

國立臺灣師範大學理學院生命科學系
生技醫藥產業碩士學位學程
碩士論文

Graduate Program of Biotechnology and Pharmaceutical Industries

Department of Life Science, College of Science

National Taiwan Normal University

Master's Thesis

脂肪酶催化果糖脂肪酸酯的合成及應用

Lipase-catalyzed synthesis and application of fructose

fatty acid esters



陳詩云

Shih-Yun Chen

指導教授：李冠群 博士

鄭劍廷 博士

Advisor : Guan-Chiun Lee, Ph.D.

Chiang-Ting Chien, Ph.D.

中華民國 111 年 8 月

August 2022

致謝

三年的碩士班生涯已經即將告一個段落，首先很感謝我的指導老師李冠群老師以及鄭劍廷老師，在我還對師大很陌生時，遇到了兩位和藹可親的老師，不管是在研究上或是生活上，都給予我大大的幫助，雖然我不是很聰明，但您們從來都沒有因此放棄我，沒有您們就不會有今天的我。

接著謝謝 D309B 以及 B306 的各位學長姐以及學弟妹，在這三年之間，看著很多人來來去去，有些相處的短暫有些長久，但不變的是，大家都是那麼的親切、和藹，因為有你們，讓我的實驗順利，讓我的生活充滿樂趣，我永遠不會忘記我們一起做實驗，一起帶生化實驗課，一起打羽毛球、慶生、出去玩、唱歌……等，這些都是多麼美好的時光，謝謝曾經陪伴著我的大家。

最後感謝我最親愛的家人以及在台北陪伴著我的室友們，你們真的是我最大的精神支柱，好幾次都想放棄，但幸運的是，我有你們向我伸出援手，是你們讓我有繼續走下去的動力，直至今日，才能順順利利的畢業，愛你們！

摘要

脂肪酸糖酯是無毒、無味、無刺激性的界面活性劑。它們可以由再生資源生產，並且可以完全被生物降解。脂肪酸糖酯的應用已擴展到許多領域，包括製藥、化妝品、洗滌劑和食品工業。果糖是一種存在許多植物中的單糖酮糖，它通常與葡萄糖結合形成雙糖蔗糖。過去，本實驗室發現果糖具有抗內毒素和抗氧化的功能，這開啟了對果糖新的潛在功效和應用的研究。為了增加對內毒素的親和力，應增加果糖的疏水性。在本研究中，我們利用市售的固定化脂肪酶 Novozymes 435 催化脂肪酸酯和果糖之間的轉酯化反應，從而生成果糖酯。藉由 MPLC 和 HPLC 分析可獲得果糖轉化產率(69.2%)和各個果糖酯的產率(單丙酸果糖酯-1，即 FMP1 為 23.4%、單丙酸果糖酯-2，即 FMP2 為 21.6%、雙丙酸果糖酯，即 FDP 為 29.6%、單月桂酸果糖酯，即 FML2 為 24.2%)。這些果糖酯吸附內毒素和清除自由基的能力也已經透過生化分析進行。除此之外，在活體試驗中，我們也利用內毒素誘導 Wistar 雌性大鼠導致敗血症之模型，觀察果糖酯是否能保護模式老鼠，減輕因內毒素而引起的症狀，包括對組織血流量變化與損傷影響，此外也利用西方墨點法 (western blotting) 去進一步的觀察內毒素增加 PARP、4HNE 及 caspase 3 等細胞凋亡相關蛋白的變化。而果糖酯可以降低細胞凋亡蛋白的表

現，證明果糖酯的保護效應。因此，本研究建立了果糖酯的酶合成法以用於工業應用，開發果糖酯的新型生化活性以用於醫藥、醫療器材和保健食品工業。

關鍵詞：果糖，果糖酯，脂肪酶，轉酯化反應，抗內毒素，抗氧化劑，敗血症



Abstract

Fatty acid sugar esters are non-toxic, odorless, non-irritating surfactants. They can be produced from renewable resources and are fully biodegradable. Their applications have been extended in many areas including the pharmaceutical, cosmetic, detergent and food industries. Fructose is a simple ketonic monosaccharide found in many plants, where it is often bonded to glucose to form the disaccharide sucrose. Previously, our group has found that fructose can be an anti-endotoxin and anti-oxidant agent, and this opens the investigation on the novel potential efficacy and the application of fructose. In order to increase the affinity toward endotoxin, the hydrophobicity of fructose should be increased. In this study, Novozymes 435, a commercial immobilized lipase, was used to catalyze the transesterification between fatty acid ester and fructose to produce fructose esters. The fructose conversion rate and the individual fructose esters yields have been analyzed by MPLC and HPLC. The endotoxin and free radical removal capacity of these synthesized fructose esters have also been carried out by biochemical assays. In addition, in *in vivo* experiments, to determine whether fructose esters have protective effects, we treated Wistar female rats with various fructose esters before inducing septicemia with endotoxin. Flow rate change of blood stream and tissue damage level will be analyzed. Western blotting is also be performed to observe the effects on the cell apoptosis related proteins including PARP, 4HNE and caspase 3. Therefore, the results of this study are set up an enzymatic production process of fructose esters for the industrial application, and exploit the novel biochemical activity of fructose esters for the applications

in medicine, medical devices and health food industries.

Keywords: fructose, fructose ester, lipase, transesterification, anti-endotoxin, anti-oxidant, septicemia



目錄

| | |
|------------------------|----------|
| 摘要 | I |
| Abstract | III |
| 目錄 | V |
| 圖目錄 | IX |
| 附錄 | XII |
| 壹、緒論 | 1 |
| 一、醣酯 | 1 |
| 1. 果糖的介紹 | 1 |
| 2. 糖脂的介紹 | 1 |
| 3. 果糖酯的介紹 | 2 |
| 二、酯化反應 | 3 |
| 三、轉酯化反應 | 3 |
| 四、脂多醣 | 4 |
| 1. 脂多醣的介紹 | 4 |
| 2. 脂多醣導致之生理與病理反應 | 4 |
| 3. 受脂多醣感染之治療方式 | 5 |
| 4. 脂多醣的檢測及清除 | 6 |
| 貳、研究目的 | 9 |

| | |
|------------------------|-----------|
| 一、研究動機與研究問題 | 9 |
| 參、研究材料與方法 | 11 |
| 一、糖酯合成 | 11 |
| 1. 單丙酸果糖酯 1..... | 11 |
| 2. 單丙酸果糖酯 2..... | 11 |
| 3. 雙丙酸果糖酯 | 12 |
| 4. 單月桂酸果糖酯 2..... | 12 |
| 5. 高果糖漿酯..... | 12 |
| 6. 單丙酸葡萄糖酯 | 12 |
| 二、果糖酯初產物分析 | 12 |
| 1. 薄層液相層析法 | 12 |
| 2. 高效液相層法 | 13 |
| 三、果糖酯純化 | 13 |
| 四、果糖酯分析 | 14 |
| 1. 高效液相層析法 | 14 |
| 2. 薄層液相層析法 | 14 |
| 五、果糖酯定量 | 15 |
| 六、內毒素吸附力分析 | 15 |
| 1. LAL kit | 15 |

| | |
|---|-----------|
| 七、離體自由基測定 | 16 |
| 八、細胞存活試驗 | 17 |
| 1. 種細胞..... | 17 |
| 2. 加入待測物..... | 17 |
| 3. 測吸光值..... | 17 |
| 九、動物實驗 | 17 |
| 1. 實驗動物分組..... | 17 |
| 2. LPS 誘發之敗血症..... | 18 |
| 3. 組織病理切片分析..... | 18 |
| 3-1 蘇木精－伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin stain, H&E stain) | 19 |
| 3-2 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC) | 19 |
| 4. 西方墨點法 (Western Blot, WB)..... | 20 |
| 5. 統計分析..... | 21 |
| 肆、結果..... | 23 |
| 一、酵素法果糖酯的合成 | 23 |
| 1. 粗產物轉化率 | 23 |
| 2. 單丙酸果糖酯-1..... | 23 |
| 3. 單丙酸果糖酯-2..... | 23 |
| 4. 雙丙酸果糖酯 | 24 |

| | |
|-------------------|-----------|
| 5. 單月桂酸果糖酯 | 24 |
| 二、果糖酯初產物分析 | 24 |
| 1. 薄層液相層析法 | 24 |
| 2. 高效液相層法 | 24 |
| 三、果糖酯純化 | 25 |
| 四、果糖酯分析 | 25 |
| 五、果糖酯定量 | 26 |
| 六、內毒素吸附力分析 | 26 |
| 七、離體自由基 | 27 |
| 八、MTT 試驗..... | 27 |
| 九、動物實驗..... | 27 |
| 十、分生實驗..... | 28 |
| 伍、討論..... | 30 |
| 參考資料 | 31 |

圖目錄

| | |
|---|----|
| 圖一、合成 FMP1, FMP2 與 FDP 之 TLC 分析結果 | 36 |
| 圖二、合成 FMP1，HPLC 分析結果 | 37 |
| 圖三、合成 FMP2，HPLC 分析結果 | 38 |
| 圖四、合成 FDP，HPLC 分析結果 | 39 |
| 圖五、MPLC 純化 FMP1，分析結果 | 40 |
| 圖六、MPLC 純化 FMP2，分析結果 | 41 |
| 圖七、MPLC 純化 FDP，分析結果 | 42 |
| 圖八、MPLC 純化 FML2，分析結果 | 43 |
| 圖九、FMP1 之純品，以 HPLC 檢查之結果 | 44 |
| 圖十、FMP2 之純品，以 HPLC 檢查之結果 | 45 |
| 圖十一、FDP 之純品，以 HPLC 檢查之結果 | 46 |
| 圖十二、各糖酯之標準曲線 | 47 |
| 圖十三、Fructose 吸附內毒素能力試驗結果..... | 48 |
| 圖十四、離體自由基檢測 | 50 |
| 圖十五、MTT assay | 51 |
| 圖十六、動物實驗-正常給予生理食鹽水組..... | 52 |
| 圖十七、動物實驗-給予 LPS 組..... | 53 |

| | |
|--|----|
| 圖十八、動物實驗-給予 LPS+低劑量果糖酯組..... | 54 |
| 圖十九、動物實驗-給予 LPS+高劑量果糖酯組..... | 55 |
| 圖二十、表面血流量統計圖..... | 56 |
| 圖二十一、實驗大鼠腎臟組織切片免疫化學染色 (Immunohistochemistry, IHC) | 57 |
| 圖二十二、實驗大鼠小腸組織切片免疫化學染色 (Immunohistochemistry, IHC) | 58 |
| 圖二十三、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠腎臟組織中 GPX4 表現 量與統計分析..... | 59 |
| 圖二十四、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠腎臟組織中 caspase 3 表 現量與統計分析..... | 60 |
| 圖二十五、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠腎臟組織中 PARP 表現 量與統計分析..... | 61 |
| 圖二十六、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠腎臟組織中 4HNE 表現 量與統計分析..... | 62 |
| 圖二十七、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠肝臟組織中 GPX4 表現 量與統計分析..... | 63 |
| 圖二十八、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠肝臟組織中 caspase 3 表 現量與統計分析..... | 64 |

圖二十九、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠肝臟組織中 PARP 表現

量與統計分析.....65



附錄

| | |
|-------------------------|----|
| 附錄一、果糖轉酯化反應..... | 66 |
| 附錄二、脂肪酶催化酯的水解和合成 | 67 |
| 附錄三、Luminol 反應結構式 | 68 |



壹、緒論

一、醣酯

1. 果糖的介紹

果糖 ($C_6H_{12}O_6$) 是六碳酮糖，是所有自然存在的碳水化合物中最甜的，由於其極易溶於水，果糖是三種最常見的天然單醣之一，因此在許多食品中存在，和葡萄糖、半乳糖一起構成了血糖的三種主要成份，其消耗量急劇增加，如今已在商業上廣泛用於飲料，果汁和烘焙食品中(Taskinen et al., 2019)。食用過量含有果糖的食物會引發眾所周知的第二型糖尿病，且會使低密度脂蛋白、總膽固醇水平升高，導致新陳代謝紊亂，也還是造成肥胖的重要原因。另外，果糖會刺激食慾，並可能使肝臟將更多的威脅心臟安全的三酸甘油酯輸出到血液中。

2. 糖脂的介紹

糖酯 (sugar ester) 是各種糖和脂肪酸組成的化合物，然而糖酯的合成目前大多使用化學生產，而化學生產通常會產生幾種具有不同醯化程度和不同醯化位置的異構體。因此，使用酶去合成的有望成為一種很有前途的方法(Kobayashi, 2011)，因為生物轉化反應可以在相對較低的溫度下進行，因此可以節省能源並防止副反應的產生。酶具有很高的專一性，因此可以合成高純度的目標化合物(Ferrer et al., 2005)。糖酯可用作牙膏和罐頭食品中的抗菌劑和乳化劑(Lee and Kim,

2016), 由親水性糖類和一個或多個疏水性脂肪酸所組成, 這些分子通常是無色無味的非離子性的界面活性劑。它們不僅可以生物降解, 無毒和無刺激性, 而且還具有乳化, 穩定和去污效果。糖酯也被證實是具有抗菌活性的(Haberbeck et al., 2012; Koga et al., 1982)。B. coagulans 和 G. stearothermophilus 是罐頭食品中具有代表性的腐敗菌。B. coagulans 是一種非致病性、兼性厭氧、耐熱和嗜酸細菌(Haberbeck et al., 2012), 而 G. stearothermophilus 是一種嗜熱產芽孢細菌, 經常導致罐裝蔬菜腐敗變質, 它的孢子可以在商業產品的熱處理中存活, 而糖酯可能是可以防止這些細菌生長的材料之一(Ng and Schaffner, 1997)。因此, 糖酯已在食品, 化妝品, 製藥和牙科保健行業受到關注(Lee et al., 2017; Neta et al., 2015)。

3. 果糖酯的介紹

果糖酯是由果糖加上脂肪酸, 透過轉酯化反應, 我們就會得到果糖酯加上甲醇, 過去文章顯示, 革蘭氏陽性菌比革蘭氏陰性菌更容易受到糖酯的抑制。例如, 果糖酯可以有效抑制變形鏈球菌的生長(Šabeder et al., 2006; Watanabe et al., 2000)。變形鏈球菌是一種眾所周知的致病菌, 可能導致齲齒(Xin, 2014)。它在蔗糖存在的情況下生長並產生一種葡萄糖基轉移酶, 該酶合成一種不溶於水的葡聚糖以引起齲齒。

二、酯化反應

酯化是將有機酸(RCOOH)與醇(ROH)混合形成酯(RCOOR)和水的過程；或導致至少一種酯產物形成的化學反應，通過醇與羧酸的酯化反應獲得酯(附錄二)。過去用於合成果糖酯的方式是化學合成，但是化學合成必須在高溫高壓及有毒的有機溶劑中才能進行反應，因此不具有生物相容性，所以不適合用在食品上。所以，採用酵素合成的方式，相對於化學合成，酵素合成較安全，且對於環境傷害較低，在常溫常壓下即可進行，固定化酵素還能回收再利用。在許多微生物脂肪酶中，南極念珠菌脂肪酶及其固定化的 Novozym 435 也是各種生物轉化反應中很常使用的酵素(Guauque et al., 2014; Mohammed Gumel et al., 2011)。

三、轉酯化反應

轉酯化反應是將酯的有機基團 R'' 與醇的有機基團 R' 交換的過程(附錄二)。這些反應中通常會加入催化劑(Otera, 1993)。該反應也可以藉助酶(生物催化劑)特別是脂肪酶來完成。轉酯化反應因為其反應後的物質不含有水分，因此對於保存有效成分來說，相對於酯化反應而言，較不容易水解。轉酯化反應為一可逆過程(Freedman et al., 1986; Schwab et al., 1987)，過程中，三酸甘油酯(TG)先與甲醇反應生成二酸甘油酯與第一個脂肪酸甲酯(FAME)，接著二酸甘油酯(DG)

再與甲醇反應生成單酸甘油酯 (MG) 與第二個脂肪酸甲酯，最後，單酸甘油酯再與甲醇反應生成最後一個脂肪酸甲酯與副產品甘油。

四、脂多醣

1. 脂多醣的介紹

脂多醣 (Lipopolysaccharides, LPS)，也被稱為內毒素，是革蘭氏陰性細菌外膜的主要成分。其結構可分為三部分：

(1) 多糖鏈 (O-antigen)

又稱為多聚 O 抗原鏈 (O polysaccharide)，多糖鏈在標準的長度下會讓 LPS 較親水，而當多糖鏈缺少或是減少時，則會使 LPS 變得更疏水(Rittig et al., 2003; Tsujimoto et al., 1999)。

(2) 核心多糖 (Core)

可以分為內核心寡糖和外核心寡糖。

(3) 脂質 A (Lipid A)

與引起發炎反應有關，各個不同的菌種也會有不同的 Lipid A。

2. 脂多醣導致之生理與病理反應

脂多醣是革蘭氏陰性菌外膜上 (outer membrane) 的醣酯質 (glycolipid)，其被認為是與敗血性休克最有關係的結構成分，當體內免疫系統受到微生物本身或其分泌物質 (例如：LPS 或 lipoteichoic

acid 等) 的刺激時，會釋放出許多的細胞激素 (cytokines)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interferon- γ (IFN- γ)、脂質代謝產物 (前列腺素) 及一氧化氮 (nitric oxide; NO) 的產生，並且進一步活化補體系統 (complement system)、白血球和血管內皮細胞等，產生不同的免疫反應，以抵抗外來微生物的侵襲(Cohen, 2002)。發炎反應是寄主對抗細菌性感染的第一道防線。這些被誘導的基因 (inducible genes) 表現出的蛋白質，包含：細胞激素、吸附性蛋白質 (adhesive proteins) 與許多會促進發炎反應有關的小分子 (proinflammatory mediators)。這些基因的活化可以調節寄主的免疫反應，以去除寄主體內的細菌感染。相對地，當這些免疫反應過度地發生時，反而會引發過強的急性發炎反應 (acute inflammation)，可能造成寄主的傷害，導致高燒、神智不清、低血壓、凝血異常等症狀，甚至造成瀰漫性血管內凝血 (disseminated intravascular coagulation; DIC)、呼吸衰竭或腎衰竭、敗血症、多重器官功能衰竭，最後可能會導致死亡(Cohen, 2002)。

3. 受脂多醣感染之治療方式

雖然現今醫療界對於敗血症及其併發症致病機轉的探討與治療的研究已有相當多的進步與成果，但是實際在臨床上還並未研發出一種專門針對脂多醣治療的藥物，還是以支持性療法為主，整理如下：

(1) 感染治療：應用適當的抗生素,對於局部的感染源,有時需考

慮利用外科的手段介入，例如清創引流等。

- (2) 支持性療法：敗血症雖然屬於感染問題，但病患可能併發休克，組織灌流不足等症狀，需要依據病患的臨床反應加以給予支持性療法，例如點滴輸液的給予，氧氣的給予，嚴重時候可能需要給予呼吸器支持或血管加壓劑等。
- (3) 藥物治療：類固醇的使用，其原理在於緩解全身性的發炎反應，臨床上低劑量的類固醇可能有助於維持敗血性休克病患的血壓，但有研究(BMJ. 2004)顯示類固醇對於病患最終的存活率並沒有幫助，僅對於住院第 28 天為止結算的存活率是有所幫助，目前對於類固醇的使用上並無絕對的共識。
- (4) 凝血治療：drotrecogin alfa 具有抑制凝血、增加抗凝血的能力，並且能夠抑制腫瘤壞死因子的合成。
- (5) 清除自由基：內毒素會讓白血球和巨噬細胞產生大量的自由基，並且去破壞組織跟 DNA，在許多研究當中，也證明了自由基的清除可以改善敗血性休克，提高存活率。

4. 脂多醣的檢測及清除

內毒素 (Endotoxin) 主要是來自革蘭氏陰性細菌的細胞壁外層，因其結構可以與細胞壁穩固的結合，所以通常只有在細菌死亡或是細胞壁溶解後才會釋放出來，也因此廣泛存在於自然界當中，包含了自

