

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : 油茶種殼等廢棄物之免疫調節功效研究 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 葉秋伶
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-041-001-B
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授： 吳明娟

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學生物科技系
(含碩士班)

中華民國

105年03月25日

一、摘要

油茶為山茶科山茶屬的常綠小喬木，其種子成熟後經榨油，俗稱苦茶油。油茶除種子提供榨油外，果殼 (fruit coat)、種殼 (seed shell) 及油茶粕 (pomace) 皆為榨油後之油茶廢棄物。研究中鑑定出來的油茶廢棄物生理活性成分主要為三萜皂素、多酚類、多醣類。台灣主要栽種之油茶分為兩類，大果種油茶 (*Camellia oleifera*) 及小果種油茶 (*Camellia tenuifolia*)。其中大果種由大陸引進，免疫功效之相關研究甚多，而台灣原生小果種尚未有人發表。

本研究與花蓮農改場合作，以當地生產小果油茶後產生之廢棄物為材料，進一步以溶劑萃取分層得到不同區分。利用 DPPH 自由基的清除和總多酚含量，評估小果油茶之廢棄物的區分之抗氧化功效。接著以脂多醣 (LPS) 刺激巨噬細胞 RAW264.7 試驗，探討小果油茶之廢棄物區分抑制發炎媒介物一氧化氮 (NO) 的產生以及細胞激素介白素-6 (IL-6) 分泌能力的功效，並進一步探討抗發炎機轉。結果發現小果種殼乙醇粗萃取物的甲醇區分具有明顯抗氧化及抗發炎效果，並且能抑制誘導型一氧化氮合成酶 (iNOS) 的蛋白表現並降低 IL-6 產量。由上述結果可推論，小果油茶廢棄物可能具抗氧化及抗發炎功效，有進一步開發的機會，促使油茶廢棄物再利用，實現環保理念。

二、研究動機與研究問題

油茶除種子提供榨油外，果殼 (fruit coat)、種殼 (seed shell) 及油茶粕 (pomace) 皆為油茶榨油後之加工廢棄物。有關油茶廢棄物可作為資源化的相關研究甚多，在研究中鑑定出來的生理活性成分主要為皂素。然而；根據許多研究顯示，大果種油茶廢棄物生理活性成分主要為皂素、黃酮類及多醣類，並且具有抗發炎及抗氧化功效；相較之下，小果種油茶廢棄物之相關研究報告僅一篇，其在探討有關小果種油茶廢棄物之抗氧化及抗衰老功效。本實驗欲探討小果種油茶廢棄物之抗氧化及抗發炎功效，以作為開發油茶副產物功能性產品之基礎，另一方面也促使油茶廢棄物再利用。

三、文獻回顧與探討

油茶為山茶科山茶屬的常綠小喬木，其種子成熟後經榨油，俗稱苦茶油。苦茶油為世界四大木本食用油之一，它的物理、化學特性和橄欖油極為相似，有東方的橄欖油之稱。苦茶油英名 *camellia seed oil*，目前台灣種植的油茶品種有二種，一為栽培種油茶，又稱大果種油茶 (*Camellia oleifera*)，另一種為野生細葉油茶，又稱小果種油茶 (*Camellia tenuifolia*) (陳俊仁 and 孫文章 2011)。

苦茶油除種子提供榨油外，果殼 (fruit coat)、種殼 (seed shell) 及油茶粕 (pomace) 皆為榨油後之油茶廢棄物。油茶粕在榨油後產生，通常含有未完全榨出的油脂，以及醣類、粗纖維、粗蛋白、皂素、黃酮等種物質，具多種生物活性。因其含有皂素，具有良好起泡性，將其與茶籬敲碎，研磨成粉，即為茶粉，亦稱茶麩，被利用為天然環保清潔劑，可清洗蔬果、碗盤、衣物、衛浴等物品，或清潔臉、手、泡腳等身體部位。茶粕也常被應用於清除水田內之福壽螺或其他軟體動物。此外，茶粕尚具生物活性，例如：溶血、消炎、抑制蟎、菜蟲等(吳嘉盈 2009; 周宜達, 葉一隆, and 陳庭堅 2015; 邱惠鈞 2009; 張浣筑 2013; 游善植 2012;

楊正偉 2007)。油茶廢棄物相關研究文獻甚多，在研究中鑑定出來的生理活性成分主要為三萜皂素、多酚類、多醣類，其中皂素具有抗菌、抗發炎及抗氧化的活性(Chen et al. 2010; Hu et al. 2012; Ye, Xing, and Chen 2013; Zhang et al. 2014)。

除了皂素外，油茶廢棄物尚有含多種類黃酮及類黃酮的配糖體 (Chen et al. 2009)，其中尤以山奈酚 (kaempferol) 衍生物的相關研究最多(Chen et al. 2009; Cheng et al. 2014; Gao et al. 2011; Liu et al. 2014; Ye et al. 2012; Ye, Guo, and Luo 2012; Huang 2009)。這些類黃酮具有強抗氧化性(Chen et al. 2010)，抗發炎及止痛功效(Ye, Guo, and Luo 2012)，不管在試管實驗或是活體實驗中，都具有良好的抗氧化能力，可當作氧化劑保護腦部免於受到自由基之傷害(Ye et al. 2012)，也具強抗發炎能力(Liu et al. 2014)，可保護腸胃道黏膜發炎的功能(Cheng et al. 2014)。

