總類黃酮含量變化。

Fig. 31. Change in total flavonoids content of 2% & 3% NAC treated lettuce stem disk during 8 days storage at 5°C.

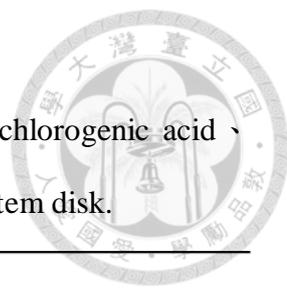


表 3. 不同濃度藥劑處理延緩各酚類含量開始上升時間之比較

Table 3. The effect of different cysteine derivatives treatment on chlorogenic acid、chicoric acid、isochlorogenic acid、flavonoids content of wounded stem disk.

		DAY							
		1	2	3	4	5	6	7	8
CK	CHL	/	/	/	/	/	/	/	/
	CHI			X	X	X	X	X	X
	ICHL	\	\	\	\	\	\	\	\
	TFLA					⊖	⊖	⊖	⊖
3% CySH	CHL							/	/
	CHI								
	ICHL							\	\
	TFLA							⊖	⊖
3% NAC	CHL							/	/
	CHI							X	X
	ICHL							\	\
	TFLA					⊖	⊖	⊖	⊖
2% CySH	CHL			/	/	/	/	/	/
	CHI								
	ICHL					\	\	\	\
	TFLA					⊖	⊖	⊖	⊖
2% NAC	CHL			/	/	/	/	/	/
	CHI			X	X	X	X	X	X
	ICHL					\	\	\	\
	TFLA					⊖	⊖	⊖	⊖

chlorogenic acid (CHL) / chicoric acid (CHI) / isochlorogenic acid (ICHL) / total flavonoids (TFLA)



## 第六章 總結

主莖切面褐化為萵苣以完整葉球販售時外觀品質指標之一。萵苣主莖切面褐化主因為創傷引起的酚類物質新生合成，酚類物質經多酚氧化酶氧化後產生醌類並聚合形成紅褐色物質，最後導致外觀褐化。本實驗以萵苣主莖切片為材料，以不同延緩褐化藥劑處理後於 5°C 下貯藏，貯藏後其外觀變化與延緩效果不同，因此探討經不同延緩褐化藥劑處理後萵苣主莖切片內的酚類物質含量、酚類物質組成與外觀褐化之關係。

萵苣主莖切片經創傷後第二天維管束即出現明顯的褐化徵狀，並於後續褐化過程切面逐漸轉為紅褐色，切面  $a^*$  值於前四天快速上升，並於四天後上升速度趨緩，其趨勢與總酚類含量、總咖啡酸含量變化趨勢相同。創傷後主要生成之酚類物質為綠原酸、萵苣酸、異綠原酸，創傷後兩天內主要生成酚類物質為綠原酸，萵苣酸與異綠原酸含量則於第二天開始上升，三者皆於第四天含量達到最高，第四天後綠原酸含量開始下降，而萵苣酸與異綠原酸含量則維持一定。

經 3% 醋酸處理後，萵苣主莖切片表面可維持白色色澤至第八天，且貯藏期間總酚類含量、總咖啡酸含量皆不上升，顯示 3% 醋酸可抑制創傷後酚類物質生成，因此可延緩主莖切面褐化。

N-acetyl-L-cysteine (NAC) 與 L-cysteine hydrochloride (CySH) 皆屬於含硫氫基化合物。經 2% NAC 處理可延緩褐化至第四天才出現維管束褐化，其綠原酸與異綠原酸含量較對照組晚兩天上升，而不影響萵苣酸含量變化；經 3% NAC 處理後可延緩褐化至第六天出現維管束褐化，其綠原酸、萵苣酸、異綠原酸含量於創傷後第六天開始上升。