來水、空氣，甚至是食物當中。內毒素具有耐熱性，因為結構安定，且非蛋白質組成成分，所以在 100 °C 高溫下加熱一小時也不易被破壞，必須在 160 °C 加熱 2~4 小時才會破壞其活性，但從消化道進入人體時，並不會產生特別的危害因子，只有進入血液中才会有危險性，內毒素會造成微循環障礙、敗血性休克、播散性血管內凝血（DIC）以及致熱等，而人體對內毒素的致熱作用極為敏感，如以極微量（1-5 納克 / 公斤體重）內毒素注入人體，即可引起發熱並造成其他危害。內毒素除了通過消化系統進入人體以外，只要進入身體就有可能造成危害，所以生物製品類、醫療注射用藥劑、常見化學藥品類、放射性藥物、醫療抗生素類、各式疫苗類、儀器用的透析液等製劑、各類醫療器材類、一次性注射器針筒等，植入性生物材料等，在登記上市前都必須經過檢驗。

內毒素定量試劑盒是用於檢測革蘭氏陰性細菌內毒素的高效，定量終點測定法。細菌內毒素催化修飾的 *Li Amebocyte Lysate* (LAL) 中的一種酶的活化。然後，活化的酶催化無色底物 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA 從對硝基苯胺 (pNA) 裂解。活化率與樣品內毒素濃度成正比。終止反應後，在 405-410nm 處以光度法測量釋放的 pNA。吸光度與內毒素濃度之間的相關性在 0.1-1.0 EU/mL 範圍內呈線性關係。顯色強度與樣品中內毒素的含量成正比，可以使用標準曲線進行計算。

再者，過去對於內毒素的清除並未有專一之方法，治療方式多以支持性療法進行，過去本實驗室也做了果糖及果糖酯對於內毒素的吸附力試驗，發現有顯著性差異，因此在本實驗中將繼續探討此問題。

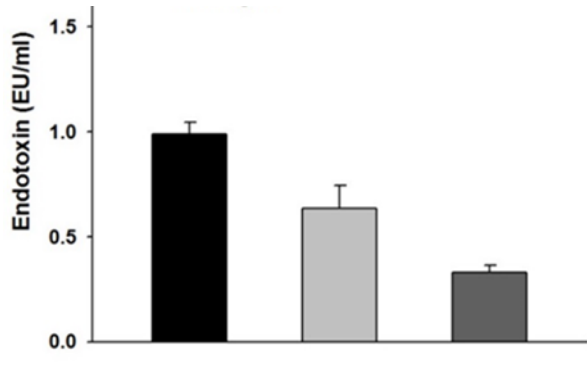


貳、研究目的

一、研究動機與研究問題

內毒素是革蘭氏陰性菌細胞壁外膜上最主要的結構之一，它的毒性最初是由李察·菲佛發現的，平時內毒素是保存在細菌細胞內，當細菌細胞壁被破壞時，內毒素才會被釋放出來。敗血症是由於血中細菌釋放出大量內毒素至血液或向血液中輸入大量內毒素污染的液體而引起的一種病理表現(Opal, 2010)，大約有 9%的敗血症患者會發生多器官功能衰竭等症狀，而這種疾病在全球正以每年 1.5%的速度增長。過去也曾發生生理食鹽水注射液遭皮氏羅爾斯頓氏菌污染，而造成許多人集體發燒之案例，而後也將「Pyrogen/Endotoxin Free」列為基本要求。

糖酯是一種的非離子性界面活性劑，可用於配製洗滌劑、食品、藥品、醫藥，以及農業和化妝品領域的各種產品，過去本實驗室做了果糖及果糖酯對於 LPS 吸附能力的試驗，LPS 是革蘭氏陰性菌外膜的主要成分，它可能導致人類的敗血症。在結果當中我們發現，LPS 加入果糖後，內毒素有明顯的下降，加入果糖及果糖酯混和物後，下降的更多，推測是 LPS 上 Lipid A 的結構，是疏水性的部分，而果糖是親水性，所以如果透過轉酯化反應，在果糖上接上脂肪酸，增加其疏水性，就可以增加跟 Lipid A 的吸附能力。



- : 1 EU/ml endotoxin
- : 1 EU/ml endotoxin + 1 mg/ml fructose
- : 1 EU/ml endotoxin + 2 mg/ml transesterification of fructose and vinyl propionate (77.9%)

在本研究的目的，是希望藉由脂肪酶的催化，將果糖酯化，因為果糖會導致代謝症候群，故想去看改質後的果糖對 LPS 在 *in vitro* 及 *in vivo* 的抑制效果，再將酯化的產物做分離及純化，並分析不同果糖酯的個別生化活性功效，包括內毒素吸附和自由基清除的能力。另外，也將評估各種果糖酯是否能保護經 LPS 誘導的老鼠，減輕因內毒素而引起的症狀。

參、研究材料與方法

一、糖酯合成

1. 單丙酸果糖酯-1 (Fructose mono-propionate 1, FMP1)

合成單丙酸果糖酯 (Fructose mono-propionate 1, FMP1) 的條件:
以 D 式的果糖 (D-Fructose, D-Fru, 購自 Sigma) 0.1 M 與丙酸乙烯酯 (Vinyl propionate, V3) 0.5 M, 即 D-Fru: V3 莫爾數比 1:5, 以叔丁醇 (tert-butyl alcohol, t-BA) 為溶劑, 於 40 °C 下加入 10 mg/ml 的固定化酵素 Novozyme 435, 以 Teflon 轉子用轉速 350 rpm 混勻反應 2 小時。

2. 單丙酸果糖酯-2 (Fructose mono-propionate 2, FMP2)

以 D-Fru 0.1 M 與 V3 0.1 M, 即 D-Fru: V3 莫爾數比 1:2, 以 t-BA 為溶劑, 於 40°C 下加入 10 mg/ml 的固定化酵素 Novozyme 435, Novozym 435 (N435) 是由 Novozymes 公司所生產的市售固定化脂肪酶, 原始酵素是南極假絲酵母脂肪酶 B (Candida antarctica B Lipase), 它的固定化名稱就是 Novozyme435, 固定化的酵素可以被重複使用, 因此它是在各種生物轉化反應中是最常用的酶, 其最佳反應溫度為 40-60 °C, 以 Teflon 轉子用轉速 350 rpm 混勻反應 8 小時。(FDP 抽乾後加相同量水後, 再抽乾)

3. 雙丙酸果糖酯 (Fructose di-propionate, FDP)

以 D-Fru 0.1 M 與 V3 0.5 M，即 D-Fru: V3 莫爾數比 1:3，以 t-BA 為溶劑，於 40°C 下加入 10 mg/ml 的固定化酵素 Novozyme 435，以 Teflon 轉子用轉速 350 rpm 混勻反應 8 小時。

4. 單月桂酸果糖酯-2 (Fructose mono-laurate, FML2)

以 D-Fru 0.1 M 與 V3 0.3 M，即 D-Fru: V3 莫爾數比 1:2，以 t-AA 為溶劑，於 40°C 下加入 10 mg/ml 的固定化酵素 Novozyme 435，以 Teflon 轉子用轉速 350 rpm 混勻反應 24 小時。

5. 高果糖漿 (High fructose corn syrup, HFCS) 酯

以 D-Fru 0.1 M 與 V3 0.3 M，即 D-Fru: V3 莫爾數比 1:5，以 t-BA 為溶劑，於 40°C 下加入 30 mg/ml 的固定化酵素 Novozyme 435，以 Teflon 轉子用轉速 350 rpm 混勻反應 24 小時。

6. 單丙酸葡萄糖酯 (Glucose mono-propionate)

以 D-Fru 0.1 M 與 V3 0.3 M，即 D-Fru: V3 莫爾數比 1:5，以 t-BA 為溶劑，於 40°C 下加入 30 mg/ml 的固定化酵素 Novozyme 435，以 Teflon 轉子用轉速 350 rpm 混勻反應 24 小時。

二、果糖酯初產物分析

1. 薄層液相層析法 (Thin liquid chromatography, TLC)

FMP1、FMP2 及 FDP 以 Merck silica 60 F254 TLC 層析片分析，展層液為 Ethyl acetate (EA): MeOH: Acetic acid (HAc)=90:10:2，展層 1 次。展層完成待溶劑揮發，均勻以顯色劑(Folin & Ciocalteu's phenol reagent: ethanol (EtOH)=2:8) 噴灑，並以 120°C 烘烤 20 分鐘以完成產物顯色。

FML2 以 Merck silica 60 F254 TLC 層析片分析，展層液為 Hexene: Ethyl acetate (EA): MeOH: Acetic acid (HAc)=20:80:10:2，展層 1 次。展層完成待溶劑揮發，均勻以顯色劑 (Folin & Ciocalteu's phenol reagent: ethanol (EtOH)=2:8) 噴灑，並以 120°C 烘烤 20 分鐘以完成產物顯色。

2. 高效液相層法 (High performance liquid chromatography, HPLC)

產物以 0.22 µm PVDF filter 過濾後，以 HPLC(Hitachi、L-2455)分析，管柱為 Thermo hypersil ODS，溫度為 40 或 60°C，移動相為 methanol (MeOH): water=5:95 或 30:70，偵測器為 Reflective index detector RI2000，流速 1 ml/min。

三、果糖酯純化

以 Agela Technologies Flash system/Cheetah MP Series preparative liquid chromatography system (MPLC)進行純化，純化 FMP1 或 FMP2

時，採用管柱 Flash column spherical C18 AQ 80 g，管柱溫度: 60°C。移動相 A:water, B: MeOH，以系統程式調控隨時的移動相 A、B 占比 (%)，流速 45 ml/min 與收集單位大小 (ml/ fraction)。純化 FDP 時，採用管柱 Flash column spherical C18 AQ 80 g，管柱溫度: 25°C，流速 45 ml/min。純化 FML2 時，採用管柱 Flash column spherical C18 AQ 80 g，管柱溫度: 25°C，流速 45 ml/min。偵測器: UV detector，detector wave length: 205 nm; monitor wave length: 240 nm。經 TLC 方法鑑定並收集純品，以迴旋濃縮機於 10~60°C，27.5~29.9 inch Hg 低壓抽除溶劑，以獲得乾燥純品。

四、果糖酯分析

1. 高效液相層析法 (HPLC)

產物以 0.22 μ m PVDF filter 過濾後，以 HPLC (Hitachi,L-2455) 分析，分析 FMP1 或 FMP2，管柱為 Venusil AQ C18，溫度為 45°C，移動相為 MeOH: water= 95:5。分析 FDP，管柱為 Thermo hypersil ODS，溫度為 40°C，移動相為 MeOH: water= 30:70。分析 FML2，管柱為 Thermo hypersil ODS，溫度為 40°C，移動相為 MeOH: water= 65:35。偵測器為 Reflective index detector RI2000，流速 1 ml/min。

2. 薄層液相層析法 (TLC)

產物以 Merck silica 60 F254 TLC 層析片分析，展層液為 EA: MeOH: Acetic acid (HAc)=90:10:2，展層 24 分鐘。展層完成待溶劑揮發，均勻以顯色劑 (Folin & Ciocalteu's phenol reagent: EtOH=2:8) 噴灑，並以 120°C 烘烤 20 分鐘以完成產物顯色。

五、果糖酯定量

產物以 0.22 μ m PVDF filter 過濾後，以 HPLC 分析，定量 FMP1 或 FMP2，管柱為 Venusil AQ C18，溫度為 45°C，移動相為 MeOH: water=95:5。定量 FDP，管柱為 Thermo hypersil ODS，溫度為 40°C，移動相為 MeOH: water=30:70。定量 FML2，管柱為 Thermo hypersil ODS，溫度為 40°C，移動相為 MeOH: water=65:35。偵測器為 Reflective index detector RI2000，流速 1 ml/min。即可做出標準曲線，以利於產物之定量。

六、內毒素吸附力分析

1. LAL kit

Thermo Scientific™Pierce™LAL 生色內毒素定量試劑盒是一種高效的定量終點分析用於檢測革蘭氏陰性細菌內毒素。細菌內毒素可活化 Li Amebocyte Lysate (LAL) 中的 factor C，factor C 再去活化 protease。然後活化的酶原會催化分裂 p 硝基苯胺 (pNA) 來自無色底物 Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA；激活率與樣品內毒素成正比濃度。終止

反應後，在 405-410 nm 處以分光光度計去測量釋放的 pNA。內毒素濃度之間的線性關係在 0.1-1.0EU/mL 範圍內。顯色強度為與樣品中內毒素的含量成正比，可以使用標準曲線進行計算。

作法參照 Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Doc. Part No. 2162713 Pub. No. MAN0017902 Rev. A.0)。

七、離體自由基測定

自由基 (free radical) 又稱游離基是指能獨立存在並具有一個或一個以上不成對電子的離子、原子或分子。當氧以不穩定的形式存在時，會以氧化的方式和其他原子或是化合物競爭電子，來維持自己的穩定，因此又被稱為活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS)。我們利用化學冷光 (Chemiluminescence, CL)、加強劑 (Luminol, 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) (附錄三)，和化學冷分析儀 (Chemiluminescence immunoassay analyzer)，其裝置包括：主機、光子檢測 (photon detector)、冷光計數器 (CL counter)、冷凝機、電腦及列印設備。其原理為將分子或原子經由化學反應形成激發態 (excited state)，而後於激發態回到基態 (ground state) 的過程中放出光子，經由光電倍增管接收 (photomultiple tubes, PMT)，轉換成電流，再經由檢測器 (detector) 偵測電流，轉換成數值 (counts)。於樣本盤中加入 200 μ L 的待測物，記錄一分鐘基線訊號，再加入 500 μ L 的

luminol，記錄一分鐘訊號，最後加入 100 μ L H₂O₂，記錄三分鐘後，取出樣本盤，以酒精及二次水清洗乾淨，並以拭鏡紙擦拭，再檢測下一個樣本。

八、細胞存活試驗

1.種細胞

使用 24 孔盤，將細胞打起來計數，於 24 孔盤中種 1×10^5 顆細胞/well，一組做 3 重複以上，避免誤差。

2.加入待測物

分別在 24 孔盤加入六種不同濃度之 FDP，0、0.1、0.25、0.5、1、2 mg/ml，每組加 4 個孔盤。

3.測吸光值

細胞貼附後(overnight)，去除 medium 加入 MTT 混合液(MTT 與 medium 比例為 1:9)總體積 50 μ l，加 MTT 的那盤避光 incubate 2 小時後去除 medium，加入 500 μ l DMSO，吸取 200 μ l，測吸光值 570 nm。

九、動物實驗

1.動物實驗分組

實驗動物經過一星期的適應，將被隨機分配成四組，每組 8 隻，組別分別為：

(1) 控制組 (control,Con)

(2) LPS 誘發敗血症組 (LPS)

(3) LPS 誘發敗血症+低劑量 FDP (LPS-L)

(4) LPS 誘發敗血症+高劑量 FDP (LPS-H)

2. LPS 誘發之敗血症

利用雌性 Wistar 大鼠 (220~250 g) 從 BioLASCO 臺灣有限公司 (臺北) 購買，並安置在國立臺灣師範大學實驗動物中心，溫度恆定，光週期一致 (早上 7 點至晚上 6 點)。在實驗日，在大鼠腹腔注射 urethane (1.2g/kg) 麻醉。由保溫毯將體溫保持在 36.5°C~37.0°C，並通過直腸溫度計監測，PE-50 導管放置在股動脈測量心率和動脈血壓 (ambulatory blood pressure, ABP)，通過使用 ADI 系統 (PowerLab/16S, ADI Instruments, Pty Ltd, Castle Hill, Australia) 與感應器 (P23, 1D, Gould-Statham, Quincy) 並從股靜脈給藥。並且利用雷射都卜勒血流測量儀 (Moor)，連續監測微血管的血球灌注的變化，也可以用於評估血管活性藥物的循環、監測外周迴圈和監測動物暴露組織的微血管循環，藉此可以得知動物在給予藥物前後，各個組織的表面血流量。在此研究，使用股靜脈注射 LPS 到大鼠，導致敗血症和腎損傷。

3. 組織病理切片分析

實驗動物犧牲後，將取下的檢體以生理食鹽水潤洗三次，浸泡於 10%福馬林中固定，再將檢體包埋於石蠟中以獲得組織塊，方便之後切片並進行不同實驗染色。

3-1 蘇木精－伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin stain, H&E stain)

將組織蠟塊放置在切片機上，以每片 4 μ m 連續切片，貼附在玻片上，放入 37 $^{\circ}$ C 烘箱烘烤隔夜。染色當天，將玻片置於 65 $^{\circ}$ C 烘箱中 15 分鐘，依序將玻片浸入不同溶液中進行脫蠟與復水，分別是二甲苯 7 分鐘與 3 分鐘各一次、無水酒精 5 分鐘兩次、95%酒精 5 分鐘兩次、75%酒精 5 分鐘一次、50%酒精 5 分鐘一次、最後靜置在二次去離子水中，將復水過的玻片取出放入蘇木精染劑中 1~2 分鐘取出，用自來水潤洗玻片去除染劑。再將玻片放入伊紅染劑中 5~10 秒取出。後續步驟依照先前復水步驟的相反方向進行脫水，最後蓋上蓋玻片完成封片後於抽風櫥內晾乾數日以利後續觀察。

3-2 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC)

組織玻片的備妥依照先前敘述步驟製作切片、脫蠟及復水後，將玻片泡入 95 $^{\circ}$ C 的抗原修復液中 (10mM 檸檬酸鈉 & 0.05% TWEEN20) 加熱 20 分鐘，取出放置在室溫環境降溫。後續步驟中，首先以 3%過氧化氫溶液滴在組織上作用 15 分鐘，以 5%胎牛血清蛋白在室溫下處理 1~2 小時，將欲使用的一級抗體依照建議稀釋倍率以

牛血清蛋白稀釋後滴在組織上放置在 4°C 環境下作用 18 小時以上，取出後以 PBST (Phosphate buffer saline + TWEEN20) 配置的二級抗體於室溫下作用一小時，上續步驟之間皆用 PBST 作為洗滌液，每次 5 分鐘各 3 次，最後滴上 DAB (3,3'-diaminobenzidine) 與組織反應 1~5 分鐘，立即將玻片浸泡於自來水中清洗以終止反應，再使用蘇木精染劑染色 15~25 分鐘後，以 50 倍稀釋的氫水溶液過水，即可依照先前步驟進行脫水並封片，晾乾數日後觀察呈色結果。

4. 西方墨點法 (Western Blot, WB)

實驗動物犧牲前採集之檢體放置在 -80°C 環境中保存，使用時，以液態氮維持低溫研磨成粉末，在 1.5ml 微量離心管中加入 100 μ l 細胞裂解液 (Radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)，混合均勻後置於冰上作用 10 分鐘，以 14000rpm、4°C 條件下離心 30 分鐘，並收集上清液完成蛋白質樣本萃取。定量未知樣本蛋白質濃度時使用 BCA (Bicinchoninic acid, 23225) 標準溶液做已知蛋白質濃度回測之標準曲線，分別配置濃度為 0 μ g/ μ l、0.4 μ g/ μ l、0.8 μ g/ μ l、1.6 μ g/ μ l、2 μ g/ μ l 的蛋白質溶液，使用分光光度計以 562 nm 波長測定以知蛋白質濃度溶液和未知濃度樣本溶液之濃度。隨後使用 4x dye 與 RIPA 溶液與各組樣本調配出各組別蛋白質濃度皆一致的溶液，放進 99°C 乾浴槽中反應 5 分鐘後立即取出置於冰上冷卻，至此完成各組別樣本配置。

