

第十六屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA16-315

作品名稱：植物油之油漱應用及抑菌最佳
化之研究

姓名：張育嘉

關鍵字：油漱法、苦茶油、反應曲面法

內容

摘要.....	1
壹、 研究動機	2
貳、 研究架構	3
參、 研究目的	4
肆、 研究設備及器材	4
伍、 研究方法	5
陸、 研究結果與討論	10
柒、 討論	22
捌、 結論	23
玖、 未來展望	24
附錄 1 參考資料	I

摘要

油漱法是古代一種應用植物油進行口腔清潔之天然療法。本研究針對植物油漱法之抑菌效果與機制進行科學性驗證。本實驗以市售橄欖油與苦茶油之油漱樣本檢測發現，苦茶油具有極佳的口腔抑菌效果，並發現可以有效抑制牙齦鏈球菌 (*Streptococcus cristatus*) 等與齲齒及牙周病相關致病菌。分析油品後發現維生素 A 與維生素 E 可能為抑菌成份，另發現維生素 A 及維生素 E 與口腔內之溶菌酶 (lysozyme) 具交互作用，增強其抑菌效率可達 2 倍。為探討最佳化以植物油進行油漱之抑菌效果，本實驗以反應曲面法 (response surface methodology, RSM) 之中心混成設計 (central composite design, CCD)，並配合每日攝取量建議及成本之估算，最適抑菌條件為 0.94% 維他命 A 及 0.74% 維他命 E，改良後之油漱法，可將實施時間縮短為原本 1/3，抑菌效果可達 93.29%。

Abstract

Ancient medical technology is often reported to be effective, though quite mysterious. Oil-pulling is an ancient medical technique which is said to be able to inhibit oral bacteria; however, it lacks scientific proof. Throughout testing of the anti-bacterial effect of oil-pulling, the percentage of bacteria reduced could reach up to 95%, which is better than the 50.3% reduction from using mouthwash. Moreover, by using 16s rDNA sequencing, we are able to determine what kinds of bacteria oil-pulling is effective with. Additionally, we tested the exclusion zone of the ingredients in camellia oil, in order to find out why oil-pulling therapy is able to reduce oral bacteria. The results show that the mixture of vitamin A, vitamin E and lysozyme targets the largest zone. By using "Enzymatic Assay of Lysozyme Kit", it is able to detect that by adding vitamin A and vitamin E, the activation of lysozyme can be enhanced. In order to shorten the length of time spent per oil-pulling (which is commonly recommended for up to 15 mins), we increased the concentration of vitamin A and vitamin E; and tested out the maximum by using response surface methodology. Finally, this project developed a product based on oil pulling by adding vitamin A to 0.94 and vitamin E to 0.74% in pure camellia oil, which can eliminate 94% of oral bacteria; and the effective time length has been shortened by 66.6%. It is also estimated to be 16% cheaper in comparison with using mouthwash.

壹、 研究動機

作者曾因牙齦感染而口腔潰瘍，因疾患而煩惱時，偶然在電視節目上接觸到植物油漱療法，嘗試後發現情況大獲改善，不僅傷口癒合，口腔環境也變得較為濕潤。此種感受相較於目前普遍使用的漱口水及牙膏使用過後的化學性刺激的感覺，油漱法後口腔感覺舒適無刺激感，更有自然素材清潔過後的感受。惟油漱法在實際操作的過程中，所費時間長達 15 分鐘，且因久漱後口腔較易有油膩感，因此作者希望深入研究植物油對於抑菌之功效及可能的機制，並透過調整其油品本身的抑菌成分，改良其抑菌效率與實用性。

油漱法在近年的預防醫學逐漸受到重視，對於其有效的降低口腔相關病症，許多的研究皆進行了數據分析，因此局灶性理論也再度被提起。2008 年，美國的非佛醫師 (Bruce Fife) 出版的油漱療法的奇蹟 (註 1) 對此種療法進行了深入的介紹，對於其抑菌機制也做出了數種可能性假說。他提出細菌和植物油結合的可能性，以及血液中毒素排出的可能性，他也進行數種疾病經油漱法改善的效果統計，並且有正向的結果。

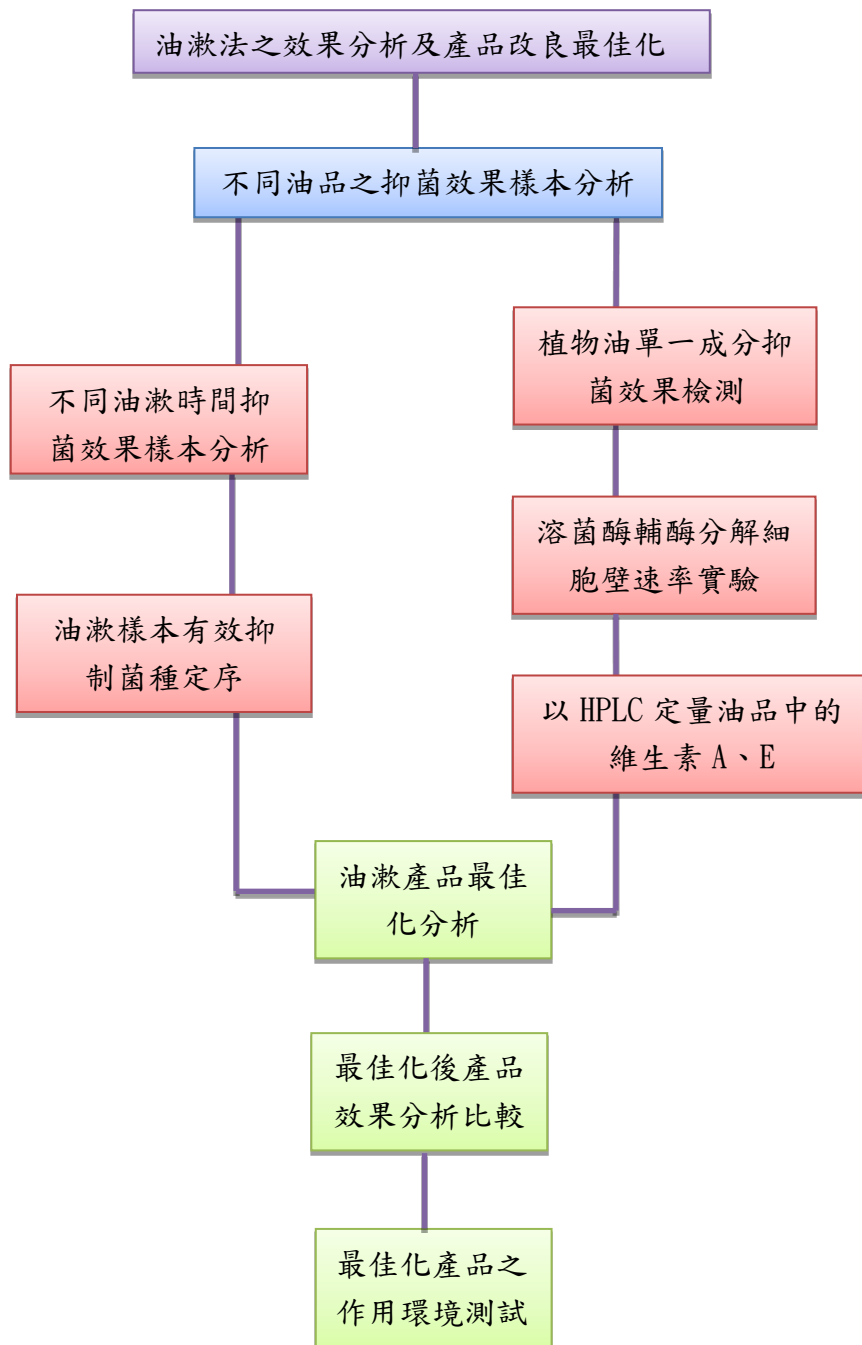
根據書上所述，提取自可食用之植物之植物油常作為油漱的媒材，因植物油和其他種類之油品相較，且生產容易，成本較低，含有較多的脂溶性維生素；而動物油常溫下常為固態，且較易變質。礦物油則可能因未完整純化，而含有許多不利於人體的物質，如重金屬等。綜上所述，我們決定以台灣市售之食用植物油作為素材，進行其抑菌機制的探討與效果最佳化的研究。本實驗中，我們選擇市面上常見的橄欖油及近年來熱門研究的苦茶油來進行油漱法之研究。

苦茶油是近年逐漸興起的油種，是油茶樹 (*Camellia sinensis*) 的種子經冷壓榨出而得。油茶樹是山茶科 (*Theaceae*) 山茶屬 (*Camellia*) 的常綠小喬木，生長於海拔 100~1200 公尺間，每年 10~11 月開花，數量較少，故其採收相對不易。文獻指出苦茶油含有大量的維生素 A、E 及甘素 (Dulcine)，更含有較橄欖油豐富的單元不飽和脂肪酸，其中油酸 (Oleic acid) 約 78.2%-80.5%、亞麻油酸 (Linoleic acid) 9.0%-12.5%，長期食用可降人體內總膽固醇含量(註 2)。

