

## 第一章 前言

山藥在中國傳統醫學用藥上常被人們廣泛的應用，根據『本草綱目』記載山藥具有益腎氣、健脾胃、止泄痢、化痰涎、潤皮毛的藥性，其他如『神農本草經』及『太平經惠方』等中醫藥學書籍皆有記載山藥的食補功效<sup>(1)</sup>。在一些地區山藥常被作為主食，可說是藥食同源的保健植物；山藥所含營養價值甚高，包括澱粉、蛋白質、黏液質 (mucilage)、尿囊素 (allantoin)、膽鹼(choline)、纖維素、脂肪、維生素及礦物質等營養素<sup>(2)</sup>。目前有許多具療效的天然性植物廣受大眾歡迎，山藥便是其中一種。近年研究陸續證實山藥具有減輕婦女更年期症狀、治療腸炎、降血脂、血糖等功效<sup>(3-5)</sup>。根據衛生統計民國 91 年國人前五大死因中，腦血管疾病和心臟疾病分別佔第二和三位，有逐年上升的趨勢，然而惡性腫瘤仍高居首位，前五大癌症死因中的直腸結腸癌為目前需要解決的問題之一。許多具療效之天然性植物廣受歡迎，山藥便是其中一種，已有研究台灣本土山藥對於降血脂和調節小腸酵素活性等功效<sup>(6)</sup>，然而，目前尚未有聞山藥之水溶性成份在保健功效方面的研究，因此本篇研究在於探討山藥水溶性萃取物對小鼠脂質及腸道之生理效應。

## 第二章 文獻探討

### 第一節 山藥

#### 一、山藥之簡介

山藥原名著蕷，因唐太宗名”預”因此改名為薯藥，又因宋應宗諱薯，最後演變成山藥，俗名懷山，為薯蕷科 (Dioscoreaceae) 薯蕷屬 (Dioscorea) 之蔓性多年生植物。本草典籍謂其性平、涼潤、味甘而無毒，能健脾胃、補肺腎、止瀉、消渴、疲勞及小便頻仍等功效，一般民眾將之視為補虛佳品。山藥分佈範圍極廣，在熱帶亞熱帶及其他地區都有栽種，物種十分繁雜。全世界薯蕷科植物超過 600 種，但只有少數作為食材，分布於本省的有 14 種及 5 變種，如大薯 (*D. alata*)、紫田薯 (*D. alata* L. var. *purpurea*)、長薯 (*D. batatas*)、及恆春山藥 (*D. doryophora*) 和日本山藥 (*D. japonica*)<sup>(2,8)</sup>。山藥食用部位為地下塊莖，形狀有掌形、長條形及紡錘形，外皮有紅、黃、褐及白色，內層有白、紅及紫紅色。

名間長紅(*D. alata* L. var. *Purpurea* (Roxb.) M. Pouch)為條薯，又稱紫田薯，塊莖為紫紅皮紫肉，主要分部在南投和嘉義兩縣；台農二號 (*Dioscorea alata* L. cv Tainung No.2) 為大薯，又稱田薯，是台灣省農業試驗所所育得的新品種，於 1996 年命名，栽種範圍廣，

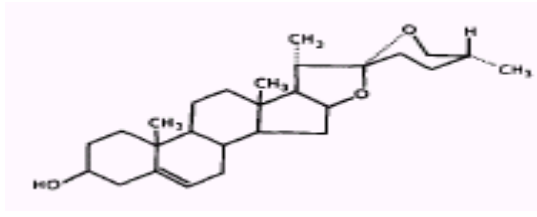
為中長形塊莖 (20 cm < 長度 < 50 cm) ，褐皮白肉，黏度高，不易變色。基隆山藥 (*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* (Hay.) Yamamoto) 為長形塊莖 (長度 > 50 cm) ，與日本山藥同種 (*D. japonica*) ，嗜口性佳，可供藥用<sup>(7,9)</sup>。

## 二、山藥之生理功能

### 1. 調節脂質代謝

山藥所含 Diosgenin (圖一) 成份被認為具有調節脂質的功能<sup>(3,11,12)</sup>，有實驗指出將純化之 Diosgenin 添加到飲食中，餵飼以 STZ 誘發糖尿病之老鼠 21 天，發現 Diosgenin 可顯著降低血糖、總膽固醇，血漿及肝臟中的 (VLDL + LDL)-膽固醇，並提高 HDL-膽固醇含量<sup>(10)</sup>。實驗顯示餵飼老鼠、雞和兔子高膽固醇飲食，並以口服或靜脈注射方式給予 Diosgenin，發現血漿中膽固醇含量亦明顯被降低<sup>(11)</sup>。Diosgenin 調節脂質之可能機制為：Diosgenin 干擾膽固醇的吸收，未被吸收的膽固醇與身體所合成的膽固醇會一起進入膽汁中，造成中性固醇 (neutral sterols) 排出增加，但不影響糞便中膽酸的排出量<sup>(12)</sup>。

研究指出在以 indomethacin 誘發腸炎的老鼠模式中，膽汁分泌發生改變，餵食 Diosgenin 能增加膽汁分泌，增加膽固醇排出，但不會影響肝臟總膽固醇及磷脂質的含量<sup>(13)</sup>。



圖一、Diosgenin構造<sup>(12)</sup>

Figure 1. Structure of Diosgenin

## 2. 抗氧化

許多疾病的發生往往與自由基的產生有關，例如：心血管疾病、阿茲罕默症及癌症等。另外，在發炎的結腸黏膜上也可發現活性氧代謝物 (reactive oxygen metabolites)。身體受自由基攻擊時，DNA 會發生改變，所製造出來的蛋白質就會發生突變，當細胞不斷進行有絲分裂，會造成組織細胞癌化。天然的抗氧化物質包括酚類 (phenols)、異黃酮 (isoflavonoid)、酚酸 (phenolic acid) 和維生素 E、C 和 A 等，可提供一個氫離子，消除自由基可能造成的危害。曾等以不同乾燥方法處理 15 種本土山藥品系，將山藥磨粉後分析其營養成分，並檢測甲醇萃取物之抗氧化效果。結果指出冷凍乾燥製品之維生素 A、C、E 含量最高，各品系皆具抗氧化能力，其中以冷凍乾燥方法處理的山藥效果最佳<sup>(14)</sup>。Hou 等人研究指出山藥 (*Dioscorea batatas* Decne) 所含蛋白質 Dioscorin (32 kDa) 可降低 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 及 monodehydroascorbate (MDA) 之能力，扮演著抗氧化劑的角色<sup>(15-17)</sup>。學者指出山藥多酚

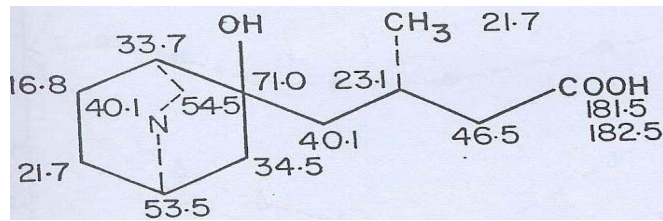
(polyphenol) 物質參與褐變反應產物<sup>(18)</sup>，能與致癌物質結合，抵抗化學性毒物所造成的傷害<sup>(18,19)</sup>。另測定褐變山藥萃取物之抗氧化活性仍有相同效果<sup>(20)</sup>。說明了山藥含有天然的抗氧化劑成份並能調節氧化性傷害。

### 3. 提煉荷爾蒙

山藥所含的植物性固醇 sapogenin，去掉糖基的配醣體 (aglycone) 稱之 Diosgenin，為黃體激素 (progesterone)、動情激素 (estrogen) 及其他固醇藥物的前趨物。動情激素目前發現具有保護心血管、預防骨質疏鬆症，減緩停經症狀的功能，Diosgenin 構造類似荷爾蒙因此常被用來提煉荷爾蒙<sup>(21)</sup>。

### 4. 調節血糖：

糖尿病的發生率逐年上升，典型三多症狀為多渴、多吃和多尿，本草典籍記載山藥具有消渴功效，似乎說明山藥可減輕糖尿病症狀。研究指出，每天餵食糖尿病兔子 20 mg 山藥萃取物即可達到降血糖的效果，因此而緩和糖尿病症狀<sup>(22)</sup>。然而山藥對於血糖的調節機制並不清楚，其所含的植物鹼 Dioscoretine (圖二) 及尿囊素被證實為降血糖成分<sup>(5,23,24)</sup>。



圖二、Dioscoretine 構造<sup>(24)</sup>

Figure 2. Structure of Dioscoretine

## 5. 抗癌

山藥所含的 saponin 對於白血症和攝護腺癌之細胞株有抗癌效果，可能涉及抗癌新機制<sup>(25)</sup>。

## 三、山藥之營養成分

山藥營養成分依品種而有所差異，曾等人選用多種本土山藥塊莖，包括名間長紅、台農二號及基隆山藥等品系，結果指出每一品系之山藥皆含有 Diosgenin (1.5-1.8 mg/g) 及七種必須胺基酸，含量最多的為麩胺酸 (Glutamic acid)，脂肪酸則以亞麻油酸為主<sup>(14)</sup>。另有學者分析七種 *Dioscorea alata* 之營養素和抗營養素成分，發現山藥含粗蛋白 7.4%、澱粉 75.6-84.3%、維生素 C 13.0-24.7 mg/100g，乾燥山藥含植酸和草酸分別是 198.0 mg/100g 及 486-781mg /100g<sup>(26)</sup>。以氣相層析儀分析山藥根、莖和塊莖部位，發現含有豐富的 D-fructose、D-glucose、sucrose 和 maltose。在儲存期間，澱粉與蔗糖之間會發生互兌 (interconversion)，澱粉含量減少，蔗糖含量增加，因此山藥在儲存期所含碳水化合物會有所差異<sup>(27)</sup>。

山藥中的黏液質含水溶性膳食纖維，Tomoda 等人指出山藥 (*Dioscorea batatas* Dence) 所含黏液質為甘露聚糖-蛋白質複合體 (mannan-protein complex) ，分子量約 200 萬，黏液質中含有 64.0% 蛋白質、26.2% mannan、2.7% acetyl group 及 1.2% phosphorus<sup>(28,29)</sup>。經酸水解可產生 D-甘露糖 (D-mannose) 和其他單糖，例如葡萄糖，以及各種胺基酸。山藥含有許多人體生長所必須的營養素，營養價值甚高。

#### 四、山藥之消化性評估

實驗將 *D. alata* 以熟食、生食、去皮及未去皮之不同處理，餵飼剛斷奶的 Wistar 老鼠，結果顯示各種處理的山藥之氮消化性 (nitrogen digestibility) 和淨蛋白質利用率 (net protein utilization) 沒有顯著性差異；在表面消化率 (apparent digestibility) 方面，去皮或未去皮熟食山藥則比生食山藥高出兩倍，各組老鼠皆無發現肝壞疽和腹漲情形<sup>(30)</sup>。

## 第二節 水溶性膳食纖維

### 一、水溶性膳食纖維對脂質的影響

#### 1. 膳食纖維

膳食纖維來自於植物的細胞壁，具有不被人體消化酵素所分解

的特性，被分類為可溶 (soluble) 和不溶 (insoluble) ，或可發酵 (fermentable) 和不可發酵 (nonfermentable) 兩種。膳食纖維可溶於熱水者為水溶性纖維，包括某些半纖維 (semicellulose)、果膠 (pectin)、樹膠 (gum) 及植物粘質膠 (mucilage)，研究顯示水溶性纖維具有降低營養素吸收 (例如：葡萄糖)、延緩胃排空、吸附水分及提供腸道細菌生長所需的碳源之生理功能；不溶性纖維則包括：纖維素 (cellulose)、某些半纖維素及木質素 (lignin)，具有增加糞便實體 (bulk) 及促進腸道蠕動等生理功能<sup>(31)</sup>。

## 2. 水溶性纖維之降血脂效應

高血脂為心血管疾病的危險因子之一，膳食纖維在許多的研究陸續證明具有降血脂的功效，特別是水溶性纖維<sup>(32)</sup>。報告指出，每天攝取 12~30 g 具黏性之水溶性纖維 (例如：果膠、樹膠、豆膠和蒟蒻) 或燕麥麩和黃豆等可降低 10~20% 的 LDL-膽固醇，並且可稍為提高 HDL-膽固醇的含量<sup>(33)</sup>。Anderson 等人將十種不同種類的膳食纖維加入老鼠飼料 (含 10 g 膽固醇及 2 g 膽酸/kg diet) 中，發現水溶性纖維降低血清及肝臟中膽固醇的能力比不溶性纖維高<sup>(34)</sup>。因此，在高膽固醇血脂的動物模式中，水溶性纖維具有降低血清膽固醇及粥狀硬化指標 (LDL-膽固醇/HDL-膽固醇) 的作用<sup>(35)</sup>。Shen 等人提出，水溶性纖維可能藉由改變脂蛋白代謝，因此而降低 LDL-膽固醇



濃度<sup>(36)</sup>。目前已知水溶性纖維降血脂機制<sup>(37)</sup>包括：

### (1) 阻礙膽固醇吸收

實驗指出具黏性的關華膠 (guar gum) 可能藉由減慢小腸黏膜液體層 (mucosal fluid layer) 的流動，進而干擾小腸對膽固醇的吸收<sup>(38)</sup>。

### (2) 延緩胃排空

具黏性的水溶性纖維可延緩胃排空，降低脂質和碳水化合物的吸收率，使餐後血脂和血糖正常化，減少胰島素的分泌，降低了胰島素對 HMG-CoA reductase 及 Acetyl-CoA carboxylase 的刺激，進而使肝臟脂質的生合成 (hepatic lipogenesis) 受到限制<sup>(39)</sup>。

### (3) 阻礙脂肪小球 (micelles) 形成

實驗指出，餵飼膽固醇飲食的老鼠給予 5% 光華膠可降低血膽固醇，並增加盲腸中膽酸的再吸收，促進中性固醇排出於糞便中，認為關華膠可專一性影響膽固醇的吸收<sup>(40)</sup>。車前子 (psyllium) 為具黏性的水溶性纖維，可藉由增加膽酸的排出，促調節 (up-regulation) 肝臟合成膽酸，達到降血膽固醇的作用<sup>(41)</sup>。目前已知水溶性纖維在腸道具有吸附脂肪酸、中性固醇 (neutral sterol) 和膽酸 (bile acid) 的作用。脂肪消化後的終產物必須被膽汁乳糜化成親水性的脂肪小球以利於消化酵素的作用，當水溶性纖維與膽酸結合時，會阻礙膽

酸進入腸肝循環，進而影響脂質在小腸中的消化吸收作用，被結合的脂肪酸、中性固醇和膽酸最後會排出於糞便中。另一方面，肝臟會利用膽固醇去代償性補充膽酸，因此而達到降血脂效果，特別是膽固醇。

#### (4) 抑制膽固醇和脂質之生合成

纖維具有不被人體消化酵素分解的特性，可直達大腸，被細菌分解產生短鏈脂肪酸，包括乙酸 (acetic acid)、丙酸 (propionic acid) 和丁酸 (butyrate)。其中丙酸在肝門靜脈吸收後，進入肝臟進行代謝，前人研究指出丙酸有降低 HMG-CoA reductase 的活性，調節肝臟膽固醇之生成的作用<sup>(42)</sup>。體外實驗指出丙酸會損害 Acetate 的利用，當 Acetate 為合成 Acetyl CoA 唯一來源時，會抑制肝細胞之脂質生合成<sup>(43)</sup>。

## 二、水溶性膳食纖維對腸道的生理作用

### 1. 增加糞便水含量

糞便中水份佔 25%，不同種類的纖維結合水的能力也會有所不同，例如：纖維素、燕麥麩 (oat bran)、果膠、關華膠 (guar gum) 和蘋果增加糞便水量分別是 75%、15%、16-35%、20% 和 40%<sup>(44)</sup>。水份可稀釋糞便中的有毒物質、增加糞便實體及軟化糞便，促進腸道的蠕動，使糞便易於排出，降低糞便在腸道的滯留時間 (transit

time) ，當滯留時間縮短，糞便量就會隨著增加。

## 2. 改變腸道菌相

人類結腸含有超過 400 種厭氧菌，主要菌種包括 *Bacteroids*、*Eubacterium*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus* 和 *Gram-positive cocci*<sup>(45)</sup>。細菌佔糞便乾重的 41% ~57%<sup>(46-49)</sup>，腸道細菌會選擇性利用腸中不被消化的物質（例如：膳食纖維及抗性澱粉），使腸道菌落有不同的菌種組成，菌種間維持著一個生態平衡狀態，當益菌增加就會抑制壞菌的生長。*Bifidobacteria* 常作為益菌指標，研究指出果寡糖為 *Bifidobacteria* 菌種之良好碳源，分解產物為乙酸和乳酸，可降低腸道 pH，抑制其它細菌的生長。另外，*Bifidobacteria* 亦可產生抑菌素 (bacteriocin)，抵抗 *Clostridia*、*E. coli* 和其他致病菌的生長，例如：*Listeria*、*Shigellas*、*Salmonellas* 和 *Vibrio cholerae*<sup>(45)</sup>，以促進宿主健康。其他水溶性纖維包括寡木糖 (xylooligosaccharide) 和蒟蒻皆能有效被 *Bifidobacteria* 利用<sup>(50,51)</sup>。

## 3. 降低結腸癌罹患率

流行病學研究指出，膳食中的脂肪及纖維含量、糞便膽酸濃度和結腸癌三者之間有著相關性<sup>(52)</sup>。大部分的纖維皆能增加糞便量並降低膽酸濃度，一級膽酸 (primary bile acids) 可被細菌分解成具毒

性的二級膽酸 (secondary bile acids)，促進腸癌的發生。實驗指出當 *Bifidobacteria* 增加時， $\beta$ -glucuronidase 及  $\beta$ -glucosidase 含量會減少，降低腸腔中二級膽酸的含量，可預防結腸癌的發生<sup>(48)</sup>。

#### 4. 維持腸黏膜正常型態

短鏈脂肪酸為腸道細菌利用水溶性纖維所產生的代謝產物，存在於盲腸 (cecum)、近端結腸 (proximal colon)、遠端結腸 (distal colon) 和糞便中。短鏈脂肪酸可維持小腸黏膜障壁的完整性，調節小腸細胞增生，可能的機制包括：短鏈脂肪酸可促進血液流動、提供能量、刺激腸道荷爾蒙 (enterotropic hormones) 分泌並對腸道神經系統產生刺激作用使腸道細胞增生<sup>(53)</sup>。短鏈脂肪酸中的丁酸可優先被結腸細胞利用作為能量來源，同時刺激結腸吸收水分和鈉離子。當短鏈脂肪酸缺乏時，造成腸細胞飢餓，容易發生結腸潰瘍和發炎的情形<sup>(53,54)</sup>。研究指出給予短鏈脂肪酸可刺激小腸黏膜細胞分裂，有效抑制小腸黏膜萎縮<sup>(55,56)</sup>。給予經腸切除的老鼠全靜脈營養，其腸黏膜會有萎縮情形，補充短鏈脂肪酸則有助於小腸黏膜的復甦<sup>(57)</sup>。另外，研究指出當給予小腸障壁功能受損的老鼠含果膠的營養液時，其腸道細菌轉移的情形比不加果膠的營養液低，指出水溶性纖維可保護小腸障壁功能，降低細菌的轉移，避免發生敗血症導致器官衰竭的可能<sup>(58)</sup>。

## 第三章 材料與方法

### 第一節 實驗材料

#### 一、山藥來源

名間長紅 (*Dioscorea alata* L. var. *Purpurea* (Roxb.) M. Pouch) :

購自南投名間鄉

台農二號 (*Dioscorea alata* L. cv Tainung No.2) : 購自南投名間鄉

基隆山藥 (*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* (Hay.)