經 2% CySH 處理後可延緩褐化至第六天出現維管束褐化，其綠原酸含量晚對照組四天上升、異綠原酸含量則晚兩天上升；經 3% CySH 處理後於第八天出

現褐化徵狀，其綠原酸與異綠原酸含量於第六天開始上升，而兩種濃度下的 CySH 處理皆可延緩菊苣酸含量上升至第八天。

經不同含硫氫基化合物於不同濃度處理後，其延緩綠原酸、菊苣酸、異綠原酸含量開始上升時間的效果不同，最終造成外觀開始褐化的時間點不同，將延緩褐化效果依出現褐化徵狀的先後排序，依序為 2% NAC、2% CySH 與 3% NAC、3% CySH，其類黃酮含量，除了 3% CySH 處理可延緩至第六天開始上升，其餘三組皆與對照組同時，於第四天開始上升，延緩褐化效果較佳的 2% CySH 與 3% NAC 處理組的第八天含量為對照組的五倍，而延緩褐化效果較差的 2% NAC 處理組則為對照組的三倍。顯示延緩咖啡酸衍生物含量上升後，類黃酮含量也會受到影響。

咖啡酸衍生物經多酚氧化酶氧化後產生醌類並聚合造成褐化，同濃度下的菊苣酸經氧化後造成褐化的程度大於綠原酸。綠原酸與菊苣酸同時存在經多酚氧化酶氧化後，其褐化程度與個別濃度相關，彼此間並無交互關係。當咖啡酸衍生物與類黃酮同時存在經多酚氧化酶氧化後，顯示兩者同時存在時會提高褐化程度，較個別褐化程度加總高。

比較顯示，兩種濃度下之 CySH 處理延緩菊苣酸含量上升的效果皆優於 NAC 處理，且 2% CySH 延緩綠原酸含量上升的效果也優於同濃度下的 NAC，而 CySH 與 NAC 處理對異綠原酸含量上升延緩效果相同。綜合顯示 CySH 處理延緩褐化效果優於 NAC 處理，且對延緩菊苣酸與綠原酸含量上升的效果不同，因而對延緩褐化的效果不同。

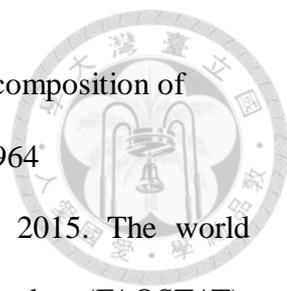
## 參考文獻



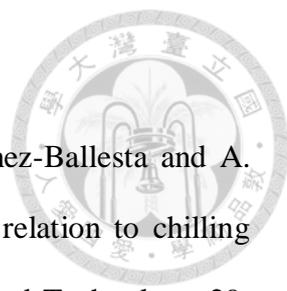
- 行政院業委員會. 2014. 農業貿易. 稅則號列(CCC)資料查詢. 行政院業委員會農業統計資料查詢.< <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/trade/TradeCcc.aspx>>
- 洪穎華. 2014. 減輕結球萵苣切面褐化之處理技術. 臺灣大學園藝學研究所學位論文
- 梁佑慎、柯立祥. 2012. 荔枝採後保鮮技術. 臺灣荔枝產業佈局研討會專刊:51- 66.
- 薛百祺、唐佳惠、官青杉、李堂察. 2009. 貯藏溫度對“台農 17 號”鳳梨果實內部褐化之研究. 台灣農業研究. 58 (4):273-282.
- Altunkaya, A. and V. Gökmen. 2008. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). Food Chemistry 107: 1173-1179
- Amaki, K., E. Saito, K. Taniguchi, K. Joshita and M. Murata. 2011. Role of chlorogenic acid quinone and interaction of chlorogenic acid quinone and catechins in the enzymatic browning of apple. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 75: 829-832
- Baur, S., R. G. Klaiber, A. Koblo and R. Carle. 2004. Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 7017-7025
- Cabezas-Serrano, A. B., M. L. Amodio and G. Colelli. 2013. Effect of solution pH of cysteine-based pre-treatments to prevent browning of fresh-cut artichokes. Postharvest Biology and Technology 75: 17-23
- Campos-Vargas, R., & Saltveit, M. E. 2002. Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. Physiologia Plantarum, 114, 73-84.
- Campos-Vargas, R., H. Nonogaki, T. Suslow and M. E. Saltveit. 2005. Heat shock