食用橄欖油是用初熟的油橄欖 (*Olea Europaea L.*) 經冷壓榨出。油橄欖是一種歷史悠久的樹種，屬木犀科 (*Oleaceae*)，是一種常綠小喬木。橄欖油在地中海沿岸國家有幾千年的歷史，除了可用於烹調，經研究證實(註 3)，橄欖油亦具有美容功效。地中海型氣候提供油橄欖生長所需的氣候條件。每年 11 月是果實的採收季節。橄欖油之脂肪酸組成含有油酸 55.3%-83.4%，以及棕櫚酸 7.5-20.0%。

本研究即為透過各種實驗證明植物油漱法之功效及抑菌治療機制，並找出能有效抑菌的植物油，並分析油品可能具抗菌效果之的單一成分與其抑菌效果。並以最佳化之實驗推論出最有抑菌效果之油漱配方，進而改良油漱法，提高其實用價值

貳、 研究架構



參、 研究目的

- 一、比較不同油品 (橄欖油、苦茶油) 及漱口水的抑菌效果。
- 二、探討不同油品進行油漱法最佳進行時間長度
- 三、利用 16S rDNA 定序探討油漱法對於何種細菌具有抑菌能力。
- 四、以比色法探討維生素 A、維生素 E 與溶菌酶活性之關係
- 五、利用 RSM 探討油漱法油品之最適組成
- 六、比較原本之油漱法與改良之油漱產品之抑菌效果與成本

肆、 研究設備及器材

一、器材

高速冷凍離心機、水平式電泳、PCR 聚合酶連鎖反應機器、HPLC 高效液相層析儀、分光光度計、無菌操作台、恆溫水浴槽、紫外光、SAS 軟體、微量滴管、離心管、直徑 9 cm 培養皿、電子秤、量筒、稱量紙、刮杓、試管、燒杯、血清瓶、顯微鏡、酒精燈、Elution tube、微量離心管、電腦、4°C 冰箱、電源供應器。

二、藥品

- (一) NB 培養基：Tryptone、Agarose、Yeast Extract、NaCl
- (二) 革蘭氏染色套組
- (三) Extraction Kit
- (四) Gel Fragment Extract Kit
- (五) DNA 聚合酶
- (六) 引子 Primer 341F：5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3'
Primer 1052R：5'-GARCTGRCGRCRRCCATGCA-3'
- (七) 電泳內染劑 (Nucleic Acid Stain)
- (八) 油漱法套組 (10 ml 油品、滅菌棉花棒 2 支、採樣夾鏈袋)、蒸餾水及漱口水採樣套組 (蒸餾水、漱口水各 20 c.c.、滅菌棉花棒 2 支、採樣夾鏈袋)
- (九) Sigma Aldrich Enzymatic Assay of Lysozyme Kit
- (十) 維生素 A、維生素 E、溶菌酶 (Lysozyme)

伍、 研究方法

一、不同油品與漱口水之抑菌效果比較

以 6 位受試者(健康男性,年齡 16~17 歲),連續 5 天於早上剛起床、未刷牙之條件下漱油 5 ml (橄欖油以及苦茶油) 15 分鐘,並取其漱油前後的口腔細菌進行固態培養基培養,連續 5 天並計算其「菌落平均」與「平均抑菌率」,記錄其結果。另以蒸餾水漱口作為對照組,以 3 位受試者 (健康男性,年齡 16~17 歲),於早上剛起床、未刷牙之條件下以漱口水漱口 30 秒前後的口腔細菌進行固態培養基培養,連續 5 天並計算其「菌落平均」與「平均抑菌率」,記錄其結果。(註:30 秒為漱口水標示之建議時間。)

「菌落平均」計算方式為：
$$\frac{\text{各樣本菌落數和}}{\text{樣本數}}$$

「平均抑菌率」的計算方式為：
$$\frac{\text{漱口前平均菌落數}-\text{漱口後平均菌落數}}{\text{漱口前平均菌落數}}$$

二、探討油漱法效益最佳化時間

以 9 位受試者 (健康男性,年齡 16~17 歲),連續 5 天早上於剛起床、未刷牙之條件下以苦茶油漱口,分為 3 組各 3 人分別進行 5、15、20 分鐘的油漱療法。並取油漱後口腔細菌進行固態培養,連續 5 天 並計算其平均抑菌率記錄其結果。

三、油漱法有效抑菌菌種定序

為瞭解油漱法對何種菌種具有抑菌效果,以及檢驗油漱法能夠清除的是益菌或壞菌,將實驗一、實驗二中能經由油漱法清除之菌種進行革蘭氏染色,先以結晶紫染色細胞壁上的肽聚醣,3 秒後洗去多餘染劑。並用媒染劑 (Mordant) 即革蘭氏碘液 (Gram's Iodine) 形成結晶紫-碘 (CV-I) 複合體,3 秒後洗去多餘染劑。再用脫色劑 (Decoloring Agent) 即丙酮洗去未形成 CV-I 複合體之結晶紫。最後再以複染劑 (Counterstain) 即番紅 (Safranin) 進行複染,3 秒後洗去多餘染劑。以顯微鏡觀察,細胞壁染色後呈藍紫色為陽性菌,紅色則為陰性菌。判斷其性質,後進行 DNA 純化,經 PCR 反應放大片段,電泳跑膠後進行 16S rDNA 定序,於美國國家生物資訊中心 (NCBI) 之資料庫進行 BLAST 比對,以確認其有效之菌種。DNA 萃取、

PCR 及電泳分析之流程如下：

(一) PCR 聚合酶連鎖反應

首先使用 GeneMark extraction kit 進行 Genomic DNA 的抽取：革蘭氏陽性菌抽取方法：抽取 300µl 液態培養菌液經離心 (6000 r.p.m.) 3 分鐘之後移除上清液，在沉澱物中加入 200µl 的 lysozyme buffer。反應 30 分鐘後接續下列步驟(2)。革蘭氏陰性菌抽取方法：抽取 300 µl 液態培養菌液經離心 (6000 r.p.m.) 3 分鐘之後移除上清液，在沉澱物中加入 200 µl 的 NB buffer 和 20 µl 的 Proteinase K。反應 10 分鐘後加入 NB Buffer 200 µl，並放入水浴槽維持恆溫 60°C，30 分鐘。加入 200 µl，95 % 酒精並將溶液轉移到 GS column。再加入 400 µl W1 Buffer 並離心 (13000 r.p.m.) 1 分鐘，移除濾出溶液，加入 600 µl W2 Buffer 並離心 (13000 r.p.m.) 1 分鐘，移除濾出溶液。加入已預熱 60°C 的 Elution Buffer 100 µl。取以上步驟之樣本 (Template DNA) 配製下列成分(表二)之溶液並放入 PCR，進行(表三)程序。

表一、進行 PCR 之溶液成分

Template DNA	8.5 µl
Taqmix red	12.5 µl
Primer 341F	2.0 µl
Primer 1052R	2.0 µl

表二、PCR 之程序

Initialization	95°C	1X
Denaturation	95°C	35X
Annealing	60°C	
Extension	72°C	
Final Elongation	72°C	1X
Incubate	25°C	∞

(二) DNA 膠體電泳

調配 TAE 電泳緩衝液，先在 1X TAE Buffer 30ml 中加入 0.3g 的 Agarose，並加入 nucleic acid stain 1.2µl 進行內染，以 100 V 電壓進行水平式電泳分析，在紫外光下取出欲取片段，預期長度 711 b，並在切膠後進行 Gel Extraction。

(三) Gel Extraction

將切下之樣本膠片放入微離心管(約 300mg)，並加入 500µl NEX Buffer，放入水浴槽(60°C) 15 分鐘。將 800µl 之以上樣本轉入 ES Column，離心(13000rpm) 30 秒並移除濾出液。加入 400µl W1 Buffer 並離心 (13000rpm) 30 秒，移除濾出溶液。加入 600µl W2 Buffer 並離心 (13000rpm) 30 秒，移除濾出溶液。加入已預熱 60°C 的 Elution Buffer 35µl。

(四) 送交明欣生物科技進行定序。

(五) 將序列輸入美國國家生物技術資訊中心 (NCBI) 資料庫之BLAST功能，確認其菌種。

四、植物油單一成分抑菌效果檢測方法

本實驗以抑菌環之實驗測試油品單一成分之抑菌效果，文獻指出苦茶油主要成分為油酸 (Oleic acid) 78.2% - 80.5%、亞麻油酸(Linoleic acid) 9.0%-12.5%，與少量維生素如維生素 A 與維生素 E 等。本研究之實驗測試純油酸、純亞麻油酸，以及以油酸稀釋之 1% 維生素 A 和 1% 維生素 E 之抑菌環，菌種皆為從樣本口腔取出後經定序確認之菌種，分別為牙疳鏈球菌(*Bacillus thuringiensis*)和蘇雲金芽孢桿菌(*Streptococcus cristatus*)代表致病菌和共生菌，並將紙錠 (直徑 0.5 公分)，浸入配置溶液，在無菌操作台風乾後，放置於已均勻塗上口腔內分離之菌種的培養基培養 24 小時，並觀察抑菌環之大小。