Yamamoto) : 購自瑞芳農會

#### 二、化學試藥

##### 1. 飼料 :

Chow : Rodent Laboratory Chow, Purina Mills, St. Louis, USA

tert-Butylhydroquinone (TBHQ) : Fluka Chemika, cat. No. RA11281,  
Switzerland

Choline ([2-Hydroxyethyl]trimethylammonium) : Sigma, St. Louis,  
USA.

AIN-93M Mineral Mix : ICN Biomedicals, Inc., cat. No.960401, Aurora,  
Ohio

AIN-93VX Vitamin Mix : ICN Biomedicals, Inc. cat. No.960402, Aurora,  
Ohio

L-Cystine : Sigma Chemical Co., cat. No. 56-89-3, St. Louis, USA.

Corn Starch : Bangkok Starch Industrial Co., Bangkok

$\alpha$ -cellulose : Sigma Chemical Co., cat. No. 9004-34-6, St. Louis, USA

2. 脂質測定試劑 :

TG kit : Randox Laboratories Ltd., cat. No. J07650, Antrim, United  
Kingdom

Total-Cholesterol kit : Randox Laboratories Ltd., cat. No. K82431,  
Antrim, United Kingdom

HDL-cholesterol kit : Randox Laboratories Ltd., cat. No. ST1018,  
Antrim, United Kingdom

Phospholipids kit : Audit, cat. No. AD312PL, Ireland

3. 一般試薬 :

Cholesteryl acetate : Aldrich Chemical Company, Inc., cat. No. 604-35-3,  
USA

Ethanol (99.5% ) : Showachemical co.,Ltd., 東京, Japan

Chloroform : Tedia Company, cat. No. CS-1332, USA.

Methanol : Tedia Company, cat. No. MS-1922, USA.

4-Methyl-n-valeric Acid (99% ) : Sigma Chemical Co., Saint Louis,  
USA.

Triobarbituric acid(99% ) : Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA.

Sodium Hydroxide (NaOH) : Wako, cat. No.197-02125, 大阪, Japan

Acetone : Tedia Company, cat. No. AS-1112, USA.

Phosphoric Acid (99% ) : Fluka Chemika, Switzerland Sodium Chloride

(NaCl) : Wako., 大阪, Japan

#### 4. PCR 試藥

QIAamp<sup>®</sup> DNA stool Mini Kit : Qiagen, Cat. No. 51504, Germany

Premier Nucleic acid purification/Amplication kit : Strategic  
Laboratory, Cat. No. PM250, Canada

TAE buffer (50×) : Premier, Wellbond Science Co., Cat. GB01, 台中市,  
台灣

Bovine serum albumin (BSA) : Sigma Chemical Co., cat. No. A-3059, St.  
Louis, USA.

TaKaRa Taq<sup>™</sup> : TakaRa Shuzo Co., cat. R001A, Shiga, Japan. (誠心堂)

Primer : Medclub Scientific Co., Taipei, Taiwan. (美得)

Ethidium Bromide (1%) : Wellbond Science Co., cat. No. GM013-10,  
台中(全盟)

台灣 Seakem<sup>®</sup> LE agarose : BMA., ME, USA. (騰達)

Excel<sup>™</sup> DNA Ladder (100 bp) : Strategic Laboratory., Canada

#### 5. 細菌培養基

Clostridien-Differential-Bouillon (DRCM) : Merck., Germany

D-(+)-Cellbiose : Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA.

D-(+)-Mannose : Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA

Lactobacilli MRS Broth : Becton Dickinson and company., USA

Glycerol : Wako., 大阪, Japan

#### 6. 黏膜酵素分析

Bio-Rad Protein Assay : Bio-Rad Laboratories, CA, USA.

Glucose kit : Randox Laboratories Ltd., cat. No. GL 2623, Antrim,  
United Kingdom

LAP kit : Randox Laboratories Ltd., cat. No. LA 561, Antrim, United  
Kingdom

### 三、儀器設備

(1) 厭氧培養罐 : Anaerocult<sup>®</sup>, Merck KgaA, Germany

(2) 厭氣培養包 : BBL<sup>™</sup>GasPak<sup>™</sup>, Becton Dickinson and Co.  
Sparks, Maryland, USA.

(3) 恆溫箱 : Firstek Scientific 1-100s, Taiwan

(4) 分光光譜儀 : Unicam genesys 10uv Spectronic, New York, USA.

(5) 氣相層析儀 : Shimadzu GC-14B, Shimadzu Co., Tokyo, Japan

(6) 水浴槽 : YIH DER BH-130, Taiwan

(7) 菌落計數器 : Model-570, Suntext, Taiwan

(8) 酸鹼滴定器 : MP220 Mettler-Toledo, UK.

(9) 迴轉式震盪器 : Vortex-Genie 2 G-560, Laboratory Equipment,  
USA

(10) 冷凝器 : Heto DRYWINNER, Kansas City, Missouri, USA



(11) 超合金增幅反映槽座：Takara PCR Thermal Cycler MP, 台中, 台灣

(12) 電泳槽：Mupid-2, Tokyo, Japan

(13) 數位化影像處理系統：Alpha Imager 2000

(14) 高速離心機：Hitachi CR-21, Japan

(15) 高速離心機：Beckman J2-MC

(16) 離心抽氣機：Centrivap concentrator 64B2, Labconco  
co., Kansas city, Missouri

#### 四、培養基

(1) Lactobacilli MRS Broth：Becton Dickinson and co., Sparks,  
Maryland, USA. (表一)

(2) Reinforced Clostridial Medium：Oxoid Ltd., Hampshire, England.  
(表二)

#### 五、菌種及來源

由新竹食品工業發展研究所菌種中心購得 *Bifidobacterium longum* 菌株 (CCRC 11847)。

#### 六、小鼠品種及來源

由國家動物中心購得五週齡，最初體重約 17 g，BALB/c 雄鼠。

表一、MRS Broth 之組成分

Table 1. The composition of MRS Broth.

Composition	Concentration (g/L)
Bacto Protease Peptone No.3	10.0
Bacto Beef Extract	10.0
Bacto Yeast Extract	5.0
Bacto Dextrose	20.0
Polysorbate 80	1.0
Ammonium Citrate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Magnesium Sulfate	0.1
Manganese Sulfate	0.05
Dipotassium Phosphate	2.0

表二、Reinforced clostridial medium 之組成分

Table 2. The composition of Reinforced clostridial medium.

Composition	Concentration (g/L)
Yeast Extract	3.0
Lab-Lemco' Powder	10.0
Peptone	10.0
Soluble Starch	1.0
Glucose	5.0
Cysteine Hydrochloride	0.5
Sodium Chloride	5.0
Sodium Acetate	3.0
Agar	0.5

## 第二節 實驗方法

### 一、實驗設計

以 AIN-93 飲食為控制組，另外分別將三種品系之山藥冷水萃取物磨粉，取代控制組中 5% 澱粉 (表三)，將 6.5 週齡 *BALB/c* 雄鼠隨機編入四組飲食中，分別是控制組、民間長紅組、台農二號組和基隆山藥組，每組八隻，餵飼 21 天，第 18 天起收集三日糞便，第 22 天禁食取血，分析項目包括飼料營養成分、飼料效應、器官相對重、脂質分析、腸道效應分析及小腸黏膜之消化酵素活性等。觀察山藥冷水萃取物對小鼠脂質及腸道之生理效應。

### 二、山藥水萃取物之製備

將山藥清洗削皮切丁，山藥丁與 4°C 去離子水之比例為 1:2，在均質機中拌打均質，以 4°C，17500xg 離心 40 分鐘，取上清液，將上清液冷凍乾燥磨粉，用於飼料配製及營養成份分析。以 AOAC 方法定量山藥水萃取物中三大營養素、水溶性纖維及灰分含量。

### 三、動物處理

以自動光照控制 (12 小時日夜循環)，室溫 25°C，自由飲水及攝食。最初以非純化商業飲食 (Chow) 適應一週，之後餵飼各組飼料。

表三、各組飼料配方組成

Table 3. Compositions of control diet and diets containing yam extract Powder.

	Control	Yam
Ingredients (g/kg)		
Soybean oil	70	70
Corn starch	529.49	479.49
Yam extract powder	0	50
Sucrose	100	100
Casein	200	200
Cellulose	50	50
Mineral mix	35	35
Vitamin mix	10	10
L-cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014

#### 四、體重測量

實驗 21 天期間每週秤體重一次，包括最初、實驗期間及最末體重，由體重總增加克數計得小鼠隻日所增加的體重。

每日體重增加克數 (g/day) = 總體重增加克數 (g) ÷ 21 (day)

#### 五、器官秤重

收集秤重小腸、盲腸、盲腸內容物、大腸、胃、肝臟及心臟。

##### (1) 小腸：

清除小腸殘渣，以 0.9% 生理食鹽水清洗拍乾後秤重紀錄。

##### (2) 盲腸：

將盲腸內容物放入 2 ml 管中，-20°C 儲存，備用於短鏈脂肪酸之分析。另將盲腸組織在 0.9% 生理食鹽水中清洗拍乾並秤重紀錄。

##### (3) 大腸、胃、肝臟及心臟：

如同上述步驟，清除大腸及胃內容物，並將大腸、胃、肝臟及心臟秤重紀錄。

##### (4) 相對器官重

相對器官重 (%) = 器官重 (g) ÷ 最後體重 (g) × 100

#### 六、飼料攝取量

每週秤飼料攝取量兩次，由 21 天之總攝食量以加水飼料與乾飼

料之總比例 (控制組濕飼料：乾飼料=2：1；山藥組則是 2.1：1) 可得餵食乾重，計算小鼠每日飼料攝食乾重。另外，在第 18 天起收集三日糞便的同時，記錄三日攝食量，並計算攝食乾重。計算如下：

控制組每日飼料攝取乾重 (g/d) = 總攝食克數 ÷ 2 ÷ 21 天

山藥組每日飼料攝取乾重 (g/d) = 總攝食克數 ÷ 2.1 ÷ 21 天

飼料效應 (%) = (每日體重增加克數 ÷ 每日飼料攝取乾重) × 100

## 七、血脂分析

### 1. 血漿製備

禁食後斷頭取血，將血液置於含抗凝血劑肝素的管中均質，之後離心 700×g，5 分鐘取上清液，放置於-20°C 冰箱中儲存，備用於血脂分析。

### 2. 血脂分析

以酵素測定法檢測總膽固醇、三酸甘油酯、HDL-膽固醇及磷脂質，並推算 (VLDL+LDL)-膽固醇及粥狀動脈硬化指數 (即 LDL-膽固醇/HDL-膽固醇)。

#### (1) 總膽固醇測定：

依商業性組套 (Randox) 所提供之方法。取 5 μl 血漿加入 500 μl 反應試劑，置於室溫下反應 15 分鐘，檢測波長 500 nm 之吸光值。

標準品 (200 mg/dL) 檢測與樣品相同。濃度計算如下：

總膽固醇濃度 (mmol/L) = (樣品在波長 500 nm 之吸光值/標準品在波長 500 nm 之吸光值) × 5.17

(2) 三酸甘油酯測定：

依商業性組套 (Randox) 所提供之方法。取 5 µl 血漿加入 500 µl 反應試劑，置於室溫下反應 15 分鐘，檢測波長 500 nm 之吸光值。

標準品 (200 mg/dL) 檢測與樣品相同。濃度計算如下：

三酸甘油酯濃度 (mmol/L) = (樣品在波長 500 nm 之吸光值/標準品在波長 500 nm 之吸光值) × 2.29

(3) 高密度脂白膽固醇測定：

依商業性組套 (Randox) 所提供之方法。沉澱劑與去離子水以 4:1 比例做稀釋，取 150 µl 已稀釋之沉澱劑加入 60 µl 血漿中混合，室溫下靜置 10 分鐘，離心 1250×g，10 分鐘，取上清液 50 µl 加入 500 µl 反應試劑，置於室溫下反應 15 分鐘，檢測波長在 500 nm 之吸光值。膽固醇標準品 (50 mg/dL) 檢測與樣品相同。濃度計算如下：

高密度脂白膽固醇濃度 (mmol/L) = (樣品在波長 500 nm 之吸光值/標準品在波長 500 nm 之吸光值) × 1.29

沉澱劑組成：phosphatungstic acid and magnesium chloride



(4) 磷脂質測定：

根據商業性組套 (Audit) 所提供之方法。取 5  $\mu$ l 血漿加入 500  $\mu$ l 反應試劑 (Reagent 1 + Reagent 2) 於 37°C 反應 10 分鐘，檢測 500 nm 波長之吸光值。標準品檢測與樣品相同。濃度計算如下：

磷脂質濃度 (mmol/L) = (樣品在波長 500 nm 之吸光值 / 標準品在波長 500 nm 之吸光值)  $\times$  3.87

試劑組成：

Reagent 1 : Tris Buffer 50 mmol/L (pH7.6) , Phenol 2.1 mmol/L

Reagent 2 : Phospholipase D 450 U/L , Peroxidase 3300 U/L , Choline oxidase 2250 U/L , 4-Amino-antipyrine 0.24 mmol/L

(5) 極低密度脂蛋白與低密度脂蛋白膽固醇計算 (單位：mmol/L)

(VLDL + LDL)-cholesterol = Total cholesterol - HDL-cholesterol

(6) Atherogenic Index (AI) = (VLDL + LDL)-cholesterol  $\div$  HDL-cholesterol

## 八、肝臟脂質分析

### 1. 樣品處理

取下肝臟置於密封袋，在液態氮中急速冷卻，於 -20°C 冰箱儲存。

## 2. 脂質萃取方法

根據 Folch<sup>(59)</sup> 的方法取 0.05 g 肝臟，剪碎加入 500  $\mu\text{l}$  之氯仿和甲醇 (2:1, v/v) 混合液，同時製作兩管，在超音波破膜機上冰浴震盪 (強度 15% , 1 分鐘)，直到肝臟成微粒狀，之後在 60°C 乾浴槽中放置 1 小時，使組織浸潤充分萃出脂質，離心 7500 $\times$ g，15 分鐘，將兩管上清液合併，上清液以每管 100  $\mu\text{l}$  分裝，至離心抽氣機中揮發 (75°C，20 分鐘或直到完全乾燥)，-20°C 儲存，備用於總膽固醇及磷脂質之檢測。另外，取出一管未烘乾的上清液 (100  $\mu\text{l}$ ) 加入 0.9 ml 甲醇稀釋 (10 倍)，同上述方法以每管 100  $\mu\text{l}$  分裝烘乾，-20°C 儲存，備用於三酸甘油酯之檢測。

## 3. 脂質分析方法

### (1) 總膽固醇

根據商業性組套 (Randox) 所提供方法。將已烘乾之黃色脂質加入 100  $\mu\text{l}$  酒精 (99.5% ) 以恢復原體積，均質後從中取出 10  $\mu\text{l}$  加入 500  $\mu\text{l}$  試劑，室溫下反應 15 分鐘，檢測波長 500 nm 之吸光值。

標準品檢測與樣品相同。濃度計算如下：

總膽固醇濃度 (mmol/L) = (樣品在波長 500 nm 之吸光值  $\div$  標準品在波長 500 nm 之吸光值)  $\times$  5.17

每克肝臟所含總膽固醇濃度 ( $\mu\text{mol/g}$ ) = 總膽固醇濃度 (mmol/l)

$\times 0.001 \text{ liter 萃取溶劑} \times 1000 \mu\text{mole /mmole} \div \text{肝臟重 (g)}$

## (2) 三酸甘油酯

根據商業性組套 (Randox) 所提供方法。將已烘乾之黃色脂質加入 50  $\mu\text{l}$ ，均質後取出 10  $\mu\text{l}$  加入 500  $\mu\text{l}$  試劑，室溫下反應 15 分鐘，檢測波長 500 nm 之吸光值。標準品檢測與樣品相同。濃度計算如下：

三酸甘油酯濃度 (mmol/L) = (樣品在波長 500 nm 之吸光值 / 標準品在波長 500 nm 之吸光值)  $\times 2.29$

每克肝臟所含三酸甘油酯濃度 ( $\mu\text{mol/g}$ ) = 三酸甘油酯濃度 mmol/L  $\times 5 \text{ 倍濃度} \times 0.001 \text{ liter 萃取溶劑} \times 1000 \mu\text{mole /mmole} \div \text{肝臟重 (g)}$

## (3) 磷脂質

根據根據商業性組套 (Audit) 所提供之方法。將已烘乾之黃色脂質加入 100  $\mu\text{l}$  酒精 (99.5%) 以恢復原體積，均質後從中取出 5  $\mu\text{l}$  加入 500  $\mu\text{l}$  試劑 (Reagent 1 + Reagent 2) 於室溫下反應 15 分鐘，檢測 500 nm 波長之吸光值。標準品檢測與樣品相同。濃度計算如下：

磷脂質濃度 (mmol/L) = (樣品在波長 500 nm 之吸光值 / 標準品在波長 500 nm 之吸光值)  $\times 3.87$

每克肝臟所含磷脂質濃度 (mmol/g) = 磷脂質濃度 (mmol/L)  $\times 0.001 \text{ liter 萃取溶劑} \times 1000 \mu\text{mole /mmole} \div \text{肝臟重 (g)}$

## 九、糞便成份分析

### 1. 糞便收集：

餵食第 18 天起連續收集三日糞便。將老鼠個別放入金屬籠中，移除墊料並放置金屬網底，將糞便放入已秤重之收集管中冰浴。結束後計算糞便顆數 (fecal pellet) 及秤量糞便淨重，最後於-20°C 冷凍儲存，以備於測定糞便濕份、短鏈脂肪酸、中性脂肪以及糞便細菌之定量。

