

# 葡萄藻 (*Botryocladia leptopoda*) 成分分析及 其粗萃取液應用性研究

李沛珊<sup>1\*</sup> · 許博淵<sup>2</sup> · 黃君毅<sup>1</sup> · 何源興<sup>1</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會水產試驗所東部海洋生物研究中心

<sup>2</sup>高雄長庚紀念醫院胸腔內科

## 摘 要

本研究為增加葡萄藻 (*Botryocladia leptopoda*) 之利用性及附加價值，以促進海藻產業發展，進行了營養成分分析、萃取技術開發及多種抗氧化能力分析。研究結果得知，每 100 g 新鮮葡萄藻包含 94.4 g 水分、3.1 g 灰分、10 Kcal 熱量、0.5 g 蛋白質及 2.0 g 碳水化合物 (內含 0.9 g 膳食纖維)，不含糖、反式及飽和脂肪。除上述外，也包含麩胺酸、甘胺酸、胱胺酸、鈉、鉀、鎂、鈣、磷、硼、鐵、銅、鎳、鋅、錳及鈷。在萃取及應用研究方面，發現不論是在總醣量、總酚量、還原力、清除超氧陰離子能力、捕捉 DPPH 自由基能力及螯合亞鐵離子能力，熱萃組皆比未處理組及冰萃組之效果佳。在細胞實驗中，發現各組別的葡萄藻粗萃取液皆不會影響 3T3-L1 細胞活力，且對損傷細胞的 LDH 釋放量均有不同程度的降低，也會讓細胞內ROS的產生減少 60 - 70%，顯示葡萄藻粗萃取液對已受到 D-半乳糖損害之 3T3-L1 細胞具有顯著保護作用。經由 D-半乳糖處理過的細胞接著和葡萄藻粗萃取液作用後，SIRT1 表現量顯著增加，而 MMP2 和 MMP9 表現量則顯著的降低。綜合以上結果指出，葡萄藻經由簡單的熱萃取方式，即有良好抗氧化能力，具有開發作為天然及安全的抗氧化素材之潛力。

關鍵詞：葡萄藻、粗萃取液、抗氧化

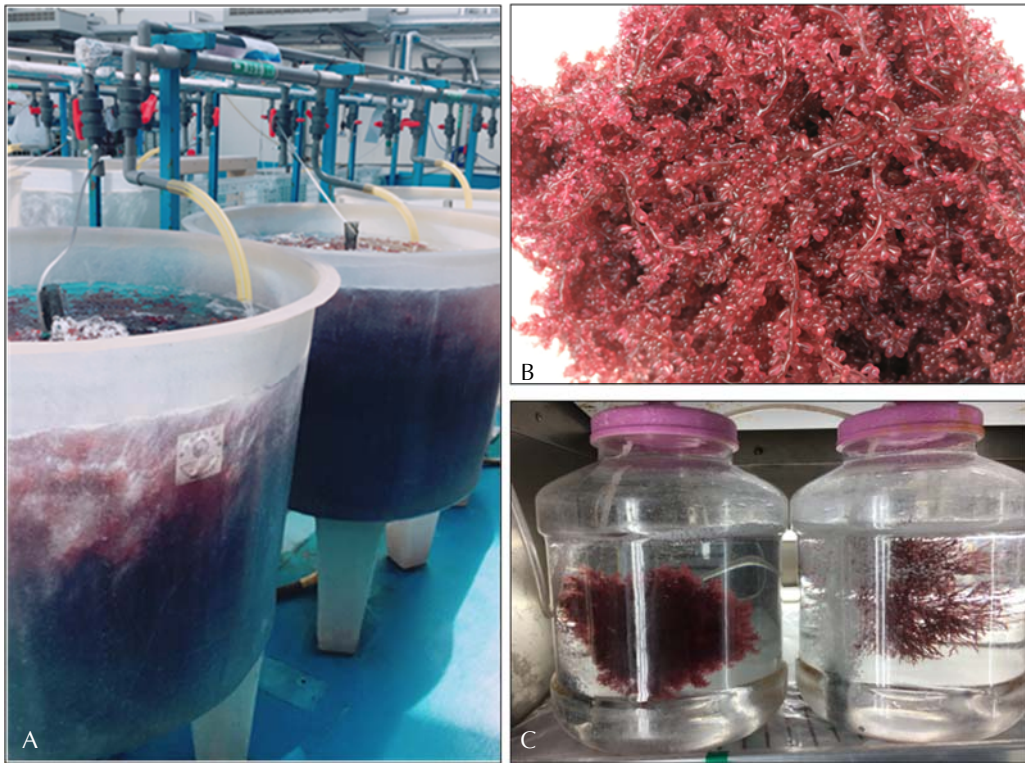
## 前 言

海藻含有多種人類必需的胺基酸、醣類、維生素、礦物質及膳食纖維，除了上述的物質外，還含有酚類化合物、萜類化合物及複雜的多醣等對人體健康有益的生物活性化合物 (Zaharudin *et al.*, 2018)。許多文獻指出，海藻粗萃取物也表現出抗凝血劑、抗病毒、抗氧化劑、抗微生物、抗癌及抗發炎 (Kazłowska *et al.*, 2010) 等活性。天然來源的抗氧化劑可延長食品的保質期，酚類化合物充當抗氧化劑，其機制涉及自由基清除及金屬螯合作用 (Xu *et al.*, 2016)。在紅藻粗萃取物已有研究指出具有抗氧化 (Ben-Sadd *et al.*, 2019) 及保護肝腎免於受到重金屬危害等功能 (Guo *et al.*, 2018)。

葡萄藻屬在全球約有 50 個種類，臺灣僅記錄了葡萄藻 (*Botryocladia leptopoda*) 及厚壁葡萄藻 (*B. skottsbergii*) 2 種。本屬特徵為單個或分枝，具有圓柱形的單管軸，其上有 1 至多個直立囊狀分枝，囊狀分枝有球形、梨形或橢圓形等多種形態，具柄或分枝，內皮層由 1 至數層無色細胞組成，內層壁上長有無柄的腺細胞，單個或集生，突出於腔內，腔內充滿黏液，外皮層細胞較少，四分孢子囊散生在皮層中，呈十字形分裂 (Guiry and Guiry, 2020)。有研究指出此屬中的 *B. occidentalis* 具有抗血栓形成作用 (Quinderé *et al.*, 2014) 及抗瘧疾活性 (Marques *et al.*, 2016)。

葡萄藻為紅藻植物門 (Rhodophyta)、真紅藻綱 (Florideophyceae)、紅皮藻目 (Rhodymeniales)、紅皮藻科 (Rhodymeniaceae) 之葡萄藻屬 (*Botryocladia*) 當中一員，外部型態有多個直立囊狀分枝 (梨形)，囊狀分枝皆小於 0.5 cm，且內層不含細胞。葡萄藻分布廣泛遍及北半球及紐西蘭，

\*通訊作者 / 臺東市知本路 2 段 291 巷 299 號, TEL: (089) 514-362 轉 207; FAX: (089) 514-366; E-mail: pslee@mail.tfrin.gov.tw



**Fig. 1** Cultivation of *Botryocladia leptopoda*. A: The set-up for expanding *B. leptopoda* by using brine shrimp; B: The appearance of cultivated *B. leptopoda*; C: *B. leptopoda* preserved in plastic transparent barrels.