油茶果殼多醣類分子量為 362 kDa 的區分在試管實驗中，具有清除超氧離子及羥自由基的能力，且成分含有 rhamnose、fructose、arabinose、mannose、galactose、glucose (Jin 2012)；另外油茶粕的多醣體在動物實驗中，具有毒殺 sarcoma 180 腫瘤細胞的能力 (Jin and Ning 2012)。

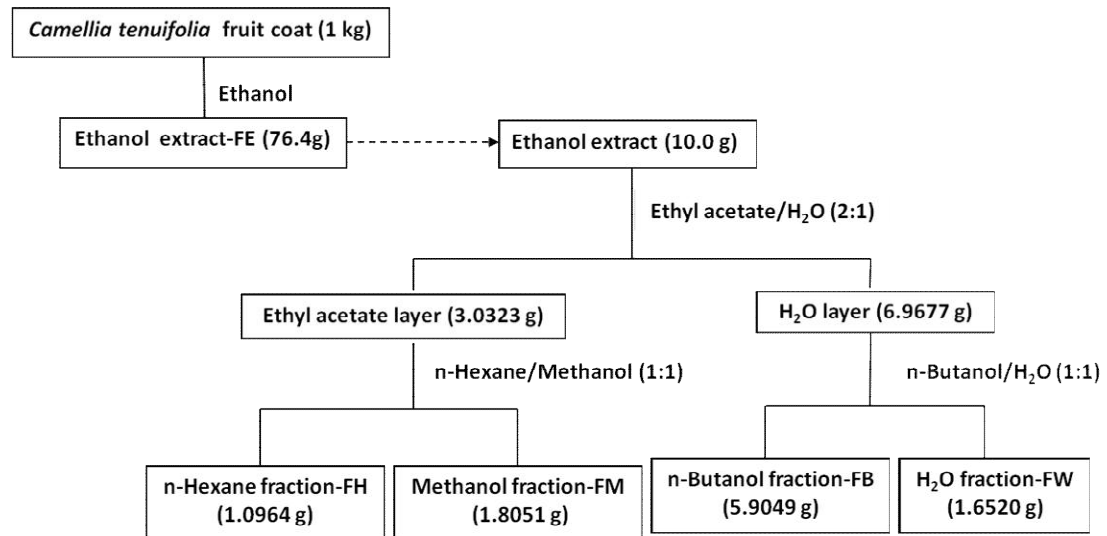
以上為油茶廢棄物之利用，相較之下油茶種殼之免疫調節的相關研究較少，又因小果種部分免疫調節相關功效尚未有人發表，因此本研究擬以細胞培養 (RAW264.7) 試驗，探討小果油茶廢棄物之各區分抑制免疫 mediator (NO) 的產生、細胞激素 (IL-6) 的分泌能力，以評估小果油茶廢棄物之抗發炎功效活性及機轉。

四、研究方法及步驟

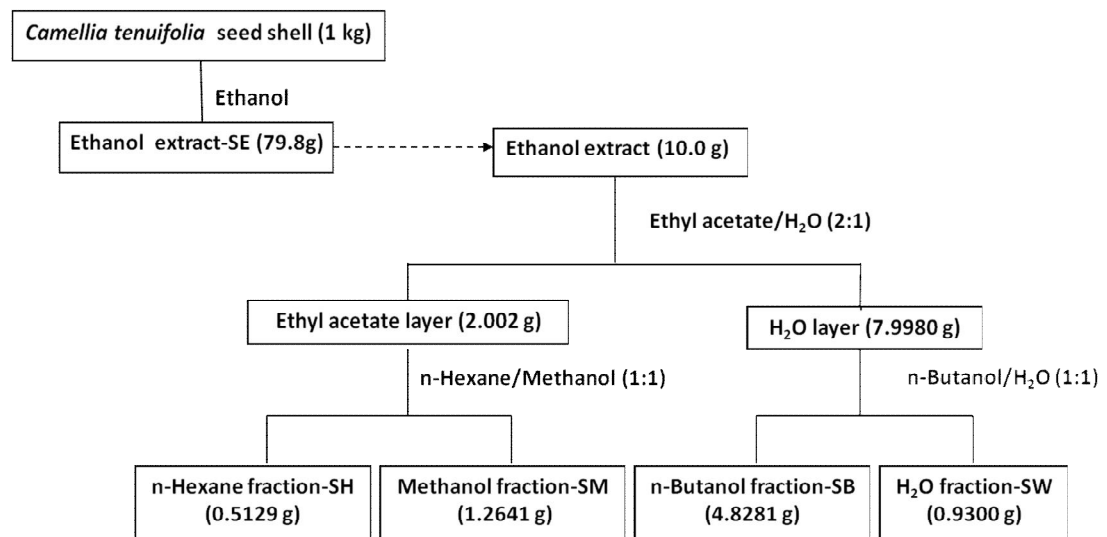
1. 小果油茶廢棄物的製備

首先以酒精粗萃後得粗萃物 (crude extract)，粗萃物再以不同溶劑進行再次萃取分層，分為正己烷區分 (*n*-hexane fraction)、甲醇區分 (methanol fraction)、正丁醇區分 (*n*-butanol fraction) 與 H₂O (H₂O fraction) (圖一、二)；而茶粕粗萃後

