財團法人中正農業科技社會公益基金會 108 年農業科技研究計畫成果研討會議程

一、研討會時間:中華民國 108 年 6 月 27 日(星期四)

二、研討會地點:國立中興大學生物產業機電工程大樓 一樓演講廳

三、議程:

09:30~10:00 報 到

10:00~10:30 開幕典禮:陳烱松董事長、詹富智院長

10:30~12:00 專題報告 13:00~17:30 成果報告

時間	題 目	演講人
第一節	專題報告	主持人: 李健全顧問
10:30~11:00	社區支持型有機農業物聯網絡應用服務—	洪巍晉 技佐
10.00 11.00	產銷一體之農業電商平台開發	行政院農業委員會桃園區農業改良場
11:00~11:30	社區支持型有機農業物聯網絡應用服務—	呂朝元 助理研究員
11.00 11.00	北部夏南瓜生產評估及智慧農業應用	行政院農業委員會桃園區農業改良場
11:30~12:00	社區支持型有機農業物聯網絡應用服務—	傅智麟 副研究員
11.50~12.00	社區推廣教育及體驗行銷模式建立	行政院農業委員會桃園區農業改良場
12:00~13:30	午 餐	
第二節	成果報告	主持人: 盛中德教授
10 00 14 00	ムシル 無 W ナ レル 目 ナ W H ナ ユ A ch 市 ロ	張興政 教授
13:30~14:00	自動化蠶絲奈米化量產機構設計與應用	逢甲大學自動控制工程學系
14.00.14.90	奈米蠶絲纖維傷口敷料產品開發及美妝保	李松泰 副教授
14:00~14:30	養品功能性評估	南臺科技大學生物科技系
14.90 15.00	L ++ 用水 为 / 4 店 & 口 压 心 ~ ru m	王靜瓊 教授
14:30~15:00	桂花開發為健康食品原料之研究	臺北醫學大學藥學系
15:00~15:30	茶 會	
第三節	成果報告	主持人:吳靖宙主任
15:30~16:00	玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞體外成	林育安 副教授
10:30~10:00	熟暨隨後發育之影響	國立宜蘭大學生物技術與動物科學系
16:00~16:30	地衣芽孢桿菌固態發酵條件最適化及對梭	游玉祥 助理教授
10:00~10:50	菌攻毒雞隻之保護效果	國立宜蘭大學生物技術與動物科學系
16:30~17:00	溫室內噴霧降溫設計基準之建置與飽差利	黄裕益 教授
10.50~17:00	用之控制器研發	國立中興大學生物產業機電工程系
綜合討論 17:00~17:30	主持人:劉易昇執行長、李健全顧	問、盛中德教授、吳靖宙主任

目 錄

專題報告

社區支持型有機農業物聯網絡應用服務—

	產銷一體之農業電商平台開發	洪巍晉	
	北部夏南瓜生產評估及智慧農業應用	呂朝元	1
	社區推廣教育及體驗行銷模式建立	傅智麟	7
成果報告			
自動化蠶絲奈米化	量產機構設計與應用	張興政	14
米蠶絲纖維傷口敷	料產品開發及美妝保養品功能性評估	李松泰	29
桂花開發為健康食	品原料之研究	王靜瓊	45
玉米赤黴烯酮解毒	劑對豬卵母細胞體外成熟暨隨後發育之影響	林育安	64
地衣芽孢桿菌固態	發酵條件最適化及對梭菌攻毒雞隻之保護效果	游玉祥	78
溫室內噴霧降溫設	計基準之建置與飽差利用之控制器研發	黃裕益	93

社區支持型有機農業物聯網絡應用服務— 北部夏南瓜生產評估及智慧農業應用

呂朝元 黃錦杰 賴信忠 莊浚釗 行政院農業委員會桃園區農業改良場

摘要

夏南瓜在歐美地區為常見的蔬菜,近年來台灣對夏南瓜需求高,有機栽培售價每公斤可達 150—180 元。因北部地區空氣濕度較高,種植夏南瓜易面臨蚜蟲及白粉病等危害且於 5 月不耐氣溫上升,致使產量下降,擬於設施內導入本場開發「智慧農業開發系統」之設備,提高產量。本計畫以有機防治資材綜合管理方式,評估 4 種市售夏南瓜品種之生產效益,於 11 月下旬定植,採收期自 12 月下旬至翌年 4 月中旬,結果顯示每 0.1 公頃產量分別為 3,022、2,954、3,090 及 1,489 公斤,品種 1—3 產值為 44—46 萬,惟品種 4 收益僅 22 萬。

前言

北部地區人口約佔台灣總人口近 1/2,為發展成熟之都會型區域,農產品需求量極大。近年來民眾對於食品安全相當重視,又農委會極力推展有機與友善之耕作,故在北部地區生產有機蔬果可就近供應都會區消費者。惟都會近郊農業生產多以小農為主,生產面積及種類相對來的少,為了增加作物生產多樣化及提高農民之收益,本計畫評估北部地區夏南瓜有機栽培可行性。

夏南瓜為葫蘆科南瓜屬,植物學名為 Cucurbita pepo Linn.,原產於義大利,又以 zucchini 來稱呼,國內俗稱為「櫛瓜」,而拍賣市場則依外果皮顏色稱為青如意或黃如意。夏南瓜在歐美是常見的蔬菜,由於氣候適宜於夏季生產,所以稱為 summer squash。世界健康食物網站指出夏南瓜屬高營養、低熱量、低 GI 及抗氧化的營養食材,被評為世界最健康的食物之一。台南區農業改良場研究報告指出,夏南瓜生育最佳溫度為畫溫 25° C,夜溫 15° C,發芽適溫為 25° C ~ 30° C ,生育期溫度不宜超過 30° C ,超過 30° C 之氣溫不僅使生長勢明顯衰弱,花器發育容易不正常,也極易罹患病毒病,造成產量驟減,因此,台灣地區之平地並不宜在夏天栽培夏南瓜,秋冬季方為主要生產期,栽培 35° 45 日即可開始採收。

近年來台灣高級餐廳對夏南瓜需求高,價格較一般蔬果為佳,台北果菜批發市場全年平均拍賣價格為每公斤55-65元(圖1),有機栽培農民自行銷售及有機商店售價,夏南瓜價格每公斤可高達150-180元,本場藉由不同品種觀察試

驗評估,以提供北部地區有機或有善農民溫網室生產之參考。106—107年本場 黃錦杰助理研究員輔導新店區內心有機農場及樹林區康維有機農場種植夏南瓜 建立成功之特色作物。

因夏南瓜在栽培管理上較適合於農業設施環境下栽培,惟仍有許多問題需要克服,例如春秋兩季溫度較高,及夏南瓜結果需要蜜蜂授粉,而蜜蜂不耐溫室環境溫度高溫。為解決上述溫室環境之問題,本計畫預計導入106—107年本場賴信忠副研究員開發「智慧農業開發系統」(圖2),將一般傳統溫室提升到智慧農業物聯網的層次,該系統使用相容 Arduino 之感測器(包含偵測土壤水份、空氣溫度、空氣濕度、光照度、水流量)及 WIFI 智慧開關控制器來隨時監控溫室環境以提升管理效能及經營效益,如同讓農場經營者建立數位分身來解決管理人力不足。

因有機農業需要大量人力在管理農場上,也需要將農產品生產管理的資訊適 當揭露給支持社區農場的成員,運用「智慧農業開發系統」未來將可智慧給水灌 溉、拉動遮陰網降溫及預測農產品收穫期,自動提供農場主及消費者何時可以吃 到蔬果,提供更有價值及貼心的服務。

材料與方法

選用 4 種市售夏南瓜品種,於 11 月上旬育苗,11 月下旬定植於新北市樹林區通過認證之有機農場溫網室內,進行觀察試驗(圖 3)。試區規劃為 4 畦,畦寬 1.2 m,單行植,株距 1.2 m,每畦栽培 1 品種,每品種種植 20 株,地面覆蓋雜草抑制蓆。定植前每 0.1 公頃施用 1,000 公斤有機質肥料,於開始採收後每 2—3 週追肥一次,每次施用有機質肥料 120 公斤。採收期自 12 月下旬至翌年 4 月中旬,採收期可長達 88 天。

結果與討論

試驗結果如表 1 所示,參試 4 種品種每 0.1 公頃產量分別為 3,022、2,954、3,090 及 1,489 公斤,果數則以品種 2 之 16,872 最多,而品種 4 之 7,440 最少。深綠果與淺綠果果重均超過 200 公克,而黃果果重僅 176 公克較低。在收益方面品種 1-3 皆有 44-46 萬,但品種 4 收益僅 22 萬。在總產量上品種 1-3 相近,但品種 4 產量僅為其他品種之 1/2。以同為淺綠果之品種 3 及品種 4 加以比較,品種 4 產量為品種 3 之 48%,果重較品種 3 低 9.5%,雖為同色品種,但二者之間有明顯差異,因此在選擇品種時須加以注意。

結論與建議

北部地區夏南瓜栽培應選擇產量高及耐白粉病之品種,當苗株定植於溫網室時,初期可採用噴灌方式,惟當第一朵花開時,應改為溝灌或滴灌方式,避免因噴水造成花朵受損及潮濕引起白粉病發生,甚至會造成果實因黴菌感染而腐爛。栽培過程如有白粉病發生(圖 4) ,可於早期使用窄域油 500 倍防治,但不同品種間對白粉病抗耐性表現不同,可選擇較耐白粉病之品種。夏南瓜花性和一般南瓜相同,均為雌雄同株異花,在溫室內栽培無授粉昆蟲,因此每日需進行人工授粉(圖 5),以花瓣未呈現萎凋前進行效果最好,一般於上午 6—8 時前完成最佳,氣溫較低時花朵開放相對較遲,授粉時間亦可延遲,但應盡量於上午 10 點前完成。黃果品種栽培期遇到高溫,果實會有轉色不良問題(圖 6),應避免於高溫時期種植。開花後 3—7 天或果實大小達該品種市場標準即可採收,採收後的果實應避免碰撞受傷,影響商品價值。銷售包裝上可搭配不同顏色(圖 7),吸引消費者購買,亦可增加烹飪顏色視覺效果。

致謝

本試驗承財團法人中正農業科技社會公益基金會之「推動社群支持型有機農業之物聯網絡平台應用服務」計畫補助,特此致謝;感謝新北市樹林區康維有機農場謝淑娟農友提供溫網室協助試驗及調查。

參考文獻

黃圓滿。2005。夏南瓜簡介與栽培概要。臺南區農業專訊 53:6-9。

黃圓滿。2014。 夏南瓜臺南 1 號~4 號新品種介紹。臺南區農業專訊 89:5-9。 盧久富。2011。西葫蘆水溶性多糖抗氧化性的研究。安徽農業科學。39(16):

9560-9561 •

雷逢進、王曉民、馬理軍、劉慶華、韓麗麗和劉秀麗。2013。不同矮蔓性西葫蘆產量與其構成因素的關係。中國瓜菜 26(3):23-26。

劉宜生。2013。西葫蘆與佛手瓜高效益栽培技術 2 版。金盾出版社。P2-6。北京。中國。

表 1. 北部地區夏南瓜有機栽培產量與收益分析

(面積 0.1 公頃)

\(\lambda\)		品種 1(深)	(深綠果)			品種 2(黃果)	来)	
K K	果數	平均果重	總產量	校斯	果數	平均果重	總產量	水
	OU	8	kg	\$	ou	83	kg	\$
12月底	168	188.0	31.4	4, 716	144	187.5	27.0	4,050
1月	4,200	202.8	871.4	130, 716	4, 152	178.9	758.6	113, 796
2月	3,600	246.8	858.4	128, 754	3,504	169.6	615.0	92, 250
3月	4,584	229.2	1,056.7	158, 508	7, 320	167.8	1, 233.6	185,040
4月中旬	1,080	194.7	204.5	30,672	1,752	174.9	319.8	47,970
總計	13, 632		3, 022. 4	453, 366	16,872		2, 954. 0	443, 106

<u> </u>		品種 3(淺)	(淺綠果)			品種 4(淺綠果	条果)	
H 73	果數	平均果重	總產量	安湖	果數	平均果重	總產量	水が
	OU	50	kg	↔	OU	50	kg	-
12月底	288	272.1	78.4	11,754	120	221.7	27.0	4,050
1月	4,800	229.7	1, 167.7	175, 158	2, 568	188.7	444.3	66,640
2月	3, 288	242.6	806.3	120,942	744	225.5	169.4	25, 416
3月	3,888	214.0	864.8	129, 726	3, 480	198.5	737.3	110,592
4月中旬	720	227.4	173.4	26,010	528	208.9	110.9	16,632
% 高計	12, 984		3,090.6	463, 590	7, 440		1, 488. 9	223, 330
11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11	•							

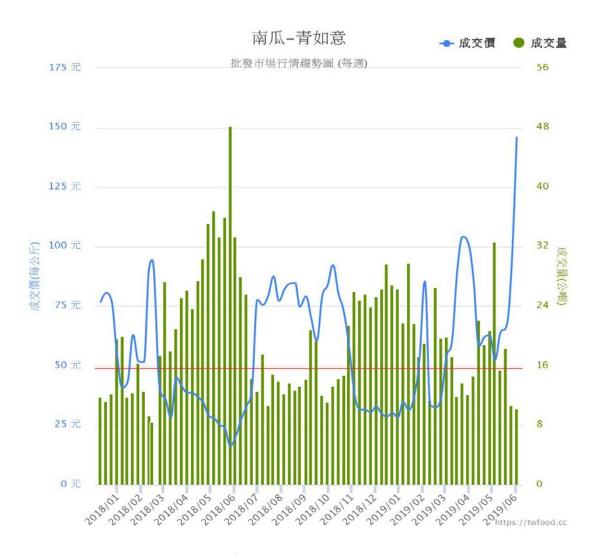


圖 1. 夏南瓜青如意批發市場價格趨勢圖。

元字試験 · 可 環境傳載器								
環境集成器								
								2149
名標	+ 18K	SSID	- 政務	15	3ER (°C)	温度 (%)	光波 (PAR)	土壤2000
1.3白	光度排除	wf1163	_Eta		26 94	68.28	0	338
1白+60	PLICIPAL	wf1180	_E18		27.14	67.61	0	393
1-70	光度扩散	wf1154	上18		28.00	89.8	0	371
1-ck	火放射	wf1163	上線		27 05	09.02	0	375
1-70-2	火皮試験	wf1157	上師		26 67	89.79	0	481
2-ck	光度試験	wf1165	上線		20.09	00.27	0	419
2-60	光度射線	wf1177	7.98		20.91	89.1	0	340
2-80	光度發展	wf1173	上總		26 92	90.66	0	490
2-50	光度初期	wf1185	上版		27 07	88.41	0	285
2-80	光体研制	wf1175	.1:18		27 07	87.52	0	401
3-10	光度影響	wf1164	上線		27 02	89.25	0	380
	1-2自 1自+50 1-70 1-4k 1-70-2 2-4k 2-60 2-80 2-50 2-80	1-2日 AUELIAN 1日 + 50 AUELIAN 1-70 AUELIAN 1-70 AUELIAN 1-70-2 AUELIAN 2-44 AUELIAN 2-40 AUELIAN 2-50 AUELIAN	1.2日 光度振荡 wf153 1日 + 60 光度振荡 wf1100 1.70 光度振荡 wf154 1-4k 光度振荡 wf150 1.70-2 光度振荡 wf157 2-4k 光度振荡 wf190 2-60 光度振荡 wf1177 2-40 光度振荡 wf1185 2-40 光度振荡 wf1175	1-2台 光度調整 wf1153 上級 1台+50 光度調整 wf1100 上級 1-70 光度速度 wf154 上級 1-4k 光度速度 wf159 上級 1-70-2 光度速度 wf157 上級 2-4k 光度速度 wf190 上級 2-60 光度速度 wf197 上級 2-40 光度速度 wf193 上級 2-40 光度速度 wf196 上級 2-40 光度速度 wf196 上級 2-40 光度速度 wf196 上級	1-2台 大阪講師 wf1153 上線 1台+50 大阪講師 wf1100 上線 1-70 大阪講師 wf1164 上線 1-6k 大阪講師 wf1100 上線 1-70-2 大阪講師 wf1167 上線 2-6k 大阪講師 wf1173 上線 2-60 大阪講師 wf1173 上線 2-60 大阪講師 wf185 上線 2-60 大阪講師 wf1175 上線	1.2日 光度阻滞 wf1153 上級 26 64 1日 + 60 光度阻滞 wf1100 上級 27 14 1.70 光度阻滞 wf1154 上級 26 00 1-6k 光度阻滞 wf1150 上級 27 05 1.70-2 光度阻滞 wf1157 上級 26 07 2-4k 光度阻滞 wf1105 上級 20 09 2-60 光度阻滞 wf1177 上級 20 52 2-40 光度阻滞 wf1173 上級 27 07 2-40 光度阻滞 wf1195 上級 27 07 2-40 光度阻滞 wf1175 上級 27 07	1-2台 光度振荡 wf1153 上級 25 64 60 20 1台 + 60 光度振荡 wf1100 上級 27 14 67 61 1-70 光度振荡 wf1164 上級 28 60 60 8 1-4k 光度振荡 wf1109 上級 27 65 00 52 1-70-2 光度振荡 wf1157 上級 28 67 00 70 2-4k 光度振荡 wf1105 上級 20 80 00 27 2-40 光度振荡 wf1173 上級 25 52 50 60 2-40 光度振荡 wf1165 上級 27 67 68 41 2-40 光度振荡 wf1165 上級 27 67 68 41 2-40 光度振荡 wf1176 上級 27 67 68 41	1.2台 光度振荡 wf1153 上級 28 94 80 20 0 1台 + 60 光度振荡 wf1100 上級 27 14 67 61 0 1-70 光度振荡 wf1164 上級 20 60 60 8 0 1-70 光度振荡 wf1167 上級 27 65 00 52 0 2-4k 光度振荡 wf1167 上級 20 67 00 70 0 2-4k 光度振荡 wf1177 上級 20 90 00 27 0 2-40 光度振荡 wf1173 上級 20 91 80 1 0 2-40 光度振荡 wf1185 上級 27 07 88 41 0 2-40 光度振荡 wf1175 上級 27 07 88 41 0

圖 2. 本場賴信忠副研究員開發「智慧農業開發系統」之環境介面。



圖 3. 設施內栽培有機夏南瓜



圖 4. 夏南瓜發生白粉病



圖 5. 夏南瓜進行人工授粉



圖 6. 栽培期遇到高溫使黃果頭尾轉色不良。



圖 7. 夏南瓜販售時以不同顏色搭 配,可吸引消費者購買。

社區支持型有機農業物聯網絡應用服務-

社區推廣教育及體驗行銷模式建立

傅智麟、洪巍晉、姜金龍

社區推廣教育與產業結合

21 世紀是體驗經濟的時代,台灣農業由傳統的產業提升為整合農業生產、製造、運銷與 休閒旅遊的複合式農業。如何讓傳統的農業經濟以產品導向為主軸的模式,進展到以五感導 向的體驗模式,並能達為消費群創造一個有價值的體驗,找出台灣新農村體驗的休閒模式新 契機,讓農村永續經營是其最終目標。

傳統的行銷模式就是「做生意」,如何讓顧客接受產品,將產品出售,著重在大量生產與銷售,在生產者與消費者的關係上是需求大於供給。銷售導向的出發點則是廠商,焦點會放在產品上,其運用的方法為強勢推銷,主要的目的是透過銷售行為來獲利。可是容易產生「行銷近視症」,生產者往往只以為茶葉只要香氣及回甘就會賣得好,而忽略了喝茶也可用來凸顯生活品味、提升文化形象。這種想法可能會錯失不少市場機會,甚至導致經營危機。因此在市場機制下衍生行銷導向,行銷導向的出發點是目標市場,焦點會放在市場需求,其運用的方法為4P、4C的整合,主要的目的是滿足顧客獲利。

在地農場或是社區等皆可以體驗行銷方式,進行資源的開發與活絡,但是要有完整的盤點、整合與規劃,並在每次的活動或是執行中逐次修正,以免淪於只套用過往模式,造成與其他農場或單位之同質性過高,而只有短期獲利,顧客回流率降低,當忠誠度不再時,就更無法永續經營。

在進行體驗行銷時,因為是五感的行銷模式,利用「見學」的概念提升產業與體驗之間的內涵,所謂「見學」一詞,應係由日本傳來,主要是透過現場瞭解、參觀等去學習知識,其主動性高。

所以如果能有跨領域的合作,農場與社區,能尋求改良場、政府(縣市、鄉鎮)、在地學校及農會等單位輔導或協助,又或是與其他農場或單位異業結合,則互相幫襯拉提的效果會更加。

有機蔬菜的目標市場

如果以生產方式區分農產品型態大致可以分為慣行(友善耕作)、具生產追溯、產銷履歷

及有機農產品等方式。台灣有機農業有別一般農產品,具有特殊性或選擇性,形成了市場區 隔與特定的消費群;其生產者與消費者互動密切,雙方資訊流通與誠信交流,是一種很獨特 的產品行銷模式。(張,2003)

在行銷目標市場會以 STP 先進行分析,所謂的 STP 是指市場區隔 (Segmenting)、目標市場 (Targeting)及產品定位 (Positioning)。在市場區隔上會以消費者特性,如人口、地理、心理與行為、性別等進行分類;在目標市場則以衡量各市場區隔的吸引力,選擇有利考慮因素如市場、競爭者及本身;在產品定位則是考量建立消費者心中特定位置。

北部地區鄰近都會區,對於有機農產品的喜好度較高,相形之下,營造出對有機蔬菜增加需求、創造需求的市場行銷方式,相對就更顯重要。在陳裕隆,2011 研究中以 T 公司為研究,其有機蔬菜目標市場定位為:1. 中壯年女性;2. 教育程度越高;3. 中高所得者;4. 重視食品安全、養生與環境保護者。而市場區隔為:居住在人口密度較高,教育及生活水準高之都會地區,家庭月所得介於 60,001 元~80,000 元之間,習慣進出超市、量販店及有機專賣店購物,且重視產品內外在品質及重視食品安全,其生活型態較為重視養生、環保,35-59 歲學歷較高之家庭主婦。(陳,2011)。

有機農產品的忠誠消費者對化學肥料或農藥等信心極低,相信有機質肥料是相對安全的,對產品外觀要求並不特別強調,其年齡多介於31-50歲之間,學歷較高。有機消費者多重視飲食安全與環境生態,所得及教育水準較高(但並非最高)者,較容易成為有機農產品消費者,各種推廣活動應朝此方向發展。(黃,1998)。

以市場區隔的角度來探討,有機農產品主要訴求是健康、天然及綠色環保理念,因此其 投入人力及成本相對慣行農產品而言,售價較高,因此中高收入族群較能接受其價格。綜觀 相關研究,有機農產品的市場是以年齡及所得收入做為區隔,以追求健康及養生的中壯年及 高齡者為目標客群;薪資方面則以中高收入族群為主。

目前台灣在有機農產品市場的行銷方式主要有下列6種:

- 農產品地產地銷:農民以在地生產,直接在地銷售方式,主要客群以鄰近產地周邊 瞭解其生產模式的消費者為主。
- 2. 農夫市集:近10年興起的模式,由學校或農民團體提供生產者與消費者互動平台, 在固定時間、地點,由農民帶來當令農產品,消費者透過跟農民直接互動,更瞭解 其栽培過程,因為安心進而增加購買力與產品忠誠度。

- 3. 社區支持型農業:是一種社區消費者直接或團體訂購方式向生產者購買農畜產品的方式。消費者繞過超市、中間盤商,買到當季新鮮食材,除了價格合理外還可以縮短食物里程。
- 4. 有機專賣店:專門銷售有機相關產品,銷售員對產品特性熟悉可以提供顧客專業知識,產品相較複合度較高。例如:里仁有機專賣店、台塑有機蔬菜等。
- 5. 農會及連鎖超市的有機專櫃:農會、連鎖超市會與特定有機農場或農民合作,在其農民直銷站或超市建立有機農產品專區,讓消費者可以就近選擇與購買。
- 6. 有機休閒農場:結合有機農業與觀光業的方式,透過休閒活動吸引消費者上前體驗 農村生活,其中也推銷自家農產品,達到雙管齊下的效果。

從上述幾個管道中,其實也可以相互的結合。社區支持型農業的運作特性,是使得原來遠離地方脈絡的消費者,再鑲嵌化(re-embedding)到原本的食物生產體系中,會員因此而感到安全,也覺得自身的支持行動有附帶的價值與收穫。社群支持型農業降低了生產端的不確定性,而在消費端,卻極有可能因為產量與品質的不固定,而增加了不確定性。為了同時迎合不同目的,社群支持型農業在實踐的過程中,必須努力去克服內部衝突,以達成真正雙贏的理想(賴,2010)。在社區支持型農業與有機休閒農場的模式相互結合,讓消費者透過實際到生產地進行體驗,更瞭解其生產過程,進而更強化對其品牌的忠誠度。

體驗行銷是要為消費者創造更多的經驗與體會。體驗是一種心理的過程,他不會只從商品出發,會去考量消費環境的情境氛圍,好的體驗行銷在設計上,會從消費者出發考量,規劃適合消費者需求,營造其良好學習經驗環境,接下來才去衡量其產品要帶給消費者的功能特性與可創造的利益。

體驗行銷主要是通過看(See)、聽(Hear)、用(Use)、參與(Participate)的手段,以實際的行動設計,挑動消費者的感官(Sense)(視、嗅、觸、味、聽)、情感(Feel)(內心情緒、誘發)、思考(Think)、行動(Act)、關聯(Relate)等感性因素和理性因素,導入各類活動的思考與實踐,重新定義設計的一種思考方式的營銷方法。目的在使其在自我滿足及參與感中,與產品或企業(品牌)產生一種深刻記憶的連結。在體驗行銷策略規畫中,地方產業的特殊性或是創意投入,越容易成為消費結構的主體,提升心理層面的趨好,形成新的創意經濟價值。消費者能在體驗過程中,藉由感官刺激,引領出個人情感與記憶經驗,如此不僅有助於提升商品與服務的經濟獲益,也強化了消費者與企業、品牌的黏著性。(黃,2016)

以往產品的行銷,如果只是價格促銷,沒有文化或是情感元素,就不會持久,過了就沒有,但透過體驗行銷規劃,讓「促」結合五感,讓印象深植,才有誘導購買行為發生的可能, 進而真正持續性銷售。

在行銷學上所謂的 4P,是指產品(Product)、價格(Price)、通路(Place)及促銷 (Promotion),不過這是從企業或是生產者的觀點去架構的行銷功能性組合。但在現今的市場 演進,已經不再是生產導向,而是社會行銷導向,其追求的是消費者與企業二者的需求,並 兼具考量社會與自然環境的利益,因此,從消費者觀點去架構的 4C 理論應運而生,所謂的 4C 是指客戶(Consumer)、成本(Cost)、便利性(Convenience)及溝通(Communication)。

就生產者而言,4P行銷主要是要針對產品去考量與規劃,木要是要「消費者請注意」, 注意其產品的品質、價值,從市場取向去探討產品的通路與促銷的模式;但4C行銷則是針對 消費者需求,在規劃設計其行銷模式上,反而不在是放在產品上,而是要生產者「請注意消 費者」,瞭解客戶的需求規劃其產品。

輔導康維有機農場模式

在精緻農業推動方案及有機農業倍增計畫之推動輔導下,消費者對於有機農產品的認同 度及消費量日漸升高。近年來食安事件頻傳,更促使都會人口對於有機農產品的議題高度關 注,尤其對於每日必需之有機蔬菜需求量大幅增加。近郊生產之有機蔬菜毗鄰廣大消費市場, 佔有地產地消之便,且栽培過程易受消費者檢驗而有較佳的信度,雙北地區就近生產有機蔬 菜有其地理優勢。

相較於台灣其它區域之有機蔬菜生產地,結合周邊之天然景觀及地區特色文化,雙北近郊有機蔬菜栽培農場更具有提供都會人口便利的有機農業教育體驗及休閒農業等發展潛力。近年來,「社區支持型農業」(CSA)已成為農業發展中一個嶄新面向,它是一種結合生產與銷售的運作模式,目前已經在國內逐漸受到關注。其推動的初衷,在於讓在地的消費者與生產者共同建立互惠共享的經濟體。CSA 是由消費者當會員,在農作物採收前先支付費用給農場,分擔農場經營風險。

對於農民而言,其實最容易改變農民的耕作管理策略,是消費者的需求與喜好取向,所以教育消費者有正確的食安及健康的飲食觀念,間接地就會影響農民由慣行農業逐步修正為有機或是友善環境耕作模式。

當人們透過社群支持型農業,可以知道他們的食物出產自哪裡、怎麼被生產、什麼時候生產的,甚至拜訪生產的地方、認識產地的農夫、親身參與生產過程等等。人與土地生產的重新連結,目地在降低充斥在現代社會中對食物安全的不信任與焦慮感(Giddens Anthony, 2000)

為此桃園區農業改良場在社區支持型有機農業物聯網絡應用服務相關計畫中,因應都會區小家庭消費需求,以北部地區有機農場為優先發展輔導對象。提高都市型農園競爭力,增加生產者收益與消費者食安信心,完成都會近郊小農產業消費體驗價值生活圈。同時增加有機蔬果商品查詢平台品項豐富度,加強輔導農友 e 化管理,以利建立消費者與生產者友善互動之資訊物流平台。

農產品最常用的是口碑行銷,注重的是品質,而其穩定的銷量是需要經過口碑及時間累積的。所以在農產品的行銷推廣手法上,如何喚起消費者注意產品的存在,並且強化消費者對產品的信心與忠誠,才能為產品帶來買氣,而進一步的促銷策略與手法,則是讓消費者認為這是廠商善意和回饋,更能加深其印象而持續買氣。

農產品的行銷特性與工業產品不同,其活動短期、活動有彈性,農產品因為有額外的附加價值如當令、限量,所以會有立即購買效果。為此,桃園區農業改良場於105-106年開始與新北市樹林區康維有機農場合作,選定其為示範農場,將推廣教育暨技術服務團成立,因應地方社群蔬果產品需求盤點其技術缺口,並導入商業品種及地方品種等多樣優質種類及建立栽培技術,提供場外輪作栽培技術之科學性證明,並提升示範農場經營效益。

桃園區農業改良場在本計畫-社區推廣教育及體驗行銷模式建立上,使以漸進式策略規劃,從栽培技術推到多元運用,再進而行銷推廣,主要從運用的概念出發,利用多元的方式。以106-107年輔導康維有機農場夏南瓜栽培及行銷推廣為例,桃園區農業改良場先行盤點其產品創新性及目前市場需求,輔導其種植新品項-桃園二號地瓜葉、櫛瓜(夏南瓜),並協助輔導康維有機農場規畫體驗行場,開放社區居民報名參與生產體驗課程,並開放場地與消費者親自參與耕作。

為了讓消費者更認識新開發種植品項-櫛瓜(夏南瓜),特別規劃於107年2月2日辦理康維有機農場一日遊之活動,進行多元運用的行銷推廣模式,現場讓消費者先瞭解夏南瓜植物特性及栽培方法,並教導正確採收的方式,進而進行實地的夏南瓜採收體驗活動,從採收過程中,讓消費者體驗生產地的氛圍及特色,以夏南瓜為道具,創造出最具魅力的情境,讓消費者在採收的興奮與愉悅中,出現留戀忘返的回憶,這就是體驗行銷的目的。