五、脂溶性維生素與溶菌酶之之酵素抑菌活性實驗

依據本研究之實驗結果，維生素 A、維生素 E 之抑菌環實驗效果顯著，經查詢文獻(註 4)後發現，維生素 A 與維生素 E 可增強溶菌酶之活性，增強其效果。因此本實驗以使用 Sigma Aldrich Enzymatic Assay of Lysozyme Kit 進行溶菌酶活性之檢測，了解溶菌酶與維生素 A 與維生素 E 之間的關係。實驗方法如下：反應液以 8.98 g 磷酸二氫鉀加蒸餾水至 1 L，加入序列稀釋至 0.01% (w/v) 之溶壁微球菌，為調整 pH 值至溶菌酶最適反應之 pH 6.2。

首先以未加入溶菌酶之反應液之透光度做為 Blank，再加入溶菌酶，紀錄 6 分鐘中透光度增加量。為比較脂溶性維生素對於抑菌反應速率的影響，我們分別在溶菌酶中加入 1% 之維生素 A 與維生素 E 以及兩者同濃度之混和，由 6 分鐘之透光度變化量檢測在維生素參與下的反應速率。

Δ 透光度=6 分鐘之溶液透光度-初始溶液透光度

六、以高效液相層析 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析植物油之脂溶性維生素

本實驗原先以 TLC 比對分析苦茶油中所含之脂溶性維生素，但因結果不如預期。因此改採用高效液相層析儀分析。流程如下：

(一) 預處理

將 10 g 的吸附性黏土加入苦茶油樣本以進行脫色，並且以 150 r.p.m. 離心 20 分鐘。使用紫外光動力學讀數器在 635 nm 分離上清液。將上清液 80 g 倒入 40 mL KOH(0.2mol / L)，並在 150 r.p.m. 下攪拌 20 分鐘、50°C 水浴 10 分鐘。離心分離混合物後，以蒸餾水沖洗，再次離心並用無水硫酸鈉乾燥。

(二) HPLC 分析

將預處理後的水樣本加入二氯乙烷，並將其有機物在氮氣下乾燥，而後加入 1 ml 甲醇。將以上混合液通過 0.45 μ m 聚四氟乙烯膜過濾器，並進行 HPLC 分析，管柱使用十八烷基二氧化矽 C₁₈ (250 \times 4.6mm)，條件為 30 °C，流速為 1 mL / min。流動相為 Menthol : H₂O=98:2。在 UV 300nm 下偵測其訊號。

七、油漱法之油品成分調整最佳化分析

由實驗七可知維生素 A 及維生素 E 對於溶菌酶具有提升其活性之作用，故設計以下實驗，調整維生素 A 及維生素 E 在油品內之含量，希冀在合理之條件內找到其最佳化之效果，實驗流程如下：

(一) 二因子水準設計 (Two-level factorial design)

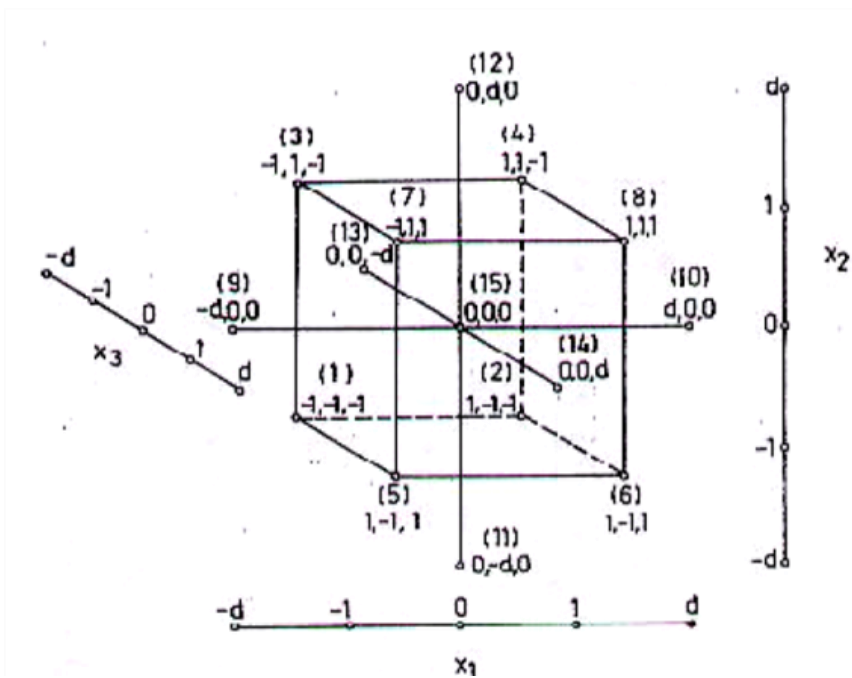
利用二因子設計，檢測所選因子是否對於溶菌酶 (Y) 活性有顯著影響。故設計 coded level 如表所示。測定四組的反應速率之後，使用 SAS 軟體以 ANOVA 分析，利用各因子之估計值得到一階行列式。

(二) 陡升路徑法 (Method of path of steepest ascent)

利用二因子水準分析法得知維生素 A (X₁) 以及維生素 E (X₂) 對於 Lysozyme (Y) 活性具有明顯的正向影響後，為了確定其最佳化濃度，使用陡升路徑法，以一條得以有條理逼近極值點的路徑，即以二水準分析法得知之 維生素 A 以及維生素 E 最大值為中心點，以固定距離向前即向後延伸，逼近最佳化濃度所在位置。

(三) 反應曲面法 (Response surface methodology, RSM)

選取維生素 A (X₁)、維生素 E (X₂) 作為變數，探討其對於 Lysozyme 活性 (Y) 的影響。統計分析軟體使用 (Statistics Analysis System, SAS)。利用中心混成設計以二階方程式描述曲面的變化。實驗使用 Box 和 Wilson (註 6) 所提出的中心混成實驗圖，設計點與原點的適當距離，即原點及各立方體頂點的距離，以及另由中心軸向外延伸之實驗點，點彼此之間對稱且等值加權。測定各組活性後，可得其回歸方程式。



圖一、中心混成實驗法 (註 6)

八、最佳化產品可行性及效果測試

由實驗八我們能夠得知油漱療法中，提高維生素 A 及維生素 E 含量將有助於提高其抑菌效率，不僅可更有效地抑菌，更可以縮短其油漱進行時間，故本實驗將對實驗結果進行實際應用的可行性測試。

除了考量其效果，本實驗亦納成本及每日建議攝取量為考量 (註 7) 將維生素 A 的含量提高至 0.94%，維生素 E 則提高至 0.73%，並且與原本之油漱法進行樣本分析比較。採樣方式同實驗一，參與者共 9 位。改良版油漱進行時間分為三組各三人，分別進行 0.5、1、5 分鐘。

九、最佳化產品之最佳作用環境

為測定最佳化後產品之適合做用環境，故以 Sigma Aldrich Enzymatic Assay of Lysozyme Kit 測試最佳化產品在不同 pH 值和不同溫度下之反應速率，本實驗利用上述套組提供之 KOH 及 KH_2PO_4 水溶液調整 pH 值，並以水浴槽調整其作用溫度。第一階段之實驗以體溫 37°C 為控制變因，調整溶液 pH 值以觀察反應速率。第二階段之實驗以所得之最佳作用之 pH 值為控制變因，調整溫度比較其反應速率。

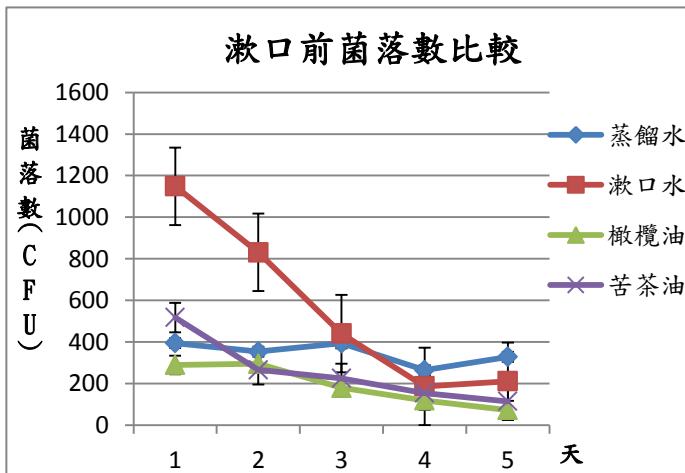
陸、 研究結果與討論

一、探討不同油品與漱口水之抑菌效果

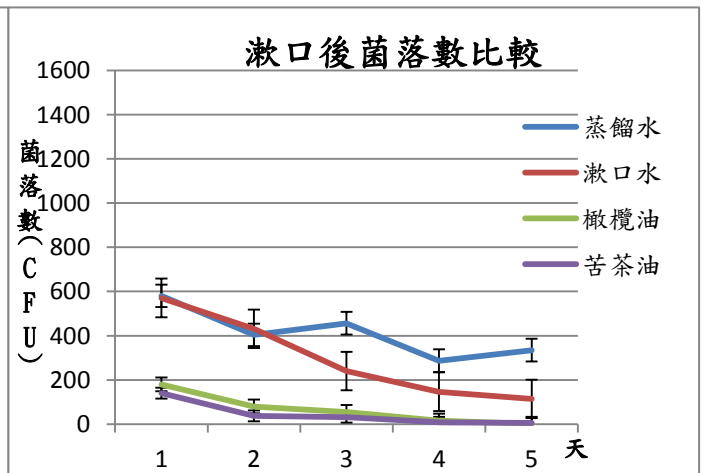
每組 3 位受試者取樣漱油前後口腔壁之細菌，經固態培養基培養 5 天後，進行菌落數計數，以蒸餾水作為對照組，橄欖油、苦茶油與漱口水作為操縱變因。結果發現橄欖油與苦茶油的平均抑菌率在連續油漱 5 天皆可到達 95% 以上 (圖四)。且由第 2 到 5 天之連續觀察漱口前的菌落數可發現，苦茶油與橄欖油的抑菌效果均可到隔天早晨(圖二)，但橄欖油的抑菌效果從第 2 天開始較明顯 (圖三)。另取市面上之漱口水，依其商品使用指示 (漱口時間 30 秒) 進行相同實驗，發現以漱口水漱口之抑菌效果維持在約 50%，雖菌落數亦逐日下降，但效果仍以油漱法較佳 (圖四)。