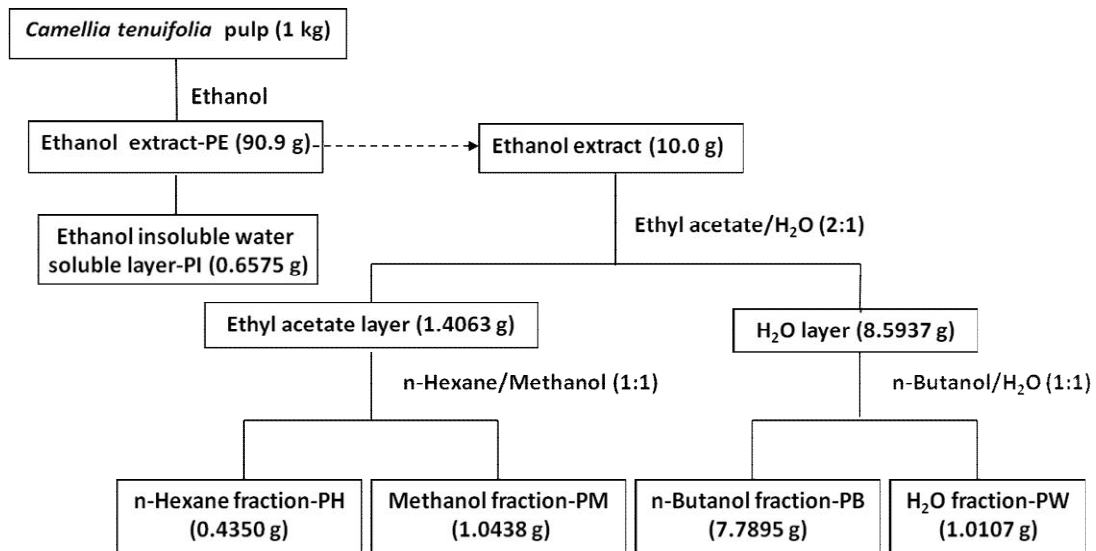
之酒精不溶物再以水進行一次萃取得酒精不溶層 (圖三)。



圖一、小果油茶廢棄物果殼萃取流程。



圖二、小果油茶廢棄物種殼萃取流程。



圖三、小果油茶廢棄物茶粕萃取流程。

2. Folin-Ciocalteu 分析

在 ELISA plate 中，加入 8 μ l Folin-Ciocalteu 試劑，再加入 20 μ l 適當稀釋後的樣品混合均勻，在室溫下反應 10 分鐘。加入 2% Na_2CO_3 溶液 (200 μ l/well) 混合均勻，於室溫下反應 10 分鐘。以 ELISA reader 偵測 A_{620} 並記錄，結果以每毫克的萃取物含有多少微克的沒食子酸 (gallic acid) 來表示 (μ g GAE/mg dw)。

3. DPPH 自由基清除能力測定

取 990 μ l 新鮮配製 0.1 mM DPPH 之甲醇溶液 (Merck)，加入 10 μ l 待測樣品，另以 α -Tocopherol (vitamin E) 來作為評估的對照組。混合後，於水浴 37°C 反應 30 分鐘，測定 A_{517} 並紀錄之。DPPH 清除能力的計算公式：

$\text{scavenging \%} = (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac} \times 100\%$ ，As 及 Ac 分別為樣品及未加樣品的 $A_{517\text{nm}}$ 。利用樣品濃度與 DPPH 清除能力的線性迴歸公式，計算出清除 50% 的 DPPH 所需的樣品濃度 (IC_{50})，每個樣品做三重複。

4. 細胞培養

小鼠巨噬細胞 (RAW264.7) 來自生物資源保存研究中心 (台灣新竹)，以含有 10% 胎牛血清 (FBS) 以及 2 mM glutamine, 1% non-essential amino acid, 1

mM pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin 之 DMEM 培養基，培養在 37°C、5% CO₂ 之培養箱。

5. 亞硝酸鹽濃度測定

RAW264.7 細胞以 1×10^7 /ml 培養於 96-well 細胞培養盤中，加入 polymyxin B (PMB, 10 µg/ml) 或小果油茶萃取物區分 (0.05, 0.1 mg/ml)，預先處理反應 30 分鐘後，再以 LPS (100 ng/ml) 誘導發炎，共同培養 18 小時。吸取上層液加入 Griess reagent (100 µl/well) 反應，並在 30 分鐘內以 ELISA microplate reader 測定波長 550 nm 之吸光值，以不同濃度 NaNO₂ 標準品製作檢量線比對。

6. 細胞存活率測定

本實驗採用 MTT assay。活細胞內粒線體之琥珀酸去氫酶會與 MTT 【3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide】 進行氧化還原而形成紫色結晶 formazan，顏色越深代表存活率越高，此不溶物會堆積於細胞內，需先經過 DMSO 打破細胞才能測得存活率。