Kraft (2019) 也在澳大利亞周邊海域發現蹤跡。此藻又稱為紅提子藻，且因藻體成鮮紅色，外觀又像成串葡萄一樣，也稱紅葡萄藻 (red grape algae)。有研究指出，葡萄藻可作為提供維生素來源之潛力 (Gajalakshmi *et al.*, 2018)，並具有抗絲蟲 (Lakshmi *et al.*, 2004)、抗真菌、抗病原體及抗菌活性 (Rizvi and Shameel, 2004)。目前有關葡萄藻研究的文獻不多，且先前已開發出量產技術，為新興且具有經濟價值之海藻。本研究為了增加此藻附加價值及有效多元利用既有資源，進行葡萄藻營養成分分析、粗萃取技術開發及探討粗萃取液總醣含量、總酚含量及多種抗氧化能力等，以了解此藻是否具有其他可利用之處，冀以提高商業價值。

## 材料與方法

### 一、葡萄藻成分分析

本研究所採用的葡萄藻種原為 2013 年從花蓮七星潭柴魚博物館取得。葡萄藻於豐年蝦桶穩

定培育 2 個月後 (Fig. 1A-C)，收取新鮮的藻體送至臺灣檢驗公司 (SGS) 進行一般成分：包括水分、灰分、熱量、蛋白質、總脂肪、飽和脂肪、反式脂肪、碳水化合物、膳食纖維及糖含量分析；水解胺基酸分析：一般海藻含有的是蛋白質，若要進行胺基酸成分分析，就必須把蛋白質水解開來，本研究是參考 A.O.A.C. (2005) 方法，採用鹼水解 (色胺酸) 及酸水解 (其他 17 種胺基酸)，將葡萄藻之蛋白質進行水解後，再利用高效液相層析儀 (HPLC) 做定性及定量分析；脂肪酸成分分析：參考衛生福利部部授食字第 1021950978 號公告 (2013) 之檢驗方法，葡萄藻樣品經油脂萃取、皂化及甲酯化後，以氣相層析儀 (gas chromatograph, GC) 進行分析；礦物質含量檢測：參考 A.O.A.C. (2009) 及 U.S. EPA (2007) 方法，海藻樣品的萃取消化，依待分析元素不同的特性選擇使用單一濃硝酸或適當比例之濃硝酸及濃鹽酸作為消化試劑，在密閉式微波消化裝置中加熱至指定的時間及溫度，冷卻後消化液經過濾、靜置沉降或離心，並稀釋至一定體積，即可利用感應耦合電漿原子

放射光譜 (ICP/OES) 及感應耦合電漿質譜儀 (ICP/MS) 進行待測元素之分析。

## 二、葡萄藻粗萃取液置備

葡萄藻清洗後置於烘箱，並以 55°C 烘乾 1-2 day，每組皆取烘乾葡萄藻 5 g 並壓碎，萃取的方式分為：(一) 直接加去離子水 125 ml 常溫浸泡 1 hr (未處理組)；(二) 以液態氮處理 10 min，加去離子水 125 ml 後置於 4°C 萃取 1 hr (冰萃組) 以及 (三) 加去離子水 125 ml 後，以 90°C 加熱 1 hr (熱萃組)。3 個組別處理完成後，皆以離心機離心，收取之上清液即為粗萃取液。

## 三、葡萄藻粗萃取液總醣量、總酚量及抗氧化能力比較

### (一) 總醣量檢測

參考 Dubois *et al.* (1956) 方法，取 1 ml 粗萃取液加入 0.5 ml 的 5% 酚溶液均勻混合後立即加入 2.5 ml 濃硫酸，室溫靜置反應 25 min 後，以波長 490 nm 偵測吸光值，並以葡萄糖標準品製作標準曲線，換算出各組萃取液的總醣量。

### (二) 總酚量檢測

參考 Singleton and Rossi (1965) 方法，取 0.25 ml 粗萃取液加入 0.25 ml 福林試劑 (Folin-ciocalteu reagent) 及 3.75 ml 去離子水，均勻混合後靜置 10 min，再加入 0.5 ml 的 20% 碳酸鈉溶液，並於 40°C 水浴槽中反應 20 min，以波長 755 nm 測其吸光值。

### (三) 抗氧化能力比較

#### 1. 還原力檢測

採用 Oyaizu (1986) 方法，取 0.25 ml 粗萃取液加入 0.25 ml 磷酸緩衝液及 0.25 ml 赤血鹽，混合均勻後，移入 50°C 水浴槽中反應 20 min，再加入 0.25 ml 三氯醋酸混合均勻後，離心取 0.5 ml 上清液，並加入 0.5 ml 去離子水及 0.1 ml 氯化鐵均勻混合後反應 10 min，以波長 700 nm 偵

測吸光值。

#### 2. 清除超氧陰離子能力

採用 Robak and Gryglewski (1988) 方法，取 0.1 ml 粗萃取液，依序加入 0.25 ml 120 μM PMS (phenazine methosulphate)、0.25 ml 936 μM NADH (β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form) 及 0.25 ml 300 μM NBT (Nitro blue tetrazolium)，均勻混合後靜置 5 min，以波長 560 nm 測其吸光值，清除率 (%) =  $[1 - (\text{含有樣品之實驗組於波長 560 nm 之吸光值} / \text{未添加樣品之對照組於波長 560 nm 之吸光值})] \times 100\%$ 。

#### 3. 捕捉 DPPH 自由基能力

參考 Yamaguchi *et al.* (1998) 方法，取 0.8 ml 粗萃取液加入 0.8 ml 0.25 mM DPPH 自由基甲醇溶液，混合均勻後避光靜置 30 min，以波長 517 nm 測其吸光值，捕捉率 (%) =  $[(\text{未添加樣品之控制組於波長 517 nm 之吸光值} - \text{含有樣品之實驗組於波長 517 nm 之吸光值}) / \text{未添加樣品之對照組於波長 517 nm 之吸光值}] \times 100\%$ 。

#### 4. 螯合亞鐵離子能力

依據 Decker and Welch (1990) 方法，取 0.02 ml 2 mM 氯化亞鐵加入 0.94 ml 粗萃取液及 0.04 ml 5 mM 菲洛嗪 (ferrozine)，混合均勻後，於室溫下靜置反應 10 min，以波長 562 nm 偵測吸光值，螯合率 (%) =  $[1 - (\text{含有樣品之實驗組於波長 562 nm 之吸光值} / \text{未添加樣品之對照組於波長 562 nm 之吸光值})] \times 100\%$ 。

## 四、葡萄藻粗萃取液對小鼠纖維母細胞 (3T3-L1) 之影響

### (一) 細胞培養與誘導細胞損傷

將 3T3-L1 細胞 (BCRC No. 60159) 培養於含有 10% 小牛血清及 1% 青黴素/鏈黴素的 Dulbecco 改良的 Eagle 培養基 (DMEM)，並於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱進行細胞培養。本實驗是藉由 D-半乳糖誘導 3T3-L1 細胞氧化損傷並且達到細胞衰老的目的 (Xing *et al.*, 2006)。實驗步驟如下，將 3T3-L1 細胞種於 12 孔盤中，細胞數

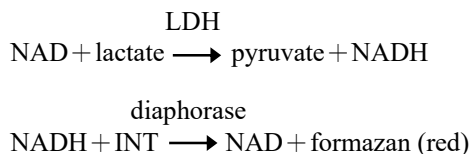
為  $1 \times 10^5$  cells/per well，待細胞貼盤後，以濃度為 8 g/L 之 D-半乳糖處理 48 hr，以達到誘導細胞損傷老化，控制組則未加入 D-半乳糖。

## (二) 細胞活力測定

將 3T3-L1 細胞以  $5 \times 10^4$  cells/ml 種於 96 孔盤中，細胞分別以有無 D-半乳糖（濃度 8 g/L）處理 48 hr，並於誘導細胞衰老後，再以葡萄藻粗萃取液處理細胞 24 hr，以 1:10 稀釋的 WST-1 試劑（WST-1 是一種類似 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 的化合物，為 MTT 改良版，主要可以和粒線體電子傳遞鏈上的 NADH 粒線體去氫酶 (dehydrogenase) 結合，生成橙黃色的 formazan，再以分光光度計檢測，即可得知細胞活力及存活率) 添加在培養基中，反應 2 hr 後，以吸光值 450 nm (參考波長為 600 nm) 來測定細胞的活力。

