

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	080003
參展科別	生物化學
作品名稱	橡實代謝物與飛鼠小腸內生菌共發酵產物之應用
得獎獎項	一等獎

就讀學校	屏東縣立枋寮高級中學
指導教師	林昀生 張簡琦麗
作者姓名	許芸臻 廖千筑

關鍵詞	<u>橡實、共發酵、內生菌</u>
-----	-------------------

作者簡介



我們是來自屏東縣枋寮高中高二的學生：許芸臻和廖千筑。身為排灣族人，我們體認到文化傳承的重要性，因此，我們結合最感興趣的生物醫藥領域，運用科學方法，印證原住民族飲食文化中食用飛鼠腸的醫療功效，過程中除了對傳統知識更加認識，也培養了科學研究的基礎。非常感謝指導老師們的教導，使我們能參加此複賽，也期望我們能藉此機會發揚原住民族的傳統智慧。

研究報告封面

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：南區（編號由國立臺灣科學教育館統一填列）

科別：生物化學科

作品名稱：橡實代謝物與飛鼠小腸內生菌共發酵產物之應用

關鍵詞：橡實、共發酵、內生菌（最多三個）

編號：

（編號由國立臺灣科學教育館統一填列）

摘要

本研究主要在探討飛鼠胃中食物殘渣成分及其腸道菌 *Floricoccus tropicus* 的代謝作用。研究中，透過核磁共振（NMR）氫圖譜分析，發現正己烷與 75%乙醇萃取的飛鼠胃中食物殘渣及橡實皆顯示出長鏈脂肪酸的訊號，初步推測飛鼠的主要食物來源可能為橡實。研究中也從飛鼠腸道內分離純化鑑定出一乳酸菌 *Floricoccus tropicus*，並發現此乳酸菌對橡實脂肪酸的代謝作用，結果顯示不飽和脂肪酸在發酵過程中顯著下降，推測這些脂肪酸被轉化成具抗發炎作用的短鏈脂肪酸。在抑菌實驗中，發酵前的橡實油脂不具抑菌效果，但發酵後的橡實油脂對大腸桿菌具有抑制效果。此外，抗發炎測試也顯示出發酵後的橡實油脂樣品能顯著地抑制 LPS 誘導的 RAW 264.7 細胞中 NO 與 TNF- α 的生成，尤其隨著濃度的增加抑制效果也增加。本研究發現的乳酸菌 *Floricoccus tropicus*，對橡實脂肪酸發酵代謝之後，具有抑制大腸桿菌及抗發炎的效果。

Abstract

This study primarily investigates the components of food residues in the stomach of flying squirrels and the metabolism of the intestinal bacteria *Floricoccus tropicus*. Using nuclear magnetic resonance (NMR) hydrogen spectrum analysis, the signals of long-chain fatty acids were detected in both n-hexane and 75% ethanol extracts of flying squirrel gastric residues and acorns, suggesting that acorns may be a primary food source for the flying squirrels. The study also identified *Floricoccus tropicus*, one of the lactic acid bacteria, from the intestines of flying squirrels and discovered its role in the metabolism of fatty acids in acorns. Results showed that polyunsaturated fatty acids significantly decreased during fermentation, indicating that they were converted into short-chain fatty acids with anti-inflammatory properties. In the antibacterial activity experiments, the acorn grease showed no inhibitory effects before fermentation, but after fermentation, the acorn grease exhibited inhibitory effects against *E. coli*. Furthermore, in anti-inflammatory tests, fermented acorn grease samples significantly suppressed the production of NO and TNF- α in LPS-induced RAW 264.7 cells, with greater inhibition at higher concentrations. In conclusion, the lactic acid bacteria *Floricoccus tropicus* was found to metabolize fatty acids of acorns into compounds with antibacterial and anti-inflammatory effects.

壹、前言

一、研究動機

從小在部落中成長，我們學習了族人代代相傳的智慧與生活方式。在這其中，飛鼠不僅是常見的獵物，更是重要的食材之一。族人相信，飛鼠主要以樹上的種子（如橡實）和嫩葉為食，這讓牠們被視為「乾淨」的獵物。捕獵飛鼠後，族人會取出其小腸，簡單沾鹽生食，或是將其醃製作為健胃補品，甚至用來治療胃痛。這些做法不僅是生活中的日常，更是族人長期累積的經驗智慧。

然而，這些傳統知識背後是否具有科學根據，一直讓我們感到好奇。族人相信飛鼠腸具有緩解胃痛的功效，實際上，他們食用的是飛鼠的小腸部分，內含食糜而非糞便。因此，流傳的「吃飛鼠大便治胃痛」的說法其實是誤解。這引發了我們的研究興趣：飛鼠腸是否真的能緩解胃痛？究竟是因為食糜中的益生菌，還是飛鼠將食物消化後所產生的代謝物具有療效？

在實驗過程中，我們將比較發酵前後油脂的成分變化，測試其抑制大腸桿菌的能力，以及其抗發炎的效果。這不僅幫助我們了解傳統食療中的科學機制，也可能揭示飛鼠腸道中益生菌和植物代謝物對人體腸胃健康的潛在益處。最終，我們希望通過這項研究，解釋為什麼族人在世代相傳的經驗中認為生食飛鼠小腸有助於腸胃健康，並且進一步保存和發揚這項珍貴的文化遺產。

二、研究目的

- (一) 確認飛鼠食用的橡實之成分組成。
- (二) 研究飛鼠腸道菌群發酵橡實前後成分的變化。
- (三) 探討及比較橡實發酵前後成分變化與其抑菌及抗發炎之能力。

貳、研究過程或方法

一、研究原理

（一）腸道共生細菌

動物的腸道內充滿著各種共生細菌，這些細菌可提供宿主缺乏的養分，或幫助分解腸道中的食物【1】。動物出生時，腸道通常是無菌的，隨著個體成長，腸道菌相逐漸複雜並趨於穩定。這些菌相會因宿主的基因型、食性、年齡及棲地環境等因素有所不同。此外，腸道菌相的變化也會影響宿主的體重、免疫力等生理現象【2】。

（二）脂多醣（LPS）與發炎反應

脂多醣（Lipopolysaccharide, LPS）是革蘭氏陰性菌外膜的主要成分，屬於細菌內毒素【Ulevitch & Tobias, 1995】。LPS 中的脂質 A 是主要影響內毒素活性的部位，能被巨噬細胞和單核球細胞辨識，並刺激細胞釋放發炎前驅物質，如一氧化氮（NO）和腫瘤壞死因子- α （TNF- α ）。當宿主感染外來細菌時，巨噬細胞通過辨識 LPS 引發一系列免疫反應以清除細菌。然而，若 LPS 引發過度的發炎反應，可能導致敗血症、敗血性休克或全身性的免疫發炎疾病【Schroder et al., 2004】。

二、研究設備與器材

（一）材料及藥品

大赤鼯鼠腸胃	<i>Petaurista philippensis grandis</i>
橡實	<i>Quercus</i>
正己烷	n-hexane
乙醇（75%）	Ethanol (75%)
MRS 培養基	Lactobacillus MRS Broth
NB 營養培養液	Nutrient Broth

瓊脂	Agar
血清瓶	Serum bottle
培養皿	Petri dish
勾菌環	Inoculation loop
燒杯	Beaker
錐形瓶	Erlenmeyer flask
微量吸管	Micropipette
三角玻璃棒	Glass Spreader

(二) 設備及器材

核磁共振光譜儀	Nuclear Magnetic Resonance
酵素免疫分析儀	ELISA Reader
直立式高溫高壓滅菌鍋	Autoclave
真空乾燥系統	Vacuum Drying Oven
無菌無塵操作台	Laminar Flow
恆溫培養箱	Thermostat Incubator
減壓濃縮機	Rotary Evaporator
小型粉碎機	Micro Mill
水流抽氣幫浦	Aspirator Pump