### 2. 糞便水分及排便率頻測定

取約 0.1 克的新鮮糞便，以 70°C 真空乾燥 72 小時。由三日所收集的糞便總顆數可得每日排便頻率。計算如下：

$$\text{糞便濕份 (\%)} = (\text{糞便濕重} - \text{糞便乾重}) \div \text{糞便濕重} \times 100$$

$$\text{每日糞便顆數 (pellet/day)} = \text{三日糞便總顆數} \div 3$$

### 3. 短鏈脂肪酸萃取與測定方法

#### (1) 萃取方法

依本實驗室<sup>(60)</sup>的方法稍作修飾，分別採 0.05 g 盲腸內容物及新鮮糞便加入 0.5 ml 水均質之，加入 50  $\mu$ l 內標準品 isocaproic acid 後，冰浴以破膜機均質，以 7500 $\times$ g 離心 10 分鐘，取上清液，加 20  $\mu$ l TCA (trichloroacetic acid) 震盪，離心 15 分鐘。取上清液加入 1 ml 乙醚

萃取，700×g 離心 1 分鐘，並且反覆此萃取步驟一次。之後，取乙醚層，加入 25  $\mu$ l 5M NaOH 皂化脂肪酸，加入 0.2 ml acetone 之後，於離心抽氣機 (35°C) 揮發乙醚，即為樣品。

## (2) 測定方法

利用氣相層析儀分析樣品中所含乙酸、丙酸、異丁酸和丁酸之含量。其分析條件如下：

管柱：Stabilwax<sup>®</sup>-DA

移動相：N<sub>2</sub>

Program：Initial Column Temp.100°C；Final Column Temp.200°C；Rate of Temp.6°C/min；Injector Temp.250°C；Detector Temp.250°C

樣品注入量：1  $\mu$ l (split ratio=1：10)

## 4. 糞便中性固醇之萃取與測定方法

### (1) 糞便脂質之萃取方法

將膽固醇標準品 Cholesteryl acetate (Aldrich) 溶於萃取溶劑 (氯仿：甲醇=2：1)，配製成 10 mg/ml 之後，將標準品稀釋成 0.5，1，2 mg/ml。

方法：

將已磨粉的糞便樣品置於真空乾燥箱 110°C，2 小時烘乾，取

0.05g 糞便置於管中加入 1 ml 萃取溶劑，封口震盪，放入已預熱至 60°C 的乾浴槽，關掉開關，放置隔夜。離心 7500×g，15 分鐘，取上清液並以 100 μl 分裝；另將已配好之標準品同樣以 100 μl 分裝，同時在抽氣離心機中以 75°C 吹乾。

## (2) 測定方法

反應試劑 (Liebermann Burchard reagent) 配製方法<sup>(61)</sup> 為 Acetic anhydride : Sulfuric acid : Acetic acid = 20 : 1 : 10 成比例混合。

將 400 μl Liebermann Burchard reagent 加入已吹乾溶劑的樣品及標準品試管中震盪 30 秒，水浴 37°C，反應 15 分鐘，測 550 nm 吸光值。計算方法是以標準品作為標準曲線，樣品以內插法求得每克乾燥糞便之中性固醇濃度。計算如下：

每日乾燥糞便之中性固醇排出量 (mmole/d) = 每日糞便排出乾重 (g/d) ÷ 秤取糞便樣品重 (g) × 中性固醇濃度 (mg/ml) × 萃取溶劑體積 (ml) ÷ 標準品分子量

## 十、糞便菌數分析

### (1) 純菌培養

#### a. 菌株活化

將由食工所購得的菌株 (*Bifidobacterium longum*) 之外管以 70

% 酒精擦拭，在火焰上加熱外管之尖端，滴數滴無菌水於尖端使外管破裂，再用硬棒敲破尖端，取出隔熱纖維紙及內管，以滅菌鑷子取出內管之棉塞，再以滅菌吸管取 300  $\mu$ l 之指定液體培養基於內管中，均質震盪之，之後取出 200  $\mu$ l 注入已滅菌之指定增殖培養基，於恆溫箱中培養 37°C，48 小時。

#### b. 增殖培養

以去離子水配製 Lactobacilli MRS Broth (55 g/L)，加入 cysteine (0.05% w/v)，每個試管分裝 8 ml，以殺菌釜 121°C 滅菌 15 分鐘。冷卻後接入 0.1 ml 經活化的菌株於各試管。之後，將各試管置於裝有厭氧包的厭氧罐，以 37°C 恆溫箱培養 48 小時。

#### c. 菌株定量保存

將經增殖培養的菌液經適當稀釋後，取 10  $\mu$ l 塗在玻片上 1 ml，經革蘭氏染色後，在光學顯微鏡下定量。取 1 ml 加入經滅菌的甘油水溶液(20% w/v)，輕微震盪後於 -80°C 冰箱儲存，以作為 PCR 定量菌數之外標準品。

#### (2) 糞便 *Clostridium perfringens* 培養

取小鼠新鮮糞便 0.1 g，以厭氧稀釋液適當稀釋，取 0.1 ml 在 Reinforced Clostridial Medium (38g/L) 洋菜膠中塗佈均勻。將培養基

置於裝有厭氧包的厭氧罐，以 37°C 恆溫箱培養 96 小時，計算褐色或黑色，且有透明外圍之 *Clostridium perfringens* 菌數，求得每克新鮮糞便之菌數。

### (3) 純菌及糞便細菌 DNA 之純化

#### a. 純菌 DNA 之純化

根據商業性組套 (Premier) 所提供之方法。取 2 ml 純菌培養之 *Bifidobacterium longum* ( $2.53 \times 10^5$  CFU/ml) 以 12500×g 離心 1 分鐘，丟棄上清液，將離心管打開倒置，使上清液能完全流出。加入 200  $\mu$ l solution I 使細胞懸浮，強力震盪使 pellet 再次呈懸浮體狀態。加入 200  $\mu$ l solution II 混勻，使細胞溶解，加入 200  $\mu$ l solution III 混勻以中和溶液，以 12500×g 離心 1 分鐘，組合 spin column 及收集管，將上清液轉移到 spin column 中，同轉速離心 1 分鐘。丟棄濾液並重組管子，加入 700  $\mu$ l wash solution 到 spin column，離心 1 分鐘，重複此步驟一次。最後丟棄濾液，離心 1 分鐘以移除殘留的乙醇。將洗過的 spin column 換到一個新的離心管，室溫下靜置 10 分鐘以移除殘留的乙醇。加入 200  $\mu$ l 經滅菌的二次水到 spin column，以 12500×g 離心 1 分鐘洗出 DNA，從中取出 20  $\mu$ l DNA 液加入 380  $\mu$ l 滅菌水 (即稀釋 20 倍)，檢測波長在 260 nm 之吸光值。最後於 -80°C 冰箱儲存，備用於 PCR 糞便菌量之檢測。



DNA 濃度 ( $\mu\text{l/ml}$ ) = OD 260 nm 之吸光值  $\times 50 \mu\text{g/ml}$   $\times$  稀釋倍數

#### b. 糞便細菌 DNA 之純化

根據商業性組套 (QIA amp) 所提供之方法。取已知菌數 *Clostridium perfringens* ( $1.25 \times 10^7$  CFU/g) 之新鮮糞便，作為外標準品。另取 0.2 g 乾燥糞便復水，即樣品。將標準品和樣品分別加入 ASL buffer 1.4 ml 均質直到均勻，70°C 加熱五分鐘，震盪後以 12500  $\times$ g 離心 1 分鐘，取 1.2 ml 上清液加入一顆 inhibition EX 錠劑震盪均質靜置 1 分鐘以吸附抑制物，再離心 3 分鐘，取上清液再離心 3 分鐘，取上清液 200  $\mu\text{l}$  加入 15  $\mu\text{l}$  Proteinase K，之後再加入 200  $\mu\text{l}$  Buffer AL 震盪，以 70°C 水浴 10 分鐘，離心 1 分鐘，加入 99.5% 乙醇，震盪後離心 1 分鐘，組合 2 ml 管子與 spin column (silica-gel membrane)，將上清液倒入 spin column 中，離心 1 分鐘，丟棄濾液，加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW1 之後離心 1 分鐘，丟棄濾液，將 spin column 放入新的離心管，加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，離心 3 分鐘，將 spin column 放入新的管子離心 1 分鐘，spin column 放入新管子後加入 200  $\mu\text{l}$  Buffer AE 靜置 1 分鐘，離心 1 分鐘使 DNA 洗出。

#### (4) PCR 檢測糞便細菌數

試藥配製

a. TAE buffer :

將 50×TAE buffer (Premier) 以去離子水分別稀釋成 5×TAE buffer 和 1×TAE buffer 。  
50×TAE buffer contents : Tris 242.28 g/L (2M) , EDTA-Na<sub>2</sub> 18.61 g/L (0.05M) 和 glacial acetic acid 60.05 g/L (1M)

b. 引子製備

將 0.121 g Tris base (10 mM) 及 0.037 g EDTA (1mM) 混合，溶解於 100 ml 去離子水中 (即 TE buffer)，以 HCl (12 N) 調整 pH 至 7.0，以殺菌釜滅菌後待涼備用。將冷凍乾燥的引子<sup>(58)</sup>(0.19 mg) 以 7500×g 離心 2 分鐘，加入 2 ml 經滅菌的 TE buffer 均質分裝。

c. Loading dye 配製

Glycerol 30% ，5×TAE buffer 20% ，滅菌水 50% ， Bromothenol blue 0.2%

d. Marker 配製

Excel™ DNA Ladder : 6× DNA loading dye : 滅菌水=3 : 2 : 1

e. Gel (2% ) 配製

將 7.5 ml 5×TAE buffer 與 30 ml 去離子水倒入燒杯，放入磁石

攪拌，以 70°C 加熱，待微溫加入 0.75 g 膠 (agarose) 使膠呈清澈透明樣，倒入模型中，待膠冷卻定型。

#### f. Ethidium bromide 溶液

將 15 µl Ethidium bromide 溶於 300 ml 之 1×TAE buffer 中。

#### g. PCR mixture

2.5 µl dNTP (2.5 mM)、2.5 µl 10× PCR buffer、0.5 µl primer-1(15.4 mM)、0.5 µl primer-2 (15.4 mM)、0.3µl (*Bifidobacterium longum*) 或 0.2µl (*Clostridium perfringens*) Taq polymerase (5U/µl)、2.5 µl bovine serum albumin (1mg/ml) 和經滅菌之二次水。

#### 分析方法：

參考 Wang 等人<sup>(62)</sup>的方法。將已純化之純菌及糞便 DNA 做適當系列稀釋，使樣品界於外標準品範圍內，以內插法求得每克糞便之菌數。取 2 µl 樣品或外標準品之 DNA 液分別加入 23 µl PCR mixture 中，反應溫度設定：第一個 cycle 為 94°C 15 秒；接著 40 個 cycle 為 94°C 20 秒，45°C 30 秒，74°C 35 秒；接著 1 個 cycle 為 74°C，10 分鐘，反應結束後保持 4°C。將 25 µl 反應終產物加入 5 µl Loading Dye 混合，取出 8 µl 放入 2% Gel 孔中，在電泳槽中裝 300 ml 1×TAE buffer 以 100 伏特電壓進行電泳，約 27 分鐘。結束後將 Gel 放入

Ethidium bromide 溶液中，避光震盪 (25 rpm) 染色 30 分鐘，置於 UV 光箱照射顯影並定量分析片段之密度。

## 十一、小腸黏膜消化酵素活性分析

### (1) 樣品製備

將小腸剪成三段 (前、中及末段)，秤重前段之後以玻片刮取黏膜，根據衛生署建議，將其加入含蛋白酶抑制劑 (phenylmethylsulfonylfluoride, iodoacetic acid) 之冰生理食鹽水中均質。

### (2) 蛋白質定量

以 Biorad 試劑定量蛋白質含量，以牛血清蛋白作為標準品 (200-800  $\mu\text{g/ml}$ )。將 Biorad 試劑稀釋 (試劑：去離子水=1：4)，取出 1 ml 經稀釋的 Biorad 試劑加入 20  $\mu\text{l}$  樣品或標準品中反應 10 分鐘，測 595 nm 之吸光值。

### (3) 蔗糖酶 (Sucrase) 活性分析：

根據 Hestrin<sup>(63)</sup> 的方法，將小腸黏膜前段 1/3 放入蛋白酶抑制劑均質，5000 $\times$ g 離心 2 分鐘，取 10  $\mu\text{l}$  樣品加 40  $\mu\text{l}$  含 1 M 蔗糖之磷酸鉀緩衝液 (37°C) 反應 5 分鐘，沸水浴 5 分鐘使酵素失活，待涼後取出 10  $\mu\text{l}$  加入 0.5 ml 葡萄糖反應試劑，37°C 水浴反應 10 分鐘，

測波長 500 nm 之吸光值。空白是以 5  $\mu$ l 樣品沸水浴 5 分鐘使酵素失活，加入 20  $\mu$ l 含 1M 蔗糖之磷酸鉀緩衝液 (37°C)，待涼後取出 10  $\mu$ l 加入 0.5 ml 葡萄糖反應試劑，37°C 水浴反應 10 分鐘，測波長 500 nm 之吸光值。計算如下：

$$\text{Glucose concentration (mmole/L)} = \frac{[(\text{sample OD} - \text{sample blank OD}) \div (\text{standard OD} - \text{reagent OD})] \times 5.55}$$

$$\text{Sucrase activity (IU/mg)} = \frac{\text{Glucose concentration (mmole/L)} \times 0.5 \text{ ml} \times 0.001 \text{ liter} \div 5 \text{ (min)}}{\text{protein content in the reaction mixture (mg)}}$$

#### (4) 麥芽糖酶 (Maltase) 活性分析

根據 Wiesmeyer<sup>(64)</sup>的方法，將小腸黏膜前段 1/3 放入蛋白酶抑制劑均質，5000 $\times$ g 離心 2 分鐘，取 10  $\mu$ l 加將 0.57 ml 磷酸鉀緩衝液 (pH = 7) (37°C) 加 20  $\mu$ l 麥芽糖反應 5 分鐘，接著沸水浴 5 分鐘使酵素失活，待涼後取出 10  $\mu$ l 加入 1 ml 反應試劑，37°C 水浴反應 10 分鐘，測波長 500 nm 之吸光值。空白是同樣以 10  $\mu$ l 樣品加入 0.57 ml 磷酸鉀緩衝液，沸水浴 5 分鐘，加入 10  $\mu$ l 麥芽糖，沸水浴 5 分鐘，待涼後取出 10  $\mu$ l 加入 1 ml 反應試劑，37°C 水浴反應 10 分鐘，測波長 500 nm 之吸光值。

$$\text{Glucose concentration (mmole/L)} = \frac{[(\text{sample OD} - \text{sample blank OD}) \div (\text{standard OD} - \text{reagent OD})] \times 5.55}$$

Maltase activity (IU/mg) = Glucose concentration (mmole/L) × 0.6 ml  
× 0.001 liter ÷ 2 (disaccharides) ÷ 5 (min) ÷ protein content in the reaction  
mixture (mg)

(5) 白胺酸胺基胜肽酶活性分析：

以 Sigma Diagnostics LAP 測定。取 0.03 ml 腸黏膜均質液加入  
0.5 ml 試劑 (3.0 ml 緩衝液加入 0.1 ml 受質)，立刻測波長 405  
nm 之最初吸光值，並分別在 1、2 和 3 分鐘之後記錄其吸光值變化。  
計算如下：

$$\text{IU/mg (25}^\circ\text{C)} = 1784 \times \Delta A_{405 \text{ nm/min}} \div \text{protein content in the reaction mixture (mg)}$$

試劑組成：

Buffer：Tris buffer 50 mmole, pH 7.2；NaCl 250 mmole/L

Substrate：L-leucine-p-nitroanilide 26 mmol/L

## 九、統計方法

各組分析所得數值以平均值正負標準偏差 (mean ± SD) 表示。  
統計方法是以 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 10.0  
程式之 one-way analysis of variance (ANOVA) 並以 Dunnett's test  
或 Tukey's test 進行分析，檢測控制組與實驗組間或各組間之差異性，  
當  $P < 0.05$  時具顯著性差異。

## 第四章 結果

### 第一節 山藥水萃取物及飼料之營養成份分析

將民間長紅 (Purpurea)、台農二號 (Tainung No.2) 及基隆山藥 (Keelung) 之水萃取液進行冷凍乾燥，可得乾燥水萃取物之回收率分別是 4.36%、4.45% 及 5.76%。測定冷凍乾燥山藥水萃取物之營養成分，包括醣類、水溶性纖維、蛋白質、脂肪、灰份和水份，並進行熱量分析 (表四)，結果顯示各山藥品系之水萃取物含碳水化合物，分別是 40.81、43.63 和 47.37 %，主要成份為水溶性纖維，其次是蛋白質、灰份和水份，脂肪含量少，熱量低。

將山藥水萃取物加入飼料中，計算其所含營養成分之結果顯示 (表五)，山藥飼料所含碳水化合物和熱量分別比控制飼料低 0.9 和 1 倍；蛋白質、礦物質和水溶性纖維含量分別比控制飼料高 1.1、2 和 2 倍。

表四、冷凍乾燥山藥水萃取物之營養成份分析

Table 4. The nutrients analysis of lyophilized yam extract.

	Purplea	Tainung No.2	Keelung
Ingredients (g/100g)			
Carbohydrate (excluding fiber)	1.76	7.99	5.92
Protein	28.86	27.99	26.13
Fat	0.26	0.34	0.24
Ash	18.93	15.86	15.03
Soluble fiber	39.05	35.64	41.45
Moisture content	11.14	12.18	11.23
Energy density (kcal/100g)	124.82	146.98	130.36



表五、飼料之營養成份分析

Table 5. Nutritional values of experimental feed.

Component (g/100g)	Control	Purpurea	Tainung No.2	Keelung
Carbohydrate	63.0	58.09	58.40	58.30
Protein	20.0	21.44	21.40	21.31
Fat	7.00	7.01	7.02	7.01
Mineral	1.0	1.95	1.79	1.75
Total dietary fiber (including cellulose)	5.0	6.95	6.78	7.07
Soluble fiber	0	1.95	1.78	2.07
Energy (kcal/100g)	395	381	382	382

## 第二節 山藥水萃取物對攝食量、體重及飼料效應之影響

控制組與山藥水萃取物組之每日攝食量、體重及攝食效應結果顯示 (表六)，控制組與各山藥水萃取物組並無顯著差異。

表六、山藥水萃取物對小鼠每日總攝食量、體重增加量及飼料效率之影響<sup>1</sup>  
 Table 6. Effects of yam water extracts on daily intake, body weight gain and feed efficiency of *BALB/c* mice.<sup>1</sup>

	Control	Purpurea	Tainung No.2	Keelung
Food intake (g/d)	3.66 ± 0.16	3.90 ± 0.34	3.94 ± 0.55	4.02 ± 0.17
Body weight gain (g/d)	0.18 ± 0.09	0.22 ± 0.07	0.20 ± 0.07	0.24 ± 0.11
<sup>2</sup> Feed efficiency ( % )	4.00 ± 0.61	5.80 ± 1.18	5.53 ± 1.08	4.80 ± 1.72

<sup>1</sup>Data are expressed as means ± SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

<sup>2</sup>Feed efficiency ( % ) = Body weight gain (g/d) ÷ Food intake (g/d) × 100

### 第三節 山藥水萃取物對小鼠主要器官和相對器官重之影響

控制組與民間長紅、台農二號及基隆山藥組小鼠之主要器官重結果顯示 (表七) 基隆山藥組小鼠之肝臟重量顯著性低於控制組 ( $p=0.03$ )。在山藥組間差異方面，基隆山藥組肝臟重量顯著性低於台農二號組 ( $p=0.04$ )。

控制組與各山藥組小鼠之相對器官重結果顯示 (表八) 只有基隆山藥組小鼠之相對肝臟重顯著性低於控制組 ( $p=0.01$ )。各山藥組間則無顯著差異。

表七、控制飼料與山藥飼料對小鼠主要器官重量之影響<sup>1,2</sup>

Table 7. Effects of control and yam diets on organ weight in *BALB/c* mice.<sup>1,2</sup>

	Control	Purpurea	Tainung No.2	Keelung
				g
Stomach	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Small Intestine	0.83 ± 0.11	0.80 ± 0.13	0.87 ± 0.10	0.80 ± 0.07
Cecum	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Colon	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.19 ± 0.03
Heart	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.09	0.15 ± 0.01
Liver	1.40 ± 0.12 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.17 <sup>ab</sup>	1.41 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.19 <sup>*,b</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as means ± SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $0.01 \leq p < 0.05$ ).