依據欲觀察特定蛋白質之分子量決定使用8~12% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠進行電泳(SDS-PAGE)，於電泳完成後，將凝膠上蛋白質以4°C、100 mA 條件轉漬到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Millipore, Billerica, MA, USA)，過程至少18小時。轉漬完成後，將膜浸泡於Ponceau S中確保蛋白質有轉漬成功，後續視需求對膜進行裁切，使用5% BSA溶液作為blocking buffer在室溫、50 rpm下作用一小時，加入使用TBST(Tris Buffered Saline with TWEEN 20)稀釋調配之一級抗體於4°C環境中作用至少18小時，之後加入以TBST稀釋調配之二級抗體在室溫、50 rpm下作用一小時，上述步驟不同溶液之間皆會使用TBST在50 rpm、室溫下洗滌各三次。最後取出膜，在冷光照相儀器中加入ECL溶液，使用冷光照相系統(ImageQuant LAS 4000 mini, GE 15 Healthcare Bio-sciences AB, Canada)進行影像拍照，後續使用Image J軟體分析。

5. 統計分析

西方墨點法結果使用Image J軟體做量化分析，免疫組織化學染色結果使用Fiji軟體量化分析，此次研究所收集之各項數據使用Prism 6軟體進行統計分析，分析結果皆以平均值±標準偏差(Standard deviation, SD)呈現，各組別之間統計差異使用unpaired two-tailed student's t-test分析，檢定後各組之間呈現* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** p

< 0.001代表有顯著差異。



肆、結果

一、酵素法果糖酯的合成

1. 粗產物轉化率

使用 Suger SZ5532 6.0 mmID×150 mmL 管柱，將果糖、葡萄糖及高果糖漿轉酯化反應前後以 HPLC 分析算出反應前後的各產物與反應物量(莫耳數)，將反應物起始量扣除剩餘量再除以起始量，乘上百分之百，即可算出各個反應物的轉化率。果糖轉化率為 69.2%，葡萄糖轉化率為 95%，高果糖漿中的果糖為 62.5%，高果糖漿中的葡萄糖為 80.4%。

2. 單丙酸果糖酯 1 (Fructose mono-propionate 1, FMP1)

此實驗利用果糖做為反應物 (Fru:V3=1:5)，加入 Novozyme 435 後，於 40°C 環境下反應 2 小時，利用 MPLC、HPLC 及檢量線定量，將產物糖酯的莫耳數除以反應物果糖的莫耳數，再乘以百分之百，算出轉化率約為 23.4%。

3. 單丙酸果糖酯 2 (Fructose mono-propionate 2, FMP2)

此實驗利用果糖做為反應物 (Fru:V3=1:2)，加入 Novozyme 435 後，於 60°C 環境下反應 24 小時，利用 MPLC、HPLC 及檢量線定量，將產物糖酯的莫耳數除以反應物果糖的莫耳數，再乘以百分之百，算出轉化率約為 21.6%。

4. 雙丙酸果糖酯 (Fructose di-propionate, FDP)

此實驗利用果糖做為反應物 (Fru:V3=1:5)，加入 Novozyme 435 後，於 40°C 環境下反應 24 小時，利用 MPLC、HPLC 及檢量線定量，將產物糖酯的莫耳數除以反應物果糖的莫耳數，再乘以百分之百，算出轉化率約為 29.6 %。

5. 單月桂酸果糖酯 (Fructose mono-laurate, FML2)

此實驗利用果糖做為反應物 (Fru:V3=1:3)，加入 Novozyme 435 後，於 40°C 環境下反應 24 小時，利用 MPLC、HPLC 及檢量線定量，將產物糖酯的莫耳數除以反應物果糖的莫耳數，再乘以百分之百，算出轉化率約為 24.2 %。

二、果糖酯初產物分析

1. 薄層液相層析法 (Thin liquid chromatography, TLC)

產物以 Merck silica 60 F254 TLC 層析片分析，展層液為 Ethyl acetate (EA): MeOH: Acetic acid (HAc)=90:10:2，顯色劑 (Folin & Ciocalteu's phenol reagent: ethanol (EtOH)=2:8) 噴灑，並以 120°C 烘烤 20 分鐘以完成產物顯色。可以看到反應後，每個反應物的初產物的成分 (圖一)。

2. 高效液相層法 (High performance liquid chromatography, HPLC)

產物以 0.22 μm PVDF filter 過濾後，以 HPLC 分析，管柱為 Thermo hypersil ODS，溫度為 40 或 60 $^{\circ}\text{C}$ ，移動相為 methanol (MeOH): water=15:85 或 30:70，偵測器為 Reflective index detector RI2000，流速 1 ml/min。可以看到反應後，每個反應物的初產物的成分（圖二）（圖三）（圖四）。

三、果糖酯純化

以 Agela Technologies Flash system/Cheetah MP Series preparative liquid chromatography system (MPLC) 進行純化，純化 FMP1（圖五）、FMP2（圖六）時，採用管柱 Flash column spherical C18 20-35 μm 80 g，管柱溫度: 60 $^{\circ}\text{C}$ 。純化 FDP（圖七）時，採用管柱 Flash column spherical C18 20-35 μm 80 g，管柱溫度: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。純化 FML2（圖八）時，採用管柱 Flash column spherical C18 20-35 μm 80 g，管柱溫度: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。移動相 A: water, B: MeOH，以系統程式調控隨時的移動相 A、B 占比（%），流速 45 ml/min 與收集單位大小（ml/fraction）。偵測器: UV detector, detector wave length: 205 nm; monitor wave length: 240 nm。經 TLC 方法鑑定並收集純品，以迴旋濃縮機於 10~60 $^{\circ}\text{C}$ ，27.5~29.9 inch Hg 低壓抽除溶劑，以獲得乾燥純品。

四、果糖酯分析

產物以 0.22 μm PVDF filter 過濾後，以 HPLC 分析，分析 FMP1

及 FMP2，管柱為 Venusil AQ C18，溫度為 45°C，移動相為 MeOH: water=95:5。分析 FDP，管柱為 Thermo hypersil ODS，溫度為 40°C，移動相為 MeOH: water=30:70。偵測器為 Reflective index detector RI2000，流速 1 ml/min。可以看到 FMP1（圖九）、FMP2（圖十）及 FDP（圖十一），在經過純化後，成分都變得單一，無其他雜質。

五、果糖酯定量

產物以 0.22 μ m PVDF filter 過濾後，利用高效液相層析法（HPLC），管柱為 Venusil AQ C18 4.6 mmID \times 250 mmL，FMP1 及 FMP2 溫度為 45°C，FDP 溫度為 40°C，FMP1（圖十二）及 FMP2（圖十二）移動相為 MeOH: MQ=5:95，FDP（圖十二）移動相為 MeOH: MQ=30:70，FML2（圖十二）的管柱則為 Thermo hypersil ODS，溫度為 40°C，移動相為 methanol (MeOH): water=65:35，將不同濃度之產物進行分析，偵測器為 Reflective index detector RI2000，流速 1 ml/min。即可做出標準曲線，以利於產物之定量。

六、內毒素吸附力分析

作法參照 Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Doc. Part No. 2162713 Pub. No. MAN0017902 Rev. A.0)，在第一步驟前，先將樣品（25 μ L）與內毒素（1 EU/ml, 25 μ L）充分混合，在 37°C 下放置 2 小時。在 Fructose、FMP1、FDP 中，可以看到內毒素有被吸附。Fructose

在 2.2×10^{-2} 吸附率約為 42%，FMP1 在 8.5×10^{-2} 吸附率約為 36%，FDP 在 7×10^{-6} 吸附率約為 14%（圖十三）。

七、離體自由基

將樣品分別配置 4×10^{-3} 、 4×10^{-4} 、 4×10^{-5} 、 4×10^{-6} mg/ml，每個濃度做三重複分析，在 Fructose（圖十四）中，可以看到隨著濃度越高，抗氧化能力是越強的；在 FMP1（圖十四）、FMP2（圖十四）及 FDP（圖十四）中，可以看到隨著濃度越高，抗氧化能力越強，在 4×10^{-5} 這個濃度時，有最好的抗氧化能力，濃度過高時，抗氧化能力則會下降，推測可能是因為在濃度過高的情況下，會導致他們聚合，而產生 Micelle 這種乳糜粒，導致它們不能有效地跟外界作反應，而導致這種情形發生。

八、MTT 試驗

測完 OD570 的值，做出統計圖表後，算出 IC50，在細胞內的劑量大約為 1.3 mg/ml，換算成體內試驗的劑量大約為 60 mg/kg（圖十五）。

九、動物實驗

將老鼠分成四組，並進行實驗：(1) 正常給予生理食鹽水 (n=8)；(2) LPS 組給予 LPS (50mg/kg, iv, n=8)；(3) LPS+低劑量果糖酯，大鼠在給予低劑量果糖酯 (10mg/kg, iv) 後 15 分鐘施打 LPS (n=8)；

(4) LPS+高劑量果糖酯，大鼠在給予高劑量果糖酯 (20mg/kg, iv) 後 15 分鐘施打 LPS (n=8)。

在正常給予生理食鹽水的組別當中，可以觀察到，動物全身的表面血流量非常的穩定，而在給予 LPS 組中，我們觀察到動物的表面血流量逐漸地減少，在 LPS+低劑量級高劑量果糖酯組別中，動物的表面血流量雖然也是逐漸減少，但與單純給予 LPS 的組相比，在後期表面血流量是有比較多的。

十、分生實驗

利用免疫化學染色的方法，可以看到，GPX4 在實驗大鼠的腎臟及小腸組織切片中，LPS 組別在經過 LPS 誘發敗血症後，GPX4 表現量相較於 Con 組確實下降許多，而在有給予 FDP 的組別當中，GPX4 的表現量相較於 Con 組確實有上升，而且有因濃度越高效果越好(圖二十、二十一)。在西方墨點法檢測中，GPX4 在大鼠腎臟及肝臟組織中，LPS 組別因 LPS 的誘導，表現量相較於 Con 組皆有下降，而在有給予 FDP 的組別中，表現量相較於 Con 組皆有上升(圖二十二、二十六)；caspase3、PARP、4HNE 在大鼠腎臟及肝臟組織中，LPS 組別因 LPS 的誘導，表現量相較於 Con 組皆有上升，而在有給予 FDP 的組別中，表現量相較於 Con 組皆有下降(圖二十三、二十四、二十五、二十七、二十八)。透過以上實驗，我們可以得

知，LPS 誘導會使動物體內產生氧化壓力並且造成細胞凋亡，而給予 FDP 會使這些情況得以緩解。



伍、討論

在先前果糖以及果糖酯混合物對於 LPS 的吸附能力試驗中，我們可以看到，果糖酯混合物相較於果糖的吸附能力有大大的提升，然而當我們將果糖酯混合物中的每一個成份一一純化分離後，得到的結果卻跟我們當初預期的不同，雖然純物質也有吸附 LPS 的效果，但效果不如果糖本身還要好，我們推測可能是因為果糖酯混合物當中，不同成份之間存在著一些相互作用的能力，因此純物質的效果才會不如混合物。

在內毒素吸附能力的試驗當中，效果雖然不如預期的那麼好，但在體內試驗當中，效果卻相當不錯，推測可能是因為當 FDP 進入體內後，因為血液當中的成份相當複雜，可能因為一些生理機制而讓 FDP 有相當好的效果，因此，未來有機會的話可以再更深入的去研究這些分子機制，就能更清楚了解 FDP 在身體中的反應路徑。

參考資料

- Arcos, J.A., Bernabé, M., and Otero, C. (1998a). Different strategies for selective monoacylation of hexoaldoses in acetone. *Journal of Surfactants and Detergents* 1, 345-352.
- Arcos, J.A., Bernabé, M., and Otero, C. (1998b). Quantitative enzymatic production of 1,6-diacyl fructofuranoses. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 27-35.
- Cohen, J.R. (2002). The Ethics of Respect in Negotiation. *Negotiation Journal* 18, 115-120.
- Coulon, D., Girardin, M., Engasser, J.M., and Ghoul, M. (1997). Investigation of keys parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalyzed by an immobilized lipase. *Industrial Crops and Products* 6, 375-381.
- Coulon, D., Ismail, A., Girardin, M., Rovel, B., and Ghoul, M. (1996). Effect of different biochemical parameters on the enzymatic synthesis of fructose oleate. *Journal of Biotechnology* 51, 115-121.
- Dandekar, P., and Patravale, V. (2009). Enzymatic synthesis of fructose ester from Mango Kernel Fat. *Indian Journal of Chemical Technology* 16, 317-321.
- Ferrer, M., Soliveri, J., Plou, F., López-Cortés, N., Reyes-Duarte, D., Christensen, M., Copa-Patiño, J., and Ballesteros, A. (2005). Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme and Microbial Technology* 36,

391-398.

Freedman, B., Butterfield, R.O., and Pryde, E.H. (1986).

Transesterification kinetics of soybean oil 1. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 63, 1375-1380.

Guauque, P., Foresti, L., and Ferreira, M. (2014). CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core. Study of their catalytic activity. *Biochemical Engineering Journal* 90.

Haberbeck, L.U., Alberto da Silva Riehl, C., de Cássia Martins Salomão, B., and Falcão de Aragão, G.M. (2012). *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. *LWT - Food Science and Technology* 46, 267-273.

Hidayat, C., Fitria, K., Supriyanto, and Hastuti, P. (2016). Enzymatic Synthesis of Bio-Surfactant Fructose Oleic Ester Using Immobilized Lipase on Modified Hydrophobic Matrix in Fluidized Bed Reactor. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 9, 353-362.

Jin, Z., Liang, S., Zhang, X., Han, S., Ren, C., Lin, Y., and Zheng, S. (2013). Synthesis of fructose laurate esters catalyzed by a CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cell biocatalyst in a non-aqueous system. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 18, 365-374.

Karlová, T., Polakova, L., Šmidrkal, J., and Filip, V. (2010).

Antimicrobial Effects of Fatty Acid Fructose Esters. *Czech Journal of Food Sciences* 28, 146-149.

- Kobayashi, T. (2011). Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media. *Biotechnol Lett* 33, 1911-1919.
- Koga, T., Hamada, S., Murakawa, S., and Endo, A. (1982). Effect of a glucosyltransferase inhibitor on glucan synthesis and cellular adherence of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 38, 882-886.
- Lee, K.P., and Kim, H.K. (2016). Antibacterial Effect of Fructose Laurate Synthesized by *Candida antarctica* B Lipase-Mediated Transesterification. *J Microbiol Biotechnol* 26, 1579-1585.
- Lee, S.M., Sandhu, G., and Walsh, M.K. (2017). Growth inhibitory properties of lactose fatty acid esters. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24, 1483-1488.
- Li, L., Ji, F., Wang, J., Li, Y., and Bao, Y. (2015). Esterification degree of fructose laurate exerted by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 69, 46-53.
- Mohammed Gumel, A., Annuar, M.S., Heidelberg, T., and Chisti, Y. (2011). Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochemistry* 46, 2079-2090.
- Neta, N.S., Peres, A.M., Teixeira, J.A., and Rodrigues, L.R. (2011). Maximization of fructose esters synthesis by response surface methodology. *New Biotechnology* 28, 349-355.
- Neta, N.S., Teixeira, J.A., and Rodrigues, L.R. (2015). Sugar ester surfactants: enzymatic synthesis and applications in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, 595-610.
- Ng, T.M., and Schaffner, D.W. (1997). Mathematical Models for the

Effects of pH, Temperature, and Sodium Chloride on the Growth of *Bacillus stearothermophilus* in Salty Carrots. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1237-1243.

Opal, S.M. (2010). Endotoxins and other sepsis triggers. *Contributions to Nephrology* 167, 14-24.

Otera, J. (1993). Transesterification. *Chemical Reviews* 93, 1449-1470.

Rittig, M.G., Kaufmann, A., Robins, A., Shaw, B., Sprenger, H., Gemsa, D., Foulongne, V., Rouot, B., and Dornand, J. (2003). Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 74, 1045-1055.

Šabeder, S., Habulin, M., and Knez, Ž. (2006). Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Food Engineering* 77, 880-886.

Scheckermann, C., Schlotterbeck, A., Schmidt, M., Wray, V., and Lang, S. (1995). Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 157-162.

Schlotterbeck, A., Lang, S., Wray, V., and Wagner, F. (1993). Lipase-catalyzed monoacylation of fructose. *Biotechnology Letters* 15, 61-64.

Schwab, A.W., Bagby, M.O., and Freedman, B. (1987). Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. *Fuel* 66, 1372-1378.

Spiliotis, N., Voutsas, E., Magoulas, K., and Tassios, D. (2000). Recovery

of fructose laurate produced through enzymatic esterification.

Separation and Purification Technology 19, 229-236.

Sutili, F.K., Ruela, H.S., Nogueira, D.D.O., Leal, I.C.R., Miranda, L.S.M., and De Souza, R.O.M.A. (2015). Enhanced production of fructose ester by biocatalyzed continuous flow process.

Sustainable Chemical Processes 3.

Taskinen, M.R., Packard, C.J., and Boren, J. (2019). Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients* 11.

Tsujimoto, H., Gotoh, N., and Nishino, T. (1999). Diffusion of macrolide antibiotics through the outer membrane of *Moraxella catarrhalis*.

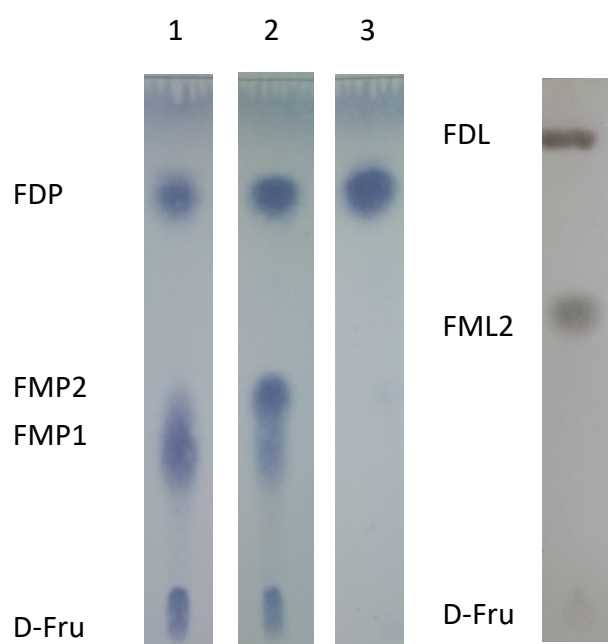
Journal of Infection and Chemotherapy 5, 196-200.

Tukel, S., Sahin, P.B., and Yildirim, D. (2013). Optimization of lipase-catalyzed synthesis of fructose stearate using response surface methodology. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 41, 344-351.

Watanabe, T., Katayama, S., Matsubara, M., Honda, Y., and Kuwahara, M. (2000). Antibacterial Carbohydrate Monoesters Suppressing Cell Growth of *Streptococcus mutans* in the Presence of Sucrose.

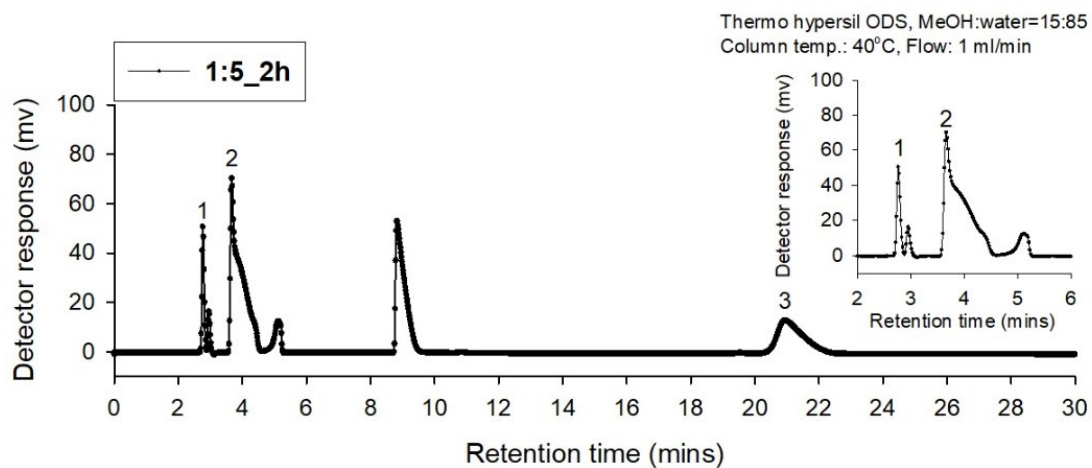
Current Microbiology 41, 210-213.