最後再以運用夏南瓜多元料理美食教學,讓消費者及社區學員等更瞭解這項食材,也更拓展其市場與銷售訂單。以夏南瓜為主角,運用民眾喜愛的電影-「料理鼠王」經典料理-「雜菜煲」開始啟動大家對夏南瓜的印象,現場教學與示範製作五彩金錢煲、鹹蛋夏南瓜、夏南瓜煎蛋、夏南瓜佐牛肉及焗烤蔬菜總匯等多道料理,讓民眾瞭解運用不同的切法橫剖、滾刀、長條型及片狀等,可以變化出多種不同的創意料理,並且透過桃園區農業改良場的FB粉絲專頁及好菜在我家的網路平台進行食譜及活動剪影的行銷推廣。





未來結合方向

現代的行銷模式有所謂的 AIDA 公式(AIDA Formula)是指潛在消費者從接觸商品資訊(如廣告、型錄……等)開始,一直到完成商品消費行為的步驟:「認知」(Awareness)、「興趣」(Interest)、「慾望」(Desire)及「行動」(Action)。

「認知」(A) 是指消費者經由廣告或宣傳,開始對產品或品牌認識,利用聳動的標題、口號,或是一連串促銷活動,吸引目標族群注意,強化消費者品牌認知。「興趣」(I) 則是當消費者注意到廣告傳達的資訊,開始對產品或品牌產生興趣,認為產品可以提供某種「改善生活的利益」,在 4C 考量下,消費者購買的是「利益」。「慾望」(D) 是指消費者因廠商所提供的「利益」產生擁有該項產品的「慾望」,當想買的產品變成心裡面一定要買到的,此時行銷活動策畫已幾近成功。

最後「行動」(A),讓潛在消費者成為實際購買者,甚至成為品牌忠誠信徒。潛在消費者 對產品或品牌,縱使有了「認知」、「興趣」、與「慾望」,到最後卻沒有任何購買行為,對整 個行銷策略而言是白努力。如何讓消費者真正動心起念,花錢消費才是最終目標,並且要品 質滿意,才會繼續購買以及推薦消費者。

集中消費者注意力,透過故事行銷、行銷活動、媒體訊息等讓消費者產生興趣認同,接 著會使消費者產生購買意願而達到預期的效果,進而創造新價值,激發更高的購買欲望,透 過產品或情感等吸引觸動,使消費者能促使採取行動購買,最重要是從選擇產品價值,進而 創造價值,最後透過採購行動傳遞真正產品價值。

未來的有機農業市場,要從通路回推農民,通路最管得住農民,可以用通路需求去推進農民改變。通路需求主要可以從消費者教育著手改變,改變消費者的觀念,進而改變消費喜好與行為。教育消費者不要用教條式,而應該是引導其如何正確的消費。以往經營的方向多為大眾化經營,聚焦在價格競爭,但現今多元社會下,分眾經營也是另一種模式,從不同族群的需求和行為模式思考,把特色突顯出來,以特定價格、行銷模式等進行產品營銷的精確經營手段。

因此在分眾經營模式考量下,未來在農場體驗活動方面,應結合社區支持型農業,善加利用國人逐漸重視有機農業發展及養生意識抬頭的機會,增加季節性體驗活動、結合五感體驗規畫,設計出具創意的客製化體驗活動,在農場行銷方面,則應培養經營專業的工作團隊,多多運用經驗傳承與異業結合方式來行銷其產品及服務,提升消費者整體的體驗價值。運用特殊的手法,塑造農場特有的風格與吸引力,這樣才有其獨創性。

參考文獻

- 1. 温珮好, 2011, 體驗行銷的秘密, Cheers 雜誌, V. 22, p. 146-149。
- 2. 劉明德、梅國忠,2011,網站體驗行銷、體驗價值、顧客滿意度與顧客忠誠度關係之探討,行銷科學學報,V.7,No.2,p.129~154。
- 3. 丁昭尤,2009,體驗行銷、體驗價值、觀光意象、遊客滿意度與忠誠度關係之研究—以 台東青山休閒農場為例,國立台東大學碩士論文。
- 4. 陳裕隆,2011,有機蔬菜行銷策略之研究-以T公司為例,國立台灣大學農業經濟學研究 所碩士論文。
- 5. 黄璋如,1998,有機農產品之市場區隔研究,農業經營管理年刊,V4,p.75-101。
- 6. 張正英,2003,有機農產品與消費者互動之研究,臺中區農業改良場特刊第57號,p. 52-83。
- 7. 黄鈺惠,2016,博物館主題活動應用體驗行銷策略之探討—以「與春天有約—淡古野餐趣」為例,新北市立淡水古蹟博物館2016學刊,V6,p.90-99
- 8. 賴爾柔、戴君玲,2010,台灣社群支持型農業的特性與困境,農業推廣文彙第54輯, p.46-52。
- 9. Giddens, Anthony(2000)。現代性的後果, 田禾譯, 南京市: 譯林。

自動化蠶絲奈米化量產機構與應用

張興政¹ 吳登楨^{2*} 許煜亮¹ 陳雅惠³ 劉恒毅¹ 林冠中¹ 1逢甲大學 自動控制工程學系 2行政院農業委員會 苗栗區農業改良場 3 逢甲大學 共同貴重儀器中心

*通訊作者: wudj@mdais.gov.tw

摘要

本研究靜電紡絲製程和自動化控制技術,以傳統單針靜電紡絲架構為基礎, 設計研製新式自動化蠶絲奈米化量產機構。透過設計轉盤陣列式多針噴頭離心靜 雷紡絲機構,達成連續離心靜電紡絲技術,以提升奈米紡絲產量。本紡絲系統結 合自動化控制技術,藉由人機介面設計,達成紡絲製程參數的控制,可降低環境 參數及人為變動的影響,提升紡絲製程的穩定性及可靠度。本機構自動控制功能 設計,採用自動化紡絲操作之基底輸送、紡絲、乾燥與收集流程;具備轉盤升降 裝置達成紡絲範圍多樣性、均勻性且一致性;可調式紡絲噴頭距離、收集板距離 與電位場距離設計達成最佳化紡絲參數調整;馬達輸送模組精密傳輸紡絲基底材 料,完成紡絲基底原料供給區、紡絲操作區至紡絲成品收集區。紡絲製程結果分 析顯示,奈米蠶絲之自動化離心靜電紡絲機構與技術,已可快速提升量產率,改 善奈米紡絲應用生產機制。

一、靜電紡絲歷史與原理

靜電紡絲技術最早是由 Formhals 學者於 1934 年提出並申請專利。他設計了 一套實驗設備與方法,利用靜電力拉伸高分子材料形成長絲狀,故此技術稱為靜 電紡絲(Electrospinning)。到了 1969 年, Taylor 學者提出靜電紡絲製程在特定的 電壓操作下,紡絲針尖噴出溶液形成圓錐體結構,定義為泰勒錐(Taylor cone), 建立了靜電紡絲理論基礎。引領許多學者們開始探討泰勒錐對於紡絲相對應之關 係。1996年,Renker 等學者發表了研究溶液靜電紡絲的成果。發現穩定靜電紡 絲製程包含四個過程:基部、噴射、展開和收集,如圖1所示[1]

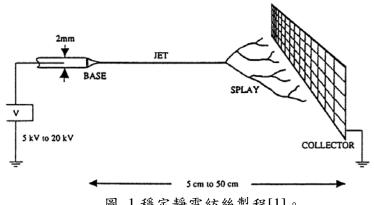


圖 1 穩定靜電紡絲製程[1]。

1971 年, Baumgarten 學者研究發現施加高電壓使靜電場變化,其錐體噴流 (Cone-jet)形態有很大的差異,每一種紡絲溶液皆有特定的穩定電壓,並發現電 壓增加會使纖維直徑變細,但增加到某一臨界電壓時,纖維直徑又趨向變粗。靜電紡絲製程控制條件包含:電壓、針尖和收集板之距離、溶液流速、環境溫度和濕度等因素[2]。近幾年來,許多學者開始研究如何增加紡絲產量與品質,2012年 Wang 等學者以旋轉螺旋線圈做為靜電紡絲製程的噴絲頭,並以聚乙烯醇做為奈米纖維主體材料,討論無針式靜電紡絲技術,分析奈米纖維直徑與生產速率的影響;利用有限元素法分析線圈表面與靜電紡絲區域的電場分佈 [3]。2011年,C. C. Liao 等學者提出增強離心靜電紡絲機械強度技術[4]。2017年,T. Hou 學者透過離心靜電紡絲,提高紡絲產量與改變紡絲表面結構[5],確定了離心靜電紡絲可以增強奈米纖維取向性與增加靜電紡絲之量產能力。

靜電紡絲基本架構是利用微流注射幫浦將調配完成之溶液,以特定速率推動送至紡絲針頭尖端,而紡絲針頭與收集板分別連接高電壓與地線,完成基本靜電紡絲架構。由此產生了靜電場,經由靜電場將針尖之溶液進行拉伸至收集板,形成奈米紡絲線,其架構圖如圖2所示[6]。

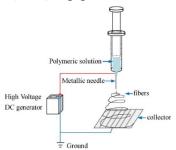


圖 2 基本靜電紡絲架構圖[6]。

基礎靜電紡絲裝置有:高電壓產生器、微量注射幫浦與金屬收集板。製作過程是將高分子聚合物溶液裝入微量注射器中,控制注射幫浦定量供液,將注射器針尖與高電壓產生器相接通以高壓電,收集板接地,當施加高壓電後針尖與收集板間形成電場,針尖末端的聚合物溶液被極化後表面聚集電荷,在庫侖力與表面張力的作用下,液滴表面的曲率會產生變化,當此電位達到臨界值 Vc 時,會因為電場拉伸而將半圓球狀的液滴逐漸轉變成泰勒錐。臨界電位 Vc 與毛細管結構與表面張力相關如式(1)所示[7]:

$$V_{C}^{2} = \frac{4H^{2}}{L^{2}} \left(\ln \frac{2L}{R} - \frac{3}{2} \right) (0.117\pi\gamma R)$$
 (1)

其中 H 為毛細管與接地端之距離,R 為毛細管半徑,L 為毛細管長度, γ 為液體的表面張力。

高分子溶液因為靜電場形成的拉伸作用,溶液會由泰勒錐頂端逐漸形成細絲 且直徑變小,主要是因為表面電荷與電場的耦合力造成噴射流體加速,影響因素 包括高分子聚合物的表面張力、黏度、導電率和電荷密度等參數。靜電紡絲過程 中會受到電壓、溶液特性、針尖與收集板間的距離、溶液流速以及環境溫度與濕 度等參數影響。靜電紡絲過程同時受兩種因素影響,一為溶液帶電受到電場拉伸, 影響紡絲纖維粗細;另一重要機制為藉由射流分裂來獲得直徑更細的紡絲纖維。 因外加電位的改變,泰勒錐受到電場作用及流體表面電荷密度不同影響。以牛頓 流體為例,在液體通過毛細管流量及外加電場強度作用下,帶電射流的半徑 h(z) 可由式(2)表示[7]:

$$h(z) = \left[\frac{\rho Q^3}{2\pi I E_{\infty}}\right]^{1/4} z^{-1/4}$$
 (2)

其中 Z 為針尖的軸向距離,ρ 為流體密度,Q 為流量,I 為電流,E_∞為電場強度。 泰勒錐帶電射流在電場中加速度運動,逐漸拉伸細化成纖維狀,此過程會有 穩定射流及不穩定射流兩種現象。紡絲在拉伸初期會出現較為穩定的一段射流, 在特定條件下到達一段距離後會產生不穩定的鞭動現象,產生不穩定性的力傳遞, 射流因表面電荷密度及加速度的干擾而產生多種不穩定模式,此現象會隨著時間 逐漸增強。由於鞭動速度極快,整個鞭動區域從不穩定的起點到收集板為止,呈 現一錐體。泰勒錐與不穩定性射流錐體兩者相互比較,推斷錐體的頂點即為不穩 定射流之起點。若毛細管口至不穩定起點之距離 L,可由式(3)表示[7]:

$$L^{5} = \frac{Q^{6} \rho^{2} K^{4} \beta (\ln x)^{2} h_{0}^{3}}{I^{5} E_{\infty}}$$
 (3)

其中 K 為流體的導電率 ,β 為通過射流表面的介電不連續性參數 $,h_0$ 為毛細孔直徑 ,x 為射流長度與毛細孔徑 ,y 的比值 ,y 為流量 ,y 高電流 ,y 高電場強度。

高電壓產生器產生電場拉伸膠狀溶液,溶液因高壓電產生帶電溶液並形成射流,此過程為影響奈米紡絲直徑的關鍵因素。紡絲表面張力、機械強度與拉伸的距離等相關研究,可得知射流電導性與聚合物濃度之間有密切相關性[8]。射流之電流由傳導電流 I_c 與表面對流電流 I_s 組成。電導率與聚合物射流半徑關係式由異速生長標度律(Allometric scaling law)表示為 $g \propto r^a$,而聚合物濃度與電導率的比例關係為 $g \propto c^\beta$,可將靜電紡絲射流的電導率由式(4)所示:

$$g = \lambda c^{\beta} r^{\alpha} \tag{4}$$

其中 α 與 β 為標度指數(Scaling exponent), λ 為常數。當 α = 2 時,為理想的傳導電流電荷分佈,射流可視為導體,對於傳導電流於射流上電荷分佈如圖 3(a)所示。而傳導電流 I_c 由式(5)所示:

$$I_{c} = \pi r^{2} kE \tag{5}$$

其中 k 為流體無因次電阻率。由歐姆定律,聚合物濃度比例與靜電紡絲的電導率關係可將式(5)修改為式(6):

$$I_{c} = \lambda c^{\beta} r^{\alpha} E \tag{6}$$

當 α=1 時,自由離子或電子不存在溶液內,電荷僅分佈於射流表面,其電荷分

佈如圖 3 (b)所示,表面對流電流 I。由式(7)所示:

$$I_s = 2\pi r \sigma v \tag{7}$$

實際上帶電荷流體存在於表面對流電流與傳導電流之間,因此,使 α 值介於 1 和 2 之間時電荷分佈如圖 3 (c) 所示。影響靜電紡絲拉伸過程聚合物濃度與非金屬導電性的關係,可由式(8)表示:

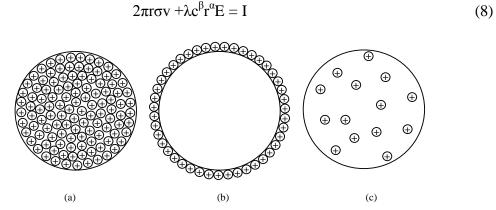


圖 3 靜電紡絲之導電帶狀況,(a)理想射流傳導電流電荷分佈,(b)表面對流電流電荷分佈,(c)實際傳導電流電荷分佈。

二、單針式靜電紡絲機構

近年來靜電紡絲技術已經應用於相當多領域,大多使用傳統單針架構搭配不同的紡絲溶液、靜電參數及環境參數控制。單針式靜電紡絲可分為下列幾種應用: (1)近場靜電紡絲架構:將靜電紡絲將針頭與收集基板之距離大幅縮短,減少距離精準的控制纖維沉積位置。(2)同軸靜電紡絲架構:以同軸針頭同時使用兩種不同的紡絲前驅體溶液進行靜電紡絲,可製備出同時具有兩種不同特性或是中空結構之靜電紡絲。(3)無基底靜電紡絲架構:將靜電紡絲收集不同主體結構,形成懸浮獨立奈米纖維薄膜。

2.1 近場靜電紡絲架構

近場靜電紡絲裝置是由高電壓產生器、微量注射幫浦、金屬針頭、移動平台 與收集基板所組成的。靜電紡絲圖案化使用了 X-Y 雙軸數位控制平台來快速收 集奈米纖維,可以有效的控制纖維沉積路徑。平台移動路徑及速度皆使用電腦控 制如圖 4 所示。本架構靜電紡絲製程,只需施加數百至數千伏電壓,藉由移動 平台的控制,就能達成規則排序之奈米纖維,並能控制纖維達到奈米等級。



圖 4 近場靜電紡絲系統架構。

2.2 同軸靜電紡絲架構

同軸靜電紡絲架構主要利用兩台微量注射幫浦控制不同溶液之流速,高電壓產生器供給高電壓源,以接地鋁板收集奈米纖維。架構設計以放置針頭之平台移動調整距離。其架構如圖 5 所示。

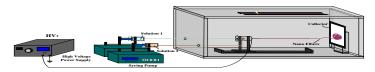


圖 5 同軸靜電紡絲系統架構。

2.3 無基底靜電紡絲架構

無基底靜電紡絲架構藉由 3D 收集基板設計, 奈米紡絲受不同電場強度影響 形成薄膜。本架構使用中空圓柱體電極生產無基底材料之奈米纖維薄膜, 使紡絲 聚集在圓柱體電極, 拉伸形成懸浮靜電紡絲薄膜。其架構如圖 6 所示。



圖 6 無基底懸浮靜電紡絲架構。

三、量產式紡絲技術發展

為了開發奈米紡絲量產技術,本研究以傳統單針式靜電紡絲製程為基礎,發展自動化陣列式多針靜電紡絲機構,並結合靜電紡絲與離心紡絲技術,開發陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構,改善傳統靜電紡絲生產速率低之缺點。

3.1 自動化陣列式多針靜電紡絲機構

本靜電紡絲平台機構的陣列式針頭裝置,多針結構之紡絲製程需考慮相互電場干擾因素,以不鏽鋼針頭為主體並於同一軸向排列,各針頭經針頭轉接套組與鐵氟龍管相連接,再與一對四分配管裝置並聯,實現以單一量筒供給溶液至一對四分配管裝置,再均勻分配前軀體溶液至陣列式不銹鋼針頭;維持均勻供給溶液速率,必須保持一對四分配管裝置水平放置和鐵氟龍管長度相等長等條件,避免實驗產生誤差值,設計一對四分配管、分配器固定座與單排多針裝置。單排多針頭載台以3D印表機製作主體結構,能夠快速的優化和控制載台機構最佳化,整合實體如圖7所示。



圖7單排多針載台結構實體圖。

陣列式多針頭結構設計,首先進行單列多針裝置之靜電紡絲製程測試,觀察紡絲沉積區域分佈、奈米纖維形貌尺寸和針頭泰勒錐射流狀況,作為陣列式結構配置之依據,提升靜電紡絲產量,增加靜電紡絲機構的效能。主體結構為兩排多針載台結構組成,並設計支撐圓孔配置與圓形支架,作為排針之間的連接固定作用,可調整兩排針結構之間距離,距離範圍為 45~80 mm,整體陣列式多排針結構設計模擬如圖 8(a)所示,陣列式多排針裝置結構實體如圖 8(b)所示。

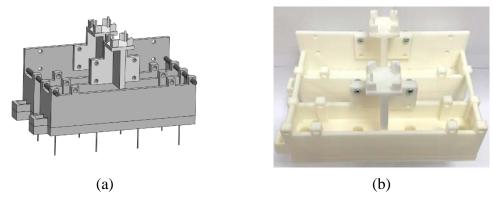
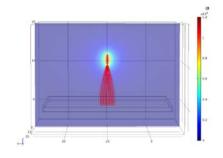
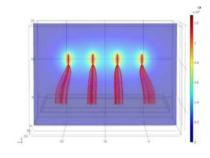


圖 8 陣列式多排針裝置結構設計:(a)模擬圖,(b)實體圖。

陣列式靜電紡絲架構相較於單針紡絲架構,增加更多靜電紡絲製程影響因素:各針頭間的高電壓相互影響問題,與溶液供給速率差異問題,兩者都會影響奈米纖維的形貌與尺寸以及紡絲薄膜沉積區域分佈。針頭間距差異會影響各股射流方向之偏移、紡絲沉積區域位置均勻性等,當針頭間距越短時,針頭高壓靜電產生正電荷射流之相互排斥力越大,使靜電紡絲射流方向並非為正常垂直向下,產生方向偏移,和針頭呈現特定角度,當相互排斥力越大角度偏移越大,進而影響紡絲沉積區域位置。反之,當針頭間距越遠時,各股射流間的影響就越小,射流產生的偏移角度變小,進而對紡絲沉積影響較小。以模擬軟體 COMSOL 之靜電模組,進行模擬多針數量結構的穩態靜電場特性。設定紡絲環境參數後,進行有限元素分析模擬。單針結構中的靜電場模擬分析結果如圖 9(a)所示,針頭周圍電位分佈較高,電力線分佈由針尖頂點至收集板上方。四針結構靜電場模擬結果如圖 9(b)所示,靠外側之針頭電力線皆產生向外側偏移現象。八針結構靜電場模擬結果如圖 9(c)(d)所示,所有針頭電力線皆產生向外側偏移現象,因針頭帶有相同高電位相互干擾造成。





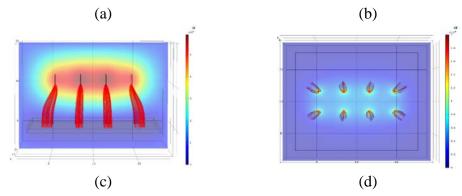


圖 9 (a)單針結構之靜電場分佈與電力線分佈模擬圖;(b)四針結構之靜電場分佈 與電力線分佈模擬圖;陣列式八針結構之靜電場分佈與電力線分佈模擬:(c)側 視圖,(d)頂視圖。

為修正陣列式多針頭電位場相互干擾造成紡絲區域偏移,提出具備第二電位之新式靜電紡絲架構,達到靜電紡絲製程技術之沉積薄膜區域可控性,可使紡絲過程製作出具備圖案化之奈米纖維薄膜。進行模擬陣列式八針結構具備第二高電位之新式靜電紡絲架構的穩態靜電場特性,幾何建模結果如圖 10(a)所示,上方八個圓柱體皆為針頭,下方八個圓盤狀體為收集板,最下方長方形體為第二電位金屬板。因第二電位金屬板產生的靜電場影響,並產生由第二電位金屬板出發至收集板之電力線,各個針頭的電力線皆受到壓縮而明顯集中,如圖 10(b)所示。由頂視角度分析結果,可以觀察到因第二電位金屬板的靜電場分佈影響,各針頭電力線偏移方向皆趨向陣列式多排針架構中心位置,如圖 10(c)所示。

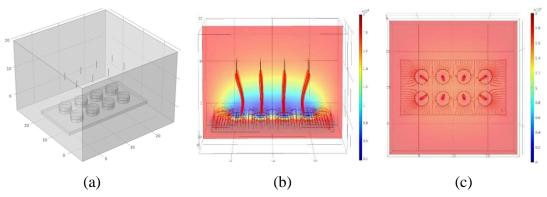


圖 10 具第二電位新式靜電紡絲架構模擬圖:(a)幾何建模圖型,(b)靜電場分佈與電力線分佈側視圖,(c)靜電場分佈與電力線分佈頂視圖。

靜電場模擬分析顯示電力線密度分佈差異,對於針頭紡絲射流走向影響,第二電位之外側電力線密度明顯較高,造成紡絲射流向內偏移且強度大,第二電位之內側電力線密度較低,使得紡絲射流向內偏移但強度較低,因第二電位金屬板形狀造成此電力線密度不同現象。新式靜電紡絲架構改善針頭之電力線偏移方向,經由圖案化紡絲收集板與第二電位金屬板結構兩者的相互配合,對於靜電紡絲製程技術的薄膜沉積區域可控性,經由模擬新式架構之理想靜電場,並實際測試靜

電紡絲製程,呈現圖案化奈米纖維薄膜,利於未來多樣商品化潛能。

開發陣列式多針靜電紡絲機構系統主要架構分別有:高電壓產生器、微量注射幫浦、接地收集鋁板、陣列式多針頭載台、二軸移動龍門架構和收集基材傳輸裝置等設備。高電壓產生器提供持續且穩定的高壓電源,產生穩定靜電場以利於溶液射流可順利進行拉伸;微量注射幫浦做為供應靜電紡絲製程前軀體溶液之穩定推動與調整流動速度;接地收集鋁板用於收集奈米紡絲纖維;陣列式多針頭載台固定於二軸移動龍門架構上方,利於系統自動化控制,可控制針頭至收集板的工作距離和多針載台左右移動位置之穩定性;收集基材傳輸裝置主要用於固定放置收集基材與利用馬達驅動,並滾輪帶動收集基材移動,達到持續性生產奈米纖維薄膜。將靜電紡絲系統放置於密閉腔體,並架設排放氣體風扇,將對人體危害之揮發性氣體安全排放至抽風櫃。影響奈米紡絲纖維表面型態具有許多因素,例如紡絲環境因素(溫度和濕度)、製程參數(針尖至收集板距離、溶液流速和電壓大小)以及紡絲前軀體溶液特性(材料種類、溶液導電度、表面張力及溶液黏度)。紡絲製程以密閉腔體進行實驗,用於控制外來環境因素,確保排除對紡絲的結果造成影響。多針陣列式靜電紡絲機構實體如圖 11 所示。



圖 11 陣列式多針靜電紡絲機構實體圖。

本機構以 Arduino 作為控制器並透過 LabVIEW 進行人機介面開發,設計即時監控環境參數與製程狀況,人機介面如圖 12 所示。介面提供使用者快速理解即時環境溫度、溼度與機台運作情況。人機介面可分為手動與自動部分,手動功能設計可單獨測試個別動作,便於檢查機台有無故障,自動功能部分可藉由輸入紡絲製程參數,完成製程參數後便可執行自動化工作,並可藉由執行狀態了解目前運作狀況,完成奈米蠶絲之自動化靜電紡絲量產機構技術。



圖 12 自動化陣列式多針靜電紡絲機構之人機介面。

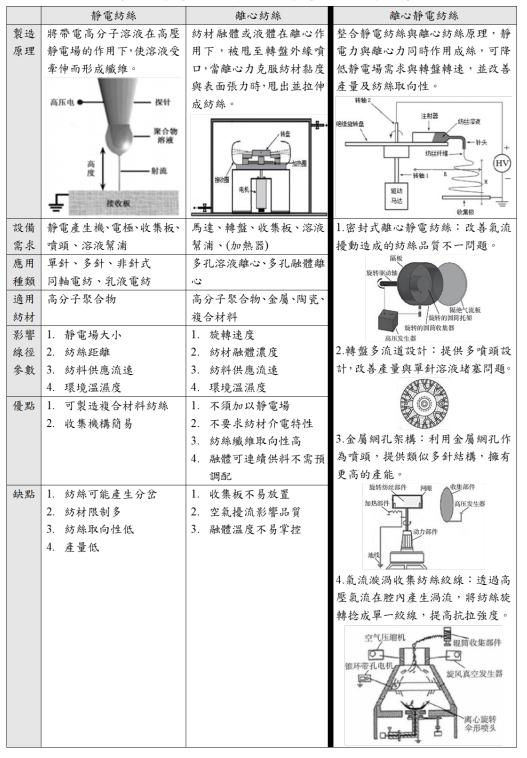
3.2 陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構

受限於靜電紡絲原理之條件要求,再提高紡絲速率勢必將犧牲紡絲品質。為達成紡絲量產商品化生產,提出整合靜電紡絲與離心紡絲技術,同時擁有靜電紡絲優異的紡絲品質特性,並具備離心紡絲高速的紡絲產量特性,同時利用離心力與靜電力生產奈微米線徑紡絲,相較於單針式靜電紡絲產量提升兩個數量級距,因此開發陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構。

靜電紡絲與離心紡絲技術比較分析如表一所示,靜電紡絲技術使用高介電系 數材料,限制了紡絲溶質、溶劑與添加物的種類;且紡絲受電力場分佈影響,無 法大量且密集的生產。離心紡絲技術利用高速離心甩出紡絲,產量大且紡絲取向 性幾乎一致,但受限於紡絲溶液從噴頭射出後失去離心力牽引,造成最後沉積於 收集板之紡絲線徑與均勻性不如靜電紡絲。故整合靜電紡絲與離心紡絲技術設計 離心靜電紡絲機構,靜電力與離心力一併作用,降低設備生產環境參數要求如靜 電場電壓需求與離心轉速都得以降低,並兼具兩者紡絲生產技術之優點。離心靜 電紡絲為近年新興技術,雖已有學者提出此項技術的應用,但仍為實驗室研究階 段且非系統化、自動化與量產化的生產設備。而本研究提出陣列式多針轉盤噴頭 離心靜電紡絲機構,設計研製新型自動化奈微米離心靜電紡絲量產機構,結合轉 盤陣列式多針架構,提升奈米紡絲兩個數量級以上之產量,研究流程如圖 13 所 示。本紡絲系統結合自動化控制技術,藉由人機介面設計,達成紡絲製程參數的 控制,可降低環境參數及人為變動的影響,提升紡絲製程的穩定性及可靠度。控 制功能設計採用自動化紡絲基底輸送、紡絲、乾燥與收集流程。透過紡絲轉盤陣 列式多針噴頭設計,達成連續離心靜電紡絲技術;具備轉盤升降裝置達成紡絲範 圍多樣性、均勻性且一致性;設計可調式紡絲噴頭距離、收集板距離與電位場距 離,達成最佳化紡絲參數調整;馬達輸送模組控制精密傳輸紡絲材料,自原料供

給區經紡絲收集區終於成品收集區。相關技術機構與設備整體架構模擬設計,如圖 14(a)所示,紡絲架構設計如圖 14(b)所示。

表一 静電、離心與離心静電紡絲技術分析



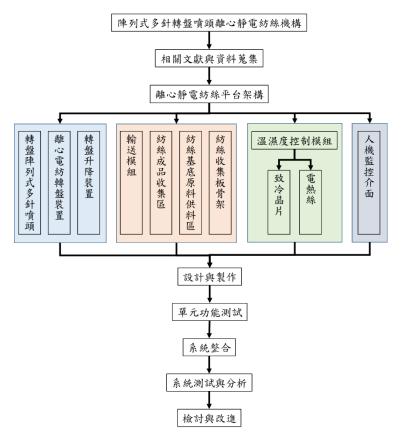


圖 13 陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構研究流程圖。

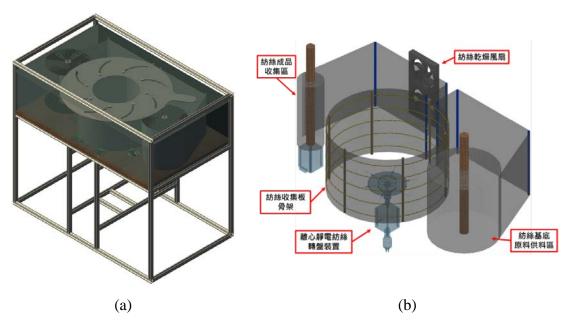


圖 14 (a)機構設備整體架構設計;(b)紡絲架構設計圖。

本研究開發陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構,主要控制與生產功能架構如下:高電壓產生器、微量注射幫浦、轉盤升降裝置如圖 15(a)所示、轉盤陣列式多針載台如圖 15(b)所示、可調式紡絲間距結構如圖 15(c)所示、可調式低電