表三、各種漱口材料之抑菌效果

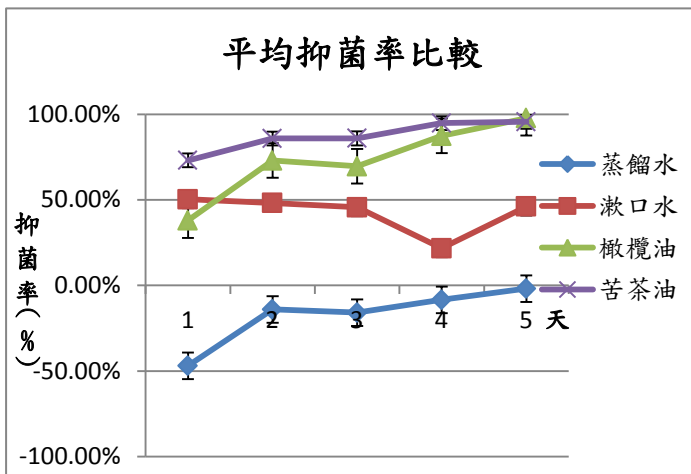
	天		第一天	第二天	第三天	第四天	第五天
	CFU						
蒸餾水	菌落平均	前	395	353.67	393.67	264.67	328.67
		後	580.33	403.33	456.33	287	334.67
橄欖油	菌落平均	前	289.67	295	180	119	72.67
		後	179.67	79.67	54.67	15	1.67
苦茶油	菌落平均	前	517.67	266.33	225.67	154.67	114.33
		後	139.33	37.67	31.67	8	5
漱口水	菌落平均	前	1148.7	831.33	441	187	211.67
		後	570.67	431	239.67	146.33	114



圖二、連續五天漱口前之菌落數比較



圖三、連續五天漱口後之菌落數比較



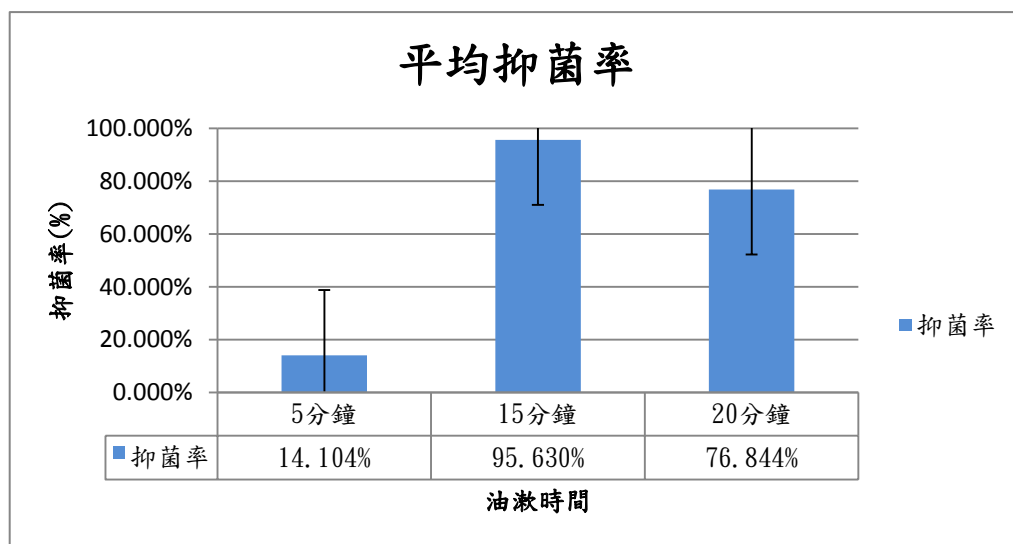
圖四、油漱前、後之口腔菌落培養



圖五、連續五天平均抑菌率比較

二、探討實施油漱法效果之最佳時間

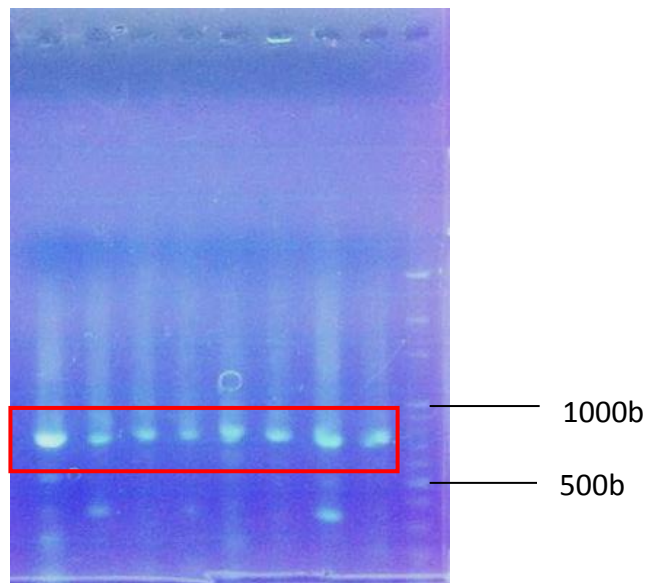
菲佛醫師於文獻中建議油漱法時間為 15~20 分鐘，故本實驗取每組 5 位受試者以苦茶油經 5 分鐘，15 分鐘與 20 分鐘之油漱法後，取樣漱口前後口腔壁之細菌，經固態培養基培養 5 天後，進行菌落數計數，以每位受試者皆漱苦茶油為控制變因，以不同漱口時間為操縱變因，實驗如(圖六)。由實驗結果發現，以 15 分鐘之油漱時間抑菌效果最佳，抑菌率約可達 95.6%，當油漱時間超過 15 分鐘時，抑菌效果略為減低，抑菌率 76.8%，由圖三可知，以苦茶油漱口之抑菌率在漱口 15 分鐘前與時間成正向關係，超過 15 分鐘後抑菌率則略為下降。



圖六、油漱時間與抑菌率比較圖，可看出 15 分鐘為最佳時間

三、利用 16S rDNA 定序探討油漱法對於何種細菌具有抑菌能力

因實驗一發現利用不同植物油漱口對口腔細菌有抑菌效果，因此為了解油漱法有效抑菌之菌種，挑選漱口前後菌落數明顯減少之樣本進行 DNA 純化以及 PCR 實驗，16S rDNA 定序結果如下表四（橄欖油）及表五（苦茶油）。實驗發現橄欖油可抑制之菌種主要為芽孢桿菌 (*Bacillus sp.*)，屬於人體正常的共生菌；而苦茶油抑制之菌種則主要有戀臭假單孢菌 (*Pseudomonas putida*) 及牙疳鏈球菌 (*Streptococcus cristatus*)，根據文獻，戀臭假單孢菌在台灣曾經造成醫院大規模的感染，而牙疳鏈球菌則為牙菌斑主要菌種之一，易造成齲齒及牙周病，由實驗結果來看，苦茶油較具有抑制致病菌之功效。



圖七、電泳跑膠結果，將切紅色方框中 711b 進行 16S rDNA 定序

表四、有效菌種基因定序(橄欖油)

定序編號	培養日期	革蘭氏染色	菌種	BSL	相符度 (%)
1	5月30日	Positive	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1	99
2	5月5日	Positive	<i>Lysinibacillus manganicus</i>	1	98
3	5月31日	Positive	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1	99
4	5月31日	Positive	<i>Bacillus siamensis</i>	1	99
5	5月25日	Positive	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	98
6	5月16日	Positive	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	1	99

表五、有效菌種基因定序(苦茶油)

定序編號	培養日期	革蘭氏染色	菌種	BSL	相符度 (%)
1	7月28日	Positive	<i>Microbacterium barkeri</i>	1	99
2	7月28日	Positive	<i>Brevibacillus panacihumi</i>	1	99
3	5月3日	Negative	<i>Pseudomonas putida</i>	1	84
4	7月30日	Positive	<i>Streptococcus cristatus</i>	1	99
5	5月3日	Positive	<i>Neisseria sicca</i>	1	94