## (三) 細胞毒性測定

為了確認葡萄藻粗萃取液對 3T3-L1 細胞是否具有細胞毒性，本研究是採用 Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit 進行細胞毒性測試。乳酸去氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 是一種穩定存在於細胞質中的酵素，當細胞膜受到損傷時，LDH 就會快速的釋放至培養液中，因此偵測培養液中的 LDH 可作為細胞傷害的指標之一，其偵測原理如下：



將 3T3-L1 細胞以  $1 \times 10^5$  cells/ml 培養於不含小牛血清的 DMEM 培養液之 12 孔盤中，並加入不同處理之葡萄藻粗萃取液，在 5% CO<sub>2</sub> 及 37°C 的條件下，培養 24 hr 後，取出上清液 50 mL 至 96 孔盤中，再加入 50 μl 之受質反應混合液，於室溫下避光反應 30 min，最終加入 50 μl Stop solution 終止反應，於 490 nm 測定其吸光值，計算細胞毒性。細胞毒性百分比 = (樣品處理後 LDH 活性 - 自發性 LDH 活性) / (最大 LDH 活性 - 自發性 LDH 活性) × 100%。

## (四) 細胞內活性氧 (ROS) 的測定

細胞在代謝合成時，會產生一些 ROS，而測量細胞內 ROS 的產生是使用 2,7-二氯二氫螢光素二乙酸酯 (DCFH-DA)，並依照 Wang and Joseph (1999) 的 DCF 微孔板檢測方法測量。DCFH-DA 是一種對氧化敏感的螢光探針，可透過細胞膜，且本身不發螢光，當被細胞內 ROS 氧化時轉換為高螢光 DCF。為了進行 ROS 實驗，將細胞接種在 96 孔盤中並培養 24 hr，加入或不加入 D-半乳糖處理細胞 48 hr，然後與不同處理的葡萄藻粗萃取液作用 24 hr，再將溶於 DMSO 的 DCFH-DA (25 μM) 添加到細胞培養液中，於 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下，以避光搖混方式作用 1 hr 後，對樣品進行螢光分光光度計分析。

## (五) RNA 萃取與即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-Time PCR)

使用市售 TRIzol® reagent 從 3T3-L1 細胞中提取 total RNA，並用於分析 SIRT1 (是一種 NAD<sup>+</sup> 依賴性蛋白去乙酰基酶)、MMP2 及 MMP9 (基質金屬蛋白酶 2 及 9) 的基因表現量，使用的 PCR 引子序列於 Table 1 列出。使用 1 μg 的起始 mRNA 和隨機六聚體，將起始 mRNA 反轉錄成 cDNA，目標基因之 mRNA 表現量再以 GAPDH 之表現量進行標準化，使用 ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR 和 SYBR green reagent 進行 PCR 分析。

**Table 1** Primers used for quantitative polymerase chain reaction analysis

Gene	Primer
SIRT1 F	5'- GCT GAC GAC TTC GAC GAC G - 3'
SIRT1 R	5'- TCG GTC AAC AGG AGG TTG TCT -3'
MMP2 F	5'- CAA GTT CCC CGG CGA TGT C - 3'
MMP2 R	5'- TTC TGG TCA AGG TCA CCT GTC -3'
MMP9 F	5'- CTC GCG GCA AGT CTT CAG AG -3'
MMP9 R	5'- CTG GAC AGC CAG ACA CTA AAG -3'
GAPDH F	5'- TGA CCA CAG TCC ATG CCA TC -3'
GAPDH R	5'- GAC GGA CAC ATT GGG GGT AG -3'

SIRT1: sirtuin 1 (Yu *et al.*, 2016); MMP2: matrix metalloproteinase 2 and MMP9: matrix metalloproteinase 9 (Mu *et al.*, 2010); GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Doetschman *et al.*, 2012); F: forward; R: reverse

## (六) 統計分析

使用 Graphpad prism software version 5.0 進行統計分析，定量數據表示為平均值 ± 標準誤差。Student's t-test 用於比較兩組之間的差異；使用單因子變異數分析 (One-way ANOVA) 來分析多個組之間的差異，然後進行 Tukey 事後多重比較檢定 (Post hoc multiple comparisons test)，以 *p* value 定為統計學上的顯著差異。

## 結果與討論

### 一、葡萄藻成分分析結果

每 100 g 的新鮮葡萄藻含有 94.4 g 水分、3.1 g 灰分、10 Kcal 熱量、0.5 g 蛋白質及 2.0 g 碳水化合物 (內含 0.9 g 膳食纖維)，而脂肪含量低於 0.1 g，糖含量低於 0.5 g，飽和及反式脂肪皆未檢出。葡萄藻水解胺基酸僅檢測出含有麩胺酸 (439 ppm)、甘胺酸 (233 ppm) 及胱胺酸 (577 ppm)，其他胺基酸含量皆低於偵測極限 (Table 2)。34 種脂肪酸組成成分分析則全低於偵測極限 0.05%。微量元素方面，以鈉 (8,888 mg/kg)、鉀 (4,460 mg/kg)、鎂 (1,210 mg/kg)、鈣 (479 mg/kg)、磷 (50.5 mg/kg)、硼 (6.1 mg/kg) 及鐵 (2.46 mg/kg) 的含量較高，並含有微量的銅 (0.39 mg/kg)、鎳 (0.35 mg/kg)、鋅 (0.34 mg/kg)、錳 (0.25 mg/kg) 及鈷 (0.01 mg/kg) (Table 3)。張 (2019) 指出紅葡萄藻一般成分分析為水分 (97.09%)、粗灰分 (1.02%)、粗蛋白 (0.995%)、粗脂肪 (0.214%) 和碳水化合物 (0.145%)，除去水分後所得的固形物之粗蛋白含量高達 34.19%。Fleurence (1999) 指出，海藻之蛋白質範圍落於 5 - 56%，且大部分低於 30%，並會因藻類物種、生長的地理位置和季節而異，蛋白質含量也會有所不同，其含量可從 3 - 47%。

### 二、葡萄藻萃取技術研發及其粗萃取液總糖量、總酚量及抗氧化能力比較

葡萄藻經不同方式處理之粗萃取液最後收集的體積為未處理組 71 ml、冰萃組 85 ml 及熱萃組 86 ml。

**Table 2** Amino acid compositions of *Botryocladia leptopoda*

Detection items	Detection results (ppm)	Detection limit (ppm)
Serine	ND	300
Aspartic acid	ND	380
Glutamic acid	439	420
Glycine	233	214
Histidine	ND	443
Arginine	ND	498
Theronine	ND	340
Alanine	ND	255
Proline	ND	329
Cystine	577	343
Tyrosine	ND	518
Valine	ND	335
Methionine	ND	426
Lysine	ND	418
Tryptophan	ND	25
Isoleucine	ND	375
Leucine	ND	375
Phenylalanine	ND	472

ND: not detected; Data are expressed as the mean ± S.D. (n=3).

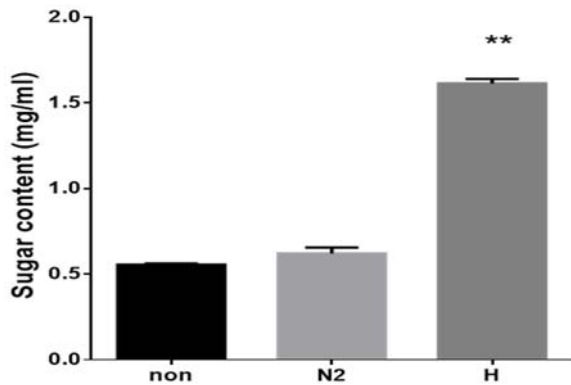
**Table 3** Mineral compositions of *Botryocladia leptopoda*

Detection items	Detection results (mg/kg)	Detection limit (mg/kg)
Sodium	8888	-
Iron	2.46	0.01
Zinc	0.34	0.01
Selenium	ND	0.01
Copper	0.39	0.01
Manganese	0.25	0.01
Chromium	ND	0.01
Nickel	0.35	0.01
Cobalt	0.01	0.01
Potassium	4460	2.0
Calcium	479	2.0
Magnesium	1210	2.0
Phosphorus	50.5	2.0
Boron	6.1	2.0

ND: not detected; Data are expressed as the mean ± S.D. (n=3).