Xin, L. (2014). Antimicrobial structure-efficacy relationship of sugar fatty acid esters. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6, 944-946.



圖一、合成 FMP1, FMP2 與 FDP 之 TLC 分析結果

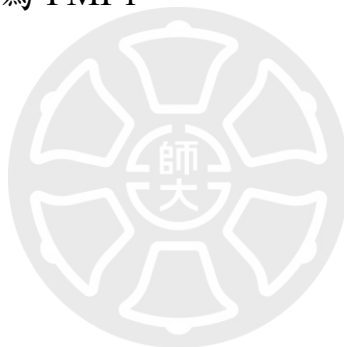
Lane 1 為 FMP 1 之合成結果，Lane 2 為 FMP 2 之合成結果，Lane 3 為 FDP 之合成結果，Lane 4 為 FML 2 之合成結果，以上皆以展層液展層一次。

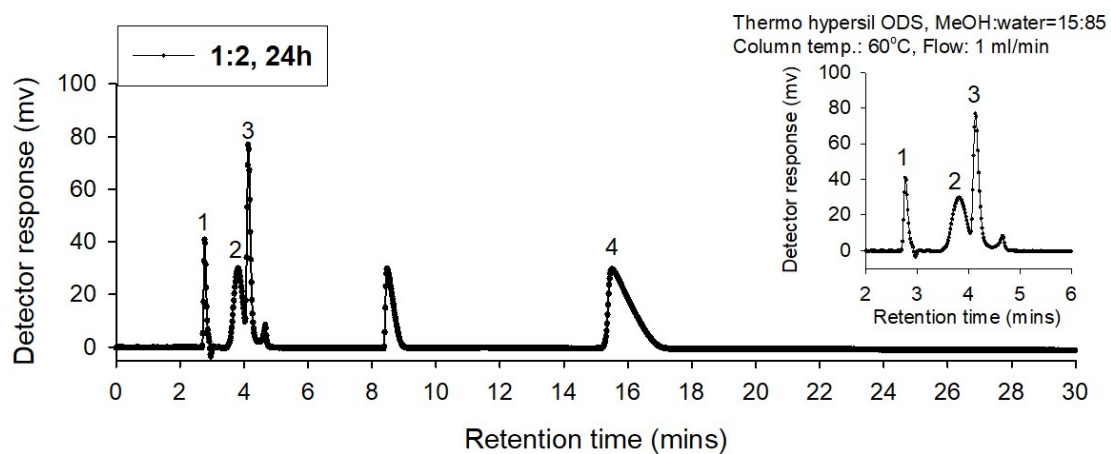


圖二、合成 FMP1，HPLC 分析結果

Peak 1 為尚未用盡之 D-Fru，Peak 2 為 FMP1，Peak 3 為 FDP。

可以看出主要產物為 FMP1。



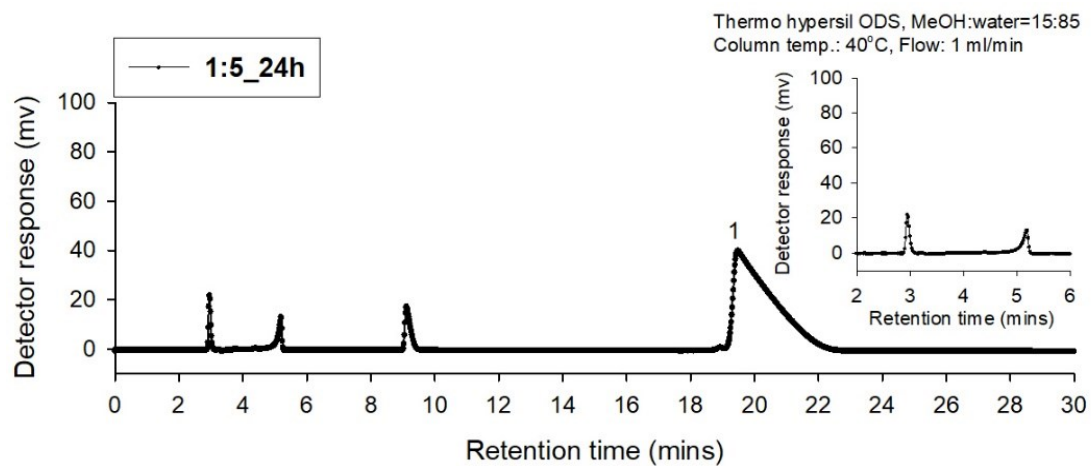


圖三、合成 FMP2，HPLC 分析結果

Peak 1 為尚未用盡之 D-Fru，Peak 2 為 FMP1，Peak 3 為 FMP2，

Peak 4 為 FDP。FMP2 可藉由後續純化取得。

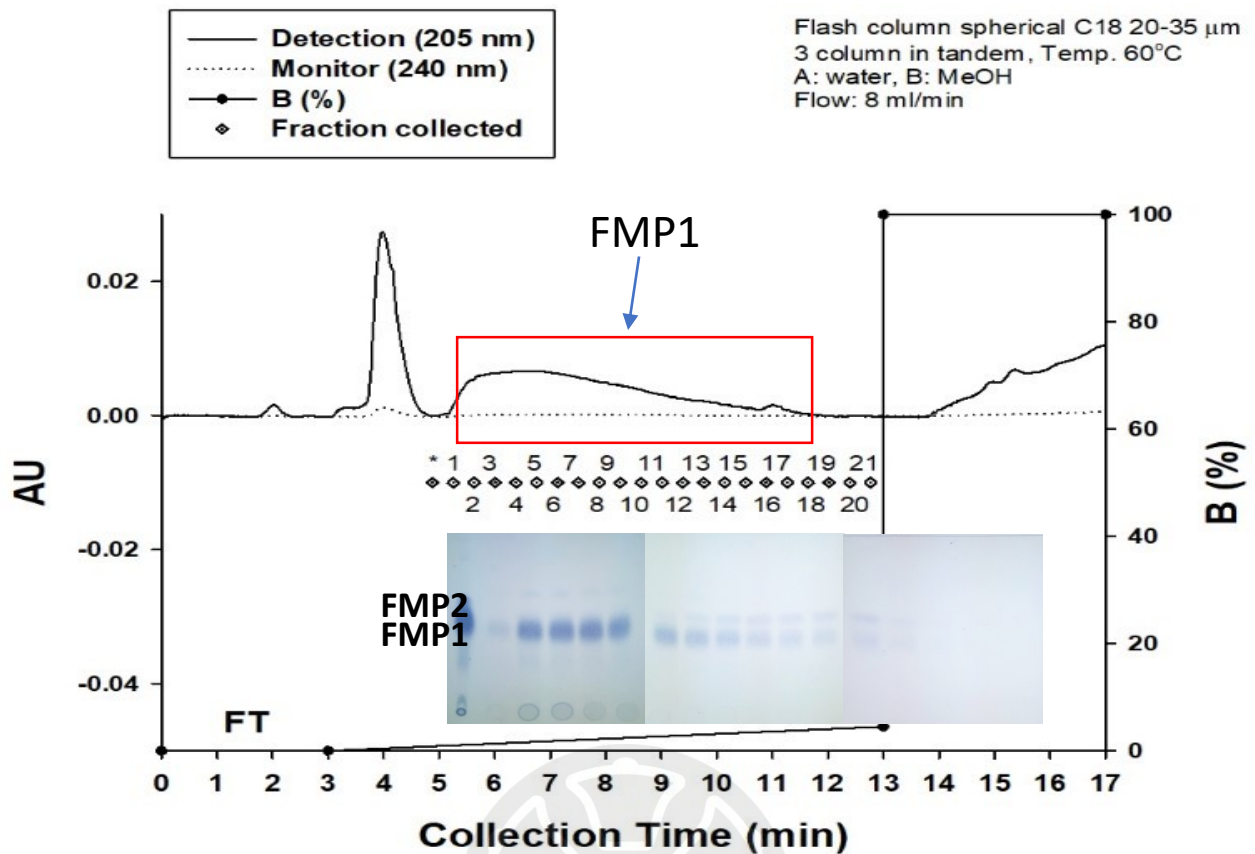




圖四、合成 FDP，HPLC 分析結果

Peak 1 為 FDP。可看出 FDP 為主要產物。



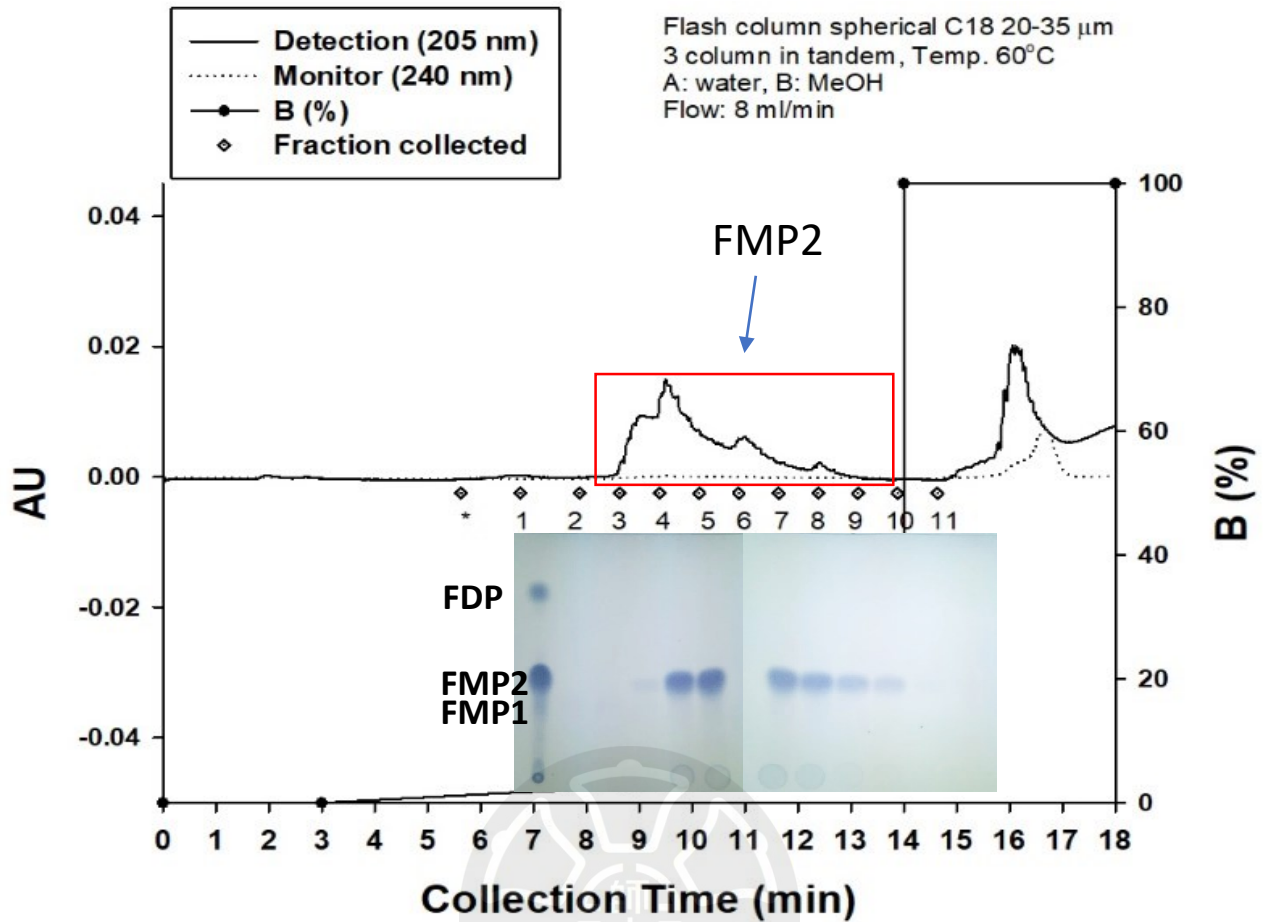


圖五、MPLC 純化 FMP1，分析結果

B%: 0-3 mins. =Flow through(FT), 3-13 mins., 0-4.5 %; 13-17 mins., 100 %

在 1~18 管當中都可以發現 FMP1 的存在，但只有 2~5 管相對比較純，因此我們只收集較純的管，接著去抽乾作後續實驗。

*表示在此時間點之前之時間樣品拋棄。數字表示 fraction 編號，並表示在此時間點到上一個 fraction 之時間點之間為此 fraction 之收集時段。Fraction 1-21 收集單位為 3 ml。

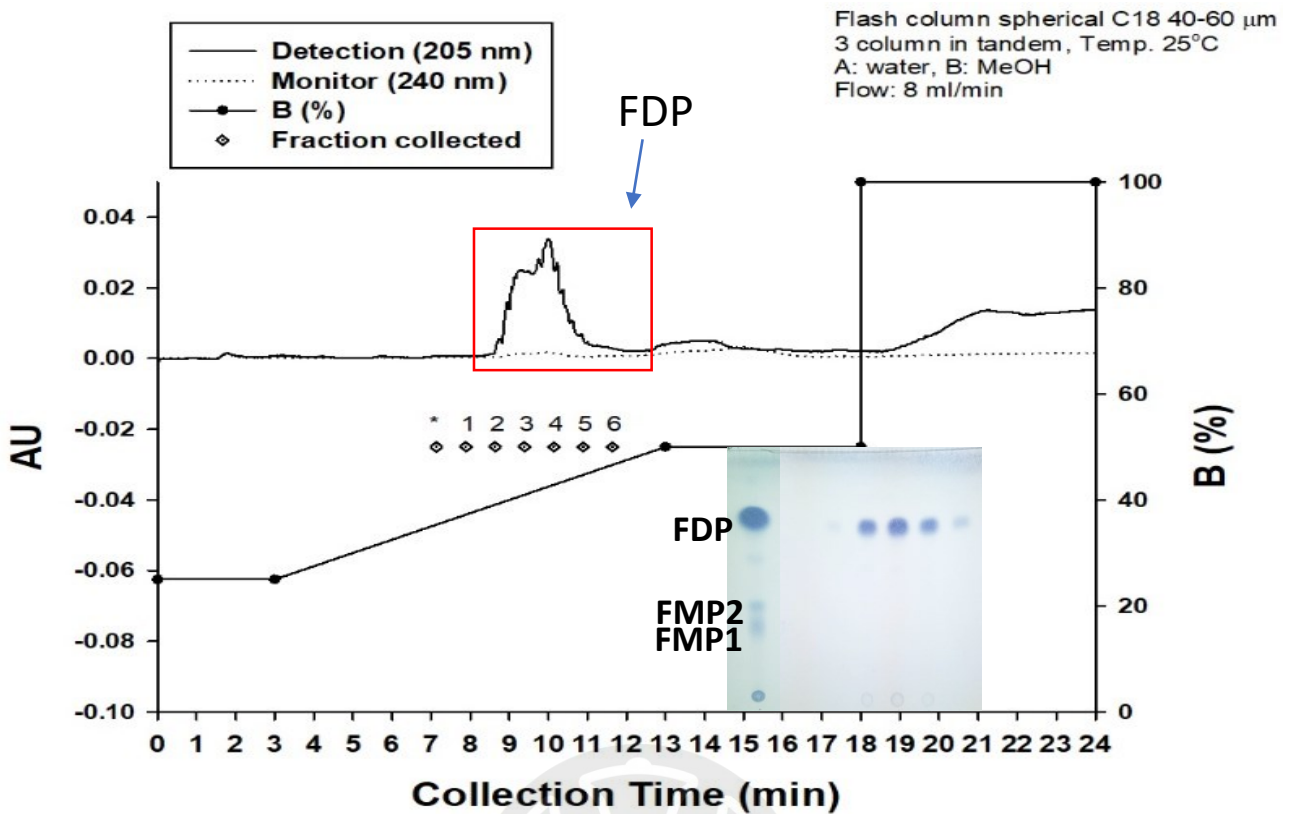


圖六、MPLC 純化 FMP2，分析結果

B%: 0-3 mins. =Flow through (FT), 20%; 3-14 mins., 0-5%; 14-18 mins., 100%。

在 3~10 管當中都可以發現 FMP2 的存在，但只有 4~8 管相對比較純，因此我們只收集較純的管，接著去抽乾作後續實驗。

*表示在此時間點之前之時間樣品拋棄。數字表示 fraction 編號，並表示在此時間點到上一個 fraction 之時間點之間為此 fraction 之收集時段。Fraction 1-11 收集單位為 3 ml。

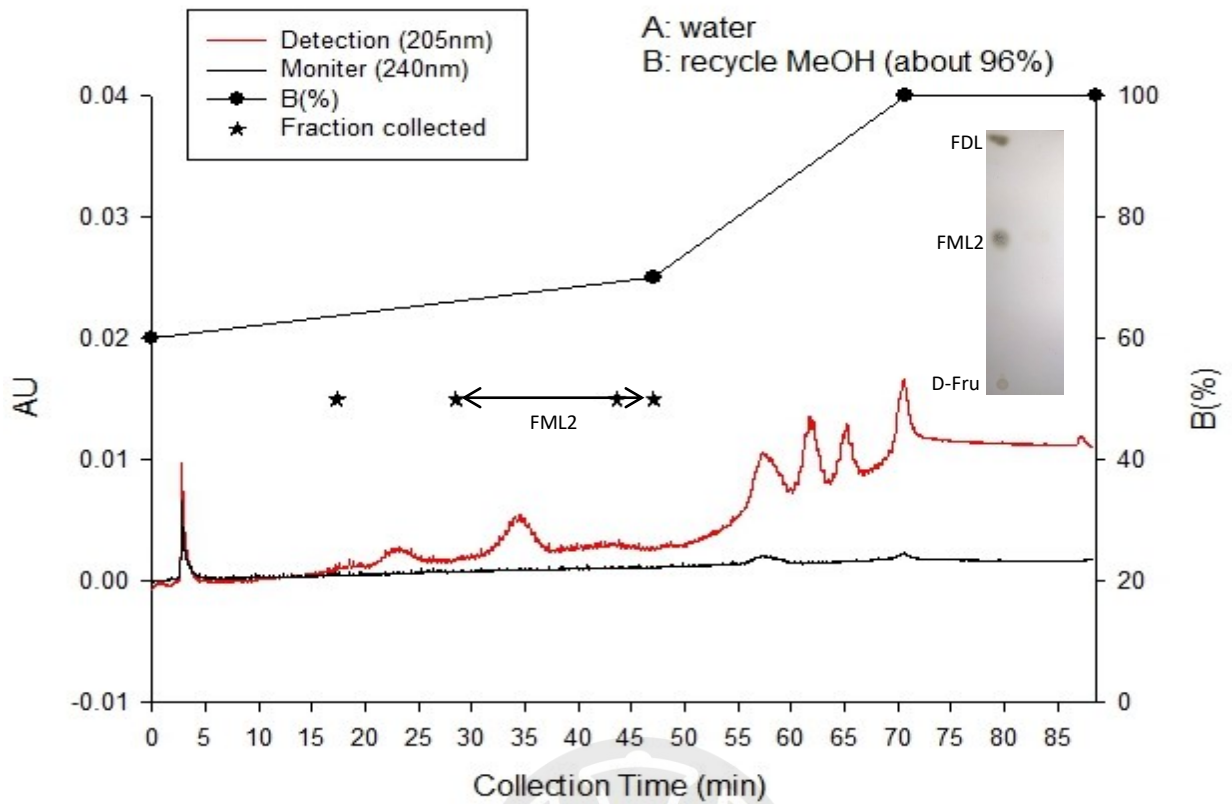


圖七、MPLC 純化 FDP，分析結果

B%: 0-3 mins. =Flow through (FT) , 25 %; 3-13 mins., 25-50 %; 13-18 mins., 50 %; 18-24 mins., 100 %。