<sup>2</sup>Data are expressed as means ± SD. Different superscript letters denote significant differences across groups as analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

表八、控制飼料與山藥飼料對小鼠相對器官重之影響<sup>1,2</sup>

Table 8. Effects of control and yam diets on relative organ weight in *BALB/c* mice.<sup>1,2</sup>

	Control	Purpurea	Tainung No.2	Keelung
			%	
Stomach	0.45 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.48 ± 0.06	0.49 ± 0.04
Small Intestine	3.26 ± 0.33	3.24 ± 0.38	3.42 ± 0.38	3.06 ± 0.27
Cecum	0.30 ± 0.10	0.30 ± 0.10	0.40 ± 0.10	0.30 ± 0.04
Colon	0.62 ± 0.11	0.71 ± 0.08	0.68 ± 0.09	0.73 ± 0.10
Heart	0.56 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.04	0.57 ± 0.02
Liver	5.75 ± 4.63 <sup>a</sup>	5.00 ± 5.35 <sup>ab</sup>	5.50 ± 5.35 <sup>ab</sup>	4.75 ± 7.07 <sup>*,b</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as means ± SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $p \leq 0.01$ ).

<sup>2</sup>Data are expressed as means ± SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

Relative weight (%) = organ weight (g) / final body weight (g) × 100

## 第四節 山藥水萃取物對小鼠脂質之影響

### 一、控制飼料與山藥飼料對血脂的影響

各山藥組小鼠之血脂數值普遍顯著性低於控制組 (表九)。在血膽固醇方面，各山藥組顯著低於控制組 ( $p \leq 0.01$ )，其中以基隆山藥組降血膽固醇幅度最大；基隆山藥組之 HDL-膽固醇顯著低於其他組別 ( $p < 0.01$ )；各山藥組之 (VLDL+LDL)-膽固醇顯著低於控制組 ( $p \leq 0.01$ )。在三酸甘油酯方面，民間長紅和基隆山藥組顯著低於控制組和台農二號組 ( $p \leq 0.01$ )；台農二號和基隆山藥組之磷脂質顯著低於控制組 ( $p < 0.01$ )；各山藥組之粥狀動脈硬化指數顯著低於控制組 ( $0.01 \leq p < 0.05$ )。

表九、控制飼料與山藥飼料對小鼠血脂之影響<sup>1,2</sup>

Table 9. Effects of control and yam diets on plasma lipid concentration in *BALB/c* mice.<sup>1,2</sup>

	Control	Purpurea	Tainung No.2	Keelung
	mmole/L			
Cholesterol				
Total	4.28 ± 0.21 <sup>a</sup>	3.86 ± 0.10 <sup>*,b</sup>	3.92 ± 0.21 <sup>*,b</sup>	3.58 ± 0.06 <sup>*,c</sup>
HDL	0.97 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.01 <sup>*,b</sup>
VLDL+LDL	3.33 ± 0.18 <sup>a</sup>	2.83 ± 0.11 <sup>*,b</sup>	2.96 ± 0.24 <sup>*,b</sup>	2.65 ± 0.06 <sup>*,b</sup>
Triacylglycerol	1.90 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.08 <sup>*,b</sup>	1.90 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.32 ± 0.01 <sup>*,c</sup>
Phospholipid	3.75 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.63 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.50 ± 0.14 <sup>*,b</sup>	3.52 ± 0.00 <sup>*,b</sup>
Atherogenic Index <sup>3</sup> (%)	3.45 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.93 ± 0.12 <sup>*,b</sup>	3.12 ± 0.33 <sup>*,b</sup>	2.93 ± 0.11 <sup>*,b</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as means ± SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison, \* mean significant different ( $0.01 \leq p < 0.05$ ).

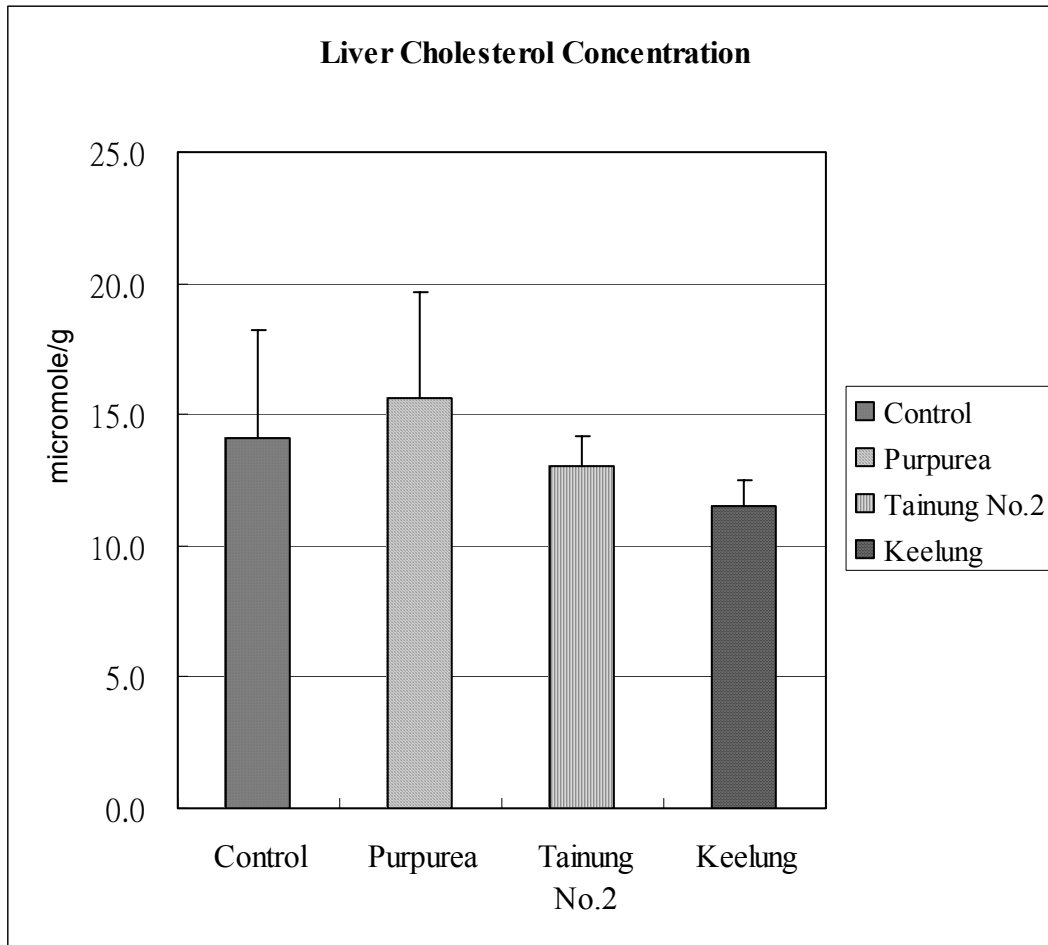
<sup>2</sup>Data are expressed as means ± SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

<sup>3</sup>Atherogenic index (%) = (VLDL + LDL)-cholesterol / HDL- cholesterol × 100



## 二、控制飼料與山藥飼料對肝臟脂質的影響

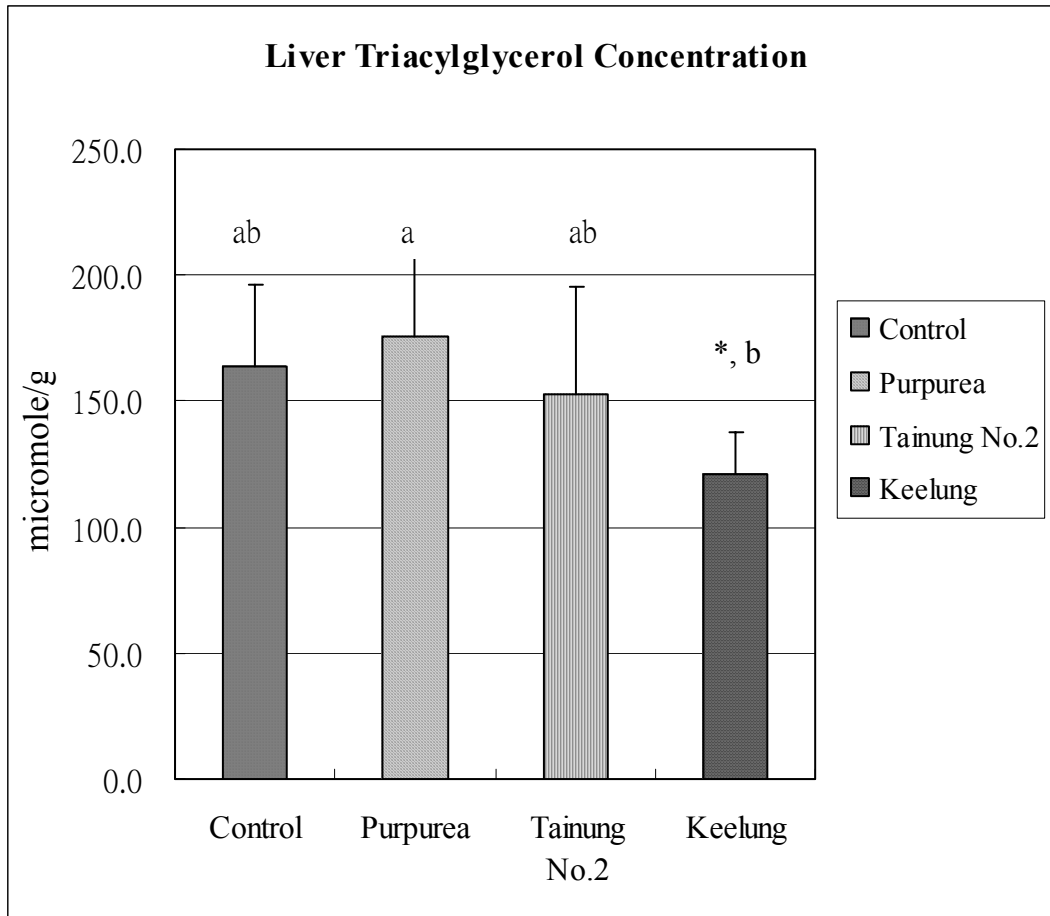
控制組、民間長紅、台農二號及基隆山藥組之肝臟膽固醇濃度(圖三)分別為  $14.13 \pm 4.0$ 、 $15.55 \pm 4.08$ 、 $12.94 \pm 1.15$  及  $11.5 \pm 1.02$   $\mu\text{mole/g}$ ，控制組與山藥組間無顯著差異。在三酸甘油酯濃度方面，各組分別是  $164.01 \pm 32.15$ 、 $175.85 \pm 33.15$ 、 $153.04 \pm 42.06$  及  $121.21 \pm 16.46$   $\mu\text{mole/g}$  (圖四)，只有基隆山藥組的三酸甘油酯濃度顯著低於控制組 ( $p=0.022$ )；在各山藥組間之差異上，基隆山藥組顯著低於民間長紅組 ( $p=0.04$ )。磷脂質濃度分別為  $33.41 \pm 9.45$ 、 $28.64 \pm 7.09$ 、 $29.14 \pm 11.96$  及  $26.54 \pm 7.26$   $\mu\text{mole/g}$  (圖五)，組間無顯著差異。



圖三、控制飼料與山藥飼料對肝臟膽固醇濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 3. Effects of control and yam diets on liver cholesterol concentration.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as means  $\pm$  SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

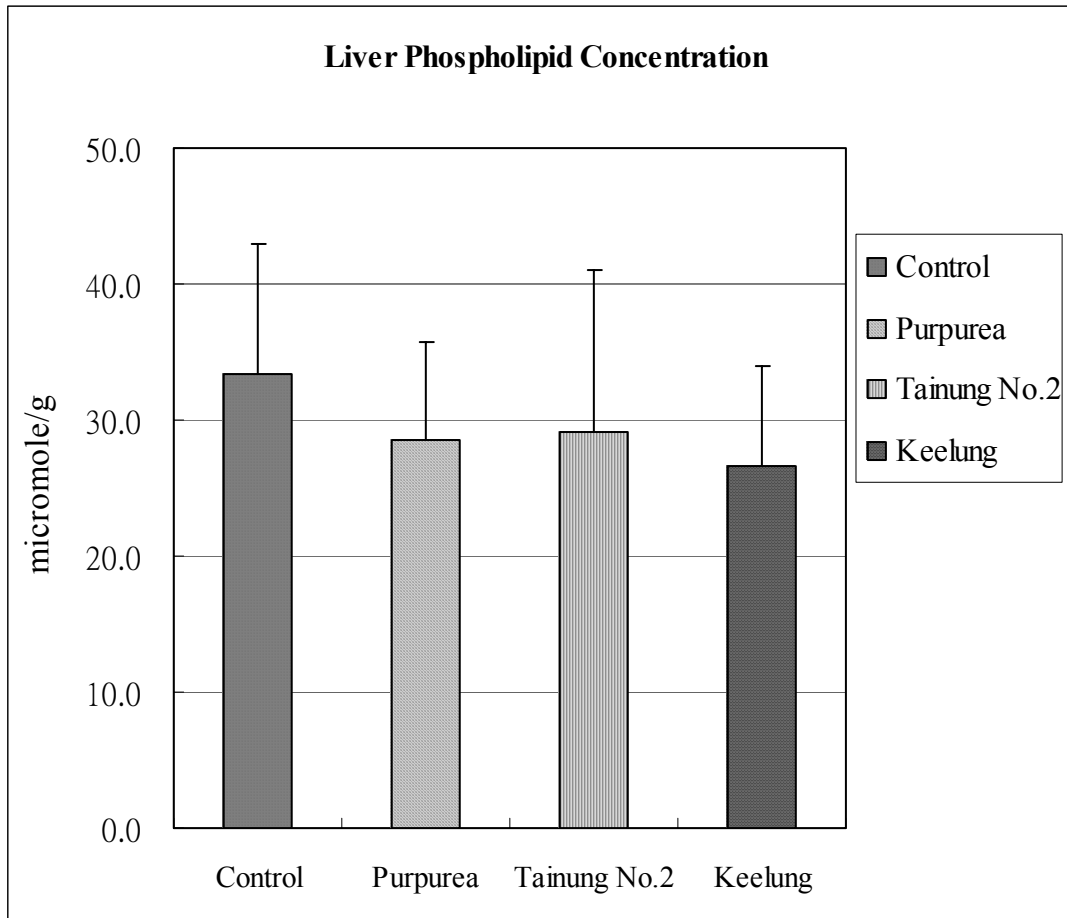


圖四、控制飼料與山藥飼料對肝臟三酸甘油酯濃度之影響<sup>1,2</sup>

Figure 4. Effects of control and yam diets on liver triacylglycerol concentration.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Data are expressed as means  $\pm$  SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $0.01 \leq p < 0.05$ ).

<sup>2</sup> Data are expressed as means  $\pm$  SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's test.



圖五、控制飼料與山藥飼料對肝臟磷脂質濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 5. Effects of control and yam diets on liver phospholipid concentration<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Data are expressed as mean  $\pm$  SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

### 三、中性固醇排出量

控制組、民間長紅、台農二號及基隆山藥組小鼠每天中性固醇排出量及每克糞便中中性固醇含量，組間並無顯著差異（表十）。

## 第五節、山藥水萃取物對小鼠之腸道效應

### 一、糞便乾濕重、濕份及糞便粒數之影響

民間長紅、台農二號及基隆山藥組小鼠之糞便重量、濕份及糞便粒數與控制飲食相較有偏高趨勢（表十），其中只有民間長紅組之糞便粒數顯著性高於控制組（ $P=0.03$ ）。山藥組之間的糞便重量、濕份及糞便粒數則無顯著差異。

表十、控制飼料與山藥飼料對小鼠糞便重量、濕份、糞便粒數及中性固醇之影響<sup>1,2</sup>

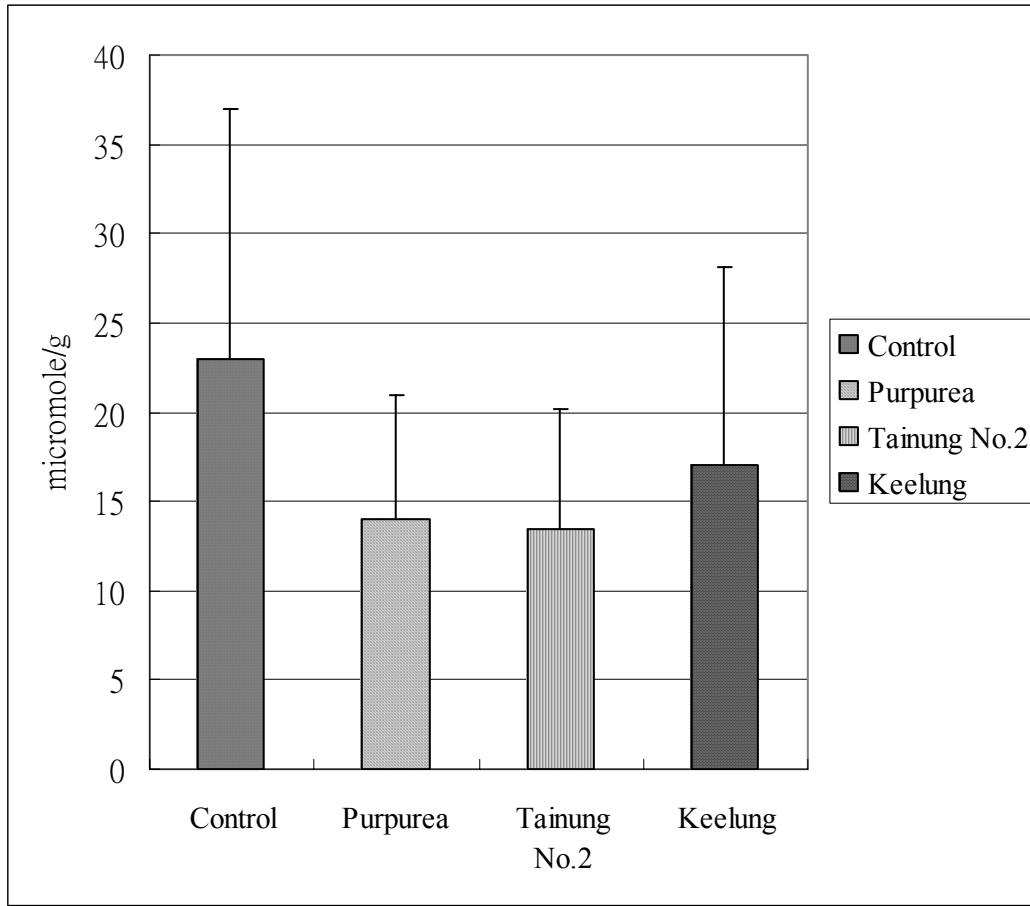
Table 10. Effects of control and yam diets on fecal weight, moisture content, pellet and neutral sterol in *BALB/c* mice.<sup>1,2</sup>

	Control	Purpurea	Tainung No.2	Keelung
Fresh fecal weight (g/d)	0.83 ± 0.20	1.09 ± 0.23	1.05 ± 0.22	1.03 ± 0.34
Dry fecal weight (g/d)	0.38 ± 0.05	0.45 ± 0.07	0.46 ± 0.06	0.43 ± 0.06
Fecal moisture (%)	52.84 ± 0.06	57.23 ± 0.05	54.92 ± 0.08	55.87 ± 0.09
Fecal pellet (per day)	67.42 ± 9.34	88.71 ± 15.48*	86.04 ± 16.68	78.88 ± 20.55
Neutral sterol				
mmole/g dry feces	0.046 ± 0.006	0.041 ± 0.002	0.041 ± 0.004	0.045 ± 0.004
mmole/d dry feces	0.017 ± 0.003	0.019 ± 0.002	0.018 ± 0.003	0.018 ± 0.003

<sup>1</sup> Data are expressed as means ± SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $0.01 \leq p < 0.05$ ).