位場裝置如圖 15(d)所示、傳輸與收集裝置設備,機構完成實體如圖 16 所示。高電壓產生器提供持續穩定的高壓電源;微量幫浦供應前軀體溶液穩定推動與調整流動速度;可調式低電位場裝置提供紡絲所需靜電力;轉盤陣列式多針噴頭固定於離心靜電紡絲轉盤,馬達帶動轉盤旋轉提供溶液離心力,針頭高電位提供溶液靜電力,靜電力與離心力同時作用,可降低靜電場與轉盤轉速需求,改善紡絲及產量取向性;傳輸與收集裝置利用步進馬達驅動,基材由滾筒連續帶動送入紡絲區域,完成紡絲之基材收集成捲,提供後續利用,達到奈米纖維薄膜量產之目的。

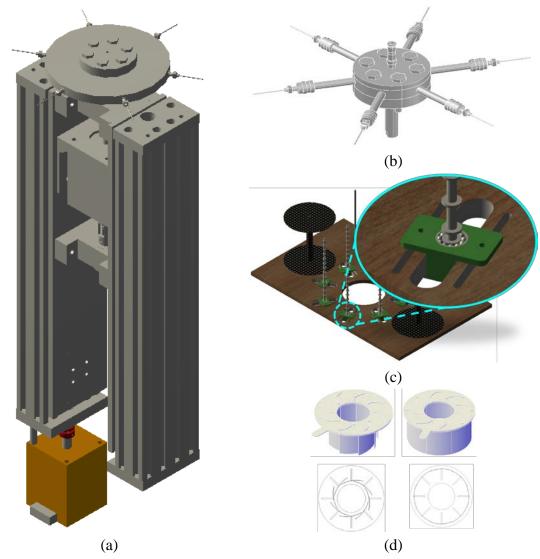


圖 15 (a)轉盤升降裝置與傳輸裝置設計圖; (b)轉盤陣列式多針噴頭設計圖; (c) 可調式紡絲間距結構設計圖; (d)可調式低電位場裝置設計圖。

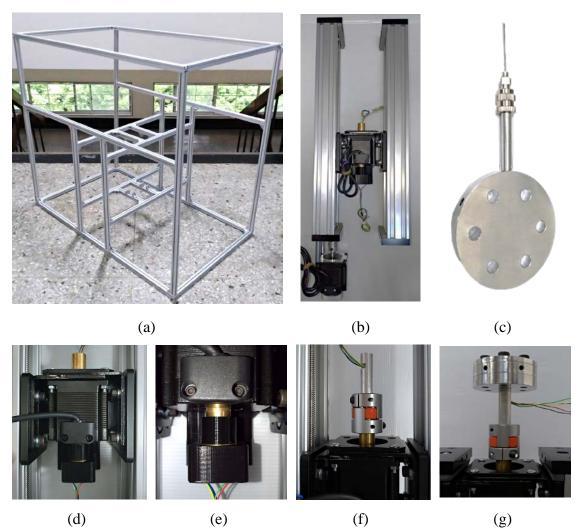


圖 16 離心靜電機構實體圖:(a)機構骨架實體,(b)轉盤升降裝置實體,(c)轉盤 陣列式噴頭針頭安裝,(d)升降裝置轉盤離心馬達連結實體,(e)高電位場電滑環連接結構實體,(f)轉盤與離心馬達連接桿製作安裝,(g)離心電紡轉盤裝置實體。

本機構使用 Arduino 無線控制器,透過 Lab VIEW 進行人機介面的開發設計,可即時監控環境參數與運作狀況,功能設計分成自動控制與手動控制兩部分,自動控制部分主要是將製程參數設定後執行,開發系統將按照各參數進行運作,可使紡絲流程穩定,並降低人為操作的疏失。手動部分主要以人力控制進行每個部份的單獨運作,可單獨檢測每個操作部分是否正常運作。紡絲區域主要由環境監控系統、轉盤陣列式多針噴頭、轉盤升降裝置與傳輸裝置組成;環境監控系統是由數位型溫濕度感測器、繼電器模組、致冷晶片除濕裝置與電熱絲加熱裝置所組成。以半導體致冷晶片的冷面朝向紡絲腔體內部,凝結空氣中水氣排出腔體,達到除濕效果;除濕效率 0.4 % RH/min。使用電熱絲的電熱效應進行升溫,以電木板絕緣,電熱絲置於下方,以風扇提高升溫速率,升溫速率 0.7 ℃/min。轉盤升降機構由精密滑軌、步進馬達驅動器組成,使用電滑環為紡絲溶液導入高壓電位場。輸送模組以步進馬達驅動,透過微控制器發送訊號至馬達驅動器,藉

由步進馬達的移動步數計數,進行移動距離控制;控制紡絲針尖到收集板間的工作距離與紡絲分佈沉積位置控制,輸送模組以輪軸、滾軸與步進馬達結合,步進馬達驅使輪軸轉動,輪軸拉動紡絲基底滑過滾軸進入紡絲區域,控制紡絲沉積面積與紡絲材料傳輸至成品收集區。

本陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構,已完成轉盤陣列式多針噴頭設計 與製作、離心電紡轉盤裝置設計與製作、轉盤升降裝置設計與製作、機構骨架設 計與製作、輸送與收集模組設計與靜電紡絲薄膜量產參數分析。多針式靜電紡絲 平台提供良好和快速的紡絲製程環境,相比於傳統靜電紡絲架構,具備穩定環境 因素控制、不間斷輸送與收集模組、快速紡絲參數調整和大幅提升奈米纖維薄膜 產能。多針式離心靜電紡絲相比於單純靜電紡絲技術,可提升至少兩個數量級之 奈米纖維薄膜產量,並能產出完整且高指向性之奈米纖維結構和表面形貌。經不 同收集時間結果分析,針頭數量與紡絲產量兩者呈近似正比關係,結合離心紡絲 與靜電紡絲,離心力與靜電力同時作用,提高紡絲速度,產量將大幅提升。

四、結論

本研究發展奈米級的蠶絲蛋白應用量產技術,研發陣列式多排針靜電紡絲平台,並提出靜電紡絲整合離心紡絲技術,開發陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構,製作系統化、自動化與量產化的生產設備。將整體機構積體化設計提升紡絲生產速率。使奈米應用優化技術快速發展。規劃蠶絲蛋白混合多種高分子材料和生物性天然高分子材料,製作出不同功能之複合型奈米纖維薄膜,提升奈米纖維薄膜產量和減少耗損,開發蠶絲蛋白多樣化的應用潛能,增強商品化應用發展的可能性。

本研究成果重點敘述如下:

- 1. 蠶絲蛋白靜電紡絲最佳操作參數:本研究最佳操作參數為絲素蛋白溶液濃度 15 %wt/v、工作電壓 20 kV、溶液供給速率 0.3 ml/hr、工作距離 90 mm、環境 温度 30 ℃和溼度 40 %RH。完成奈米纖維平均線徑為 50 nm。
- 2. 新式靜電紡絲架構設計與測試:設計第二電位之新式架構,進行奈米纖維薄膜區域之可控制性測試,可有效控制奈米纖維薄膜圖案化。
- 3. 陣列式多針靜電紡絲機構設計製作:設計積體式靜電紡絲平台,提供穩定製程環境。工作項目為高靜電電位、一對四溶液供給管道和不間斷穩定速率控制、自動化移動二軸龍門裝置、收集基材傳送帶裝置和實驗腔體內部溫溼度穩定控制,排除多種干擾因素。
- 4. 陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構設計:設計研製新型自動化奈微米離心靜電紡絲量產機構,結合轉盤陣列式多針架構,提升奈米紡絲兩個數量級以上之產量。設計紡絲轉盤陣列式多針噴頭,達成連續離心靜電紡絲技術,轉盤升降裝置達成紡絲多樣性、均勻性且一致性,並具備可調式紡絲噴頭距離、收集板距離與電位場距離設計,達成最佳化紡絲參數調整,製作系統化、自動化與量產化的蠶絲蛋白應用生產系統。

- 5. 量產式蠶絲蛋白紡絲技術產量分析:針對紡絲技術產量測試分析,單針靜電 紡絲溶液供給速率為 0.3 ml/hr; 陣列式多排針結構最佳化溶液供給速率為 2.1 ml/hr; 整合靜電離心紡絲技術之陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構溶液 供給速率為 60 ml/hr。相較於單針的產量, 陣列式 8 針結構提升了 9 倍奈米 纖維薄膜產量, 陣列式多針轉盤噴頭離心靜電紡絲機構提升了近 200 倍之奈 米纖維薄膜產量。
- 6. 蠶絲蛋白應用潛力分析:量產式紡絲技術提供良好和快速的紡絲製程環境, 具備更穩定環境因素控制、不間斷收集基材傳輸系統、快速紡絲參數調整和 大幅提升奈米纖維薄膜產能,亦可配合多種生物性天然高分子材料,製作多 樣化蠶絲蛋白奈米纖維薄膜,具備商品多樣化開發潛能。

參考文獻

- [1] D. H. Reneker and I. Chun, "Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning," Nanotechnology, Vol. 7, pp. 216-223, 1996.
- [2] P. K. Baumgarten, "Electrostatic spinning of acrylic microfibers," Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 36, pp. 71-79, 1971.
- [3] X. Wang, H. Niu, X. Wang, and T. Lin, "Needleless electrospinning of uniform nanofibers using spiral coil spinnerets," Journal of Nanomaterials, 2012.
- [4] C. C. Liao, C. C. Wang, K. C. Shih and C. Y. Chen, "Electrospinning fabrication of partially crystalline bisphenol a polycarbonate nanofibers: Effects on conformation, crystallinity, and mechanical properties," European Polymer Journal, Vol. 47, pp.911-924, 2011.
- [5] T. Hou, X. Li, Y. Lu and B. Yang, "Highly porous fibers prepared by centrifugal spinning," Materials & Design, Vol. 114, pp.303-311, 2017.
- [6] H. Yang, S. Ma, G. Yang, Q. Chen, Q. Zeng Q. Ge, L. Ma, and Y. Tie "Synthesis of La₂O₃ doped Zn₂SnO₄ hollow fibers by electrospinning method and application in detecting of acetone," Applied Surface Science, Vol. 425, pp. 585-593, 2017.
- [7] 吳大誠等, 奈米纖維, 台北, 五南圖書出版公司, 2003.
- [8] J. He, L. Xu, Y. Wu, and Y. Liu, "Review mathematical models for continuous electrospun nanofibers and electrospun nanoporous microspheres," Polymer International, Vol. 56, pp. 1323-1329, 2007.

奈米蠶絲纖維傷口敷料產品開發及美妝保養品功能性評估

李松泰

南台科技大學 生物科技系

摘要

開發奈米蠶絲蛋白傷口敷料之試驗,首先測試人類皮膚纖維母細胞 CCD-966SK 生長在絲 素蛋白鑄成之薄膜,結果顯示第 15 天後細胞的生長速度與對照組無顯著差異,絲素蛋白薄膜 的厚度對細胞的生長亦無影響。接著我們以此薄膜做為載體將奈米蠶絲纖維電紡在薄膜上,做 成奈米蠶絲纖維傷口敷料進行動物實驗。結果顯示傷口在兩週後已癒合,25 天後除了使用 3M 貼布的老鼠外,使用奈米蠶絲纖維敷料的老鼠傷口處已開始長毛。傷口組織切片 HE 染色結果 顯示,含甲殼素及薑黃素、含 Genipin 及 Silver sulfadiazine、含絲膠蛋白及 Silver sulfadiazine 之奈米蠶絲纖維敷料的毛囊較使用其他敷料的老鼠明顯增多。評估蠶絲蛋白的美妝保養功能之 項目,首先以MTT測試絲膠蛋白及絲素蛋的安全性,結果顯示細胞培養基中含有絲膠蛋白或 絲素蛋白不會影響小鼠黑色素瘤細胞 B16-F10 及人類皮膚纖維母細胞 CCD-966SK 細胞的存活 與生長。蠶絲蛋白之美白功能性評估結果顯示,試管中抑制酪胺酸酶活性的效率不論絲膠蛋白 或絲素蛋白,大分子的抑制效果比小分子好;而小分子的蠶絲蛋白對細胞內酪胺酸酶具有較好 的抑制效果。以不同濃度的絲膠蛋白及絲素蛋白進行抗氧化功能評估,結果顯示絲膠蛋白及絲 素蛋白在濃度 50%以上具有顯著的螯合鐵離子能力,而且絲素蛋白的螯合能力比絲膠蛋白高。 分析絲膠蛋白及絲素蛋白清除 DPPH 抗自由基之效果,顯示兩者的清除能力皆不佳。絲膠蛋白 及絲素蛋白清除 ABTS 陽離子自由基能力之抗氧化實驗結果顯示,濃度 25%以上具有 80%以 上的清除能力。測定絲膠蛋白及絲素蛋白還原能力,結果顯示絲素蛋白有較高的還原能力,而 絲膠蛋白既使在高濃度其還原能力與對照組無差異。綜合以上四種抗氧化能力試驗結果,顯示 蠶絲蛋白具有廣泛的抗老化功能。

關鍵詞:絲膠蛋白、絲素蛋白、傷口敷料、抗氧化。

前言

栽桑養蠶在台灣早期是一重要經濟產業,主要提供紡織業及寢具產業蠶絲原料,做成蠶絲衣服布料、蠶絲被等產品。我國政府在民國五十到七十年間大力推廣栽桑養蠶,因此台灣蠶業也風光一時,對提升蠶農經濟收入有很大的幫助。但後來因為化學合成纖維價格低廉及農業人工成本提高,台灣蠶業無法與中國、巴西及印度等人工便宜之國家競爭而沒落,我國政府也自1992 年廢耕桑蠶(江孟儒 2008),此後近二十餘年來台灣已經沒有蠶業可言,唯有極少數業者仍以打造蠶絲被及經營觀光農場慘澹經營。近年來由於蠶絲蛋白廣泛的被開發應用於輔助食品(food additive)、美妝產品(cosmetics)、功能性生物材料(functional biomaterials)、生醫材料(biomedicalmaterials)、及製藥工業(pharmaceutical)等相關產業上,使它成為引起全球重視的生物性材料(biomaterial),預測未來全球性的需求量將大幅增加(Vepari and Kaplan 2007、Mondal et

al., 2007、Gulrajani et al., 2008、Patel and Modasiya, 2011、Rockwood et al., 2011、Aramwit et al., 2012)。而且蠶絲蛋白可藉由大量飼養家蠶來生產,可以源源不絕的供應,不像塑料原料是由地底的原油提煉,石化能源有枯竭的危機。因此蠶絲蛋白在生技產業的創新研究發展上具有無窮的潛力與商機,是提升國家生技產業創新能力的好題材。本研究基於蠶絲蛋白的生物相容性、材質加工多元性及諸多生物活性之理論基礎,開發蠶絲蛋白傷口敷料及評估蠶絲蛋白的美妝保養功能。台灣在發展栽桑養蠶具有地理環境及人為條件的優勢競爭力,地理環境的優勢是台灣在自然環境下能夠全年栽桑養蠶是鄰近的中國、日本、韓國等國家無法媲美,人為條件的優勢是台灣在自然環境下能夠全年栽桑養蠶是鄰近的中國、日本、韓國等國家無法媲美,人為條件的優勢是台灣方數農大國農委會苗栗農業改良場(早期的蠶業改良場)累積非常寶貴的蠶業資源與技術。台灣至今還有許多農民具有栽桑養蠶的技術與經驗,因此值得國內產官學界共同努力創新思維蠶絲蛋白的多元開發應用,開創蠶絲蛋白生技產業成為一顆明日之星。

研究背景

蠶絲主要由絲膠蛋白(Sericin)與絲素蛋白(Fibroin)兩種蛋白質所組成,其中絲膠蛋白含量佔 $20\sim30\%$ 、絲素蛋白佔 $70\sim80\%$,另含有微量的碳水化合物、臘、色素分子及無機物(Mondal et al., 2007)。蠶絲的結構是由絲素蛋白所形成之兩束(brins)強韌的蠶絲纖維(或稱為絲素蛋白纖維, fibroin filament)為核心,外包覆著多層的絲膠蛋白而成(Khalifa et al., 2012)。絲素蛋白所形成的纖維是一種共聚物(copolymer),被稱為結晶區(crystalline regions)之絲素蛋白的疏水性 β -折板(beta-sheet)結晶之間由一小段親水性的區段相連,此區段被稱為非結晶鏈(amorphous chain)。蠶絲纖維具有強韌且具光澤的物理特性,因此古早時期即被人類用來纖成高級布料。

早期蠶絲纖維主要用於紡織工業,蠶繭先以熱水煮沸去除絲膠蛋白後繅絲織布,絲膠蛋白 被當成是紡織工業的廢棄物。近年研究發現絲膠蛋白具有光澤性、保濕度佳、可抗氧化、抗紫 外線及抗菌、且可抑制酪胺酸酶之活性。酪胺酸酶是皮膚表皮之基底層細胞產生黑色素的重要 酵素,所以絲膠蛋白亦具有美白之功能(Voegili et al., 1993, Padamwar and Pawar 2004, Padamwar et al., 2005)。有文獻指出絲膠蛋白做成的化妝水、乳液或軟膏,具有增加皮膚彈性、抗皺紋、 抗老化的功效(Voegili et al., 1993、Padamwar and Pawar 2004)。皮膚失去彈性產生皺紋最主要 原因是水分過度散失,絲膠蛋白已被證實具有極佳的保濕效果(Padamwar et al., 2005)。此外, 研究也發現絲膠蛋白可促進多種細胞株的生長,及具有許多生物活性,因此絲膠蛋白的開發應 用更加廣泛(Vaithanomsat and Punyasawon, 2006、Gulrajani et al., 2008、Aramwit et al., 2012、 Rajput and Singh, 2015)。蠶絲蛋白中的另一成份絲素蛋白也具有保濕、抗氧化、抗紫外線及抗 菌的特性,因此蠶絲蛋白是開發**美妝保養品**(cosmetics)的高檔原料。這些蠶絲蛋白可經由人體 消化作用水解成為胺基酸,所以也可成為食品的添加成分。此外,絲素蛋白具有多種優良的生 物特性,包括:生物相容性(biocompatibility) —因此不會引起人體的過敏反應;生物可分解性 (biodegradable) —因此在自然環境中極易被分解,亦可緩慢的被人體組織吸收;化學修飾性 (chemically modified)—容易進行化學性修飾以改變材質的功能及特性;材質加工多元性 (processing multiple material formats/tunable architecture)—可加工製成多種形式材質,包括:纖 維狀(fibers)、管狀(tubes)、海綿狀(sponges)、薄膜(films)、膠狀(gels)及微球體(microspheres)等 材質 (Rockwood et al., 2011)。因此絲素蛋白可開發做為功能性生物材料(functional biomaterials) 例如防熱性薄膜、導電性薄膜、透明薄膜等,應用於特用化學品及生物感應器(biosensors)等相

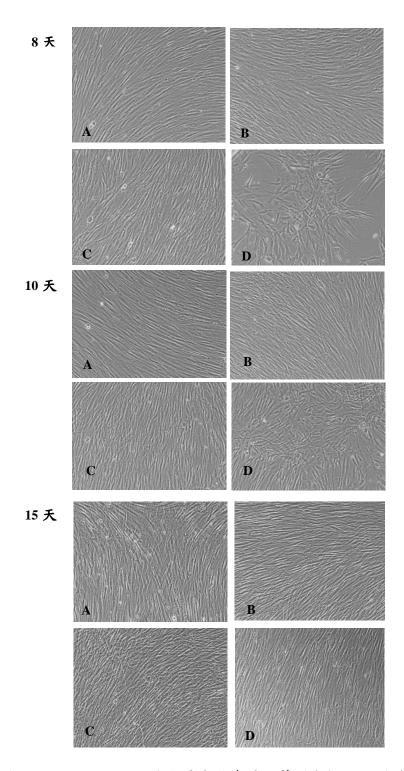
關產業上。絲素蛋白因具有上述的生物特性,近年來成為生醫材料(biomedicalmaterials)的新秀,可開發成多種生醫產品例如傷口敷料、人工皮膚、人工血管、人工器官骨架、人工眼角膜、柔軟組織填充物等,應用於組織工程(tissue engineering)、疾病模式(disease models)、移植醫材(implant devices)、及藥物傳遞(drug delivery)的研究與開發(Rockwood et al., 2011)。絲素蛋白在組織工程之開發應用,已有許多相關研究報告,包括:硬骨(bone)骨架(Kim et al., 2005、Mandal et al., 2011、Gil et al., 2011、 Mandal et al., 2012)、軟骨(cartilage)(Wang et al., 2006、 Yan et al., 2012)、柔軟組織(soft tissue)(Etienne et al., 2009)、眼角膜(corneal)(Lawrence et al., 2009、Gil et al., 2010)、脈管組織(vascular tissues)(Lovetta et al., 2007)、子宮頸組織(cervical tissue)(House et al., 2010)、皮膚(skin)(Sobajo et al., 2008、Shevchenko et al., 2010、Wharram et al., 2010、Gil et al., 2013)及人工器官的骨架(Janani et al., 2018)。

研究成果

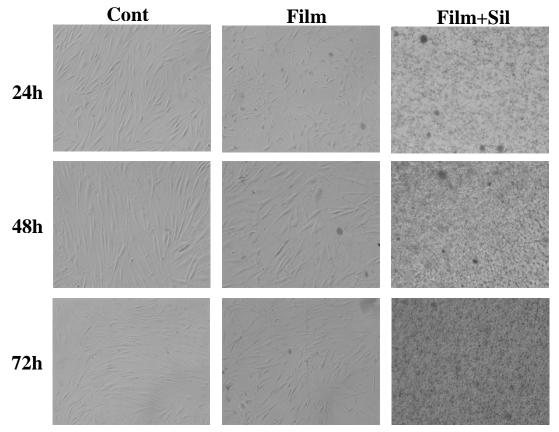
一、奈米蠶絲纖維傷口敷料開發

(1)蠶絲蛋白對纖維母細胞生長之影響

首先比較 CCD-966SK 細胞生長在絲素蛋白薄膜的情形,實驗組別分別為:(A)市售的細胞培養皿(BIOFIL®); (B)培養皿底部塗佈 Poly-L-Lysine 薄膜;(C) 培養皿底部塗佈絲素蛋白薄膜厚度約 50μm;(D) 培養皿底部塗佈絲素蛋白薄膜厚度約 100μm。試驗結果顯示 CCD-966SK 細胞在絲素蛋白薄膜的盤中生長速度前7天較慢,第15天後的生長速度與對照組無顯著差異,絲素蛋白薄膜的厚度對細胞的生長亦無影響(圖一)。我們接著探討 CCD-966SK 細胞生長在奈米紡絲薄膜的情形,實驗組別分別為 Control 組:細胞生長在市售的細胞培養皿;Film 組:細胞生長在 Fibroin 製做的薄膜;Film+Silk 組:細胞生長在以 Fibroin 薄膜為載體的電紡奈米蠶絲纖維。將 2x10⁵ 個 CCD-966SK 細胞分別接種於上述三種不同基質的表面上,72 小時後以 Trypsin 處理細胞使其脫離基質,計算長在各種基質的細胞數目。結果顯示細胞接種於三種不同基質 72 小時後, Control 組細胞沒有明顯的增減,接種於 Film 及 Film+Silk 組的細胞則顯著的減少,推測可能是細胞原本即培養於材質上,轉貼在絲素蛋白薄膜或電紡紗基質上,初期細胞尚未適應的關係(圖二、圖三)。

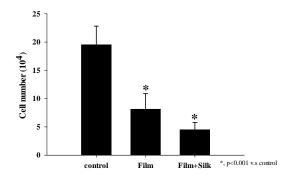


圖一. CCD-966SK 細胞生長在絲素蛋白薄膜分析。(A)市售的細胞培養皿;(B)培養皿底部塗佈 Poly-L-Lysine 薄膜;(C)培養皿底部塗佈絲素蛋白薄膜厚度約 50μm;(D)培養皿底部塗佈絲素蛋白薄膜厚度約 100μm。



圖二. CCD-966SK 細胞生長在奈米紡絲薄膜分析。Control 組:細胞生長在市售的細胞培養皿;Film 組:細胞生長在 Fibroin 鑄做的薄膜;Film+Silk 組:細胞生長在以 Fibroin 薄膜為載體的電紡紗。

Cell count-72hr

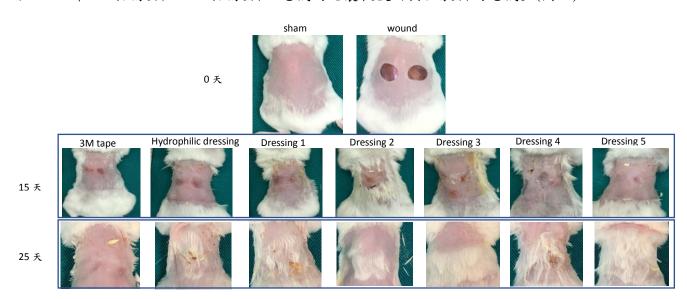


圖三. CCD-966SK 細胞分別接種於三種不同紡絲基質的細胞數目生長分析。 Control 組:細胞生長在市售的細胞培養皿; Film 組:細胞生長在 Fibroin 鑄成的薄膜; Film+Silk 組:細胞生長在以 Fibroin 薄膜為載體的電紡紗。

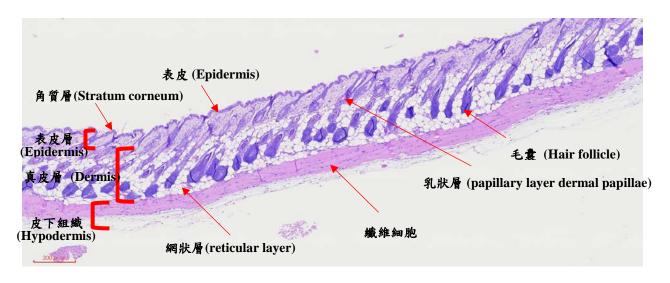
(2)奈米蠶絲纖維傷口敷料動物實驗

使用週齡為 5~6 週之 BALB/C female mice 小鼠,實驗組別將分成八組,每組各 6 隻。Sham 組:只剔除毛髮沒有傷口,其皮膚組織將作為創傷癒合組織之切片的對照;負對照組:Tegarderm tape(3M) 透氣性貼布;正對照組:Tegaderm Hydrocolloid Dressing(3M) 親水性敷料;試驗敷料 1:絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含絲素蛋白與絲膠蛋白(4:1)/薑黃素);試驗敷料 2:絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含薑黃素 5%);試驗敷料 3:絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含絲素蛋白與甲殼素(4:1)+薑黃素 5%);試驗敷料 4:絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含絲素蛋白+Genipin + Silver sulfadiazine 5%);試驗敷料 5:絲素蛋白薄膜(含絲膠蛋白+ Silver sulfadiazine 5%)。表皮傷口創傷模式誘發:將小鼠進行隨機分組後,利用 1.5~3vol% isoflurane 進行氣體麻醉,再以剃毛機將小鼠背部的毛髮剃除乾淨,捏起背部皮層再以打孔機(無菌消毒後)進行打孔穿過兩皮層,造成孔徑大小為 8mm 之兩個傷口,表皮傷口依照組別的不同給予不同的傷口敷料處理。傷口癒合效果評估:將小鼠進行乙醚氣體麻醉後掀開敷料進行拍照,拍照後再覆回敷料。實驗進行 25 天拍照後,將老鼠犧牲並取癒合傷口之皮膚組織切片及進行蘇木素-伊紅染色(hematoxylin & eosin stain 簡稱 HE 染色)。

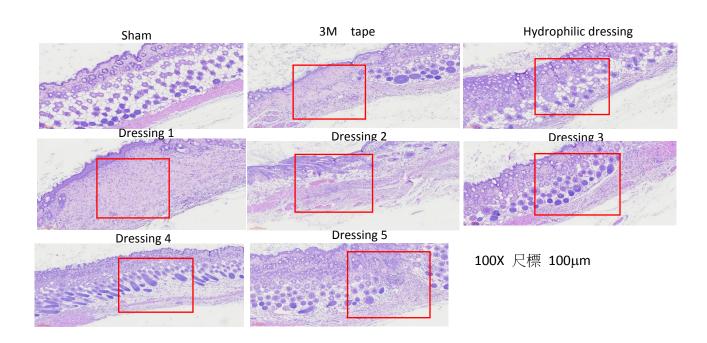
實驗結果顯示皮層傷口在兩週後都已癒合,但新的皮膚尚未完全長出。25 天後各組的傷口皮膚都已長出,但除了使用 3M 貼布的老鼠外,使用其他敷料的老鼠傷口處已開始長毛(圖四)。Sham 組正常皮膚組織切片後經 HE 染色,參考皮膚構造(附圖 1)很明顯可觀察很薄的表皮層,表皮層的最外層為角質層。表皮層底下為真皮層,內有染成深藍色的毛囊。真皮層底下為皮下層,可以看到被染成粉紅色的纖維母細胞(圖五)。傷口組織切片 HE 染色結果顯示,使用 3M 貼布、試驗敷料 1 及試驗敷料 2 老鼠的毛囊較使用其他敷料的老鼠少(圖六)。



圖四、奈米蠶絲纖維敷料動物實驗。實驗組別分別為 Sham 組:只剔除毛髮沒有傷口;負對照組:使用 Tegarderm TM tape(3M) 透氣性貼布;正對照組:使用 Tegaderm TM Hydrocolloid Dressing (3M) 親水性敷料;試驗敷料 1:絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含絲素蛋白與絲膠蛋白(4:1)/薑黃素);試驗敷料 2:絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含薑黃素 5%);試驗敷料 3:絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含絲素蛋白與甲殼素(4:1)+薑黃素 5%);試驗敷料 4:絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含絲素蛋白+ Genipin + Silver sulfadiazine 5%);試驗敷料 5:絲素蛋白薄膜(含絲膠蛋白+ Silver sulfadiazine 5%)。



圖五、老鼠正常皮膚構造。Sham 組正常皮膚組織切片後經 HE 染色顯示很薄的表皮層,表皮層底下為真皮層,染成深藍色的是毛囊。真皮層底下為皮下層,被染成粉紅色的是纖維母細胞。

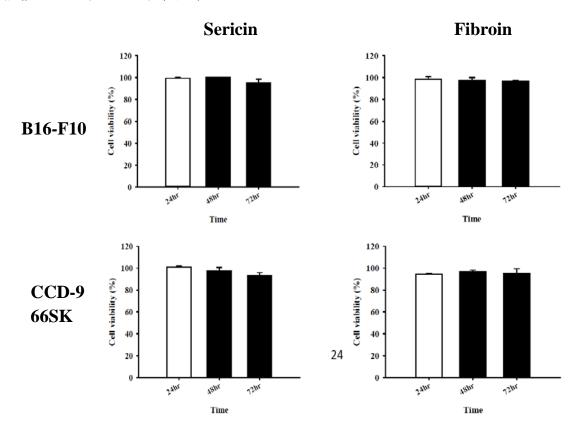


圖六、傷口組織切片 HE 染色。Shem 為正常皮膚組織切片;3M tape:使用 TegardermTM tape(3M) 透氣性貼布;Hydrocolloid dressing:使用 TegadermTM Hydrocolloid Dressing 親水性敷料; Dressing 1:使用絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含絲素蛋白與絲膠蛋白(4:1)/薑黃素); Dressing 2:使用絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含薑黃素 5%);Dressing 3:使用絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含絲素蛋白與甲殼素(4:1)+薑黃素 5%);Dressing 4:使用絲素蛋白薄膜+奈米電紡紗(含絲素蛋白+ Genipin + Silver sulfadiazine 5%);Dressing 5:使用絲素蛋白薄膜(含絲膠蛋白+ Silver sulfadiazine 5%)。