參、實驗流程與研究方法

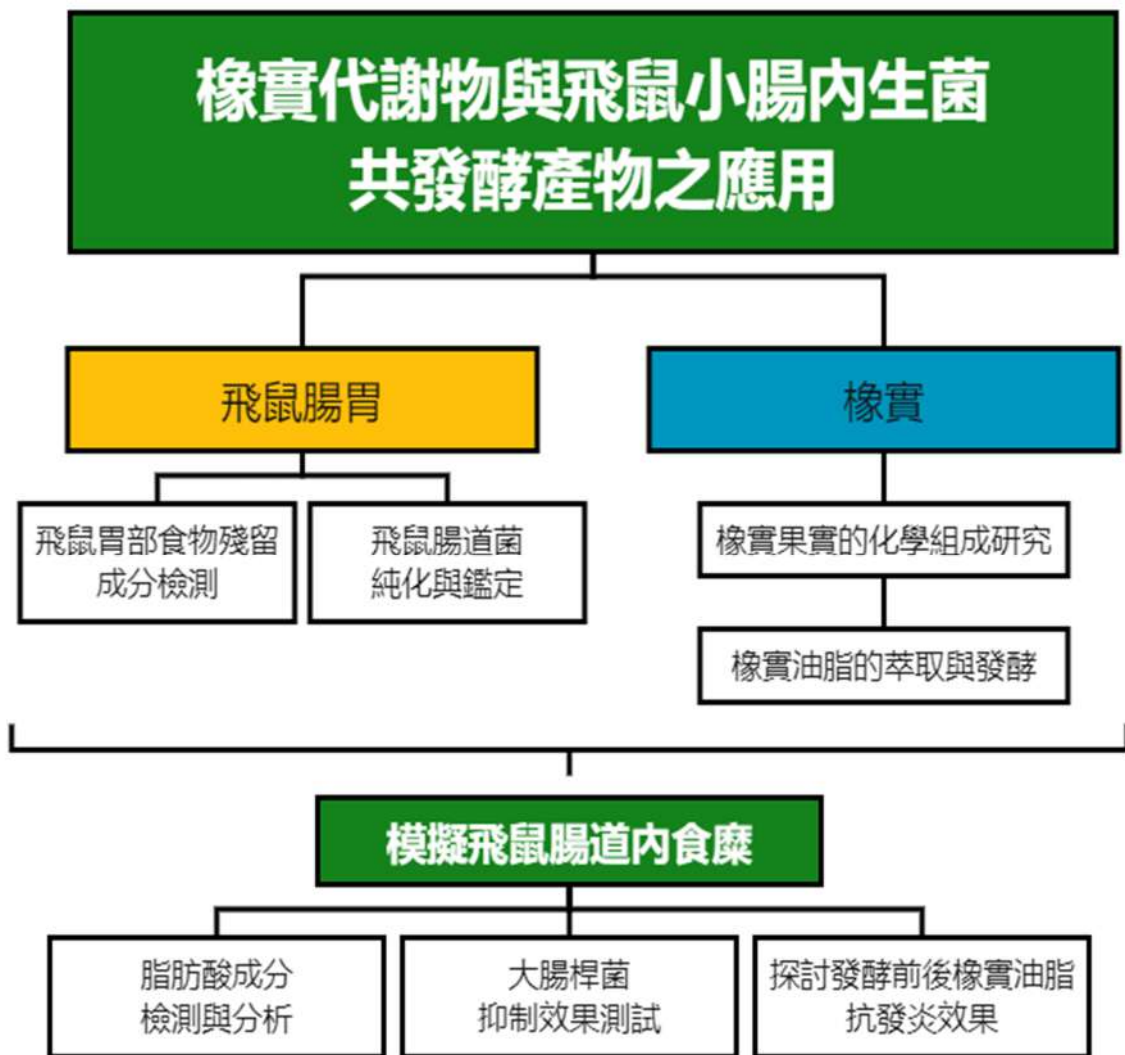


圖 1、實驗流程圖(研究者繪製)

一、實驗一（飛鼠胃部食物殘留的成分檢測）

（一）方法：



圖 2、飛鼠胃部食物殘留的成分檢測方法(研究者繪製)

二、實驗二（飛鼠腸道菌的純化與鑑定）

（一）方法：

1.小腸樣本處理：

- (1)解剖飛鼠後，取出小腸，截取一段並用無菌長尾夾夾住兩端。
- (2)使用無菌水沖洗小腸的外部，避免引入外來雜菌。
- (3)將小腸放入無菌瓶中，解開夾子，擠出小腸內的內容物，並加入無菌水。
- (4)使用無菌棉花棒取樣內部內容物。

2.接種與培養：

- (1)使用四區畫菌法將取樣液體接種於 MRS 培養皿上。
- (2)將培養皿置於 37°C 的恆溫培養箱中培養三天。

3.細菌純化與培養：

- (1)三天後，培養皿上出現多種細菌。
- (2)挑選菌落進行純化，並再次接種於 MRS 培養皿中進行進一步培養。

4.菌種鑑定：

- (1)經過多次純化後，獲得純菌株。
- (2)將純菌株送至基龍米克斯（桃園）進行菌種鑑定測試。
- (3)菌種鑑定之方法與檢測流程說明，如圖 3：



圖 3、菌種鑑定之方法與檢測流程(研究者繪製)

5.檢測流程說明：

(1)DNA 萃取：採用 taco 自動核酸萃取儀（磁珠系統）進行細菌或是真菌之 DNA 萃取與純化。

(2)Target PCR-1（細菌鑑定）：

- i. 針對細菌類鑑定，使用 16S rDNA 作為標的基因。
- ii. 由於菌種的多樣性可能影響 PCR 擴增效率，因此使用三組不同的通用引子（Universal Primer）如表 1，進行 16S rDNA 的 PCR 擴增。
- iii. 成功擴增且長度較長的產物會進行定序解碼，以鑑定細菌種類。

01	引子名稱：27F/1525R PCR 產物：1500 bp 參考文獻：Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M.,eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175
02	引子名稱：27F/1492R PCR 產物：1500 bp 參考文獻：Jiang, H.; Dong. Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. Environ. Microbiol 72(6): 3832–3845.
03	引子名稱：8F2/806R PCR 產物：802 bp 參考文獻：N Engl J Med 1992;327:293-301
04	引子名稱：fD1modF/16S1RR-B PCR 產物：568 bp 參考文獻：J Clin Microbiol 1998;36:2205-9. Arthritis Rheum 1998;41:535-43.

表 1、PCR 產物大小如上表所列(研究者繪製)

(3)Target PCR-2（真菌鑑定）：

- i. 針對真菌類鑑定，採用 NS（18S）或 ITS（18S/28S）作為標的基因。
- ii. 考量真菌種間多樣性，容易導致 PCR 擴增困難，因此也使用三組不同的通

用引子 (Universal Primer) 如表 2，進行 NS 或 ITS 的 PCR 擴增。

iii. 成功擴增且長度較長的 PCR 產物將進行定序解碼，以鑑定真菌種類。

01	引子名稱：NS1/NS6 PCR 產物：1400 bp	參考文獻：White T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, in PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, Academic Press, San Diego, 1990, pp. 315–322.
02	引子名稱：NS5/NS6 PCR 產物：310 bp	
03	引子名稱：ITS1/ITS4 PCR 產物：570/590 bp	

表 2、三組引子 PCR 產物大小如表所列(研究者繪製)

(4)PCR 反應條件與溫度設置：

i. 根據提供的反應條件，PCR 配方和溫度循環如下表 3、4：

成分	1-rxn，體積 (μL)
UltraPure 水	8.4
2.5mM dNTP	3.2
10X Reaction Buffer	2
25mM MgCl ₂	1.2
100% DMSO	1
SuperTherm Taq Polymerase (1U/μL)	0.2
2μM F+R 引子	2
DNA 模板	2
總體積	20

表 3、PCR 反應配方(研究者繪製)

步驟	溫度 (°C)	時間	次數
初始變性	95	5 分鐘	1 次
變性	95	30 秒	40-Cycles
引子黏合	60	30 秒	
延伸	72	30 秒	
最後延伸	72	7 分鐘	1 次
Instrument：Veriti 96-Well Thermal Cycler (Veriti 多槽溫控式聚合酶連鎖反應器)			
Serial Number：#299025707			

表 4、PCR 條件與反應溫度(研究者繪製)

(5)將擴增成功且長度較長的 PCR 產物進行定序解碼，核酸序列經 NCBI Blast 比對資料庫得出最相似之菌株結果。

(6)進一步繪出演化樹（Phylogenetic tree）觀察樣本菌株與其他菌株之親緣性。

三、實驗三（橡實果實的化學組成研究）

（一）方法：



圖 4、橡實果實的化學組成研究方法(研究者繪製)

四、實驗四（橡實油脂的萃取與發酵）

（一）方法：

- 1.準備橡實：取 400 克橡實，剝去外殼後取出果實。
- 2.研磨：使用小型粉碎機將橡實果實研磨成粉末。
- 3.分次萃取：將粉末分為兩份，每份約 200 克，分別浸泡在正己烷中萃取其油脂。
- 4.過濾流程：每三天過濾一次，共進行三次萃取，如圖 5 至圖 8。
 - (1)使用陶瓷漏斗與濾紙，過濾溶解油脂的正己烷溶液，收集於錐形瓶中，並使用水流抽氣機加快過濾過程。
 - (2)經減壓濃縮機處理後，使用乾式真空泵將正己烷抽乾，獲得約 20 克粗萃的油狀物。
- 5.分裝萃取物：將萃取出油狀物分裝至兩個小瓶中，每瓶約 5 克。
- 6.發酵實驗：
 - (1)取其中一瓶橡實萃取物，加入實驗二中鑑定的 *Floricoccus tropicus* 腸道菌。
 - (2)使用磁力攪拌器進行攪拌，加速發酵反應，持續 5 天，反應溫度保持在 37°C。

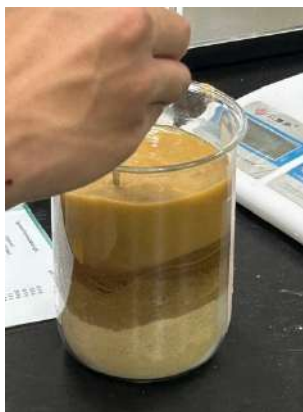


圖 5、磨碎後加入正己烷(研究者拍攝)



圖 6、第一次過濾濃縮(研究者拍攝)