## 二、控制飼料與山藥飼料對盲腸短鏈脂肪酸濃度之影響

控制組、民間長紅、台農二號及基隆山藥組小鼠每克盲腸內容物之乙酸含量 (圖六) 分別是  $23.0 \pm 14.0$ 、 $14.0 \pm 7.0$ 、 $13.5 \pm 6.7$  和  $17.0 \pm 11.2 \mu\text{mole/g}$ ，組間無顯著差異；控制組丙酸含量低於內標準品，各山藥組分別是  $2.0 \pm 1.0$ 、 $1.8 \pm 0.9$  和  $2.0 \pm 1.0 \mu\text{mole/g}$  (圖七)；控制組和民間長紅組之丁酸含量低於內標準品，台農二號組及基隆山藥組分別是  $1.4 \pm 0.7$  和  $2.5 \pm 1.7 \mu\text{mole/g}$  (圖八)。總短鏈脂肪酸含量各組分別是  $23 \pm 14$ 、 $16 \pm 8$ 、 $16 \pm 8$  和  $22 \pm 14 \mu\text{mole/g}$  (圖九)，組間無顯著差異。



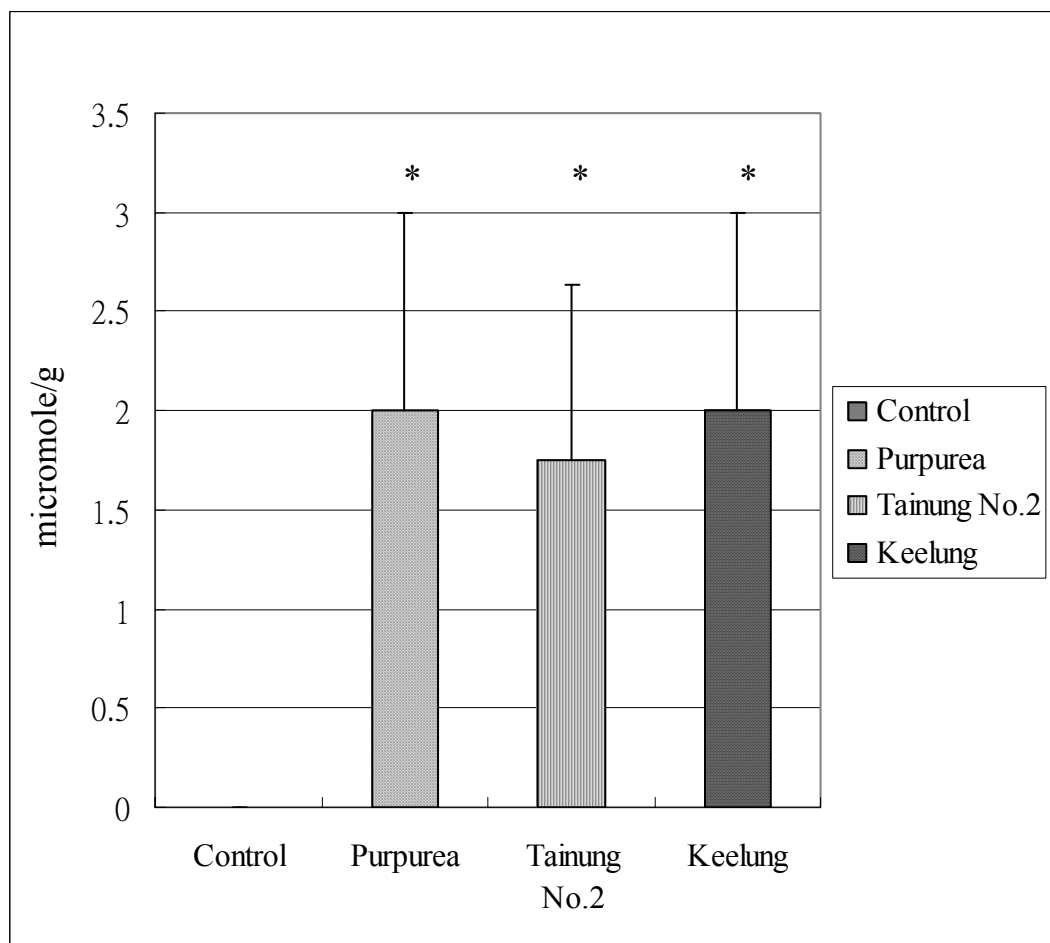
圖六、控制飼料與山藥飼料對盲腸乙酸濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 6. Effects of control and yam diets on acetate concentration of cecal content.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Data are expressed as mean  $\pm$  SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.



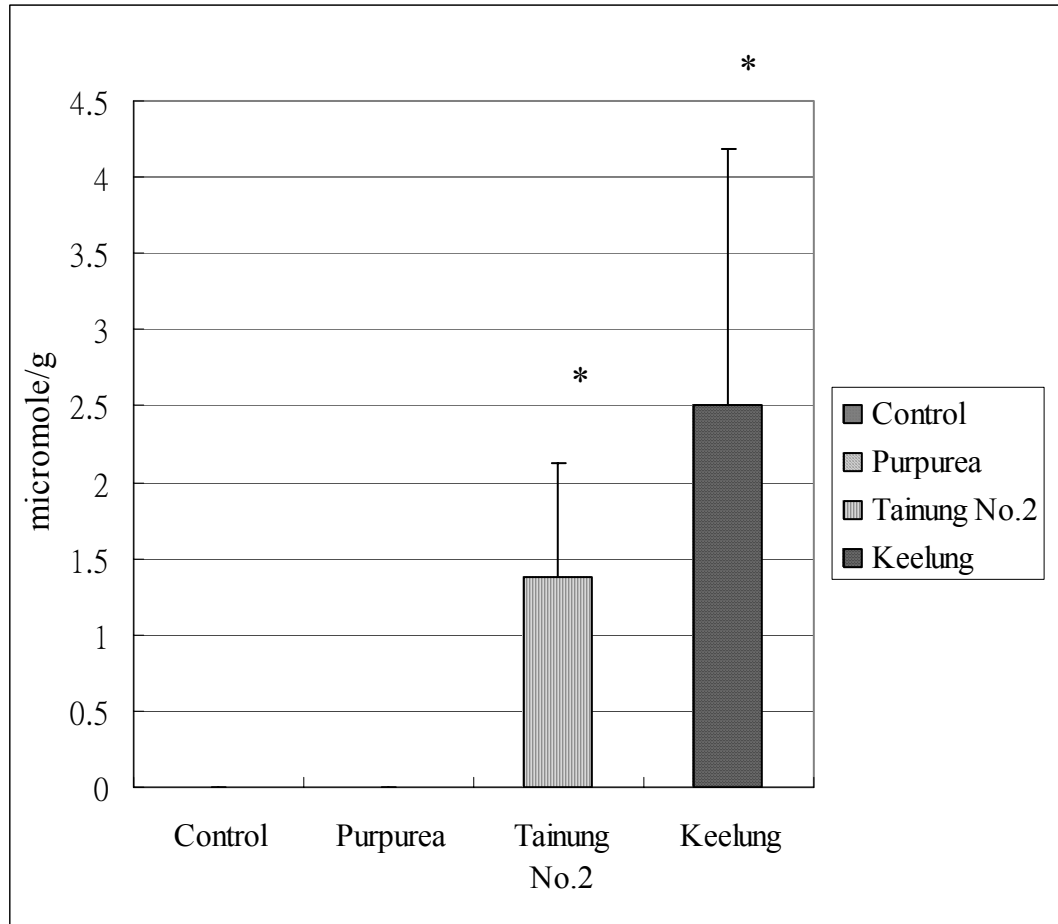




圖七、控制飼料與山藥飼料對盲腸丙酸濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 7. Effects of control and yam diets on propionate concentration of cecal content.<sup>1</sup>

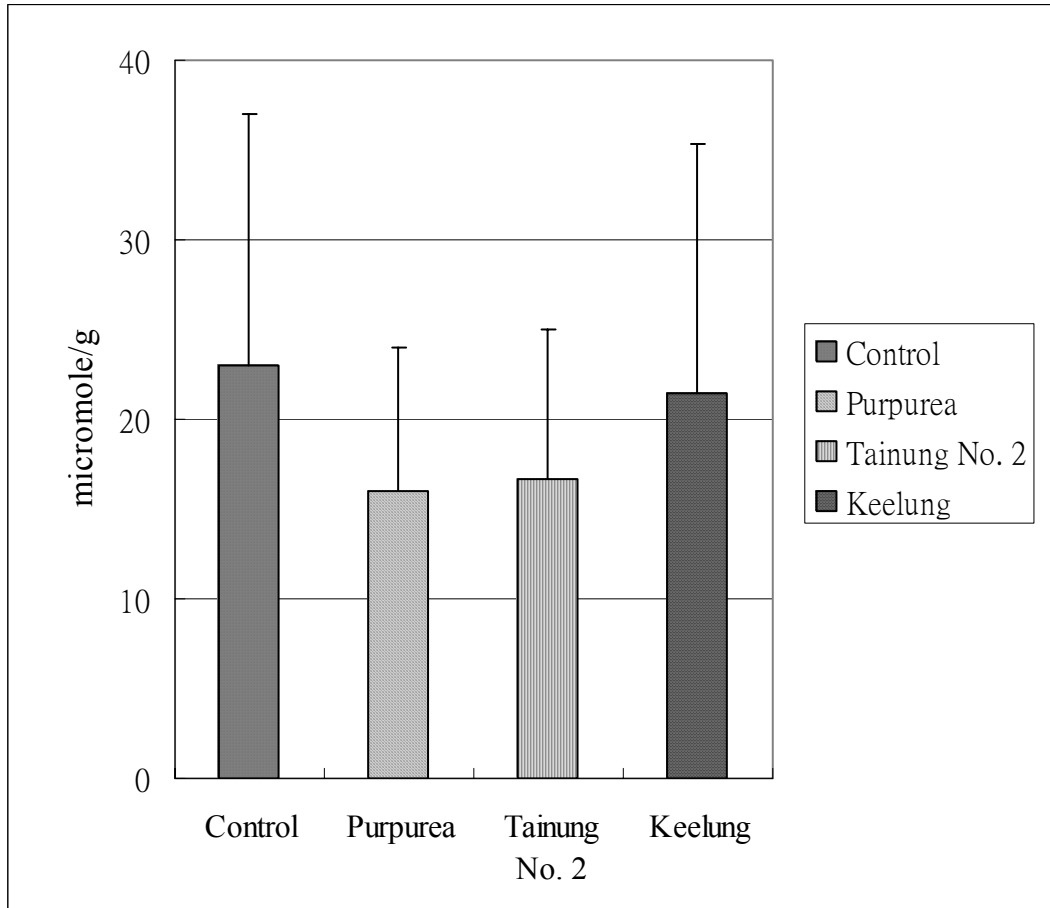
<sup>1</sup>Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $p < 0.05$ ).



圖八、控制飼料和山藥飼料對盲腸正丁酸濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 8. Effects of control and yam diets on n-butyrate concentration of cecal content.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $p < 0.05$ ).



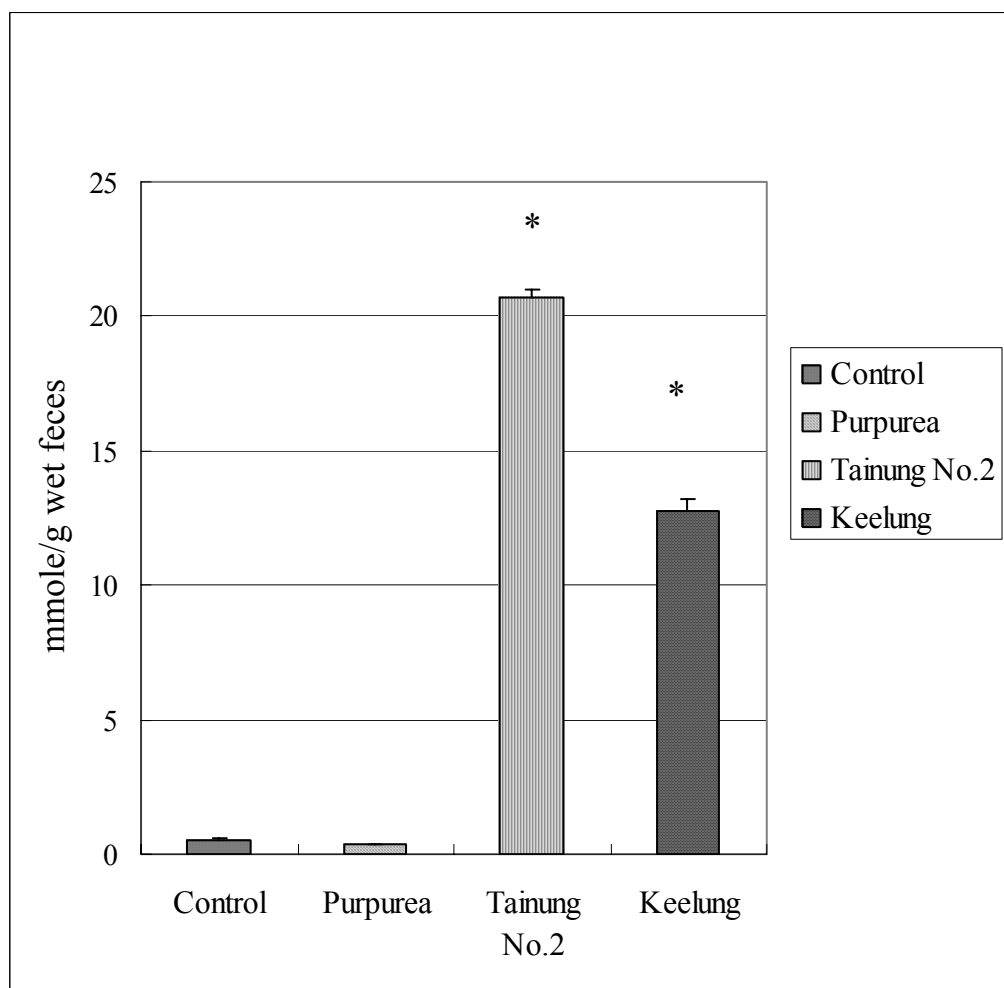
圖九、控制飼料與山藥飼料對盲腸總短鏈脂肪酸濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 9. Effects of control and yam diets on total short fatty acid concentration of cecal content.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as mean  $\pm$  SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