上述亞硝酸鹽濃度測定之細胞培養盤的盤底細胞，在吸取上層液後，加入 0.5% MTT 溶液 (100 µl/well) 並放回 37°C、5% CO₂ 之培養箱反應三小時，以 suction 吸除上層液，加入 DMSO (100 µl/well) 後輕拍，以 ELISA microplate reader 測定波長 550 nm 之吸光值。

7. 細胞激素 (IL-6) 測定

RAW264.7 細胞以 1×10^7 /ml 培養於 96-well 細胞培養盤中，預先處理 PMB (10 µg/ml) 或小果油茶萃取物 (0.05, 0.1 mg/ml)，反應 30 分鐘後，再以 LPS 誘導發炎，共同培養 18 小時，吸取上層液，以 OptEIA™ Set Mouse IL-6 套組分析細胞激素 IL-6 之濃度。

8. 西方墨點法

將等量蛋白以 8 到 12% 的 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 進行分離，再將分離的蛋白轉漬至 PVDF Transfer Membrane (GE Healthcare, Amersham Hybond-P) 上，以含有 5% 脫脂奶粉的 TBST 當作 Blocking buffer 於 4°C 下進行 Blocking 6 至 8 小時，利用一級抗體於 4°C 進行雜交作用 14 至 16 小時。再以 horse-radish peroxidase-conjugated 對應的二級抗體於室溫雜交作用 2 小時，最後以 ECL plus (GE Healthcare, Germany) 及 Hyperfilm ECL 壓片掃描，利用 ImageJ 影像分析軟體定量。

9. iNOS mRNA 表現分析

此部分採取 RT-Q-PCR 測定 iNOS mRNA 的表現。RAW264.7 細胞以 1×10^6 /mL 密度培養於 6-well 細胞培養盤中，加入小果油茶萃取物，共同培養 12 小時，用 illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) 配合 High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, CA) 來進行反轉錄實驗。接著以 Power SYBR Green PCR (Applied Biosystem) 利用下表的 iNOS 及 β -actin (控制組) 引子對，進行 real-time PCR，以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 定量化後為其表現數值。

Gene	Primers	Amplicon (bp)
β -actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	154
iNOS	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA GTGGACGGGTTCGATGTCAC	127

10. 統計分析

本文所提及之實驗皆作三重複以上，且實驗結果以平均值±標準差表示，並利用 Tukey 多重比較法事後比較檢定，當 p-value 小於 0.05 即表示具有統計學上之顯著性差異。

五、結果

1. 小果油茶廢棄物抗氧化活性分析

利用 Folin-Ciocalteu 試劑測定粗萃物及各區分之總多酚含量，結果如表一所示，甲醇區分明顯含量皆最高，乙醇及正丁醇區分次之，H₂O 區分含微量，而正己烷區分在此試驗中未被檢測出含有酚類化合物。在 DPPH 自由基清除能力測定中，發現結果 (表二) 與總多酚含量相對應，即總多酚含量愈高，自由基清除能力愈佳；反之，總多酚含量愈低，自由基清除能力愈低。在 DPPH 試驗中使用具強抗氧化能力的 α -tocopherol 作為正對照組，而甲醇層自由基清除率與 α -tocopherol 相當，甚至更強。由於總多酚含量與 DPPH 自由基清除率有強烈相關性，可顯示出小果種油茶果殼等萃取物的抗氧化化合物成分大多是酚類化合物，且主要存在於甲醇層，故以甲醇層萃取物進行後續實驗。

表一、小果油茶乙醇粗萃取物和各區分之總多酚含量。

Total phenolic content ($\mu\text{g GAE}/\text{mg dw}$)			
	fruit coat	seed shell	Pulp
Ethanol extract	107.37\pm3.54	91.42 \pm1.47	62.40 \pm3.26
Hexane fraction	< 1	< 1	< 1
Methanol fraction	226.79 \pm 1.85	266.30 \pm 7.29	120.56 \pm2.16
Butanol fraction	129.13 \pm 2.55	106.95\pm3.09	43.34 \pm0.27
H₂O fraction	51.85 \pm 3.16	88.90 \pm5.71	4.73 \pm2.89
Ethanol insoluble water soluble layer			52.09 \pm 0.37

Total phenolic content: 8 μl Folin-Ciocalteu 試劑與 20 μl 樣品反應混合 10 分鐘，再加入 2% Na₂CO₃ 溶液反應 10 分鐘，隨後以 ELISA reader 偵測 A₆₂₀，結果以 $\mu\text{g GAE}$ (gallic acid)/mg dw 表示。