	
圖 7、第二次過濾濃縮(研究者拍攝)	圖 8、第三次過濾濃縮(研究者拍攝)

五、實驗五（脂肪酸成分的檢測與分析）

（一）方法：

1.樣品準備與檢測方法：

(1)根據衛福部公告的《食品中脂肪酸之檢驗方法》（102 年 11 月 28 日部授食字第 1021950978 號公告訂定），針對未發酵及經 *Floricoccus tropicus* 發酵的橡實油脂進行脂肪酸成分鑑定，檢測其各脂肪酸、反式脂肪酸、飽和脂肪酸、順式單元不飽和脂肪酸及順式多元不飽和脂肪酸。

2.皂化與酯化：

(1)皂化：

- i. 取 1 毫升樣品於褐色瓶中，加入 1 毫升 1N 氫氧化鈉甲醇溶液。
- ii. 充入氮氣後，旋渦混合 30 秒，並加熱至 80℃ 進行皂化 15 分鐘，冷卻後備用。

(2)酯化：

- i. 加入 1 毫升 14%三氟化硼甲醇溶液，充入氮氣，旋渦混合 30 秒，加熱至 110℃ 進行酯化 15 分鐘。
- ii. 冷卻後加入 1 毫升正己烷，旋渦混合 1 分鐘，再加入 6 毫升飽和氯化鈉溶液，輕輕振搖，靜置分層，取上層溶液，並加入少量無水硫酸鈉過濾備用。

3.脂肪酸鑑別及含量測定：

(1)氣相層析鑑別：

- i. 取 1 μL 檢液與 1 μL 標準溶液，注入氣相層析儀。依據檢液和標準溶液的波峰滯留時間進行脂肪酸成分的鑑別。

(2)脂肪酸含量計算：

- i. 檢體中各脂肪酸甲基酯之含量：
$$W_{\text{FAME}_x}(\text{g}) = \frac{A_x \times R_x \times W_{\text{is}} \times 1.004}{A_{\text{is}}}$$
 - A_x ：各脂肪酸甲基酯的波峰面積
 - R_x ：各脂肪酸甲基酯與內部標準品甲基酯於火焰離子檢出器之相對反應係數
 - W_{is} ：內部標準品的添加量(g)
 - A_{is} ：內部標準品的波峰面積
 - 1.004：內部標準品轉換為甲基酯之係數
- ii. 檢體中各脂肪酸之含量： $W_x(\text{g}) = W_{\text{FAME}_x} \times F_{\text{Fax}}$
 - W_{FAME_x} ：檢體中各脂肪酸甲基酯之含量(g)
 - F_{Fax} ：脂肪酸甲基酯轉換為脂肪酸的係數

4.脂肪酸種類的含量計算：

(1)反式脂肪酸含量：

- i. 檢體中反式脂肪酸含量(%) = $\frac{\Sigma W_{\text{FEAx}} \times 100}{W}$
 - ΣW_{FEAx} ：各反式脂肪酸含量總和(g)
 - W ：取樣分析檢體重量(g)

(2)飽和脂肪酸含量：

- i. 檢體中飽和脂肪酸含量 (%) = $\frac{\Sigma W_{\text{SAFAx}} \times 100}{W}$
 - ΣW_{SAFAx} ：各飽和脂肪酸含量總和(g)

(3)順式單元不飽和脂肪酸含量：

i. 檢體中順式單元不飽和脂肪酸含量(%) = $\frac{\Sigma W_{SUFAX} \times 100}{W}$

◦ ΣW_{SUFAX} ：各順式單元不飽和脂肪酸含量總和(g)

(4)順式多元不飽和脂肪酸含量：

i. 檢體中順式多元不飽和脂肪酸含量(%) = $\frac{\Sigma W_{PUFAX} \times 100}{W}$

◦ ΣW_{PUFAX} ：各順式多元不飽和脂肪酸含量總和(g)

5.氣相層析儀條件：

參數	設定值
層析管初始溫度	170°C，持續 40 分鐘
升溫速率	3°C/分鐘
終溫	200°C，持續 50 分鐘
檢出器溫度	300°C
注入器溫度	250°C
移動相	氦氣，流速 0.75 mL/min
分流比	40:1

表 5、氣相層析儀條件(研究者繪製)

六、實驗六（大腸桿菌抑制效果測試）

（一）方法：

1. 抑菌試驗：

(1) 取 300 μ L 大腸桿菌液，加入含有 NB 培養基的培養皿中，使用玻璃棒均勻塗抹在培養皿表面。

(2) 使用無菌紙錠進行抑菌試驗：

i. 分別取未發酵及經 *Floricoccus tropicus* 發酵的橡實油脂，配置成 50 mg/mL 的正己烷溶液。

ii. 將無菌紙錠放入已塗有大腸桿菌的培養皿中。

iii. 取 20 μ L 溶液置於無菌紙錠上。

(3) 將培養皿置於 37°C 培養箱中培養 24 小時，觀察抑菌圈的形成，以此判斷橡實油脂對大腸桿菌的抑制效果。

2. 最小抑菌濃度（MICs）試驗：

(1) 若在抑菌試驗中觀察到抑菌圈，則進行最小抑菌濃度（MICs）試驗。

(2) 配制 50 mg/mL 的橡實油脂正己烷溶液，進行減半序列稀釋（稀釋濃度分別為 25、12.5、6.25、3.125 mg/mL）。

(3) 取各稀釋濃度的橡實油脂正己烷溶液 20 μ L，置於大腸桿菌培養皿中的無菌紙錠上。

(4) 將培養皿置於 37°C 培養 24 小時，觀察各濃度的抑菌圈，產生抑菌圈的最小濃度即為該油脂的最小抑菌濃度（MICs）。

七、實驗七（探討發酵前後的橡實油脂在 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞中的抗發炎效果）

（一）方法：

1.巨噬細胞發炎誘導及存活率測試：

(1)培養 RAW264.7 巨噬細胞。

(2)LPS 誘導發炎反應：

i. 添加 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的脂多醣（LPS），誘導巨噬細胞產生發炎反應。

(3)添加橡實油脂樣品：

i. 各取未發酵橡實油脂（FY-1）與發酵後橡實油脂（FY-2） $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 添加至巨噬細胞。

(4)細胞存活率測試：

i. 觀察並測試 RAW264.7 巨噬細胞在不同處理條件下的存活率，評估橡實油脂對細胞存活的影响。

2.抑制 NO 產生的效果測試：

(1)NO 產生誘導：

i. 通過 LPS 誘導 RAW264.7 巨噬細胞釋放發炎前驅物質一氧化氮（NO）。

(2)橡實油脂樣品對 NO 的抑制效果測試：

i. 評估未發酵（FY-1）和發酵後（FY-2）的橡實油脂是否能減少 NO 的產生，進而判斷其抗炎效果。

3.抑制 TNF- α 產生的效果測試：

(1)TNF- α (腫瘤壞死因子- α)產生誘導：

i. 使用 LPS 誘導 RAW264.7 巨噬細胞釋放發炎前驅物質 TNF- α 。

(2)橡實油脂樣品對 TNF- α 的抑制效果測試：

i. 評估未發酵（FY-1）和發酵後（FY-2）的橡實油脂是否能有效減少 TNF- α 的釋放，以進一步確認其抗炎效果。

肆、研究結果與討論

一、實驗一（飛鼠胃部食物殘留的成分檢測）

（一）結果：

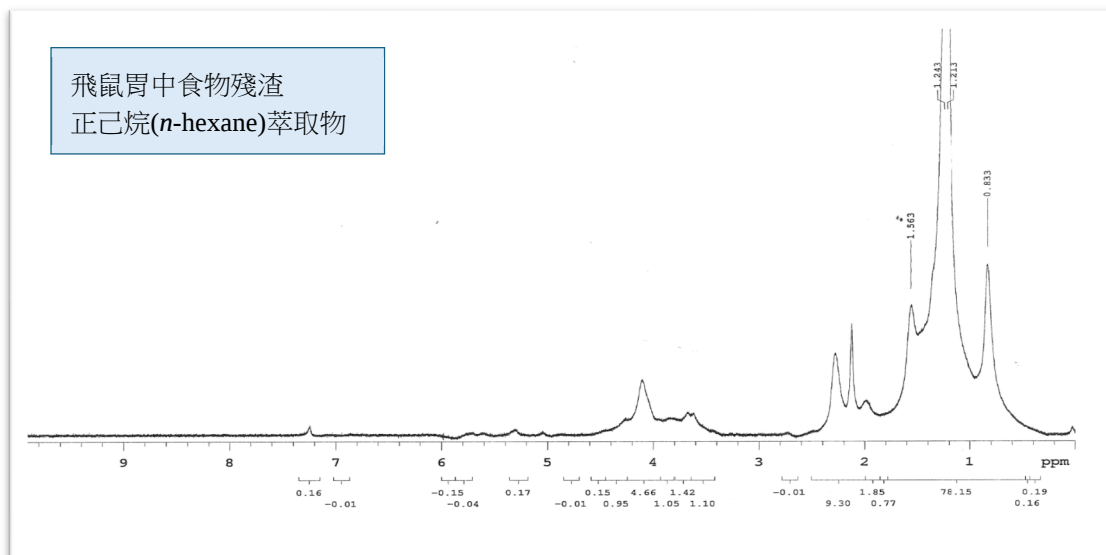


圖 9、飛鼠胃中食物殘渣正己烷(*n*-hexane)萃取物之氫圖譜(研究者繪製)

