

中華民國第 57 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

052204

果皮資材之再利用

—水果纖維作為醫藥原料的探討

學校名稱：臺中市立臺中女子高級中等學校

作者： 高二 卓亮恬 高二 施馨怡 高二 蕭子瑄	指導老師： 呂億真
---	------------------

關鍵詞：菱角、果皮纖維、果皮萃取物

摘要

本研究挑選四種臺灣常見水果，分別探討果皮纖維及果皮甲醇萃取物再利用的可能性，期許提升農產品廢棄物之價值及改善肥胖問題。經體外測試及動物實驗發現：柚子皮纖維和菱角殼纖維吸附植物油及豬油能力均良好，未來極具開發為減重相關之保健食品的潛能。另外分析果皮甲醇萃取物之總多酚含量，並進行清除 DPPH 自由基與抗發炎能力等測試，結果顯示：果皮甲醇萃取物中以菱角殼與柚子皮所具有的多酚類抗氧化物質最多，且這三種果皮清除自由基能力以及抗發炎能力良好。其中菱角殼在多項試驗結果均有最佳表現，若能與有機農法結合發展，不僅能將果皮再利用，開發成相關保健食品，更能提升果皮經濟價值、兼顧生態環境保護。

壹、研究動機

臺灣常被稱為水果王國，然而食用後的農產品廢棄物及果皮往往被丟棄，甚至可能引起環境汙染問題。以官田地區為例，先前參訪位於台南官田的水菱有機農場，發現臺南官田年產近 3700 公噸菱角殼，過去都棄置田邊露天燃燒或運往焚化爐焚化產生大量二氧化碳汙染。另外，肥胖也是現代人常有的健康問題，從 1996 年起，世界衛生組織 (WHO) 便已將肥胖列為慢性疾病，且根據 WHO 統計，每年至少有 280 萬人死亡可歸咎於超重或肥胖，因此解決肥胖問題是刻不容緩的議題。而市面上之減肥保健食品常以幾丁聚醣為原料，在高三選修生物課本中提到，幾丁聚醣與纖維素有類似結構，引發我們探討同為纖維的果皮是否有類似功效。另外，文獻指出果皮含有許多營養成分，例如多酚、維生素等物質，具抗氧化等特性 (W.Y Huang *et al.*, 2009)。我們由此做為發想，希望能使果皮從廢棄物轉化為可利用的資源，因此利用甲醇萃取出果皮內物質，進而討論其再利用價值。

貳、研究目的

本研究目的在探討果皮廢棄資材的再利用性，依序如下：

- 一、測試不同果皮纖維之油脂吸附能力。
- 二、分析果皮甲醇萃取物之總多酚含量，並進行清除 DPPH 自由基測試及其對於小鼠巨噬細胞 (Raw264.7 cells) 之抗發炎活性測試，以評估何種果皮甲醇萃取物具開發為減重相關保健食品之潛能。
- 三、藉由動物實驗，測量體重變化及各項血清生化指標，評估果皮纖維和幾丁聚醣對高脂飲食的影響。

參、研究設備及器材

一、實驗相關之果皮

1. *Citrus maxima* (CMP; 柚子皮)
2. *Citrus paradise* (CPP; 葡萄柚皮)
3. *Hylocereus polyrhizus* (HPP; 紅肉火龍果皮)
4. *Trapa natans* (TNP; 菱角殼)

二、實驗器材

1. 鋁箔紙
2. 抽濾漏斗
3. 500 mL 抽濾瓶
4. 110 mm 濾紙
5. 500 mL 濃縮瓶
6. 20 mL 樣品瓶
7. 1 L 寬口血清瓶
8. 酒精燈
9. 10 cm 細胞培養皿
10. 電動吸量管 (auto-pipette)
11. 微量吸管 (pipette)
12. 打火機
13. 50 mL 離心管
14. 紗布
15. 細胞計數盤
16. 計數器
17. 96 孔盤 (96-well)
18. 1 mL 針筒
19. 1.5 mL 微量離心管
20. 篩網
21. 加熱板
22. 微量天平

23. 封口膜 (parafilm)
24. 小鼠管餵針
25. 老鼠飼養箱

三、儀器裝置

1. 烘箱 (Channel Instruments)
2. 超音波震盪機 (Wing Instruments)
3. 濃縮機 (EYELA)
4. 水浴鍋 (EYELA)
5. 真空幫浦 (Vacuum pump vp-series, PANCHUM SCIENTIFIC CORP.)
6. 無菌操作台 (Properous Instruments Co., Ltd.)
7. 二氧化碳恆溫培養箱 (SANYO)
8. 乾浴器 (Pantech Instruments)
9. 離心機 (HERMLE)
10. 粉碎機 (YU CHI MACHINERY CO., LTD.)
11. 多用途震盪器 (Vortex-genie, Scientific Industries)
12. 顯微鏡 (OLYMPUS)
13. 水浴槽 (YIHDER)
14. 迴旋式震盪器 (YIH DER)
15. 全自動分光光度分析儀 (ELISA, Bio-rad)

四、實驗相關藥品及配置

1. 100% 甲醇
2. 95% 酒精
3. 蒸餾水
4. 去離子水
5. 豬油 (香里食品)
6. 健康調和油 (得意的一天)
7. 沙拉油 (泰山芥花油)
8. Sodium nitrite (NaNO_2) ; (J.T.Baker)
9. Chitosan (Sigma-Aldrich)

10. Cholesterol (Sigma-Aldrich)
11. Gallic acid (Sigma-Aldrich)
12. 1 N Folin-Ciocalteu phenol reagent (Sigma-Aldrich)
13. Dimethyl sulphoxide (DMSO) ; (Sigma-Aldrich)
14. Sodium carbonate (Na_2CO_3) ; (Riedel-de HAën): 將 3.5 g Na_2CO_3 , 溶於 50 mL 去離子水中混合均勻配置成 7 %濃度
15. MTT working solution (Sigma-Aldrich): 將 500 mg MTT , 溶於 100 mL PBS 中混合均勻配置成 5 mg/mL 濃度
16. DPPH (Sigma-Aldrich): 將 1.97 mg DPPH , 溶於 100 % 甲醇中均勻配置成 0.5 mM 濃度
17. Lipopolysaccharides (LPS) ; (Sigma-Aldrich): 將 1 mg LPS , 溶於 1 mL PBS 中混合均勻配置成 1 mg/mL 濃度
18. Griess reagent A : 含 1 % sulfanilamide 、 5 % phosphoric acid (H_3PO_4)
19. Griess reagent B : 0.1 % naphthylenediamine dihydrochloride (NED)
20. Phosphate buffer saline (PBS): 將 sodium chloride (NaCl) 8 g 、 potassium chloride (KCl) 0.2 g 、 sodium phosphate (Na_2HPO_4) 1.145 g 、 potassium phosphate (KH_2PO_4) 0.2 g 溶於 1 L 去離子水
21. Hank' s Balanced Salt Solution (HBSS): 將 NaCl 8 g 、 KCl 0.4 g 、 Na_2HPO_4 0.06g 、 Glucose 1 g 、 phenol red 0.02 g 溶於 1 L 去離子水
22. TEG solution : 將 trypsin 0.25 g 、 EDTA 0.1 g 、 glucose 0.05 g 溶於 100 mL HBSS
23. Medium for Raw264.7 cells culture: 含 90 % Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) 、 10 % Fetal bovine serum (FBS) 、 1 % 2 mM L-glutamine

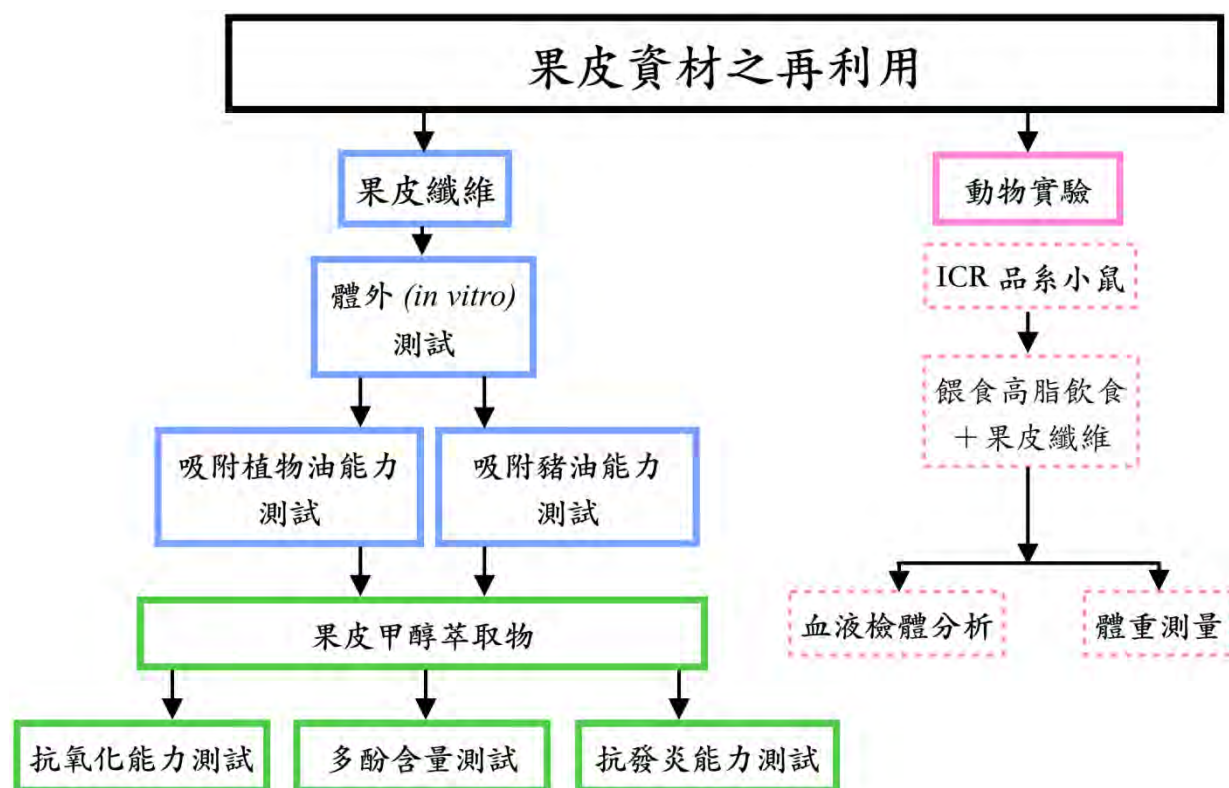
五、實驗細胞株

小鼠巨噬細胞 Raw264.7 cells (murine macrophage cell line) , 屬貼附型 (adherent) 細胞 , 購自 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) , 商品編號 ATCC®TIB-71TM

六、實驗動物

品種: Mice , 品系: Bltw:CDI (ICR) (遠交系小鼠) , 來源: 樂斯科生物生技公司 , 實驗小鼠飼養於國立嘉義大學動物房 , 並通過實驗動物小組之審核同意 , 審查同意書如附件。

肆、研究過程或方法



一、測試不同果皮纖維之油脂吸附能力

(一) 果皮纖維製備

收集當季果皮置於 40℃ 烘箱乾燥後，剪成約拇指大小萃取其內容物。於血清瓶中倒入甲醇蓋過果皮，浸泡約一週。抽濾分離果皮及其甲醇萃取液，以蒸餾水浸泡半小時後烘乾。粉碎機磨粉至纖維小於餵管管徑並以針筒測試。過篩後保存於室溫。

(二) 吸附植物油能力測試

秤取果皮纖維 1 g 於離心管，加入植物油（得意的一天健康調和油）5 mL 後於震盪器使纖維與油混合均勻，再用超音波震盪 15 分鐘 3 次，每次間隔 5 分鐘，離心前加水至 45 mL，4000 rpm 37℃ 離心 30 分鐘。去除上清液，取出果皮纖維放上濾紙，編號後放入烘箱 1 週後，秤重並計算纖維吸附百分比，公式如下。

$$\text{纖維吸附百分比} = \frac{(\text{纖維吸油後重} - \text{纖維吸油前重})}{\text{纖維吸油前重}} \times 100\%$$

(三) 吸附豬油能力測試

加熱至 250℃ 使豬油呈液態，其餘步驟與吸附植物油能力測試相同。

二、分析果皮甲醇萃取物

(一) 果皮甲醇萃取物 (樣品 sample) 製備

收集當季果皮至 40℃烘箱乾燥，一週後剪成約拇指大小以便萃取其內容物。於血清瓶中倒入甲醇蓋過果皮，浸泡約一週。抽濾分離果皮及其甲醇萃取液，再使用濃縮機濃縮至膏狀，取出少量置於 1.5 mL 微量離心管抽真空蒸發水分，於 4℃冰箱保存。