表二、小果油茶乙醇粗萃取物和各區分之 DPPH 自由基清除能力。

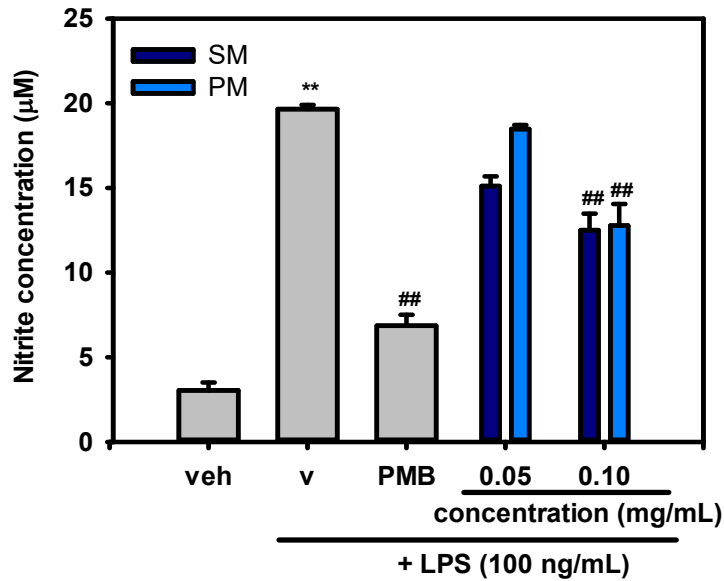
IC50 for DPPH scavenging (mg/ml)			
	fruit coat	seed shell	Pulp
Ethanol extract	19.60	18.33	84.96
Hexane fraction	-	-	-
Methanol fraction	7.34	5.47	14.38
Butanol fraction	13.18	8.53	170.99
H₂O fraction	27.25	5.88	218.03
Ethanol insoluble water soluble layer			29.71
Vitamin E		13.30	

DPPH scavenging: 以 990 μ l 新鮮配製 0.1 mM DPPH 甲醇溶液，加入 10 μ l 樣品，另以 α -Tocopherol (vitamin E) 來作為評估的對照組。混合後，於水浴 37°C 反應 30 分鐘，測定 A₅₁₇。

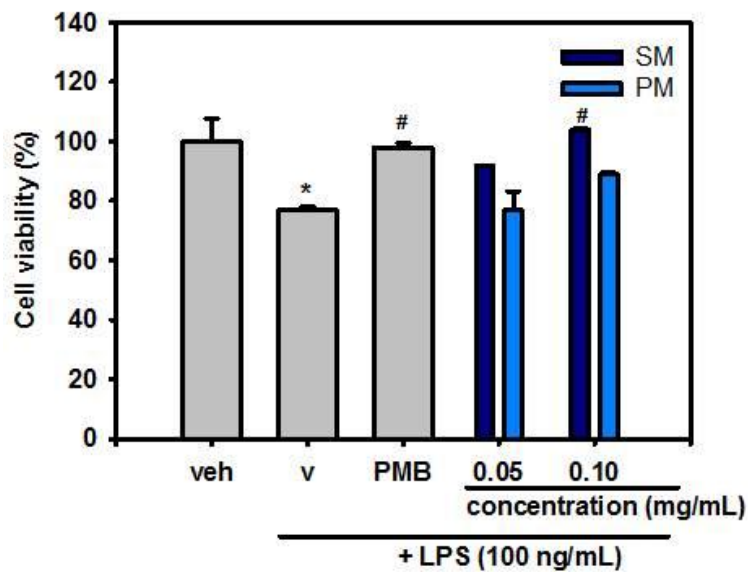
2. 種殼及茶粕甲醇區分抗發炎能力測定

因果殼的甲醇區分 (FM) 經多次測試，發現其結果不穩定，細胞毒性高 (數據未顯示)，故僅取種殼及茶粕的甲醇區分 SM 及 PM 進行測試。此實驗利用革蘭氏陰性菌的莢膜成分酯多醣 (LPS) 來刺激小鼠巨噬細胞 RAW264.7。細胞預先處理 SM 及 PM 反應 30 分鐘，結果如圖四顯示，單獨加入 LPS (100 ng/ml) 反應 18 小時後，NO 產量相對於未受刺激的細胞增加了約 8 倍；若加入 PMB (10 μ g/ml) 共同處理，可以有效抑制 LPS 誘導之 NO 的產量。共同處理 SM 及 FM 的效果雖然較 PMB 弱，但是在 0.1 mg/ml 時可以顯著抑制 NO 產生。

接著以 MTT 分析細胞存活率，圖五顯示 LPS (100 ng/ml) 處理 RAW264.7 細胞產生~20% 的細胞毒性，PMB 共同處理則可完全回復細胞存活率。添加 0.05 和 0.1 mg/ml 的種殼甲醇區分 (SM) 也可以顯著回復細胞存活率，但是茶粕的甲醇區分 (PM) 則無明顯影響。



圖四、小果油茶種殼與茶粕甲醇區分對 RAW264.7 受 LPS 刺激下之 NO 產量的影響。RAW264.7 細胞以 polymyxine B (PMB, 10 µg/ml) 或 0.05, 0.1 mg/ml 的種殼甲醇區分 (SM)、茶粕甲醇區分 (PM) 處理 30 min 後，再與 LPS 共同培養 18 小時。**, $p < 0.01$ 表示與未加 LPS 的 vehicle 組相比，具顯著性差異。##, $p < 0.01$ 表示與加 LPS 的 vehicle 組相比，具顯著性差異。