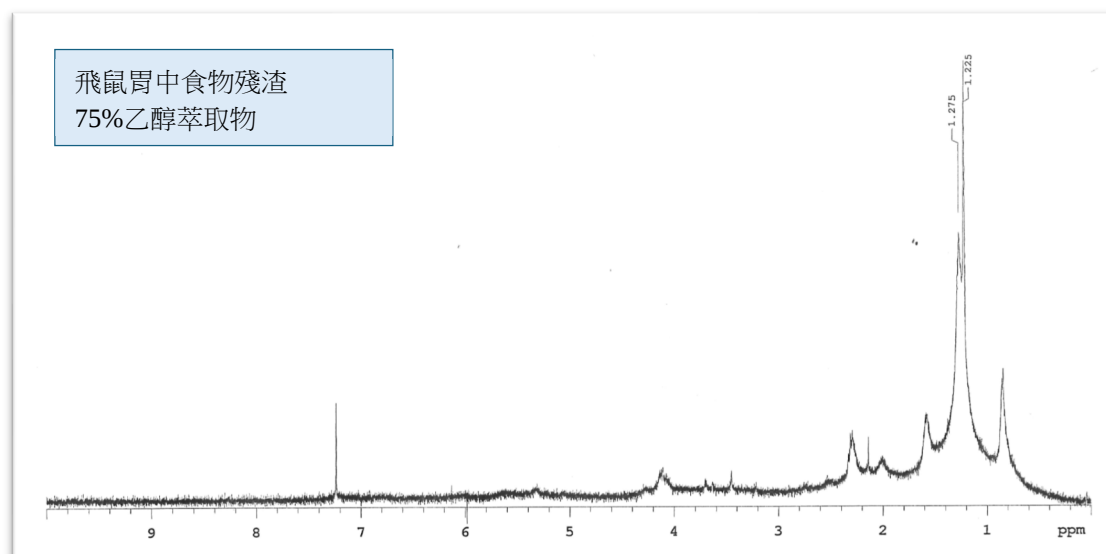


圖 10、飛鼠胃中食物殘渣 75%乙醇(EtOH)萃取物之氫圖譜(研究者繪製)

（二）討論：

1. 透過核磁共振（NMR）檢測正己烷和 75%乙醇萃取物的氫圖譜，由圖 9 的氫譜中可以看到在 1.2 ppm 處有較大的訊號，推測這是脂肪酸結構中長鏈脂肪族上氫的訊號。因此，正己烷萃取飛鼠胃中食物殘渣的主要成分可能為脂肪酸類化合物。

2. 圖 10 的氫圖譜中雖未見到明顯的特殊訊號，但在 1.2 ppm 處仍有較微弱的訊號，這同樣可能來自於脂肪酸結構中的長鏈脂肪族上的氫的訊號。因此，75%乙醇萃取的飛鼠胃殘渣內含物，主要成分也可能為脂肪酸類化合物。
3. 比較正己烷與 75%乙醇萃取物的氫圖譜可以發現，正己烷作為低極性溶劑，能夠有效萃取胃殘渣中的脂肪酸。而 75%乙醇則為中高極性溶劑，可以萃取出極性較高的成分，但氫圖譜並未顯示較中高級極性之成分的明顯訊號，仍然顯示出少量脂肪酸的訊號。由此推測，飛鼠胃殘渣中的主要成分可能來自富含油脂的堅果類食物，其內含物以脂肪酸類化合物為主。

二、實驗二（飛鼠腸道菌的純化與鑑定）

（一）結果：

1. 核酸定序結果：

```
CGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGAG
AAGCTTTAAGAGATTAGCTTGCCGTCACCGGCTTGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAG
CACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC
GGTTTATTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGG
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATG
CACCACCTGTATCGAGTGTCCCGAAGGAAGTTTCTATCTCTAGGAATAGCACTCGTATGT
CAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTTG
CGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTAATCCCCAGGCGGAGTGC
TTAATGCGTTAGCTGCGACACTCAGGGGTGGATACCCCCGAACATCTAGCACTCATCGTT
TACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTTCGAGCCTCAGC
GTCAATTACAGTCCAGAGAGCCGCTTTTCGCCACCGGTGTTTCTCCATATATCTACGCATT
TCACCGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTACTGCATTCAAGTTCACCAGTTTCCAATG
CTTACAATGGTTGAGCCACTGCCTTTTACATCAGACTTAATGAACCGCCTGCGCTCGCTTT
ACGCCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
GTTAGCCGTGGCTTTTCTGGTAAGATACCGTCAGCCAGTGAAGTTTCCACTCTCACTGGTG
TTCTTCTCTTACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTC
GGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC
CGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGTATCGTTGCCTTG
GTGAGCCTTTACCTACCAACTAGCTAATACAACGCGGGTCCATCCTATAGTGTACCAGT
TGGCACTTTCAACTTTAGAACATGTGTTTCTAAGTTTTATGCGGTATTAGCTGTCGTTTCC
AACAGTTATCCCCCTCTATAGGGCAGGTTACCCACGCGTTACTACCCGTTTCGCTACTCA
TTGTTTCAGTGCAAGCACCGAACTCTGCGTTCAACTTGCATG
```

(1)序列比對須考量 5 種參數，如下所述：

- i. Max Score：the highest alignment score from that database sequence
- ii. Total Score：the total alignment scores from all alignment segments
- iii. Query Cover：query covered by alignment to the database sequence
- iv. E value：the best (lowest) Expect value of all alignments from that database sequence
- v. Ident：the highest percent identity (Max ident of all query-subject alignments)

(2)Max Score 和 Total Score 數值皆表示兩序列的同源性，數值越高表示他們之間相似的程度越大。

(3)E value 數值就是用來評估 Max Score 和 Total Score 數值的可靠性。

它代表在隨機的情況下，其它序列與目標序列相似度要大於 Max Score 和

Total Score 數值的可能性。所以 E value 數值越低代表可信度越高。

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Floricoccus tropicus strain DF1 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	2152	2152	96%	0.0	97.39%	NR 159226.1
<i>Floricoccus penangensis strain HibF3 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	2141	2141	96%	0.0	97.23%	NR 159225.1
<i>Lactococcus plantarum strain DSM 20686 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	1919	1919	100%	0.0	93.22%	NR 044358.1
<i>Lactococcus paracarnosus strain TMW 2.1615 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	1892	1892	100%	0.0	92.84%	NR 174341.1
<i>Lactococcus carnosus strain TMW 2.1612 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	1892	1892	100%	0.0	92.84%	NR 174340.1
<i>Lactococcus chungangensis CAU 28 = DSM 22330 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	1890	1890	96%	0.0	93.69%	NR 044357.1
<i>Lactococcus laudensis strain DSM 28961 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	1884	1884	96%	0.0	93.62%	NR 136466.1
<i>Lactococcus piscium strain CCUG 32732 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	1882	1882	96%	0.0	93.61%	NR 043739.1
<i>Lactococcus raffinolactis strain NBRC 100932 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	1871	1871	100%	0.0	92.53%	NR 113959.1
<i>Lactococcus raffinolactis strain DSM 20443 16S ribosomal RNA, partial sequence</i>	1871	1871	98%	0.0	93.11%	NR 044359.1

表6、E value 數值(研究者繪製)

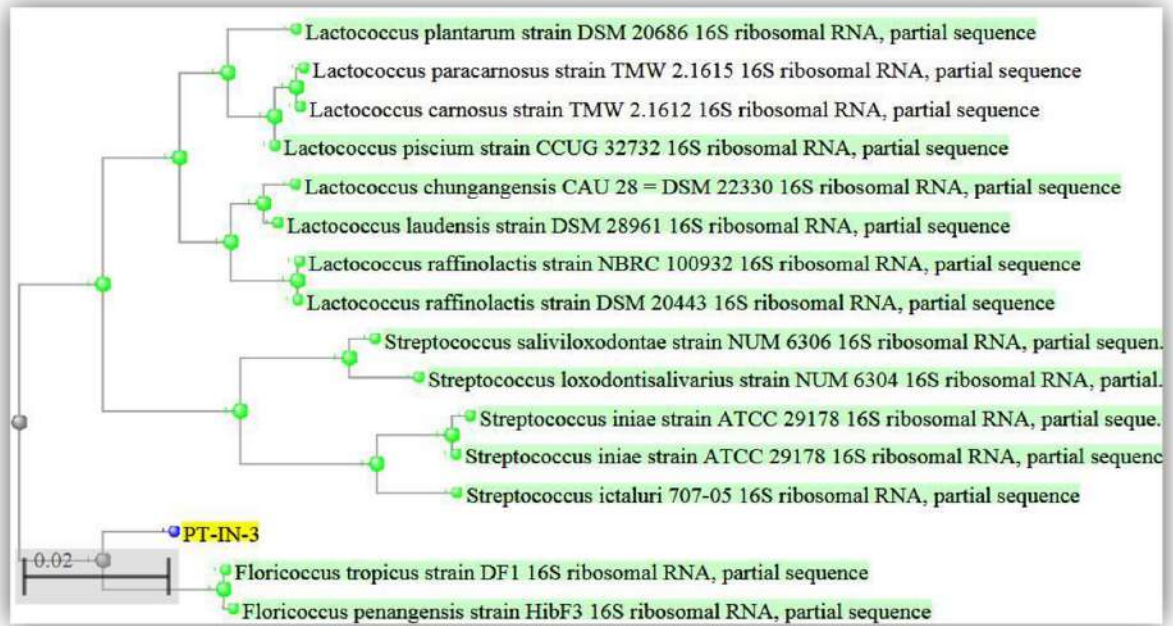


圖 11、演化樹 Phylogram Tree(研究者繪製)