二、蠶絲蛋白皮膚保養功能性評估

(1)蠶絲蛋白安全性分析

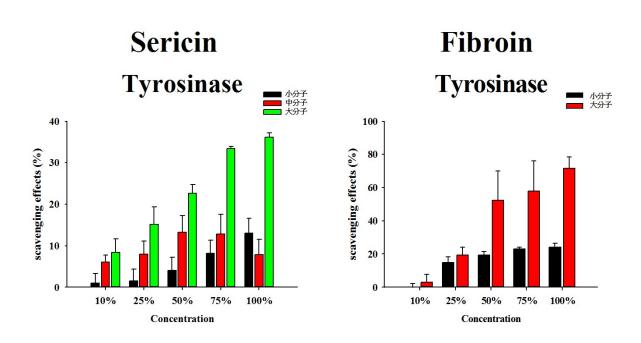
將小鼠黑色素瘤細胞 B16-F10 及人類皮膚纖維母細胞 CCD-966SK 細胞以含 10 % FBS 之培養基培養24小時使細胞貼附在培養皿後,換成含有蠶絲蛋白的培養液(Sericin濃度為 1mg/ml, Fibroin 濃度為 0.5mg/ml),之後再繼續培養 24、36、72 小時,以 MTT 分析細胞的存活率,以無蠶絲蛋白培養基的細胞存活率為 100%,結果顯示細胞培養基中含有 Sericin 或 Fibroin 不會影響細胞的存活與生長(圖七)。



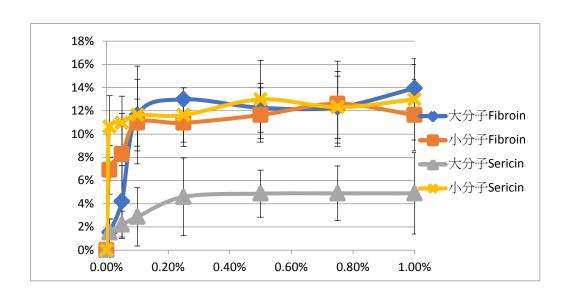
圖七、 蠶絲蛋白安全性分析。以 Sericin 及 Fibroin 處理小鼠黑色素瘤細胞 B16-F10 及人類皮膚纖維母細胞 CCD-966SK 細胞,進行 MTT 分析細胞存活率。

(2)美白功能性評估

酪胺酸酶是黑色素合成的重要酵素,如頭髮的顏色、皮膚的顏色,黑色素母細胞會分泌酪胺酸酶(Tyrosinase)對酪胺酸(Tyrosine)進行催化,受催化的酪胺酸會形成多巴(Dopa),酪胺酸酶再對多巴進行催化形成多巴醌(Dopaquinone),而多巴醌經過色素聚合物中間體之後便形成黑色素(Melanin),黑色素會往皮膚表層進行堆積。因此檢測樣品是否具有美白功能,可以檢測其抑制酪胺酸酶的活性。蠶絲蛋白抑制酪胺酸酶活性的試驗分別於體外(試管中)及體內(小鼠黑色素瘤細胞 B16-F10 內)進行測試,而絲膠蛋白及絲素蛋白水溶液分別區分為大分子(大於 35 kDa)及小分子(小於 11 kDa)來進行試驗。試管中抑制酪胺酸酶活性的效率實驗結果顯示不論絲膠蛋白或絲素蛋白,大分子的抑制效果比小分子好(圖八);而抑制細胞內酪胺酸酶實驗結果,發現小分子的蠶絲蛋白都有很好的抑制效果(圖九),大分子絲膠蛋白可能因為不易進入細胞,所以抑制細胞內酪胺酸酶活性的效果不佳。



圖八、絲膠蛋白及絲素蛋白抑制試管中酪胺酸酶活性的分析。



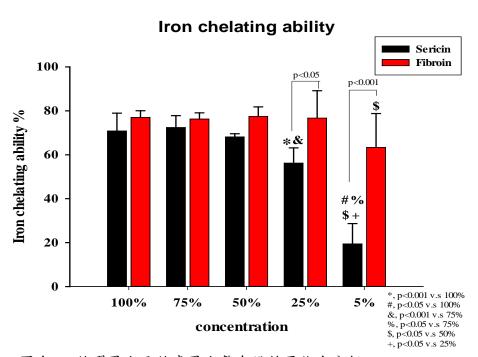
圖九、絲膠蛋白及絲素蛋白抑制小鼠黑色素瘤細胞 B16-F10 細胞內酪胺酸酶活性的分析。

(3)蠶絲蛋白抗老化功能評估

一般試驗樣品抗老化功能主要是評估其抗氧化的能力,人體在正常代謝過程中會產生自由 基(Free Radical)及活性氧(Reactive Oxygen Species),例如粒腺體是細胞內進行氧化作用產生能 量的主要場所,因此也是產生自由基及過氧化物的主要胞器。自由基是能獨立存在而具有不配 對電子的原子、離子或分子,分子量較大的自由基通常並不活躍,但小的自由基則相當活潑, 具有搶奪其它物質電子的特性;活性氧是氧的衍生物,最常見的有超氧自由基 O_2 (superoxide anion radical)、過氧化氫 H2O2 (hydrogen peroxide)、氫氧自由基 OH(hydroxyl radical)、過氧化 脂質 LOOH(lipid hydroperoxide)、一氧化氮 NO (nitric oxide)、單線態氧 (singlet oxygen, O2), 這些活性氧分子也大都是自由基。它們的共同特性是極為活潑不安定,具有向鄰近的分子奪取 電子的活性,使得被奪電子的分子氧化,形成另一個新的自由基,引發出一連串的連鎖氧化反 應。抗氧化劑是指任何可以去除自由基、抑制自由基的作用、或終止氧化連鎖反應的物質。人 體在正常生理狀況下,自由基在身體中維持動態平衡狀態,不會對身體造成傷害。因為人體中 有多種酵素及營養素分子,能有效抑制或減緩自由基或自由基所產生之氧化鏈鎖反應之物質, 建構起人體的保護網。在酵素系統方面最常見的有超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、過 氧化氫酶 (catalase, CAT)、穀胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)等,先由 SOD 將超氧自由基轉化為過氧化氫,再由 CAT 及 GSH-Px 轉化成對人體無害的氧及水。另外在營 養素有機分子方面最普遍的有類胡蘿蔔素 (β-carotene)、維生素 C、維生素 E、穀胱甘肽 (glutathione, GSH) 及輔酶 Q10 等,也以不同的機制幫助我們清除多餘的自由基。例如類胡 蘿蔔素能透過提供電子抑制活性氧的生成,達到清除自由基的目的、維生素 С 可提供自身的 氫給自由基形成穩定的分子、維生素 E 可中和過氧化自由基,結束自由基鏈鎖反應,有效地 抑制脂類過氧化作用、GSH 可以在 GSH-Px 的幫助下使許多體內的過氧化有機分子還原、有 些有機分子可與具有促氧化能力的金屬(例如鐵或銅離子)產生螯合作用,以減少金屬離子參與 的氧化連鎖反應。因為人體內自由基過度累積時,就會使身體正常機能受到傷害並導致疾病。

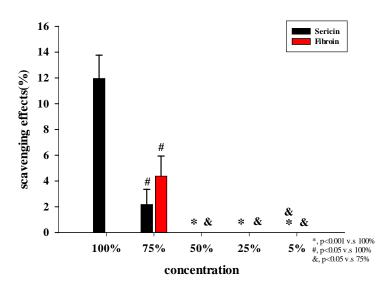
因此可以藉由強化身體本身的酵素系統與補充更多清除自由基的營養素,來使身體中的自由基維持平衡。

本研究以不同濃度的絲膠蛋白及絲素蛋白進行抗氧化功能評估,進行以下四項活性檢測,包括:亞鐵離子螯合能力、清除 DPPH 自由基能力、清除 ABTS 陽離子自由基能力、以及還原能力。結果顯示絲膠蛋白及絲素蛋白在濃度達到 50%以上具有顯著的螯合鐵離子能力,而且絲素蛋白的螯合能力比絲膠蛋白高,在濃度 5%即有 60%以上的清除能力(圖十)。分析絲膠蛋白及絲素蛋白清除 DPPH 抗自由基之效果,顯示兩者的清除能力不佳(圖十一)。絲膠蛋白及絲素蛋白清除 ABTS 陽離子自由基能力之抗氧化實驗結果顯示,濃度 25%以上具有 80%以上的抗氧化能力(圖十二)。測定不同濃度之絲膠蛋白及絲素蛋白還原能力,結果顯示絲素蛋白有較高的還原能力,而絲膠蛋白使在 100%的濃度其還原能力與對照組無顯著差異(圖十三)。

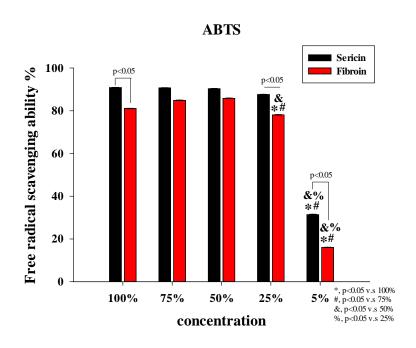


圖十、 絲膠蛋白及絲素蛋白螯合鐵離子能力分析

DPPH assay

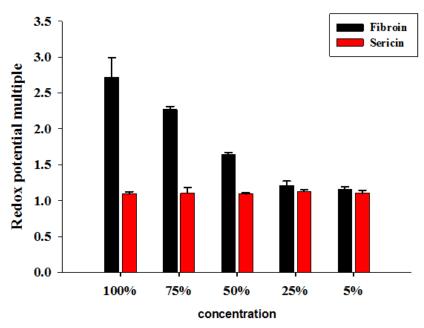


圖十一、絲膠蛋白及絲素蛋白清除 DPPH 自由基之效果分析



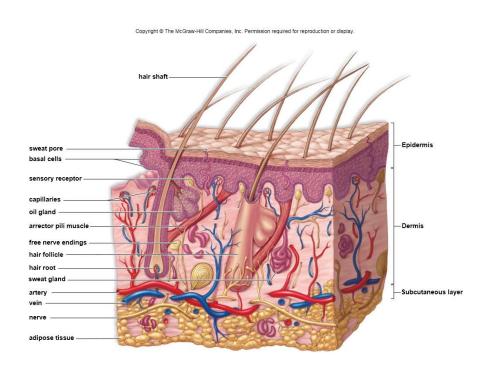
圖十二、 絲膠蛋白及絲素蛋白清除 ABTS 陽離子自由基能力分析

Redox potential



圖十三、絲膠蛋白及絲素蛋白還原能力分析,顯示不同濃度的 絲膠蛋白及絲素蛋白其還原能力為對照組還原能力 的倍數。

附圖



附圖一、皮膚構造(資料來源: BIOLOGY Inquiry into Life, 14 Edition)

參考文獻

- 1. 江孟儒 戰後台灣蠶業之研究 2008 國立政治大學歷史學系研究所碩士論文
- 2. Altman Gregory H., Frank Diaz, Caroline Jakuba, Tara Calabro, Rebecca L. Horan, Jingsong Chen, Helen Lu, John Richmond, David L. Kaplan. 2003. Silk-based biomaterials. Biomaterials 24, 401-416.
- 3. Aramwit P., T. Siritientong and T. Srichana. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. Waste Management & Research. 2012, 30(3) 217–224.
- 4. Atala A., Stuart B Bauer, Shay Soker, James J Yoo, Alan B Retik. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. The Lancet. 2006. 367(9518) P1241-1246.
- 5. Bhardwaj N., Y. P. Singh, D. Devi, R. Kandimalla, J. Kotoky and B. B. Mandal. Potential of silk fibroin/chondrocyte constructs of muga silkworm Antheraea assamensis for cartilage tissue engineering. 2016. *J. Mater. Chem. B*, 4, 3670-3684.
- 6. Boveris A., Cadenas E. (1997) .Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen speciesMarcel Dekker. Inc, New York.
- 7. Chen X., D. P. Knight, Z. Shao, F. Vollrath. 2001. Regenated *Bombyx* silk solution studied with rheometry and FTIR. Polymer (42) 9969-9974.
- 8. Childs R., Bardsley W. (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. Biochem J, 145: 93-103.
- 9. Dinis T., Madeira V., Almeida L. (1994) .Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 315(1): 161–169.
- 10. Etienne O., Aurore Schneider, Jonathan A. Kluge, Claire Bellemin-Laponnaz, Camille Polidori, Gary G. Leisk, David L. Kaplan, Jonathan A. Garlick, and Christophe Egles. Soft tissue augmentation using silk gels: an *in vitro* and *in vivo* study. *J. Periodontol*. 2009. 80(11): 1852–1858
- 11. Feng Z. Q., X. Chu, N. P. Huang, T. Wang, Y. Wang, X. Shi, Y. Ding, Z. Z. Gu. The effect of nanofibrous galactosylated chitosan scaffolds on the formation of rat primary hepatocyte aggregates and the maintenance of liver function. Biomaterials, 30(14) (2009), pp. 2753-2763.
- 12. Feng Z. Q., X. H. Chu, N. P. Huang, M.K. Leach, G. Wang, Y. C. Wang, Y. T. Ding, Z. Z. Gu. Rat hepatocyte aggregate formation on discrete aligned nanofibers of type-I collagencoated poly (L-lactic acid). Biomaterials, 31(13) (2010), pp. 3604-3612.
- 13. Gil Eun Seok, Sang Huyg Park, Jeff Marchant, Fiorenzo Omenetto, and David L. Kaplan. Response of human corneal fibroblasts on silk film surface patterns. Macromol Biosci. 2010. 10(6): 664–673
- 14. Gil Eun Seok, Jonathan A. Kluge, Danielle N. Rockwood, Rangam Rajkhowa, Lijing Wang, Xungai Wang, and David L Kaplan. Mechanical improvements to reinforced porous silk scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2011. 99(1): 16–28.
- 15. Gil, E. S., B. Panilaitis, E. Bellas, and D. L. Kaplan. Functionalized Silk Biomaterials for

- Wound Healing. Adv. Healthcare Mater. 2013, 2, 206–217.
- 16. Gulrajani M. L., Roli Purwar and M. Joshi. A Value Added Finish from Silk Degumming Waste Liquor. 2008, www.fibre2fashion.com
- 17. House M., Cristina C. Sanchez, William L. Rice, Simona Socrate, and David L. Kaplan. Cervical tissue engineering using silk scaffolds and human cervical cells. Tissue Engineering Part A. June 2010, 16(6): 2101-2112
- 18. Janani G., S. K. Nandi, B. B. Mandal. Functional hepatocyte clusters on bioactive blend silk matrices towards generating bioartificial liver constructs. Acta Biomaterialia. 2018. 67:167-182.
- 19. Khalifa, B., N. Ladhari, and M. Touay. 2012. Application of sericin to modify textile supports. The Journal of The Textile Institute Vol. 103, No. 4, April 2012, 370–377.
- 20. Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M. & Kaplan, D.L. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* (2005) **26**, 2775–2785.
- 21. Lawrence Brian D., Jeffrey K. Marchant, Mariya Pindrus, Fiorenzo Omenetto, and David L. Kaplan. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials*. 2009. 30(7): 1299–1308
- 22. Lesnefsky E. (1994) .Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. Biol, 129–146.
- 23. Lovetta M., Christopher Cannizzaroa,b, Laurence Daheronc,d, Brady Messmera, Gordana Vunjak-Novakovice, David L. Kaplana. Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering. Biomaterials 28 (2007) 5271–5279
- 24. Mandal Biman B., Sang-Hyug Park, Eun Seok Gil, and David L. Kaplan. Multilayered silk scaffolds for meniscus tissue engineering. Biomaterials. 2011. 32(2): 639–651.
- 25. Mandal Biman B., Ariela Grinberg, Eun Seok Gil, Bruce Panilaitis, and David L. Kaplan. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. PNAS. 2012. 109(20): 7699–7704.
- 26. Mark S. (1997) . Polymer science dictionary. Springer, 152.
- 27. Meir S., Kanner J., Akiri B., Hadas S. (1995) .Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. Food Chem, 43: 1813-1817.
- 28. Mondal, M., K. Trivedy and S. Nirmal Kumar. 2007. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn., a review. Caspian J. Env. Sci. 2007, Vol. 5 No. 2 pp. 63~76
- 29. Om P. Sharma., Tej K. Bhat. (2009) .DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry, 113(4): 1202–1205.
- 30. Oyaizu M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese Journal of Nutrition, 44: 307-315.
- 31. Padamwar M. N. and A. P. Pawar. Silk sericin and its application: a review. Journal of Scientific & Industrial Research. 2004, 63:323-329
- 32. Padamwar Mahesh N, A. P Pawar, A. Daithankar & K R Mahadik. Silk sericin as a moisturizer:

- an in vivo study. Journal of Cosmetic Dermatology. 2005, 4:250–257
- 33. Patel RJ. and M. K. Modasiya. Sericin: Pharmaceutical Applications. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 2011, Vol. 2 (3) 913-917.
- 34. Rockwood Danielle N., Rucsanda C Preda, Tuna Yücel, Xiaoqin Wang, Michael L Lovett & David L Kaplan. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. Nature protocols. 2011, Vol.6, No.10, 1612-1631.
- 35. Rodriquez M., Flurkey W. (1992). A biochemistry project to study mushroom tyrosinase. Journal of chemical education, 69 (9): 767-769.
- 36. Sah M. K. and K. Pramanik. Regenerated silk fibroin from B. mori silk cocoon for tissue engineering applications. International Journal of Environmental Science and Development. 2010. 1(5): 404-408.
- 37. Shevchenko Rostislav V., Stuart L. James and S. Elizabeth James. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J. R. Soc. Interface* 2010. **7**, doi: 10.1098
- 38. Sobajo C, Farhad Behzad, Xue-Feng Yuan, and Ardeshir Bayat. Silk: A Potential Medium for Tissue Engineering. Open Access Journal of Plastic Surgery. 2008. 8: 438-446.
- 39. Teramoto H., K. Nakajima, C. Takabayashi. Preparation of elastic silk sericin hydrogel. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005, 69(4) 845-847.
- 40. Vaithanomsat P. and C. Punyasawon. Production of Water-Soluble Silk Powder from *Bombyx mori* Linn (Nang-Noi Srisakate 1). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 2006, 40: 152 158
- 41. Vepari, Charu and David L. Kaplan . Silk as a biomaterial. Prog. Poly. Sci. 2007, 32. 991-1007.
- 42. Voegeli R., J. Meier, and R. Blust. Sericin silk protein: unique structure and properities. Cosmet Toilet. 1993, 108:101-108
- 43. Wang Yongzhong, Dominick J. Blasioli, Hyeon-Joo Kim, Hyun Suk Kim, David L. Kaplan. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. Biomaterials 2006. 27: 4434–4442
- 44. Wharram, S.E., Zhang, X.H., Kaplan, D.L. & McCarthy, S.P. Electrospun silk material systems for wound healing. *Macromol. Biosci.* 2010. 10, 246–257.
- 45. Yan Le-Ping, Joaquim M. Oliveira, Ana L. Oliveira, Sofia G. Caridade, Joao F. Mano, Rui L. Reis. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. Acta Biomaterialia 2012. 8: 289–301.

桂花開發為健康食品原料之研究

Study on sweet olive to develop as health food materials

計畫編號:107-中基-農-1

計畫主持人:王靜瓊教授 a

協同主持人: 侯文琪教授 b、陳立耿副教授 c

執行單位: a臺北醫學大學藥學系及生藥學研究所b、嘉義大學微生物免疫與生物藥學系c

摘要

目的:利用健康食品之【延緩老化】功效之評估方法,以 acteoside 做為延緩 老化之功效指標成分,開發桂花萃取物做為新的保健食品之原料。

結果: 丹桂及銀桂萃取物的主要成分皆為毛蕊花糖苷 (acteoside) 為,且指紋圖比較無異。利用熱水、50%及 95%酒精萃取後,其對主成分影響不大。但以 95%酒精之萃取物雜質較少,因而利用 95%酒精萃取物建立分離毛蕊花糖苷之標準作業流程,快速分離得到大量之指標成分。抗老化的實驗中,結果顯示,酒精萃取物具有顯著抑制 Gal/BSA 模式醣化反應,但利用半乳糖誘導BALB/c 小鼠老化之體內試驗中,無顯著改善作用。28 天的管餵毒性試驗發現,雖無顯著影響肝腎功能,但高劑量(5g/kg)會顯著使體重下降,建議使用劑量應該小於 2g/kg。綜合上述結果,桂花要開發為健康食品時,使用劑量將是核心關鍵。而桂花水萃取物可以抑制 NO 產生及酪胺酸酶活性作用,建議未來桂花水萃取物可以應用於醫美化妝品原料。

關鍵詞

桂花(sweet olive)、保健食品原料(health food material)、抗氧化(anti-oxidation)、延緩老化(anti-aging)、毛蕊花糖苷(acteoside)、指標成分(substance marker)

桂花之名稱出自「本草綱目拾遺」,具植物分類,桂花屬木犀科(Oleaceae) 木犀(Osmanthus fragrans Lour.)所開之花¹。木犀為灌木或小喬木,多分枝,木質堅硬。葉互生,偶呈對生,柄長 5-7mm,葉片革質,橢圓形或長橢圓狀批針形,長 4-11cm,寬 1.5-5.5cm,基部楔形,先端突尖或漸尖,銳鋸齒緣或全緣。花腋出,簇生,雌雄異株,梗細弱¹。花萼 4 裂花冠亦 4 裂,白色或乳黄色,花芳香濃郁。雄花具雄蕊 2 枚,藏於花內¹。雌花具雌蕊 1 枚,花柱圓柱形,柱頭頭狀,子房 2 室。核果長橢圓形,內含種子 1 枚,花期全年。如李時珍「本草綱目」曰:「今人所栽巖桂,俗呼為木犀,其花有白者名銀桂,黃者名金桂,紅者名丹桂。」。銀桂,花朵顏色較白,稍帶微黃,香氣較淡,葉片較薄為 Osmanthus fragrans var. latifolius;金桂,花朵金黃,香氣濃郁,葉片較厚為 Osmanthus fragrans var. thunbergii;丹桂,花朵顏色橙黃,氣味濃郁,葉片厚,色深為 Osmanthus fragrans var. aurantiacus。除上述三種品系,台灣還有一種花朵顏色稍白,或淡黃,香氣較淡,葉片薄,長年開花的四季桂為 Osmanthus fragrans var. semperflorens。

桂花屬臺灣受歡迎的園藝植物,具有【貴族之家】之喻意。除其香氣樹形適合觀賞外,其花陰乾,去雜質,密封儲藏,具有化痰、散瘀之效,治痰飲喘咳,腸風血痢,牙痛,口臭等功效 1 ,亦為民間調製花草茶原料之一。其枝葉、根亦作藥用。枝葉治風濕、小兒受驚;根治胃痛、牙痛、風濕麻木、筋骨疼痛 1 。另,根據現代研究發現,其花、葉、莖成分各有不同:花中含有: γ -decanolactone、 α -ionone、 β -ionone、trans-linalool oxide、cis-linalool oxide, linallol、pelargonaldehyde、 β -phellandrene、nerol、geraniol、dihydro- β -ionone acteoside、salidroside、rutin、(+)-phillygenin、phillyrin、(-)-phillygenin、taxiresinol、(-)-olivil $^{2-5}$ 、isoacteoside、chlorogenic acid、caffeic acid $^{6-7}$ 、lignans、sterols、pomolic acid、ligstroside $^{2,8-9}$,花蠟中含有碳氫化合物、月桂酸、肉荳蔻酸、棕櫚酸、硬脂酸等。葉中含有: α -amyrin、 β - amyrin、 β - sitosterol 、betulin 、uvaol、oleoside dimethyl ester、oleuropein 和 syringin ... 等。且桂花萃取物或其主要成分亦具有清除自由及保護神經等功能(表一)。

表一、桂花萃取物及主要成分之藥理活性

藥理作用	有效成分
清除自由基 5,10,18-20	
神經保護 5,11,18-20	
抑制酪胺酸酶活性 ^{5,12,18-20}	
抗氧化活性 6、抑制 D-半乳糖誘導的神經老化 13	acteoside
獨特香氣之成分 14-15	β - and α -ionone
抑制 NO 產生 3、抗真菌和抗菌作用 16-17	lignans
人類的卵巢腺癌細胞凋亡8	pomolic acid
抑制過敏性氣道炎症 ¹⁰	
對於金黃色葡萄球菌,枯草芽孢桿菌和大腸桿菌之抗	黄酮類
菌作用 ²¹	

再者,衛生福利部亦公告桂花屬可食用之食品原料,且有文獻報導其 80% 酒精萃取物進行 90 天亞急性毒性試驗,未出現顯著之毒性。因此本研究擬根據台灣保健食品之延緩老化之功效評估方法中 D-半乳糖造成衰老動物模型評估桂花之功效。

醣類在日常飲食中是很重要的角色,但攝取過量的 D-半乳糖會引起重要器官如心、肝、腎、腦異常代謝,最後會產生衰老症狀。連續在動物體內注射 D-半乳糖,使細胞內半乳糖濃度過高,D-半乳糖在醛糖還原酶的催化下,還原成半乳糖醇,此不可被細胞進一步的代謝因而堆積於細胞內,影響細胞之正常滲透壓導致細胞腫脹,功能障礙,最中引起衰老。另外 D-半乳糖也受半乳糖合成酶的作用,代謝過程中產生自由基,降低動物抗氧化能力引起衰老。近年也有研究指出 D-半乳糖造成衰老動物模型與細胞內鈣離子超載有密切關係,鈣離子的穩定失衡進而干擾神經功能,因而造成細胞毒性至細胞死亡,導致如阿茲海默症等神經衰退疾病發生 ²²⁻²⁴。

綜合老化原因自由基的產生是老化的源頭,所以當樣品可以抗氧化時,則抗老化的作用相對提高。因此本研究將以抗氧化作用,作為篩選追蹤活性成分之方法。故本研究第一年以抗氧化分析桂花,確認最佳品系,並以活性追蹤分離其活性成分。然而,該活性成分,不是作為藥物開發使用,而是作為桂花萃取物之品質標準指標。

第二年則利用體外抑制糖化反應瞭解萃取物之作用機轉,並利用 D-半乳糖

造成衰老動物模型瞭解其有效劑量。

臺灣適合栽種桂花,且為普遍的園藝植物,故具有發展之優勢。目前雖無大面積栽種之農戶,但有許多自種、自銷之觀光農園。如:茶香桂花農園,該農園種有百年桂花,並自製許多相關之產品,曾被各大媒體報導。若能透過此計畫之成果,瞭解如何應用桂花於抗氧化及延緩老化之作用,相信可助於相關農園的產業競爭力,並促使未來擴大栽培面積。

實驗方法

1. 建立桂花萃取物及指標成分品質系統

(1) 植物材料

自中國購入桂花 (銀桂 Osmanthus fragrans var. latifolius; 金桂 Osmanthus fragrans var. thunbergii; 丹桂 Osmanthus fragrans var. aurantiacus),經鑑定基原無誤後,粉碎成粗粉,供做實驗用材料。另將少量新鮮桂花以冷凍乾燥方式處理,供做成分比對之用。

(2) Acteoside 及桂花抗氧化成分之分離、純化

將粉碎之桂花以十倍量乙醇加熱迴流萃取一小時,重複二次;過濾、 濾液濃縮後加水,以乙酸乙酯進行液-液分配劃分成乙酸乙酯及水層兩個 劃分部,各劃分部分別進行抗氧化活性篩選。

選擇具抗氧化活性之劃分部進行管柱層析分離其活性成分,以 Diaion HP-20 $(H_2O\rightarrow 20\% MeOH\rightarrow 40\% MeOH\rightarrow 60\% MeOH\rightarrow 70\% Acetone)$, Toyopearl HW-40(F) $(H_2O\rightarrow 40\% MeOH\rightarrow 50\% MeOH\rightarrow 60\% MeOH\rightarrow 70\% MeOH\rightarrow MeOH-Acetone-H_2O (8:1:1) \rightarrow MeOH-Acetone-H_2O (7:2:1) \rightarrow MeOH-Acetone-H_2O(6:3:1) \rightarrow 70\% Acetone)$, Sephardex LH-20 $(H_2O\rightarrow 20\% MeOH\rightarrow 40\% MeOH\rightarrow 60\% MeOH\rightarrow 80\% MeOH\rightarrow MeOH)$ 等層析管柱依次進行成分分離。若仍無法獲得純化合物則繼續以 MCI-gel CHP-20P 管柱、ODS 管柱、製備級 HPLC 等進行純化精製。再以 NMR, 2D-NMR, IR, UV, ESI-Mass, Element Analysis 等儀器進行結構式鑑定。

(3) 桂花萃取物之 HPLC 指紋圖譜建立與分析方法

建立逆相之高效率液相層析法 (HPLC)分析萃取物之指紋圖譜,並定

量 acteoside 方法。

I.樣品製備方法

取適量桂花加十倍體積之溶媒(不同極性之溶媒),以 65 °C 加熱 迴流 2 小時,過濾,花渣再加十倍體積之溶媒,用 65 °C 加熱迴流 2 小時,過濾,合併濾液,濃縮後,冷凍乾燥。

II. HPLC 定量 acteoside 條件

層析管:十八矽烷鍵結矽膠管柱,充填粒徑 $5\sim10\mu m$,內徑 $4\sim6$ mm,長度 $15\sim25$ cm。管柱溫度:40 °C。偵測波長:277 nm。注入量: $10~\mu L$ 。移動相:0.5% TFA: acetonitrile 80:20。利用標準品進行檢量線分析,以內插法估算樣品中 acteoside 含量。

2. 抗氧化活性評估

(1) DPPH 自由基清除活性評估法

各萃取物、劃分部或分離純化成分之自由基清除活性篩選追蹤採用 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)自由基清除活性評估法。待測樣品(0.5mg)溶於 4ml 甲醇中,與 1.0ml 50mM DPPH 甲醇溶液混合均匀靜置 30 分鐘,於波長 517nm 測定其吸光度,以相同步驟進行空白對照組、α-tocopherol、BHA 正對照組並比較其自由基清除活性。

(2) 超氧陰離子自由基(Superoxide anion radical)之清除活性

0.1 ml 之 superoxide dismutase (SOD)水溶液(5, 10, 25, 50, 100 units/ml)及待測樣品溶液(0.2mg/ml)分別加入 1.0 ml 反應混合物 [含 0.4 mM xanthine, 0.24mM nitro blue tetrazolium chloride (NBT)溶於 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0)]及 1.0 ml xanthine oxidase (0.049 units/ml 以 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0)稀釋),將溶液混勻後於 37 oC 反應 20 分鐘後加入 2.0 ml 之 69mM sodium dodecylsulphate (SDS)水溶液终止反應,於波長 560nm 測定 NBT 吸光度。待測物之超氧陰離子自由基(Superoxide anion radical)清除活性藉由 SOD 標準曲線換算為 SOD equivalents (SOD units / mg)。