### 三、控制飼料與山藥飼料對糞便短鏈脂肪酸濃度之影響

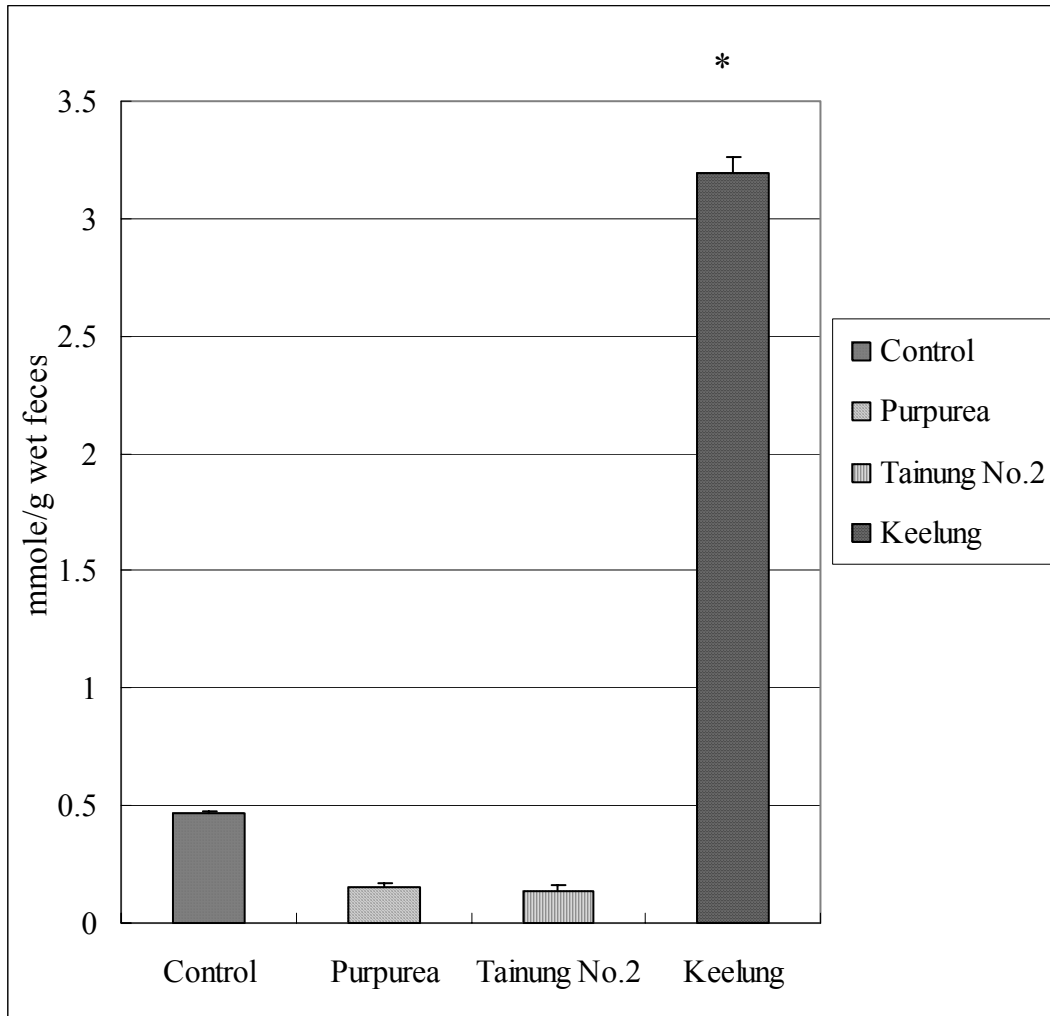
控制組、民間長紅、台農二號及基隆山藥組小鼠每克濕糞便之乙酸濃度分別是  $0.51 \pm 0.10$ 、 $0.40 \pm 0.01$ 、 $20.68 \pm 0.31$  和  $12.75 \pm 0.43$  mmole/g (圖十)，台農二號組和基隆山藥組顯著高於控制組；丙酸濃度分別是  $0.47 \pm 0.15$ 、 $0.15 \pm 0.02$ 、 $0.14 \pm 0.02$  和  $3.20 \pm 0.07$  mmole/g，基隆山藥組顯著高於控制組 (圖十一)；正丁酸濃度分別是  $0.06 \pm 0.01$ 、 $0.12 \pm 0.01$ 、 $0.10 \pm 0.02$  和  $1.24 \pm 0.02$  mmole/g，基隆山藥組顯著高於控制組 (圖十二)。總短鏈脂肪酸濃度分別是  $1.04 \pm 0.12$ 、 $0.67 \pm 0.04$ 、 $20.92 \pm 0.35$  和  $17.18 \pm 0.52$  mmole/g (圖十三)，台農二號組和基隆山藥組顯著高於控制組。



圖十、控制飼料與山藥飼料對糞便乙酸濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 10. Effects of control and yam diets on acetate concentration of fecal.<sup>1</sup>

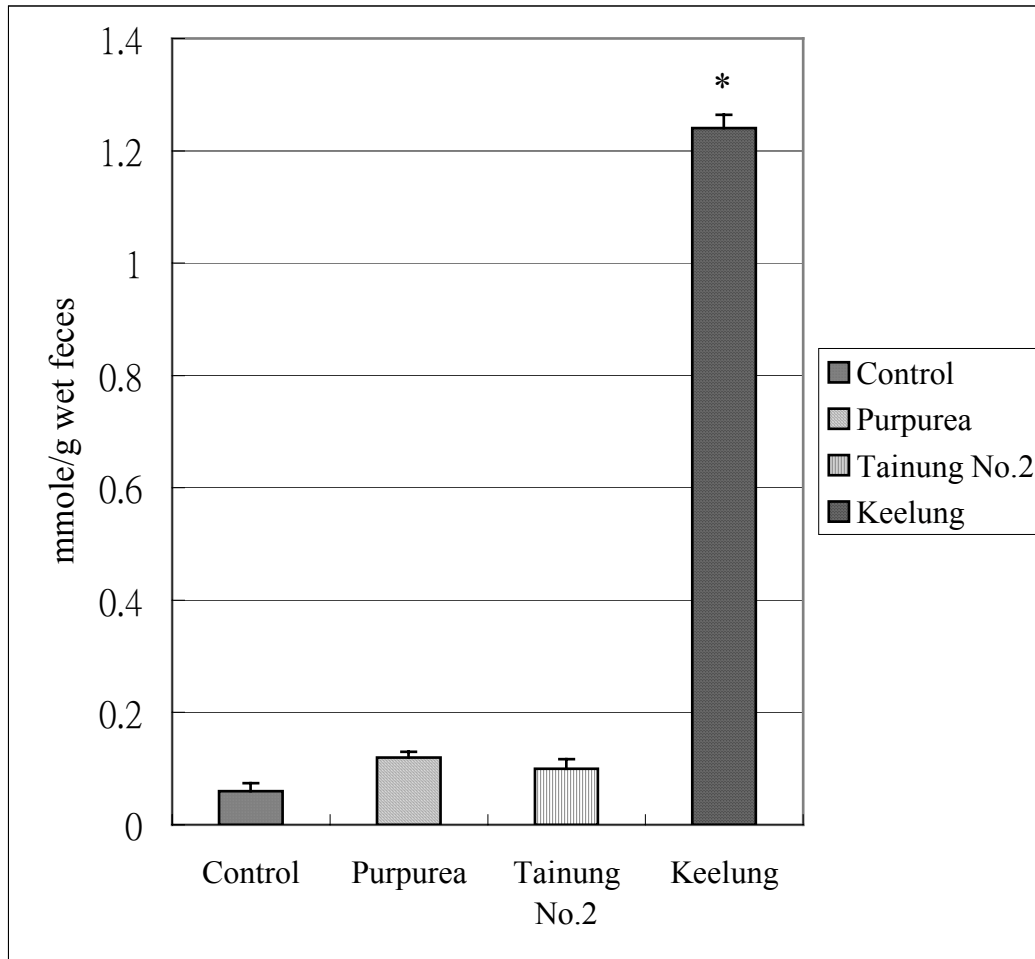
<sup>1</sup>Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $p < 0.05$ ).



圖十一、控制飼料與山藥飼料對糞便丙酸濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 11. Effects of control and yam diets on propionate concentration of fecal.<sup>1</sup>

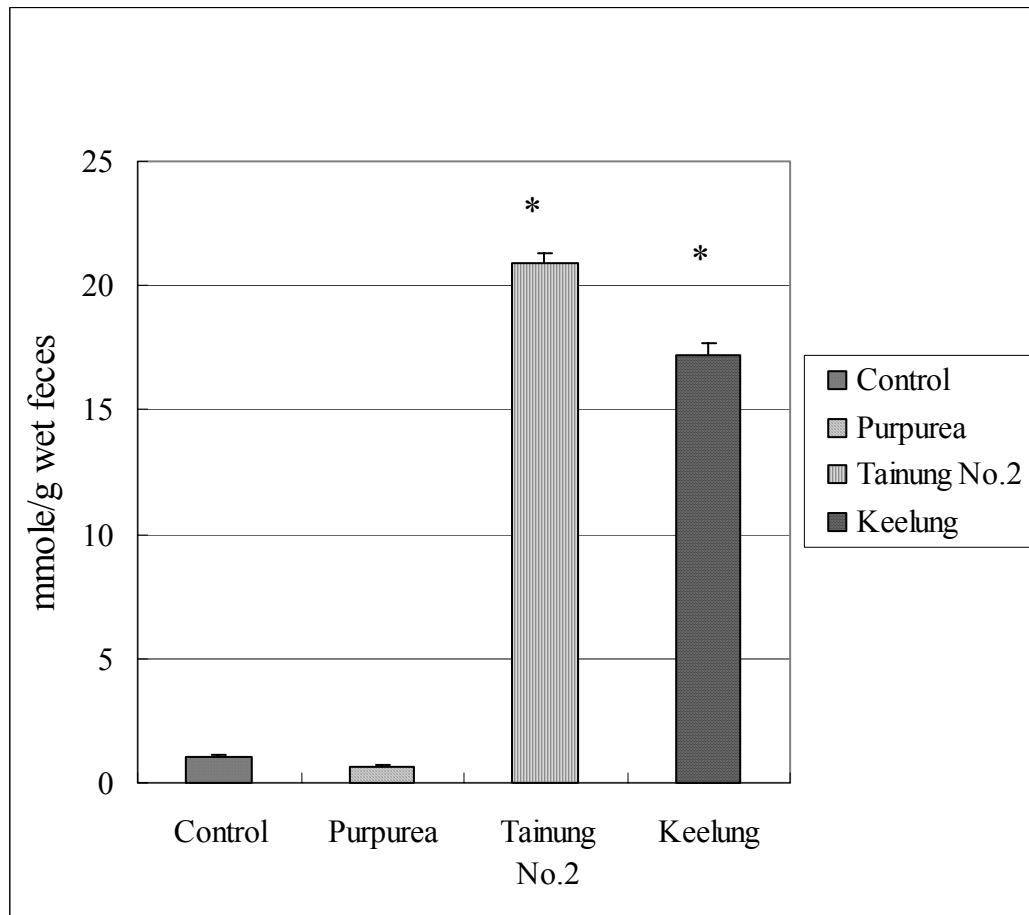
<sup>1</sup>Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $p < 0.05$ ).



圖十二、控制飼料與山藥飼料對糞便正丁酸濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 12. Effects of control and yam diets on fecal n-butyrate concentration.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $p < 0.05$ ).



圖十三、控制飼料與山藥飼料對糞便總短鏈脂肪酸濃度之影響<sup>1</sup>

Figure 13. Effects of control and yam diets on total short chain fatty acid of fecal.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Different superscript letters denote significant differences across group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test, control group as comparison. \* denotes for significant difference ( $p < 0.05$ ).

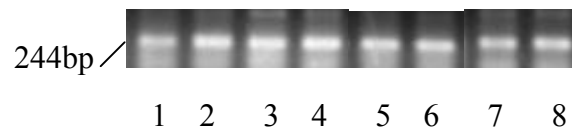
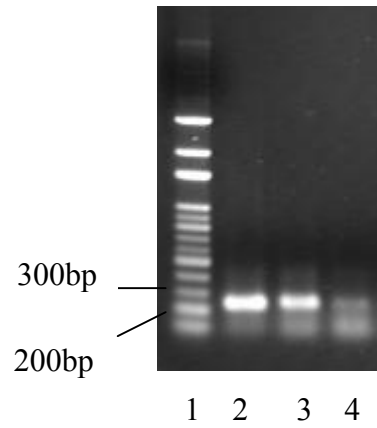


#### 四、糞便中 *Bifidobacterium longum* 及 *Clostridium perfringens* 菌數

以 PCR 技術定量 *Bifidobacterium longum* 和及 *Clostridium perfringens* 之菌數，其 PCR 產物之表現隨不同稀釋倍數而遞減，並且樣品之 DNA 表現量介於外標準品範圍內（圖十四和十六）。

控制組、民間長紅、台農二號及基隆山藥組小鼠每克糞便乾重之 *Bifidobacterium longum* 含量分別是  $1.8E+05$ 、 $7.6E+04$ 、 $1.9E+05$  及  $7.1E+04$  CFU/g（圖十五），另計算每克濕糞便之 *Bifidobacterium longum* 含量分別是  $8.6E+04$ 、 $3.3E+04$ 、 $7.6E+04$  及  $3.0E+04$  CFU/g。

各組小鼠每克糞便乾重之 *Clostridium perfringens* 含量分別是  $1.08E+09$ 、 $8.58E+08$ 、 $8.73E+08$  和  $2.93E+08$  CFU/g（圖十七）。每克濕糞便含量分別是  $4.99E+08$ 、 $3.47E+08$ 、 $3.79E+08$  及  $1.71E+08$  CFU/g。

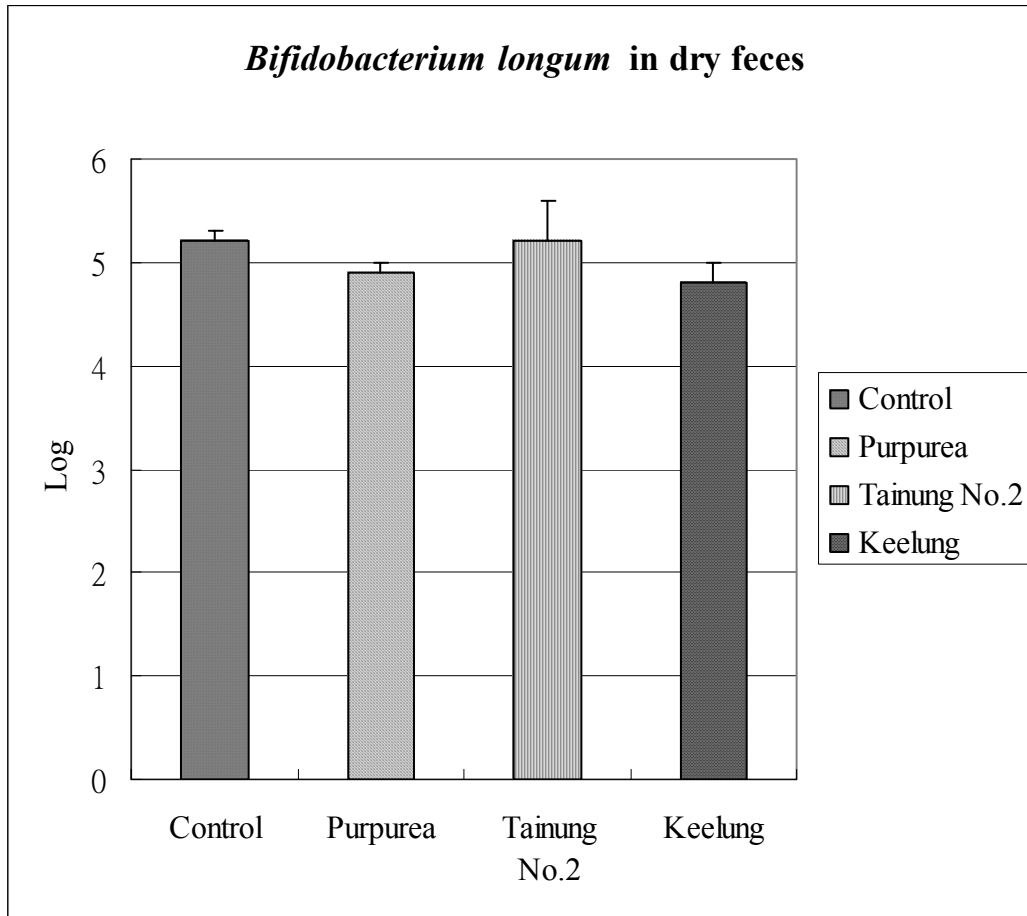


圖十四、*Bifidobacterium longum* 之 PCR 表現

Figure 14. *Bifidobacterium longum* of PCR expression

上圖為 *Bifidobacterium longum* 純菌之 PCR 表現，作為外標準品，產物為 244 bp，lane 1 為 Marker；lane 2 為原倍 DNA，lane 3 為稀釋 10 倍，lane 4 為稀釋  $10^2$  倍。

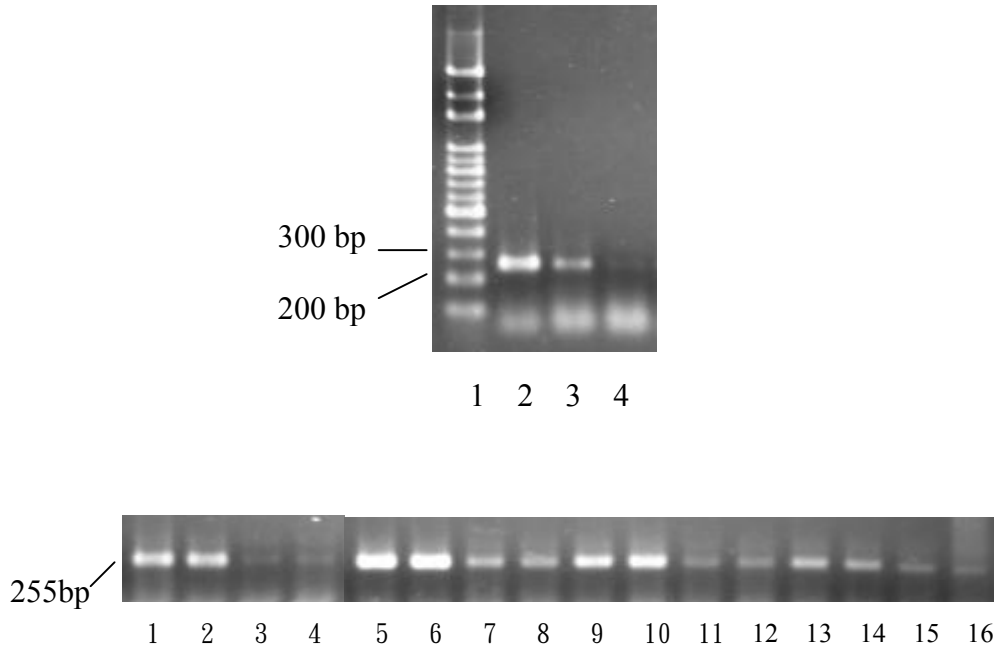
下圖為小鼠糞便樣品中 *Bifidobacterium longum* 之 PCR 表現。lane 1-2 為控制組；3-4 為台農二號組；5-6 為民間長紅組；7-8 為基隆山藥組 DNA 在原倍時的 PCR 表現。



圖十五、每克乾燥糞便中 *Bifidobacterium longum* 菌數<sup>1</sup>

Figure 15. *Bifidobacterium longum* content in dried feces (unit : log CFU/g)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as mean ± SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