(二) 討論：

1. 透過 NCBI Blast 比對結果確認，送檢的飛鼠腸道菌為 *Floricoccus tropicus* strain DF1 16S ribosomal RNA 的部分序列 (Sequence ID: NR_159226.1)。
2. 由於目前並無關於大赤鼯鼠腸道菌相的相關文獻，本研究首次發現大赤鼯鼠腸道內含有此乳酸菌 *Floricoccus tropicus*。根據文獻[三]，*Floricoccus tropicus* 是從馬來西亞檳城一個果園中榴槿樹 (*Durio zibethinus*) 的新鮮花朵中分離出來的乳酸菌。(*Floricoccus tropicus* gen. nov., sp. nov. 及 *Floricoccus penangensis* sp. nov.)，文獻中還發現了另一種從木槿花 (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) 中分離出的乳酸菌 *Floricoccus penangensis*，這兩種菌一起被鑑定為一個新屬，名為 *Floricoccus*。

三、實驗三（橡實果實的化學組成研究）

（一）結果：

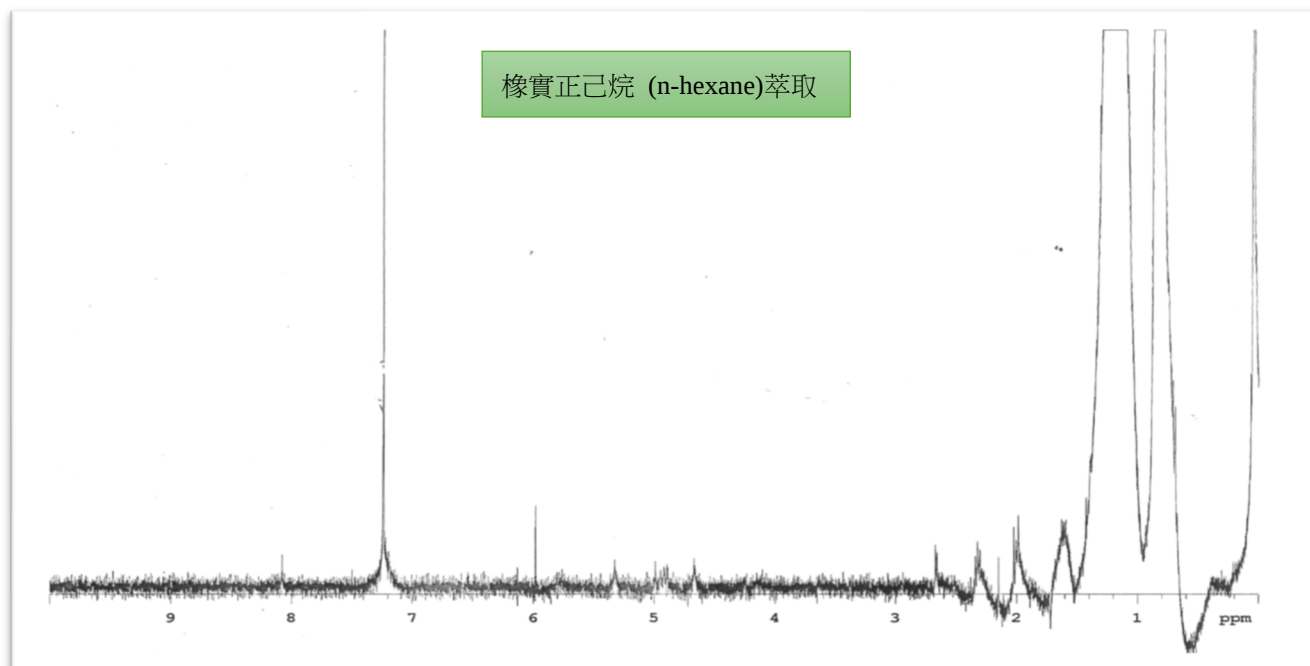


圖 12、橡實正己烷 (*n*-hexane)萃取物之氫圖(研究者繪製)

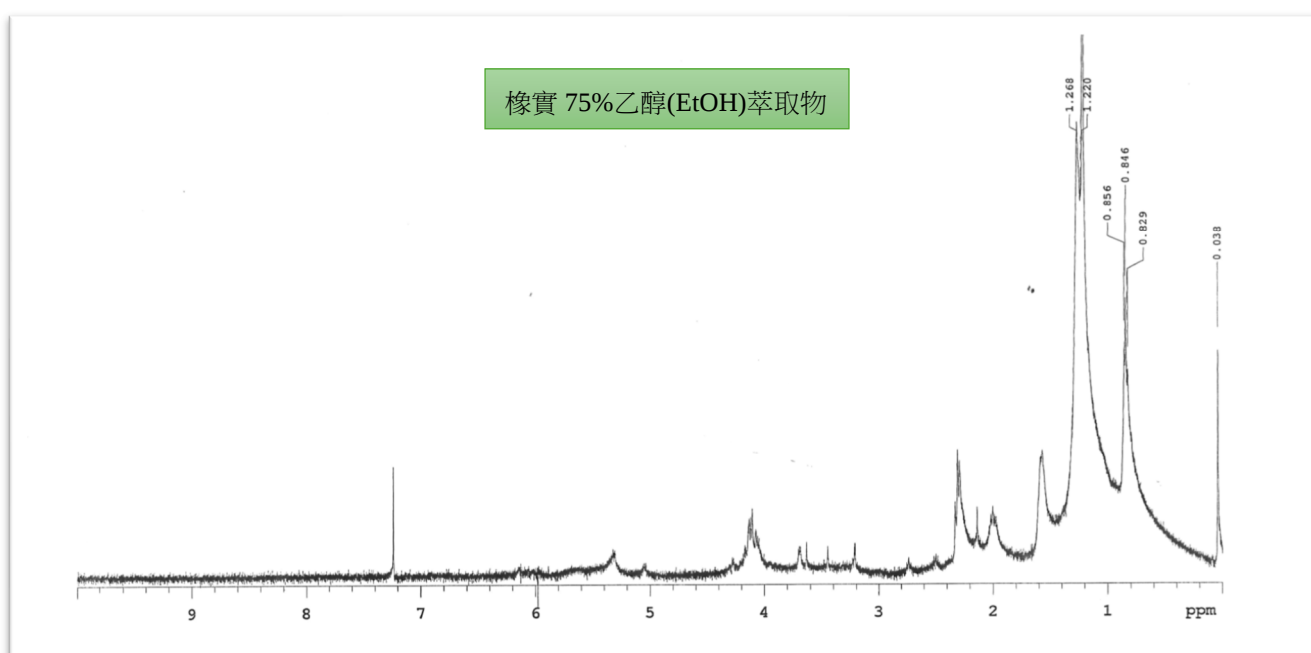


圖 13、橡實 75%乙醇(EtOH)萃取物之氫圖(研究者繪製)

（二）討論：

1. 本實驗主要探討橡實果實的內含成分，分別利用正己烷（*n*-hexane，低極性）和 75%乙醇（EtOH，中高極性）兩種有機溶劑進行萃取，經由核磁共振（NMR）氫圖譜來分析成分。
2. 從圖 12 的氫圖譜中，在 1.2 ppm 處觀察到較大的訊號，推測為脂肪酸結構長鏈脂肪族上氫的訊號，因此推斷，利用正己烷可萃取出橡實果實中大量脂肪酸類成分。
3. 在圖 13 的氫圖譜中，雖然未見到明顯的特殊訊號，但在 1.2 ppm 處有較小的訊號，這也被推測為脂肪酸結構中長鏈脂肪族上氫的訊號，表示利用 75%乙醇可萃取出橡實果實少量脂肪酸類成分。
4. 同樣比較正己烷與 75%乙醇萃取物的氫圖譜，發現正己烷作為低極性溶劑，能有效萃取出橡實中的脂肪酸類成分；而 75%乙醇作為中高極性溶劑，理應萃取出極性較高的成分，但實際上，氫圖譜中未顯示此類成分的訊號，反而發現少量脂肪酸類訊號。因此，推測橡實的成分主要為脂肪酸類化合物。
5. 對比實驗一（分析飛鼠胃中食物殘渣成分）與實驗三（分析橡實果實成分）的結果，從圖 9（飛鼠胃中食物殘渣正己烷(*n*-hexane)萃取物之氫圖譜）與圖 12（橡實正己烷 (*n*-hexane)萃取物之氫圖）、圖 10（飛鼠胃中食物殘渣 75%乙醇(EtOH)萃取物之氫圖譜）與圖 13（橡實 75%乙醇(EtOH)萃取物之氫圖）的比較，可推測飛鼠胃中食物殘渣的成分與橡實成分極為相似，兩者皆主要成分皆為脂肪酸。此外，飛鼠胃中的殘渣物和橡實果實磨碎後的樣態極為相似，由此推測，所採集的飛鼠極有可能以橡實為主食。