### (一) 總醣量

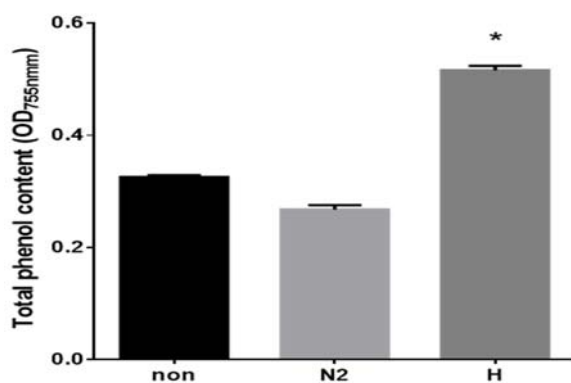
如 Fig. 2 所示，熱萃組的總醣量為  $1.61 \pm 0.03$  mg/ml，顯著高於冰萃組 ( $0.62 \pm 0.03$  mg/ml) 及未處理組 ( $0.55 \pm 0.01$  mg/ml) ( $p < 0.01$ )。



**Fig. 2** Comparison of the total sugar contents of crude extracts produced from *Botryocladia leptopoda* by different extraction methods. non: untreated, N2: ice extraction, H: heated extraction. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=3). The values with different numbers of asterisks are significantly different in terms of  $p$  value according to Tukey's post hoc multiple comparisons. ★★:  $p < 0.01$ .

### (二) 總酚量

如 Fig. 3 所示，熱萃組的總酚量  $OD_{755nm} = 0.52 \pm 0.01$ ，顯著高於未處理組 ( $0.33 \pm 0.01$ ) 及冰萃組 ( $0.27 \pm 0.01$ ) ( $p < 0.05$ )。

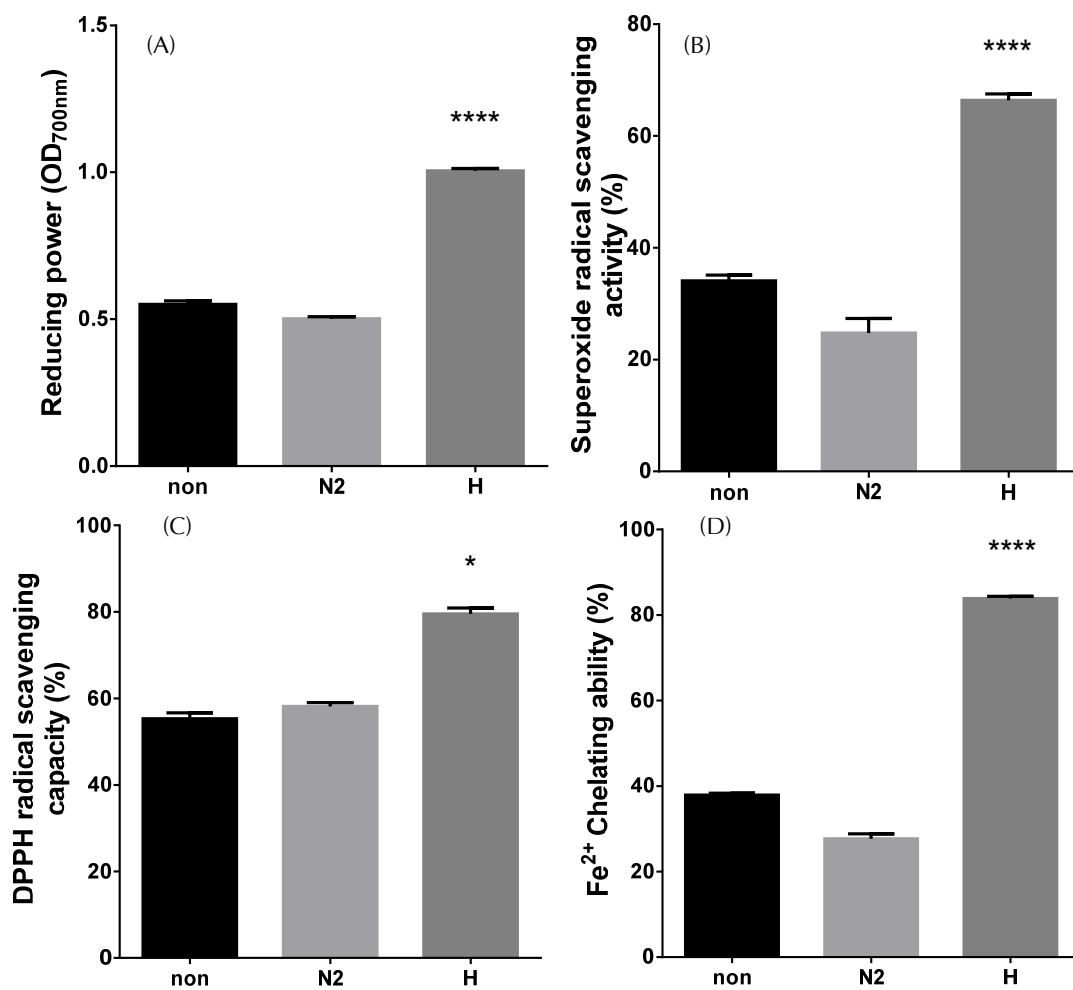


**Fig. 3** Comparison of the total phenol contents of crude extracts produced from *Botryocladia leptopoda* by different extraction methods. non: untreated, N2: ice extraction, H: heated extraction. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=3). The values with different numbers of asterisks are significantly different in terms of  $p$  value according to Tukey's post hoc multiple comparisons. ★:  $p < 0.05$ .

### (三) 抗氧化能力比較

還原力結果如 Fig. 4A 所示，熱萃組的還原力  $OD_{700nm} = 1.01 \pm 0.01$ ，顯著高於未處理組 ( $0.56 \pm 0.01$ ) 及冰萃組 ( $0.50 \pm 0.01$ ) ( $p < 0.0001$ )。清除超氧陰離子能力結果如 Fig. 4B 所示，熱萃組的清除率為  $66.38 \pm 1.14\%$ ，顯著高於未處理組 ( $34.10 \pm 1.02\%$ ) 及冰萃組 ( $24.75 \pm 2.61\%$ ) ( $p < 0.0001$ )；3. 捕捉 DPPH 自由基能力結果如 Fig. 4C 所示，熱萃組的捕捉率為  $79.55 \pm 1.35\%$ ，顯著高於冰萃組 ( $58.14 \pm 0.87\%$ ) 及未處理組 ( $55.30 \pm 1.38\%$ ) ( $p < 0.05$ )。螯合亞鐵離子能力結果如 Fig. 4D 所示，熱萃組的螯合率為  $83.88 \pm 0.48\%$ ，顯著高於未處理組 ( $37.89 \pm 0.46\%$ ) 及冰萃組 ( $27.68 \pm 1.14\%$ ) ( $p < 0.0001$ )。