(二) 總多酚含量 (Total phenolic contents) 測試

本試驗用以測試 4 種果皮甲醇萃取物樣本總多酚含量，含量越高則代表樣本內含抗氧化物質越高。

將待測樣本 (sample)、標準品沒食子酸 (gallic acid) 及作為空白組 (blank) 的去離子水各 50 μ L 加入 450 μ L 去離子水。接著加入 50 μ L 1 N Folin-Ciocalteu phenol reagent 搖晃 5 分鐘，試劑中鎢鉬酸常用來為總多酚化合物定量，自身會被還原 (Mo^{6+} 變為 Mo^{5+}) 產生藍色化合物，且藍色的深淺與總多酚含量呈正相關。因 Folin-Ciocalteu phenol reagent 在酸性環境下穩定，不易發生反應，故須加入碳酸鈉以利反應進行。再加入 500 μ L 7 % 碳酸鈉 (Na_2CO_3) 和 200 μ L 去離子水，將溫度定在 23 °C 中反應 90 分鐘。最後用全自動分光光度分析儀測波長 750 nm 吸光值。(gallic acid : 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、及 1 mg/mL)

表一：多酚含量測試之待測物配置

	配置
standard	gallic acid 50 μ L + 450 μ L H_2O + 50 μ L 1 N Folin-Ciocalteu reagent + 500 μ L 7 % Na_2CO_3 + 200 μ L H_2O
sample	sample 50 μ L + 450 μ L H_2O + 50 μ L 1 N Folin-Ciocalteu reagent+ 500 μ L 7 % Na_2CO_3 + 200 μ L H_2O
blank	H_2O 50 μ L + 450 μ L H_2O + 50 μ L 1 N Folin-Ciocalteu reagent + 500 μ L 7 % Na_2CO_3 + 200 μ L H_2O

(三) 抗氧化能力測試 (DPPH radical-scavenging activity)

DPPH 常在抗氧化研究上被用來評估抗氧化物的抗氧化能力。其被抗氧化物還原時會由紫色轉淡，吸光值會降低，吸光值愈低，表示抗氧化物的抗氧化能力愈強。

將 50 μ L 0.5 mM DPPH (溶於 100 % 甲醇) 與 50 μ L 的待測物混合，室溫避光反應 30 分鐘，接著使用全自動分光光度分析儀測波長 517 nm 吸光值並代入下列公式換算成自由基清除能力百分比。

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = \left(\frac{\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \right) \times 100 \%$$

表二: 抗氧化能力測試之待測物配置

	配置
control	50 μ g 酒精 + 50 μ L 0.5 mM DPPH
sample	50 μ g sample + 50 μ L 0.5 mM DPPH

(四) 細胞繼代

細胞繼代依細胞密度每 2~3 天繼代培養一次。培養基 (Medium for Raw264.7 cells culture) 從冰箱拿出來後需置於 37 °C 水浴槽回溫, 以酒精擦拭過後移入無菌操作台使用。當細胞生長到九分滿時, 將細胞培養皿從 5 %二氧化碳恆溫培養箱中取出至無菌操作台, 以電動吸量管將老舊培養基吸除, 再用 Hank' s Balanced Salt Solution (HBSS) 清洗細胞, 最終加入 1 mL TEG solution 將細胞切下。取 4 mL 新鮮培養基將盤中細胞洗下來後, 移至離心管以離心機 1200 rpm 離心 10 分鐘, 去除上清液後再以新鮮培養基回溶, 將細胞定量在 2×10^5 cells/mL 植回 10 cm 培養皿, 並將培養基補至 10 mL, 接著放回 37 °C、5 %二氧化碳恆溫培養箱兩天, 等細胞長到九分滿再進行下一次繼代培養。

(五) 小鼠巨噬細胞 (Raw264.7 cells) 細胞存活率評估 (MTT assay)

粒線體對細胞環境改變敏感, 其代謝 (metabolism) 為生命現象之一, 呼吸鏈 (respiration chain) 運作時在琥珀酸脫氫酶 (SDH) 和細胞色素 C 的作用下四氫唑環會開裂, 使 MTT (黃色) 還原產生紫色甲臍結晶 (formazan)。因死細胞中無琥珀酸脫氫酶, 不能將 MTT 還原, 故甲臍結晶的生成量與活細胞數目成正比。以顏色深淺 (吸光度) 測定含量 (absorbance), 即可得知細胞存活率 (cell viability)。

利用小鼠巨噬細胞 (Raw264.7 cells) 在 96 孔盤, 以初始濃度 2×10^5 cell / mL, 並加入 50、100、200 μ g/mL with 及 without LPS 的樣品及作為空白組 (blank) 的酒精 2 μ L 培養 48 小時, 接著移除上清液, 加入 5 mg/mL MTT working solution 10 μ L 加上 PBS 40 μ L, 放進 5 %二氧化碳恆溫培養箱培養 4 小時, 移除上清液, 可以觀察到有藍紫色晶體沉積在 96 孔盤底部, 吸掉 MTT working solution, 加入 DMSO 100 μ L 於各 well 中, 將晶體回溶混合均勻, 使用全自動分光光度分析儀測波長 570 nm 吸光值。

表三: MTT assay 之待測物配置

	配置
Control	Raw264.7 cells 200 μ L
95 %酒精	Raw264.7 cells 200 μ L + 95 %酒精 2 μ L
Sample	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 50 μ g/mL 2 μ L
without LPS	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 100 μ g/mL 2 μ L

	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 200 μ g/mL 2 μ L
sample with LPS	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 50 μ g/mL 2 μ L + LPS 2 μ L
	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 100 μ g/mL 2 μ L + LPS 2 μ L
	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 200 μ g/mL 2 μ L + LPS 2 μ L

(六) 小鼠巨噬細胞 (Raw264.7 cells) 細胞產生一氧化氮能力分析 (NO assay)

NO assay 是利用和 Griess reagent 反應所生成的顏色變化，在 550 nm 下測定吸光值，對照吸光值—濃度標準曲線後，即可得到 NO₂ 在組織培養液中的含量，得知 4 種樣本抗發炎能力。

Raw264.7 cells 細胞在 96-well，以初始濃度 2×10^5 cells / mL 加入 1 μ L 1 mg / mL 刺激物 LPS 培養 48 小時，取 100 μ L 上清液置於新的 96 孔盤中，依序加入 Griess reagent A 50 μ L 及 Griess reagent B 50 μ L 反應 10 分鐘。以 sodium nitrite (NaNO₂) 做標準曲線 (50 μ M、25 μ M、12.5 μ M、6.25 μ M、3.125 μ M、1.5625 μ M、0.78125 μ M、0.390625 μ M、0 μ M)，接著使用全自動分光光度分析儀測波長 550 nm 吸光值，並對照標準曲線計算待測物濃度。

表四: NO assay 之待測物配置

	配置
control	Raw264.7 cells 200 μ L
95%酒精	Raw264.7 cells 200 μ L + 95 %酒精 2 μ L
sample without LPS	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 50 μ g/mL 2 μ L
	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 100 μ g/mL 2 μ L
	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 200 μ g/mL 2 μ L
sample with LPS	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 50 μ g/mL 2 μ L + LPS 2 μ L
	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 100 μ g/mL 2 μ L + LPS 2 μ L
	Raw264.7 cells 200 μ L + sample 200 μ g/mL 2 μ L + LPS 2 μ L

三、動物實驗

自植物油、豬油吸附能力測試篩選出最有效的二種果皮纖維——柚子皮與菱角殼纖維。並選擇 ICR 品系小鼠，飼養於標準規格之老鼠飼養箱，室內溫度恆溫 21~23℃，光照及黑暗各 12 小時。本計畫已事先向國立嘉義大學實驗動物管理小組申請且審核通過。飼養於國立嘉義大學生技健康館動物房，待小鼠穩定一週後，隨機分 4 組 (每組 n=7)，共 28 隻 (表五)。

表五: 動物實驗小鼠分組

組別	飲食
I	0.44 % 膽固醇 (高脂飲食)
II	0.44 % 膽固醇 + 幾丁聚醣 250 mg/kg
III	0.44 % 膽固醇 + 柚子纖維 250 mg/kg
IV	0.44 % 膽固醇 + 菱角纖維 250 mg/kg

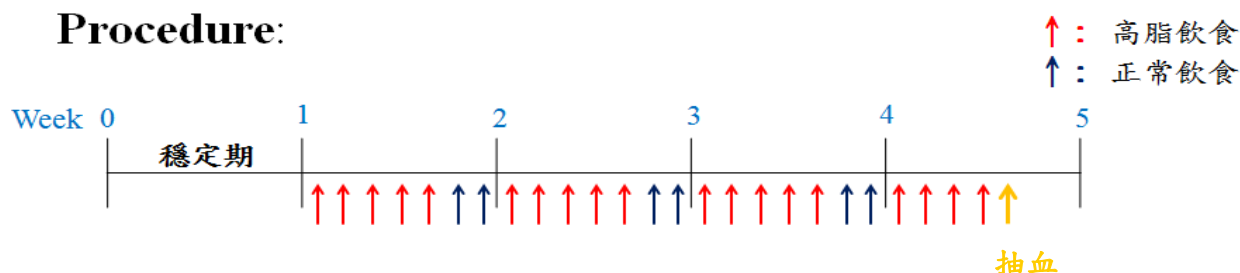
表六: 動物實驗飲食配置

	高脂飲食	高脂飲食+果皮纖維或幾丁聚醣 250mg/kg
註解	小鼠一天飼料攝取量為 4.5 g，因此 0.44 %膽固醇為 0.0198 g。故每隻小鼠一天需吃到 0.0198 g 膽固醇，將其溶於 0.2 mL 蒸餾水中給予小鼠 (0.0198 g/0.2 ml/mice)。	小鼠平均體重為 30 g，因此 250 mg/kg 約為 7.5 mg/mice。故每隻小鼠一天吃到 7.5 mg 的果皮纖維或幾丁聚醣。
步驟	將膽固醇用紗布過篩，秤取 4.455 g 溶於 45 mL 沙拉油中。	將幾丁聚醣或果皮纖維用紗布過篩，秤取 0.3375 g 溶於 9 mL 配置好的 0.44%膽固醇溶液中。

註：高脂飲食之基本組成依據 AIN-93M 配方修改，另添加 0.44 % cholesterol (cholesterol NF，MP biomedical)

每週五天給予上述飲食配置 (表六)之飲食並秤量小鼠體重，其餘兩天則給予正常飲食，流程如圖一。於第 26 日餵食後抽血。送至上哲獸醫診所代測各項生化指標，檢測項目如 (表七)。

Procedure:



圖一: 動物實驗之流程

表七: 各項檢測生化指標及說明

血液檢定項目	說明
三酸甘油酯 Triglyceride (TG)	三酸甘油酯是血脂肪的一種，又叫中性脂肪，三酸甘油酯是重要脂質之一，其來源是由腸道吸收食物中的脂肪及由肝臟合成，可用來評估脂質代謝狀態。
高密度脂蛋白膽固醇 High Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-C)	體內防止動脈硬化的重要物質，HDL-C 偏低是冠狀動脈粥狀硬化及冠心病發生的重要預測指標，TG 過高常是造成 HDL-C 偏低的原因之一。
Blood urea Nitrogen (BUN)	利用血液中尿素氮濃度做臨床診斷，腎絲球發炎、及慢性腎衰竭、攝食高蛋白或脫水時血液中氮濃度會上升，飢餓或營養不良則會下降。
AST / SGOT (Aspartate transaminase, AST)	大量存於心肌及肝中。肝細胞核損傷釋放 SGOT 於血液中，是診斷肝功能指標。

資料來源：

成大醫院病理部 (<http://centrallab.hosp.ncku.edu.tw>)