(3) 脂質過氧化評估

Wistar 大鼠利用 CO_2 犧牲,迅速取出腦後保存於 -20° C,利用均質器 加入腦 5 倍重量之 1 M PBS 溶液,在冰浴下製成組織均質液,均質液經 2000 rpm 之轉速下離心 10 分鐘,取出上清液並利用 Bioquant 定量蛋白質。大鼠腦均質液蛋白質濃度定量為 $340~\mu g$,將腦均質液分別加入 125~m M t-BuOOH 及各種試驗樣品,於 37° C下反應 90~分鐘,反應溶液利用 3000~r pm 轉速下離心 20~分鐘,取其上清液再分別加入 H_3PO_4 及 TBA,於 90° C下反應 90~分鐘,冰浴後加入 MeOH-NaOH 終止反應,於波長 530~n m 下分析 MDA 之含量。

3. 確認桂花萃取物安全之劑量

3-1. 餵服 28 天,評估體內毒性試驗

28 天餵食毒性試驗之目的是測試試驗物質經重覆給予 28 天後對哺乳類動物可能產生之毒性影響,了解毒性變化之產生,同時測定無毒性顯示之劑量(no-observed-adverse-effect level, NOAEL)。

3-1.1 動物品種及性別

雄性, ICR 小鼠 (20-25 克), 週齡為 5 週。

3-1.2 動物數量

每個劑量組使用 9 隻 ICR 雄性小鼠

3-1.3 試驗物質給予途徑

一般採用胃管經口餵食(gavage),必要時得混入飼料或飲水中。 採用 胃管經口餵食時之餵食體積應在 10 ml/kg 動物體重以下,若餵食體積過高, 可採多次餵食方式,但須在 6 小時內完成。

3-1.4 試驗物質給予期間

每天固定時間給予試驗物質,連續28天。

3-1.5 劑量範圍

實驗分組及 50% 酒精萃取物之劑量(1) 高劑量組(5g/kg) 9 隻;(2) 低劑量組(0.5g/kg) 9 隻;(3) 空白組 9 隻。

3-1.6 觀察與檢驗

(1)臨床觀察

每天觀察動物至少二次(兩次時間間隔不得少於六小時),以確定死亡情 形。每天觀察試驗動物的臨床症狀一次以上,記錄試驗動物顯示的毒性作 用,包括作用之開始及過程。

(2)體重:

試驗開始給予試驗物質前,測量動物體重;試驗期間每天測量一次。

(3)臨床生化值檢查

血清生化檢驗 (Clinical Chemistry) 試驗動物須在試驗結束前採樣 以進行血清生化檢驗肝 (GOT/GPT)與腎(BUN/Creatinine)功能等。

2. 延緩老化之體內外活性評估

- 2-1. 體外試驗:抑制糖化反應評估
 - (1) 初期醣化作用之試驗 (BSA Glucose assay)

模擬高血糖環境, 偵測抗氧化物是否具高醣所造成之初期 BSA 修飾抑制能力。試劑以含 0.2 g/L NaN3 之 1.5 M PBS (pH7.4)配製。將 BSA (50 mg/mL)與 glucose (144 mg/mL)分別在有無添加測試樣品的條件下,於 37 °C、5% CO2 及飽和水蒸氣的恆溫培養箱反應,以螢光光度計每天偵測 Ex.360 nm; Em.460 nm 之螢光值。

(2) 中期醣化作用之試驗 (MGO Glucose assay)

蛋白質醣化及葡萄糖自氧化過程中期可能形成具雙羰基結構的活性羰化物,如 Methylglyoxal (MGO)。試劑以含 0.2 g/L NaN3 之 0.1 M PBS (pH 7.4)配製。將 20 mg/mL BSA 與 0.3 M MGO 分別在有無添加測試樣品的條件下,於 37 ℃、5 % CO2 及飽和水蒸氣的恆溫培養箱,無菌環境下反應,以螢光光度計每天偵測 Ex. 360 nm;Em. 460 nm 之螢光值。

- 2-2. 體內試驗:D-半乳糖引起小鼠過氧化之動物模式 (根據健康食品延緩 老化之評估方法)
 - (1) 原理: D-半乳糖供給過量, 大量產生活性氧, 打破了受控於遺傳模式的活性氧產生與消除的平衡狀態, 引起過氧化效應。

(2) 動物模型方法:選3月齡健康成年的小鼠,用 D-半乳糖 1.2 g/kg.bw 頸背部皮下注射模型,注射量為 0.1 ml/10g.bw,每日 1 次,連續 6 週,取血測 MDA,按 MDA 水平隨機分組,如上述之分組方式。在給受試物同時,除空白對照組外,各組繼續給予 D-半乳糖 1.2 g/kg.bw 頸背部皮下注射,空白對照組皮下注射生理鹽水,30 天後,犧牲動物測氧化指標和生化指標。

3. 皮膚保護活性分析

3-1. LPS 誘導 RAW 264.7 細胞產生 NO 之發炎模式

LPS 刺激 RAW 264.7 細胞誘導 iNOS 產生 NO, 也會使 COX-2 酵素活化進而誘導 PGE $_2$ 生成,而 PGE $_2$ 生成及 NO 皆會導致發炎反應。因而本實驗將以 Western blot 觀察 iNOS 及 COX-2 等蛋白表現,及利用 EIA 等技術檢測 NO 及 PGE $_2$ 之含量之模式,評估桂花是否具抗發炎作用。

3-2.酪胺酸酶活性評估

在人體中,Tyrosine 會經酪胺酸酶反應最終形成黑色素,是皮膚變黑的主要因素,反應過程中 Tyrosine 會先行成 L-Dopa,再由 L-Dopa 經酪胺酸酶氧化成 Dopachrome。根據研究,Dopachrome 於 492nm 具波段具有吸收波長,可藉由 Dopachrome 生成多寡,進一步評估胺酸酶氧催化活性。本實驗即偵測反應溶液於 492nm 波段的吸收值,評估 Dopaquinone 的形成,並進一步推算酪胺酸酶活性受測試物質抑制的狀況,藉此開發具有抑制酪胺酸酶活性之美白原料。

3-2.2 實驗步驟

- (1) 實驗進行前 30 分鐘先開儀器溫機,設置溫度為 37℃,吸收波長為 492nm。
- (2) 於 96 孔盤的測試 well 中加入 90 μL 0.1U 酪胺酸酶溶液,並加入 50μL 待測物 Y 之序列稀釋溶液(實驗組)或序列稀釋之 Kojic acid(對照組), 以 0.1M Phosphate Buffer 及物質溶解溶劑分別為實驗組及對照組之空白試驗。(本試驗最少進行三重複)

- (3) 將測試盤置於 37℃中, 400rpm 均匀混和 15 min。
- (4) 測試盤入機器內,進行492nm 波段吸收測試,進行兩次數據測試並取 其平均值為背景值。(A₀為空白測試之背景值;B₀為實驗組或對照組 測試之背景值)
- (5) 取出測試盤,於各 well 中分別加入 60μL 6 mM L-Dopa 溶液,並置於 37℃中混合反應(400rpm)15 分鐘。
- (6) 測試盤再進行 492nm 波段吸收測試,進行兩次數據測試並取其平均值 為測試值,扣除背景值後,初步計算抑制程度,根據數據分布,找尋 待測物質 Y 最合適之測試濃度。公式如下:

$(A-A_0)-(B-B_0)/(A-A_0)*100\%$

A:為空白組所得之吸收值。B:為實驗組或對照組所得之吸收值。 A₀:為空白組背景值。 B₀:為實驗組或對照組背景值

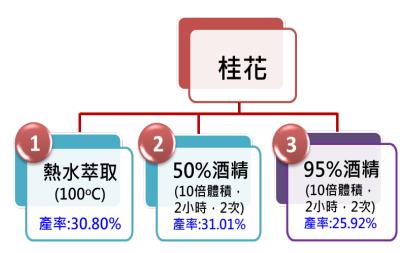
- (7) 將所得之三組抑制程度數據平均後,利用 GraFit 軟體計算出 Kojic acid 之 IC50數值,評估測試穩定度,當此數值不明顯偏差參考範圍時,此 測試稱之為有效測試。
- (8) 同步驟7,初步評估待測物 Y 之抑制程度與濃度之關係,選擇此待測物 Y 合適之七個濃度點,並重複步驟 1~7,最後進行待測物 Y 之 IC50 數值計算。

4. 實驗數據統計分析:

採用 SAS 電腦統計套裝軟體(SAS institute, Cary, NC)進行變異數分析 (analysis of variance, ANOVA),並以 Duncan's test 來測試不同處理間顯著差異效果(P<0.05)。

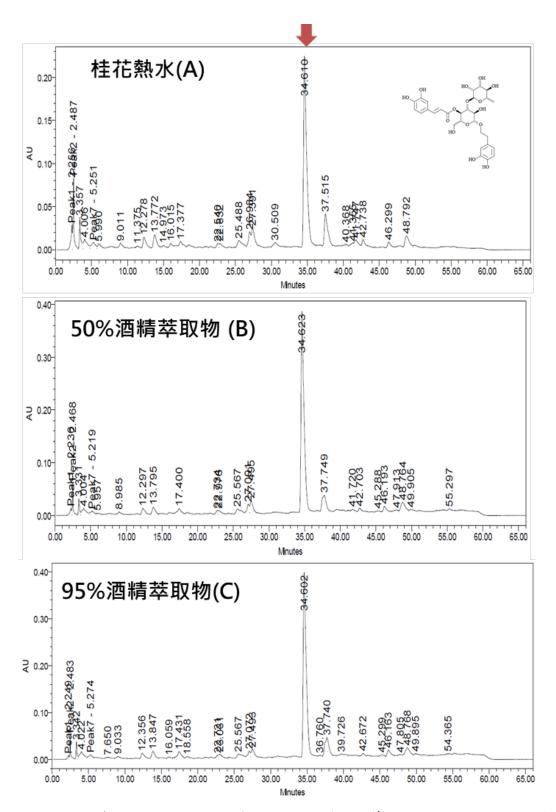
結果

- 一、桂花枝成分分析結果
- 1. 萃取方法與產率:利用 3 種溶媒萃取桂花,其方法與產率如圖一。結果顯示:95%酒精萃取之產率最低。



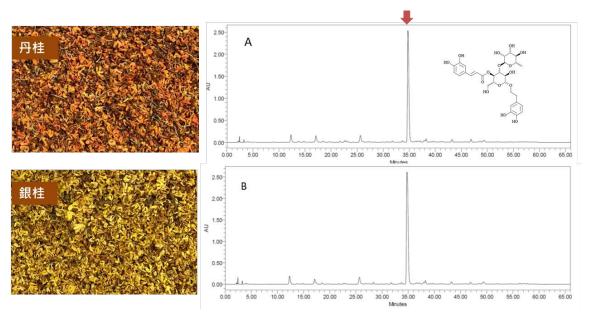
圖一、 桂花之萃取方法與產率

2. 桂花不同萃取方法成分比較:桂花利用熱水、50%及 95%酒精萃取後,其萃取物的指紋圖比較仍無顯著差異,且毛蕊花糖苷 (acteoside, Rt 34.5 min)為主要成分(圖二)。



圖二、桂花之熱水(A) 50%酒精(B) 95%酒精 (C)萃取物之 HPLC 指紋圖譜 管柱:LiChrospher 100 RP-18e (4 mm i.d. \times 250mm, 5 μ m),移動相:0.05% Trifluoroacetic acid-CH₃CN (0min, 95:5; 55min, 70:30; 56 min, 95:5; 66 min, 95:5),流速:1.0ml/min 管柱温度:40°C 檢測波長:280nm,樣品濃度:(1g/10 ml MeOH)

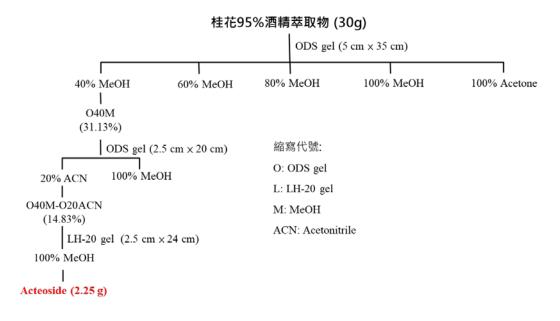
3. 不同桂花之成分比較: 丹桂與銀桂以 95%酒精萃取後, 其萃取物的指紋圖相似(圖三), 且毛蕊花糖苷為主要成分。



圖三、 丹桂(A) 和銀桂(B) 95%酒精萃取物之 HPLC 指紋圖譜

二、建立桂花主成分分離之標準作業流程

桂花 95%酒精萃取物,經 ODS 管柱分離後,可以得到 7.52%的**毛蕊花糖苷** acteoside,建立分離純化之標準流程 (圖四)。



圖四、 桂花之毛蕊花糖苷 acteoside 分離之標準作業流程圖

三、桂花萃取物對抗老化作用之評估

利用清除自由基能力、抑制醣化反應及神經細胞保護活性之方法評估桂花之 抗老化作用,結果顯示:50、90%酒精萃取物具有顯著之功效。但利用半乳糖誘導 BALB/c 小鼠老化之體內試驗中,50%酒精萃取物無顯著改善作用。推測該萃取 物於體內可用率低影響功效。

1. 桂花樣品之自由基清除能力

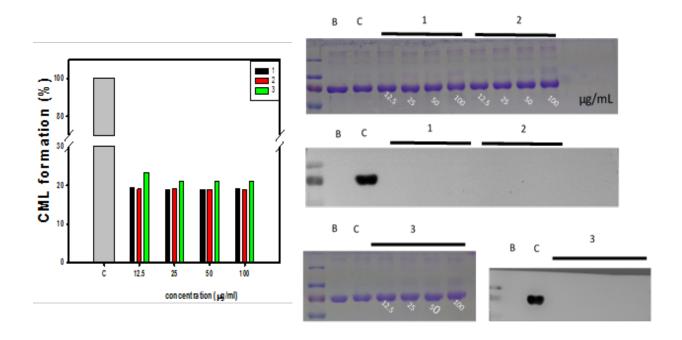
以氧自由基吸收能力法(ORAC)測定三種桂花萃取物之抗氧化能力,結果 95%酒精萃取物,抗氧化作用最強如表二。

表二、桂花萃取物之抗氧化能力

編號 _(溶螺)	sample	最終濃度 (µg/ml)	ORAC value (µM Trolox)
1 (dd water)	熱水抽取物	2.5	4.93
2 (DMSO)	50%酒精抽取物	1.25	3.27
3 (DMSO)	95%酒精抽取物	1.25	2.68

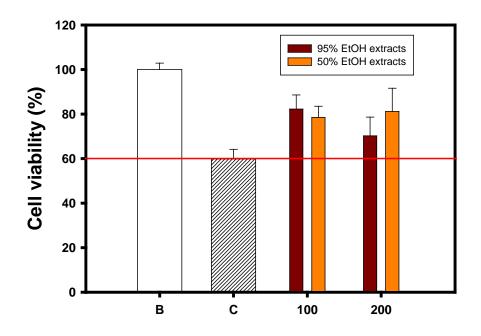
2. 桂花樣品之抑制醣化反應(BSA/galactose)

三種樣品對於抑制 Gal/BSA 模式醣化反應活性強,在 12.5~100 μg/mL 濃度下,幾乎可達 80%抑制生成 CML,且酒精萃取比熱水強 (圖五)。



圖五、 桂花之 95%酒精 (1) 、50%酒精(2)、熱水(3) 萃取物之抑制醣化反應 3. 桂花樣品對神經細胞(SH-SY5Y)保護活性

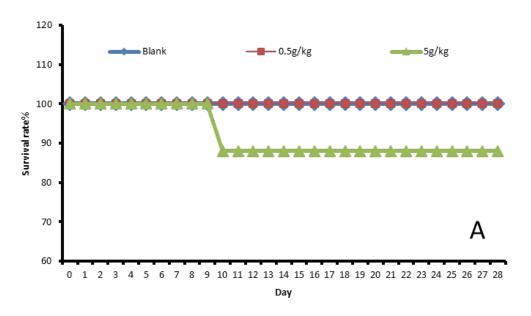
95%酒精抽取物(95%EtOH)或 50%酒精抽取物(50%EtOH)具有明顯保護 MGO 誘導神經細胞死亡活性 (圖六)。

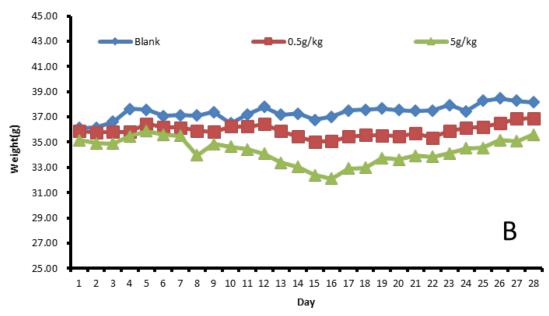


圖六、 桂花之 95%酒精及 50%酒精萃取物對 MGO 誘導神經細胞損傷之保護作用

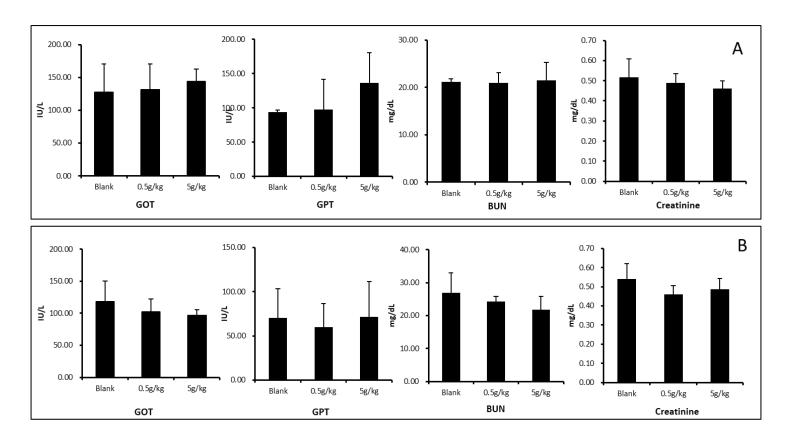
四、桂花萃取物之毒性評估

將 50%酒精萃取物 0.5 及 5g/kg,分別管餵 ICR 小鼠 9 隻,持續 28 天。結果顯示:2 組體重都有下降,而 5g/kg 體重下降約有 10%且有 1 隻老鼠死亡 (可能是實驗操作所造成) (圖七)。但其 14 天及 28 天的肝腎功能皆與對照組無顯著差異(圖八)。推測桂花萃取物於口服使用時,劑量不宜達 5g/kg, 0.5-2g/kg 應為安全劑量。





圖七、 桂花 50%酒精萃取物 28 天管餵小鼠之存活率 (A) 與體重變化 (B)



圖八、 桂花 50%酒精萃取物 28 天管餵小鼠之 14 天(A)與 28 天(B)的血液生化值

五、桂花萃取物開發化妝品原料評估

如表三顯示,桂花萃取物可以抑制 NO 及酪胺酸酶活性作用,其中以水萃取物具較佳抗發炎及美白效果。因此建議桂花水萃取物可應用於皮膚消炎及美白之化妝品添加物。

IC₅₀ (μg/ml) H₂O 50%EtOH 95%EtOH
ON 抑制濃度 161.73±4.04 174.79±6.52 145.94±6.42

酪胺酸酶活性抑制濃度 170±50 340±90 410±20

表三、 桂花萃取物抑制 NO (A)及酪胺酸酶 (B)抑制作用

總結

根據上述實驗發現桂花酒精萃取物比水萃取物具有更強的抗氧化活性,未來應用清除自由基之保健食品開發,但劑量使用不宜超過 2g/kg。而水萃取物具有抑制 NO 及黑色素形成作用,建議未來可以用於美白化妝品之添加物。

主要参考文獻

- 1. Nien-Yung Chiu and Kuang-Hsiung Chang. The Illustrated Medicinal Plants of Taiwan. Vol. I. SMC Publishing Inc. Taipei, Taiwan. pp.154 (1995).
- 2. Lee, H.; Lin, C.; Yang, L. Neuroprotection and free radical scavenging effects of *Osmanthus fragrans. J.Biomed. Sci.* 2007, 14,819–827.
- 3. Wu, L. C.; Chang, L. H.; Chen, S. H.; Fan, N. C.; Ho, J. A.Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of the acetonic extract of *Osmanthus fragrans*: a potential natural and functional food flavor additive. *LWT–Food Sci. Technol.* 2009, 42, 1513–1519.
- 4. Lee, D. G.; Choi, J. S.; Yeon, S. W.; Cui, E. J.; Park, H. J.; Yoo, J.S.; Chung, I.; Baek, N. Secoiridoid glycoside from the flowers of *Osmanthus fragrans* var. aurantiacus Makino inhibited the activity of β-secretase. *Han'guk Eungyong Sangmyong Hwahakhoeji* 2010, 53, 371–374.
- Lee, D. G.; Lee, S. M.; Bang, M. H.; Park, H. J.; Lee, T. H.; Kim, Y. H.; Kim, J. Y.; Baek, N. I. Lignans from the flowers of *Osmanthus fragrans* var. aurantiacus and their inhibition effect on NO production. *Arch. Pharmacal Res.* 2011, 34, 2029–2035.
- 6. Yiong Jiang, Shuqin Mao, Weisu Huang, Baiyi Lu, Zengxuan Cai,Fei Zhou,Maiquan Li,Tiantian Lou, Yajing Zhao. Phenylethanoid Glycoside Profiles and Antioxidant Activities of *Osmanthus fragrans* Lour. Flowers by UPLC/PDA/MS and Simulated Digestion Model. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 2459–2466.
- 7. Zang, D.K., Xiang, Q.B., Liu, Y.L., et al. The studying history and the application to International Cultivar Registration Authority of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.). *J. Plant Resour. Environ.*, 2003, 12(4):49-53.
- 8. Yoo KH, Park J-H, Lee DK, Fu YY, Baek NI, Chung IS. Pomolic acid induces apoptosis in SK-OV-3 human ovarian adenocarcinoma cells through the mitochondrial-mediated intrinsic and death receptor-induced extrinsic pathways. *Oncol Lett.* 2013, 5:386–390.
- 9. Lee DG, Park JH, Yoo K-H, Chung I-S, Lee Y-H, Lee J-K, Han D-S, Cho S-M, Baek N-I. 24-ethylcholesta-4,24(28)-dien-3,6-dione from *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* flowers inhibits the growth of human colon cancer cell line, HCT-116. *J Korean Soc Appl Bi*. 2011, 54:206–210.

- Hung, C. Y.; Huang, F. L.; Shi, L. S.; Ka, S. M.; Wang, J. Y.; Tsai, Y. C.; Hung, T. J.; Ye, Y. L. The ethanol extract of *Osmanthus fragrans* flowers reduces oxidative stress and allergic airway inflammation in an animal Model. *Evidenced-Based Complement*. *Alternat. Med.* 2013, 1–10.
- 11. Lee, H.; Lin, C.; Yang, L. Neuroprotection and free radical scavenging effects of *Osmanthus fragrans. J.Biomed. Sci.* 2007, 14,819–827.
- 12. Wu, L. C.; Chang, L. H.; Chen, S. H.; Fan, N. C.; Ho, J. A.Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of the acetonic extract of *Osmanthus fragrans*: a potential natural and functional food flavor additive. *LWT–Food Sci. Technol.* 2009, 42, 1513–1519.
- 13. Xiong L, Mao S, Lu B, Yang J, Zhou F, Hu Y, Jiang Y, Shen C, Zhao Y. Osmanthus fragrans Flower Extract and Acteoside Protect Against d-Galactose-Induced Aging in an ICR Mouse Model. J Med Food. 2016 Jan;19(1):54-61.
- 14. Wang L, Li M, Jin W, Li S, Zhang S, Yu L. Variations in the components of *Osmanthus fragrans* Lour. essential oil at different stages of flowering. *Food Chem.* 2009, 114: 233–236.
- 15. Baldermann S, Kato M, Kurosawa M, Kurobayashi Y, Fujita A,Fleischmann P, Watanabe N. Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour. *J Exp Bot*. 2010,61: 2967–2977.
- 16. Min, B.-S., Na, M.-K., Oh, S.-R., Ahn, K.-S., Jeong, G.-S., Li, G., Lee, S. K., Joung, H., and Lee, H.-K., New furofuran and butyrolactone lignans with antioxidant activity from the stem bark of *Styrax japonica*. *J. Nat. Prod.*, 2004, 67, 1980-1984.
- 17. Miert, S. V., Dyck, S. V., Schmidt, T. J., Burn, R., Vlietinck, A., Lemiere, G., and Pieters, L., Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, 13, 661-669.
- 18. Li, A.N.; Li, S.; Li., H.B.; Xu, D.P.; Xu, X.R.; Chen, F. Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *J. Funct. Food.* 2014, 6, 319–330.

- 19. Wang, H.; Gan, D.; Zhang, X.; Pan, Y. Antioxidant capacity of the extracts from pulp of *Osmanthus fragrans* and its components. *LWT-Food Sci. Technol.* 2009, 43, 319–325.
- Huang, S.; Pan, Y.; Gan, D.; Ouyang, X.; Tang, S.; Ekunwe, S.I.N.; Wang, H.
 Antioxidant activities and UV-protective properties of melanin from the berry of *Cinnamomum burmannii* and *Osmanthus fragrans. Med. Chem. Res.* 2011, 20, 475–481.
- 21. Wang L, Yu L, Cui Y, Xing J. Flavonoids from *Osmanthus fragrans*: extraction and bacteriostatic activity. *Nat Prod Res Dev.* 2008;20:717–20.
- 22. 朱亞珍,朱虹光, D-半乳糖致衰老動物模型的建立及其檢測方法,2007, 復旦學報:醫學版,34(4):P617-P619。
- 23. 秦虹兵,楊朝晔,范憶江,朱清, D-半乳糖誘導衰老小鼠模型之建立與評論,2009,中國組織工程研究與臨床康復,第13卷,第7期。
- 24. 簡美英,益智仁之成分分離及其對 β-amyloid 損傷 PC-12 細胞之保護作用, 2011, P6-P7。

致謝

感謝財團法人中正農業科技社會公益基金會之研究經費支持

玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞體外成熟暨隨後發育之影響

計畫編號 : 107-中基-農-2

計畫主辦人: 林育安

執行機關 :國立宜蘭大學

執行期間 : 106年1月1日至107年12月31日

摘要

本研究之目的是要探討玉米赤黴烯酮 (Zearalenone; F2 毒素) 與玉米赤黴 烯酮解毒劑對豬卵母細胞體外成熟暨隨後發育之影響。自當地屠宰場取自含有 3 mm 以上之濾泡卵巢,並挑選具有 3 層以上卵丘完整包覆之卵丘-卵母細胞複合 體,以逢機選擇方式進行各試驗。試驗一:探討玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外 成熟暨隨後發育之影響。試驗結果,顯示豬卵母細胞培養於含有 0、4、8、16 與 32 μM 玉米赤黴烯酮之 M-199 體外成熟培養液中,卵母細胞之成熟率分別為 83.5%、78.5%、40.0%、38.0% 與 24.2%,當玉米赤黴烯酮之濃度為 4μM 時, 豬卵母細胞之成熟率有顯著下降之趨勢 (P<0.05)。體外受精試驗方面:隨著玉 米赤黴烯酮濃度的增加,卵母細胞之受精率有下降之趨勢,4μM 組與對照組無 顯著差異,但 8μM 組則與對照組有顯著差異 (P<0.05),多精入卵率隨著玉米 赤黴烯酮濃度之增加而提升 (P < 0.05)。胚發育率方面: $0 \times 4 \times 8 \times 16$ 與 32 μM 組之胚發育率,分別為 77.7%、37.9%、26.5%、15.7% 與 7.0% (P < 0.05),隨 著玉米赤黴烯酮濃度之增加,胚發育率有下降之趨勢,並且無法發育到囊胚階 段。試驗二:探討玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞體外成熟暨隨後發育之影 響。卵丘細胞擴散試驗:8μM 組卵丘細胞擴散良好以上之比率為 10.9%,當添 加玉米赤黴烯酮解毒劑後,卵丘細胞擴散良好以上之比率為 37.6% (P < 0.05)。 卵母細胞體外成熟試驗:8 μM 組卵母細胞成熟率為 41.2%,經添加玉米赤黴烯 酮解毒劑後卵母細胞成熟率為 66.7% (P < 0.05)。體外受精試驗方面:各組間之 受精率有顯著差異,以 8 μM 組最低 (P < 0.05),多精入卵率也以 8 μM 組最高 (P < 0.05),添加玉米赤黴烯酮解毒劑則對卵母細胞之受精率與多精入卵率都有改 善作用。胚發育率方面:以8μM 組最低,對照組最高 (P < 0.05),8μM 組發 育到桑椹胚階段則停止,玉米赤黴烯酮解毒劑組則可以發育到囊胚。綜合上述各 試驗之結果得知,玉米赤黴烯酮之濃度為 4 µM,對卵母細胞之成熟率、受精率 與胚發育率均有影響作用,添加玉米赤黴烯酮解毒劑對卵母細胞之成熟率、受精 率與胚發育率均有改善作用。

關鍵詞:豬卵母細胞、體外成熟、玉米赤黴烯酮

前言

台灣因處於高溫多溼之環境氣候、穀物飼料易發黴長菌並產生毒素,黴菌毒素種類繁多 (Binder, 2007),例如黃麴毒素 (Muench et al., 1983)、赭麴毒素 (Hossain et al., 1997)、伏馬鐮孢毒素 (Kang and Alexander, 1996)、玉米赤黴烯酮與嘔吐毒素等 (Hussein and Brasel., 2001; Lai et al., 2015)。每種毒素都有其特定之作用器官,在所有黴菌毒素中以玉米赤黴烯酮與繁殖障礙有相關,因玉米赤黴烯酮會產生類似動情素之物質,造成雌性動物會有假發情現象。在所有經濟動物中,以豬之敏感性最強。豬為我國最主要之經濟動物之一,並提供動物性蛋白質之來源,母豬若攝食含有玉米赤黴烯酮之飼料,其發情週期受到干擾後將會影響母豬之繁殖效率,對飼養者而言,則是生產受益減損,無形中提高了生產成本。因此,玉米赤黴烯酮一直是飼料界者與飼養者一直很想解決之課題。

目前,國內外有關玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞成熟與後續發育影響之文獻報告極為有限。此外,玉米赤黴烯酮的劑量對於國內豬隻卵巢之卵母細胞影響如何,這方面的相關資料仍很欠缺。因此,本研究的目的,是要探討玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外成熟暨隨後發育之影響。待相關之資料建立好後,後續再探討解毒劑對玉米赤黴烯酮作用效果之研發,希望能解決母豬因玉米赤黴烯酮感染所引起之繁殖障礙問題,以提高母豬之繁殖效率。希望能對產業界、學術界以及人類醫學疾病等方面均能夠有實際之幫助與貢獻。