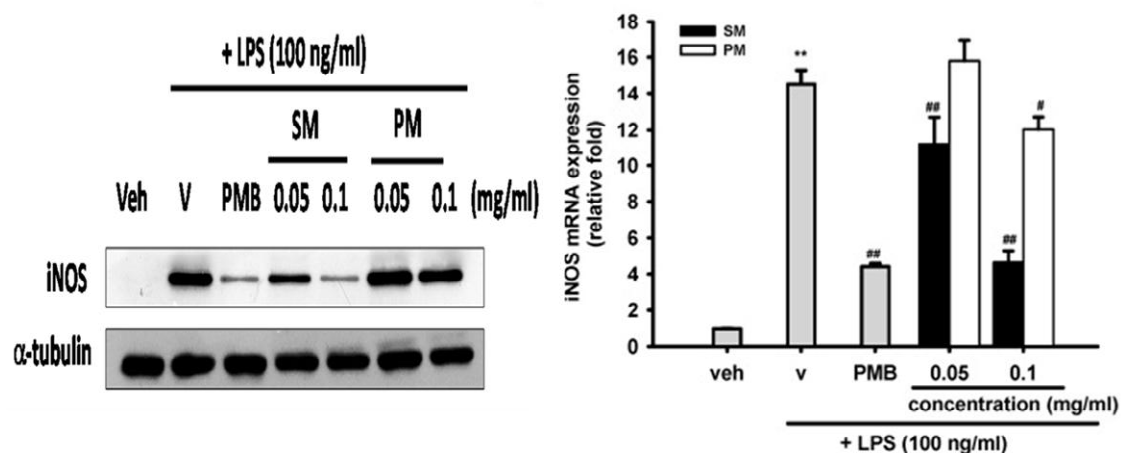


圖五、小果油茶種殼與茶粕甲醇區分對 RAW264.7 受 LPS 刺激下之存活率的影響。RAW264.7 細胞以 polymyxin B (PMB, 10 µg/ml) 或 0.05, 0.1 mg/ml 的種殼甲醇區分 (SM)、茶粕甲醇區分 (PM) 處理 30 min 後，再與 LPS 共同培養 18 小時。本實驗使用 MTT assay。*, $p < 0.05$ 表示與未加 LPS 的 vehicle 組相比，具顯著性差異。#, $p < 0.05$ 表示與加 LPS 的 vehicle 組相比，具顯著性差異。

3. 種殼及茶粕甲醇區分對細胞受 LPS 誘導之 iNOS 表現量影響

西方墨點法可檢視 SM 及 PM 是否透過抑制 iNOS 蛋白表現使 NO 產量降低。結果如圖六 (左) 所示，未加 LPS 的對照組 iNOS 蛋白幾乎無表現，而加入 LPS 使 iNOS 蛋白表現大幅提升，且可藉由加入 PMB 顯著性抑制。在實驗組，SM 不僅對 iNOS 蛋白有顯著性抑制，也具濃度依賴性；相較之下，PM 對 iNOS 蛋白表現具些微濃度依賴性，但整體抑制效果較不明顯。對照組 α -tubulin 的表現量也無太大差異性，顯示 SM 確實可藉由抑制 iNOS 蛋白表現，達到降低 NO 產量的效果。

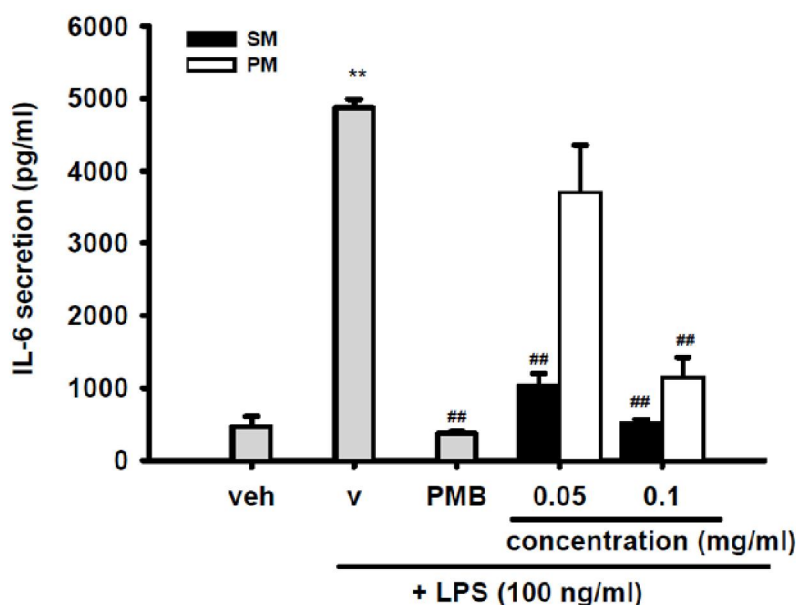
RT-Q-PCR 結果顯示如圖六 (右)，相較於 vehicle 組，加入 LPS 使 iNOS 的 mRNA 表現量提升約 14.5 倍，而在加了 PMB 後又被明顯抑制。在樣品部分，可以發現 SM 能顯著性抑制 iNOS 之 mRNA 的表現，並且具有濃度依賴性。然而；PM 相較之下抑制作用較微弱，僅在 0.1 mg/ml 時，有抑制效果。