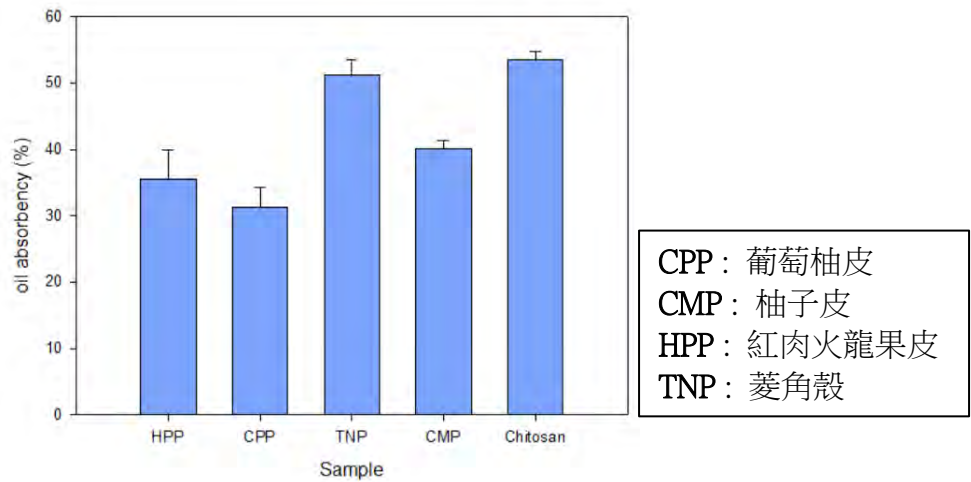
現代醫事檢驗所 (<http://www.symcl.com.tw>)

康健雜誌 (<http://www.cw.com.tw/article/article.action?id=500522>)

伍、研究結果

一、測試不同果皮纖維之油脂吸附能力

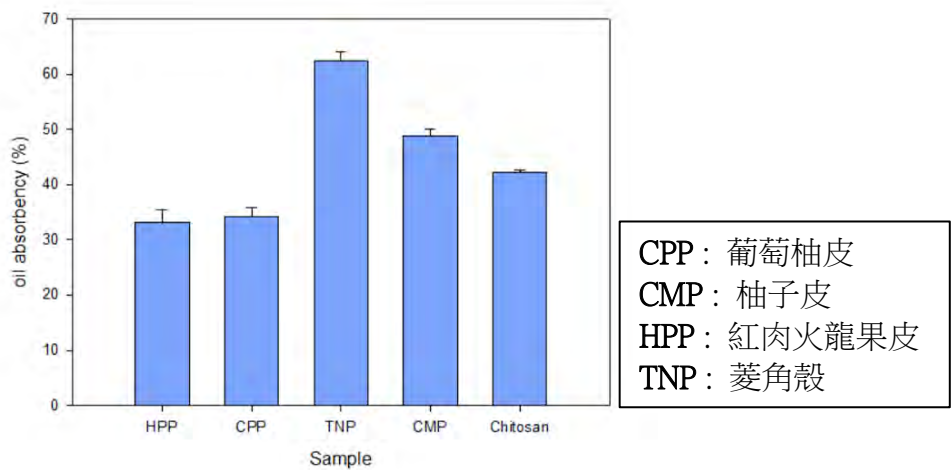
(一) 吸附植物油能力測試



圖二: 吸附植物油能力測試結果

由圖二可知 CMP (柚子皮)、TNP (菱角殼) 的吸附植物油能力接近 Chitosan (幾丁聚醣)。

(二) 吸附豬油能力測試

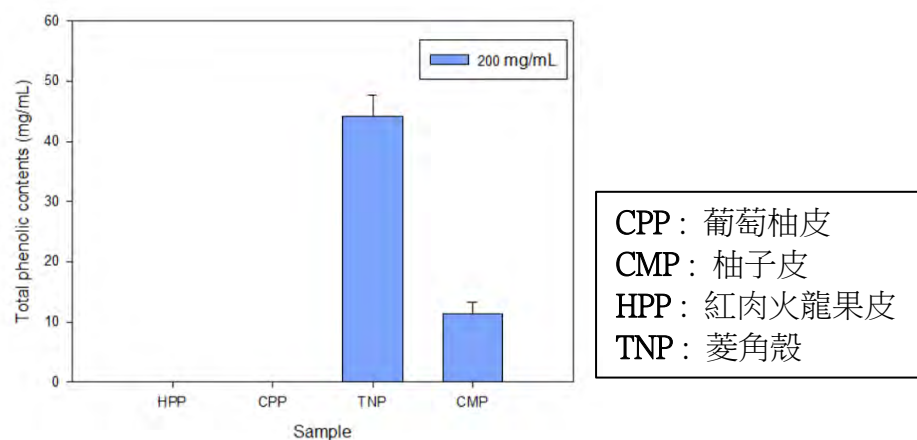


圖三: 吸附豬油能力測試結果

由圖三可知 CMP (柚子皮)、TNP (菱角殼) 吸附豬油能力皆高於 Chitosan (幾丁聚醣)。

二、分析果皮甲醇萃取物

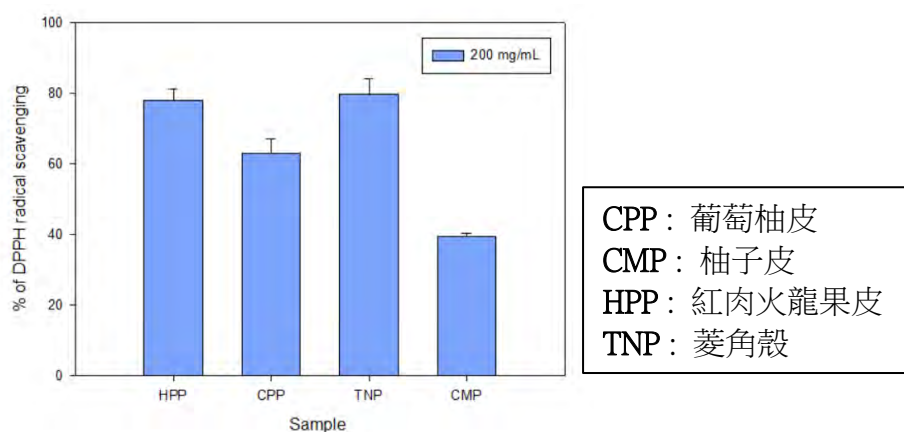
(一) 總多酚含量 (Total phenolic contents) 測試



圖四: 總多酚含量測試結果

由圖四可知 CMP (柚子皮)、TNP (菱角殼) 總多酚含量皆遠高於其他樣本，其中以 TNP (菱角殼) 含量最高，其餘樣本含量皆趨近於零。

(二) 抗氧化能力測試 (DPPH radical-scavenging activity)

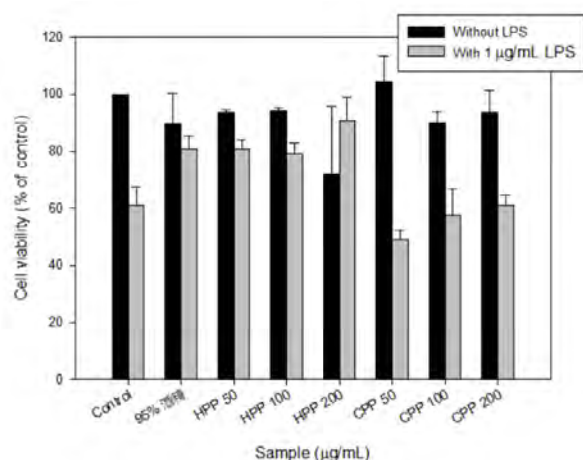


圖五: DPPH 自由基清除能力測試結果

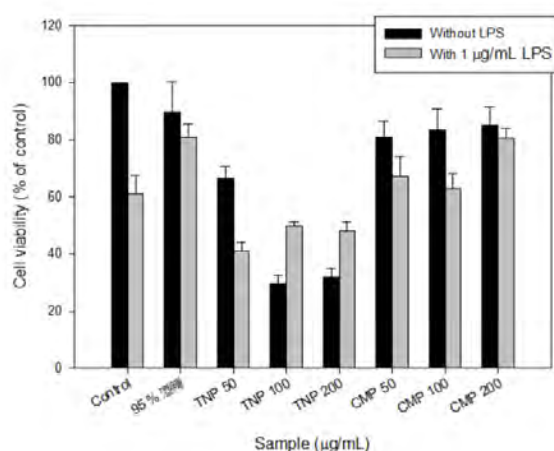
由圖五可知，除了 CMP (柚子皮) 外，HPP (紅肉火龍果皮)、CPP (葡萄柚皮) 及 TNP (菱角殼) DPPH 自由基清除能力均達 60 % 以上，其中 TNP (菱角殼) 及 HPP (紅肉火龍果皮) 更達到接近 80 %。

(三) 小鼠巨噬細胞 (Raw264.7 cells) 細胞存活率評估 (MTT assay)

(A)



(B)

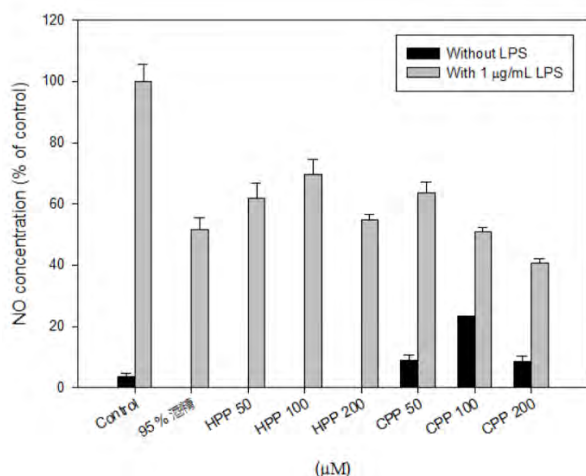


圖六: 經不同濃度 (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 的果皮甲醇萃取物處理 48 小時後之小鼠巨噬細胞存活率結果。(A) HPP (火龍果皮)、CPP (葡萄柚皮); (B) TNP (菱角殼)、CMP (柚子皮)。

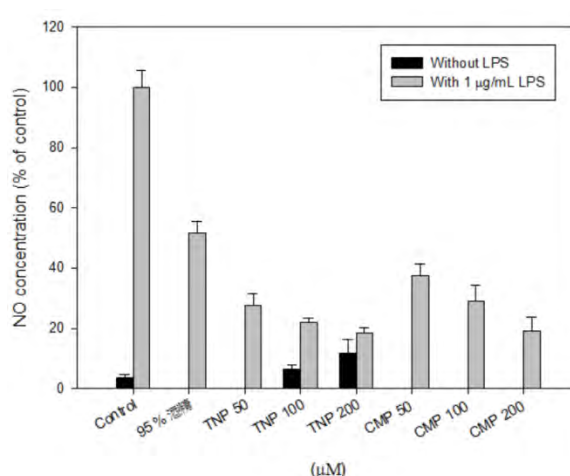
由圖六可知 CPP (葡萄柚皮)、TNP (菱角殼) 在其濃度 50 $\mu\text{g/mL}$ 時細胞存活率最高; HPP (火龍果皮) 在其濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ 時細胞存活率最高; CMP (柚子皮) 在其濃度 200 $\mu\text{g/mL}$ 時細胞存活率最高。

(四) 小鼠巨噬細胞 (Raw264.7 cells) 細胞產生一氧化氮能力分析 (NO assay)

(A)



(B)

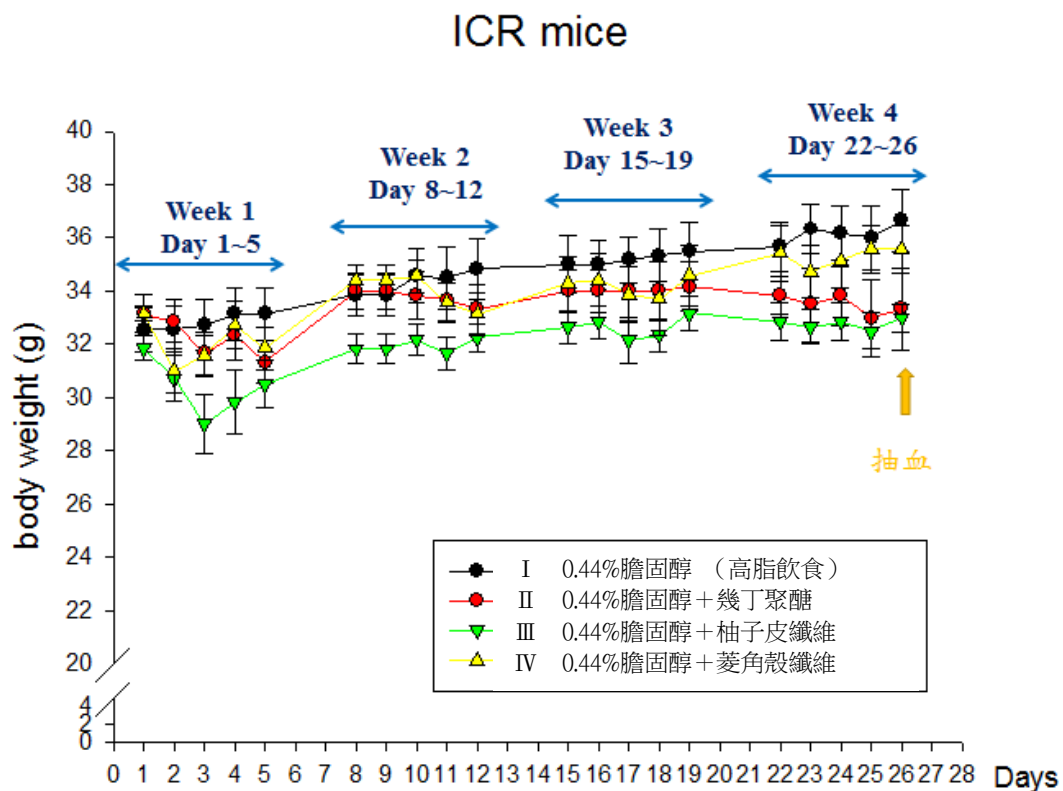


圖七: 小鼠巨噬細胞分別受不同濃度 (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 的果皮萃取物處理 48 小時之後一氧化氮生成產生結果。(A) HPP (火龍果皮)、CPP (葡萄柚皮); (B) TNP (菱角殼)、CMP (柚子皮)。