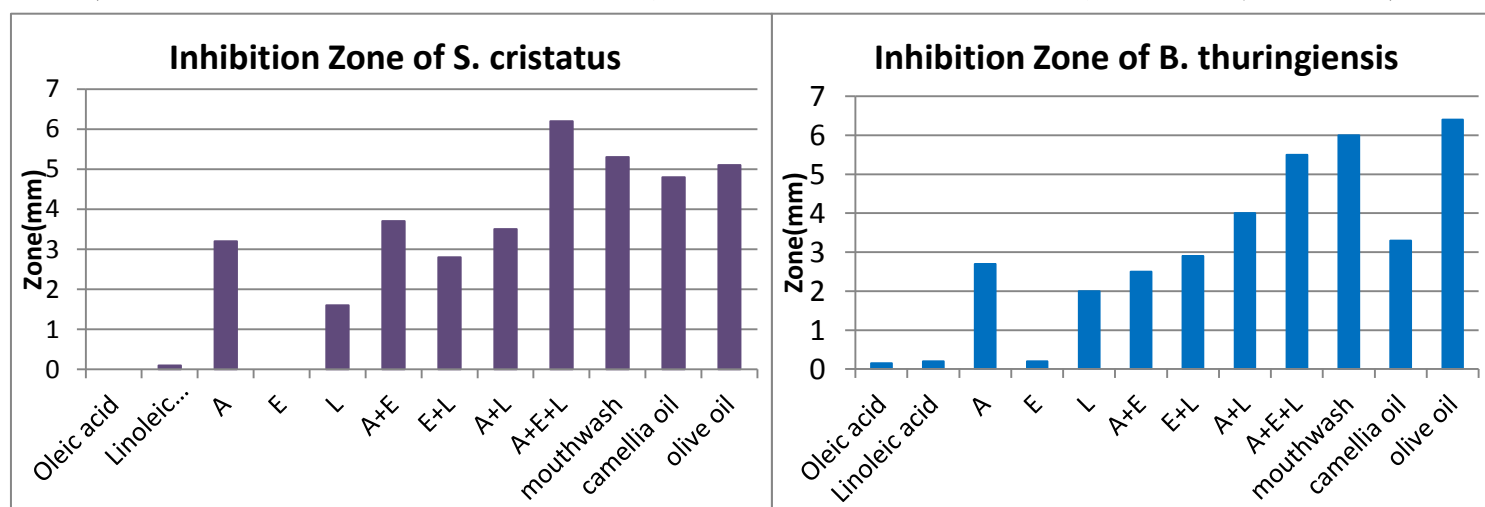
四、植物油單一成分抑菌效果檢測方法

前述實驗發現油漱法有抑菌效果，更可抑制特定菌種，接下來我們想要了解油品單一成分對特定菌種之抑制效果。及唾液中單一成分針對特定菌種的抑制效果。比較抑菌環的大小可以了解油品中單一成分如維生素 A、E 的抑菌效果，並與唾液中溶菌酶之抑菌環比較，實驗結果如表，數據如表。結果發現維生素 A、E 以及溶菌酶三種成分之混和溶液抑菌效果最佳。值得注意的是，漱口水及橄欖油皆會對體內正常共生菌牙疳鏈球菌(*B. thuringiensis*)具抑菌能力，而苦茶油卻可在不破壞共生菌群的情況下對致病菌牙疳鏈球菌(*Streptococcus cristatus*)有效地進行抑制(表六)。

表六、各種成分之抑菌環大小

單位:毫米	O.A.	L.A.	A	E	L	A+E	E+L	A+L	A+E+L	漱口水	苦茶油	橄欖油
<i>S. cristatus</i>	0	0.1	3.3	0.1	1.3	3.7	1.2	3.2	5.8	6.2	6.6	0.9
<i>B. thuringiensis</i>	0.1	0.2	2.7	0.2	2.0	2.5	2.9	4.0	5.5	6.0	3.3	6.4

(註：O.A.為油酸、L.A.為亞麻油酸、A即維生素 A，E及維生素 E，L即溶菌酶，單位：毫米)



圖八-1、各成分單質對牙疳鏈球菌(*S. cristatus*)之抑菌環大小比較

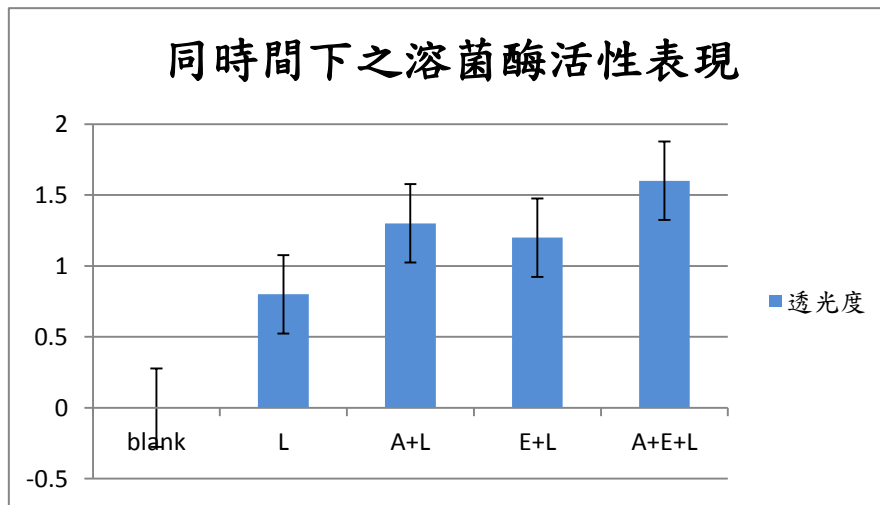
圖八-2、各成分單質對蘇雲金芽孢桿(*B. thuringiensis*)之抑菌環大小比較

五、脂溶性維生素對於溶菌酶之酵素活性實驗

為了解油漱法中維他命 A、維他命 E 對抑菌速率的影響，本實驗檢測溶菌酶之活性套組，以 450 nm 進行透光度測量。透光度增加表示抑菌反應進行，因此，我們紀錄三組實驗中在第 6 分鐘混合溶液與初始溶液相較透光度的變化。實驗結果發現，同時加入溶菌酶、1% 維他命 A、1% 維他命 E 之混合反應液透光度增加速度最快，為添加維生素之前的 2 倍，抑菌反應速率最快，與僅含單一種維生素與溶菌酶、僅加入溶菌酶之結果長條圖比較 (圖九) 可以發現，在沒有脂溶性維生素存在的清況下，抑菌反應速率較慢，而兩種維生素併用之反應速率較快。因此推論維他命 A、維他命 E 可增加溶菌酶抑菌反應速率。

表七、維生素 A (A)、維生素 E (E) 對溶菌酶 (L) 之活性影響

時間:分鐘	0	6	△透光度
blank	0.2	0.2	0
L	0.3	1.1	0.8
A+L	0.5	1.8	1.3
E+L	0.8	2.0	1.2
A+E+L	0.8	2.4	1.6



圖九、各反應液反應時間與透光度變化(註：A 即維生素 A，E 及維生素 E，L 即溶菌酶)

六、以 HPLC 定量苦茶油中之維生素 A 和維生素 E

委外分析使用高效液相層析儀定量維生素，管柱使用十八烷基二氧化矽 C₁₈ (250×4.6 mm)，移動相 Menthol : H₂O=98:2，流速為 1 mL / min。並以 UV 300 nm 測量其數值。分析結果為含有 8 p.p.m. 維生素 A 和 0.21% 維生素 E，如下表八。

表八、HPLC 定量結果

	維生素 A	維生素 E
每公克含量 (mg/g)	8 p.p.m.	2.1 mg / g
比率 (%)	0.0008%	0.21%

七、利用 RSM 探討油漱法油品之最適組成

(一) 二水準因子設計 (Two-level factorial design)

利用二因子設計，檢測所選因子是否對於溶菌酶 (Y) 活性有顯著影響。以固定之透光率變化量，測量其反應時間，以時間倒數代表其反應速率進行探討。利用 SAS 軟體進行 ANOVA 分析，發現維生素 A、E 對溶菌酶皆具有顯著的影響，且維生素 A、E 同時存在時對溶菌酶的影響亦有顯著差異 (P value 小於 0.0001)。故利用各因子之估計值得一階行列式如下：

$$Y=0.00997+0.01228X_1+0.00558X_2,$$

由檢定係數 $R^2=0.9806$ 來看，此回歸方程式可描述本實驗之數據。由於最大值仍未出現在 0.0001% 至 1% 之間，因此以陡升路徑法，向前向後延伸以逼近最大值。

表九、Two-level 實驗設計表

維生素 A (%)	維生素 E (%)
1	1
1	0.001
0.001	1
0.001	0.001

表十、Two-level 實驗各因子反應時間紀錄

A (%)	E (%)	T	1/T
1	1	34.98	0.02862
1	0.001	46.58	0.02146
0.001	1	67.82	0.01476
0.001	0.001	92.72	0.01078

表十一、Two-level 實驗結果之 ANOVA 分析

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	T Value	Pr > t	Parameter Estimate from Coded Data
Intercept	1	0.010765	0.000258	41.66	<.0001	0.018905
VA	1	0.010688	0.000365	29.25	<.0001	0.006135
VE	1	0.003981	0.000365	10.89	<.0001	0.002785
VA*VA	0	0	.	.	.	0
VE*VA	1	0.003186	0.000517	6.17	<.0001	0.000795
VE*VE	0	0	.	.	.	0