在 1~6 管當中都可以發現 FDP 的存在，但只有 3~5 管相對比較純，因此我們只收集較純的管，接著去抽乾作後續實驗。

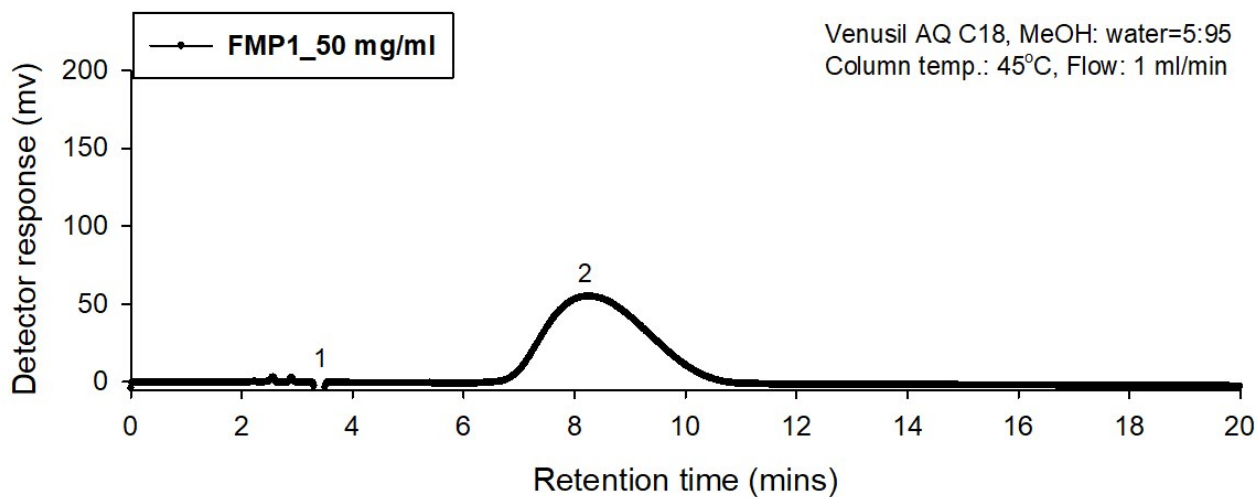
*表示在此時間點之前之時間樣品拋棄。數字表示 fraction 編號，並表示在此時間點到上一個 fraction 之時間點之間為此 fraction 之收集時段。Fraction 1-6 收集單位為 3 ml。



圖八、MPLC 純化 FML2，分析結果

B%: 0-47.1 mins., =60-70 %; 47.1-70.7 mins., 70-100 %; 70.7-88.5 mins., 100 %。

箭頭表示在此時間點收集。

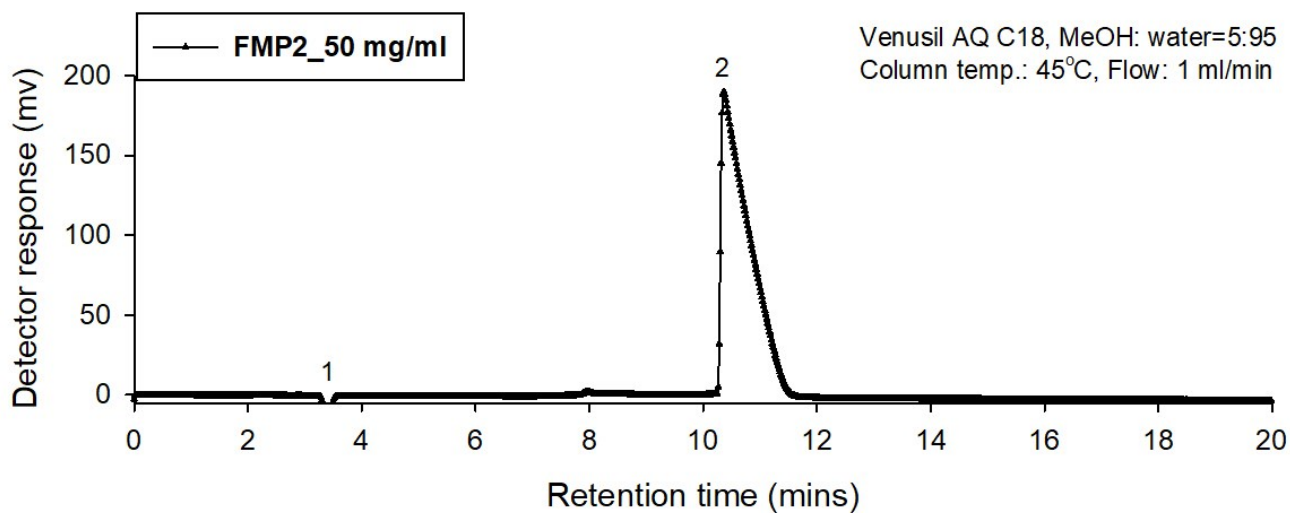


圖九、FMP1 之純品，以 HPLC 檢查之結果

Peak 1: solvent peak, Peak 2: FMP1

由 HPLC 分析結果可知，純化之 FMP1，純度相當高，去除了大量的 D-Fru、FMP2、FDP。





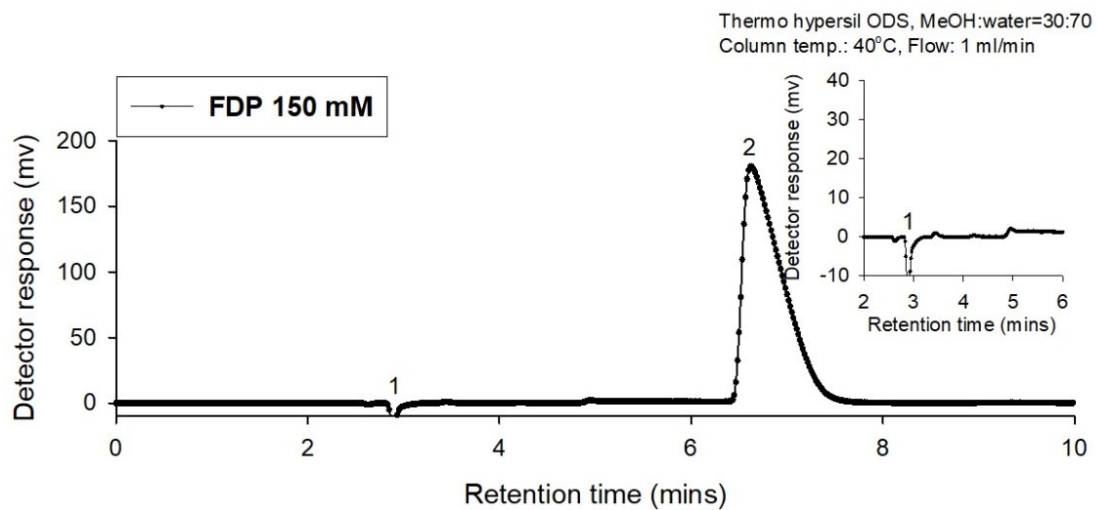
圖十、FMP2 之純品，以 HPLC 檢查之結果

Peak 1: solvent peak, Peak 2: FMP2

由 HPLC 分析結果可知，純化之 FMP2，純度相當高，去除了 D-

Fru、FMP1、FDP。





圖十一、FDP 之純品，以 HPLC 檢查之結果

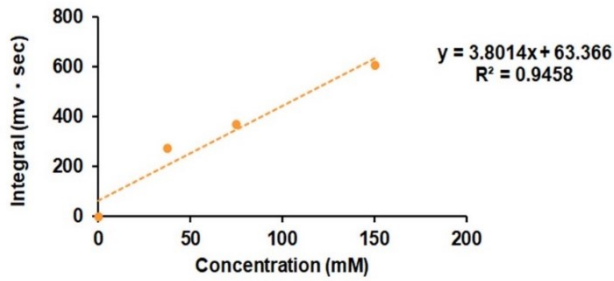
Peak 1: solvent peak, Peak 2: FDP

由 HPLC 分析結果可知，純化之 FDP，純度相當高，僅發現 FDP 之單一 peak。



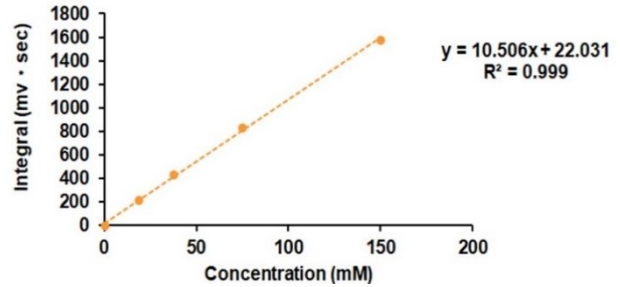
| | |
|----------------|--|
| Mobile Phase | MeOH : MQ = 5 : 95 |
| Column | Thermo hypersil ODS 4.6 mmID x 250 mmL |
| Column Temp | 45 °C |
| Retention Time | 15 |
| Flow Rate | 1 ml/ min |

FMP1



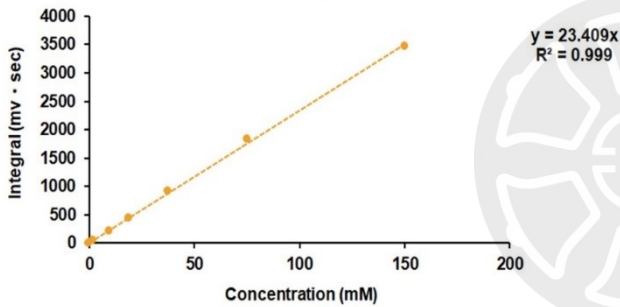
| | |
|----------------|--|
| Mobile Phase | MeOH : MQ = 5 : 95 |
| Column | Thermo hypersil ODS 4.6 mmID x 250 mmL |
| Column Temp | 45 °C |
| Retention Time | 15 |
| Flow Rate | 1 ml/ min |

FMP2



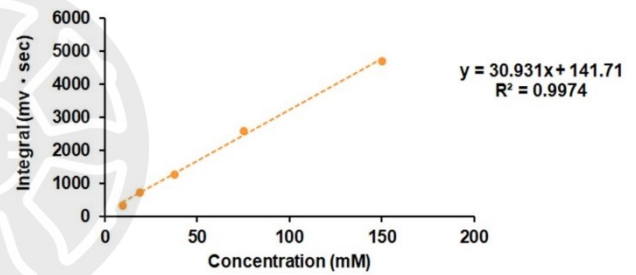
| | |
|----------------|-----------------------------------|
| Mobile Phase | MeOH : MQ = 30 : 70 |
| Column | Venusil AQ C18 4.6 mmID x 250 mmL |
| Column Temp | 40 °C |
| Retention Time | 15 |
| Flow Rate | 1 ml/ min |

FDP

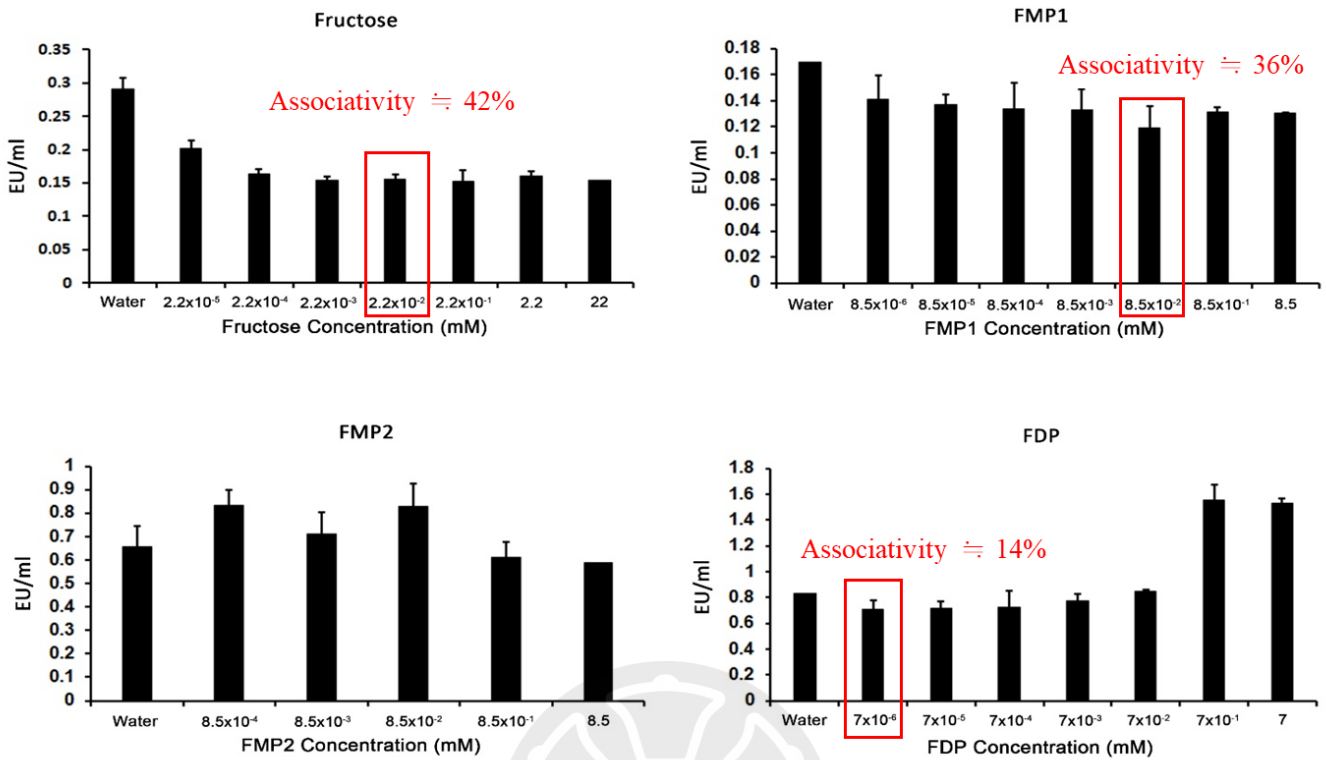


| | |
|----------------|-----------------------------------|
| Mobile Phase | MeOH : MQ = 65 : 35 |
| Column | Venusil AQ C18 4.6 mmID x 250 mmL |
| Column Temp | 40 °C |
| Retention Time | 40 |
| Flow Rate | 1 ml/ min |

FML2

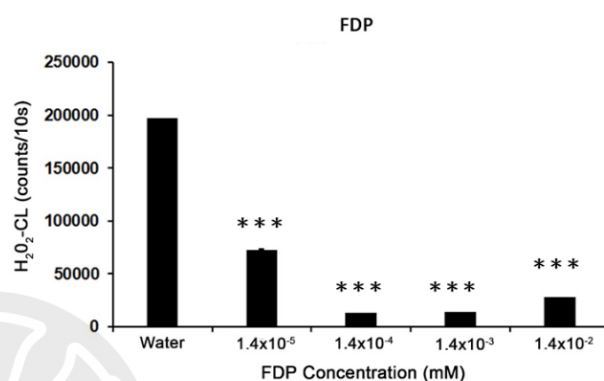
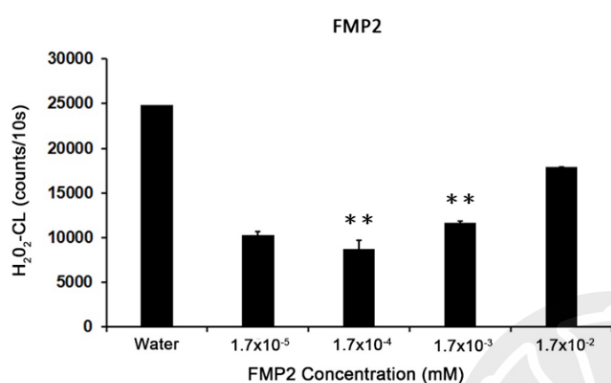
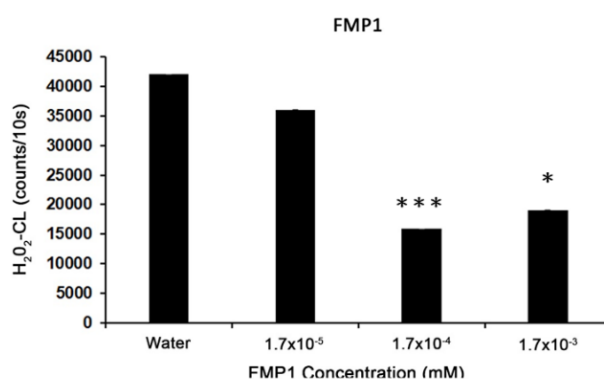
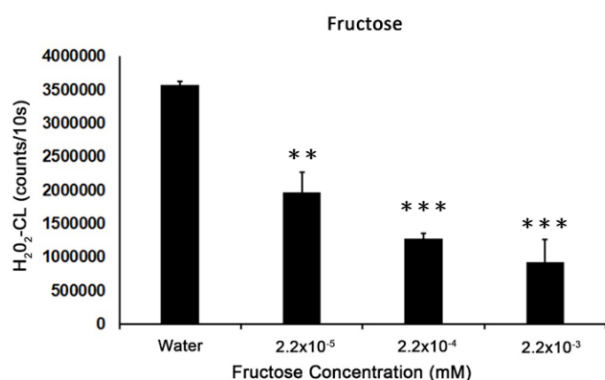


圖十二、各糖酯之標準曲線



圖十三、Fructose 吸附內毒素能力試驗結果

由上圖可以看到，Fructose 吸附內毒素能力相較於其他糖酯來說，效果比較好一些，這跟當初果糖酯混合物所做出來的實驗結果有些不同，因此我們推測混合物效果之所以比較好，可能是因為各個純物質樣品間也許有其他的相互作用，因此導致在內毒素吸附能力的實驗中，純物質的效果沒有想像中好。



| | Concentration of fructose (mM) | CL (counts/10s) | Relative activity (%) | | Concentration of FMP2 (mM) | CL (counts/10s) | Relative activity (%) |
|---|--------------------------------|-----------------|-----------------------|---|----------------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | Water | 3566369 | 100% | 1 | Water | 24862 | 100% |
| 2 | 2.2×10^{-5} | 1968886 | 54% | 2 | 1.7×10^{-5} | 10282 | 41% |
| 3 | 2.2×10^{-4} | 1276044 | 36% | 3 | 1.7×10^{-4} | 8720 | 35% |
| 4 | 2.2×10^{-3} | 925769 | 26% | 4 | 1.7×10^{-3} | 11669 | 47% |

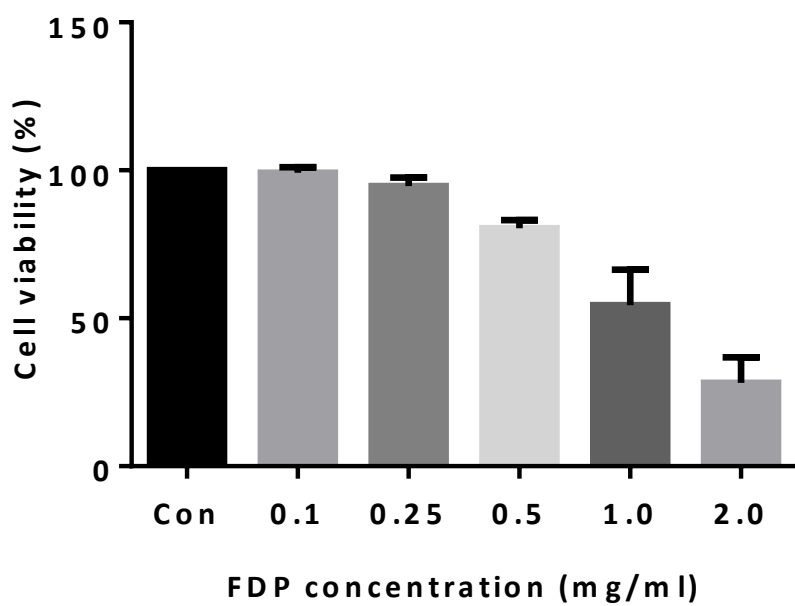
| | Concentration of FMP1 (mM) | CL (counts/10s) | Relative activity(%) | | Concentration of FDP (mM) | CL (counts/10s) | Relative activity(%) |
|---|----------------------------|-----------------|----------------------|---|---------------------------|-----------------|----------------------|
| 1 | Water | 42041 | 100% | 1 | Water | 197452 | 100% |
| 2 | 1.7×10^{-5} | 36087 | 86% | 2 | 1.4×10^{-5} | 72393 | 37% |
| 3 | 1.7×10^{-4} | 15842 | 38% | 3 | 1.4×10^{-4} | 13546 | 7% |
| 4 | 1.7×10^{-3} | 19082 | 45% | 4 | 1.4×10^{-3} | 13798 | 7% |
| | | | | 5 | 1.4×10^{-2} | 28089 | 14% |