圖六、小果油茶種殼與茶粕甲醇區分對 RAW264.7 受 LPS 刺激下之 iNOS 表現的影響。(左) RAW264.7 細胞以 polymyxin B (PMB, 10 μ g/ml) 或 0.05, 0.1 mg/ml 的種殼甲醇區分 (SM)、茶粕甲醇區分 (PM) 處理 30 min 後，再與 LPS 共同培養 16 小時，隨後進行總蛋白抽取並以西方墨點法測定 iNOS 蛋白表現量。(右) RAW264.7 細胞以前述西方墨點法同樣條件培養 12 小時，隨後進行總 RNA 抽取並以 RT-Q-PCR 測定 iNOS 的 mRNA 表現量。**, $p < 0.01$ 表示與未加 LPS 的 vehicle 組相比，具顯著性差異。#, $p < 0.05$ 表示與加 LPS 的 vehicle 組相比，具顯著性差異。###, $p < 0.01$ 表示與加 LPS 的 vehicle 組相比，具顯著性差異。

4. 種殼及茶粕甲醇區分抑制細胞激素 (IL-6) 分泌能力測定

IL-6 與發炎有關，是一主要的促發炎細胞激素，由單核球及巨噬細胞所分泌。此實驗結果如圖七顯示，細胞以 LPS 誘導 18 小時後，IL-6 分泌明顯增加約 10 倍，而加入 PMB 又幾乎被完全抑制。SM (0.05, 0.1 mg/ml) 及 PM (0.1 mg/ml) 皆有抑制細胞激素 IL-6 分泌的效果，且具有濃度依賴性，其中又以 SM 之效果最為明顯。



圖七、小果油茶種殼與茶粕甲醇區分對 RAW264.7 受 LPS 刺激下之細胞激素 (IL-6) 產量的影響。RAW264.7 細胞以 polymyxin B (PMB, 10 μ g/ml) 或 0.05, 0.1 mg/ml 的種殼甲醇區分 (SM)、茶粕甲醇區分 (PM) 處理 30 min 後，再與 LPS 共同培養 18 小時，隨後吸取上層液以 OptEIA™ Set Mouse IL-6 套組分析細胞激素 IL-6 之濃度。**, $p < 0.01$ 表示與未加 LPS 的 vehicle 組相比，具顯著性差異。##, $p < 0.01$ 表示與加 LPS 的 vehicle 組相比，具顯著性差異。

六、討論

很多研究指出多酚類是天然化學成分，普遍存在於植物內並扮演重要角色，具有抗氧化、抗發炎、抗衰老及抗病菌等功能(Lim and AG Koffas 2010; Bravo 1998)。在抗氧化活性分析中，本研究先利用 Folin-Ciocalteu 試劑進行小果油茶廢棄物乙醇粗萃物的總多酚含量測定，發現甲醇區分的總多酚含量最豐富，且其結果與 DPPH 自由基清除率測定之結果一致，可推測抗氧化物質很可能為多酚類物質且存在於甲醇區間。

發炎反應是一種當人體遭受到外物入侵所引起的防禦性反應，包括一連串訊息傳遞，誘導型一氧化氮合成酶 (iNOS) 的活化即為其中一部分。然而，LPS 誘導巨噬細胞所釋放出之 NO 又可藉由抑制 iNOS 表現而降低產量，進而緩和發炎反應。在此次實驗中，我取 LPS 誘導細胞發炎，並且以 polymyxin B (PMB) 為對照組，亞硝酸鹽濃度測定的結果，可以發現 SM 及 PM 在 0.05 mg/ml 時有輕微抑制效果；在 0.1 mg/ml 具顯著性抑制，顯現兩者皆具濃度依賴性且皆能抑制 LPS 所引起之細胞毒性。在西方墨點法及 RT-Q-PCR 結果中，更進一步顯示 SM 能夠明顯抑制 iNOS 蛋白及 mRNA 表現量，說明 SM 是藉由抑制 iNOS 的表現而降低 LPS 所誘導之 NO 產量。相較之下，PM 於 0.1 mg/ml 時，雖有輕微抑制 iNOS 的 mRNA 表現量，但在蛋白表現量卻無抑制效果，顯示其抑制作用可能發生於 iNOS 之酵素活性，而非基因表現。

細胞激素 IL-6 是一種促發炎的細胞激素，在發炎反應中扮演重要角色，不僅參與感染區域血流變化，防止病菌擴散，也能經由刺激巨噬細胞活化導致發炎反應，因此調節 IL-6 保持適量的分泌是很重要的，過多或不足都可能導致疾病，例如敗血症及自體免疫疾病等(Tracey and Cerami 1993)。本研究發現 SM 及 PM 皆能抑制 RAW264.7 在 LPS 刺激下所誘導之 IL-6 分泌能力，並具有濃度依賴性，其中又以 SM 效果最為顯著，具有抗發炎之潛力。