由圖七結果可知濃度 50 $\mu\text{g/mL}$ 的樣本抑制 NO 生成之效果依序為 TNP > CMP > HPP > CPP；濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ 的樣本抑制 NO 生成之效果依序為 TNP > CMP > CPP > HPP；200 $\mu\text{g/mL}$ 的樣本抑制 NO 生成之效果依序為 TNP > CMP > CPP > HPP。而所有果皮甲醇萃取物皆有抑制 NO 生成的效果，其中菱角殼 (TNP) 無論在濃度 50、100 或 200 $\mu\text{g/mL}$ 時，效果都明顯優於其他萃取物，顯示其具有良好的抗發炎能力。

三、動物試驗 (*in vivo*)

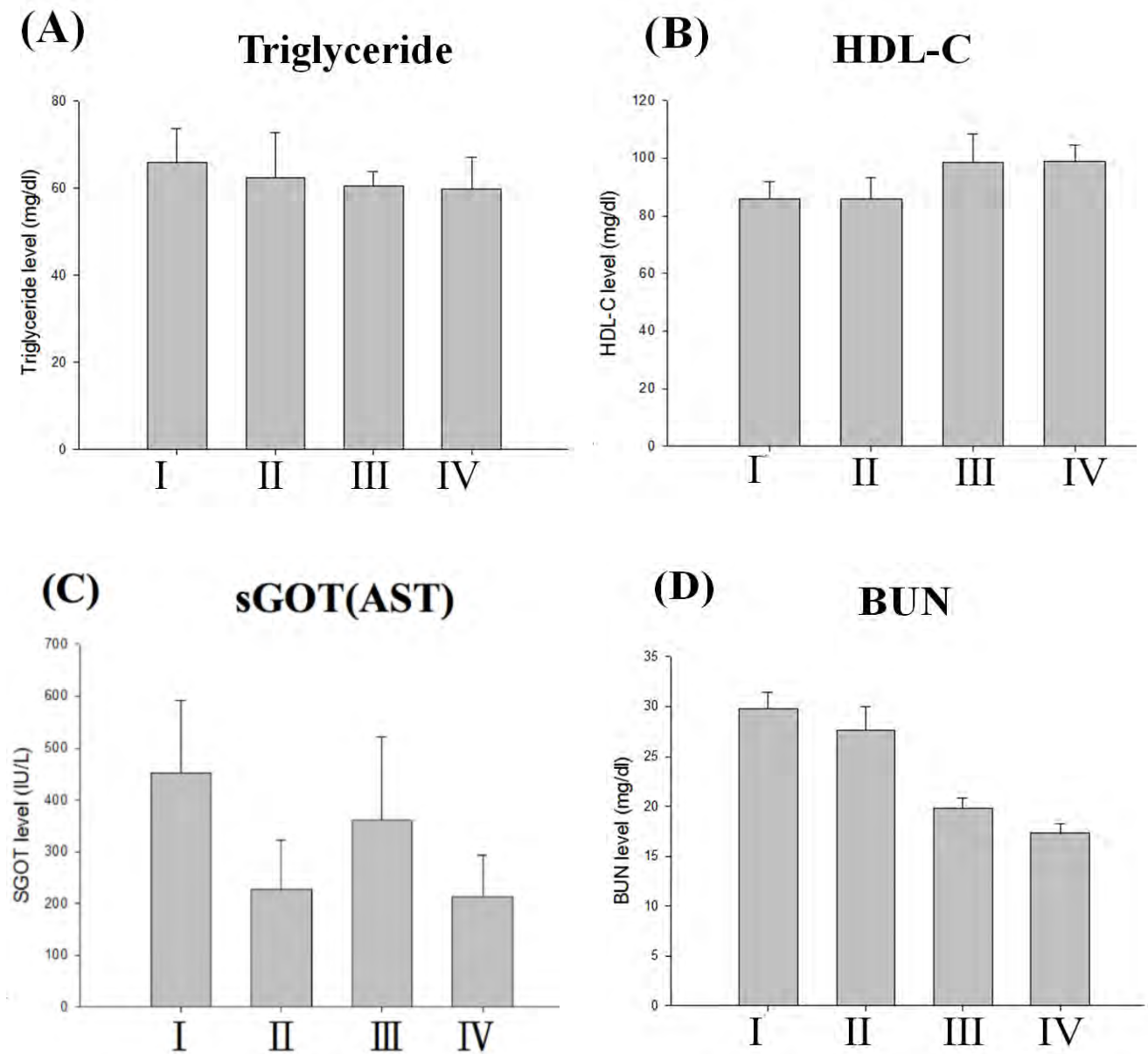
(一) 加入柚子皮 (CMP) 纖維、菱角殼 (TNP) 纖維與幾丁聚醣對高脂飲食小鼠體重變化影響：



圖八: 動物實驗第 1 天至第 26 天小鼠體重變化

餵食實驗小鼠高脂飲食，並配合口服給予果皮纖維後，根據圖八可知，除了第一週為適應期外，各組小鼠體重呈現上升趨勢，表示本實驗並未對小鼠產生嚴重之毒、副作用。若將菱角殼 (TNP) 和柚子皮 (CMP) 纖維開發為醫療原料，應不會對人體造成嚴重的不良反應或傷害。

(二) 餵食高脂飲食小鼠柚子皮 (CMP) 纖維、菱角殼纖維 (TNP) 或幾丁聚醣後對小鼠血液中生化值之影響：



圖九: 動物實驗第26天小鼠血液中生化指標。(A) Triglyceride, (B) HDL-C, (C) SGOT, (D) BUN。

根據圖九實驗結果可發現，小鼠給予高脂飲食搭配不同的果皮纖維及幾丁聚醣後血液中生化指標有所差異。圖九 (A) 中可以發現，柚子及菱角纖維這二個組別的小鼠血液中三酸甘油酯皆下降。圖九 (B) 中，柚子及菱角纖維這二個組別有提高血液中 HDL-C 的現象。圖九 (C) 中，幾丁聚醣、柚子皮纖維及菱角殼纖維這三個組別小鼠之血液 SGOT (AST) 皆下降。圖九 (D) 中，柚子及菱角這二個組別小鼠血液中 BUN 下降。

陸、討論

- 一、透過體外測試初步模擬果皮纖維及幾丁聚醣在胃與腸道中吸附油脂，減少體內脂質吸收的能力，結果顯示所有果皮纖維樣本皆具油脂吸附能力，其中柚子皮纖維及菱角殼纖維效果最接近幾丁聚醣，故進行第三部分動物實驗以模擬體內情形。
- 二、總多酚含量測試、DPPH 抗氧化能力測試及 NO assay 所測定的性質皆與減緩心血管疾病相關。

多酚 (polyphenol) 類物質具有很強的抗氧化能力，可調整多種體內酵素、細胞受體的活性、減緩心血管疾病 (Augustin Scalbert et al., 2005) 及降低血液中低密度膽固醇含量 (Hamed Samavat et al., 2016) 的作用。本實驗結果顯示柚子皮、菱角殼總多酚含量高於其他果皮，其中以菱角殼含量最高。

相關研究顯示自由基增加會刺激內皮細胞分泌細胞素，產生一連串發炎反應 (Sahnoun Z et al., 1998)。本研究以 DPPH 自由基清除能力測試不同果皮萃取液的抗氧化能力，結果顯示，柚子皮的清除自由基能力達約 40 %，葡萄柚皮達約 60 %，火龍果皮和菱角殼更可清除約 80% 的 DPPH。

文獻指出發炎反應與心血管疾病相關。除了低密度脂蛋白膽固醇含量，心血管疾病的評估須包含血管內發炎反應 (Paul Ridker et al., 2002)。脂肪堆積及巨噬細胞活化為粥狀斑塊形成的重要原因。斑塊內細胞釋出細胞素，引起發炎反應，持續發炎會導致發炎細胞的增加及聚集，分泌許多發炎因子造成斑塊的不穩定，破裂的斑塊引發局部血栓形成，最後導致急性冠心症候群 (Acute coronary syndrome) 的發生 (Piek et al., 2000)。NO assay 用以測試樣本抗發炎能力。結果顯示所有果皮甲醇萃取物皆能抑制 NO 生成。其中菱角殼、柚子皮抑制率高達一半以上。

輔以 MTT assay 評估各濃度樣本是否造成細胞傷害，並推測開發各樣本最適當的濃度。結果顯示除了菱角殼，細胞存活率皆達一半以上，且體內試驗結果菱角殼並無造成體重急遽下降等不適情形，故這些果皮若開發為保健食品，不易對人體造成不良的反應或傷害。

綜合以上實驗結果，菱角殼、柚子皮所具有的多酚類抗氧化物質最多，且這二種果

皮在多項測試均表現良好，未來極具開發為降低心血管疾病等功效醫藥原料的潛能。

三、由於高密度脂蛋白具減緩內皮細胞硬化 (Spieker LE et al., 2002)、防止低密度脂蛋白氧化、降低血漿中氧化壓力 (oxidative stress)，及減少單核細胞聚集動脈壁 (Theilmeier G et al., 2000) 等降低心血管疾病特性，且膽固醇與其結合成高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C) 驅使膽固醇逆向運輸 (Reverse Cholesterol Transport)，與三酸甘油酯 (Michael Miller et al., 2011) 成為評估心血管疾病指標之一。

本研究第三部分進一步挑選最接近市售保健食品幾丁聚醣的柚子皮與菱角殼纖維再與幾丁聚醣進行小鼠體內測試，給予 4 週高脂飲食後，結果顯示添加柚子皮纖維組別與幾丁聚醣組別的小鼠體重下降。而添加柚子皮纖維組別、菱角殼纖維組別與幾丁聚醣組別的小鼠血液中高密度脂蛋白膽固醇含量均上升，三酸甘油酯數值均有下降情形。

SGOT 及 BUN 為檢驗是否危害小鼠肝、腎功能指標。由於服用之纖維大多於肝、腎代謝，且脂肪肝等高脂飲食造成的不良影響會使數值升高，故指標數值的下降顯示幾丁聚醣、柚子皮纖維及菱角殼纖維並不會對小鼠產生毒、副作用。

綜合以上結果，柚子皮纖維、菱角殼纖維與市售保健食品幾丁聚醣具有提高高密度脂蛋白膽固醇、降低三酸甘油酯等特性，有潛力發展為相關保健食品。

柒、未來展望

一、解決幾丁聚醣問題

在高三選修生物課本中提到，幾丁聚醣與纖維素有類似結構，文獻指出，幾丁聚醣作為市售保健食品利用其與食物中脂肪類物質結合的特性，防止脂肪在腸胃道中被消化吸收，達到改善消化吸收的機能、降低高血壓、減少脂肪及膽固醇的攝取等效果。而幾丁聚醣通常由蝦蟹外殼所提煉，易引發食用者對蝦蟹過敏的問題，且製備過程廣泛使用熱鹼處理法，需使用高濃度的鹼液，容易造成環境汙染。天然的果皮纖維則無此問題，其不易對人體造成過敏問題且有相較於幾丁聚醣不錯的吸附油脂能力，或許能開發為新一項健康保健食品，使廢棄之果皮有更大的經濟價值。