材料與方法

一、成熟培養液配製

M-199 組織培養液 (tissue culture medium; M-199) 試驗以 M-199 (Gibco No. 21200-076) 為體外成熟培養液,並依據 Wang et al. (1997) 所述配製。

二、豬濾泡液 (porcine follicular fluid; PFF)

卵巢置於 PBS 中清洗並將其所殘留之血液擠出,置於滅菌之衛生紙上將表面擦乾,再以 23 G 針筒抽取濾泡液,經匯集於試管並遠心分離 600xg (1000 rpm、10 分鐘、 4° C) 後,取上清液分裝於 1.5 ml 離心管中,每管 1 ml 貯存於 -20° C 之冷凍櫃中,待使用時取出解凍。

三、卵母細胞之來源及前處理步驟

本試驗所使用之豬卵母細胞,係取自當地屠宰場所屠宰肉豬卵巢。肉豬經屠宰燙毛剖腹後,立即以高壓滅菌過之剪刀,將腹腔兩側之卵巢(圖 1)取下,置於35~37℃之磷酸緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS; Gibco Cat. No. 450-1300)中,並於一小時內將所取得之卵巢攜回實驗室處理。之後,在顯微鏡

下挑選卵丘包被完整之卵丘-卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs) (圖 2)。將其置於含 PBS 之培養皿中,待收集完成後,以 PBS 清洗卵丘-卵母細胞複合體三次,逢機置於各試驗處理組別中,進行體外成熟、體外受精及胚發育試驗之用。

四、體外成熟培養之步驟

將卵丘細胞包被完整之卵母細胞以 PBS 清洗三次,再以體外成熟培養液清洗 1 次,以吸管逢機選擇的方式吸取卵丘-卵母細胞複合體,分別置入各試驗處理組別之培養皿 (直徑 3.5 公分) 中,各培養皿分別滴三滴 50 μ l 微滴之成熟培養液,每一微滴含有 10 個卵丘-卵母細胞複合體,並在培養液之上層覆蓋 2 ml 之礦物油 (Sigma No. M-8410),然後置於 39° C、5% CO₂、95% 空氣與相對濕度為 $95 \sim 100\%$ 之培養箱內培養 48 小時。

五、卵母細胞之體外受精

(一) 精液之處理

公豬精液以手握法將射出精液收集於 2 層紗布過濾之燒杯中,再將過濾之精液裝入於 100 ml 之塑膠瓶中,攜回實驗室,於 20° 恆溫箱中靜置 16 小時。使用時吸取 5 ml 之精液與 BSA 生理鹽水以 1:1 的比例混合後,於 20° C、 200 xg (500 rpm) 遠心分離 3 分鐘,取上層之 5 ml ,再加 5 ml 之 BSA 生理鹽水,混合後以 1200 xg (2000 rpm) 遠心分離 3 分鐘,去除上清液,再加入 10 ml 之 BSA 生理鹽水,依上述步驟再重複一次,俾進一步洗去精漿成分。當最後一次離心結束,將上層液去掉,加入 pH 7.8 之獲能培養液懸浮成 2 ml 之液體量,置於 37° C、5% CO $_2$ 、95% 空氣與相對濕度為 $95 \sim 100\%$ 之恆溫培養箱內靜置 4 小時,以完成獲能作用。於靜置期間,同時評估獲能培養液中精子之濃度,並調整為每 ml 約含 2 x 10^8 精子數。

(二) 卵母細胞體外受精之步驟

將體外成熟培養 48 小時後之卵丘-卵母細胞複合體,以吸管吸取置於含有 0.1% 玻尿酸酶 (Sigma No. H-4272) 之 PBS 溶液中作短暫之浸泡處理,然後再 移入 PBS 之培養皿中,以適當口徑之微吸管上下吐放之機械方式,去除卵母細胞外圍部分之卵丘細胞,再以 PBS 清洗一次。將收集之卵母細胞,置於 $1.9 \, \text{ml}$ pH 7.4 之受精培養液中,然後加上 $0.1 \, \text{ml}$ 業經完成獲能作用的精子,濃度為 $2 \, \text{x}$ 10^7 精子/ml,使精卵混合液中之最終受精濃度為 10^6 精子/ml,並且在培養液之上層覆蓋 $2 \, \text{ml}$ 之礦物油。於 $39^{\circ}\text{C} \cdot 5\%$ $CO_2 \cdot 95\%$ 空氣與相對濕度為 $95 \sim 100\%$ 之恆溫培養箱中進行體外受精培養 6 小時。培養終了時,將所有卵母細胞置於 $2 \, \text{ml}$ PBS 中洗滌,以適當口徑之微吸管機械式重複吸放步驟,去除附著於卵母細胞外圍所殘留之卵丘細胞及多餘之精子。經 PBS 清洗三次。再以早期胚培養液

清洗一次,隨後將所有卵母細胞分別置於 50 μl 微滴之早期胚培養液,每一微滴含有 10 個卵母細胞,且在早期胚培養液之上層覆蓋 2 ml 之礦物油。再放入於39℃、5% CO₂、95% 空氣與相對濕度為 95~100% 之恆溫培養箱中繼續培養 8 小時。並將卵母細胞予以固定、染色,以觀察體外受精的情形。

(三) 胚之體外培養

經體外受精之卵母細胞,以胚培養液清洗 3 次,置入 50 μ l 微滴之胚培養液,每一微滴含有 10 個體外受精之卵母細胞,並在培養液之上層覆蓋 2 ml 之礦物油,然後置於 39° C、5% CO_{2} 、95% 空氣與相對濕度為 $95 \sim 100\%$ 之培養箱內培養 16 小時或 144 小時 (6 天),觀察並記錄胚發育情形。

結果與討論

試驗一:探討玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外成熟暨隨後發育之影響

(一) 玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外成熟之影響

玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外成熟率之影響,如表 1 所示。對照組之卵母細胞成熟率為 83.5%,當卵母細胞培養於含有 4 μ M 玉米赤黴烯酮成熟培養液中,卵母細胞成熟率為 78.5% (P < 0.05),隨著玉米赤黴烯酮濃度之增加,相對地卵母細胞成熟率有下降趨勢。顯示玉米赤黴烯酮會干擾卵母細胞成熟促進因子作用,使卵母細胞發育成熟之機制受到抑制,以降低卵母細胞之成熟。

(二) 玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外受精之影響

玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外受精之影響,如表 2 所示。對照組之受精率為 80.8%,當玉米赤黴烯酮濃度為 4 μ M,受精率仍在 80% 以上,與對照組無顯著差異。當玉米赤黴烯酮濃度增加為 8 μ M 時,卵母細胞之受精率降低到 61.3%,並與對照組有顯著差異 (P < 0.05),隨著玉米赤黴烯酮濃度之增加,卵母細胞之受精率有下降之趨勢 (P < 0.05)。相對地,卵母細胞之多精入卵率有增加之現象 (P < 0.05)。透明帶位於卵母細胞之外圍,具有防護多精入卵之功能,隨著玉米赤黴烯酮濃度之增加,透明帶之防禦機制受到破壞之情形更嚴重,致使玉米赤黴烯酮濃度愈高,多精入卵率也愈高 (P < 0.05)。

(三) 玉米赤黴烯酮對體外受精後胚發育之影響

玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外受精後胚發育之影響,如表 3 所示。對照 組之胚發育率為 77.7%,當玉米赤黴烯酮濃度為 4μM,胚發育率只有 37.9%, 隨著玉米赤黴烯酮濃度之增加,卵母細胞之胚發育率有下降之趨勢 (P < 0.05),32 μ M 組只有 7.0%。4 μ M 組發育到桑椹胚階段就停止發育。顯示玉米赤黴烯酮濃度為 4 μ M 時,對胚發育就會有所影響,且隨著玉米赤黴烯酮濃度之增加,卵母細胞之胚發育率下降之情行則愈嚴重 (P < 0.05)。透明帶的防禦機制失效,造成多精入卵,導致影響後續胚之發育機制。

試驗二:探討玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞體外成熟暨隨後發育之影響。

(一) 玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵丘細胞擴散之影響

玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵丘細胞擴散之影響,如表 4 所示。對照組之卵丘細胞擴散率良好以上約 71.1%,當卵母細胞培養於含有 8 μM 玉米赤黴烯酮成熟培養液中,卵丘細胞擴散率為 10.9% (P < 0.05),當添加玉米赤黴烯酮解毒劑,卵丘細胞之擴散率良好以上約 37.6% (P < 0.05)。顯示玉米赤黴烯酮解毒劑對於玉米赤黴烯酮之毒性具有降解的功能,使卵丘細胞具有擴散的功能。

(二) 玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞體外成熟之影響

對照組卵母細胞之成熟率為 87.6%,4 μ M 玉米赤黴烯酮組卵母細胞之成熟率只有 41.2%,但當添加玉米赤黴烯酮解毒劑後,對卵母細胞之成熟率有改善作用 (P < 0.05) 如表 5 所示。卵母細胞於成熟過程中會受到卵母細胞成熟促進因子作用而發育成熟,4 μ M 玉米赤黴烯酮對卵母細胞於成熟過程中,可能會干擾卵母細胞促進成熟因子作用,使卵母細胞發育成熟之機制受到抑制,以降低卵母細胞之成熟。玉米赤黴烯酮解毒劑對玉米赤黴烯酮具有降解功能,可以減少卵母細胞成熟促進因子受到干擾而使卵母細胞發育成熟。

(三) 玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞體外受精之影響

 $8 \mu M$ 玉米赤黴烯酮組受精率為最低,對照組最高 (P < 0.05),如表 6 所示。當添加玉米赤黴烯酮解毒劑於含有 $8 \mu M$ 玉米赤黴烯酮成熟培養液中,受精率為 65.6% (P < 0.05)。多精入卵率方面:以 $8 \mu M$ 組最高,對照組最低 (P < 0.05),當添加玉米赤黴烯酮解毒劑後,多精入卵率有降低之趨勢(P < 0.05)。顯示玉米赤黴烯酮解毒劑對玉米赤黴烯酮具有降解功能,可以降低對卵母細胞透明帶的傷害,使卵母細胞透明帶具有防禦功能。

(四) 玉米赤黴烯酮解毒劑對體外受精後胚發育之影響

玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞體外受精後胚發育之影響,如表 7 所示。胚發育率方面:以 8 μM 玉米赤黴烯酮組最低,對照組最高 (P<0.05),對照組可以發育到囊胚階段,但 8 μM 玉米赤黴烯酮組無法發育到桑椹胚階段。當添加玉米赤黴烯酮解毒劑後,可以提升胚發育率,並且發育到囊胚,顯示玉米赤黴烯酮解毒劑對玉米赤黴烯酮具有降解功能,降低對胚發育機制的干擾。

添加不同濃度之玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外成熟暨隨後發育之影響,試驗結果顯示,當玉米赤黴烯酮添加濃度為 4 µM 時,卵母細胞之成熟率則有下降之勢。當添加濃度為 8 µM 時,卵母細胞之成熟率為 40.0%。卵母細胞之體外受精率與胚發育率,隨玉米赤黴烯酮濃度之增加而下降 (P < 0.05)。以玉米赤黴烯酮解毒劑添加於含有 8 µM 玉米赤黴烯酮中,卵母細胞之成熟率有改善作用 (P < 0.05)。卵母細胞之體外受精率與胚發育率也都有助益,減少多精入卵的問題發生,並且能使胚發育到囊胚階段,顯示玉米赤黴烯酮經玉米赤黴烯酮解毒劑作用後,對卵母細胞之成熟率、受精率與胚發育率均有助益作用。

執行成果與效益評估及建議

豬胚數量的多寡則會影響到豬農的生產效益與成本,台灣畜牧業中飼料成本 佔總成本的 70%,台灣處於高溫多溼的環境中,飼料易受潮發黴而滋生黴菌,黴 菌會利用飼料中的營養份並產生二次代謝產物,即為「黴菌毒素」。黴菌種類繁 多,例如黃麴毒素、赭麴毒素、伏馬鐮孢毒素、玉米赤黴烯酮與嘔吐毒素等,其 中以玉米赤黴烯酮與繁殖障礙有相關。經濟動物中以豬對玉米赤黴烯酮最為敏 感,玉米赤黴烯酮會產生類似動情素之物質,造成母豬會有假發情現象。

目前,國內外有關玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞成熟與後續發育影響之文獻報告極為有限。此外,玉米赤黴烯酮的劑量對於國內豬隻卵巢之卵母細胞影響如何,這方面的相關資料仍很欠缺。本階段已完成並建立玉米赤黴烯酮濃度與玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞之影響情形。藉由本次之研究希望能解決母豬因玉米赤黴烯酮感染所引起之繁殖障礙問題,以提高母豬之繁殖效率,希望能對產業界、學術界以及人類醫學疾病等方面均能夠有實際之幫助與貢獻。

致謝:非常感謝財團法人中正農業科技社會公益基金會贊助本次研究計畫經費

參考文獻

- Binder, E. M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Animal Feed Science and Technology 133:149-166.
- Hossain, M. B., M. A. Jalal and D. Helm. 1997. 6-L-alanineferrirubin, a ferrichrome-type siderophore from the fungus Aspergillus ochraceous. Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications. 53 (Pt 6):716-768.
- Hussein, S. H. and J. M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology 167:101-134.
- Kang, Y. J and J. M. Alexander. 1996. Alterations of the glutathione redox cycle status in fumonisin B1-treated pig kidney cells. J. Biochemical Toxicology. 11(3):121-126.
- Lai, F. N., J. Y. Ma, J. C. Liu, J. J. Wang, S. F. Cheng, X. F. Sun, L. Li, B. Li, C. M. Nyachoti and W. Shen. 2015. The influence of N-acetyl-L-cysteine on damage of porcine oocyte exposed to zearalenone *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 289:341-348.
- Muench, K. F., R. P. Misra and M. Z. Humayun. 1983. Sequence specificity in aflatoxin B₁-DNA Interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. 80:6-10.
- Wang W. H., Abeydeera L. R., Cantley T. C., Day B. N. 1997. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. J. Reprod. Fert. 111: 101-108.

Effect of Zearalenone antidote on the *in vitro* maturation and subsequent development of porcine oocytes

Yu-An Lin

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of zearalenone (F2 toxin) and zearalenone antidote on in vitro maturation and subsequent development of porcine oocytes. From the local slaughterhouse, the ovarian follicles containing more than 3 mm were selected, and the cumulus-oocyte complex with more than 3 layers of cumulus was selected and tested in a random selection manner. Experiment 1: To investigate the effect of zearalenone on the in vitro maturation and subsequent development of porcine oocytes. The results showed that the oocytes were cultured in M-199 in vitro culture medium containing 0, 4, 8, 16 and 32 µM zearalenone. The maturation rate of oocytes was 83.5% and 78.5%, respectively. 40.0%, 38.0% and 24.2%, when the concentration of zearalenone was 4 µM, the maturation rate of porcine oocytes decreased significantly (P < 0.05). In vitro fertilization test: With the increase of zearalenone concentration, the fertilization rate of oocytes decreased, and there was no significant difference between the 4 µM group and the control group, but the 8 µM group was significantly different from the control group (P. <0.05), the rate of multiple spermatozoa increased with the increase of zearalenone concentration (P < 0.05). Embryo development rate: embryo development rates in the 0, 4, 8, 16 and 32 μ M groups were 77.7%, 37.9%, 26.5%, 15.7%, and 7.0%, respectively (P < 0.05), with zearalenone As the concentration increases, the embryo development rate decreases and it cannot develop to the blastocyst stage. Experiment 2: To investigate the effect of zearalenone antidote on the in vitro maturation and subsequent development of porcine oocytes. Cumulus cell proliferation test: The ratio of cumulus cells spreading well in the 8 µM group was 10.9%. When the zearalenone antidote was added, the ratio of cumulus cells spreading well was 37.6% (P < 0.05). The in vitro maturation test of oocytes: the maturation rate of oocytes in 4 µM group was 41.2%, and the maturation rate of oocytes after adding zearalenone antidote was 66.7% (P < 0.05). In vitro fertilization test: There was a significant difference in fertilization rate between the groups, which was the lowest in the 8 μM group (P < 0.05), and the multi-fertilization rate was also highest in the 8 μ M group (P < 0.05). Detoxification with zearalenone was added. The agent has an effect on the fertilization rate of the oocyte and the rate of multi-fertilization. The embryo development rate was the lowest in the 8 µM group and the highest in the control group (P < 0.05). The 8 µM group stopped growing to the morula stage, and the zearalenone antidote group developed to the blastocyst. Based on the results of the above tests, the concentration of zearalenone was 4 µM, which affected the maturation rate, fertilization rate and embryo development rate of oocytes. Adding zearalenone antidote to oocytes Cell maturation rate, fertilization rate and embryo development rate are all improved.

Key words: Pig oocyte, In vitro maturation, Zearalenone

表 1. 玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞於體外成熟之影響

Table 1. Effect of zearalenone on porcine oocytes maturation in vitro

玉米赤黴烯酮	受檢之卵	生發泡 (%)	第一次減數分裂	成熟卵母細胞
濃度	母細胞數		中期卵母細胞數	數 (%)
$(\mu \mathbf{M})$	(重複數)	% of GV	(%)	_
$(\mu 1 1 1)$		(Mean±SE)	0/ CB # . T	% of oocytes
Zearalenone	No. of		% of Met I	mature to Met
concentration	oocytes examined		(Mean±SE)	[] (Maan+SE)
$(\mu \mathbf{M})$	(Replicate)			(Mean±SE)
	(Replicate)			
0	96 (3)	5 (5.8±5.3) ^b	$11 (10.7 \pm 6.3)^{b}$	80 (83.5±1.9) ^a
4	79 (3)	$8(10.1\pm2.1)^{b}$	9 (11.4±3.9) ^b	$62 (78.5 \pm 2.0)^{b}$
8	95 (3)	$42 (44.3\pm8.9)^{a}$	$15 (15.7 \pm 6.1)^{b}$	$38 (40.0\pm3.3)^{c}$
			h	
16	84 (3)	35 (42.2±11.9) ^a	17 (19.8±9.4) ^b	$32 (38.0\pm2.9)^{c}$
22	75 (2)	10 (05 5) 15 7\ab	20 (50 211 6 4)8	19 (24 212 7) ^d
32	75 (3)	19 (25.5±15.7) ^{ab}	38 (50.3±16.4) ^a	18 (24.2±2.7) ^d

a, b 同行中具不同英文字母表示具有統計上差異 (P<0.05)。

Different superscripts (a, b) in the same column indicate statistically significant difference (P<0.05).

Mean±SE:平均 ± 標準機差 GV (Germinal vesicle):生發泡

MI (Metaphase I): 第一次減數分裂中期 MII (Metaphase II): 第二減數分裂中期 (成熟卵母細胞)

表 2. 玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞於體外受精之影響

Table 2. Effect of zearalenone on fertilization of porcine oocyte in vitro

			<u> </u>	
玉米赤黴烯酮	受檢之卵	成熟卵母細胞	受精卵母細胞	多精入卵數 (%)
濃度	母細胞數	數 (%)	數 (%)	
(μM)	(重複數)			Polyspermy (%)
		Met II (%)	Penetration (%)	$(Mean \pm SE)$
Zearalenone	No. of	$(Mean \pm SE)$	$(Mean \pm SE)$	
concentration	oocytes			
(μM)	examined			
	(Replicate)			
0	89 (3)	73 (82.1±0.8) ^a	59 (80.8±2.5) ^a	29 (49.1±3.8) ^d
4	79 (3)	62 (78.5±2.4) ^a	50 (80.5±5.3) ^a	35 (70.2±2.7) ^c
8	82 (3)	44 (53.7±1.8) ^b	27 (61.3±1.3) ^b	$24 (88.8 \pm 1.3)^{b}$
16	74 (3)	35 (46.7±6.1) ^c	$20 (56.2 \pm 5.8)^{b}$	18 (91.7±7.2) ^b
32	75 (3)	16 (21.3±1.6) ^d	4 (24.4±7.7) ^c	4 (100.0±0.0) ^a

a, b, c, d 同行中具不同英文字母表示具有統計上差異 (P<0.05)。

Different superscripts (a, b, c, d) in the same column indicate statistically significant difference (P<0.05).

Mean±SE:平均 ± 標準機差

表 3. 玉米赤黴烯酮對豬卵母細胞體外受精後胚發育之影響

Table 3. Effect of zearalenone on development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*

zca in viiro				
受檢之卵母	胚發育數	2 細胞數 (%)	桑椹胚數	囊胚數 (%)
	NT 1 C	2 11 (0/)	(%)	D1
(重複數)		` '	3.6 1 (0/)	Blastocyst
	•	(Mean±SE)	` '	(%)
No. of	-		(Mean±SE)	(Mean±SE)
oocytes	` /			
examined	(Mean±SE)			
(Replicate)				
85 (3)	$66 (77.7 \pm 1.7)^{a}$	$32 (37.7\pm5.8)^{a}$	$2(2.3\pm2.0)^{a}$	$7(8.2\pm1.8)^{a}$
97 (2)	22 (27 0 + 2 2)b	12 (12 7 5 5)b	1 (1 1 + 2 0) ^a	$0(0.0\pm0.0)^{b}$
67 (3)	33 (31.9±2.2)	12 (13.7±3.3)	1 (1.1±2.0)	0 (0.0±0.0)
83 (3)	$22 (26.5\pm4.9)^{c}$	$9(10.6\pm5.3)^{bc}$	$0 (0.0\pm0.0)^{a}$	$0 (0.0\pm0.0)^{b}$
82 (3)	13 (15 7+3 2) ^d	3 (3 6+3 5) ^c	$(0,0+0,0)^a$	$0 (0.0\pm0.0)^{b}$
02 (3)	13 (13.7±3.2)	3 (3.0±3.3)	0 (0.0±0.0)	0 (0.0±0.0)
				1
86 (3)	$6 (7.0\pm0.4)^{e}$	$2(2.4\pm2.1)^{c}$	$0 (0.0\pm0.0)^{a}$	$0 (0.0\pm0.0)^{b}$
	受檢之卵母 細胞數 (重複數) No. of oocytes examined (Replicate) 85 (3) 87 (3) 83 (3) 82 (3)	受檢之卵母	受檢之卵母 胚發育數 2 細胞數 (%) 細胞數 (重複數) Number of embryos development (%) (Mean±SE) 85 (3) 66 (77.7±1.7) ^a 32 (37.7±5.8) ^a 87 (3) 33 (37.9±2.2) ^b 12 (13.7±5.5) ^b 83 (3) 22 (26.5±4.9) ^c 9 (10.6±5.3) ^{bc} 82 (3) 13 (15.7±3.2) ^d 3 (3.6±3.5) ^c	受檢之卵母

同行中數據不具相同英文字母 (a, b, c, d, e) 者,表示具有統計上差異 (P < 0.05)。

data within the same column without common superscripts (a, b, c, d, e) indicate statistically significant difference (P<0.05)

Mean±SE:平均 ± 標準機差

表 4. 玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞之卵丘細胞擴散之影響

Table 4. Effect of zearalenone antidote on cumulus cell proliferation of porcine

ooc	ytes					
組別	受檢卵數	非常好	良好 (%)	普通 (%)	差 (%)	極差 (%)
C	(重複數)	(%)	V	Card	Dana	V
Group	No. of oocytes examined (Replicate)	Excellent	Very dood	Good	Poor	Very poor
Control	93 (3)	35	32	13	13	0
		(37.7±2.0) ^a	(34.4±3.8) ^a	$(14.0\pm2.4)^{b}$	(13.9±1.1) ^c	$(0.0\pm0.0)^{c}$
zearalenone	92 (3)	0	10	29	21	32
(8µM)		$(0.0\pm0.0)^{c}$	$(10.9\pm 2.1)^{c}$	(31.5±1.7) ^a	(22.8±2.5) ^a	(34.8±1.7) ^a
zearalenone	85 (3)	16	16	28	15	10
(8μM) +		(18.8±1.6) ^b	(18.8±2.3) ^b	(32.9±2.5) ^a	(17.7±0.4) ^b	$(11.7\pm1.8)^{b}$
antidote						

同行中數據不具相同英文字母 (a, b, c) 者,表示具有統計上差異 (P<0.05)。

Different superscripts (a, b, c) in the same column indicate significant differences (*P*<0.05).

Mean±SE:平均 ± 標準機差

表 5. 玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞於體外成熟之影響

Table 5. Effect of zearalenone antidote on porcine oocytes maturation in vitro

處理組	受檢之卵	生發泡數 (%)	第一次減數分裂	成熟卵母細胞
Treatment	母細胞數		中期卵母細胞數	數 (%)
group	(重複數)	% of GV	(%)	
	No. of	(Mean±SE)		% of oocytes
	oocytes		% of Met I	mature to Met
	examined		(Mean±SE)	П
	(Replicate)			(Mean±SE)
0	88 (3)	3	8	77
		$(3.4 \pm 0.3)^{c}$	$(9.0 \pm 1.4)^{c}$	$(87.6 \pm 1.2)^{a}$
8 μΜ	85 (3)	37	13	35
		$(43.5 \pm 0.8)^{a}$	$(15.3 \pm 1.3)^{b}$	$(41.2 \pm 1.5)^{c}$
8μM+ antidote	84 (3)	10	18	56
		$(11.7 \pm 3.2)^{b}$	$(21.6 \pm 2.1)^{a}$	$(66.7 \pm 1.3)^{b}$

同行中數據不具相同英文字母 (a, b, c) 者,表示具有統計上差異 (P < 0.05)。 Different superscripts (a, b, c) in the same column indicate significant differences (P < 0.05).

Mean±SE: 平均 ± 標準機差 GV (Germinal vesical): 生發泡

MI (Metaphase I):第一次減數分裂中期 MII (Metaphase II):第二次減數分裂中期

表 6. 玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞於體外受精之影響

Table 6. Effect of zearalenone antidote on fertilization of porcine oocyte in vitro

Table 0. Effect 0			ation of potenic oo	
處理組	受檢之卵	成熟卵母細胞	受精卵母細胞	多精入卵數 (%)
Treatment group	母細胞數 (重複數) No. of oocytes examined (Replicate)	數 (%) Met II (%) (Mean ± SE)	數 (%) Penetration (%) (Mean ± SE)	Polyspermy (%) (Mean ± SE)
0	85 (3)	73 (85.9±0.8) ^a	59 (80.9±1.7) ^a	28 (47.5±0.1) ^c
8 μΜ	82 (3)	32 (39.0±2.2) ^c	17 (53.1±4.8) ^c	14 (82.4±3.3) ^a
8μM+ antidote	89 (3)	58 (65.2±1.3) ^b	38 (65.6±1.0) ^b	20 (52.5±2.2) ^b

a, b, c 同行中具不同英文字母表示具有統計上差異 (P<0.05)。

Different superscripts (a, b, c) in the same column indicate statistically significant (P<0.05).

Mean±SE:平均 ± 標準機差。

表 7. 玉米赤黴烯酮解毒劑對豬卵母細胞體外受精後胚發育之影響

Table 7. Effect of zearalenone antidote on development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*

處理組	受檢之卵母 細胞數	胚發育數	2 細胞數 (%)	桑椹胚數 (%)	囊胚數 (%)
Treatment group	(重複數) No. of oocytes examined (Replicate)	Number of embryos development (%) (Mean±SE)	2 cell (%) (Mean±SE)	Morula (%) (Mean±SE)	Blastocyst (%) (Mean±SE)
0	88 (3)	75 (85.6±2.3) ^a	13 (14.8±2.7) ^a	8 (9.1±2.1) ^a	11 (12.5±2.3) ^a
8 μΜ	90 (3)	20 (22.2±2.1)°	11 (12.2±1.6) ^a	0 (0.0±0.0) ^c	0 (0.0±0.0) ^c
8μM+ antidote	89 (3)	37 (41.6±1.7) ^b	11 (12.4±2.1) ^a	5 (5.6±1.9) ^b	4 (4.5±1.9) ^b

a, b, c 同行中具不同英文字母表示具有統計上差異 (P<0.05)。

Different superscripts (a, b, c) in the same column indicate statistically significant (P<0.05).