表十二、Two-level 實驗設計結果之變數最大值預測表

Coded Radius	Estimated Response	Standard Error	Uncoded Factor Values	
			Vitamin A	Vitamin E
0.0	0.018905	0.000129	0.500500	0.500500
0.1	0.019582	0.000130	0.545824	0.521494
0.2	0.020265	0.000132	0.590836	0.543154
0.3	0.020954	0.000135	0.635547	0.565442
0.4	0.021649	0.000139	0.679964	0.588323
0.5	0.022351	0.000145	0.724098	0.611762
0.6	0.023059	0.000152	0.767958	0.635727
0.7	0.023774	0.000159	0.811554	0.660189
0.8	0.024496	0.000169	0.854895	0.685119
0.9	0.025224	0.000179	0.897991	0.710491
1.0	0.025959	0.000190	0.940850	0.736281

(二) 陡升路徑法 (Method of path of steepest ascent)

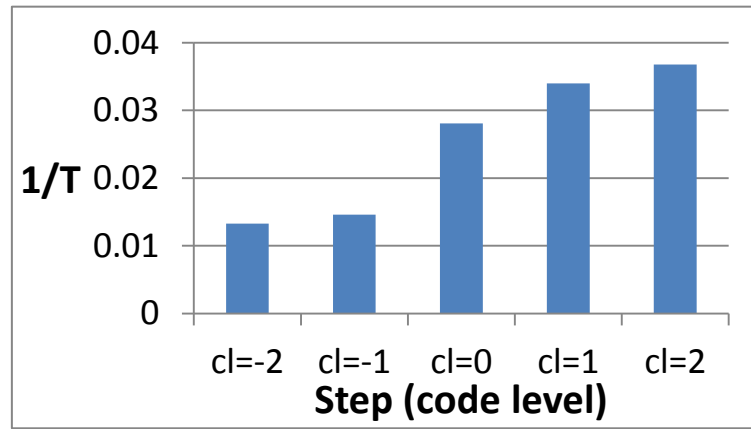
接續利用陡升路徑法接近其極值點位置，以陡升路徑法作為一條有條理的最適化方式逼近極值點，由二因子得出之結果維生素 A=0.941% 及維生素 E=0.736% 以固定距離向前及向後延伸，逼近最適值之區域。

$$\Delta X_1 = \Delta X_2 \cdot 0.01228 / 0.00558$$

由以上實驗得知，溶菌酶活性從 coded level 為 -2、-1 逐漸升高，達到 0 之後成長趨緩，故極值點在 coded level > 2。

表十三、陡升路徑法實驗設計表

Factor	Unit	-2	-1	0	1	2
維生素 A	%	0.341	0.641	0.941	1.241	1.541
維生素 E	%	0.463	0.600	0.736	0.872	1.009



圖十、以陡升路徑法探討在設計之 coded level 下維生素 A 和 E 對溶菌酶活性影響

(三) 反應曲面法 (Response surface methodology, RSM)

透過 RSM 反應曲面法，我們能夠更精確地得知其回歸方程式為

$$Y=0.0266+(0.0061)X_1+(0.0017)X_2+(-0.000976)X_{12}+(0.000282)X_1X_2+(-0.000174)X_{22}$$

其 R^2 值=0.9780，再經由 ANOVA 分析發現其 Pr 值在維生素 A 及維生素 E 皆小於 0.0001，代表維生素 A 及維生素 E 皆對溶菌酶之活性有顯著影響。利用 SAS 分析得到其 3D 曲面圖。經由此分析能夠更精確地得知維生素 A 及維生素 E 之最佳化濃度最大值為 5% 維他命 A 及 10% 維他命 E。

表十四、RSM 實驗設計表

Factor	Unit	-1.68	-1	0	1	1.68
維生素 A	%	0.437	0.641	0.941	1.241	1.445
維生素 E	%	0.507	0.600	0.736	0.872	0.965

表十五、RSM 中心混成設計設定參數

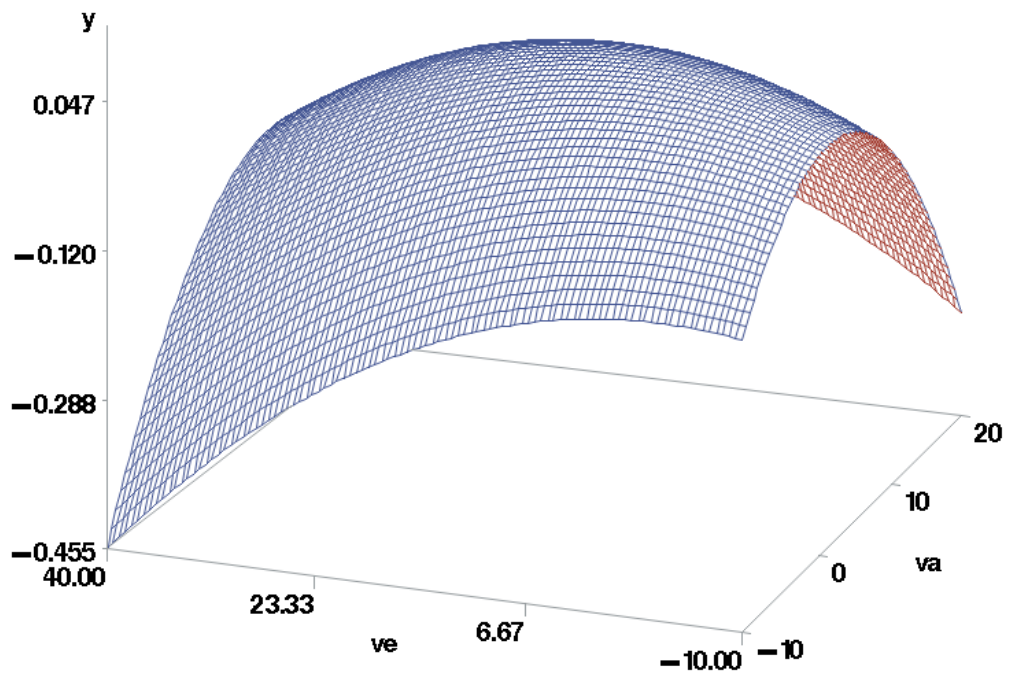
Number	維生素 A	維生素 E	Number	維生素 A	維生素 E	Number	維生素 A	維生素 E
1	-1.68	0	10	-1	-1.68	19	1	1.68
2	-1.68	1	11	0	0	20	1	-1.68
3	-1.68	-1	12	0	1	21	1.68	0
4	-1.68	1.68	13	0	-1	22	1.68	1
5	-1.68	-1.68	14	0	1.68	23	1.68	-1
6	-1	0	15	0	-1.68	24	1.68	1.68
7	-1	1	16	1	0	25	1.68	-1.68
8	-1	-1	17	1	1			
9	-1	1.68	18	1	-1			

表十六、RSM 中心混成實驗之 ANOVA 分析

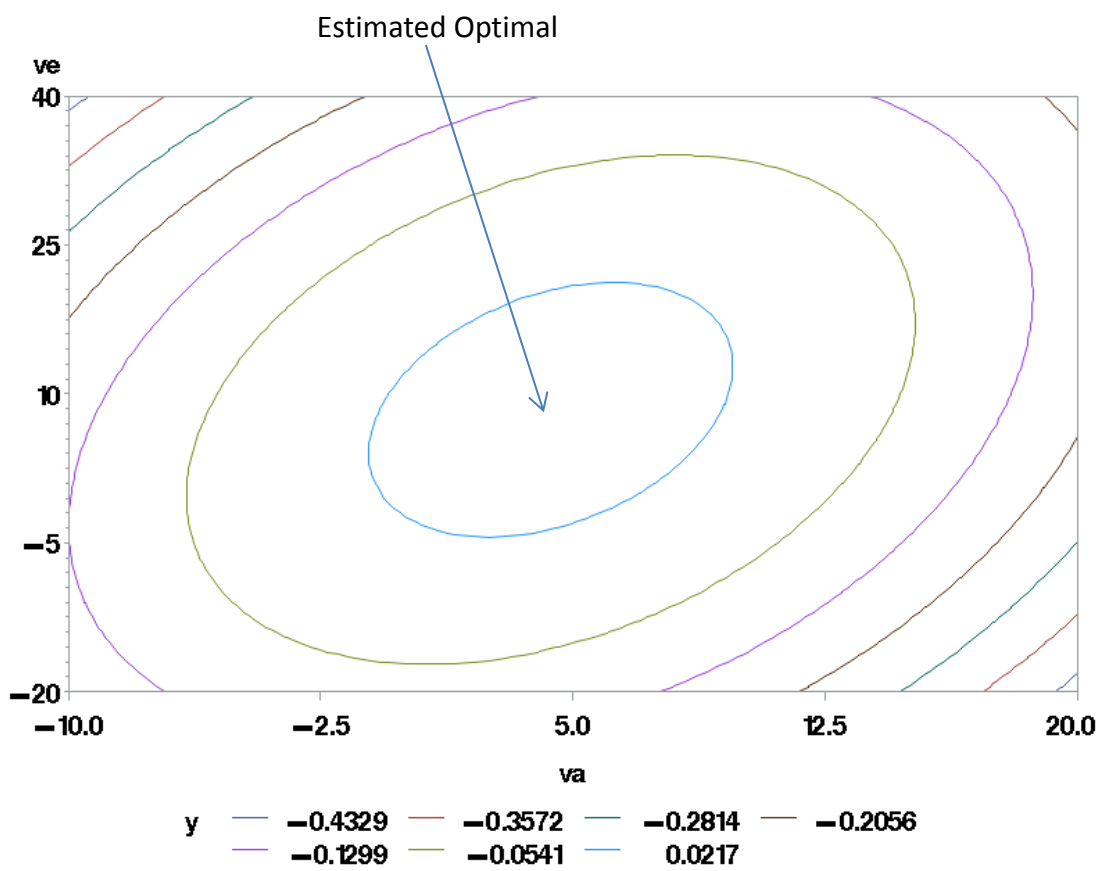
Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr> t	Parameter Estimate
Intercept	1	0.026589	0.000597	44.56	<.0001	0.026589
VA	1	0.006143	0.000222	27.73	<.0001	0.010320
VE	1	0.001690	0.000222	7.63	<.0001	0.002838
VA*VA	1	-0.000976	0.000245	-3.98	0.0008	-0.002753
VE*VA	1	0.000282	0.000179	1.58	0.1315	0.000797
VE*VE	1	-0.000174	0.000245	-0.71	0.4877	-0.000490