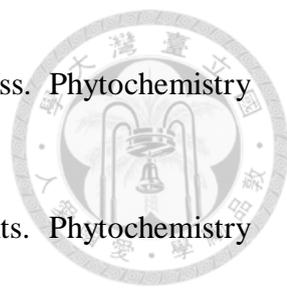


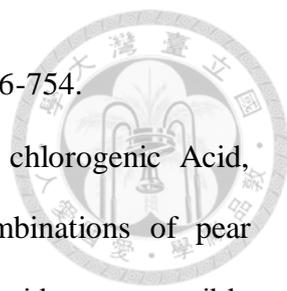
- treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiologia Plantarum* 123:82-91
- Cantos, E., J. C. Espin and F. A. Tomas-Barberan. 2001. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 322-330
- Cilliers, J.J. and Singleton, V.L. 1990. Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols. *Journal of agricultural and food chemistry* 38:1789-1796.
- Ding, C. K., K. Chachin, Y. Ueda and Y. Imahori. 1998. Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Loquat Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4144-4149
- Ding, C. K., K. Chachin, Y. Ueda and C. Y. Wang. 2002. Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. *Food Chemistry* 76: 213-218
- Chen, J. Y., P. F. Wen, W. F. Kong, Q. H. Pan, J. C. Zhan, J. M. Li, S. B. Wan and W. D. Huang. 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology* 40: 64-72
- Clifford, M. N. 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1033-1043
- Decoteau, D.R. 2007. Leafy salad crops, p. 238-251. *Vegetable crops*. International editions. Pearson education Taiwan Ltd., Taiwan.
- Dixon, R. A. and N. L. Paiva. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* 7:1085-1097
- DuPont, M. S., Z. Mondin, G. Williamson, K. R. Price. 2000. Effect of variety,

- 
- processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3957-3964
- Food and agriculture organization of the united nations (FAO). 2015. The world production of lettuce and chicory. FAO statistics division browse data (FAOSTAT). <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>
- Hisaminato, H., M. Murata and S. Homma. 2001. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65:1016-1021.
- Ilker, Y., A. A. Kader, R. Ilker and L. L. Morris. 1977. Anatomy of lettuce tissue affected by three physiological disorders. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 102:426-428.
- Kader, A. A. 2002. *Postharvest technology of horticultural crops*. UCANR Publications.
- Kang, H. M. and Saltveit, M.E. 2003. Wound-induced increases in phenolic content of fresh-cut lettuce is reduced by a short immersion in aqueous hypertonic solutions. *Postharvest Biology and Technology* 29:271-277.
- Ke, D. and M.E. Saltveit. 1989. Wound - induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. *Physiologia Plantarum* 76:412-418.
- Kerns, D.L., Matheron, M., Palumbo, J., Sanchez, C., Still, D.W., Tickes, B., Umeda, K., and Wilcox, M. 1999. *Guidelines for head lettuce production in Arizona*. IPM series.
- Kuijpers, T. F. M., C. E. Narváez-Cuenca, J. P. Vincken, A. J. W. Verloop, W. J. H. van Berkel and H. Gruppen. 2012. Inhibition of Enzymatic Browning of Chlorogenic Acid by Sulfur-Containing Compounds. *Journal of Agricultural and*

Food Chemistry 60: 3507-3514

- 
- Lafuente, M. T., L. Zacarias, M. A. Martínez-Téllez, M. T. Sanchez-Ballesta and A. Granell. 2003. Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. *Postharvest Biology and Technology* 29: 309-318
- Landrigan, M., S. C. Morris and K. S. Gibb. 1996. Relative humidity influences postharvest browning in rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). *HortScience* 31: 417-418
- León, J. , E. Rojo and J. J. Sánchez -Serrano. 2001. Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 52:1-9
- López-Gálvez, G., M. Saltveit and M. Cantwell. 1996. Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. *Postharvest biology and technology* 9:223-233.
- Mai, F. and M. A. Glomb. 2013. Isolation of phenolic compounds from iceberg lettuce and impact on enzymatic browning. *Journal of agricultural and food chemistry* 61:2868-74.
- Martinez, M. V. and J. R. Whitaker. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology* 6: 195-200
- Martinez-Sanchez, A., J. A. Tudela, C. Luna, A. Allende and M. I. Gil. 2011. Low oxygen levels and light exposure affect quality of fresh-cut Romaine lettuce. *Postharvest Biology and Technology* 59: 34-42
- Mateos, M., D. Ke, M. Cantwell, and A. A. Kader. 1993. Phenolic metabolism and ethanolic fermentation of intact and cut lettuce exposed to CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.* 3:225-233