圖十四、離體自由基檢測

在離體自由基的檢測當中，Fructose 隨著濃度越高，抗氧化能力越好，而 FMP1、FMP2 及 FDP 在濃度為 10^{-4} 時效果最好，但在濃度更高時，效果反而會變差，是因為糖酯會有乳糜粒(micelles)的形式產生，會造成糖酯無法有效的跟外界去做反應，因此當濃度過高時效果會變差。當濃度同樣為 10^{-4} 時，清除 H_2O_2 的能力最好的物質為 FDP，因此後續體內試驗，我們則選用 FDP 去進行。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

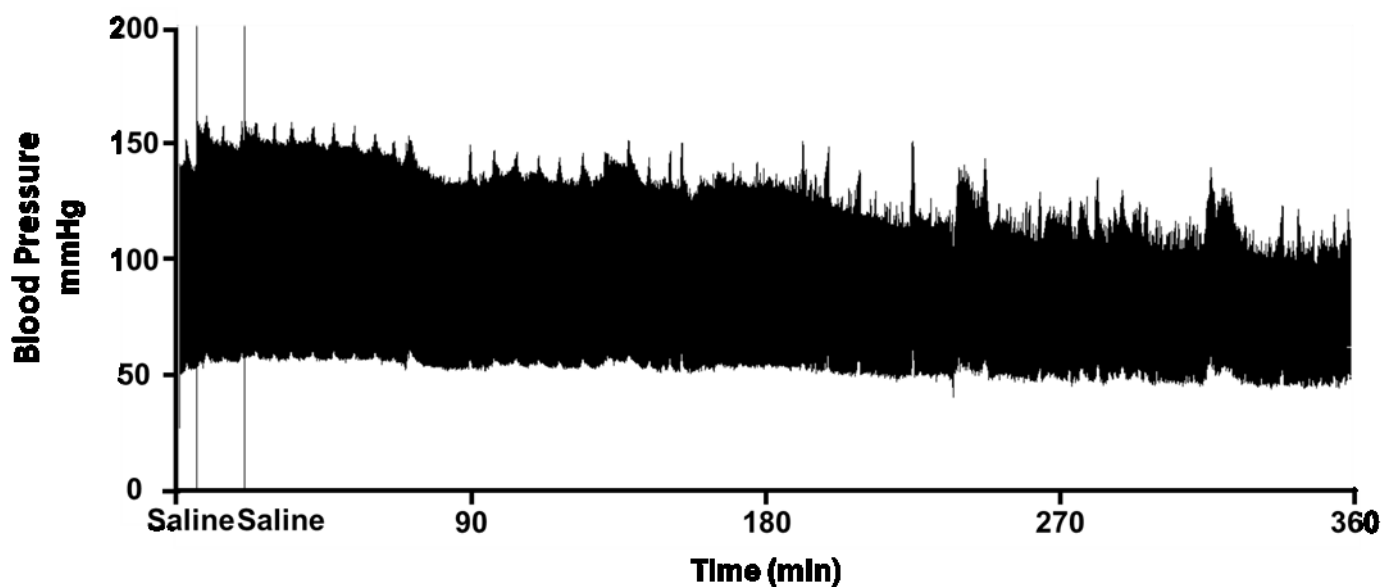


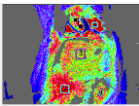
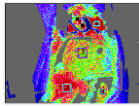
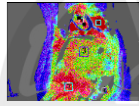
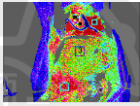
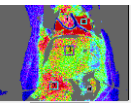
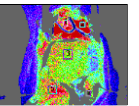
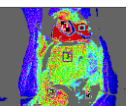


圖十五、MTT assay

使用肝臟內皮細胞進行MTT試驗，統計後各組之間皆無顯著性差異。

利用數值去計算出IC50，體外試驗劑量大約為每毫升1.3毫克，換算成體內試驗的劑量大約為每公斤60毫克。

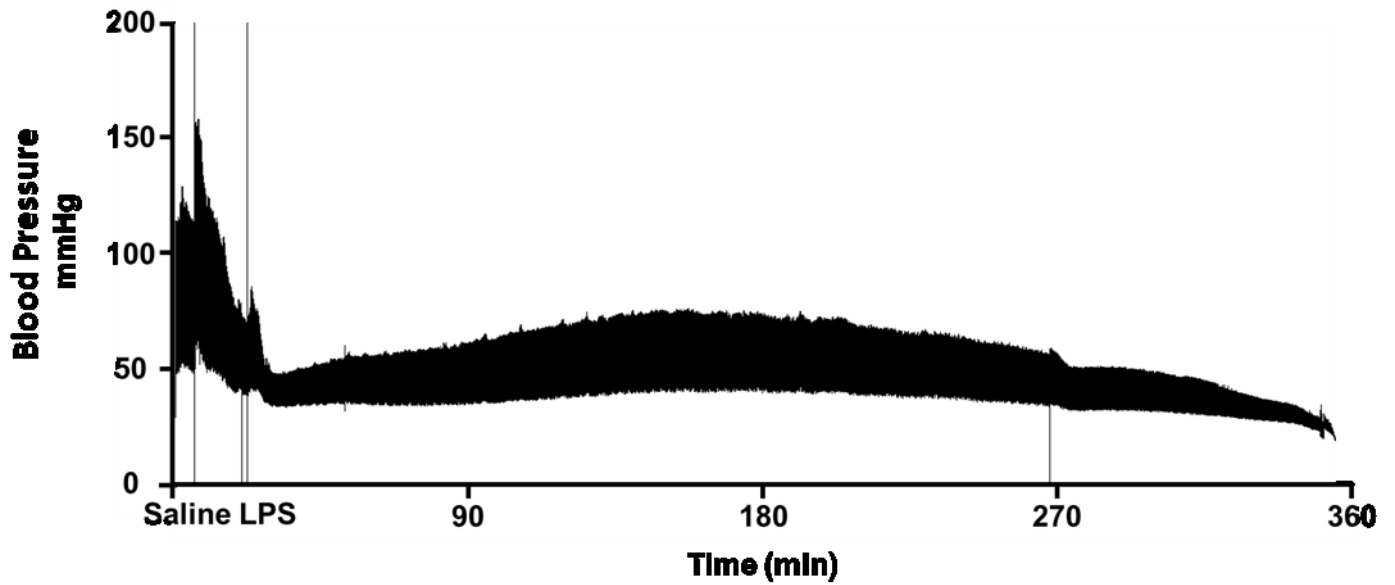


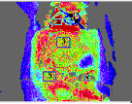
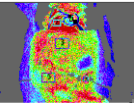
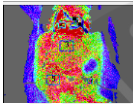
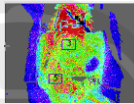
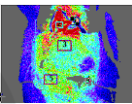
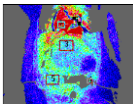
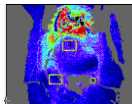
| Con (N=6) | 0 min | 5 min Saline | 20 min Saline | 90 min | 180 min | 270 min | 360 min |
|--------------|---|---|---|---|--|---|---|
| |  |  |  |  |  |  |  |
| ROI NO | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean |
| 1 | 806.1 | 846.5 | 836.0 | 755.0 | 778.9 | 814.1 | 835.3 |
| 2 | 1516.2 | 1516.4 | 1532.5 | 1540.7 | 1510.4 | 1496.2 | 1546.9 |
| 3 | 578.3 | 575.9 | 582.5 | 582.1 | 579.5 | 544.5 | 553.1 |
| 4 | 740.8 | 712.0 | 586.8 | 433.5 | 445.2 | 495.3 | 497.2 |
| 5 | 1097.9 | 1131.0 | 967.6 | 869.7 | 912.9 | 809.3 | 711.7 |

圖十六、動物實驗-正常給予生理食鹽水組

正常給予生理食鹽水組在經過六小時表面血流量的測量後，可以看到其表面血流都是相當穩定的。

1: Heart 2: Lung 3: Liver 4: kidney 5: Small intestine

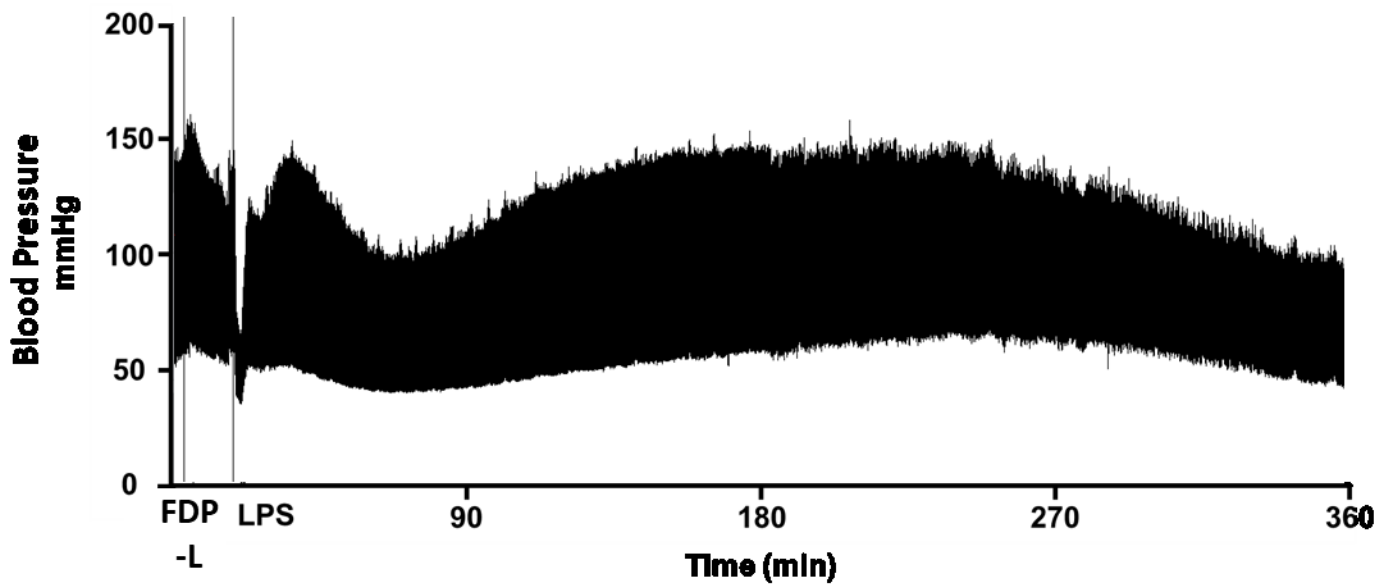


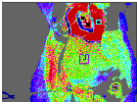
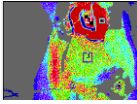
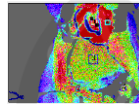
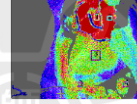
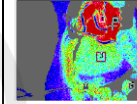
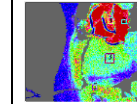
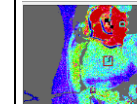
| LPS (N=6) | 0 min | 5 min Saline | 20 min LPS | 90 min | 180 min | 270 min | 360 min |
|-----------|--|--|--|--|---|--|--|
| |  |  |  |  |  |  |  |
| ROI NO | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean |
| 1 | 612.0 | 638.4 | 504.5 | 537.3 | 525.0 | 520.6 | 430.8 |
| 2 | 1247.1 | 1348.0 | 1047.9 | 1054.9 | 1072.6 | 1045.6 | 724.7 |
| 3 | 604.3 | 612.3 | 654.5 | 514.1 | 379.6 | 288.2 | 139.1 |
| 4 | 717.4 | 713.9 | 685.5 | 472.3 | 380.7 | 316.7 | 155.7 |
| 5 | 586.3 | 590.3 | 703.5 | 587.0 | 441.6 | 322.9 | 119.3 |

圖十七、動物實驗-給予 LPS 組

給予 LPS 組在經過六小時表面血流量的測量後，可以看到其表面血流是越來越少的。

1: Heart 2: Lung 3: Liver 4: kidney 5: Small intestine

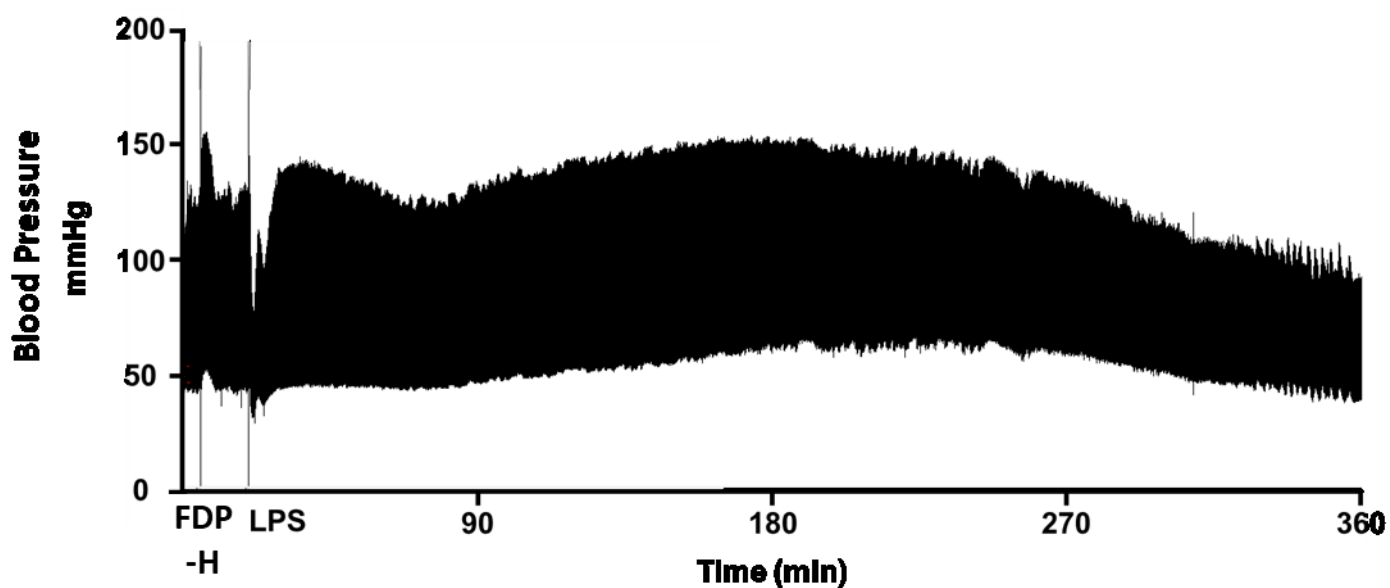


| FDP-L (N=6) | 0 min | 5 min FDP L | 20 min LPS | 90 min | 180 min | 270 min | 360 min |
|----------------|--|--|--|--|---|--|--|
| |  |  |  |  |  |  |  |
| ROI NO | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean | Flux Mean |
| 1 | 870.3 | 886.3 | 777.7 | 862.1 | 842.9 | 836.1 | 823.6 |
| 2 | 1431.4 | 1389.0 | 1356.4 | 1336.6 | 1203.4 | 1218.0 | 1110.6 |
| 3 | 486.0 | 500.1 | 560.1 | 481.7 | 372.1 | 386.9 | 313.4 |
| 4 | 665.4 | 663.1 | 587.8 | 512.7 | 375.6 | 404.6 | 301.3 |
| 5 | 590.9 | 692.1 | 665.2 | 638.7 | 504.6 | 558.7 | 414.0 |

圖十八、動物實驗-給予 LPS+低劑量果糖酯組

給予 LPS+低劑量果糖酯組在經過六小時表面血流量的測量後，可以看到其表面血流雖然也是越來越少，但其血流量相對於給予 LPS 組來說，是有比較多的。

1: Heart 2: Lung 3: Liver 4: kidney 5: Small intestine

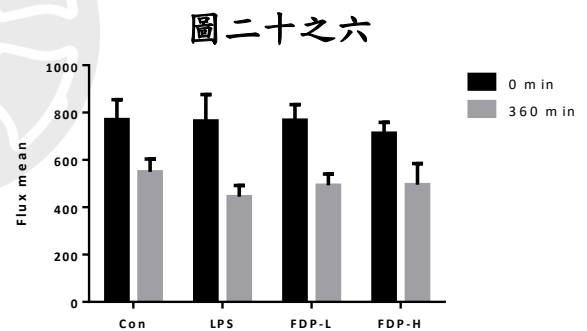
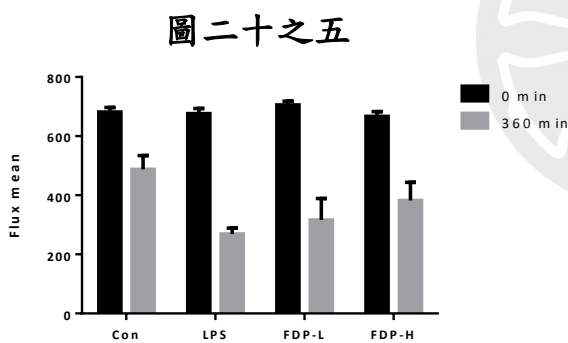
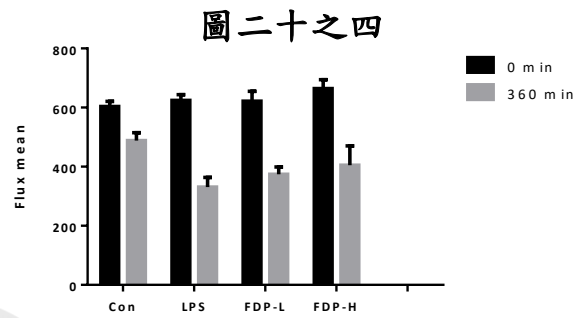
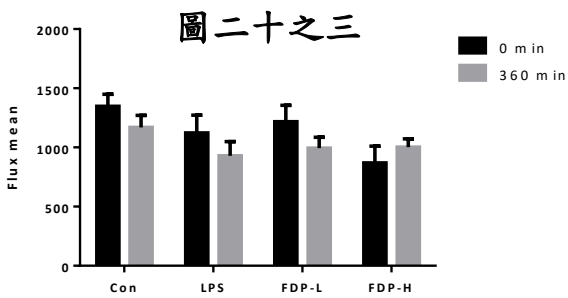
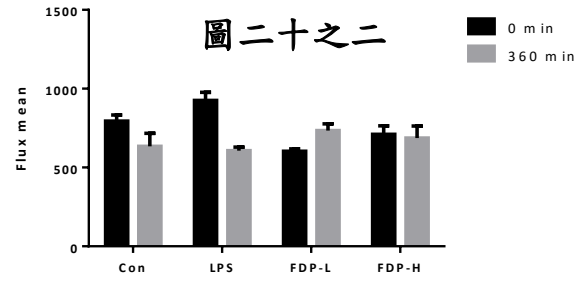
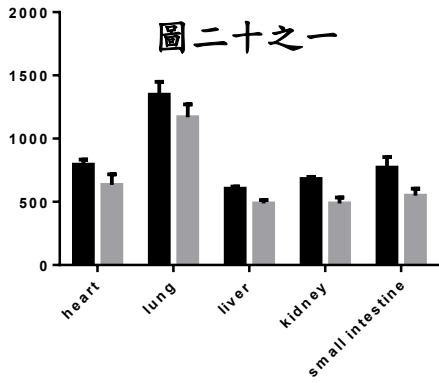


| FDP-H (N=6) | 0 min | 5 min FDP H | 20 min LPS | 90 min | 180 min | 270 min | 360 min |
|----------------|-------|----------------|---------------|--------|---------|---------|---------|
| | | | | | | | |
| ROI | Flux | Flux | Flux | Flux | Flux | Flux | Flux |
| NO | Mean | Mean | Mean | Mean | Mean | Mean | Mean |
| 1 | 617.4 | 777.1 | 840.4 | 831.1 | 796.3 | 781.6 | 702.3 |
| 2 | 383.0 | 356.9 | 504.5 | 1132.0 | 1142.7 | 1115.5 | 1112.7 |
| 3 | 596.7 | 585.8 | 596.3 | 668.1 | 535.2 | 482.1 | 456.2 |
| 4 | 622.6 | 602.7 | 562.3 | 632.1 | 547.8 | 463.2 | 342.4 |
| 5 | 546.9 | 594.7 | 714.3 | 962.0 | 675.8 | 575.5 | 508.8 |