Mean±SE:平均 ± 標準機差



圖 1.由屠宰場取回之卵巢 (1x)

Fig. 1. Ovary retrieved from the slaughterhouse (1x)

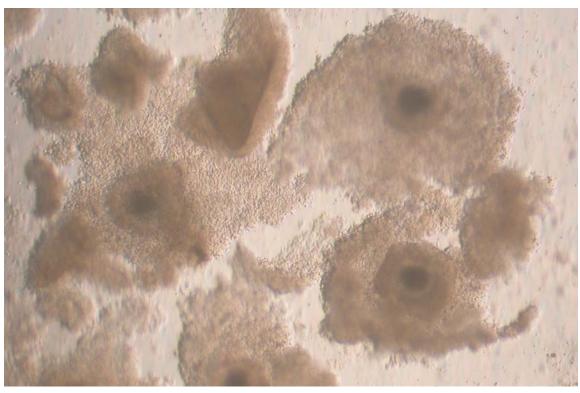


圖 2.自豬卵巢濾泡回收之卵丘-卵母細胞複合體 (400x)

Fig. 2. Cumulus-oocyte complex recovered from porcine ovarian follicles (400x)



圖 3. 卵丘細胞擴散情形 (400x)

Fig. 3. Condition of cumulus cell proliferation (400x)

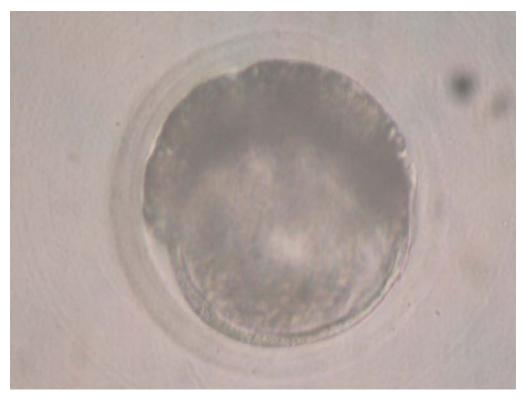


圖 4. 發育到囊胚階段的胚 (400x)

Fig. 4. Development to blastocyst stage of embryo (400x)

地衣芽孢桿菌固態發酵條件最適化及對梭菌攻毒雞隻之保護效果

Optimization of solid-state fermentation parameters of *Bacillus licheniformis* and effect of protective immune response in broilers by *Clostridium perfringens* challenge

宜蘭大學生物技術與動物科學系 游玉祥

前言

地衣芽孢桿菌(Bacillus licheniformis),被認為是安全的菌種(general recognized as safe, GRAS), 地衣芽孢桿菌已被廣泛用於食品發酵中,並可利用發酵方式產生 多種酵素,如鹼性蛋白酶與角蛋白酶等(Sarker et al., 2013)。過去文獻指出地衣芽 孢桿菌能藉由發酵過程產製二次代謝物,除了能於大豆粕發酵過程分泌高量的細 菌素(bacteriocin)(Farzana et al., 2005)外,且也具有產製環形脂肽(lipopepetide)的 能力,如地衣素(lichenysin)及表面活性素(surfactin)等(Yakimov et a l., 1995)。在 過去研究指出地衣芽孢桿菌及表面活性素具有抗病毒及免疫調節之功能(Arena et al., 2006)。表面活性素生物合成的調控包括控制發酵培養基成分,如葡萄糖和 麩醯胺酸(Sumi et al., 2015)。培養基中的碳源、氮源和金屬離子之組合對於生物 表面活性劑(biosurfactant)生產中具有重要的作用(Makkar and Cameotra, 2002)。固 態發酵可利用較便宜固態基質材料,如農業產品之副產物麩皮與稻稈等進行大量 發酵(Zhao et al., 2008),但特別的是細菌的水活性與真菌不同,需要較多含水量 的基質生長,但過多水分影響通氣量與發酵後乾燥的熱能成本,因此如需運用於 工業上發酵,必須考慮水分含量。本計畫目的為探討地衣芽孢桿菌於各種碳源、 氮源基質和起始水分最適化之條件,建立固態發酵之標準化流程。並選出最適化 基質經不同天數發酵,分析所產生之菌數量、次級代謝物和抑菌圈測試。

目的(或擬解決問題)

家禽產業藉由育種篩選與基因改良技術,大幅改善產肉動物之生長速率及飼料換肉率,但同時在家禽快速生長下,卻容易導致代謝異常或病原菌感染。如家禽壞死性腸炎(necrotic enteritis, NE),此疾病一年四季皆會發生,但一般發於 4-9 月高溫多濕季節,在全球家禽商業化飼養中,壞死性腸炎往往導致生產效益下降及死亡率上升,主要致病菌是產氣莢膜梭菌(Clostridium perfringens, CP)。在早期商業飼養,預防家畜禽腸道疾病發生,常會於飼料中添加抗生素以達到理想的生產效益。但歐盟於自 2006 年已全面禁止抗生素添加,國際間也逐漸減少抗生素使用。近年來由於消費者對無藥物殘留及安全食品的訴求,抗生素類之使用漸被重視。因此其替代品之研發相對受重視,科學家從野外健康動物腸道菌相,發現有些微生物長期定殖於腸道中,又稱為益生菌(probiotics),經動物攝食後,利用此

外源菌種之特性使其成為腸道內之優勢菌種,藉以調整腸道內之菌相,降低病源菌之增殖,因此能改善動物之腸道健康,達到降低使用抗生素之機會。

益生菌在發酵過程中能產生部分代謝物質具有抑菌作用,有助於腸道菌相平衡,這些抑菌物質功能各異,除直接與有害菌作用外,亦可藉由降低腸道 pH 值來減少有害菌之增殖。益生菌添加於飼料中,動物經攝食進入體內後,即面臨消化系統的挑戰,如:胃酸、溶菌酶(lysozyme)、膽鹽、腸道蠕動、消化液流速及免疫系統等,能克服並定殖(colonization)於腸道內生存者,進而成為優勢菌群,才能發揮其效用。益生菌-芽孢桿菌屬(Bacillus spp.)已被廣泛使用,如枯草芽孢桿菌(Bacillus subtilis)應用於傳統大豆發酵食品。與枯草芽孢桿菌親緣相近之地衣芽孢桿菌可形成芽孢,並在許多研究中指出可於腸道內生長,改善腸道免疫調節功能,與宿主建立良好的共生關係,是具有潛力能替代商業所使用的抗生素之益生菌。故本計畫目的為研究地衣芽孢桿菌之固態發酵最適化條件,並評估此固態發酵產物對抗產氣莢膜梭菌所引起的雞壞死性腸炎之效力,期望能進一步開發與應用作為畜禽之替代性抗生素來源。

材料與方法

一、固態發酵產物菌落計數

地衣芽孢桿菌孢子數計數:取 1 g 發酵產物加入 99 mL 含 0.85% NaCl 無菌水,以磁石攪拌 30 分鐘將菌塊分離均勻,此步驟為發酵產物含菌量 10^{-2} 稀釋。混和均勻之樣品放置 80% 水浴槽分別反應 10 分鐘。加熱完,放置室溫的自來水冷卻。取 1 mL 10^{-2} 發酵產物稀釋菌液加入 99 mL 含有 0.85% NaCl 無菌水,此步驟為發酵產物含菌量 10^{-3} 稀釋,以此類推系列稀釋。將無菌 TSA agar 平板培養基置於 60% 烘箱以維持液態,取 1 mL 發酵產物稀釋液注入培養皿,再傾倒液態 TSA agar,輕晃培養皿使菌液與 TSA agar 均勻混合。待 Agar 凝固後置入 30% 培養箱靜置 18 小時。培養完,選出含有 30-300 菌落的培養皿,置於計數平板器上計數。孢子數計算公

式如下:(相同稀釋的平均每盤孢子數)/(菌液稀釋倍數×每盤菌液量, mL)=_____CFU/g。

二、地衣芽孢桿菌穩定分析

耐熱試驗:取1g發酵產物加入99 mL含0.85% NaCl無菌水,以磁石攪拌30分鐘將菌塊分離均勻。混和均勻之樣品放置80、90、100℃水浴槽分別反應5、10、15分鐘。同時於水槽內放置含有自來水之管子,管中放入溫度計以測量水經水域水浴槽加熱之溫度,來反映出樣品實際溫度變化,達到反應溫度及計時。加熱完,放置室溫的自來水冷卻,以未熱處理之發酵產物做對照。上步驟為發酵產物含菌量10⁻²稀釋,依照總菌數量檢測方法求得菌數量。存活率=(熱處理之菌數量)/(未熱處理之菌數量)×100%。

耐酸試驗:取1g發酵產物加入99 mL PBS 無菌水,以磁石攪拌30分鐘將菌塊分離均勻,此步驟為發酵產物含菌量10⁻²稀釋。配置0.1%蛋白棟水(peptone water)以3.0 M鹽酸調整 pH2、3、4,並分別取10 mL不同酸鹼的蛋白棟水於試管中。將緩衝液(PBS)稀釋10⁻²菌液取1 mL分別加入不同酸鹼的試管內,放置震盪培養箱於30℃,160 rpm/min 震盪培養3小時。對照組為1 mL鹽類緩衝液稀釋之菌液加入未調整 pH的0.1%蛋白棟水中,以相同條件下震盪培養3小時。此步驟為發酵產物含菌量10-3稀釋,依照總菌數量檢測方法求得菌數量。存活率=(酸處理之菌數量)/(未經酸處理之菌數量)×100%存活率。

耐膽鹼測試:取1g發酵產物加入99 mL PBS 無菌水,以磁石攪拌30分鐘將菌塊分離均勻,此步驟為發酵產物含菌量10⁻²稀釋。分別將菌培養於含0.1%、0.2%、0.3%牛膽鹽(oxgall bile)之水溶液及未添加膽鹽之0.1%蛋白棟水中,此步驟為發酵產物含菌量10⁻³稀釋,依照總菌數量檢測方法求得菌數量。存活率=(膽鹼處理之菌數量)/(未經膽鹼處理之菌數量)×100%。

三、地衣芽孢桿菌抑菌能力和代謝成分分析

抑菌圈分析:使用腸道內病原菌 Clostridium perfringens ATCC13124 作為抑菌圈大小檢測用菌,使用 GAM 培養液於 37°C培養 24 小時活化。取 1 g 發酵產物加入 99 mL 0.85% NaCl 無菌水,震盪盤搖晃 30 分鐘混合均 勻,使菌液懸浮,另外配製相同濃度之廣效型安比西林(ampicillin)、安來 黴素(enramycin)作對照。使用無菌鑷子夾取牛津杯放置培養皿中,並將培養好約 2×10⁸ CFU/mL 之產氣莢膜梭菌與 GAM agar 均勻混合倒入培養盤。待至冷卻將牛津杯移除,再加入 150 μL 發酵產物液或抗生素於含有孔洞之 GAMagar 培養盤中,產氣莢膜梭菌以置入厭氧缸 37°C培養 24 小

時,觀察抑菌圈大小。使用腸道內病原菌 Staphylococcus aureus BCRC10780 作為抑菌圈大小檢測用菌,使用 LB 培養液於 37° C培養 18 小時活化。取 1 g 發酵產物加入 99 mL 0.85% NaCl 無菌水,震盪盤搖晃 30 分鐘混合均勻,使菌液懸浮,另外配製相同濃度之廣效型安比西林 (ampicillin)作對照。使用無菌鑷子夾取牛津杯放置培養皿中,並將培養好約 2×10^{8} CFU/mL 之金黃色葡萄球菌與 LB agar 均勻混合倒入培養盤。待至冷卻將牛津杯移除,再加入 150 μ L 發酵產物液或 Ampicillin 於含有孔洞之 LB agar 培養盤中,金黃色葡萄球菌以 37° C培養 24 小時,再觀察抑菌圈大小。

Tricine SDS-PAGE: 首先將玻璃片與海綿條組裝於鑄膠器上,配製 15%分離膠體(蒸餾水、40% acrylamide/bis、3X gel-buffer、30% APS、Glycerol和 TEMED),待分離膠體凝固後進行配製焦集膠體(蒸餾水、40% acrylamide/bis、3X gel-buffer、30% APS 和 TEMED)。蛋白質樣品與sample buffer (1 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% (v/v) glycerol、10% SDS、1% BPB和 2-ME)混合後,於 100° C 乾浴槽加熱,將待測樣品注入膠片上齒模的孔洞,以 70 伏特進行電泳約 20 分鐘,當膠體上的條帶聚集在同一排後,再轉換為 120 伏特直到條帶到達膠體最下方,將膠體取出進行染色及退染。

表面素之 HPLC 分析定量:標準品之前處理:將 10 mg 表面素(surfactin, Sigma S-3523)溶於 1 mL methanol 中,再稀釋成至少 3 種不同濃度,利用 HPLC 建立檢量線。取 5 mL 菌液或發酵液,在 4°C下,以 8,000 rpm 離心 20 分鐘,取上清液以濃鹽酸滴定至 pH = 2 ± 0.5 。在 4°C下,以 8,000 rpm 離心 20 分鐘,取沉澱物,此沉澱物即為粗表面素。將粗表面素溶於 5 mL 的 pH 8 NaOH 水溶液中,去除未溶解的不純物,收集濾液再度以濃鹽酸使其沉澱後離心濃縮即得純化的表面素。以 5 mL 的 methanol 回溶,經 0.22 μ m 過濾膜過濾,便可進行 HPLC 分析。利用 Cosmosil 5C18-AR, 5 μ m,內徑 4.6 mm × 25 cm,以 Acetontril:3.8 mM Trifluoroacetic acid=4:1(v/v)為沖堤液,流速為 1 mL/min,滯留時間 30 分鐘,注入體積 100 μ L,在 210 nm 波長的條件下進行 HPLC 分析。

四、統計分析

試驗結果使用 Statistical Analysis System 9.0(2005) 軟體進行分析,以 ANOVA 單因子變方分析後,再利用鄧肯氏新多次變域測試(Duncan's New Multiple Range Test)比較各處理間差異之顯著性,每一試驗數值以平均值±標準差(Mean \pm SD) 表示,顯著水準為 α < 0.05。

結果與討論

1. 不同碳源對地衣芽孢桿菌菌數之影響

於固態發酵基質加入不同比例之碳源養分,圖 1A 結果顯示使用 5 %葡萄糖組有較高於 5 %黑糖組之菌數量,凡添加葡萄糖組比空白組有菌數量增加趨勢。另外,額外添加不同比例,但同樣碳源結果顯示無顯著差異。葡萄糖為單糖,但黑糖主要為一分子葡萄糖與一分子果糖所組成。在 Zhao 等(2008)使用 Bacillus licheniformis 進行碳源固態發酵試驗之結果顯示於 1 kg 基質中,額外添加葡萄糖之孢子數產量比麥芽糖及蔗糖較高,能增加 35 %產量。在 B. thuringinensis 固態發酵也有相似結果(Devi et al., 2005),因此推斷微生物利用單糖的能力可能相對比雙糖好。碳氮源之綜合試驗中添加 4 %-6 %葡萄糖可得到較高之孢子數,此結果與本試驗菌數量為添加 5 %葡萄糖於固態基質中發酵相互呼應。

2. 不同氮源對地衣芽孢桿菌菌數之影響

在圖 1A 碳源試驗中得知 5 %葡萄糖可得到較高菌數量,而微生物發酵中氮源也扮演相當重要的角色,特別是工業上大豆粕與酵母粉為較便宜好取得之材料,因此本試驗進而調整不同氮源比例。圖 1B 試驗結果顯示在發酵基質中添加 10 %大豆粕及 3 %酵母粉顯著高於其他組別,但與 5 %大豆粕及 6 %酵母粉組僅有增加趨勢並無顯著差異。另外,在兩組都添加 6 %酵母粉之組別彼此也無顯著差異。在 Bacillus licheniformis 氮源試驗中,基質中添加 5 %酵母粉可增加 24 %產量(Zhao et al., 2008),而在本試驗添加 3 %及 6 %酵母粉酵母粉只有相對於空白組有較高趨勢,反之額外添加 10 %大豆粕可顯著提高菌數量。Kiers 等(2000)使用Bacillus licheniformis 發酵大豆粕 24 小時可增加菌數量,並可增加至 10 % CFU/g,與本試驗添加高劑量大豆粕有相似效果,此代表 Bacillus sp.可有效利用大豆粕作為氮源。

3. 不同初始水分對地衣芽孢桿菌菌數之影響

細菌最適生長水活性(water activity, Aw)大約於 0.7-0.9,而在固態發酵中,細菌會利用基質中或從空氣中獲得水分,因此基質的通氣量及初始水分對於細菌生長密切相關。本試驗偵測不同初始水分 40 %至 70 %菌數量之變化,圖 1C 結果顯示在 45 %至 50 %初始水份有顯著較高之菌數量,特別是 50 %初始水分顯著高於其他各組。Prakasham 等(2006)發酵試驗中,也說明發酵之初始水分含量只存在一個狹窄的範圍可以支持一個較好的生物質量生產。本試驗結果可得知過高的初始水分含量可能導致固態基質在發酵過程中有結塊之狀況,進而影響基質的通氣量,而導致菌數量下降。

4. 多日固態發酵地衣芽孢桿菌菌數及孢子數之影響

使用前幾個試驗最適化之條件進行多日發酵,並計算菌數量及孢子數。圖 1D 結

果顯示隨著發酵天數增加,菌數量也顯著增加,彼此呈正相關。過去研究中,固態發酵 Bacillus sp.在 48 小時發酵後可產製高量之菌數量(Kiers et al., 2000)。但在圖 1E 結果顯示,孢子數在發酵 4 日、6 日顯著高於 2 天發酵,而發酵 4 日與 6 日彼此無顯著差異。從結果可得知孢子數需發酵至 4 天以上之時間產製量較大,6 日發酵物可達到 4.57×10⁸ CFU/g,此試驗結果推斷可能細菌在基質運用到後期,養分減少進而轉變成休眠孢子,以抵過艱難環境。在過去研究中,32℃牛奶中培養 B. subtilis 4 日後有較高量的孢子數(Williams et al., 1957)。另外,在液態發酵文獻中 Monteiro 等(2005)使用 2 公升肉湯發酵 52 小時,發現可生產 4.2×10⁸-5.6×10⁹ CFU/mL 之孢子數,與本試驗孢子數接近,雖然固態發酵較無液態發酵穩定,但固態發酵比較液態發酵可減少大量的工業廢水。Zhao 等(2008)使用 B. licheniformis 進行固態發酵 48 小時可產製 1.7×10¹¹ CFU/g 之孢子數,由於此作者試驗使用 1 kg 之發酵基質,但接種於固態基質中之接菌量並無詳細定量。雖報告中孢子數產量較本試驗 250 g 基質多,但如未來要運用於商業化產品,可再探討將基質總體積增加或接菌量增加是否可增加孢子數。

5. 多日固態發酵物熱穩定試驗

圖 2A 結果顯示在高溫加熱下,4 日及 6 日發酵物之孢子數都 顯著高於 2 日發酵物,回收率均可達到 100 %,但在 2 日發酵物回收率較低。從此結果得知 4 日與 6 日發酵物可藉由形成內孢子形式抵抗高溫環境,在過去許多實驗已證實芽孢桿菌具有耐熱性質(Warth, 1978; Setlow, 1994)。已形成芽孢化之孢子外層有許多複雜的結構組成,特別是有包裹一層外套(coats),它能助於抵擋高熱之環境使之存活,並等適當的環境再次萌發(Nicholson et al., 2000)。而在本試驗於地衣芽孢桿菌可顯著地看到具熱穩定性,此特性可耐過在飼料打粒 95℃以上之高溫,而不被破壞。

6. 多日固態發酵物耐酸及耐膽鹼試驗

圖 2B 結果顯示 4 日及 6 日發酵物在耐酸試驗中顯著高於 2 日發酵物,特別是 6 日發酵物於 pH 3.0-4.0 都可達到 100 %回收率,4 日也可達到 99 %以上。圖 2C 結果顯示,在 0.1 %-0.3 %之膽鹽中各組彼此無顯著差異,且各組回收率皆有達到 70 %以上,代表多日固態發酵物對於膽鹽耐受性佳。固態發酵物作為飼料添加劑必須能存活於不適宜生長之腸胃道中,亦能表現發酵物對宿主的健康功效 (Prasad et al., 1998),本試驗探討發酵物對胃酸與膽鹽之耐受性可用來評估發酵物中的地衣芽孢桿菌是否能存活並通過胃腸道(Hyronimus et al., 2000; Park et al., 2002)。在動物胃中含有低 pH 值之胃液,是因為所分泌的胃酸中含有高濃度的鹽酸所致(Holzapfel et al., 1998),此為腸道屏障之一,低 pH 值易造成大多數的微生物死亡(Kimoto et al., 2000)。另外,在腸道中存有膽鹽,高濃度膽鹽會快速溶解菌體細胞膜之脂質,對微生物而言亦是一種生長抑制因子(Keele and Neil, 1965; Floch et al., 1972),因此胃酸與膽鹽是決定各種益生菌在腸胃道中存活與

定殖的關鍵性要素 (Succi et al., 2005)。

7. 發酵物抗菌試驗

圖 3A 結果顯示,無論是液態搖瓶發酵產物,或者固態發酵物上清液皆具有抑制金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)之效果,隨著固態發酵物天數上升,抑菌圈顯著較深。圖 3B 和 3C 結果顯示,在產氣莢膜梭菌(Clostridium perfringens)抑菌試驗,可看到 4 日、6 日發酵物有抑菌效果,特別在 6 日發酵物有顯著較深。在過去研究指出液態肉湯培養 B. licheniformis 可產製類似細菌素物質(Bacteriocin-like substance, BLS),且對於 S. aureus 具有顯著抑制效果,在耐熱活性試驗也具熱穩定之能力,特別是在 pH 3.0-5.0 含有 80%以上的殘存活性。過去研究從健康雞隻腸道分離 B. subtilis 可顯著抑制 Clostridium perfringens、Clostridium difficile,並且對於有機溶劑及高溫具有耐受性(Teo and Tan, 2005)。 芽孢桿菌屬在報導基因(reporter genes)上對病原菌具有許多干擾途徑,包括:干擾(DNA; RNA; protein)合成、細胞壁、脂肪酸等(Shobharani et al., 2015)。而且自Alvarez-Ordonez 等(2014)試驗結果指出 B. licheniformis 對於革蘭氏陽性菌(gram-positive)抑制效果較佳,此與本試驗結果一致。

8. 抗菌物質分析

圖 4 結果顯示分子量約在 1.4 kDa 有明顯小分子訊號,目前已知抗菌物質大約在 4 kDa 以下,並可抑制 S. aureus。另外,芽孢桿菌屬所分泌的二次代謝物,包括:枯草桿菌素(bacitracin)、表面活性素(surfactin)、地衣素(lichenysin)、伊枯草菌素 (iturin)和豐原素(fengycin),分子量落於大約 1.0-1.4 kDa 左右(Yakimov et al., 2000)。因此本試驗結果預期抗菌物質分子量約 1.4 kDa 以下,將更一步進行 HPLC 分析。圖 5 和圖 6 結果顯示,對照 surfactin 標準品,可得知在波長 210 nm 所得到約於 19 分鐘左右的訊號,滯留面積隨發酵時間增加呈線性上升,此結果得知發酵天數將影響 surfactin 產量。綜合分析實驗結果可得知 B. licheniformis ATCC10716 也可產製 surfactin 同源物,且對應 Pecci 等(2010)試驗結果可得知應屬於為 C15 surfactin。

結論

綜合上述研究結果可得知,地衣芽孢桿菌固態發酵最適化參數為5%葡萄糖、10%大豆粕、3%酵母粉和50%初始含水量。4和6天發酵物具較高孢子數、耐熱、耐酸能力。耐熱、耐酸試驗結果顯示地衣芽孢桿菌發酵物是具有作為動物飼料添加劑的潛力。抗菌試驗中,可觀察到發酵物對金黃色葡萄菌、產氣莢膜梭菌具有抑制作用,推測可能來自於固態發酵物中之二次代謝物,此類抗菌物質是未來發酵技術產業發產的趨勢,並有機會替代動物預防疾病所使用之抗生素。

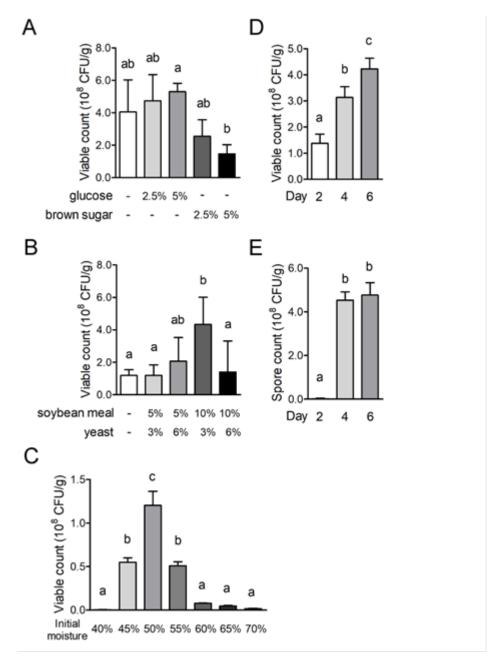


圖 1、地衣芽孢桿菌固態發酵最適化條件建立。

(A)不同碳源(葡萄糖與黑糖)之固態發酵基質組成對地衣芽孢桿菌菌數之影響。(B)不同氮源(大豆粕與酵母粉)之固態發酵基質組成對地衣芽孢桿菌菌數之影響。(C)不同起始水分對地衣芽孢桿菌之固態發酵後菌數之影響。(D)不同發酵天數對地衣芽孢桿菌之固態發酵後菌數之影響。(E)不同發酵天數對地衣芽孢桿菌之固態發酵後孢子數之影響。數值表示為平均值±標準偏差(n=3)。上標若為不同英文子母則顯示該組具統計顯著意義(P<0.05)。

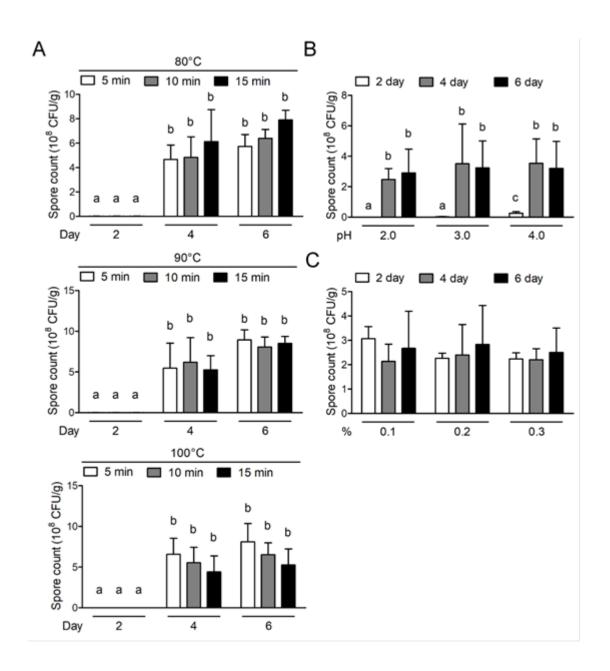


圖 2、不同培養環境對地衣芽孢桿菌固態發酵物孢子數之影響。
(A)熱處理(80、90 與 100°C)對地衣芽孢桿菌固態發酵物孢子數之影響。(B)酸處理(pH2.0、3.0 與 4.0)對地衣芽孢桿菌固態發酵物孢子數之影響。(C)膽鹼處理(0.1、0.2 與 0.3%)對地衣芽孢桿菌固態發酵物孢子數之影響。數值表示為平均值±標準偏差(n=3)。上標若為不同英文子母則顯示該組具統計顯著意義(P<0.05)。

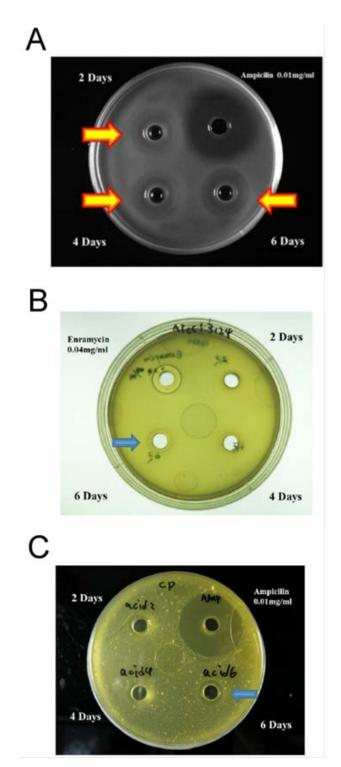


圖 3、地衣芽孢桿菌固態發酵物之抗菌能力。

(A)不同發酵天數之地衣芽孢桿菌固態發酵物對金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)的抗菌能力,安比西林(ampicillin)為正對照組。(B)不同發酵天數之地衣芽孢桿菌固態發酵物對產氣莢膜梭菌(Clostridium perfringens)的抗菌能力,安來黴素(enramycin)為正對照組。(C)不同發酵天數之地衣芽孢桿菌固態發酵物對金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)的抗菌能力,安比西林(ampicillin)為正對照組。

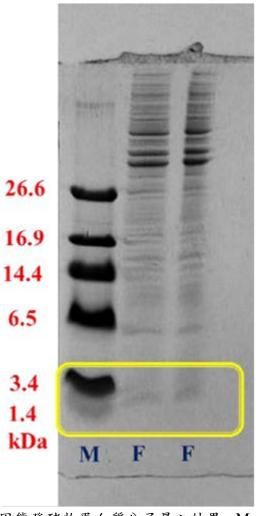


圖 4、地衣芽孢桿菌固態發酵物蛋白質分子量之結果。M 為蛋白質標準分子量指示樣品,F 為地衣芽孢桿菌固態發酵物。

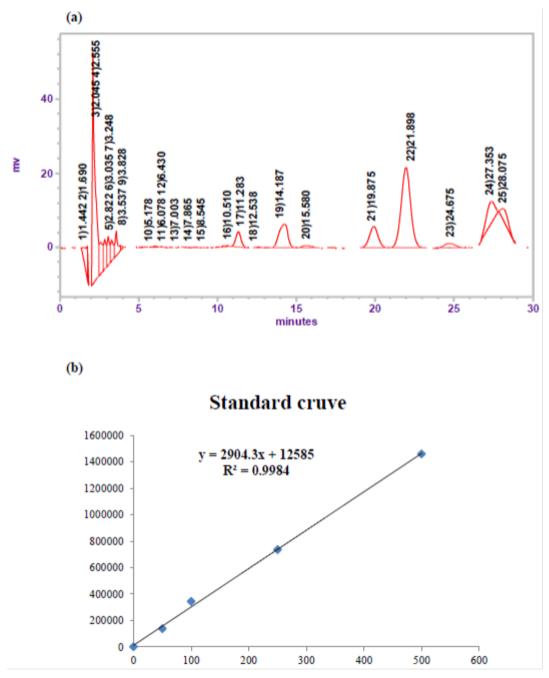


圖 5、Surfactin 定量分析。(A)Surfactin 標準品溶液之 HPLC 圖譜、(B)Surfactin 標準品溶液之標準曲線。

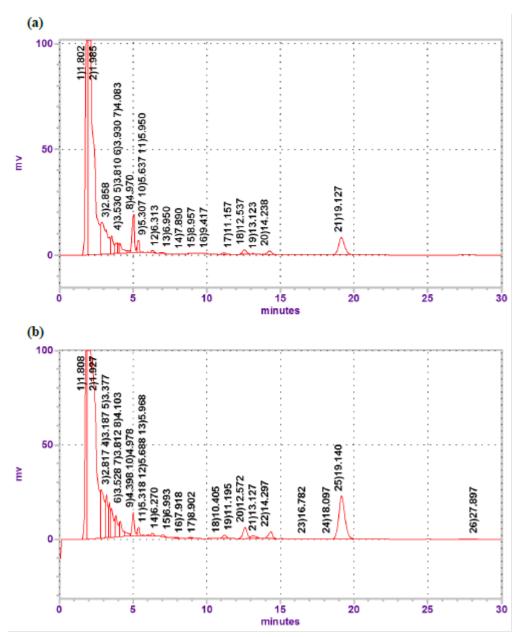


圖 6、不同發酵天數對 surfactin 產量之影響。(A) 4 日地衣芽孢桿菌固態發酵物之 HPLC 圖譜、(B)6 日地衣芽孢桿菌固態發酵物之 HPLC 圖譜

參考文獻

- Arena, A., T. L. Maugeri, B. Pavone, D. Iannello, C. Gugliandolo, and G. Bisignano. 2006. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. Int. Immunopharmacol. 6: 8-13.
- Alvarez-Ordonez, A., M. Begley, T. Clifford, T. Deasy, K. Considine, P. O'Connor, R. Paul Ross, and C. Hill. 2014. Investigation of the antimicrobial activity of *Bacillus licheniformis* strains isolated from retail powdered infant milk formulae. Probiotics & Antimicro. Prot. 6: 32-40.
- Devi, P. S., T. Ravinder, and C. Jaidev. 2005. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. J. Invertebr. Pathol. 88: 163-168.
- Farzana, K., S. N. Shah, F. B. Butt, and S. B. Awan. 2005. Biosynthesis of bacitracin in solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. Pak. J. Pharm. Sci. 18: 55-57.
- Floch, M. H., H. J. Binder, B. Filburn, and W. Gershengoren. 1972. The effect of bile acids on intestinal microflora. Am. J. Clinical Nutrition. 25: 1418-1426.
- Hyronimus, B., C. Le Marrec, A. Hadj Sassi, and A. Deschamps. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 61: 193-197.
- Holzapfel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger, and H. J. Huis. 1998. Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. 41: 85-101.
- Kiers, J. L., A. E. A. Van Laeken, F. M. Rombouts, and M. J. R. Nout. 2000. In vitro digestibility of bacillus fermented soya bean. Int. J. Food Microbiol. 60: 163-169.
- Kimoto, H., S. Ohmomo, M. Nomura, M. Kobayashi, and T. Okamoto. 2000. In vitro studies on probiotic properties of *lactococci*. Milchwissenschaft. 55: 245-249.
- Keele, C. A, and E. Neil. 1965. Secretion of digestive juices. In "Samson Wright's Appiled Physioloy" pp. 1353-1363. Oxford University Press. London.
- Makkar, R. S. and S. S. Cameotra. 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 428-434.
- Monteiro, S. M., J. J. Clemente, A. O. Henriques, R. J. Gomes, and M. J. Carrondo. 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol Prog. 21: 1026-1031.
- Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, and P. Setlow. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 548-572.
- Prasad, J., G. Harsharanjit, J. Smart, and P. K. Gopal. 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strain for use as probiotics. Int. Dairy J. 8: 993-1002.