表十七、RSM 最大變數預測表

Coded Radius	Estimated Response	Standard Error	Uncoded Factor	
			VA	VE
0.0	0.026589	0.000597	0	0
0.1	0.027636	0.000594	0.161170	0.047414
0.2	0.028636	0.000584	0.320509	0.100848
0.3	0.029590	0.000570	0.477683	0.160733
0.4	0.030500	0.000553	0.632327	0.227477
0.5	0.031366	0.000535	0.784049	0.301443
0.6	0.032191	0.000520	0.932436	0.382919
0.7	0.032976	0.000512	1.077077	0.472103
0.8	0.033723	0.000516	1.217575	0.569076
0.9	0.034434	0.000538	1.353569	0.673792
1.0	0.035110	0.000578	1.484756	0.786066



圖十一、RSM 反應曲面圖



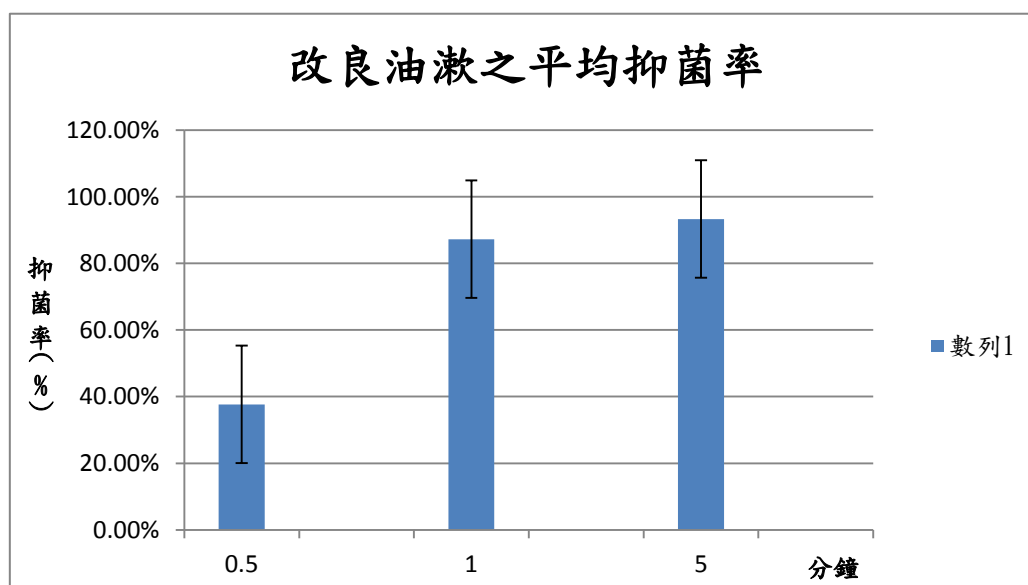
圖十二、RSM 反應曲面等高線圖

八、最佳化產品效果測試及成本分析

最佳化測試之維生素 A 與維生素 E 之建議添加量為：5% 維他命 A 及 10% 維他命 E。考量成本及建議攝取量（成年人每日維生素 A 0.6 mg 與維生素 E 12.0 mg），改良之產品將苦茶油中的維生素 A 和維生素 E 提高二因子水準分析之預測最大值 0.94% 和 0.74%，取樣方式同實驗一。參與取樣者 9 人，共分 3 組，分別進行 30 秒、1 分鐘與 5 分鐘，採樣進行共計 1 日。培養並記錄其菌落數變化如下表。實驗結果發現油漱 1 分鐘平均抑菌率可達 87.25%，5 分鐘平均抑菌率可達 93.29%。另計算成本約為 12.5 元（苦茶油為源順苦茶油之市價換算，維生素價格由 Sigma Aldrich 所公布之藥品價格進行換算）。經由市場調查市售之漱口水成本，每日使用漱口水之平均成本為 14.88 元，油漱法價格便宜 16%。

表十八、進行改良油漱前後之菌落數及其抑菌率

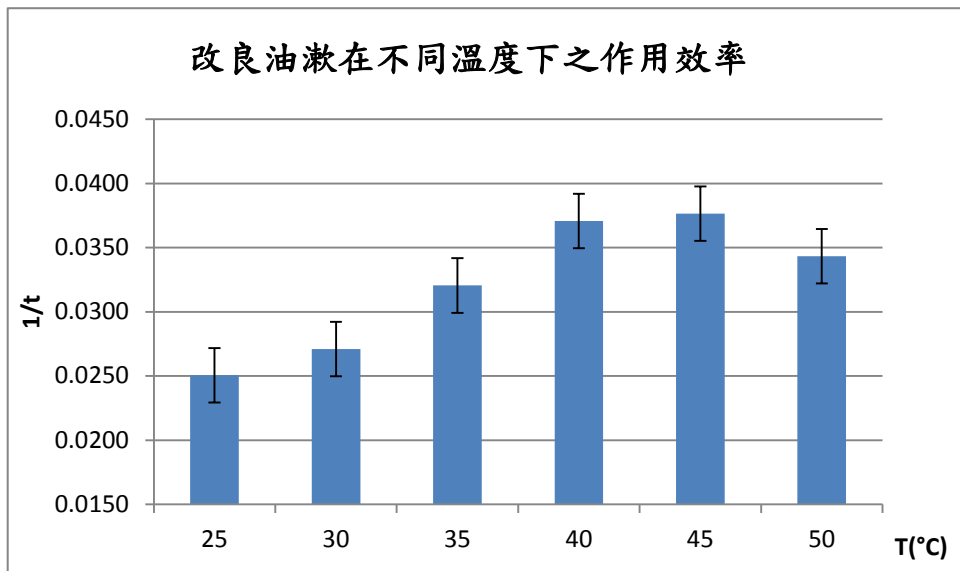
	0.5 分鐘		1 分鐘		5 分鐘	
	前	後	前	後	前	後
平均菌落數	381.33	237.67	460.00	58.67	273.33	18.33
平均抑菌率	37.67%		87.25%		93.29%	



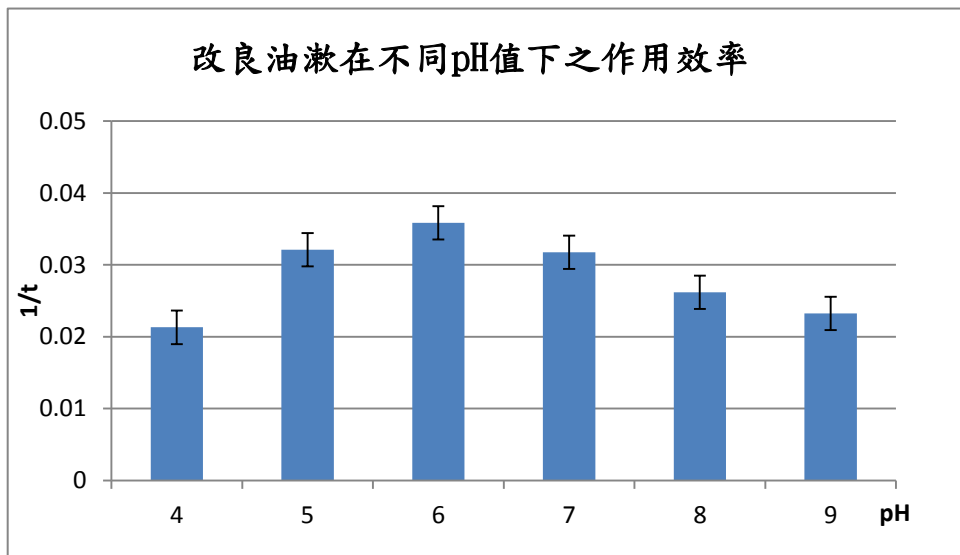
圖十三、改良後油漱之平均抑菌率

九、最佳化產品之最佳作用環境

為得知最佳化後的產品否適用於人體口腔環境，故測試其在不同溫度及酸鹼值下的抑菌效率，首先測試體溫溫度 37°C 下，不同 pH 值得抑菌速率，調整酸鹼值之材料使用之 KOH 及 KH_2PO_4 水溶液，發現其最作用酸鹼值為 pH 5.9，符合口腔之弱酸環境，令測試產品在 pH 5.9 時，不同溫度下之反應速率，結果顯示 $40\sim 45^{\circ}\text{C}$ 為其最佳作用溫度，此結果亦非常接近人體之口腔環境。