圖十九、動物實驗-給予 LPS+高劑量果糖酯組

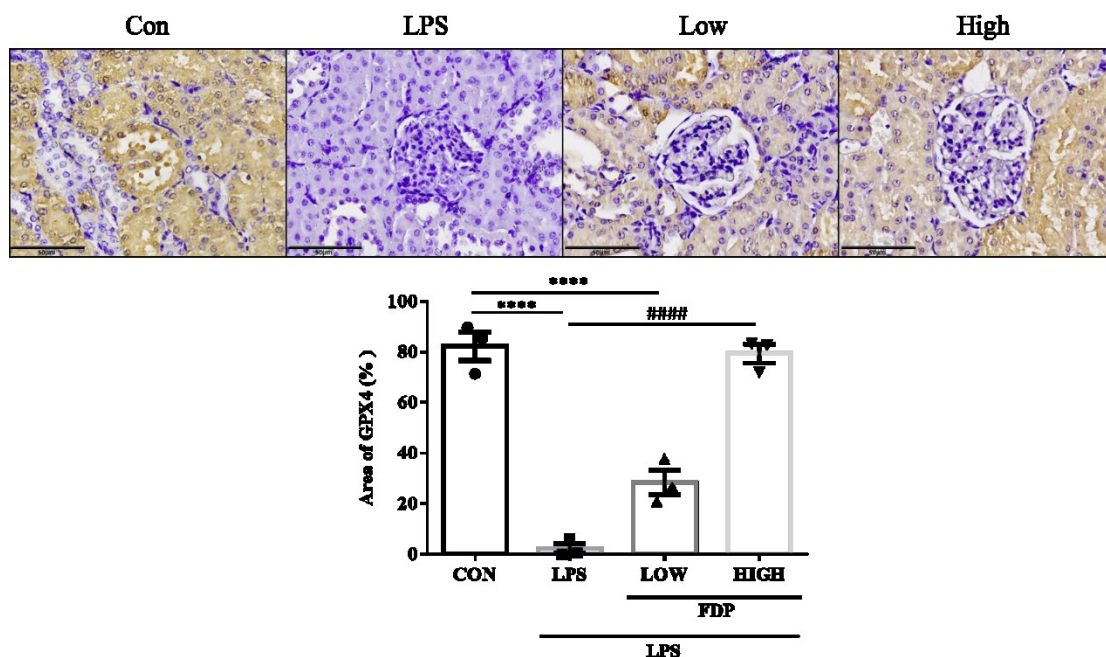
給予 LPS+高劑量果糖酯組在經過六小時表面血流量的測量後，可以看到其表面血流雖然也是越來越少，但其血流量相對於給予 LPS 組來說，是有比較多的。

1: Heart 2: Lung 3: Liver 4: kidney 5: Small intestine



圖二十、表面血流量統計圖

圖二十之一為 LPS 組別之各器官實驗前及實驗後表面血流量之差異，可以看到肝臟、腎臟及小腸是最嚴重的，因此後續分生實驗較著重於這三個器官。圖二十之二~圖二十之六，分別為心、肺、肝、腎及小腸之實驗前及實驗後各組別表面血流量之變化，可以看出在有給予 FDP 的組別中，相較於 LPS 組別血流量有上升得較多。

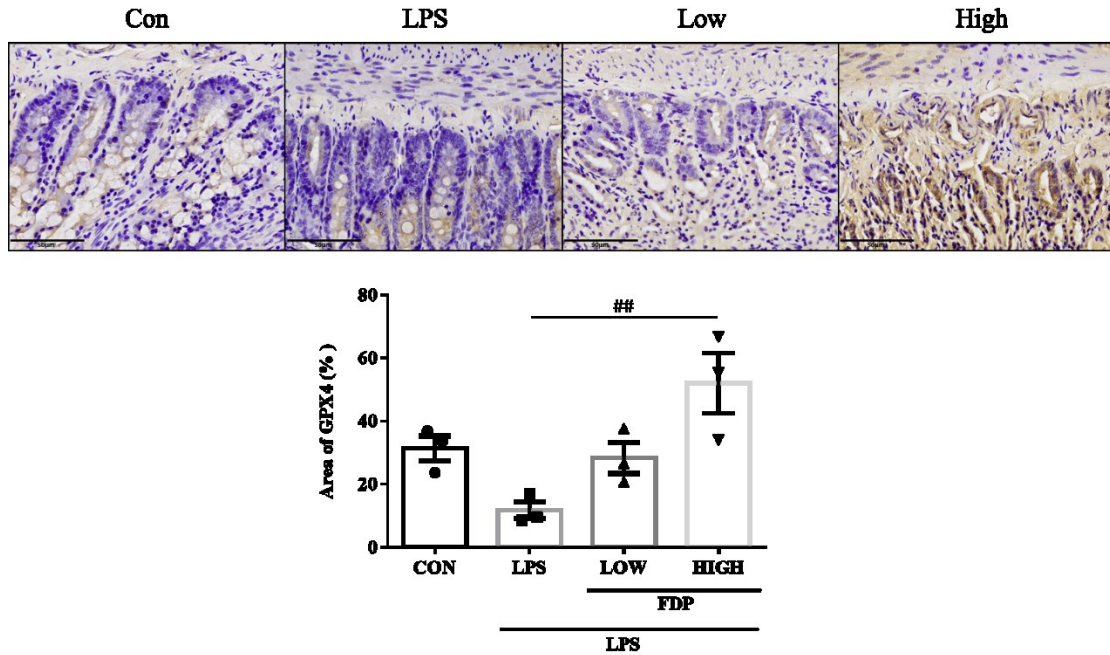


圖二十一、實驗大鼠腎臟組織切片免疫化學染色 (Immunohistochemistry, IHC) –GPX4

上圖為各組實驗大鼠腎臟組織切片免疫化學染色(IHC)結果，組別由左到右依序為 Con：控制組；LPS：LPS 誘發敗血症組；LPS+L 組：LPS 誘發敗血症+低劑量糖酯組；LPS+H 組：LPS 誘發敗血症+高劑量糖酯組。*表示與 Con 組相比有顯著差異，#表示與 LPS 組相比有顯著差異。綜合以上結果，可以證明 FDP 在腎臟組織當中是具有抗氧化能力，能修復脂質氧化損傷的效果。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

(# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$)

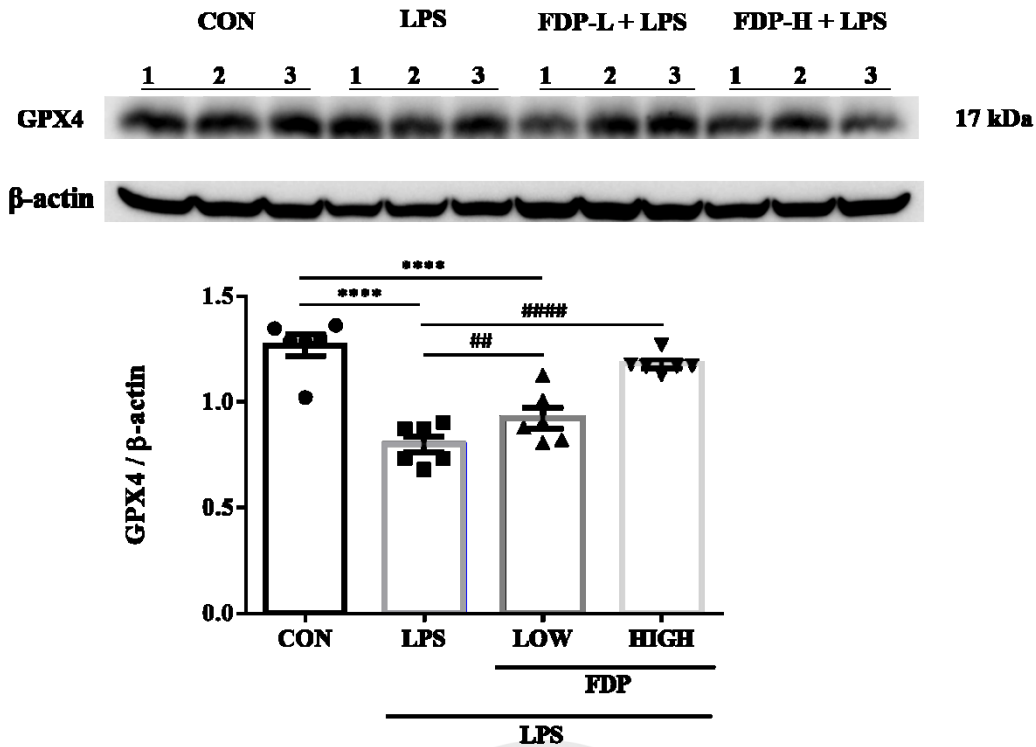


圖二十二、實驗大鼠小腸組織切片免疫化學染色 (Immunohistochemistry, IHC) –GPX4

上圖為各組實驗大鼠小腸組織切片免疫化學染色(IHC)結果，組別由左到右依序為 Con：控制組；LPS：LPS 誘發敗血症組；LPS+L 組：LPS 誘發敗血症+低劑量糖酯組；LPS+H 組：LPS 誘發敗血症+高劑量糖酯組。*表示與 Con 組相比有顯著差異，#表示與 LPS 組相比有顯著差異。綜合以上結果，可以證明 FDP 在小腸組織當中是具有抗氧化能力，能修復脂質氧化損傷的效果。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

(# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$)



圖

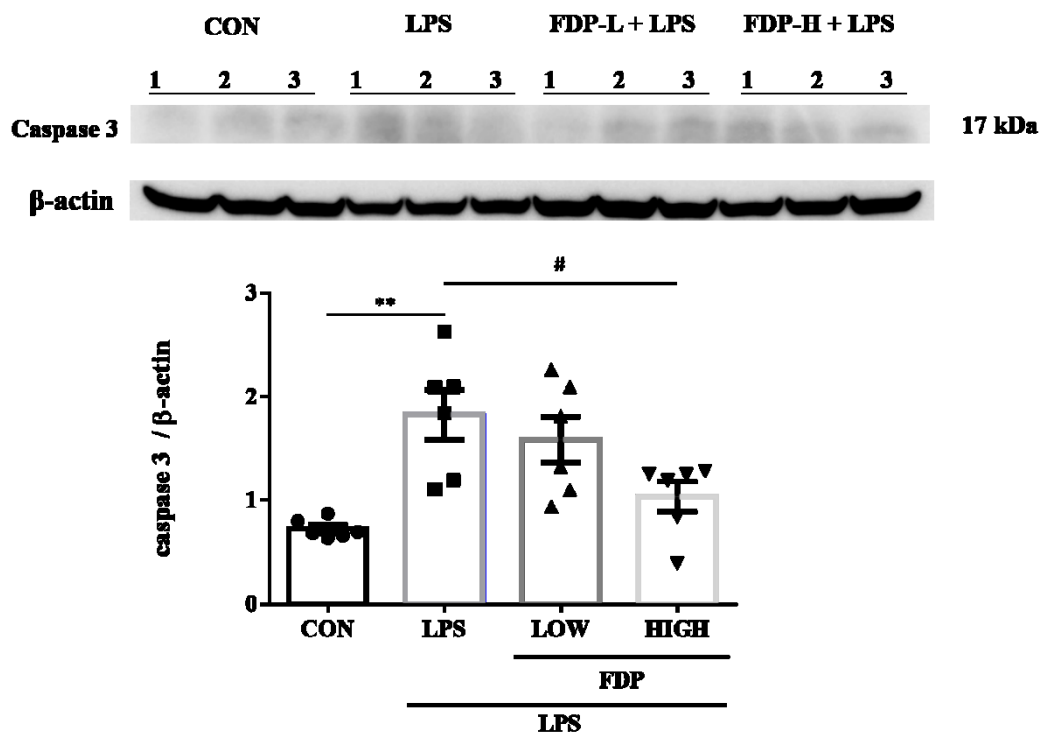
二十三、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠腎臟組織中GPX4表現量與統計分析

上圖為各組別實驗大鼠腎臟組織中 GPX4 表現量。組別由左到右依序為 Con：控制組；LPS：LPS 誘發敗血症組；LPS+L 組：LPS 誘發敗血症+低劑量糖酯組；LPS+H 組：LPS 誘發敗血症+高劑量糖酯組。

下圖為各組別之 β -actin 蛋白質表現量統計分析，數據皆為 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n = 6$)，*表示與 Con 組相比有顯著差異，#表示與 LPS 組相比有顯著差異。綜合以上結果，可以證明 FDP 在腎臟組織當中是具有抗氧化能力，能修復脂質氧化損傷。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

(# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$)

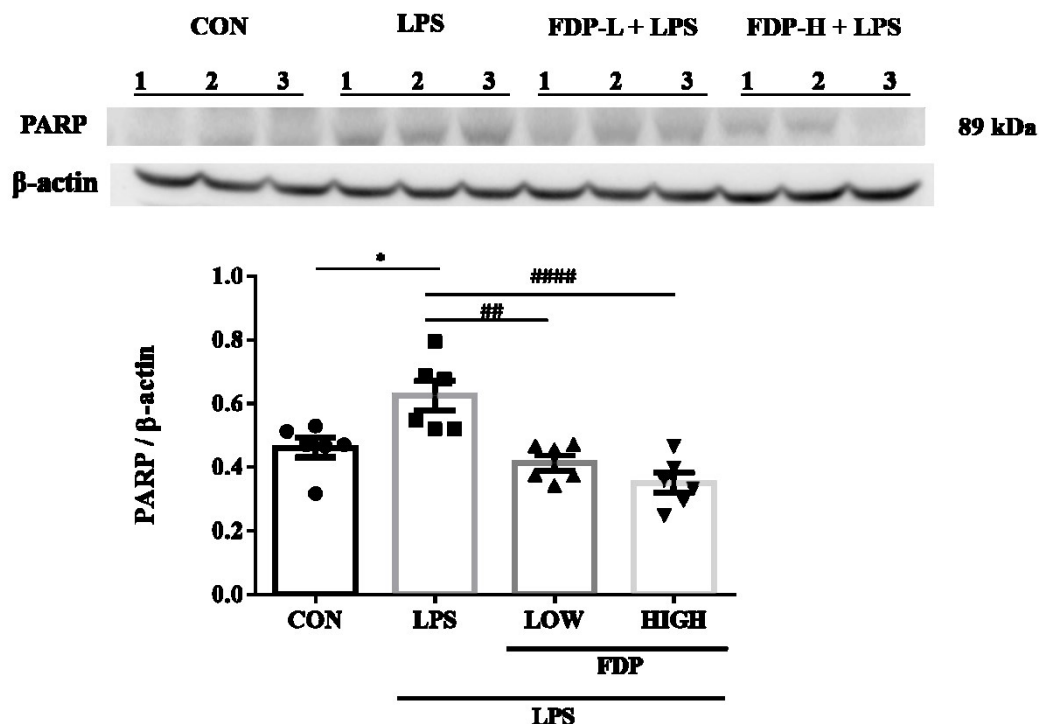


圖二十四、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠腎臟組織中caspase 3表現量與統計分析

上圖為各組別實驗大鼠腎臟組織中 caspase 3 表現量。組別由左到右依序為 Con：控制組；LPS：LPS 誘發敗血症組；LPS+L 組：LPS 誘發敗血症+低劑量糖酯組；LPS+H 組：LPS 誘發敗血症+高劑量糖酯組。下圖為各組別之 β -actin 蛋白質表現量統計分析，數據皆為 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n = 6$)，*表示與 Con 組相比有顯著差異，#表示與 LPS 組相比有顯著差異。綜合以上結果，可以證明 FDP 在腎臟組織當中是具有抑制細胞凋亡的能力。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

(# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$)



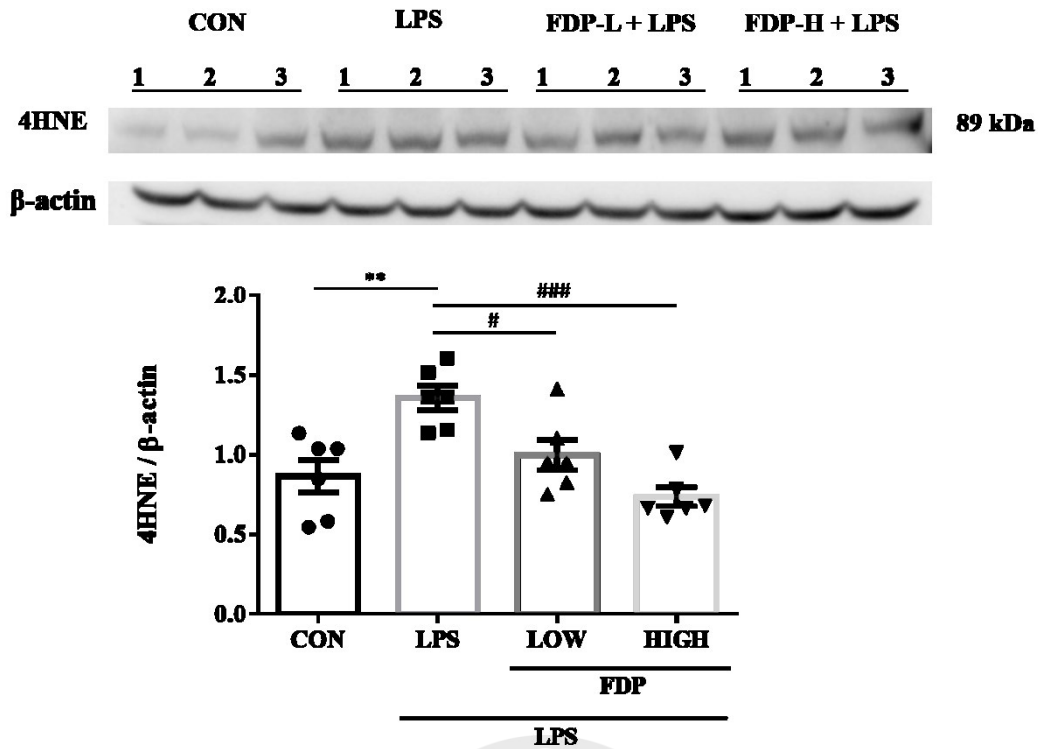
圖二十五、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠腎臟組織中PARP表現量與統計分析

上圖為各組別實驗大鼠腎臟組織中 PARP 表現量。組別由左到右依序為 Con：控制組；LPS：LPS 誘發敗血症組；LPS+L 組：LPS 誘發敗血症+低劑量糖酯組；LPS+H 組：LPS 誘發敗血症+高劑量糖酯組。

下圖為各組別之 β -actin 蛋白質表現量統計分析，數據皆為 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n = 6$)，*表示與 Con 組相比有顯著差異，#表示與 LPS 組相比有顯著差異。綜合以上結果，可以證明 FDP 在腎臟組織當中是具有抑制細胞凋亡的能力。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

(# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$)