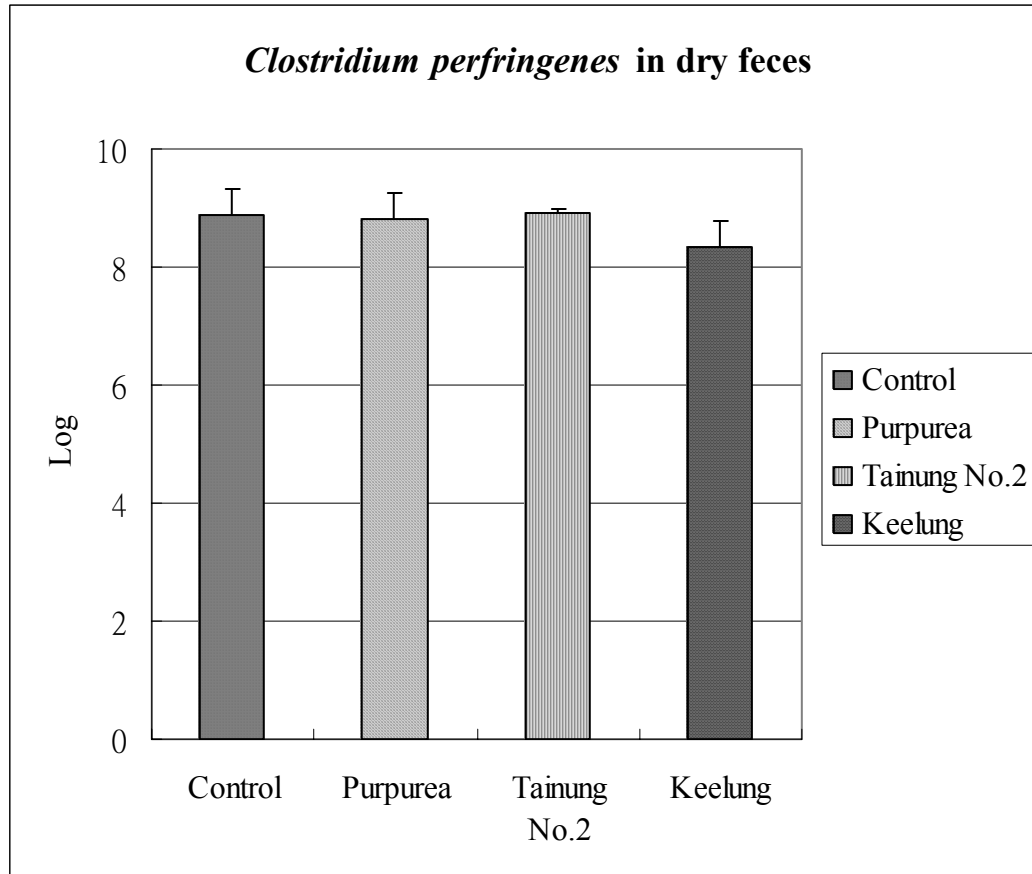


圖十六、*Clostridium perfringens* 之 PCR 表現

Figure 16. *Clostridium perfringens* of PCR expression

上圖為 *Clostridium perfringens* 已知菌數之 PCR 表現。作為外標準品，產物為 255 bp，lane 1 為 Marker；lane 2、3 和 4 為已知菌數 *Clostridium perfringens* DNA 稀釋 10、100 和 1000 倍之 DNA 表現。

下圖為 *Clostridium perfringens* 小鼠糞便樣品之 PCR 表現。lane 1-2 為控制組稀釋  $10^3$  倍，lane 3-4 為稀釋  $10^4$  倍；lane 5-6 為台農二號組稀釋  $10^3$  倍，lane 7-8 為稀釋  $10^4$  倍；lane 9-10 為基隆山藥組稀釋  $10^3$  倍，lane 11-12 為稀釋  $10^4$  倍；lane 13-14 為民間長紅組稀釋稀釋  $10^3$  倍，lane 15-16 為稀釋  $10^4$  倍。



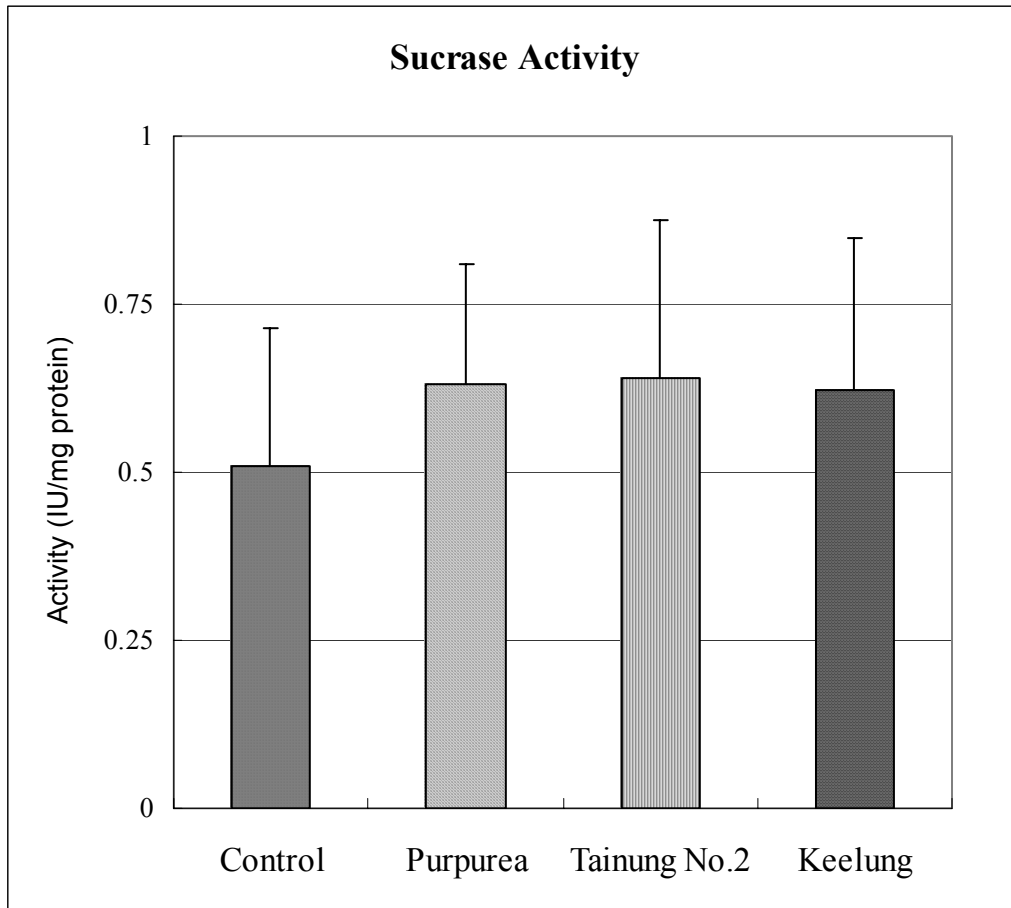
圖十七、每克乾燥糞便中 *Clostridium perfringens* 菌數<sup>1</sup>

Figure 17. *Clostridium perfringens* content in dried feces (unit : log CFU/g)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as mean ± SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

## 五、小腸黏膜之消化酵素活性

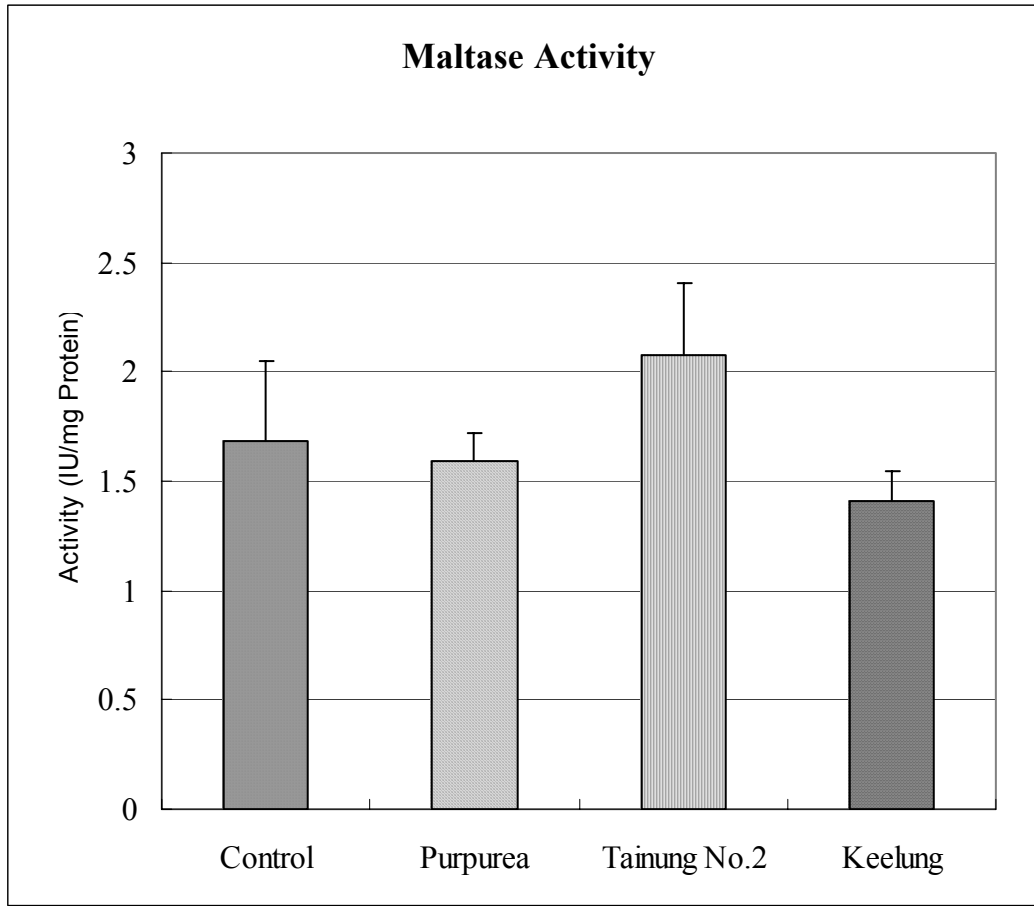
檢測小鼠小腸黏膜之消化酵素活性包括蔗糖酶 (圖十八)、麥芽糖酶 (圖十九) 及白胺酸胺基胜肽酶 (圖二十)。控制組、民間長紅、台農二號及基隆山藥組之蔗糖酶活性分別是  $0.51 \pm 0.20$ 、 $0.63 \pm 0.18$ 、 $0.64 \pm 0.23$  及  $0.62 \pm 0.23$  IU/mg protein；麥芽糖酶活性分別是  $1.68 \pm 0.37$ 、 $1.59 \pm 0.13$ 、 $2.08 \pm 0.33$  及  $1.41 \pm 0.14$  IU/mg protein；白胺酸胺基胜肽酶活性分別是  $31.93 \pm 5.45$ 、 $36.64 \pm 7.94$ 、 $32.27 \pm 7.96$  及  $34.7 \pm 6.75$  IU/mg protein。各山藥組與控制組之間皆無顯著差異。



圖十八、小腸黏膜之蔗糖酶活性<sup>1</sup>

Figure 18. Sucrase activity in intestine mucosa cells.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as mean  $\pm$  SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

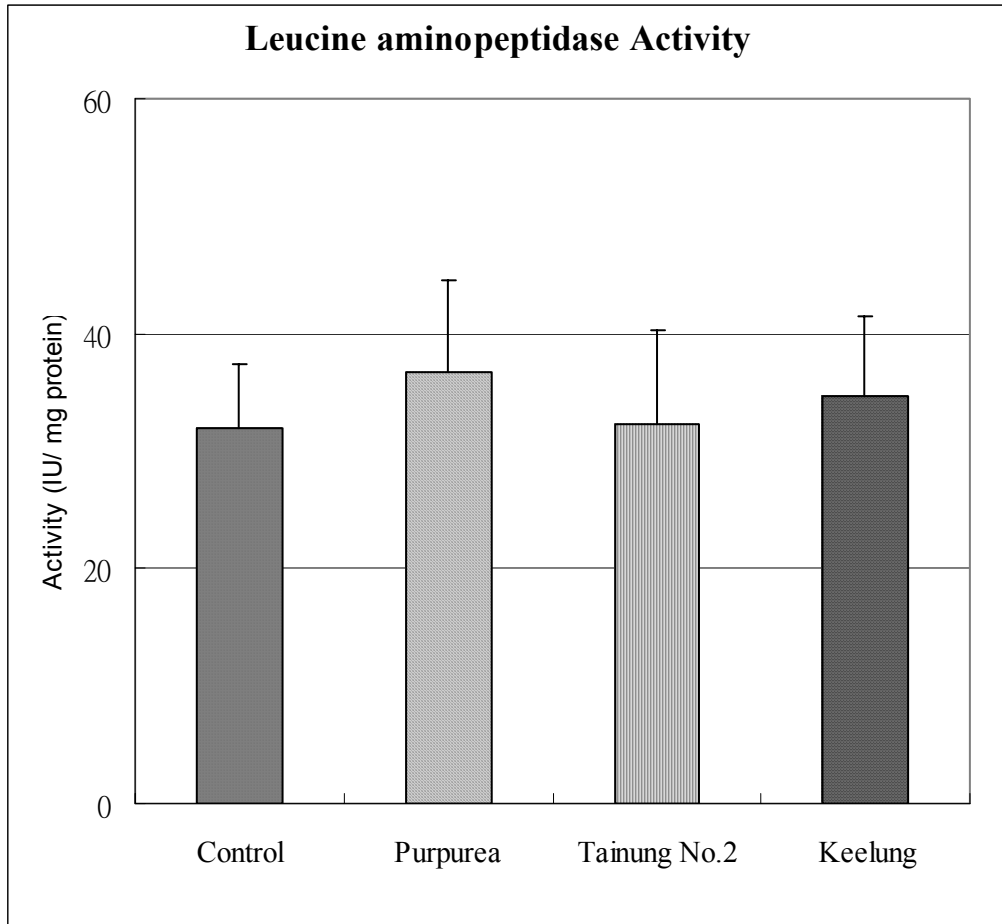


圖十九、小腸黏膜之麥芽糖酶活性<sup>1</sup>

Figure 19. Maltase activity in the intestine mucosa cells.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as mean  $\pm$  SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.





圖二十、小腸黏膜之白胺酸胺基胜肽酶活性<sup>1</sup>

Figure 20. Leucine aminopeptidase activity in intestine mucosa cells.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Data are expressed as mean  $\pm$  SD. No significant difference was found from the control group as analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

## 第五章 討論

### 第一節、飼料營養成分之探討

AIN-93 diet 所含 cellulose 屬不溶性纖維，主要生理功能在於增加糞便實體，不具有降血脂功能，因此作為控制飲食。由於山藥在許多地區常被當作是主食，並且飲食代換表 (Exchange list) 中被歸類為主食類，因此將山藥水萃取物之凍乾粉取代控制 AIN-93 diet 中 5% 澱粉，山藥中的黏液質含水溶性纖維，因此，控制組與山藥組飼料主要差別是山藥組飼料中多了 2% 水溶性纖維成分，其他成分為山藥所含單糖分子、胺基酸、灰份和少許的脂肪和結合水。民間長紅、台農二號和基隆山藥組飼料之總膳食纖維含量比控制組高出 1.39、1.36 和 1.42 倍，另以小鼠每日飼料總攝食量推算總膳食纖維之實際攝取量可知，各山藥組小鼠的總膳食纖維淨攝取量分別是控制組的 1.48、1.46 和 1.55 倍，相對的水溶性纖維實際攝取量則以基隆山藥組為高。在另一方面，山藥萃取物富含成長所需的必須胺基酸，主要是麩胺酸<sup>(14)</sup>，因此實驗組飼料成分中，蛋白質比例較高，為可能造成飼料效應上升的原因之一。

### 第二節、山藥飼料對小鼠脂質之影響

Araghiniknam 等人實驗結果指出給予老人 (65-82 years) 補充含山藥萃取物 (90% ) 之膠囊，為期三週，結果顯示受試者血清脂質過氧化值、三酸甘油酯及磷脂質濃度顯著性降低，並且可增加 HDL-膽固醇含量，具有調節血清脂質濃度的功能<sup>(65)</sup>。在動物實驗中，同時給予高膽固醇飲食和 Diosgenin 時，血膽固醇明顯被降低<sup>(11)</sup>。亦有研究指出山藥中的 Diosgenin 成分可增加中性固醇排出，具有降血脂功效，但不影響肝臟膽固醇和磷脂質含量<sup>(10,12,66)</sup>。由前人研究得知，脂溶性 Diosgenin 成份之降血脂效應與山藥水萃取物相似，然而，Diosgenin 為去掉糖基的脂溶性物質，並且本實驗是以水萃取山藥，糞便中性固醇的排出亦無明顯差異，因此可排除 Diosgenin 的作用。

實驗設計將 5% 山藥水萃取物取代控制飲食中玉米澱粉，因此，山藥組飼料中多了水溶性膳食纖維的成份。研究指出，水溶性膳食纖維可降低血中膽固醇及 LDL-膽固醇含量<sup>(36,67,68)</sup>。本實驗結果顯示三種山藥水萃取物皆能顯著降低血清總膽固醇、(VLDL+LDL)-膽固醇及粥狀動脈硬化指標，可能原因有二，其一是具黏性的黏液質降低小腸黏膜液體層的流動<sup>(37)</sup>，阻礙膽固醇與小腸絨毛接觸的機會，降低膽固醇的吸收，增加膽固醇的汰換 (turnover)，使血中膽固醇含量降低。雖然基隆山藥組小鼠血清 HDL-膽固醇顯著性被降低，然

而，以粥狀動脈硬化指標而言，基隆山藥水萃取物與其他山藥水萃取物同樣顯著性低於控制組，因此，基隆山藥水萃取物並不會影響心血管疾病。另一可能原因為丙酸參與降血脂作用，Christian 等人指出水溶性纖維發酵可產生短鏈脂肪酸，其中的丙酸具有影響肝臟 HMG-CoA reductase 活性，並降低脂肪酸合成的作用<sup>(43,69,70)</sup>。分析結果得知，各山藥組小鼠之盲腸內容物中丙酸濃度顯著高於控制組，在糞便中則是基隆山藥組，以降血脂成效而言，基隆山藥組降血膽固醇和三酸甘油酯的幅度最大，因此，各山藥所含水溶性纖維可被腸道細菌利用，其發酵產生的丙酸可能參與降血脂作用。由飼料水溶性纖維含量、血脂、肝脂、和腸道丙酸濃度之分析結果可解釋基隆山藥水萃取物降血脂之最大功效。

在肝臟脂質方面，只有基隆山藥組小鼠之三酸甘油酯含量顯著低於控制組，膽固醇和磷脂質含量偏低但無顯著性差異，這樣的結果同時反應於基隆山藥組小鼠之肝臟和肝臟相對器官重量上，推測肝臟重量低於控制組為三酸甘油酯降低的原因之一。

### 第三節、山藥飼料對小鼠之腸道效應

#### 一、糞便重量、水份及排便頻率分析

細菌利用糞便中的蛋白質所產生的含氮廢物，在腸道堆積會造成結腸細胞受損。實驗結果發現民間長紅組小鼠排便頻率顯著高於

控制組，顯示民間長紅水萃物可縮短腸道的過渡時間，增加排便頻率，可能原因為民間長紅所含水溶性纖維與水結合能力較高，使糞便較為濕潤，為增加排便頻率的原因之一。各山藥組小鼠之糞便濕重、水分含量及排便頻率有高於控制組的趨勢，顯示各山藥品系所含水溶性纖維成份可能具有潤腸通便的效果，其中以民間長紅品系最為顯著。由實驗結果推測，山藥所含水溶性纖維具吸附水分的能力，可稀釋腸中有毒物質並軟化糞便，減少有害物質與腸黏膜接觸機會，降低結腸癌的罹患率。

糞便組成包括未被消化的營養素、水、細菌、膳食纖維和腸道剝落的黏膜細胞等。研究指出水溶性纖維可作為結腸細菌受質，提高糞便中的菌量，進而增加糞便重<sup>(71,72)</sup>。實驗結果顯示，各山藥組小鼠糞便乾重雖然沒有顯著性增加，但卻有偏高的趨勢呈現，因此推測各山藥水萃物可能為結腸細菌良好受質。