本研究發現熱萃組粗萃取液具有較高含量的總醣量和總酚量（比其他方式增加了約 1.6 – 2 倍），且具有較高的抗氧化活性。張等 (2019) 指出葡萄藻蛋白質經酵素及鹼處理後所得到的水解物具有最強的 ACE (Angiotensin Converting Enzyme) 抑制活性及 DPP-4 (Dipeptidyl peptidase 4) 抑制活性，接著進一步以細胞實驗證實其調節血糖之功效，結果顯示濃度 2 mg/ml 約可抑制 3 成的 DPP-4 活性，且具劑量依賴性。另將藻渣添加乙醇萃取多酚，結果每克乾藻可萃取 215 mg 多酚產物，顯示葡萄藻萃取機能性肽後，再以乙醇提取多酚為較適萃取條件。藻類多醣和寡糖衍生物已顯示出具有多種治療潛力和藥物遞送應用，來自褐藻、紅藻及綠藻的硫酸化多醣、褐藻醣膠、卡拉膠及 Ulvan (石蓴屬的硫酸多糖) 潛在抗癌機制，包括誘導凋亡、細胞週期停滯、調節轉導信號通路、血管生成、激活免疫反應及抗氧化系統 (Sajadimajd *et al.*, 2019)。一些海藻的萃取物和酚類化合物對暴露於空氣中的顆粒物 (PM) 的細胞具有抗氧化及抗炎作用，酚類化合物可以降低細胞中 ROS 的水平或/和增強細胞的抗氧化能力，從而減輕 PM 誘導的氧化損傷，還降低了與 PM 的細胞炎症反應有關的因子，可能對暴露於高水平空氣污染的皮膚具有保護作用 (Boo, 2019)。石蓴及滌苔的寡糖用於研究 SAMP8 小鼠的抗衰老作用及其潛在機制，結果認為來自石蓴及滌苔的寡糖是理想的候選化合物，可用於功能性食品和藥品中以防止老化 (Liu *et al.*, 2019)。



**Fig. 4** Comparison of antioxidant capacities of crude extracts produced from *Botryocladia leptopoda* by different extraction methods. (A): The reducing power; (B): Capacity to scavenge superoxide anion; (C): Capacity to capture DPPH free radicals; (D): Capacity to chelate ferrous ion. non: untreated, N2: ice extraction, H: heated extraction. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n=3). The values with different numbers of asterisks are significantly different in terms of *p* value according to Tukey's post hoc multiple comparisons. ★: *p* < 0.05, ★★★★★: *p* < 0.0001.

### 三、葡萄藻粗萃取液對小鼠纖維母細胞 (3T3-L1) 之影響結果

#### (一) 葡萄藻粗萃取液對細胞活力之影響

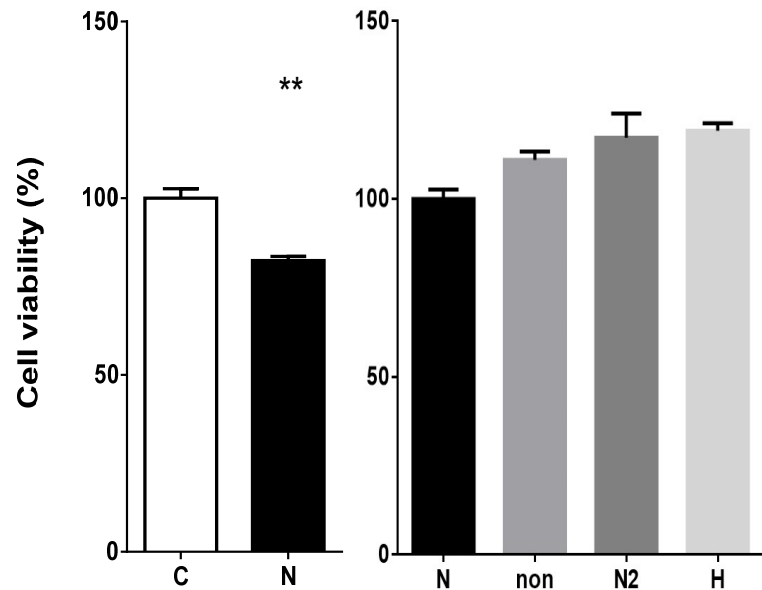
試驗組別分為控制組 (未加入 D-半乳糖) 及實驗組 (加入 D-半乳糖)，結果顯示經由 D-半乳糖誘導的細胞氧化壓力，明顯降低了細胞活力，對比控制組的細胞活力，大約降低了 20% (Fig. 5A)。後續測試葡萄藻粗萃取液對受損細胞 (加入 D-半乳糖) 活力之影響，結果顯示來自葡萄藻的不同粗萃取液對受損細胞的活力雖略有增加，但並沒有顯著改變 (Fig. 5B)。有研究指出由鼠尾藻、裙帶菜及海帶屬 (*Laminaria* spp.) 所萃取之褐藻醣膠

可刺激吞噬細胞及增強干擾素活性，間接誘發細胞蛋白質的免疫反應及影響淋巴細胞活性 (Itoh and Hitoshi, 1995)。另有研究指出半葉馬尾藻、裙帶菜和海帶水萃物在 500  $\mu\text{g/ml}$  時能刺激 HB4C5 細胞增生活性 (135、115 及 129%) (洪等, 2010)。

#### (二) 葡萄藻粗萃取液對細胞毒性之影響

細胞用 D-半乳糖處理後，細胞內的氧化壓力會隨之上升，並導致細胞的 LDH 釋放量顯著增加，對比控制組細胞的 LDH 釋放量增加了約 45%。以葡萄藻粗萃取液處理受損細胞，所有添加粗萃取液的組別對受損細胞的 LDH 的釋放量均

**Fig. 5** Effects of different extraction methods on cell viability of 3T3-L1 cells. Left: Effects of the culture medium + D-galactose on cell viability; Right: Effects of the crude extract produced from *Botryocladia leptopoda* by different extraction methods on damaged cell viability. C: control (culture medium without D-galactose), N: test (culture medium with D-galactose), non: untreated, N2: ice extraction, H: heated extraction. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3). The values with different numbers of asterisks are significantly different in terms of  $p$  value according to Tukey's post hoc multiple comparisons. ★★:  $p < 0.01$ .

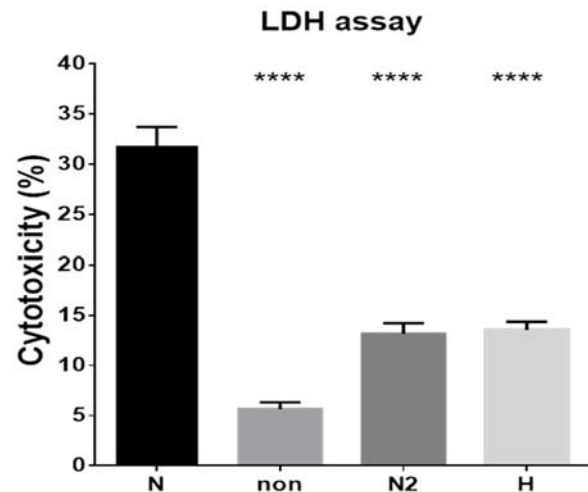


顯著的降低作用 ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 6)。LDH 是細胞質的一種穩定酶，一旦細胞膜破裂，就會釋放到細胞外。因此，LDH 被認為是細胞膜完整性的標誌 (Laffleur *et al.*, 2015)。皮膚是外部組織層，是保護人體免受各種外部壓力的屏障，綠藻乙醇提取物沒有細胞毒性，且可藉通過皮膚角質形成細胞中的抗氧化、抗凋亡及抗炎活性，發揮皮膚保護作用 (Choi *et al.*, 2019)。