圖十四、改良後油漱在不同溫度($25\sim 50^{\circ}\text{C}$)下之作用效率



圖十五、改良後油漱在不同 pH 值(pH 4~9)下之作用效率

柒、 討論

根據數據顯示，以橄欖油漱口，在持續的 5 天取樣中，首日之抑菌率僅 37.97% 其抑菌率不斷上升達到 96%；若以苦茶油進行油漱，首日抑菌率即達 73%，5 日後上升至 95%。抑菌的效果趨勢相較於橄欖油則更為穩定。而以蒸餾水漱口則幾乎沒有抑菌效果。而以圖二顯示，在每日油漱法進行前口腔的細菌數呈現下降的趨勢，說明油漱法之抑菌效果具有持續性，就本實驗之結果來看，透過長期的油漱法，可以減少日常口中的細菌數。另受試者進行油漱後對於苦茶油的評價較高，因為以苦茶油漱口較少油膩感，且苦茶油具有其特殊的香味，可以增加人們油漱的意願。再以油漱法與市售漱口水效果作比較，在 5 天以漱口水標示之最佳化漱口時間的取樣中（圖三），抑菌率穩定地維持在約 50% 的範圍，菌落數也有下降的趨勢，但與油漱法之抑菌效果比較，連續 5 天取樣的效果仍以油漱法為佳。

利用不同油品油漱前後之定序菌種結果顯示，橄欖油可抑制之菌種大部分為芽孢桿菌屬 (*Bacillus sp.*) 的菌種，而芽孢桿菌在過去的文獻中無威脅性紀錄，屬於人類口腔內正常的共生菌種，而苦茶油之定序結果則發現可抑制易導致感染的菌種，包括戀臭假單孢菌(*Pseudomonas putida*)(註 10)、奈瑟氏菌屬(*Neisseria sicca*)，以及造成牙周病的主要菌種，牙疳鏈球菌(*Streptococcus cristatus*)。因此由此推論苦茶油較橄欖油更有減少口腔細菌所引起之相關疾病發生的能力。

根據抑菌環實驗的比較，若以單獨成分（維他命 A、E 以及溶菌酶）的抑菌環比較，則以維他命 A 之抑菌環最大，而同濃度之複合成分的抑菌環則以維他命 A、E 與溶菌酶之混合液之抑菌環最大。另以油品以及漱口水進行抑菌環實驗發現橄欖油以及漱口水皆會抑制芽孢桿菌的生長，但苦茶油可針對致病菌牙疳鏈球菌進行有效的抑制，經查詢文獻後發現，維生素 A 加強溶菌酶之抑菌效果（註 4）。

根據 I.G. Guimarães (註 4) 等的研究，血清中維生素 A 可以增加溶菌酶之活性，而根據美國國立衛生院 (NIH) 所公布，維生素 E 可有效防止維生素 A 在反應過程中的氧化現象(註 9)。因文獻探討中發現維生素 A，維生素 E 可作為溶菌酶之輔酶，有增強溶菌酶活性與效果的潛力，為證明維生素 A、維生素 E 在本實驗中對溶菌酶之活性之影響，故採用 Sigma Aldrich 公司所出品的 Enzymatic Assay of Lysozyme Kit，對於其反應速率進行分析比較。發現加入 1% 維生素 A 和 1% 維生素 E 皆可增強溶菌酶活性達 2 倍。

委外之測量為使用高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography)，經分析後發現，苦茶油中維生素含量雖達 2.1mg/g，但維生素 A 之濃度僅有 0.0008 %。故推論油漱所需之時間長度，可能是因為受維生素濃度

之限制。為確認此一機制與最適濃度之可能範圍，並改良油漱療法，因此進行以下之 RSM 分析實驗。

首先以二水準因子設計法探討維生素 A、維生素 E 及 Lysozyme 之交互作用，可由其 ANOVA 結果推論維生素 A 及維生素 E 對 Lysozyme 具交互作用，且維生素 A 與維生素 E 之間亦具有交互作用，可以說明以上實驗對於三者之間之推論是正確的，進一步經由陡升路徑法及反應曲面法進行有條理地逼近極值點，找出維生素 A 和維生素 E 對 Lysozyme 活性影響之濃度最大值為約為 5% 維生素 A 及 10% 維生素 E。而在小於極值處，維生素 A 和維生素 E 之濃度愈高，溶菌酶之活性愈強。

考量改良產品之成本與維生素每日之建議攝取量，改良之產品將維生素 E 原本的 0.21% 提升至 0.74%，維生素 A 之濃度由原本的 0.0008% 提升至 0.94%。進行樣本分析後，發現改良後之油漱法時間 5 分鐘內即可達原油漱法 15 分鐘之抑菌效果。進一步測試其最佳作用環境，發現其最適酸鹼值為 pH 5.9，而其最佳作用溫度區間則為 40~45°C，非常接近人體口腔 pH 6，37°C 的環境。市面上之漱口水進行一次約需 14.88 元，而改良後之油漱法約為 12.5 元，故油漱法較市面上之漱口水之抑菌效果更佳且價格便宜 16%，若能大量生產降低成本，未來有潛力成為口腔健康保健的大眾選擇。

捌、 結論

在比較各種油品抑菌效果的實驗中，橄欖油與苦茶油的抑菌效果經過 5 天的療程皆可高達 95%，相較於蒸餾水，油漱法具有顯著的抑菌效果。在進行漱口水與油漱法的抑菌效果比較中，我們發現油漱法對於抑制細菌的效果較為穩定長效。而且隨著天數的增加，油漱法的抑菌效果也逐漸上升，因此證明油漱法具有長效型的抑菌效果。

在各種油品油漱法的效果中，橄欖油對於芽孢桿菌屬(*Bacillus sp.*)的菌種有較佳的抑菌效果，苦茶油則可以抑制造成齲齒的牙齦鏈球菌(*Streptococcus cristatus*)，以及抑制多種造成感染的菌種。本研究亦分離出油品中維生素 A 以及維生素 E 及唾液中溶菌酶的成分進行抑菌環實驗。結果顯示油中所含有的維他命 A 與維他命 E 皆有抑菌效果。混和成分交叉分析後發現，維生素 A 以及維生素 E 與溶菌酶共同作用抑菌效果明顯提升，本實驗中證實維生素 A 以及維生素 E 可增強溶菌酶之活性，並增強其抑菌效果可達 2 倍。

在 HPLC 的分析結果中，發現苦茶油中維生素 A 之含量非常少，約為 8 p.p.m.。進一步經由二因子水準分析可以得知維生素 A 和維生素 E 與溶菌酶存在交互作

用，並利用反應曲面法，考慮成本與維生素之最佳攝取量，提高苦茶油中維生素之含量，改良之產品將維生素E原本的0.21% 提升至0.74%，維生素A之濃度由原本的0.0008% 提升至0.94%。改良之油漱法與成分未調製之苦茶油比較，發現油漱時間可有效縮短為原本的三分之一，抑菌效果可達93.29%。而其最佳作用環境(pH 5.9, 40~45°C)亦符合人體口腔之環境。且改良後油漱法之成本較市面上之漱口水之抑菌效果更佳且價格便宜16%。

玖、 未來展望

1. 進一步設計實驗探討油漱法是否可針對系統性疾病進行治療及改善，驗證是否如菲佛醫師所述，油漱療法可以改善糖尿病及多項慢性病症。
2. 進一步設計實驗探討苦茶油內其他可能的抑菌相關成分與抑菌機制。
3. 針對油漱法之使用者體驗進行改良，減少其油膩感與口味等感受，使使用者更有進行油漱療法之意願。
4. 研究大量生產進一步降低成本之可能性，使其未來有潛力成為口腔健康保健的大眾選擇。並將油漱法推廣至全世界，降低日趨嚴重的齲齒病例，也將推廣至開發中國家，幫助當地較貧窮之居民透過有效且便宜的方式清潔口腔。

附錄 1

參考資料

- 註1. Bruce Fife, Oil Pulling Therapy, Piccadilly Books, 2013
- 註2. camellia-oil.org, The Composition of Camellia Oil
- 註3. Oliveoilsource, Chemical Characteristics of Olive oil
- 註4. Carol Davila, TLC Applications on separation and quantification of fat-soluble vitamins, 2009
- 註5. I.G. Guimarãesa, C. Limb, M. Yildirim-Aksoyb, M.H. Lic, P.H. Klesiusb
Effects of dietary levels of vitamin A on growth, hematology, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*
- 註6. 沈明來，試驗設計學，九州出版社，2007.01.01
- 註7. 中華民國每日營養素攝取建議量表(Recommended Daily Nutrient Allowance, RDNA)1993
- 註8. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, et al. Infectious diseases society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. Clin Infect Dis, 2012
- 註9. NIH, Vitamin E Fact Sheet for Consumers, May 9, 2016
- 註10. Clinical spectrum of *Pseudomonas putida* infection.