二、在地農作之友善環境調查—參訪台南官田水菱有機菱角田

因菱角殼於本研究各項測試均有良好表現，因此我們針對菱角探討是否可作為市售保健食品-幾丁聚醣之替代品。我們前往台南官田水菱有機農場，它是第一個政府認證的有機菱角田，以友善農法和生態保育為理念種植菱角。友善農法之精神及耕作方式在於自然資源循環永續利用及生態平衡發展，化學農藥及肥料製品，生產自然安全農產品。官田水菱有機農場從事生態鏈循環農業並推廣綠色保護計畫。生態鏈循環農業利用水雉為菱角金花蟲之天敵的特性取代化學農藥，以減少病蟲害，避免環境汙染，進而達到生態保育的目標並生產無毒有機農產品。目前以友善農法種植的菱角殼，還未有深入研究，以水菱有機農場為例，製作成商品的比例大約只有 40 %，其餘約 60 % 只能當作堆肥，而以慣行農法種植的菱角殼因含有大量農藥，幾乎作為廢棄物。因此若將友善農法——無農藥果皮的概念與本實驗研究結果結合，能提升食品安全性，並作為抗心血管疾病的醫療原料，達到提高果皮經濟價值之目的。

三、提升有機農業經濟效益——發展「無農藥果皮」相關產品

初步分析商品化的可能性，我們目前將菱角殼磨成粉狀後，製作成膠囊，作為商品化之構想，未來可進一步成為具有降低血脂功效之市售保健食品。

捌、結論

果皮纖維中柚子皮、菱角殼纖維與市售幾丁聚醣皆具有提高高密度脂蛋白 (HDL) 與降低三酸甘油酯等特性，未來極具開發為降低心血管疾病之保健食品的潛能。果皮甲醇萃取物中以菱角殼、柚子皮所具有的多酚類抗氧化物質最多，且這三種果皮清除自由基能力以及抗發炎能力良好。其中菱角殼在多項試驗結果均有最佳表現，若能與有機農法結合發展「無農藥果皮」的相關天然保健食品，不僅能將果皮再利用、提升果皮經濟價值，更能解決廢棄物和幾丁聚醣問題，達到永續發展。

玖、參考文獻及其他

黃仲杰 (105 年 12 月)。推動友善環境農業。行政院農業委員會。取自

<http://www.coa.gov.tw/ws.php?id=2505838>

吳岱芝 (2013 年 5 月 22 日)。農村再生，生什麼？談生態友善農業（下）。環境

資訊中心。取自 <http://e-info.org.tw/node/85893>

有機農業將立專法 納入友善農耕 如何定義？（2016 年 8 月 26 日）。有機農業全

球資訊網。取自

<http://info.organic.org.tw/supergood/front/bin/ptdetail.phtml?Part=20160826&Category=100981>

吳彰哲、黃瀚寧。蝦蟹殼中的寶貝—幾丁質（2010 年 4 月）。科學發展，448 期。

陳惠英、顏國欽 (1998 年 2 月 1 日)。自由基、抗氧化防禦與人體健康。臺灣營

養學會雜誌，23（1），105 – 121。

Augustin Scalbert, Claudine Manach, Christine Morand ,and Christian Remesy. (2005).

Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287 – 306.

Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, and Liliana

Jiménez. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability^{1,2}. *Am J Clin Nutr May*, 727-747.

Changjiang Guoa, Jijun Yanga, Jingyu Weia, Yunfeng Lia, Jing Xua, Yugang Jianga.

(2003, December). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23(12), 1719 – 1726

Chuanlong Zong, Yang Yu, Guohua Song, Tian Luo, Luqin Li, Xinnong Wang, and

Shucun Qin. (2012). Chitosan oligosaccharides promote reverse cholesterol transport and expression of scavenger receptor BI and CYP7A1 in mice, 237, 194 – 200.

Hua Cai, David G. Harrison. (2000, November 10). Endothelial Dysfunction in

Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress, 87(10).

Gerd Assmann, Antonio M. Gotto. (2004, June 15). HDL Cholesterol and Protective

Factors in Atherosclerosis. *Circulation*, 109(23)

Kazuko. Shimada, Kuniko. Fujikawa, Keiko. Yahara, Takashi. Nakamura. (1992).

Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem*, 40 (6), 945 – 948.

Piyawan Surinrut, Supanee Kaewsutthi and Raneer Surakarnkul. (2005). Radical Scavenging Activity in Fruit Extracts. *WOCMAP III*, 5.

Peter Libby. (2006). Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 83(2), 456 – 460.

Thomas A. Pearson, George A. Mensah, R. Wayne Alexander, Jeffrey L. Anderson, Richard O. Cannon, Michael Criqui, Yazid Y. Fadl, Stephen P. Fortmann, Yuling Hong, Gary L. Myers, Nader Rifai, Sidney C. Smith, Kathryn Taubert, Russell P. Tracy, Frank Vinicor. (2003). Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease, 107, 499-511.

The Emerging Risk Factors Collaboration. C-Reactive Protein, Fibrinogen, and Cardiovascular Disease Prediction. (2012). *N Engl J Med*, 1310-1320.

Wu-Yang Huang, Yi-Zhong Cai, Harold Corke, Mei Sun. (2010, September). Survey of antioxidant capacity and nutritional quality of selected edible and medicinal fruit plants in Hong Kong. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 510-517

Yang Yu, Tian Luo, Shuai Liu, Guohua Song, Jiju Han, Yun Wang, Shutong Yao, Lei Feng and Shucun Qin. (2015). Chitosan Oligosaccharides Attenuate Atherosclerosis and Decrease Non-HDL in ApoE^{-/-} Mice, 22, 926-941.

【評語】 052204

1. 探討國產農業廢棄物（果皮或殼）之萃取物及其殘渣之開發利用。
2. 對試驗材料及試驗流程設計宜有科學邏輯性之瞭解。
3. 實驗結論及釋義應依實際試驗結果作為佐證。

作品海報

壹、研究動機

臺灣常被稱為水果王國，然而食用後的農產品廢棄物及果皮往往被丟棄，甚至可能引起環境汙染問題。以官田地區為例，先前參訪位於台南官田的水菱有機農場，發現臺南官田年產近3700公噸菱角殼，過去都棄置田邊露天燃燒或運往焚化爐焚化產生大量二氧化碳汙染。另外，肥胖也是現代人常有的健康問題，從1996年起，世界衛生組織 (WHO) 便已將肥胖列為慢性疾病，且根據WHO統計，每年至少有280萬人死亡可歸咎於超重或肥胖，因此解決肥胖問題是刻不容緩的議題。而市面上之減肥保健食品常以幾丁聚醣為原料，在高三選修生物課本中提到，幾丁聚醣與纖維素有類似結構，引發我們探討同為纖維的果皮是否有類似功效。另外，文獻指出果皮含有許多營養成分，例如多酚、維生素等物質，具抗氧化等特性 (W.Y Huang et al., 2009) 。我們由此做為發想，希望能使果皮從廢棄物轉化為可利用的資源，因此利用甲醇萃取出果皮內物質，進而討論其再利用價值。

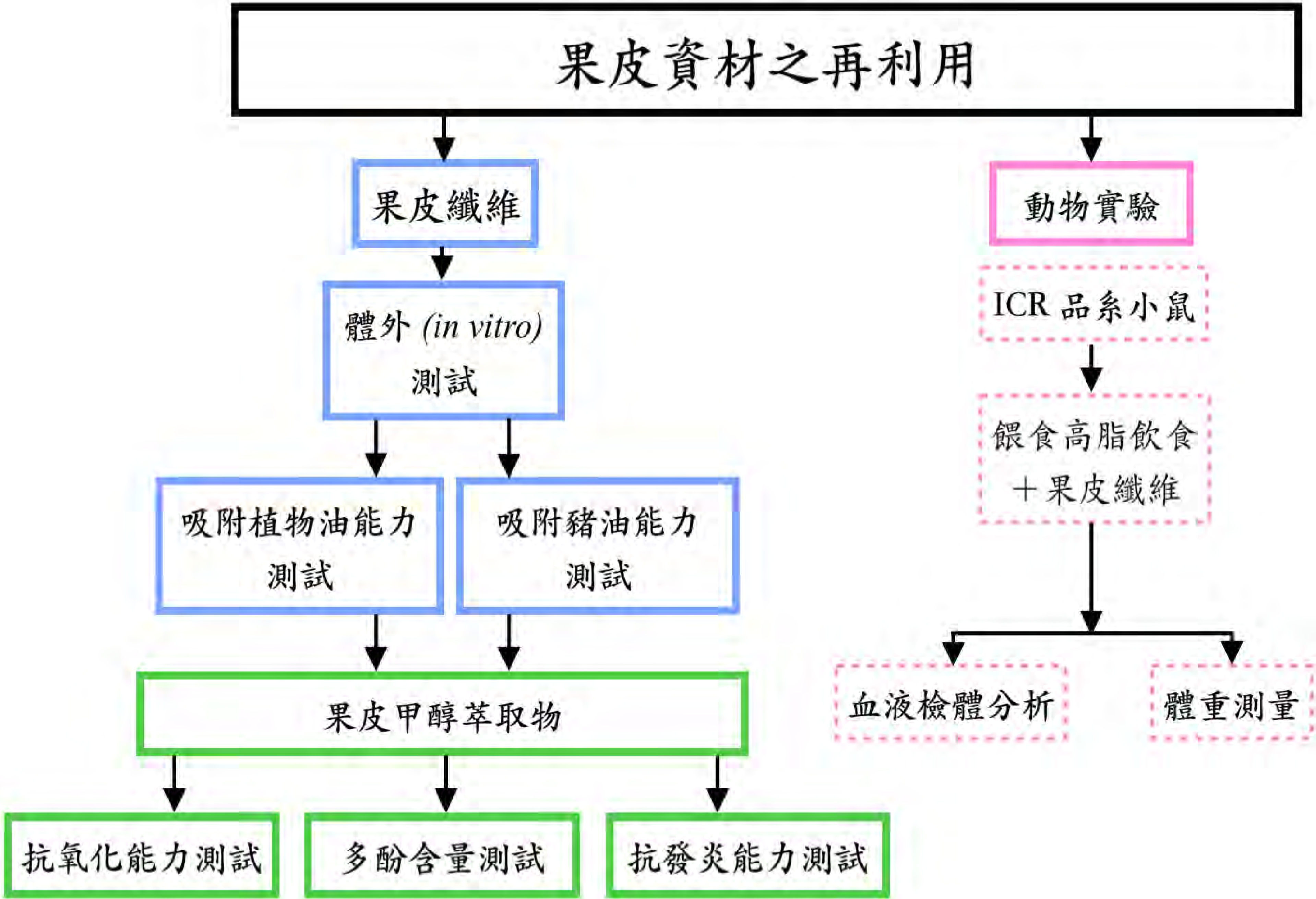
貳、研究目的

- 一、測試不同果皮纖維之油脂吸附能力。
- 二、分析果皮甲醇萃取物之總多酚含量，並進行清除DPPH自由基測試及其對於小鼠巨噬細胞 (Raw264.7 cells) 之抗發炎活性測試，以評估何種果皮甲醇萃取物具開發為減重相關保健食品之潛能。
- 三、藉由動物實驗，測量體重變化及各項血清生化指標，評估果皮纖維對高脂飲食的影響。

參、研究材料

- 一、實驗相關果皮及代號：
CMP: 柚子 (Citrus maxima)
CPP: 葡萄柚 (Citrus paradise)
HPP: 紅肉火龍果 (Hylocereus polyrhizus)
TNP: 菱角 (Trapa natans)
- 二、幾丁聚醣 (Chitosan)
- 三、實驗相關油品：健康調和油（得意的一天）、豬油（香里食品）
- 四、實驗細胞株:小鼠巨噬細胞 Raw264.7 cells
- 五、實驗動物：雄性小鼠 ICR mice，6-8週齡