### (三) 葡萄藻粗萃取液對細胞內 ROS 產生之影響

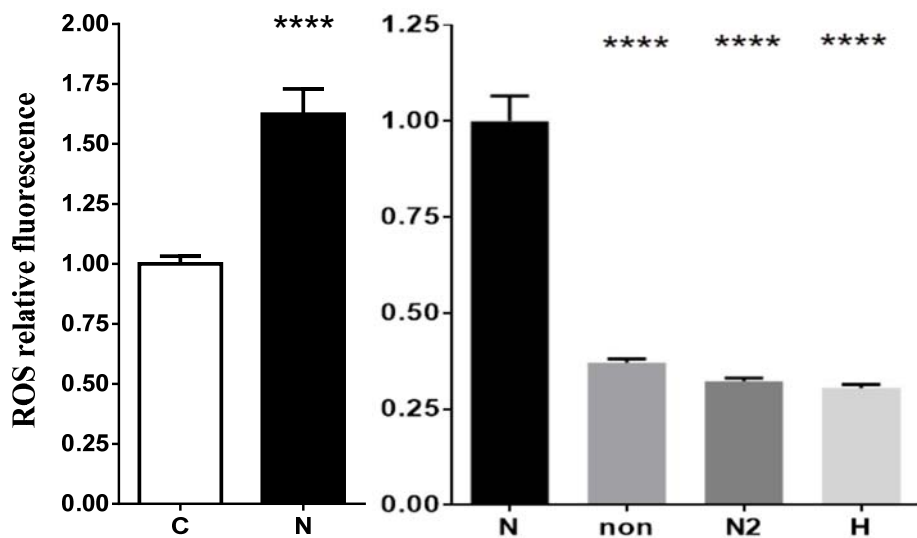
為了測試粗萃取物中對細胞內活性氧化物質 (ROS) 產生的影響，使用了 DCFH-DA 來進行分析。實驗組 (加入 D-半乳糖) 與對照組 (未加入 D-半乳糖) 相比，ROS 產生量增加了 84.1% ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 7A)。實驗組與添加粗萃取液組別相比 (D-半乳糖加粗萃取液)，葡萄藻粗萃取液處理後導致受損細胞內 ROS 的產生減少了 60 - 70% ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 7B)，顯示葡萄藻粗萃取液對已受到 D-半乳糖損害之 3T3-L1 細胞具有顯著保護作用。藻類具有抗氧化防禦系統，可以克服氧化壓力，其抗氧化防禦機制有兩種，即酶促抗氧化劑 (超氧化物歧化酶、過氧化氫酶、抗壞血酸過氧化物酶及穀胱甘肽還原酶) 及非酶促抗氧化劑 (類胡蘿蔔素、生育酚、抗壞血酸、穀胱甘肽、類黃酮

及酚類化合物)。褐藻素 (一種來自海洋褐藻葉綠體的色素)，對肥胖、糖尿病、炎症及癌症具有多種作用，並提供腦血管保護，並可通過控制脂肪形成和脂肪形成因子，以及 ROS 調節酶來抑制脂質積累和 ROS 的產生 (Seo *et al.*, 2016)。

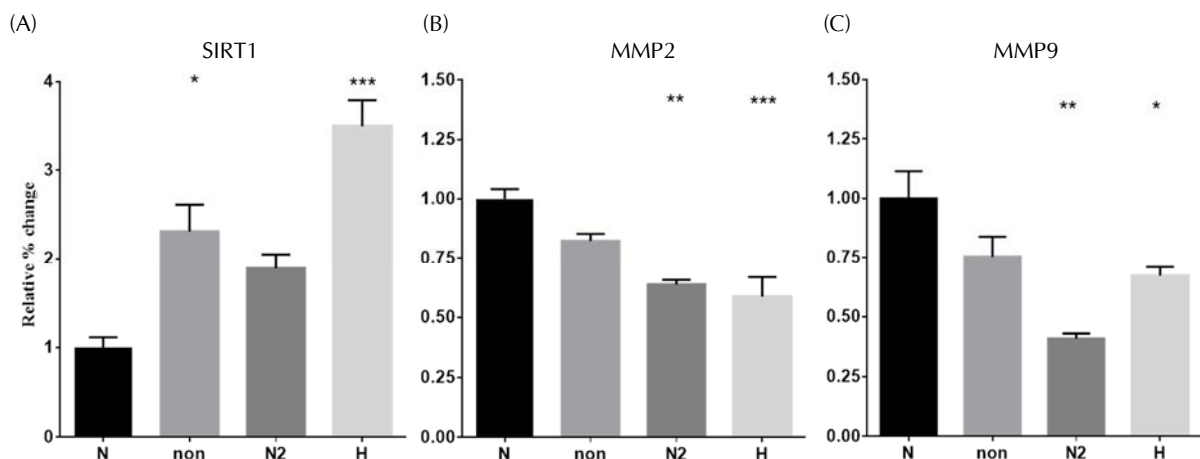


**Fig. 6** Effects of different extraction methods on LDH release from 3T3-L1 cells. Cytotoxic activity of crude extract produced from *Botryocladia leptopoda* by different extraction methods. N: test (culture medium with D-galactose), non: untreated, N2: ice extraction, H: heated extraction. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3). The values with different numbers of asterisks are significantly different in terms of  $p$  value according to Tukey's post hoc multiple comparisons. ★★★★★:  $p < 0.0001$ .





**Fig. 7** Effects of different extraction methods on ROS production and release from 3T3-L1 cells. Left: Effects of the culture medium with D-galactose on oxidative stress; Right: Effects of the crude extract produced from *Botryocladia leptopoda* by different extraction methods on oxidative stress. C: control (culture medium without D-galactose), N: test (culture medium with D-galactose), non: untreated, N2: ice extraction, H: heated extraction. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3). The values with different numbers of asterisks are significantly different in terms of *p* value according to Tukey's post hoc multiple comparisons. ★★★★★:  $p < 0.0001$ .



**Fig. 8** Effects of the crude extract produced from *Botryocladia leptopoda* by different extraction methods on antioxidant and proinflammatory expression in 3T3-L1 cells. (A): SIRT1 mRNA expression ( $p < 0.01$ ); (B): MMP2 mRNA expression; (C): MMP9 mRNA expression. N: test (culture medium with D-galactose), non: untreated, N2: ice extraction, H: heated extraction. Quantitative data are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3). The values with different numbers of asterisks are significantly different in terms of *p* value according to Tukey's post hoc multiple comparisons. ★:  $p < 0.05$ , ★★:  $p < 0.01$ , ★★★:  $p < 0.001$ .

(四) 葡萄藻粗萃取液對小鼠 3T3-L1 纖維母細胞的 SIRT1、MMP2 及 MMP9 基因表現量之影響

在經 D-半乳糖處理的 3T3-L1 細胞中，SIRT1 表現量顯著降低，但 MMP2 及 MMP9 表現量卻增加。將 D-半乳糖處理過的細胞，用葡萄

藻粗萃取液處理後，與實驗組（加 D-半乳糖）相比，熱萃組的 SIRT1 表現量顯著增加 ( $p < 0.001$ )，而 MMP2 ( $p < 0.001$ ) 及 MMP9 ( $p < 0.001$ ) 表現量則顯著的降低；而未處理組僅增加 SIRT1 表現量 ( $p < 0.05$ )，冰萃組則僅降低 MMP2 及 MMP9 ( $p < 0.01$ ) 的表現量 (Fig. 8A-C)。

Dutot *et al.* (2012) 發現泡葉藻 (*Ascophyllum nodosum*) 提取物可以增加上皮細胞 SIRT1 活性。SIRT1 活性可顯著降低受損細胞 ROS 產生量，並增加細胞存活率，其被認為在調節細胞生理過程中起重要作用，例如通過各種物質的去乙酰化作用來調節氧化壓力、老化、代謝、細胞生長、細胞存活及細胞凋亡 (Salminen *et al.*, 2013)。Shimada *et al.* (2014) 研究中指出，SIRT1 是一種有效的細胞內氧化應激和炎症反應抑制劑，也可促進錳型超氧化物歧化酶 (MnSOD) 的表現及增加人類視網膜微血管內皮細胞 (RMEC) 的抗氧化壓力能力。從褐藻中分離出的褐藻素具有多種生物學功能，可抗小鼠的炎症、抗腫瘤及減輕肥胖。褐藻素是一種有效的海洋性質化合物，能通過促進的 SIRT1 / AMPK 途徑，增加油酸誘導的脂肪肝細胞的脂解作用，並抑制其脂肪生成 (Yu *et al.*, 2017)。人們對天然抗氧化劑的興趣日益濃厚，發現褐藻醣膠基於其令人滿意的體外抗氧化劑效能，已將該分子鑑定為神經病理學和代謝異常的有效藥物，這種海藻多醣的肝保護作用還包括 SIRT1 的過表現，其通過抑制高血糖症、減輕炎症、刺激酶促抗氧化反應、減輕肥胖及胰島素抵抗 (Dimitrova-Shumkovska *et al.*, 2020)。