七、參考文獻

- Bravo, Laura. 1998. 'Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance', *Nutrition reviews*, 56: 317-33.
- Chen, Jung-Hui, Bing-Chung Liao, Ting-Ting Jong, and Chieh-Ming J Chang. 2009. 'Extraction and purification of flavanone glycosides and kaempferol glycosides from defatted *Camellia oleifera* seeds by salting-out using hydrophilic isopropanol', *Separation and Purification Technology*, 67: 31-37.
- Chen, Jung-Hui, Hsing-Yu Wu, Bing-Chung Liao, Chieh-Ming J Chang, Ting-Ting Jong, and Li-Chen Wu. 2010. 'Identification and evaluation of antioxidants defatted *Camellia oleifera* seeds by isopropanol salting-out pretreatment', *Food chemistry*, 121: 1246-54.
- Cheng, Y. T., S. L. Wu, C. Y. Ho, S. M. Huang, C. L. Cheng, and G. C. Yen. 2014. 'Beneficial effects of *Camellia* Oil (*Camellia oleifera* Abel.) on ketoprofen-induced gastrointestinal mucosal damage through upregulation of HO-1 and VEGF', *J Agric Food Chem*, 62: 642-50.
- Gao, Da-Fang, Min Xu, Ping Zhao, Xiao-Yuan Zhang, Yi-Fei Wang, Chong-Ren Yang, and Ying-Jun Zhang. 2011. 'Kaempferol acetylated glycosides from the seed cake of *Camellia oleifera*', *Food chemistry*, 124: 432-36.
- Hu, Jie-Lun, Shao-Ping Nie, Dan-Fei Huang, Chang Li, Ming-Yong Xie, and Yin Wan. 2012. 'Antimicrobial activity of saponin-rich fraction from *Camellia oleifera* cake and its effect on cell viability of mouse macrophage RAW 264.7', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 2443-49.
- Huang, Yu-Shan. 2009. 'Identification and evaluation of biological properties of the kaempferol derivatives from the seed cake of *Camellia oleifera* Abel'.
- Jin, Xianchun. 2012. 'Bioactivities of water-soluble polysaccharides from fruit shell of *Camellia oleifera* Abel: Antitumor and antioxidant activities', *Carbohydrate Polymers*, 87: 2198-201.
- Jin, Xianchun, and Yu Ning. 2012. 'Antioxidant and antitumor activities of the polysaccharide from seed cake of *Camellia oleifera* Abel', *International journal of biological macromolecules*, 51: 364-68.
- Lim, Chin-Giaw, and Mattheos AG Koffas. 2010. 'Bioavailability and recent advances in the bioactivity of flavonoid and stilbene compounds', *Current Organic*

- Chemistry*, 14: 1727-51.
- Liu, Xiaohui, Lingyan Jia, Ying Gao, Bo Li, and Youying Tu. 2014. 'Anti-inflammatory activity of total flavonoids from seeds of *Camellia oleifera* Abel', *Acta biochimica et biophysica Sinica*: gmu071.
- Tracey, Kevin J, and Anthony Cerami. 1993. 'Tumor necrosis factor, other cytokines and disease', *Annual review of cell biology*, 9: 317-43.
- Ye, Yong, Ya Guo, and Yue-Ting Luo. 2012. 'Anti-inflammatory and analgesic activities of a novel biflavonoid from shells of *Camellia oleifera*', *International journal of molecular sciences*, 13: 12401-11.
- Ye, Yong, Ya Guo, Yue-Ting Luo, and Yan-Fang Wang. 2012. 'Isolation and free radical scavenging activities of a novel biflavonoid from the shells of *Camellia oleifera* Abel', *Fitoterapia*, 83: 1585-89.
- Ye, Yong, Haiting Xing, and Xuelan Chen. 2013. 'Anti-inflammatory and analgesic activities of the hydrolyzed sasanquasaponins from the defatted seeds of *Camellia oleifera*', *Archives of pharmacal research*, 36: 941-51.
- Zhang, Xin-Fu, Shao-Lan Yang, Ying-Ying Han, Lei Zhao, Gui-Long Lu, Tao Xia, and Li-Ping Gao. 2014. 'Qualitative and quantitative analysis of triterpene saponins from tea seed pomace (*Camellia oleifera* Abel) and their activities against bacteria and fungi', *Molecules*, 19: 7568-80.
- 吳嘉盈. 2009. '有機水田區生態廊道改善及苦茶粕危害之初步研究'.
- 周宜達, 葉一隆, and 陳庭堅. 2015. '苦茶粕與無患子之皂素萃取與浸置水條件之福壽螺防治成效', *農業工程學報*, 61: 56-60.
- 邱惠鈞. 2009. '探討苦茶粕水浸出液對斜紋夜盜蛾之防治效果', *國立嘉義大學生物資源學系研究所碩士論文*. 嘉義.
- 張浣筑. 2013. '苦茶粕與無患子劑量之 pH 值特性與對福壽螺防治成效', *屏東科技大學土木工程系所學位論文*: 1-46.
- 陳俊仁, and 孫文章. 2011. '油茶栽培與利用', *臺南區農業專訊*: 5-7.
- 游善植. 2012. '苦茶粕水萃液對神澤氏葉蟎之毒性探討', *屏東科技大學熱帶農業暨國際合作系學位論文*: 1-87.
- 楊正偉. 2007. '苦茶粕防治甘藍幼苗立枯病之效果與其有效成分之鑑定'.
- 楊雅雯. '苦茶粕水浸出液對南方根瘤線蟲危害番茄之防治探討'.
- 詹亞平. '探討幾丁聚醣與苦茶粕萃取物對白絹病菌之抑制效果'.