- Prakasham, R. S., S. Rao Ch, and P. N. Sarma. 2006. Green gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. Bioresour. Technol. 97: 1449-1454.
- Park, Y. S., J. Y. Lee, Y. S. Kim, and D. H. Shin. 2002. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from dongchimi. J. Agric. Food Chem. 50: 2531-2536.
- Pecci, Y., F. Rivardo, M. G. Martinotti, and G. Allegrone. 2010. LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. J. Mass Spectrom. 45: 772-778.
- Shobharani, P., R. J. Padmaja, and P. M. Halami. 2015. Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures *Bacillus licheniformis* MCC2514 and *Bacillus licheniformis* MCC2512. Res. Microbiol. 166: 546-554.
- Sarker, P. K., S. A. Talukdar, P. Deb, S. M. A. Sayem, and K. Mohsina. 2013. Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* P003. Springer Plus. 2: 506.
- Sumi, C. D., B. W. Yang, I. C. Yeo, and Y. T. Hahm. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. Can. J. Microbiol. 61: 93-103.
- Setlow, P. 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. J. Appl. Bacteriol. 76: 49S–60S.
- Succi, M., P. Tremonte, A. Reale, E. Sorrentino, L. Grazia, S. Pacifico, and R. Coppola. 2005. Bile and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strain ioslated from Parmigiano Reggiano cheense. FFMS Microbiol. Lett. 244: 129-137.
- Teo, A. Y, and H. M. Tan. 2005. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4185-4190.
- Williams, D. J., J. G. Franklin, H. R. Chapman, and L. F. L. Clegg. 1957. Methods of assessing the sporicidal efficiency of an ultra-high-temperature milk sterilizing plant. I. Experiments with suspensions of spores in water. J. Appl. Bacteriol. 20: 43-47.
- Warth, A. D. 1978. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. J. Bacteriol. 134: 699-705.
- Yakimov, M. M., K. N. Timmis, V. Wray, and H. L. Fredrickson. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1706-1713.
- Zhao, S., N. Hu, J. Huang, Y. Liang, and B. Zhao. 2008. High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. Biotechnol. Lett. 30:295-297.

溫室內噴霧降溫設計基準之建置與飽差利用之控制器研發

國立中興大學 黄裕益

摘要

目前台灣地區設施內的噴霧量設計,業者普遍依賴經驗,導致噴霧水量常有供不應求、或是供過於求的情況發生。本研究目的係建置一高壓噴霧系統之設計基準,根據106年環境資料設計夏季外氣條件、無遮陰設施,利用熱平衡建立VETH圖設計噴霧水量,估算一分地約8(L/min)的噴霧水量,設施內溫度可降至室外溫3~4°C以下。本研究以物聯網為架構搭配Raspberry Pi 與 Arduino 單晶片,建置一套價格低廉、自由度高,及穩定性佳的飽差控制器,使用者能遠端監視溫室狀態、控制環控設備啟閉,查詢歷史紀錄及對參數功能進行調整。本研究於南投埔里之溫室設施,建置噴霧降溫系統,針對不同室內循環扇、噴霧降溫控制策略進行試驗,探討不同策略(溫度、濕度、飽差、交互作用)組合的執行狀況,實驗結果顯示良好的策略組合能改善傳統控制策略的缺點,將設施內溫度降至室外溫度2~4°C以下,並提升室內循環扇之控制準確性。利用飽差控制器進行夏季玉女小番茄的栽培,試驗飽差控制環境與未控制環境對番茄作物的影響,結果顯示飽差控制環境下,作物的氣孔開度及光合作用皆優於未控制環境,得知飽差控制可同時達到冷卻、調整蒸散量,及促進光合成作用的效果。

關鍵字:番茄、飽差、噴霧降溫、控制策略、VETH、物聯網、Raspberry Pi 、Arduino

前言

台灣位於亞熱帶地區,四季皆有其獨特氣候,夏季因對流旺盛常有颱風、豪雨,春天有梅雨季及冬天的寒害;極端的氣候變化,使得作物的生長日趨不易,因此為改善作物生長環境,提升作物品質、產量、經濟效益,農民搭建設施的意願與需求亦日漸提升。

如何將設施內的環境控制在適合作物生長的環境,為設施栽培的一大學問,台灣的地理位置常時光照充足、甚至產生過多的情形,使土壤與設施建材吸收大量的熱能,畫間設施內環境常產生高溫的現象,導致作物生長受到抑制及人員工作效率降低,故降溫為台灣地區溫室設施的首要目標。現行主要降溫的方法為減少熱量的進入,如:利用遮陰網,或利用自然通風及機械通風的方式增加通風量,帶走進入溫室熱量,而上述兩種降溫方法之降溫極限為室外乾球溫度。進一步降溫則須採用蒸發冷卻,調節設施內環境溫度至作物之最適生長溫度,主要施行方式有水牆法、細霧法、噴霧法,其中噴霧法因有設備價格低、安裝方式相對簡易、保養容易及適用於開放型設施等優點,故農民採用噴霧降溫法的意願較高,且有逐漸增加的趨勢。

噴霧降溫法使用雖易,但台灣地區因日射量大,日間常有大量的熱能進入設

施,且農民多採用自然通風的方式,其通風量不如機械通風穩定,再加上不當的使用噴霧降溫法,可能達不到預期的降溫效果,甚至設施內溫度不降反升,產生高溫高濕的環境(黃,2000;片岡,2003;Abdel-Ghany et al.,2006)。在設施內因溫度、濕度等環境因子的改變,不同環境狀態下之應噴霧水量皆不同,加上自然通風之通風量推算困難,導致目前台灣地區在設施內噴水量的設計上無一標準,多以業者之經驗法進行設計;然而經驗設計法不一定符合設施內當下之狀態點,因此可能產生噴霧量不足降溫不夠、噴霧量過多使水滴降落於葉片及地面上,產生日照放大現象導致葉面燒傷及病害等問題。

目前在噴霧控制上多以溫度、濕度為目標,以間歇噴霧、定時噴霧為控制策略,無法精確的因應環境溫度控制,因此會產生控制上的誤差;而不當的設計與控制模式,亦會使設施內成為不利作物生長的環境。本研究以台灣地區氣象資料,利用 VETH 圖設計法,提供估算通風量、溫室內蒸發散量、高壓噴霧水量之設計依據,做為農民建置噴霧冷卻的參考。在控制策略上利用設施內溫濕度的變化所形成之空氣飽和水蒸汽差做為控制依據,搭配室內循環風扇提升室內空氣流動,改善蒸散作用(石原等人,1986;服部等人,1993;Takash et al.,1997;比星等人,1998;栞田等人,2002;Jessica et al., 2011;古在,2012;浅野等人,2013)與光合作用(石原等人,1986;斉藤等人,1987;Takash et al.,1997)。

材料與方法

一、栽培設施

本研究試驗溫室位於南投埔里, 錏管塑膠布 7 連棟溫室, 圖 1 為溫室設施實際狀況。圖 2 為利用 Solidworks 繪製之俯視圖,圖 3 為番茄作物栽培情形,計算各項設施規格得其占地面積 2,890 m2,總體積約為 11,560 m3,栽培作物為玉女番茄,採離地栽培。

二、設備規劃

本研究於夏季平均高溫時,量測設施內各點之溫度,做為感測器擺放位置之參考,圖 4 為 2017/06/28 12:30-13:00 之熱環境分佈圖。本研究利用熱平衡建立VETH線圖,作為換氣率、噴霧量及噴頭數之估算設計。以夏季平均高溫時期外氣設計條件,35℃、RH63%、無遮陰設施內淨輻射量 5.6(Kcal/(m²×min)),進行VETH線圖之繪製,求得不同溫濕度條件及各通風率下之蒸發散量,如圖 5 所示。估算 7 棟各別所需要之噴霧量,如表 1 所示。A 區總噴霧水量為 7.8 L/min,B 區為 14.25 L/min,故高壓噴霧機選用 9L、15L 出水量的機種。

三、系統架構與硬體設備

- (一)系統架構主要分為主系統端、訊號端、控制端,由訊號端接受各式感測 器資料後,傳送至系統端進行邏輯運算,最後控制模式由系統端傳送至 控制端控制各項設備。此系統具無線傳輸與遠端監控之功能,整體架構 如圖6所示。
- (二) 控制器係以數梅派 (Raspberry Pi) B 型第三代為系統主機, Arduino Uno

做為訊號擷取晶片, Arduino Mega 為輸出控制晶片。

- (三) 環境因子感測器為溫室環控系統中最重要的設備,需能夠適應環境的變化又不失其準確度,其穩定能提高控制策略的有效性。本研究係採用久德電子公司所提供的戶外型-溫濕度傳送器,架設高度為離地2.3m,其規格如表2所示。照度計係採用久德電子公司所提供的照度感測器,其具防風雨等特性,適合於室外環境使用。照度計架設高度為離地3m,其規格如表3所示。
- (四) 依據 VETH 線圖估算設施內噴霧水量與設施空間配置,本研究所採用之高壓噴頭為 NATURAL FOG 公司 NFN 種類之噴頭,選用 2 號噴頭搭配高壓噴霧機之工作壓力 1000psi,出水量為 0.075L/min,最大霧粒為 27.3 μm,最小霧粒為 7 μm,平均霧粒大小為 11 μm,其流量與工作壓力相對關係如表 4 所示,噴頭架設高度為離地 2.7m,估算其霧粒皆可完全蒸發,其架設情形如所示,架設角度約向下斜 15 度。搭配之高壓噴霧機係採用由邦立傑傑公司生產,具釋壓功能,得避免因高壓噴頭壓力殘留而導致之滴水現象;其於噴霧間歇期間會執行釋壓的動作,故噴霧時間須延長計算。型號為 1.5HP PJ-C21507 YPJ,與 3HP PJ-C2307 YPJ 之高壓噴霧機,規格如表 5 所示。
- (五) 作物若是生長於高濕的環境下,易使病害孳生,利用室內循環扇擾動停滯的高濕空氣,能有效降低作物產生病害的機率。本研究所採用之室內循環風扇,為揚雅國際股份有限公司所販售,其規格如表 6 所示。循環扇架設高度為離地 2.3 m , 架設情形所示。

四、系統控制策略設計

本系統以 Python 搭配樹梅派建置一套環境控制系統,使用者可透過人機介面改變參數,並依據需求進行控制策略的變更及選擇,本系統係將噴霧控制、風扇控制分為兩個獨立控制,其中啟動噴霧時風扇會搭配其控制策略啟閉,風扇之啟閉則為單獨動作。所有功能皆可由使用者自行決定是否搭配,其搭配相當多樣化且自由度相當高。

(一) 系統功能如下述:

I. 手自動切換

為避免故障或是誤動作之情況發生,會設置手動模式及自動模式,故本系統亦加入手/自動切換模式,方便使用者依照需求操作更改。於手動模式意思即為所有功能皆無,控制策略、額外功能皆無動作,紀錄資料與手動控制設備的功能除外。

Ⅱ. 歷史資料紀錄

為方便使用者及時查看歷史資料,本系統將歷史資料圖表化,能迅速且清楚的察看感測、控制資訊。使用者亦可依照自己的需求,更改系統內資料紀錄頻率。

III. 噴霧前風扇運轉

為求噴霧蒸散完全、提高設施內氣體流動率,使用者可依照自己的需求 設定是否噴霧前作動風扇運轉,及提前運轉的時間長度設定。

IV. 日落前/日出後風扇運轉

本研究試驗區為日夜溫差大的地區,夜間時常為低溫高濕的環境,且葉片溫度時常接近露點溫度,早晨時葉面上多有小液滴的凝結,且日出時日照度上升急驟,此時葉面上的小液滴形成放大鏡的作用,造成葉面燒灼的情況發生。於日出後運轉室內循環風扇,可促進設施內氣體流動,減少液滴的凝結、減緩葉溫上升的幅度。Kohei et al. (2014)指出日落期間,作物之光合成速率最佳,故於日落前啟動風扇運轉,可打散作物境界層,並提升設施內氣體的流動,補充足夠的二氧化碳,以利光合作用的進行。

V. 飽差過低時風扇運轉

過大的飽差會造成氣孔關閉,過低的飽差會使作物蒸散作用趨緩的情形,若再加上空氣流動率低,常會造成潮濕、植物病害的問題。故本研究於飽差過低時,每隔一段時間即運轉風扇使設施內空氣循環流動,避免高濕的空氣停滯。本控制模式是不受系統時間控制,任何時間達到條件即會作動風扇。

(二) 控制模式如下述:

I. 飽差控制

利用溫濕度感測資料推算飽和水蒸氣濃度差值,進行噴霧的控制模式,以不感帶控制策略進行操作。當飽差值高於啟動設定值時,啟動噴霧控制系統:飽差值低於關閉值時,關閉噴霧控制系統。此模式為本研究主要的控制模式,於交互控制中其優先順序為最高級。

Ⅱ. 交互控制模式

飽差控制、溫度控制、濕度控制模式搭配組合的控制模式,例如同時開啟飽差控制的啟動條件及溫度控制模式的關閉條件,如飽差值高於6時啟動噴霧系統,溫度小於30時關閉噴霧系統。若是三個控制模式同時搭配,則其優先順序為飽差控制優先,溫度控制次之,濕度控制最後,其搭配噴霧模式,組合變化高達65種。

五、飽差控制環境與未控制環境對作物的影響

本研究係參考 Chiraz et al. (2012) 番茄作物之試驗步驟,取作物頂芽以下第二片成熟展開葉,五片做試驗,於同一時段內,利用光合作用測定儀LI6400(Licor公司生產)進行光合作用、氣孔導度的量測,探討以飽差控制器調控之環境、與溫室設施內未控制環境,兩種環境條件,對光合作用、氣孔導度的影響。

結果與討論

一、設施環境監控系統

(一) 系統監控頁面

本系統監控頁面之主要監測內容包含設施內外各別的溫度、濕度、飽差值及室內的照度值,控制方面有手/自動切換、風扇控制、噴霧控制、捲簾控制、滴灌設備及設備狀態,設備啟動時,其狀態條100%填滿藍色塊,如圖7中風扇的狀態;設備若是關閉狀態,其狀態條即顯示出1%的藍色塊及灰色填滿,如圖7中噴霧、滴灌的狀態。於此頁面只要切換到手動模式,即可手動操作捲簾、風扇、噴霧、滴灌設備的啟閉。

(二) 歷史資料頁面

本系統的歷史資料頁面(圖8)能夠監看先前環境及設備的狀態,環境 因子包括溫室內的溫度、濕度、飽差、日照,設備狀態為風扇、噴霧系統的 啟閉情形,透過此頁面,使用者得即時瀏覽歷史資料。除即時監看資料外, 本系統亦有每分鐘自動儲存系統狀態、設備狀態、環境因子之功能,可由分 析軟體進行探討。

(三) 參數設定頁面

透過本系統的參數設定頁面,使用者可依照需求自行設定噴霧系統、風扇系統的啟閉條件,亦可透過介面自行組合控制策略與設定參數,係屬於自由度相當高的控制系統。噴霧控制及風扇控制為獨立控制,參數由兩個獨立頁面進行設定,圖 9 為噴霧系統的參數設定頁面,風扇控制的參數設定頁面亦同。

(四) 功能設定頁面

本系統功能設定頁面(圖 10)的設定內容主要除了控制策略外的功能,使用者亦能夠透過此頁面選擇是否開啟功能,及日出後啟動風扇運轉時間設定、日落前啟動風扇運轉的時間設定及噴霧前風扇運轉的參數設定,其中低飽差風扇運轉的時間設定為運轉 15 分鐘、間歇 45 分鐘。系統設定時間為前述控制策略之運行時間,功能設定不受系統時間的控制。使用者可由此頁面自行設定歷史資料監測頁面的更新頻率。

(五) 遠端監控

本系統利用 VNC 遠端監控程式進行遠端監控,使用者可於任意地方利用網路以電腦、手機、平板等電子設備進行溫室設施的監測及控制,無需到溫室現場即可進行操作,達成智慧農業 4.0 的概念。電腦、平板與手機的監控畫面如圖 11 所示。使用者也可由遠端監控功能搭配監視器,監控該溫室的環境狀況、作物生長情形,如圖 12 所示。

二、噴霧之飽差控制策略對番茄作物生理的影響

試驗時間為 2018/05/18 12:30~14:00,試驗區域之氣象概況,萬里無雲、日照度 60,000lux 以上,噴霧作動時期設施內平均溫度 31.2℃、濕度 83.5%、飽差 5.2(g/m^3);噴霧未作動時期設施內平均溫度 34.3℃、濕度 62.9%、飽差 14.2(g/m^3)。試驗結果如圖 13、圖 14 所示,光合作用速率值越大,表示光合成作用越好;氣孔導度越接近 1,表示氣孔開度越大。根據結果顯示本研究所開發之控制器,應用其噴霧控制策略調控環境,確實能有效調控氣孔開度、提升光合

作用。

三、利用飽差控制器進行環境控制對番茄作物的影響

根據本試驗合作農民口述,試驗期間(2018/03/15~2018/07/17)利用飽差控制器進行環境控制,確實能有效降低設施內溫度,改善春夏季番茄作物之熱障礙,且果實著果率(如圖15所示),並大幅改善番茄裂果情形、果實轉色情況亦較以往經驗佳,果實品質確實有提升,病害發生率亦明顯降低許多。

結論

本研究之高壓噴霧系統以台灣埔里地區 106 年環境資料為基準,設計外氣條件 $35^{\circ}\mathbb{C}$ 、RH63%、無遮陰設施內淨輻射量 $5.6(Kcal/(m^2 \times min))$,利用熱平衡建立 VETH 圖設計噴霧水量,估算一分地約需 8(L/min)之噴霧水量,設施內溫度可降 至外氣溫 $3\sim4^{\circ}\mathbb{C}$ 以下。

本研究利用 Raspberry Pi 搭配 Arduino 及 WiFi 傳輸技術,建置一物聯網架構,以電子產品進行遠端監控,控制溫室之環控設備啟閉,如:噴霧、滴灌、風扇及捲簾,且其具備價格低廉、擴展性高、耐氣候變化之特性,試驗期間(兩年)控制器未發生當機、誤動作的情形,確實可應用於農產開放型溫室設施。

本研究開發之控制器能根據環境資料,計算該地區日出及日落時間,並與室內循環扇及捲簾設備之控制策略配合。根據本試驗結果顯示,利用飽差控制器進行環境控制,確實能提升作物光合成效率、調節作物氣孔開度,並效降低設施內溫度,改善春夏季番茄作物之熱障礙。

執行成果與效益評估及建議

台灣地區溫室設施常有熱累積情形,本研究利用夏季環境資料為基準 VETH線圖估算估算一分地約需 8(L/min)之噴霧水量,設施內溫度可降至外氣溫 3~4℃以下。本研究研發之飽差利用環境控制器,搭配風扇、高壓噴霧設備,可將設施內環境控制在適合作物生長之飽差範圍(3g/m³~6g/m³)內。實驗結果顯示,此控制策略確實能提升作物光合成效率、調節作物氣孔開度,並效降低設施內溫度,改善養夏季番茄作物之熱障礙,且果實著果率、產量提升,並大幅改善番茄裂果情形、果實轉色情況亦較以往經驗佳,果實品質確實有提升,病害發生率亦明顯降低許多。

本試驗設施為七連棟溫室,機房距離設施內感測器位置約50公尺,常遇到電磁波干擾、訊號傳遞路徑不佳,導致無線傳遞訊號的遺失、訊受接收不良的情況發生,建議可將無線傳輸設備之頻率錯開,避免佔用各自頻道。設施位於網路訊號不佳之區域,目前係以電信業者SIM卡擴接網路的方式,提供溫室區域網路,但常會發生訊號不良,導致使用者無法遠端連接控制器的情況,建議可選擇有線網路的連接、或是選用該區域訊號傳輸良好的電信業者。

致謝:感謝財團法人中正農業科技社會公益基金會贊助本次研究計畫經費

參考文獻

- 1. 黃裕益。2000。鼓風式噴霧法於開放型溫室降溫之研究。農業機械學刊 9(4)。 17-30。
- 2. 片岡圭子。2003。シクラメン栽培利用への利用效果。18-21。東京:施設と園藝 123 號。
- 3. 比鳥根真一・川滿芳信・村山盛一。1998。葉面飽差の違いがサトウキビの 光合成特性に及ぼす影響。1-7。琉球大學農學部學術報告。
- 4. 石原邦, 黒田栄喜。1986。水稲葉身の光合成速度に対する空気湿度の影響.。日作紀 55:458-464.
- 5. 古在豐樹。2012。人工光型植物工場世界に広がる日本の農業革命。初版。 143-167。東京:株式会社オーム。
- 6. 斉藤邦行,石原邦。1987。水稲葉身の光合成速度におよぼす飽差の影響。 日作紀 56:163-170.
- 8. 東シベリア北方林域における Larix gmelinii 林の水分動態と土壌水分,飽差との関係。 日林誌 84:"246-254
- 9. 服部重昭, 玉井幸治, 阿部敏夫。 1993。 ヒノキ林における土壌水分と飽差が蒸発散に及ぼす影響。日林誌 75: 216-224
- 10. 浅野洋介,渡邊孝一,嘉数 (大野) 祐子,栗本育三郎。 2013。植物工場 における細霧発生による水蒸気飽差制御 システムの構築。木更津工業高 等専門学校。
- 11. Abdel-Ghany, A.M., E. Goto and T. Kozai. 2006. Evaporation characteristics in a naturally ventilated, fog-cooled greenhouse. Renewable Energy 31: 2207-2226.
- 12. Jessica J. Prenger, Peter P. Ling. 2011. Understanding and Using Vapor Pressure Deficit. THE OHIO STATE University. AEX-804.
- 13. Kohei Koyama, shuhei Takemoto. 2014. Morning reduction of photosynthetic capacity before midday depression. SCIENTIFIC REPORTS. volume 4, Article number: 4389.
- 14. Takashi Nobuoka, Masayuki Oda, Hidekazu Sasaki. 1997. Effects of Wind and Vapor Pressure Deficit on Transpiration of Tomato Scions. P.105-112. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science.

Establish the design standard of fog cooling system in greenhouse and the development of its controller by water vapor deficit

Yu-I Huang

Abstract

Conventionally, the amount of fogging for greenhouses in Taiwan is calculated mainly based on the experience of vendors, thus often leading to excessive demand or supply of water in greenhouses. The purpose of this study was to establish a design standard for high-pressure fog systems. A non-shaded greenhouse was designed based on the summer weather conditions, which were derived from the environmental data in 2017. Additionally, this study employed the heat balance method to construct a ventilation—evapotranspiration—temperature—humidity (VETH) chart, which was then used to calculate the required amount of fogging in the greenhouse. The results revealed that the required amount of fogging per Fen (a unit of area in Taiwan, with an equivalent to 969.917 m2) was approximately 8(L/min), which reduced the temperature in the greenhouse by $3-4^{\circ}C$.

This study constructed a water vapor deficit controller underpinned by internet of things, using the Raspberry Pi and Arduino single-chip microcontroller. This controller exhibits low cost, high flexibility, as well as high stability and also enables users to monitor greenhouses, control environmental-control equipment, browse history records, and adjust parameters and functions, all of which can be accomplished remotely.

This study constructed a fog cooling system in a greenhouse in Puli, Nantou, tested different control strategies using ventilation fan and fog cooling system in various greenhouses, and explored the effectiveness of different strategies (i.e., using temperature, humidity, water vapor deficit, and combinations among them as the control factor). The experimental results revealed that the favorable strategy combinations alleviated the weakness of conventional control strategies, reducing the temperature by 2–4 °C and increasing the preciseness of ventilation fan control.

This study grew cherry tomatoes in summer using a water vapor controller and examined the effects of control strategies on the growth of cherry tomatoes, compared with that in the uncontrolled environment. The results revealed that the plants exhibit more favorable stomatal conductance and photosynthesis rate under the water vapor deficit-controlled environment than that under the uncontrolled environment. Therefore, the water vapor deficit control facilitates cooling, adjusts transpiration volume, and enhances photosynthetic activities.

Keywords: tomatoes, water vapor deficit, control strategies, ventilation—evapotranspiration—temperature—humidity (VETH), internet of things, Raspberry Pi, Arduino

表 1. 噴霧水量估算

	第7棟	第6棟	第5棟	第 4 棟	第3棟	第2棟	第1棟
噴頭	62	68	60	37	28	23	16
問距 (m)	1 (單排)	1 (單排)	1 (單排)	1.5 (單排)	1.5 (單排)	1.5 (單排)	1.5 (單排)
面積 (m²)	617.5	670.5	582.5	364	271.5	225	159
棟長 (m)	70	76	66	55	41	34	24

表 2. JTC-OTH6 户外型-温濕度傳送器規格

特性		耐氣候、防風雨
量測類型		溫度/濕度
量測模式		CMOS(溫度&濕度)
量測範圍	温度	0~60°C
	濕度	0~100%RH
精確值	温度	±0.3°C(20~40°C),±1°C(其他範圍)
	濕度	±3%RH(20~80%RH),±5%RH(其他範圍)
輸出信號		4-20mA · ModBus RTU
取樣頻率		0.3 秒
電纜長度		2m
電源供應		DC10~24V

表 3.ELS-198 照度感測器規格

特性		耐氣候、防風雨(IP54)			
量測類型		照度 單位:LUX			
量測模式		四種量測模式(Screw termials)			
量測範圍	模式一	3~300 lux			
	模式二	30~3k lux			
	模式三	300~30k lux			
	模式四	600~60k lux			
環境容許溫度	Ę	-40℃~50℃			
輸出信號		0-10V			
控制距離		100m			
電源供應		DC24V±10%			

表 4. 2 號噴頭之工作壓力與流量相對關係

NFN- type, BS			FLOW RATE / OPERATING PRESSURE RANGE							
系列	孔徑	PSI	300	400	500	600	700	800	900	1000
#20	0.20mm	LPM	0.041	0.047	0.053	0.058	0.063	0.067	0.071	0.075
	0.008"	GPM	0.011	0.013	0.014	0.015	0.017	0.018	0.019	0.020

表 5. 高壓噴霧機之規格

機型	PJ-C21507	PJ-C2307			
電源規格	3 <i>ψ</i> ×220V×60HZ×4P	$3 \phi \times 220 V \times 60 HZ \times 4P$			
馬力	1.5HP×1.125Kw×4.7A	3HP×2.25Kw×8.6A			
吸水量	9L-11L/min/1680RPM	15-18L/min/1700RPM			
工作壓力	1000psi/70KG/CM ²				
注意事項	嚴禁斷水運轉及進水不足				

表 6. 室內循環風扇規格

機型	高效率(省電)馬達
電源規格	3 <i>ψ</i> ×220V×60HZ×4P
馬力	1/4 HP
電流	0.9A
轉速	1700RPM



圖 1.溫室設施實際狀況

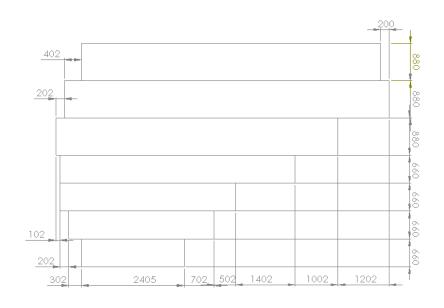


圖 2.溫室俯視圖 (單位:公分)



圖 3.溫室設施作物栽培情形

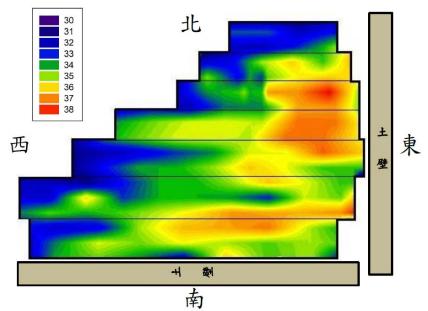


圖 4.熱環境分布圖 (單位:℃)

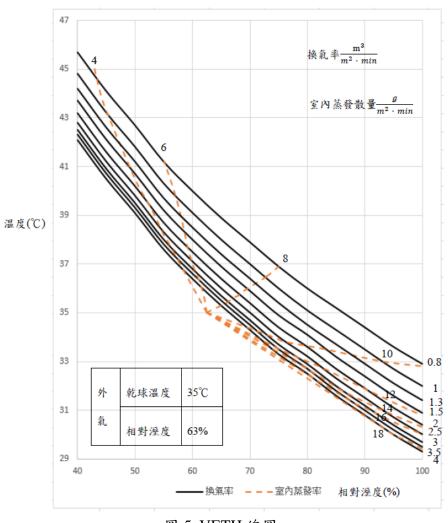


圖 5. VETH 線圖

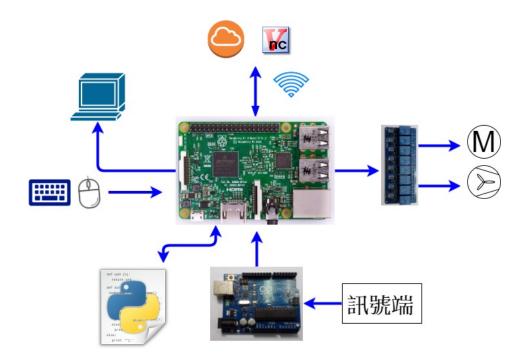


圖 6. 系統整體架構



圖 7. 系統監控頁面



圖 9. 噴霧系統的參數設定頁面

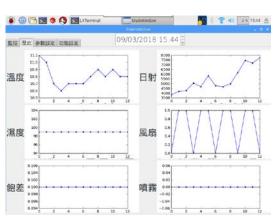


圖 8. 歷史資料頁面



圖 10. 功能設定頁面



圖 11.手機遠端監控畫面



圖 12.遠端監視畫面

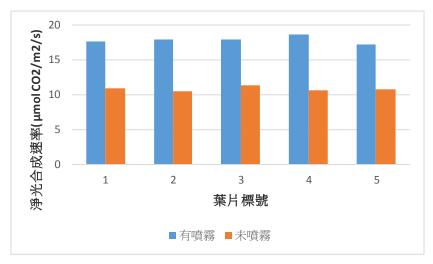


圖 13.光合作用與控制環境/未控制環境之關係

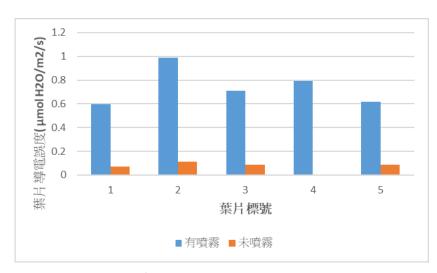


圖 14. 氣孔導度與控制環境/未控制環境之關係



圖 15 番茄作物定植 40 天之果實著果情形(9 成以上)