MMPs (Matrix metalloproteinases) 為內生性胜肽水解酶，透過水解細胞外間質及細胞骨架，參與人體許多正常生理反應，例如胚胎發育、器官形成、神經生長、排卵、傷口癒合、血管生成及細胞凋亡 (Nagase and Woessner Jr, 1999)。MMPs 是重要的細胞外基質降解酶，在癌症進展以及其他重要疾病 (例如氧化應激及肝纖維化) 的轉移中具有重要作用，褐藻物種已被證明是抗 MMPs 藥劑的良好來源，對 MMP-2 和 9 活性具高度抑制作用 (Bae *et al.*, 2015)。褐藻經由正己烷分餾之粗萃取物，存在大量的各種多醣衍生物，可抑制 MMP-2 及 MMP-9 的 mRNA 基因表現量及蛋白質水平，被認為可能是 MMPs 的潛在抑制劑 (Lee *et al.*, 2017)。綠藻提取物抑制了皮膚及關節細胞的炎症反應，部分原因是其抗氧化特性抑制了 MMPs 蛋白酶活性及降低細胞內 ROS 表現，推測也許可作為皮膚和關節炎性疾病的替代藥物 (Miyata *et al.*, 2019)。昆布醣是中性的褐藻水溶性  $\beta$ -D-葡聚醣，具有免疫調節、輻射防護及抗癌活性，天然

和硫酸化的昆布醣均能保護正常的表皮細胞，但只有硫酸化的昆布醣才能夠使黑色素瘤細胞對 X 射線輻射敏感，從而顯著抑制細胞增殖、聚落形成及癌細胞轉移，其機制與抑制 MMP-2 和 MMP-9 蛋白酶活性有關 (Malyarenko *et al.*, 2019)。

## 結 論

海藻功能繁多，除可提供氧氣，減少二氧化碳及作為魚蝦貝類棲息地和餌料之外，也跟人類的生活息息相關，例如可供人類食用及作為健康食品與美容醫療方面的素材，可提煉藻膠與生質能源，另外也可用於觀賞水族。本研究進行葡萄藻營養成分分析、粗萃取技術開發及探討粗萃取液總醣含量、總酚含量及多種抗氧化能力等，得知此藻透過一些簡單方式獲得的粗萃取液即具有良好的抗氧化能力及清除自由基能力等功能，可作為天然及安全的抗氧化素材，若能進一步開發與落實應用，必有助於提高海藻的附加價值，並促進海藻產業的發展。

## 謝 辭

本研究經費由行政院農業委員會水產試驗所 106 農科-10.3.1-水-A1(7) 計畫項下支助。計畫執行期間承蒙東部中心同仁協助，使本研究可順利完成，在此一併致謝。

## 參考文獻

- 洪郁嵐, 黃培安, 吳純衡 (2010) 三種褐藻水萃物之抗氧化與免疫活性評估. 水產研究, 18(2): 95-107.
- 張榕欣, 易琮凱, 柯芬妮, 蔡慧君 (2019) 紅葡萄藻生物活性之應用研究. 水產試驗所2019年年報, 基隆, 138 pp.
- 衛生福利部 (2013) 食品中脂肪酸之檢驗方法. 102年10月11日部授食字第1021950978號公告.
- A.O.A.C. (2005) Official Method 988.15 Tryptophan in foods and food and feed ingredients. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed., Revision 1, pp. 88–89. Gaithersburg, MD: AOAC International.
- A.O.A.C. (2005) Official Method 994.12 Amino acids in feeds. In Official Methods of Analysis of AOAC

- International, 18th ed., Revision 1, pp. 9–19. Gaithersburg, MD: AOAC International.
- A.O.A.C. (2009) Official Method 984.27 For the determination of nine nutritional elements in food products by Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy after microwave digestion: single-laboratory validation and ring trial. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 92(5): 1484-1518.
- Bae, M. J., F. Karadeniz, B. N. Ahn and C. S. Kong (2015) Evaluation of effective MMP inhibitors from eight different brown algae in human fibrosarcoma HT1080 cells. *Prev Nutr Food Sci.*, 20(3): 153-161.
- Ben-Saad, H., I. Ben-Amara, N. Kharrat, M. A. Giroux-Metgès, A. Hakim, K. M. Zeghal and H. Talmi (2019) Cytoprotective and antioxidant effects of the red alga *Alsidium corallinum* against hydrogen peroxide-induced toxicity in rat cardiomyocytes. *Arch. Physiol. Biochem.*, 125(1): 35-43.
- Boo, Y. C. (2019) Can plant phenolic compounds protect the skin from airborne particulate matter? *Antioxidants*, 8(9): 379.
- Choi, E., Y. S. Yi, J. Lee, S. H. Park, S. Kim, M. A. Hossain, S. G. Jang, Y. I. Choi, K. J. Park, D. S. Kim, J. H. Kim and J. Y. Cho (2019) Anti-apoptotic and anti-inflammatory activities of edible fresh water algae *Prasiola japonica* in UVB-irradiated skin keratinocytes. *Am. J. Chin. Med.*, 47(8): 1853-1868.
- Decker, E. A. and B. Welch (1990) Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 674-677.
- Dimitrova-Shumkovska, J., L. Krstanoski and L. Veenman (2020) Potential beneficial actions of fucoidan in brain and liver injury, disease, and intoxication -potential implication of sirtuins. *Mar. Drugs.*, 18(5): 242.
- Doetschman, T., T. Georgieva, H. Li, T. D. Reed, C. Grisham, J. Friel, M. A. Estabrook, C. Gard, L. P. Sanford and M. Azhar (2012) Generation of mice with a conditional allele for the transforming growth factor beta3 gene. *Genes*, 50: 59–66.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Dutot, M., R. Fagon, M. Hemon and P. Rat (2012) Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-senescence activities of a phlorotannin-rich natural extract from brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 167(8): 2234-2240.
- Fleurence, J. (1999) Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.*, 10(1): 25-28.
- Gajalakshmi, D., N. Shettu and S. Murugesan (2018) Vitamin content of marine red alga *Botryocladia leptopoda* (J. Agardh) Kylin potential use as a source of vitamins in nutrition. *Int. J. Life Sci. Res.*, 6(2): 263-268.
- Guiry, M. D. and G. M. Guiry (2020) Algaebase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.
- Guo, Y., X. Gu, Y. Jiang, W. Zhu, L. Yao, Z. Liu, H. Gao and L. Wang (2018) Antagonistic effect of laver, *Pyropia yezonensis* and *P. haitanensis*, on subchronic lead poisoning in Rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 181(2): 296-303.
- Itoh, H., H. Noda and H. Amano (1995) Immunological analysis of inhibition of lung metastases by fucoidan (GIV-A) prepared from brown seaweed *Sargassum thunbergii*. *Anticancer Res.*, 15(5B): 1937-1947.
- Kazłowska, K., T. Hsu, C. C. Hou, W. C. Yang and G. J. Tsai (2010) Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *J. Ethnopharmacol.*, 128(1): 123-130.
- Kraft, G. T. (2019) Algae of Australia: Marine benthic algae of north-western Australia 2. Red algae. *Phycologia*, 58(2): 225-227.
- Laffleur, F., J. Psenner and W. Suchaoin (2015) Permeation enhancement via thiolation: in vitro and ex vivo evaluation of hyaluronic acid-cysteine ethyl ester. *J. Pharm. Sci.*, 104(7): 2153-2160.
- Lakshmi, V., R. Kumar, P. Gupta, V. Varshney, M. N. Srivastava, M. Dikshit, P. K. Murthy and S. Misra-Bhattacharya (2004) The antifilarial activity of a marine red alga, *Botryocladia leptopoda*, against experimental infections with animal and human filariae. *Parasitol Res.*, 93(6): 468-474.
- Lee, S. G., F. Karadeniz, J. H. Oh, G. H. Yu and C. S. Kong (2017) Inhibitory effect of *Hizikia fusiformis* solvent-partitioned fractions on invasion and MMP activity of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 22(3): 184-190.
- Liu, X. Y., D. Liu, G. P. Lina, Y. J. Wu, L. Y. Gao, C. Ai, Y. F. Huang, M. F. Wang, H. R. El-Seedi, X. H. Chen and C. Zhao (2019) Anti-ageing and antioxidant effects of sulfate oligosaccharides from green algae