四、實驗四（橡實油脂的萃取與發酵）

（一）結果：



圖 14、左瓶為未發酵之橡實油脂，
右瓶為經 *Floricoccus tropicus* 發酵後之橡實油脂。

(研究者拍攝)

（二）討論：

1. 根據實驗一與實驗三的結果，可以初步推測飛鼠的主要食物可能為橡實，並發現橡實內含豐富的脂肪酸。因此，將青剛櫟油脂中加入飛鼠腸道菌 *Floricoccus tropicus*，以模擬飛鼠食用橡實後經腸道菌發酵所產生之食糜，並在後續實驗中比較經 *Floricoccus tropicus* 發酵前後橡實脂肪酸的組成，用以推測 *Floricoccus tropicus* 在飛鼠腸道中，對橡實脂肪酸轉化與代謝的作用，為飛鼠的飲食習性及其腸道菌的功能做後續討論。

五、實驗五（脂肪酸成分的檢測與分析）

（一）結果：

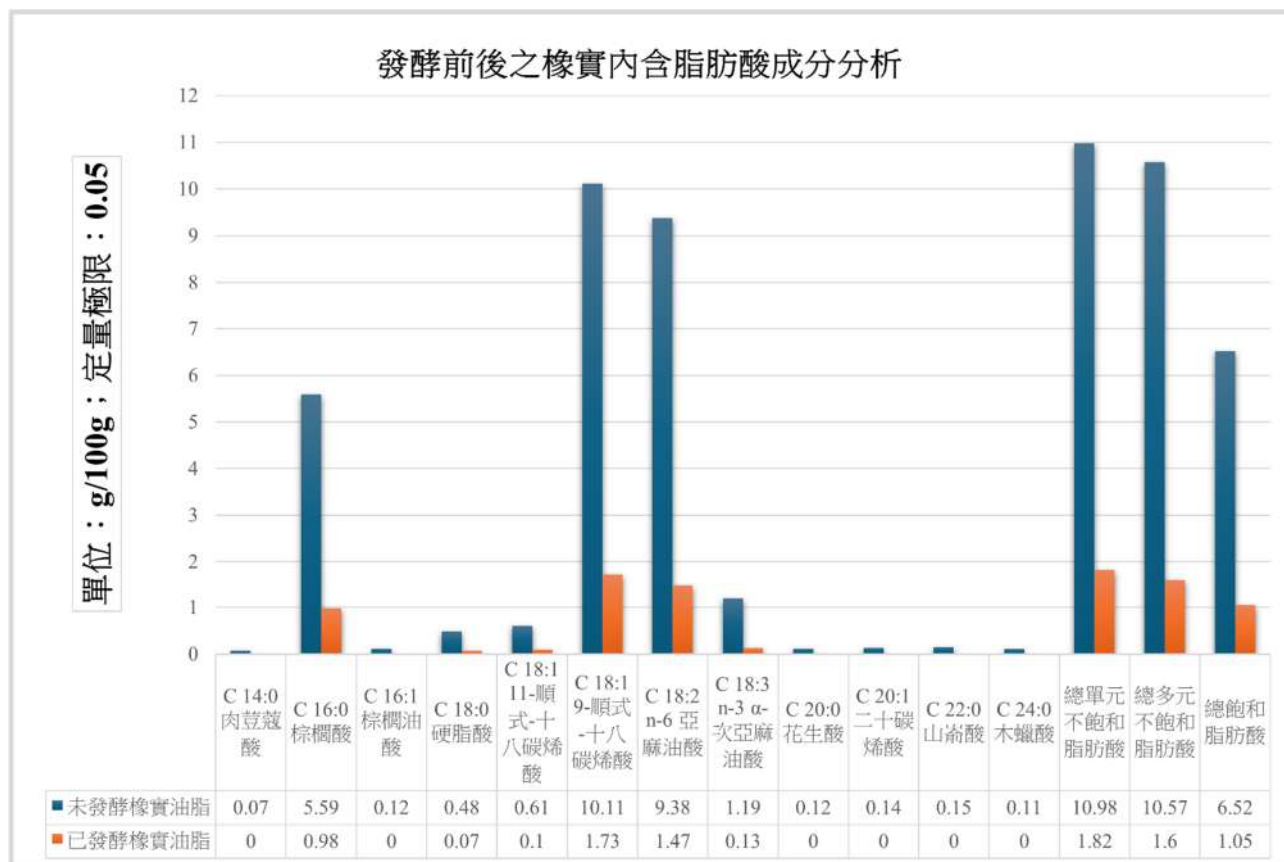


圖 15、發酵前後橡實脂肪酸成分分析比較圖(研究者繪製)

（二）討論：

- 比較未發酵和經腸道菌 *Floricoccus tropicus* 發酵的橡實油脂脂肪酸成分，可以觀察到幾種關鍵不飽和脂肪酸：(1)C 18:1 11-順式-十八碳烯酸 (2)C 18:1 9-順式-十八碳烯酸 (3)C 18:2 n-6 亞麻油酸 (4) C 18:3 n-3 α-次亞麻油酸，在發酵前後含量有明顯的下降。此外，總單元不飽和脂肪酸和總多元不飽和脂肪酸的含量也大幅下降。推測橡實油脂經過腸道菌 *Floricoccus tropicus* 發酵後，大量不飽和脂肪酸被代謝轉化為短鏈脂肪酸（Short-chain Fatty Acids, SCFAs）。
- 短鏈脂肪酸是由少於六個碳原子組成的有機酸，主要包括幾種常見的 SCFAs，有乙酸（C2）、丙酸（C3）、丁酸（C4），可能是腸道中的 *Floricoccus tropicus* 將不飽和脂肪酸發酵代謝轉化為 SCFAs，而短鏈脂肪酸

具有抗發炎作用、腸道免疫調節以及腸道屏障強化等功能，這些都待進一步測試研究。

六、實驗六（大腸桿菌抑制效果測試）

（一）結果：

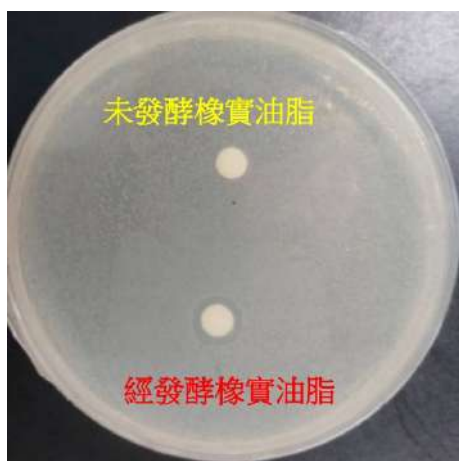


圖 16、
上：未發酵橡實油脂；
下：經發酵後之橡實油脂
抑制大腸桿菌之情形
(研究者拍攝)

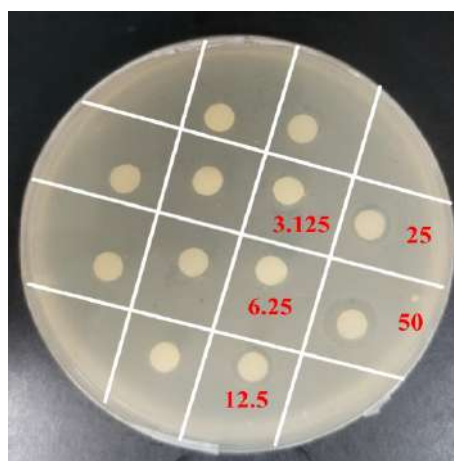


圖 17、
經發酵後之橡實油脂等倍稀釋濃
度之抑制大腸桿菌情形
(單位：mg/mL)
(研究者拍攝)

（二）討論：

1. 由圖 16 顯示，在抑菌實驗中，上方紙錠添加了未發酵的橡實油脂（50 mg/1 mL 正己烷，20 μ L），而下方紙錠則添加了同樣濃度經腸道菌 *Floricoccus tropicus* 發酵後之橡實油脂。經過 24 小時培養，結果顯示下方紙錠在大腸桿菌周圍出現了抑菌圈（直徑 7 mm），而上方未發酵的橡實油脂並未顯示出任何抑菌效果。這說明，經發酵後的橡實油脂在 50 mg/1 mL 濃度下對大腸桿菌具有抑制作用。
2. 最小抑菌濃度（MICs）試驗中，使用經發酵後的橡實油脂（50 mg/1 mL，抑圈直徑為 8 mm），並來測試稀釋不同濃度下的抑菌效果。
經稀釋後，測試結果整理如表 7：

濃度(mg/ml)	50	25	12.5	6.25	3.125
紙錠加抑菌圈 之直徑(mm)	8	6	5.5	4 (無明顯抑菌圈)	