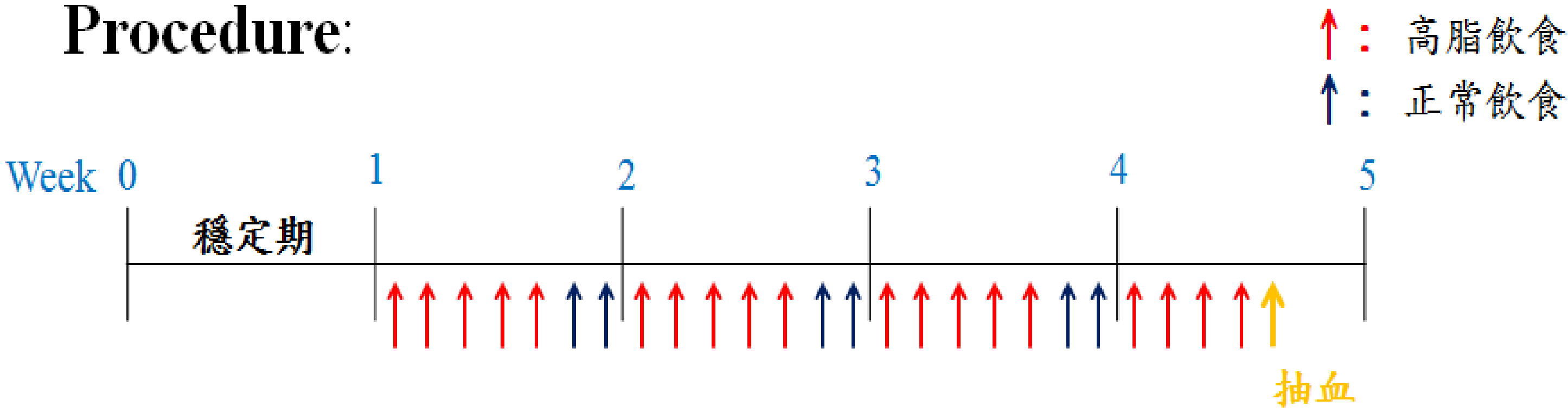
肆、研究方法



註一：吸附油脂百分率= $\frac{\text{吸附油脂後重}-\text{吸附油脂前重}}{\text{吸附油脂前重}} \times 100\%$

註二：實驗小鼠飼養於嘉義大學動物房，室溫恆溫21-23 °C，光照及黑暗各12小時。隨機分4組(如表一)，每組七隻。餵食時程如圖一所示，每週給予5天高脂飲食並秤量體重，另外2天正常飲食。第26日抽血並送至上哲獸醫院檢測血液中相關生化指標，比較果皮纖維對高脂飲食小鼠之體重及血液中相關生化指標影響。

Procedure:



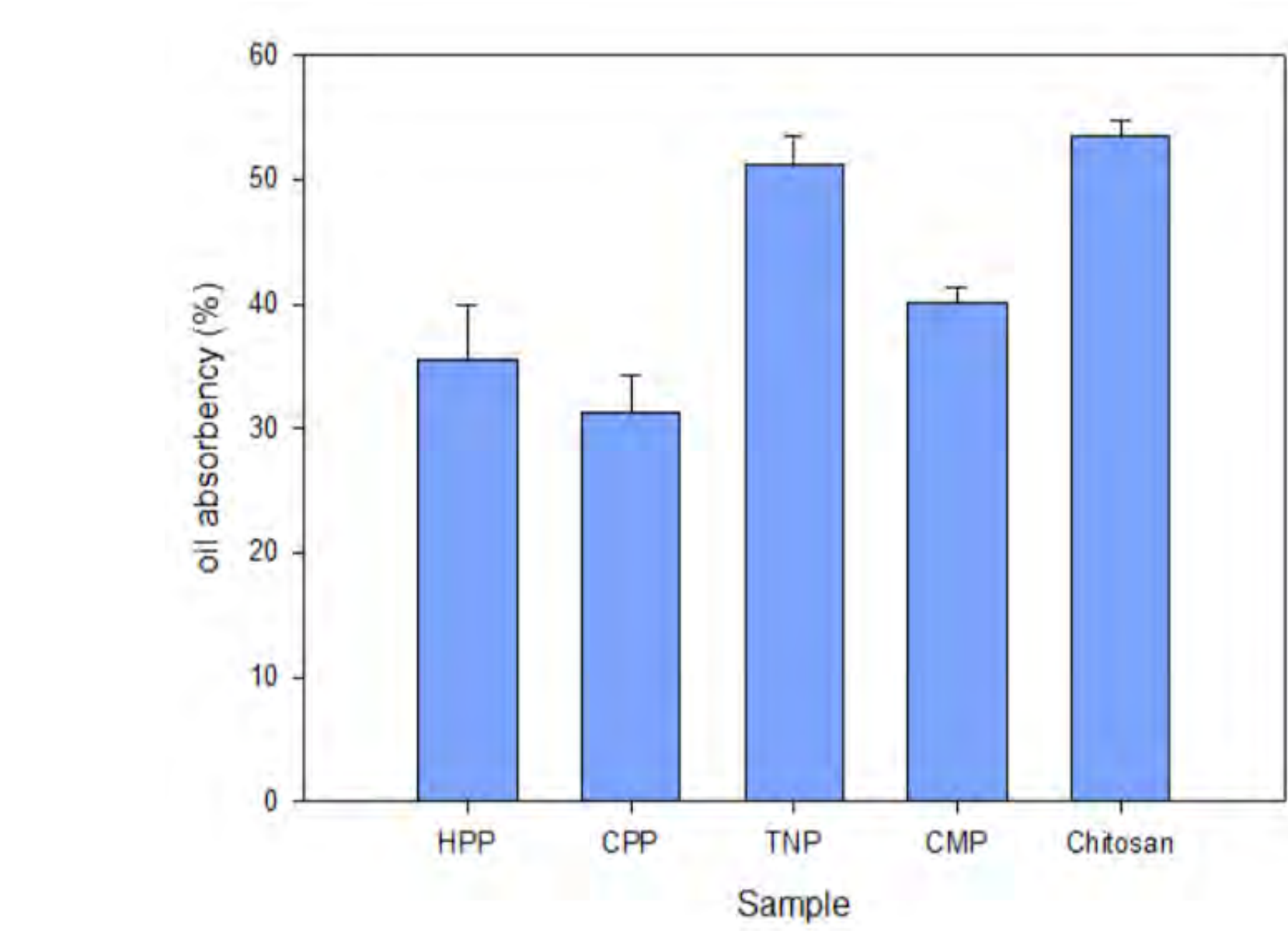
圖一：動物實驗時程

表一：動物實驗小鼠分組

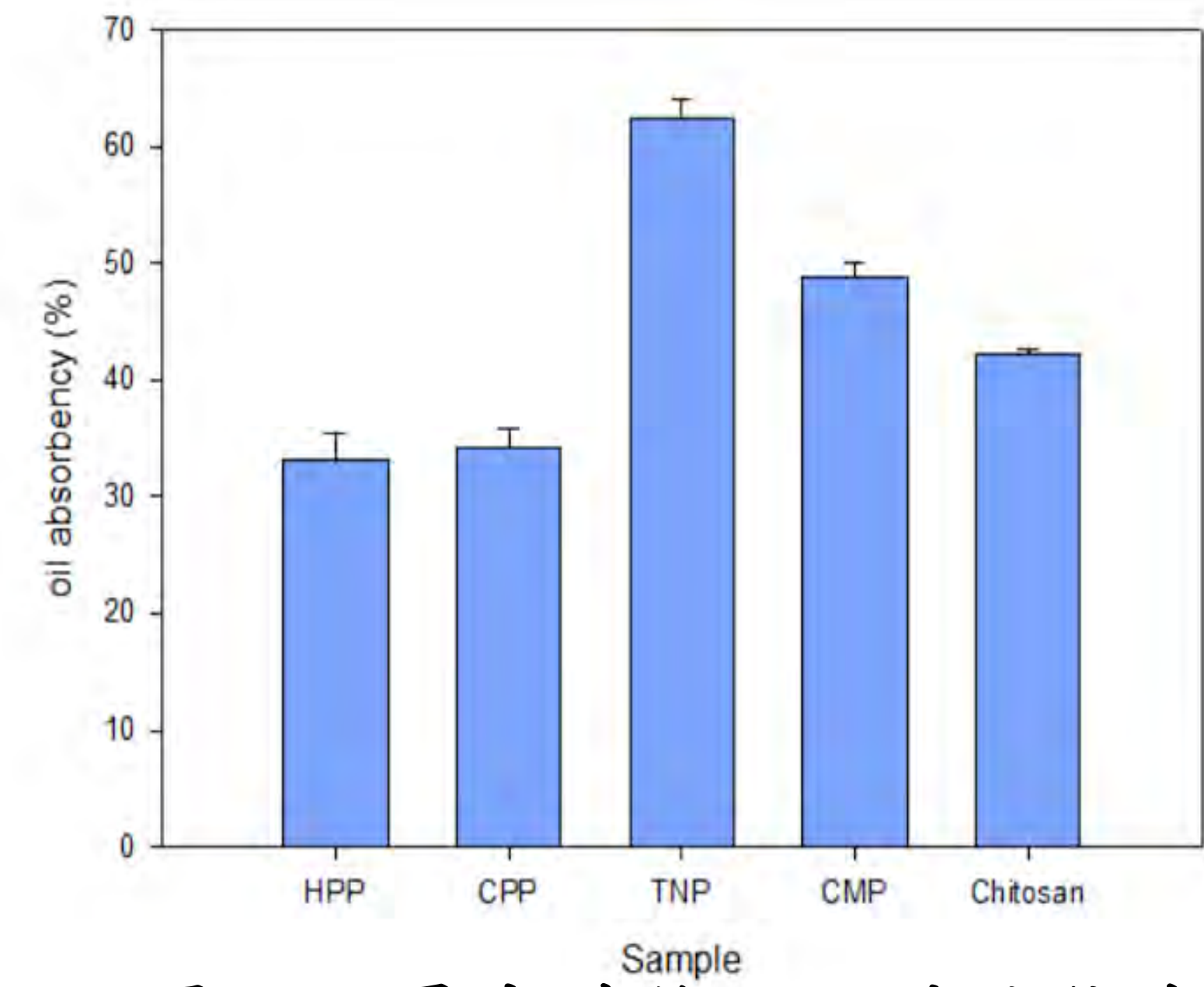
組別	飲食
I	膽固醇（高脂飲食）
II	膽固醇+幾丁聚醣
III	膽固醇+柚子皮纖維
IV	膽固醇+菱角殼纖維