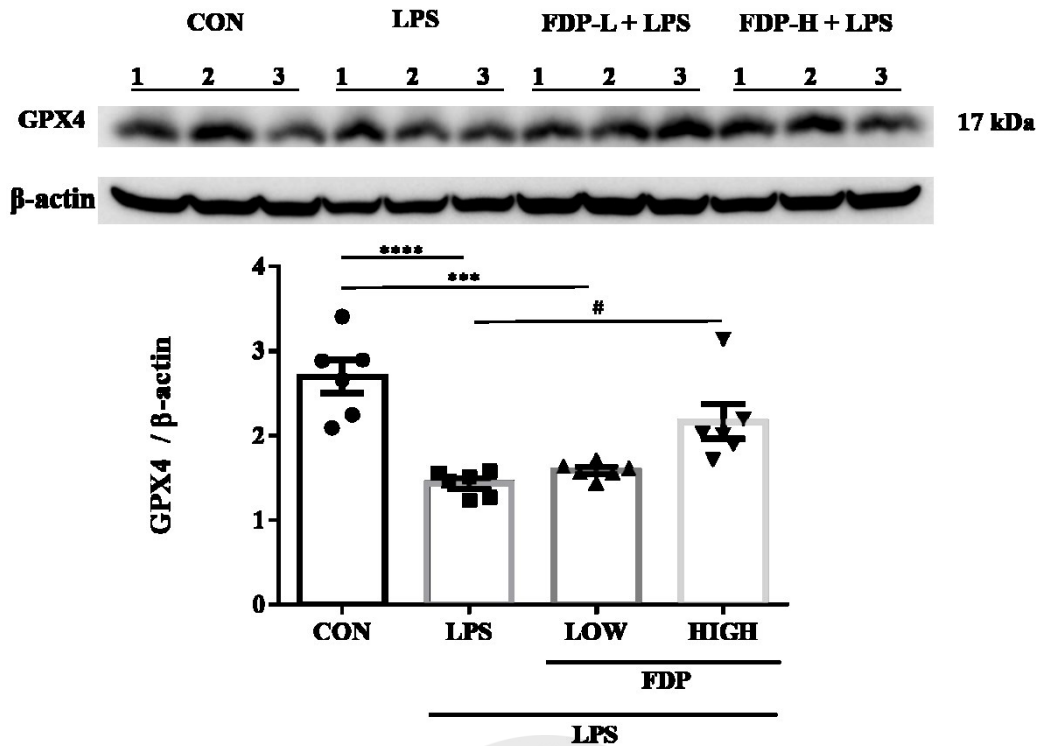
圖二十六、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠腎臟組織中4HNE表現量與統計分析

上圖為各組別實驗大鼠腎臟組織中 4HNE 表現量。組別由左到右依序為 Con：控制組；LPS：LPS 誘發敗血症組；LPS+L 組：LPS 誘發敗血症+低劑量糖酯組；LPS+H 組：LPS 誘發敗血症+高劑量糖酯組。

下圖為各組別之 β -actin 蛋白質表現量統計分析，數據皆為 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n = 6$)，*表示與 Con 組相比有顯著差異，#表示與 LPS 組相比有顯著差異。綜合以上結果，可以證明 FDP 在腎臟組織當中是具有減少氧化壓力的能力。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

(# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$)



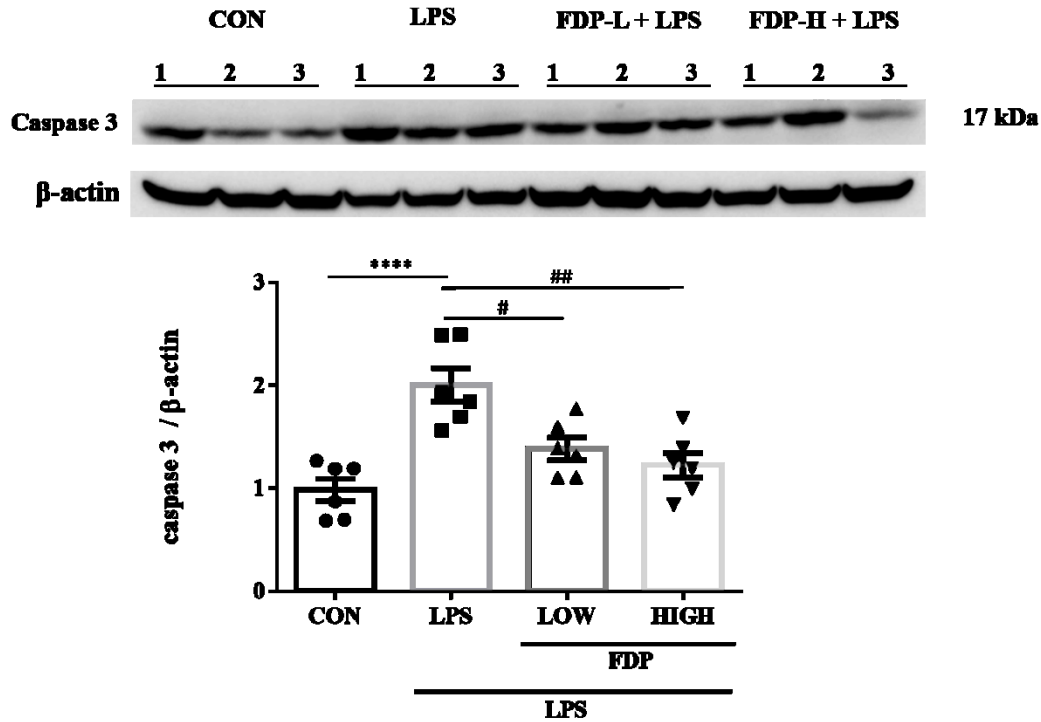
圖二十七、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠肝臟組織中GPX4表現量與統計分析

上圖為各組別實驗大鼠肝臟組織中 GPX4 表現量。組別由左到右依序為 Con：控制組；LPS：LPS 誘發敗血症組；LPS+L 組：LPS 誘發敗血症+低劑量糖酯組；LPS+H 組：LPS 誘發敗血症+高劑量糖酯組。

下圖為各組別之 β -actin 蛋白質表現量統計分析，數據皆為 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n = 6$)，*表示與 Con 組相比有顯著差異，#表示與 LPS 組相比有顯著差異。綜合以上結果，可以證明 FDP 在肝臟組織當中是具有抗氧化能力，能修復脂質氧化損傷的效果。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

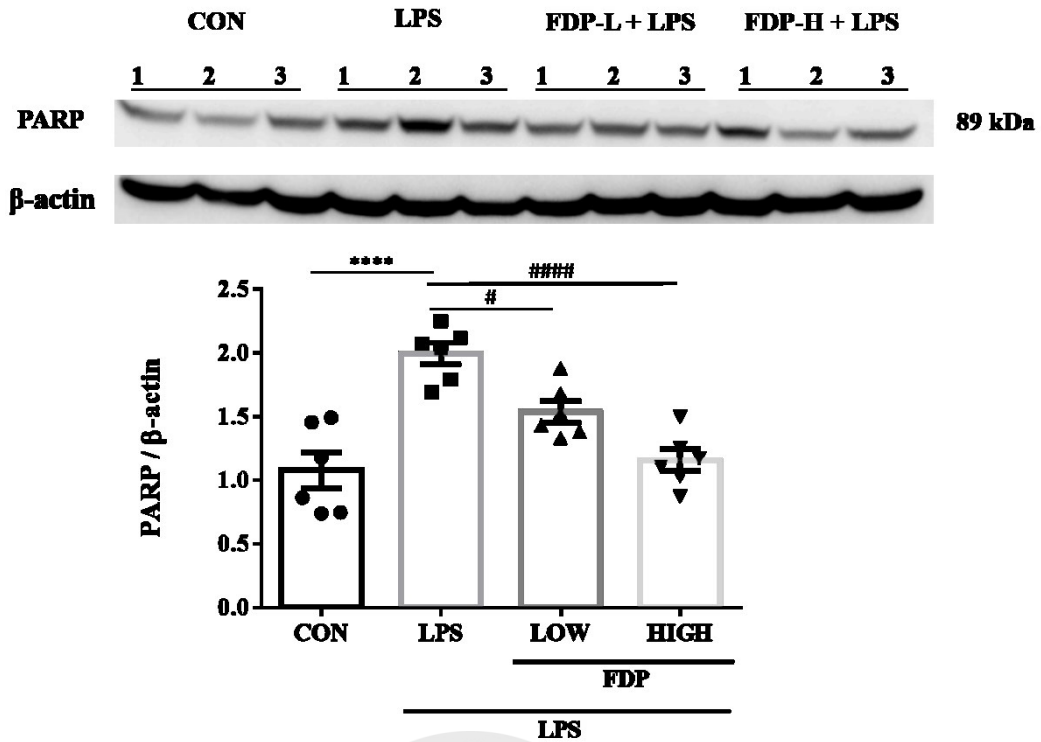
(# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$)



圖二十八、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠肝臟組織中caspase 3表現量與統計分析

上圖為各組別實驗大鼠肝臟組織中 caspase 3 表現量。組別由左到右依序為 Con：控制組；LPS：LPS 誘發敗血症組；LPS+L 組：LPS 誘發敗血症+低劑量糖酯組；LPS+H 組：LPS 誘發敗血症+高劑量糖酯組。下圖為各組別之 β -actin 蛋白質表現量統計分析，數據皆為 $\text{mean} \pm \text{SD}$ ($n = 6$)，*表示與 Con 組相比有顯著差異，#表示與 LPS 組相比有顯著差異。綜合以上結果，可以證明 FDP 在肝臟組織當中是具有抑制細胞凋亡的能力。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) (# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$)



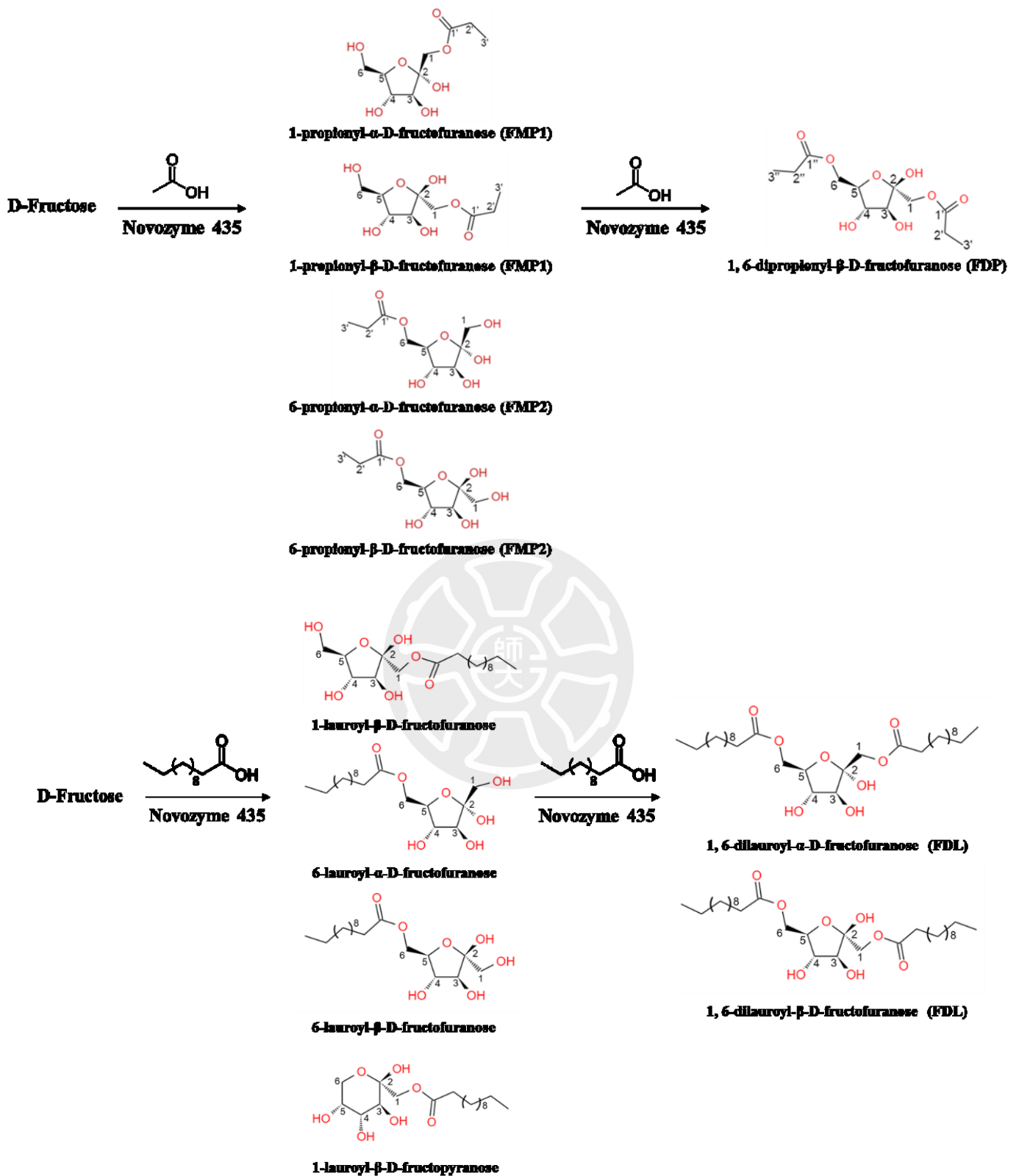
圖二十九、西方墨點法檢測各組別實驗大鼠肝臟組織中PARP表現量與統計分析

上圖為各組別實驗大鼠肝臟組織中 PARP 表現量。組別由左到右依序為 Con：控制組；LPS：LPS 誘發敗血症組；LPS+L 組：LPS 誘發敗血症+低劑量糖酯組；LPS+H 組：LPS 誘發敗血症+高劑量糖酯組。

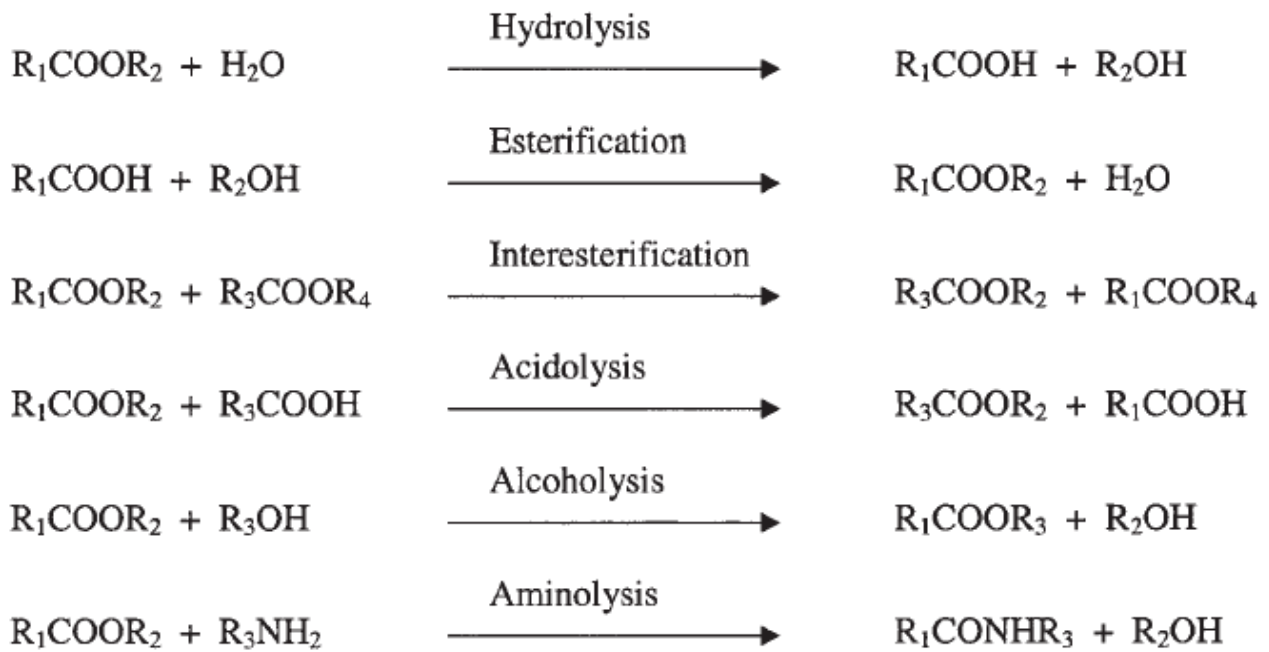
下圖為各組別之 β -actin 蛋白質表現量統計分析，數據皆為 mean \pm SD (n = 6)，*表示與 Con 組相比有顯著差異，#表示與 LPS 組相比有顯著差異。綜合以上結果，可以證明 FDP 在肝臟組織當中是具有抑制細胞凋亡的能力。

(*p < 0.05 ; **p < 0.01 ; ***p < 0.001)

(#p < 0.05 ; ##p < 0.01 ; ###p < 0.001)

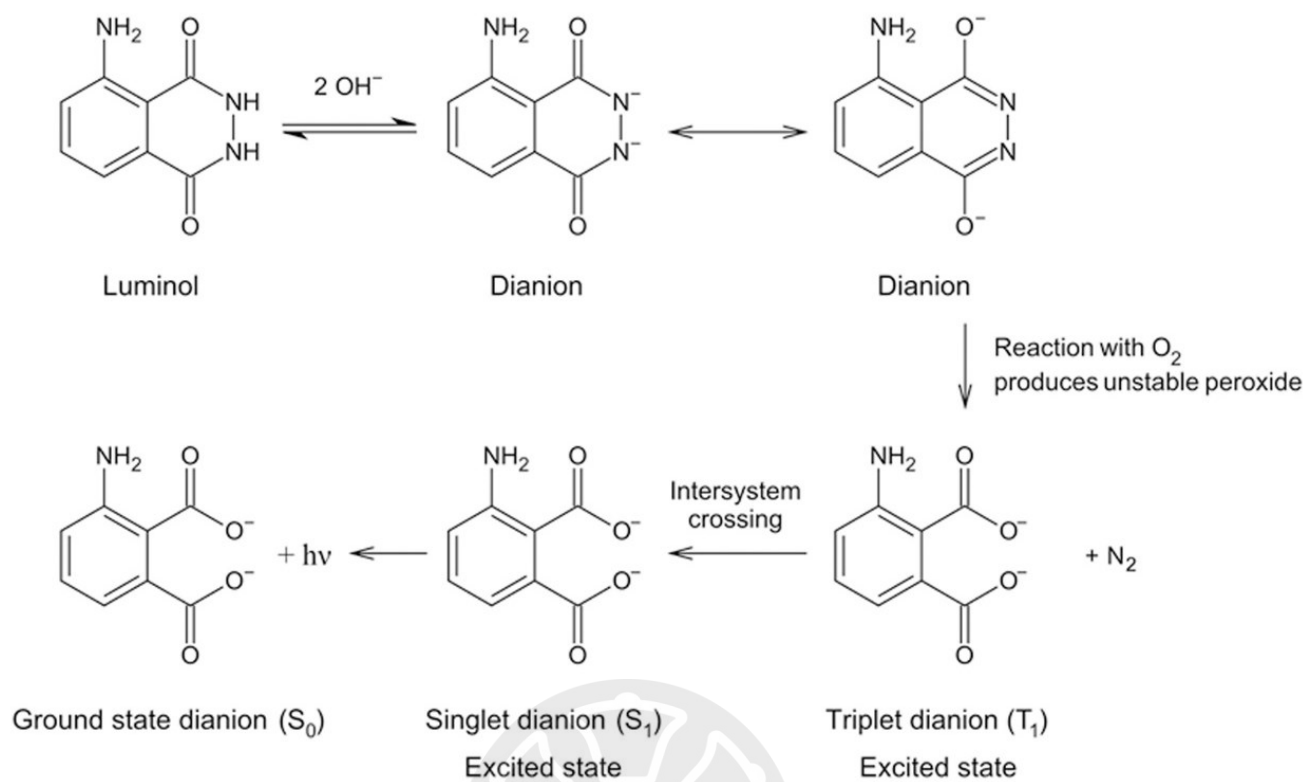


附錄一、果糖轉酯化反應。



附錄二、Lipases catalyze the hydrolysis and synthesis of esters

脂肪酶催化酯的水解和合成 (Modify from [A. Houde et al., 2004])



附錄三、Luminol 反應結構式