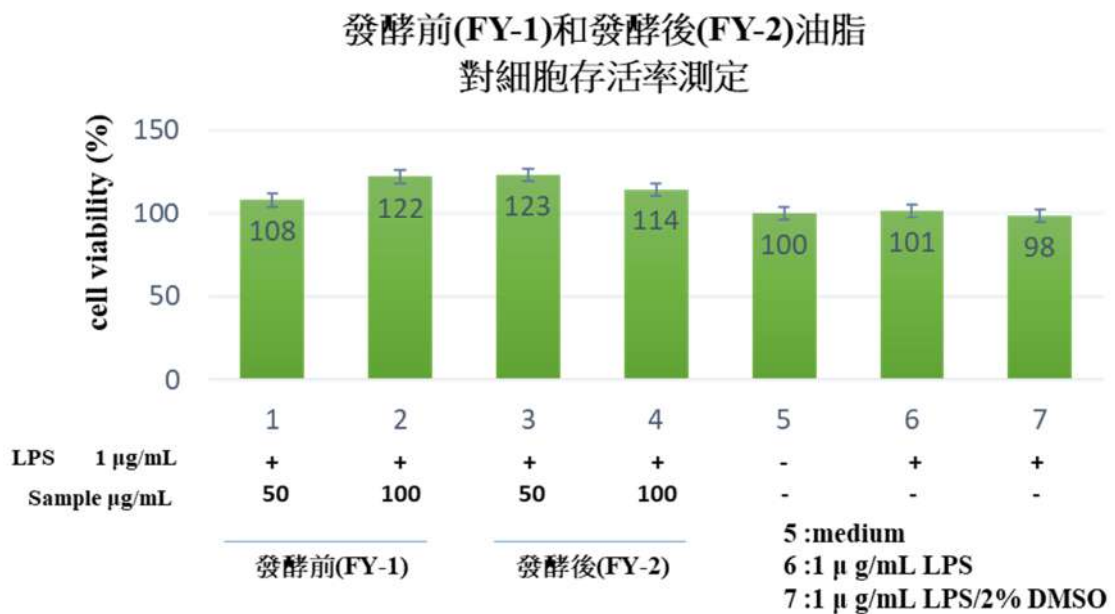
表 7、稀釋不同濃度下的抑菌效果(研究者繪製)

3. 根據實驗結果，**12.5 mg/mL** 的濃度為最小有效抑菌濃度 (MICs)，該濃度仍能產生明顯的抑菌效果 (抑菌圈直徑 5.5 mm)，也進一步說明發酵過程增強了橡實油脂的抗菌活性。

實驗七 (探討發酵前後的橡實油脂在 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞中的抗發炎效果)

à 發酵前後兩種樣品(FY-1、FY-2)對於 RAW264.7 巨噬細胞存活率的影響：

(一) 結果：



Effects of (FY-1)&(FY-2) on cell viability in RAW 264.7 cells

圖 18、發酵前(FY-1)和發酵後(FY-2)油脂對細胞存活率測定(研究者繪製)

(二) 討論：

圖 18 顯示，未發酵樣品 (FY-1) 和發酵樣品 (FY-2) 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度下，對 LPS 誘導的 RAW 264.7 細胞存活率皆在 108%到 123%之間。這顯示這兩種樣品在該濃度下不會對細胞造成毒性，亦不會影響 RAW 264.7 巨噬細胞株之存活率，反而有些微促進細胞生長的效果。後續實驗選擇 50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 為標準濃度。

à 發酵前後兩種樣品(FY-1、FY-2)抑制 LPS 所誘發的 NO 生成量：

(一) 結果：

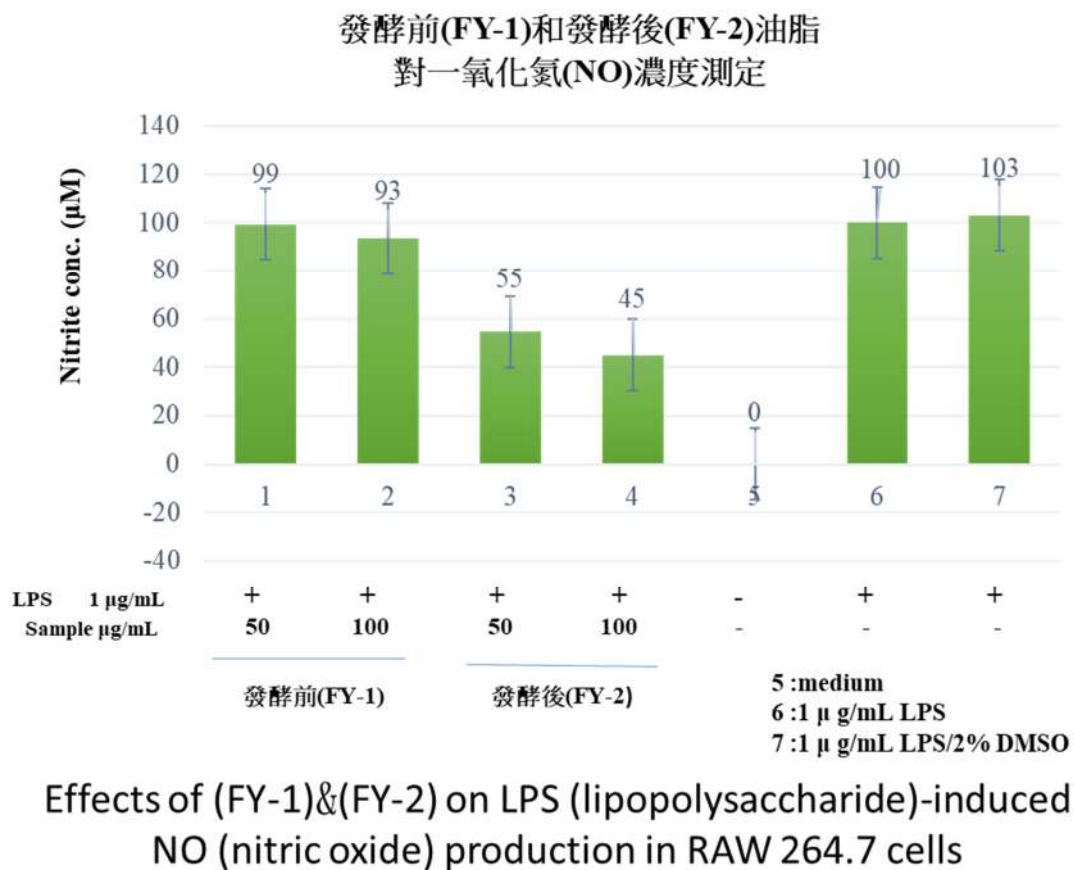


圖 19、發酵前(FY-1)和發酵後(FY-2)油脂對一氧化氮(NO)濃度測定(研究者繪製)

(二) 討論：

本實驗利用 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞發炎，細胞釋放一氧化氮

(NO) 作為炎症標誌物，測試發酵前 (FY-1) 及發酵後 (FY-2) 橡實油脂對

NO 生成的抑制能力。根據圖 19 結果列表 8：

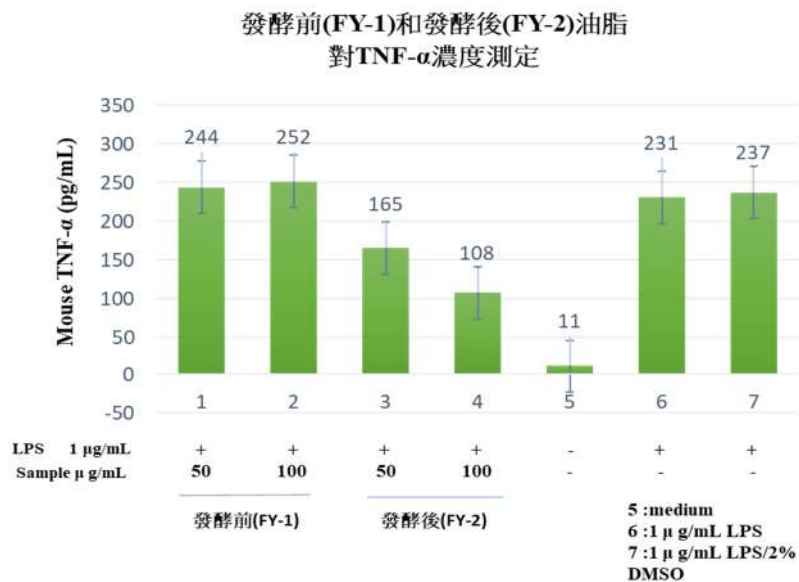
實驗組別	添加物質	NO 生成量 (μM)	抑制率 (%)
控制組(6)	1 $\mu\text{g/mL}$ LPS	100	0
實驗組(1)	1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 50 $\mu\text{g/mL}$ FY-1	99	1
實驗組(2)	1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 100 $\mu\text{g/mL}$ FY-1	93	7
實驗組(3)	1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 50 $\mu\text{g/mL}$ FY-2	55	45
實驗組(4)	1 $\mu\text{g/mL}$ LPS + 100 $\mu\text{g/mL}$ FY-2	45	55