肆、研究結果

一、測試不同果皮纖維之油脂吸附能力：



圖二：果皮纖維吸附植物油能力測試

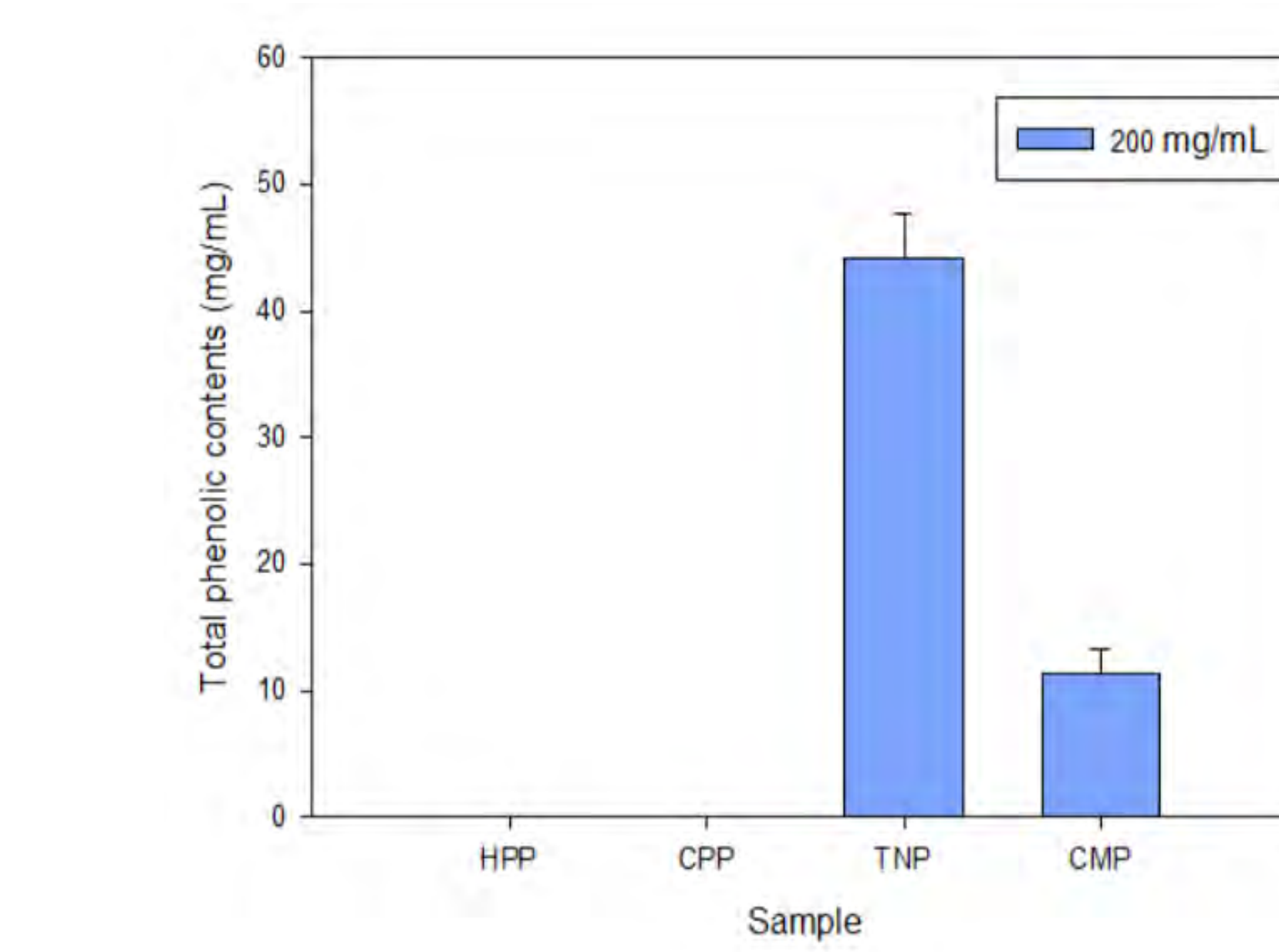


圖三：果皮纖維吸附豬油能力測試

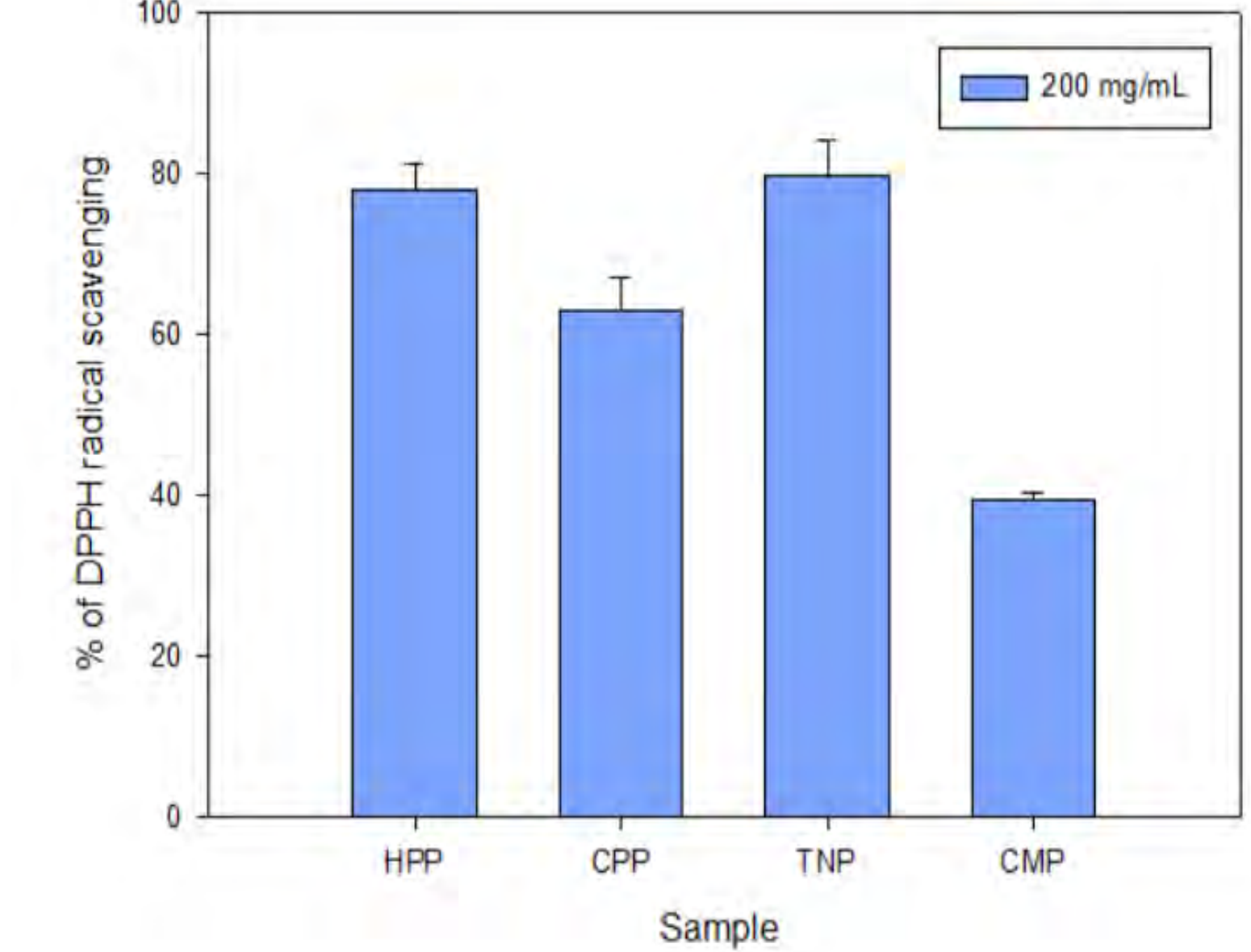
由圖三可知柚子皮 (CMP) 和 菱角殼 (TNP) 吸附豬油能力皆高於幾丁聚醣。

二、測試不同果皮甲醇萃取物總多酚含量及抗氧化、抗發炎之能力：

(一) 果皮甲醇萃取物之總多酚含量測試與抗氧化能力測試



圖四：總多酚含量測試結果

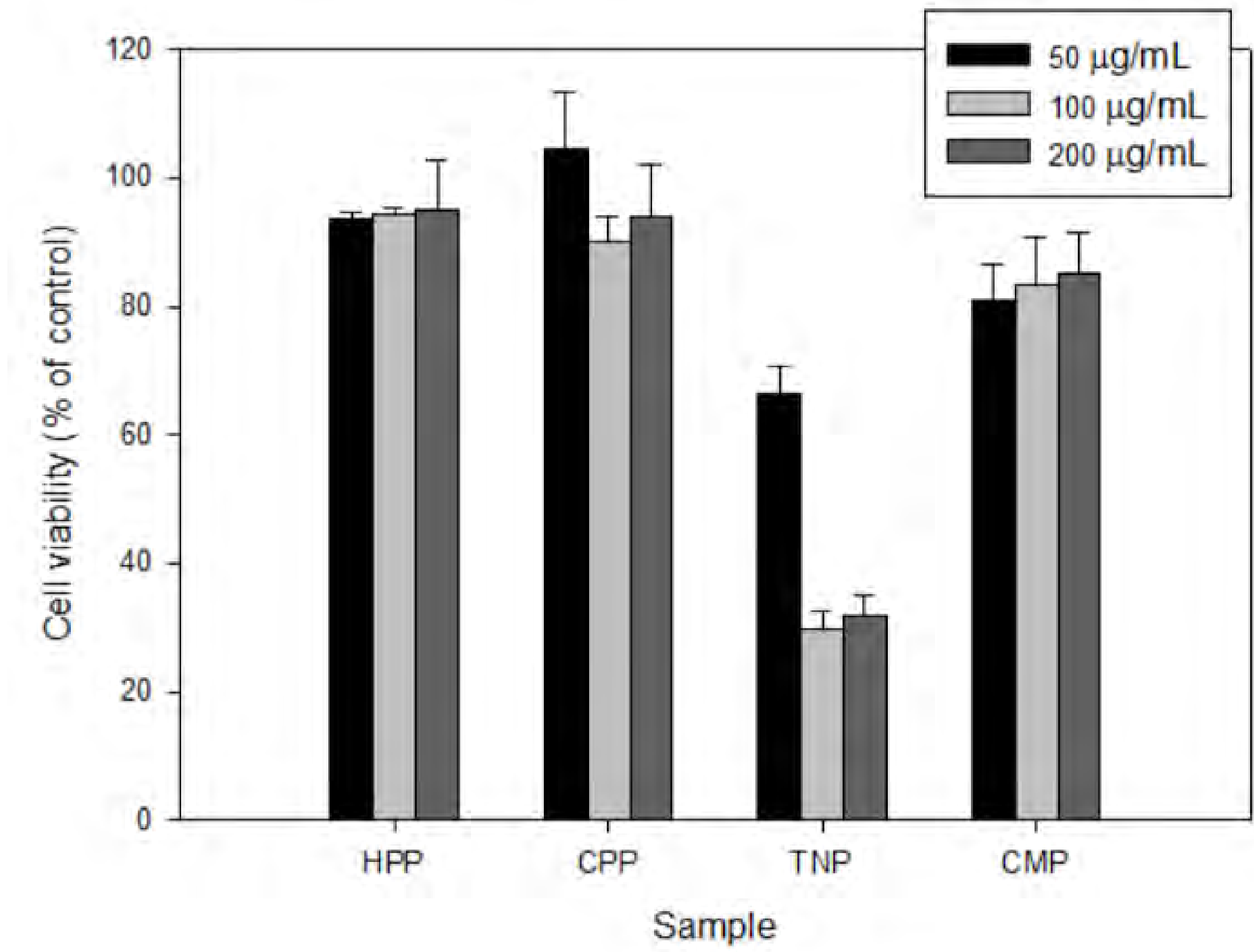


圖五：DPPH自由基清除能力測試結果

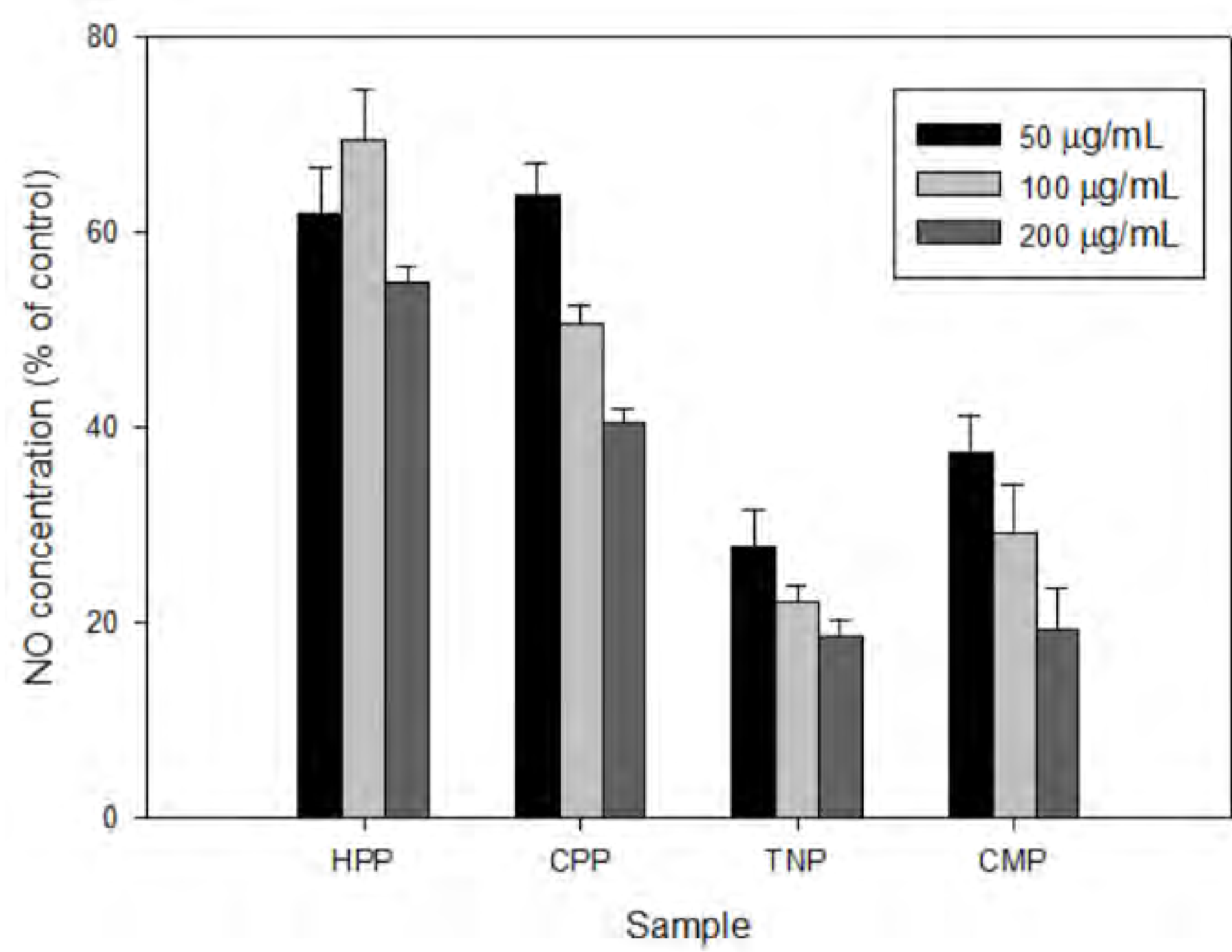
由圖五可知，除柚子皮 (CMP) 外，DPPH自由基清除能力均達 60 % 以上，其中菱角殼 (TNP) 及火龍果皮 (HPP) 高達接近 80 %。