- 
- Mayer, A.M. 1986. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry* 26:11-20.
- Mayer, A.M. and E. Harel. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 8:193-215.
- Molnar-Perl, I. and M. Friedman. 1990. Inhibition of browning by sulfur amino acids. 3. Apples and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1652-1656
- Morris, L.L., J.A. Klaustermeyer and A.A. Kader. 1974. Postharvest requirements of lettuce to control physiological disorders. *In "Int Conf Handling Perish Agric Commod"*.
- Murata, M., M. Sugiura, Y. Sonokawa, T. Shimamura and S. Homma. 2002. Properties of chlorogenic acid quinone: relationship between browning and the formation of hydrogen peroxide from a quinone solution. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 2525-30
- Nuez, F. and J. Prohens. 2008. *Vegetables*. Springer.
- O'Donnell, P. J., C. Calvert, R. Atzorn, C. Wasternack, H. M. O. Leyser, D. J. Bowles. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *SCIENCE* 274:1914-1917
- Pantastico, E.B., W. Grierson and J. Soule. 1967. Chilling injury in tropical fruits: bananas (*Musa pardisiaca* var. sapientum cv. Lacatan). *Proc. Trop. Regul. Amer. Soc. Hort. Sci.* 11:82-91
- Peiser, G., López-Gálvez, G., Cantwell, M., and Saltveit, M.E. 1998. Phenylalanine ammonia lyase inhibitors control browning of cut lettuce. *Postharvest Biology and Technology* 14:171-177.
- Ricarda, N., J. M. Anthony and M. Cathie. 2004. Engineering plants with increased levels

- 
- of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22:746-754.
- Richard-Forget, F. C. and F. A. Gaillard. 1997. Oxidation of chlorogenic Acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2472-2476
- Richard-Forget, F. C., P. M. Goupy and J. J. Nicolas. 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 2. Kinetic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2108-2113
- Richard, F. C., P. M. Goupy, J. J. Nicolas, J. M. Lacombe and A. A. Pavia. 1991. Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 1. Isolation and characterization of addition compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 841-847
- Pierpoint, W. S. 1966. The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochem J* 98: 567-80
- Saltveit, M.E. 2004. Effect of 1-methylcyclopropene on phenylpropanoid metabolism, the accumulation of phenolic compounds, and browning of whole and fresh-cut 'iceberg' lettuce. *Postharvest biology and technology* 34:75-80.
- Saltveit, M. E., Y. J. Choi and F. A. Tomas-Barberan. 2005. Involvement of components of the phospholipid-signaling pathway in wound-induced phenylpropanoid metabolism in lettuce (*Lactuca sativa*) leaf tissue. *Physiologia Plantarum* 125: 345-355
- Stearn, W. T. 1966. *Botanical latin : history, grammar, syntax, terminology and vocabulary*. 1st. Edition.
- Steck, W. 1968. Metabolism of cinnamic acid in plants-chlorogenic acid formation.

Phytochemistry 7:1711-1717

Stewart, J.K. 1978. Influence of oxygen, carbon dioxide and carbon monoxide levels on decay of head lettuce after harvest. *Scientia Horticulturae* 9:207-213.

Taiz, L. and E. Zeiger. 2006. *Plant physiology* 4th. Edition.

Toivonen, P. and D.A. Brummell. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 48:1-14.

Tomás-Barberán, F. A. and Espín, J. C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81: 853-876

Tomás-Barberán, F. A., J. Loiza-Velarde, A. Bonfanti and M. E. Saltveit. 1997. Early wound-and ethylene-induced changes in phenylpropanoid metabolism in harvested lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122:399-404.

Tomás-Barberán, F.A., M.I. Gil, M. Castaner, F. Artés and Saltveit, M.E. 1997. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *Journal of agricultural and food chemistry* 45:583-589.

Valero, E., R. Varon and F. Garcia-Carmona. 1991. A kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymic catalysis. The inhibition of polyphenol oxidase by L-cysteine. *Biochem J* 277: 869-74

Vamos-Vigyazo, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 15:49-127.

Yoruk, R. and M. R. Marshall. 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry* 27:361-422