表 8、發酵前 (FY-1) 及發酵後 (FY-2) 橡實油脂對 NO 生成的抑制能力(研究者繪製)

可見，未發酵樣品 (FY-1) 在不同濃度下對 NO 的抑制效果不明顯，抗發炎作用較弱。相較之下，發酵後的橡實油脂樣品 (FY-2) 隨著濃度增加，對 NO 的抑制效果有所提升，尤其在 100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度下具較佳的抗發炎作用。

à 發酵前後兩種樣品(FY-1、FY-2)對 RAW264.7 巨噬細胞株 TNF- α 細胞激素生成的影響：

(一) 結果：



Effects of (FY-1)&(FY-2) on LPS (lipopolysaccharide)-induced Mouse TNF- α in RAW 264.7 cells

圖 20、發酵前(FY-1)和發酵後(FY-2)油脂對 TNF- α 濃度測定(研究者繪製)

(二) 討論：

本實驗利用 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生發炎前驅物質 TNF- α ，測試評估發酵前 (FY-1) 及發酵後 (FY-2) 的橡實油脂，對 TNF- α 生成量的抑制效果。圖 20 顯示發酵前後樣品對 TNF- α 生成量的影響，整理如表 9：

實驗組別	添加物質	TNF- α 生成量 (pg/mL)	抑制率 (%)
控制組(6)	1 μ g/mL LPS	231	--
實驗組(1)	1 μ g/mL LPS + 50 μ g/mL FY-1	244	--
實驗組(2)	1 μ g/mL LPS + 100 μ g/mL FY-1	252	--
實驗組(3)	1 μ g/mL LPS + 50 μ g/mL FY-2	165	28.6
實驗組(4)	1 μ g/mL LPS + 100 μ g/mL FY-2	108	53.2

表 9、發酵前 (FY-1) 及發酵後 (FY-2) 的橡實油脂對 TNF- α 生成量的抑制效果

(研究者繪製)

由此可見，未發酵的樣品 (FY-1) 隨著濃度增加，TNF- α 生成量不減反增，表示其無法有效抑制 TNF- α 的產生。相較之下，發酵後的樣品 (FY-2) 在 50 μ g/mL 和 100 μ g/mL 濃度下顯示出更顯著的抑制效果。綜合以上結果，經過發酵後的橡實油脂 (FY-2) 隨著濃度的增加，對 TNF- α 的抑制率逐步提高，尤其在較高濃度 100 μ g/mL 下展現出較強的抗發炎效果。

伍、結論與應用

一、結論

- (一) 利用正己烷(低極性)和 75%乙醇(中高極性)萃取飛鼠胃中的食物殘渣和橡實，進行成分比對，兩者皆以脂肪酸類為主。特別是正己烷萃取物中，在 NMR 核磁共振 1.2 ppm 處觀察到長鏈脂肪族上氫的訊號，對比飛鼠胃中食物殘渣與橡實兩者成分相似，因此推測飛鼠的主要食物來源可能為橡實。
- (二) (根據 DF1 16S ribosomal RNA 比對結果發現飛鼠腸道內含有乳酸菌 *Floricoccus tropicus*，這是首次在飛鼠腸道中發現該菌的紀錄。
- (三) 研究中發現 *Floricoccus tropicus* 能夠將橡實中的不飽和脂肪酸代謝轉化為短鏈脂肪酸 (SCFAs)。而 SCFAs 具有抗發炎、免疫調節及強化腸道屏障的功能，確認在經過發酵的作用後，橡實本身結構的轉換及其功能性之增加。
- (四) 抑菌實驗發現，發酵後的橡實油脂能顯著抑制大腸桿菌的生長，最小抑菌濃度 (MICs) 為 12.5 mg/mL，也確認發酵後橡實油脂的抗菌活性。
- (五) 經測試比較發酵前後之橡食油脂的抗發炎效果，得知經乳酸菌 *Floricoccus tropicus* 發酵後的橡實油脂，在 100 µg/mL 濃度下，對 NO 的抑制率最高達 55%，對 TNF- α 的抑制率最高達 53.2%，顯示經 *Floricoccus tropicus* 發酵後的橡實油脂具更加的抗發炎潛力。

二、應用

- (一) 保護與尊重傳統醫學知識和文化療法：

在部分原住民族中，生食飛鼠腸被認為能夠治療腸胃不適，這反映了當地的傳統醫學知識和文化療法的重要性。飛鼠腸作為飲食文化的一部分，不僅展示了原住民族的傳統生活方式，還體現了族人的價值觀。保護與尊重這些文化傳統，有助於實現良好健康與社會福利 (SDG 3) 永續城市和社區 (SDG 11)。

- (二) 保護物種和生態系統：

台灣的飛鼠多樣性顯著，分布於不同海拔範圍。原住民族通常捕獲的大赤鼯鼠不屬於保育類，而白面鼯鼠則受到保護。食用飛鼠腸涉及對當地生物多樣性的

利用，強調了保護物種和生態系統的重要性，以避免過度捕獵和環境破壞，這是維持良好陸域生態（SDG 15）的關鍵。

(三) 開發功能性食品：

飛鼠腸的治療效果可能與其營養價值及安全性有關。確保飛鼠腸符合食品安全標準且富含營養，有助於保障健康生活（SDG 3）。而本研究首次發現了飛鼠腸道內含有 *Floricoccus tropicus*。未來可以進一步研究飛鼠的腸道菌群，並探討不同菌群在飛鼠消化橡實和其他食物過程中的功能，這將有助於更全面地理解飛鼠的飲食習性及其與腸道菌群的共生關係。而研究顯示經 *Floricoccus tropicus* 發酵後的橡實油脂，在抗發炎和抗菌方面具顯著效果。未來可以將此發現應用於功能性食品的開發，尤其是在促進腸道健康、抗發炎及提升免疫力方面，實踐良好健康與社會福利（SDG 3）。

陸、參考文獻

- [1] Carey, H. V., & K. N. Duddleston. (2014). Animal-microbial symbioses in changing environments. *J Therm Biol*, 44, 78-84.
- [2] Bailey, M. T., J. C. Walton, S. E. Dowd, Z. M. Weil, & R. J. Nelson. (2010). Photoperiod modulates gut bacteria composition in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Brain Behav Immun*, 24(4), 577-584.
- [3] Li-Oon Chuah, Kien-Pong Yap, Ahamed Kamal Shamila-Syuhada, Kwai Lin Thong, Rosma Ahmad, Min Tze Liong and Gulam Rusul. (2017). *Floricoccus tropicus* gen. nov., sp. nov. and *Floricoccus penangensis* sp. nov. isolated from fresh flowers of durian tree and hibiscus, Chuah et al., *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67:4979–4985.
- [4] Wong, J. M., De Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., & Jenkins, D. J. (2006). Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), 235-243.
<https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>
- [5] Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., De los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- [6] Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D., & Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325-2340.
<https://doi.org/10.1194/jlr.r036012>

【評語】 080003

本研究主要在探討飛鼠胃中食物殘渣成分及其腸道菌的代謝作用。從飛鼠腸道內分離純化鑑定出一乳酸菌 *Floricoccus tropicus*，並發現此乳酸菌轉化橡實不飽和脂肪酸成具抗發炎作用的短鏈脂肪酸。發酵後的橡實油脂對大腸桿菌具有抑制效果。此外，抗發炎測試也顯示出發酵後的橡實油脂樣品能顯著地抑制 LPS 誘導的 RAW 264.7 細胞中 NO 與 $\text{TNF-}\alpha$ 的生成，尤其隨著濃度的增加抑制效果也增加。

優點：

1. 研究主題為飛鼠具有新穎性及台灣特色。飛鼠不僅是部落常見的獵物，更是重要的食材之一。族人取出飛鼠小腸簡單沾鹽生食，或是將其醃製作為健胃補品，甚至用來治療胃痛。
2. 由於目前並無關於大赤鼯鼠腸道菌相的相關文獻，本研究首次發現大赤鼯鼠腸道內含有此乳酸菌 *Floricoccus tropicus*。
3. 本研究發現的乳酸菌 *Floricoccus tropicus*，對橡實脂肪酸發酵代謝之後，具有抑制大腸桿菌及抗發炎的效果。

建議：

1. 核磁共振 (NMR) 檢測正己烷和 75%乙醇萃取物的氫圖譜，可以看到在 1.2 ppm 處有較大的訊號，推測這是脂肪酸結構中長鏈脂肪

族上氫的訊號，可能需要純化後利用各種檢測工具配合標準品才能更確定是中長鏈脂肪。

2. 利用 LPS 誘導 RAW 264.7 巨噬細胞產生發炎前驅物質 $\text{TNF-}\alpha$ ，測試評估發酵前 (FY-1) 及發酵後 (FY-2) 的橡實油脂，對 $\text{TNF-}\alpha$ 生成量的抑制效果的實驗，只用二個濃度，要用四個濃度較能確定。
3. 研究中發現 *Floricoccus tropicus* 能夠將橡實中的不飽和脂肪酸代謝轉化為短鏈脂肪酸 (SCFAs)，如何確定？
4. 體外實驗結果提供進一步進行活體 (in vivo) 實驗的重要基礎，建議思考未來量化與純化的實驗策略與活體 (in vivo) 動物實驗的模式。