(二) 果皮甲醇萃取物對小鼠巨噬細胞Raw264.7 cells之抗發炎能力測試

(A)



(B)

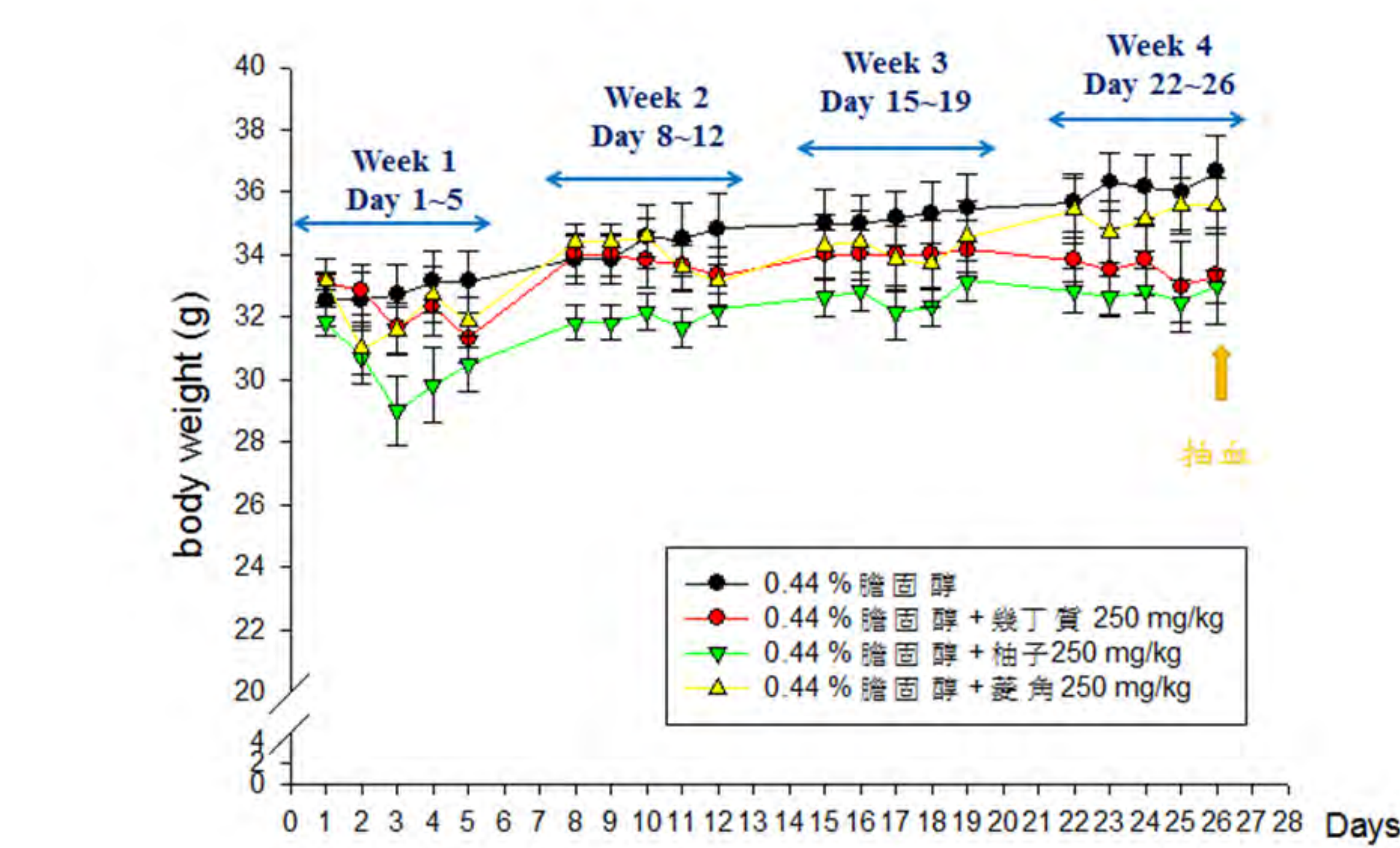


圖六：經不同濃度 (50、100、200 µg/mL) 的果皮甲醇萃取物處理48小時後之小鼠巨噬細胞 (A) 細胞存活率 (MTT assay) 結果；(B) 一氧化氮含量 (NO assay) 結果

由圖六結果可知，(A) 各果皮甲醇萃取物在其最適當濃度均達到 60 % 以上的細胞存活率。(B) 結果顯示所有果皮甲醇萃取物皆有抑制NO生成的效果，其中柚子皮 (CMP) 和菱角殼 (TNP) 在濃度50、100和200 µg/mL時，效果都明顯優於其他萃取物，顯示其具有良好的抗發炎能力。

三、測試不同果皮纖維對高脂飲食小鼠之影響：

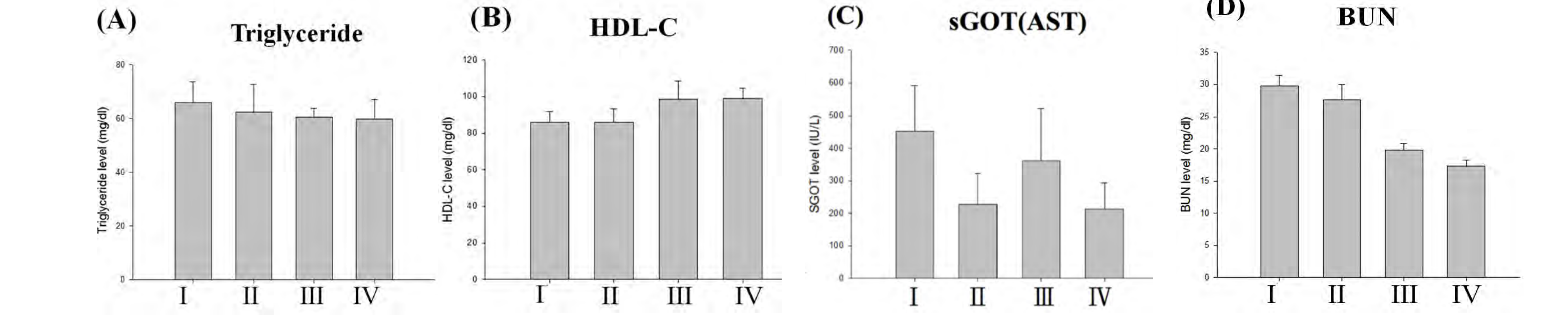
(一)加入柚子皮 (CMP) 纖維、菱角殼 (TNP) 纖維與幾丁聚醣對高脂飲食小鼠體重變化影響：



圖七：動物實驗測試各組別小鼠體重變化圖

餵食實驗小鼠高脂飲食，並配合口服給予果皮纖維後，根據圖七可知，除了第一週為適應期外，各組小鼠體重呈現上升趨勢，表示本實驗並未對小鼠產生嚴重之毒、副作用。若將菱角殼 (TNP) 纖維和柚子皮 (CMP) 纖維開發為保健食品，應不會對人體造成嚴重的不良反應或傷害。

(二)餵食高脂飲食小鼠柚子皮 (CMP) 纖維、菱角殼 (TNP) 纖維 或幾丁聚醣後對小鼠血液中生化數值之影響：



圖八：動物實驗第26天小鼠血液中生化指標。(A) Triglyceride, (B) HDL-C, (C) SGOT, (D) BUN。

根據圖八實驗結果可發現，小鼠給予高脂飲食搭配不同的果皮纖維及幾丁聚醣後血液中生化指標有所差異。圖八 (A) 中可以發現，柚子皮纖維、菱角殼纖維及幾丁聚醣這三個組別的小鼠血液中三酸甘油酯下降。圖八 (B) 中，柚子皮纖維及菱角殼纖維這二個組別有提高血液中HDL-C的現象。圖八 (C) 中，柚子皮纖維、菱角殼纖維及幾丁聚醣這三個組別小鼠之血液SGOT (AST)皆下降。圖八 (D) 中，柚子皮纖維、菱角殼纖維及幾丁聚醣這三個組別小鼠血液中BUN下降。

伍、討論

一、透過體外測試初步模擬果皮纖維及幾丁聚醣在胃與腸道中吸附油脂，減少體內脂質吸收的能力，其中柚子皮纖維及菱角殼纖維效果最接近幾丁聚醣，故進行第三部分動物實驗以模擬體內情形。

二、果皮富含多酚，文獻指出多酚具有清除自由基與抗氧化能力 (A. Scalbert *et al.*, 2005)，也可降低血液中LDL-C的含量 (H. Samavat *et al.*, 2016)。自由基的清除可減輕對細胞的危害，且可降低血管斑塊內細胞引起的發炎反應。可能對心血管等疾病的減緩有幫助。綜合本研究結果中果皮萃取物的多酚含量、清除自由基能力與抗發炎效果，以柚子皮及菱角殼有最佳表現，顯見深具開發成保健食品之潛能。

三、三酸甘油酯的降低及HDL-C的提升顯示所有樣本可能具有降低心血管疾病的潛能。SGOT及BUN為檢驗是否危害小鼠肝、腎功能指標。由於服用之纖維大多於肝、腎代謝，且脂肪肝等高脂飲食造成的不良影響會使數值升高，故指標數值的下降顯示幾丁聚醣、柚子皮纖維及菱角殼纖維並不會對小鼠產生毒、副作用。綜合以上結果，柚子皮纖維、菱角殼纖維具有提高高密度脂蛋白膽固醇、降低三酸甘油酯等特性，有潛力發展為相關保健食品。

陸、未來展望

一、在地農作之友善環境調查——參訪台南官田水菱有機菱角田
因菱角殼於本研究各項測試均有良好表現，因此我們針對菱角探討是否可作為市售保健食品-幾丁聚醣之替代品。我們前往台南官田水菱有機農場，它是第一個政府認證的有機菱角田，以友善農法和生態保育為理念種植菱角。友善農法之精神及耕作方式在於自然資源循環永續利用及生態平衡發展，生產自然安全農產品。目前以友善農法種植的菱角殼，還未有深入研究，以水菱有機農場為例，製作成商品的比例大約只有40 %，其餘約60 % 只能當作堆肥，而以慣行農法種植的菱角殼因含有大量農藥，幾乎作為廢棄物。因此若將友善農法——無農藥果皮的概念與本實驗研究結果結合，能提升食品安全性，並作為抗心血管疾病的保健食品，達到提高果皮經濟價值之目的。

二、提升有機農業經濟效益——發展「無農藥果皮」相關產品
初步分析商品化的可能性，我們目前將菱角殼磨成粉狀後，製作成膠囊，作為商品化之構想，未來可進一步成為具有降低血脂功效之市售保健食品。

柒、 結論

果皮纖維中柚子皮、菱角殼纖維與市售幾丁聚醣皆具有提高高密度脂蛋白（HDL）與降低三酸甘油酯等特性，未來極具開發為降低心血管疾病之保健食品的潛能。果皮甲醇萃取物中以菱角殼、柚子皮所具有的多酚類抗氧化物質最多，且這兩種果皮清除自由基能力以及抗發炎能力良好。其中菱角殼在多項試驗結果均有最佳表現，若能與有機農法結合發展「無農藥果皮」的相關天然保健食品，不僅能將果皮再利用、提升果皮經濟價值，更能解決廢棄物和幾丁聚醣問題，達到永續發展。

捌、參考文獻

吳彰哲、黃瀚寧。蝦蟹殼中的寶貝——幾丁質（2010年4月）。科學發展，448期。
Augustin Scalbert, Claudine Manach, Christine Morand ,and Christian Remedy. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287–306.
Hamed Samavat, April R Newman, Renwei Wang, Jian-Min Yuan, Anna H Wu, and Mindy S Kurzer. (2016, November) Effects of green tea catechin extract on serum lipids in postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled clinical trial.
Yang Yu, Tian Luo, Shuai Liu, Guohua Song, Jiju Han, Yun Wang, Shutong Yao, Lei.
Feng and Shucun Qin. (2015). Chitosan Oligosaccharides Attenuate Atherosclerosis and Decrease Non-HDL in ApoE-/- Mice, 22, 926-941.



圖九：參訪台南官田水菱有機菱角田

圖十：菱角殼