## 二、糞便菌數分析

人類胃腸道微生物在健康及營養上扮演一個重要的角色，*Bifidobacteria* 屬益菌之指標。根據衛生署所訂定健康食品之胃腸道功能改善評估方法指出，若盲腸或糞便中的 *Bifidobacteria* 明顯增加，以及 *Clostridium perfringens* 減少或無明顯變化者，則稱之具改善腸內菌相功能。本實驗以 PCR 技術分析 *Bifidobacteria* 中的

*Bifidobacterium longum* 菌種之 DNA 含量，實驗結果顯示控制組小鼠每克濕糞便所含菌數比山藥組高，但若以乾糞便推算糞便 *Bifidobacterium longum* 菌數則以台農二號組最高，可能原因為水份稀釋了糞便中 *Bifidobacterium longum* 菌數，然而，在統計上組間並無顯著差異。控制組小鼠糞便中 *Clostridium perfringens* 菌數在乾重或濕重上都有偏高趨勢，但組間無顯著差異。推測台農二號水草物可能為結腸中 *Bifidobacterium longum* 所利用。然而，*Clostridium perfringens* 對山藥水草物的利用情形稍減少。

傳統鑑定糞便細菌方法是以選擇性培養基定量細菌，然而這樣的方法有許多的缺點，例如耗費人力、時間、只能定量活菌和無法專一性鑑定菌種等問題，因此本實驗參考前人的方法，利用 PCR 技術定量糞便中的專一菌種 *Bifidobacterium longum* 及 *Clostridium perfringens*。由於 *Bifidobacterium longum* 之 DNA 序列與 *Bifidobacterium adolescentis* 接近，因此實驗以 *Bifidobacterium longum* 純菌之 DNA 作為模板 (template)，利用 *Bifidobacterium adolescentis* 之引子進行反應，產生 244 bp 之 DNA 片段；*Clostridium perfringens* 菌種以 *Clostridium clostridiiforme* 之引子進行反應，產生 255 bp 之 DNA 片段。由於糞便組成複雜，含有許多 PCR 抑制物，例如膽鹽、血紅蛋白 (haemoglobin) 分解產物和纖維<sup>(73)</sup>。純化糞便

細菌 DNA 的技術對於 PCR 的分析是個重要的關鍵，實驗參考 McOrist 等人的方法，選擇商業性組套 (QIA amp) 純化糞便細菌 DNA，提高了 PCR 的檢測成效<sup>(74)</sup>。由於 *Clostridium perfringens* 純菌之 DNA 無法穩定表現片段，因此，實驗以已知 *Clostridium perfringens* 菌數之小鼠糞便 DNA 作為外標準品，DNA 片段可依不同稀釋倍數而有良好表現。推測純菌培養的菌種與腸道菌種之遺傳基因不同，因此，無法在同一 PCR 反應條件下，呈現相同之複製效率。

### 三、盲腸內容物與糞便中短鏈脂肪酸含量

腸道細菌可利用水溶性纖維作為生長碳源，產生短鏈脂肪酸。實驗結果顯示，台農二號和基隆山藥組小鼠糞便中的總短鏈脂肪酸和乙酸濃度顯著高於控制組，另由水溶性纖維實際攝取量得知，基隆山藥組攝取量最高，其次是台農二號組，因此，結腸中水溶性纖維含量較為豐富，結腸細菌可獲得較多的碳源，因此造成糞便中總短鏈脂肪酸濃度相對性提高。另外，各山藥組盲腸內容物中丙酸濃度皆顯著高於控制組，在糞便中則是基隆山藥組為高，此結果反應於降血脂效應。

研究指出，短鏈脂肪酸中的丁酸成份可促進萎縮的小腸和結腸表皮細胞之增生<sup>(75,76)</sup>。實驗結果顯示，基隆山藥和台農二號組之盲

腸丁酸濃度顯著高於控制組，在糞便中則是基隆山藥組最高，另外，各山藥組小鼠之結腸重量雖然沒有顯著性差異，但有高於控制組的趨勢呈現，同樣以基隆山藥組最高，因此，推測各山藥品系可能有助於正常腸道細胞之增生，然而有待進一步定量腸細胞在 S 期時的 DNA 含量，以確認是否具有刺激腸道細胞增生的作用。

#### 四、山藥飼料對小腸消化酵素活性之影響

控制組與山藥組間之消化酵素活性並無顯著差異，顯示山藥水萃取物並不會影響小腸消化酵素的活性。



## 第六章、結論

1. 山藥所含水溶性成份及藉由腸道細菌利用所產生的丙酸可能參與了降血脂作用，因此，三種山藥水萃取物皆具有降低血脂的保健功效，其中又以基隆山藥組成效最大。
2. 在腸道方面，民間長紅水萃取物最具潤腸通便的效果，台農二號及基隆山藥之水萃取物可能為結腸細菌良好碳源，可產生較多的短鏈脂肪酸，調節腸道細胞的增生作用。
3. 在飼料效率、器官重量和消化酵素方面則不受影響。

## 參考文獻

1. 森立之輯 (1955) 神醫本草經 卷一 上海：群聯出版社。
2. 徐輝妃，黃鵬 (1997) 山藥的營養及保健價值與食用法介紹。花蓮區農業專訊，19：7-8 頁。
3. Komesaroff P. A., Black C. V., Cable V. & Sudhir K. (2001) Effects of wild yam extract on menopausal symptoms, lipids and sex hormones in healthy menopausal women. *Climacteric* 4: 144-150.
4. Langmead L., Dawson C., Hawkins C., Banna N., Loo S. & Rampton D. S. (2002) Antioxidant effects of herbal therapies used by patients with inflammatory bowel disease : an in vitro study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16: 197-205.
5. Hang Y. Y. (1996) Determination of the content of main constituents and pharmacological experiments on *Dioscorea japonica* in China. *J. Plant Resour. Environ.* 5: 5-8.
6. Chen H. L., Wang C. H., Chang C. T. & Wang T.C. (2003) Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in *Balb/c* mice. *Nutr.* 19: 646-651.

7. 劉新裕，張同吳 (1998) 山藥，值得多元化利用。 豐年，48: 47-48 頁。
8. 劉新裕，張同吳，林義恭，陳淑芬，王昭月，朱戩良，王順成 (1999) 山藥之品種特性、生產潛力、物化性質與抗氧化研究。中華農業研究，48: 1-22頁。
9. 劉新裕，王昭月，徐原田，胡敏夫，楊宏仁，何琦琛 (1996) 山藥新品種-台農 2 號。豐年，46: 22-25 頁。
10. McAnuff M. A., Omoruyi F. O., Morrison E. Y. St. A. & Asemota H. N. (2002) Plasma and liver lipid distributions in streptozotocin-induced diabetic rats fed saponin extract of the Jamaican bitter yam (*Dioscorea polygonoides*). Nutr. Res. 22: 1427-1434.
11. Juarez-Oropeza M. A., Diaz-Zagoya J. C. & Rabinowitz J. L. (1987) In vivo and in vitro studies of hypocholesterolemic effects of diosgenin in rats. Int. J. Biochem. 19: 679-683.
12. Cayen M. N. & Dvornik D. (1979) Effect of diosgenin on lipid metabolism in rats. J. lipid res. 20: 162-174

13. Yamada T., Hoshino M., Hayakawa T., Ohhara H., Yamada H., Nakazawa T., Inagaki T., Iida M., Ogasawara Y., Uchida A., Hasegawa C., Murasaki G., Miyaji M., Hirata A. & Takeuchi T. (1997) Dietary diosgenin attenuates subacute intestinal inflammation associated with indomethacin in rats. *Am. J. Physiol.* 273: 355-364.
14. 曾慶瀛，余哲仁，王璧娟，劉新裕 (1999) 藥用植物之開發與利用 研討會論文集。21-35 頁
15. Hou W. C., Hsu F. L. & Lee M. H. (2002) The yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro. *Planta. Med.* 68: 1072-1076.
16. Hou W. C., Chen H. J. & Lin Y. H. (1999) Dioscorins, the major tuber storage proteins of yam (*Dioscorea batatas* Decne), with dehydroascorbate reductase and dehydroascorbate activities. *Plant sci.* 149: 151-156.
17. Hou W. C., Lee M. H., Chen H. J., Liang W. L., Han C. H., Liu T. W. & Lin Y. H. (2001) Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4956-4960.
18. Martin F. W. & Ruberte R. (1976) The polyphenol of *Dioscorea alata* (Yam) Tubers Associated with Oxidative Browning.

- J. Agric. Food Chem. 24: 67-70.
19. Farombi E. O., Nwankwo J. O. & Emerole G. O. (1997) Possible modulatory effect of browned yam flour diet on chemically-induced toxicity in the Rat. *Food. Chem. Toxicol.* 35: 975-979.
  20. Farombi E. O., Britton G. & Emerole G. O. (2000) Evaluation of the antioxidant activity and partial characterization of extracts from browned yam flour diet. *Food Res. Int.* 33: 493-499.
  21. Joseph L., Mayo M. D. & Facog (1999) A nature approach to menopause. *Appl. Nutr. Sci. Rep.* 5: 1-8.
  22. Iwu M. M., Okunji C. O., Ohiaeri G. O., Akah P., Corley D. & Tempesta M. S. (1990) Hypoglycaemic activity of dioscoretine from tubers of *Dioscorea dumetorum* in normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta. Med.* 56: 264-267.
  23. Lwu M. M., Okunji C. O., Akah P., Tempesta M. S. & Corley D. (1990) Dioscoretine: the hypoglycemic principle of *Dioscorea dumetorum*. *Planta. Med.* 56: 119-121.
  24. Lwu M. M. (1991) Dioscoretine and its use as a hypoglycemic agent. U. S. Patent, 5,019,580
  25. Yao X H. K. (2002) The cytotoxicity of protoneodioscin

- (NSC-698789), a furostanol saponin from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells in vitro. *Phytomedicine* 9: 560-565
26. Wanasundera J. P. D. & Ravindran G. (1994) Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*). *Plant Foods Hum. Nutr.* 46: 33-39.
27. Kouassi B., Diopoh J. & Fournet B. (1990) Soluble sugars from yam and changes during tuber storage. *Phytochemistry* 29: 1069-1072
28. Tomoda M., Ito and Yokoi M. (1981) Plant Mucilages. XXX. Isolation and characterization of a mucilage, "Dioscorea-mucilage B," from the Rhizophors of *Dioscorea batatas*. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 3256-3261.
29. Ohtani K. & Murakami K. (1991) Structure of mannan fractionated from water-soluble mucilage of Nagaimo (*Dioscorea batatas* Dence). *Agric. Biol. Chem.* 55: 2413-2414.
30. Panigrahi S. & Francis B. (1982) Digestibility and possible toxicity of the yam *Dioscorea alata*. *Nutr. Rep. Int.* 26: 1007-1013.
31. Davidson M. H. & McDonald A. (1998) Fiber: Forms and Functions. *Nutr. Res.* 18: 617-624.

32. Levrat-Verny M. A., Behr S., Mustad V., Remesy C. & Demigne C. (2000) Low levels of viscous hydrocolloids lower plasma cholesterol absorption. *J. Nutr.* 130: 243-248.
33. Spiller G. A. (2001) *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*. 3rd ED. New York: CRC Press. 412.
34. Anderson J. W., Jones A. E. & Riddell-Mason S. (1994) Ten different dietary fibers have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. *J. Nutr.* 124: 78-83.
35. Fernandez M. L., Sun D. M., Tosca M. & McNamara D. J. (1995) Guar gum effects on plasma low-density lipoprotein and hepatic cholesterol metabolism in guinea pigs fed low- and high-cholesterol diets: a dose-response study. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 127-134.
36. Shen H., He L., Price R. L. & Fernandez M. L. (1998) Dietary soluble fiber lower plasma LDL cholesterol concentrations by altering lipoprotein metabolism in female guinea pigs. *J. Nutr.* 22: 1434-1441.
37. McIntosh M. (2001) A diet containing food rich in soluble and insoluble fiber improves glycemic control and reduces hyperlipidemia among patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr. rev.* 59: 52-55.
38. Gee J. M., Blackburn N. A. & Johnson I. T. (1983) The influence of guar gum on intestinal cholesterol transport in the rat. *J. Nutr.* 50:

215-224.

39. Howarth N. C., Sc. M., Saltzman E., D. M. & Robers S.B. (2001)  
Dietary fiber and weight regulation. *Nutr. rev.* 59: 129-139.
40. Demigne C., Levrat M. A., Behr S. R., Moundras C. & Remesy C.  
(1998) Cholesterol-lowering action of guar gum in the rat : changes in  
bile acids and sterols excretion and in enterohepatic cycling of bils  
acids. *Nutr. Res.* 18: 1215-1225.
41. Trautwein E. A., Kunath-Rau A. & Erbersdobler H. F. (1999)  
Increased fecal bile acid excretion and changes in the circulating bile  
acid pool are involved in the hypocholesterolemic and  
gallstone-preventive actions of psyllium in hamsters. *J. Nutr.* 129:  
896-902.
42. Lin Y., Vonk R. J., slooff M. J. H., kuipers F. & smit M. J. (1995)  
Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and  
triacylglycerol synthesis between nhman and rat hepatocytes in  
primary culture. *Br. J. Nutr.* 74: 197-207.
43. Demigne C., Morand C., Levrat M. A., Besson A., Moundras C. &  
Remesy C. (1995) Effect of propionate on fatty acid and cholesterol  
synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *J.*  
*Nutr.* 74: 209-219.



44. Cummings, J. H., (1997) *The Large Intestina in Nutrition and Disease*, Institut Danone, Bruxelles
45. Gibson G. R. & Roberfroid M. B. (1995) Dietary modulation of human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
46. Stephen A. N. & Cummings J. H. (1980) The microbial contribution to human fecal mass. *J. Med. Microbiol.* 13: 45.
47. Salyer A. (1979) Energy sources of major intestinal fermentative anaerobes. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 258.
48. Marteau P., Pochart P., lourie B., Pellier P., Santos L., Desjeux G. F., & Rombauid J. C. (1990) Effects of chronic indigestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 685-688.
49. Kulkarni N. & Reddy B. S. (1994) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial  $\beta$ -glucuronidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 207: 278.

50. Okazaki M., Fujikawa S. & Mtaumoto N. (1990) Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 9: 77-86.
51. Mizutani T. & Mitsuoka T. (1982) Effect of konjact mannan on spontaneous liver tumorigenesis and fecal flora in C3H/HE male mice. *Cancer Lett.* 17: 27-32.
52. Pherson-Kay R. M. (1987) Fiber, stool bulk and bile acid output: implications for colon cancer risk. *Prev. Med.* 16: 540-544.
53. Wächtershäuser A. & Stein J. (2000) Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal disease. *Eur. J. Nutr.* 39: 164-171.
54. Davidson M. H. & McDonald A. (1998) Fiber: Forms and Function. *Nutr. Res.* 18: 617-624.
55. Koruda M. J., Rolandelli R. H., Bliss D. Z., Hastings J., Rombeau J. L. & Settle R. G. (1990) Parenteral nutrition supplemented with short-chain fatty acids: effect on the small-bowel mucosa in normal rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 685-689.
56. Cresci A., Orpianesi C., Silvi S., Mastrandrea V. & Dolara P. (1999) The effect of sucrose or starch-based diet on short-chain fatty acids and faecal microflora in rats. *J. Appl. Microbiol.* 86: 245-250.

57. Koruda M. J., Rolandelli R. H. & Settle R. G. (1988) The effect of parenteral nutrition supplemented with short chain fatty acids on adaptation to massive small bowel resection. *Gastroenterology* 95: 715-720.
58. Deng G. Y., Lin Y. W., He G. Z. & Jiang Z. M. (2000) Dietary fiber protection on intestinal barrier function. *Asian J. Surg.* 23: 90-96.
59. Folch J., Lees M. & Stanley G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226: 497.
60. Chen H. L., Lu Y. H., Lin J. J. & Ko L. Y. (2001) Effects of isomalto-oligosaccharide on bowel function and nutritional status in constipated elderly men. *J. Am. Coll. Nutr.* 20: 1-6.
61. Huang T. C., Chen C. P., Wefler V. & Raftery A. (1961) A stable reagent for the Liebermann-Burchard reaction. *Anal. chem.* 33: 1405-1407.
62. Wang R. F., Cao W. W. & Cerniglia C. E. (1996) PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1242-47.
63. Hestrin S., Feingold D. S. & Schramm M. (1962) Hexoside hydrolases. V.  $\beta$ -Fructofuranosidase (Invertase) from yeast. In:

Colowick SP Kaplan NO eds. Methods in enzymology. New York: Academic Press. 5: 251.

64. Wiesmeyer H. (1962) Amylomaltase. Methods in enzymology. In: Colowick SP Kaplan NO eds. Methods in enzymology. New York: Academic Press. 5: 141.

65. Araghiniknam O., Chung S., Nelson-White T., Eskelson C. & Watson R. R. (1996) Antioxidant activity of Dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. Life Sci. 59: 147-157.

66. Thewles A. & Coleman (1995) Fractionation of livers following diosgenin treatment to elevate biliary cholesterol. Biochim. Biophys. Acta . 1255: 77-81.

67. Kelley J. J. & Tsai A. C. (1978) Effect of pectin, gum Arabic and agar on cholesterol absorption, synthesis, and turnover in rats. J. Nutr. 108: 630-639.

68. Fernandez M. L., Sun D. M., Tosca M. & McNamara D. J. (1995) Guar gum effects on plasma low-density lipoprotein and hepatic cholesterol metabolism in guinea pigs fed low- and high-cholesterol diets: a dose-response study. Am. J. Clin. Nutr. 61: 127-134.

69. Nishina O. M. & Freedland R. A. (1990) Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J. Nutr.* 120: 668-673.
70. Berggren A. M., Nyman M.G.L. & Lindquist I. (1996) Influence of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rats. *Br. J. Nutr.* 76: 287-296.
71. Chen H. L., Haack V. S., Janecky C. W., Vollendorf N. W. & Marlett J. A. (1998) Mechanisms by which wheat bran and oat bran increase stool weight in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 711-719.
72. Schneeman B. O. (1998) Dietary fiber and gastrointestinal function. *Nutr. Res.* 18: 625-632.
73. Monteiro L., Gras N., Vidal R., Cabrita J. & Megraud F. (2001) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR DNA stability and removal of inhibitors. *J. Microbiol. Methods.* 45: 89-94.
74. McOrist A. L., Jacson M. & Bird A. R. (2002) A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J. Microbiol. Methods.* 50: 131-139.
- 75 Rombeau J. L., Reilly K. J. & Rolandelli R. H. (1995) Short-chain fatty acids in intestinal surgery: rationale and clinical implications. In: Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T (eds) *Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids*, Cambridge University

Press, Great Britain, 401-425.

76. Kripke S. A., Fox A. D., Berman J. M., Settle R. G. & Rombeau J. L.  
(1989) Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic  
infusion of short-chain fatty acids. JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.  
13: 109-116.