- Ulva lactuca* and *Enteromorpha prolifera* in SAMP8 mice. *Int. J. Biol. Macromol.*, 139: 342-351.
- Malyarenko, O. S., R. V. Usoltseva, T. N. Zvyagintseva and S. P. Ermakova (2019) Laminaran from brown alga *Dictyota dichotoma* and its sulfated derivative as radioprotectors and radiosensitizers in melanoma therapy. *Carbohydr. Polym.*, 206: 539-547.
- Marques, J., E. Vilanova, P. A. S. Mourão and X. Fernández-Busquets (2016) Marine organism sulfated polysaccharides exhibiting significant antimalarial activity and inhibition of red blood cell invasion by *Plasmodium*. *Sci. Rep.*, 6: 24368.
- Miyata, M., S. Iwata, C. K. Mifude, M. Tajima, M. Kameyama, M. Ihara, T. Matsui, S. I. Yamagishi, H. Ishitobi, S. Miyaki and K. Kaseda (2019) A novel *Mucidosphaerium* sp. downregulates inflammatory gene expression in sikin and articular cells. *Altern Ther Health Med.*, AT5779: Online ahead of print.
- Mu, M., X. M. L. Urso, K. Murray, F. Fu and Y. Li (2010) Relaxin regulates MMP expression and promotes satellite cell mobilization during muscle healing in both young and aged mice. *Am. J. Pathol.*, 177(5): 2399-2410.
- Nagase, H. and J. F. Woessner Jr (1999) Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 274(31): 21491-21494.
- Oyaizu, M. (1986) Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35: 771-775.
- Quinderé, A.-L. G., G. R. C. Santos, S.-N. M. C. G. Oliveira, B. F. Glauser, B. P. Fontes, I. N. L. Queiroz, N. M. B. Benevides, V. H. Pomin and P. A. S. Mourão (2014). Is the antithrombotic effect of sulfated galactans independent of serpin? *J. Thromb. Haemost.*, 12(1), 43-53.
- Rizvi, M. A. and M. Shameel (2004) Studies on the bioactivity and elementology of marine algae from the coast of Karachi, Pakistan. *Phytother. Res.*, 18(11): 865-872.
- Robak, J. and R. J. Gryglewski (1988) Flavonoids are scavenging of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 37(5): 837-841.
- Sajadimajd, S., S. Momtaz, P. Haratipour, F. F. El-Senduny, A. I. Panah, J. Navabi, Z. Soheilikhah, M. H. Farzaei and R. Rahimi (2019) Molecular mechanisms underlying cancerp preventive and therapeutic potential of algal polysaccharides. *Curr. Pharm. Des.*, 25(11):1210-1235.
- Salminen, A., K. Kaarniranta and A. Kauppinen (2013) Crosstalk between oxidative stress and SIRT1: impact on the aging process. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(2): 3834-3859.
- Seo, M. J., Y. J. Seo, C. H. Pan, O. H. Lee, K. J. Kim and B. Y. Lee (2016) Fucoxanthin suppresses lipid accumulation and ROS production during differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother. Res.*, 30(11): 1802-1808.
- Shimada, T., H. Furuta, A. Doi, H. Ariyasu, H. Kawashima, H. Wakasaki, M. Nishi, H. Sasaki and T. Akamizu (2014) Des-acyl ghrelin protects microvascular endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis through sirtuin 1 signaling pathway. *Metab. Clin. Exp.*, 63(4): 469-474.
- Singleton, V. L. and J. A. Rossi (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16: 144-158.
- U.S. EPA. (2007) "Method 3051A (SW-846): Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges and oils," Revision 1. Washington, DC.
- Xu, Y., S. Burton, C. Kim and E. Sismour (2016) Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food Sci. Nutr.*, 4(1): 125-133.
- Yamaguchi, T., H. Takamura, T. Matoba and J. Terao (1998) HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(2): 1201-1204.
- Yu, W. C., Y. L. Chen, P. A. Hwang, T. H. Chen and T. C. Chou (2017) Fucoidan ameliorates pancreatic  $\beta$ -cell death and impaired insulin synthesis in streptozotocin-treated  $\beta$  cells and mice via a Sirt-1-dependent manner. *Mol. Nutr. Food Res.*, 61(10).
- Yu, Y., Y. Liu, C. Zong, Q. Yu, X. Yang, L. Liang, F. Ye, L. Nong, Y. Jia, Y. Lu and Z. Han (2016) Mesenchymal stem cells with Sirt1 overexpression suppress breast tumor growth via chemokine-dependent natural killer cells recruitment. *Sci. Rep.*, 26(6): 35998.
- Zaharudin, N., A. A. Salmeán, L. O. Dragsted (2018) Inhibitory effects of edible seaweeds, polyphenolics and alginates on the activities of porcine pancreatic alpha-amylase. *Food Chem.*, 245: 1196-1203.

## Composition Analysis of *Botryocladia leptopoda* and Application of Crude Extract

Pei-Shan Lee<sup>1\*</sup>, Po-Yuan Hsu<sup>2</sup>, Jun-Yi Huang<sup>1</sup> and Yuan-Shing Ho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eastern Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Department of Thoracic Medicine, Kaohsiung Chang Gung Memorial Hospital

### ABSTRACT

This research conducted nutrient component analysis, extraction technology development and various antioxidant capacity analysis of *Botryocladia leptopoda*, in order to increase the utilization and associated added value of *B. leptopoda*, while promoting the development of the seaweed industry as well. We found that every 100 g of fresh *B. leptopoda* contains 94.4 g of water, 3.1 g of ash, 10 Kcal of calories, 0.5 g of protein, and 2.0 g of carbohydrates (including 0.9 g of dietary fiber), but no sugar, trans fat, or saturated fat. In addition to the above, glutamate, glycine, cystine, sodium, potassium, magnesium, calcium, phosphorus, boron, iron, copper, nickel, zinc, manganese, and cobalt are also included. In terms of extraction and application research, we found that the hot extraction group provided better results than the other two groups (the untreated group and the ice extraction group) in terms of total sugar, total phenol, reducing power, ability to scavenge superoxide anion, capacity to capture DPPH free radicals, and ability to chelate ferrous ion. In cell experiments, we found that the crude extract of *B. leptopoda* did not affect the viability of 3T3-L1 cells, while the crude extract significantly decreased the levels of LDH and ROS (by about 60-70%) in cells treated with D-galactose. The crude extract of *B. leptopoda* thus has a significant protective effect on 3T3-L1 cells that have been damaged by D-galactose. After the cells treated with D-galactose were subjected to the crude extract of *B. leptopoda*, their SIRT1 levels were significantly increased, while their MMP2 and MMP9 levels were significantly decreased. The above results indicate that *B. leptopoda* has good anti-oxidant capabilities when subjected to simple hot extraction, and has the potential to be developed as a natural and safe anti-oxidant material.

**Key words:** *Botryocladia leptopoda*, crude extract, anti-oxidant

---

\*Correspondence: 299 lane 291 Sec.2 Zhiben Rd., Taitung, Taitung 950, Taiwan. TEL: (089) 514362 ext. 207; FAX: (089) 514366; E-mail: pslee@mail.tfrin.gov.tw