

鋸齒麒麟菜萃取物作為保骨素材之可行性研究

陳柏璇、杜明杰

水產試驗所水產加工組

NORMAL BONE

OSTEOPOROSIS

前言

紅藻含有較多藻紅素外觀為紫紅或鮮紅色，由於藻紅素可吸收葉綠素所無法吸收的青綠光，可生長在較深的海域，甚至水深 100 m 處仍可發現蹤跡 (Schaeffer and Krylov, 2000)。紅藻中的鋸齒麒麟菜 (*Eucheuma serra*)，屬紅藻門 (Rhodophyta) 真紅藻綱 (Rhodophyceae) 杉藻目 (Gigartinales)，含膠量在 30% 左右，是萃取鹿角菜膠的工業用海藻 (臺灣海藻資訊網，2012)。全球每年有 8 百萬噸的產量 (White and Wilson, 2012)。

麒麟菜富含調節體生理作用的活性物質，如海藻多醣、海藻氨酸、高度不飽和脂肪酸及微量元素 (如鐵、鋅、銅、錳)，也含有豐富的鈉、鉀、鎂、鈣和蕨藻紅素 (Caulerpin) 等 (毛和李，1997；陳，2007；楊等，2002)。麒麟菜多醣組成主要為半乳糖 (galactose) 和少量的葡萄糖 (glucose)、木糖 (xylose)、塔羅糖 (talose) 以及艾杜糖 (idose) 等 (梁等，2005)。

人口結構高齡化已成為全球趨勢，2015 年臺灣 65 歲以上老人比率已達 12.3% (287 萬人)，老化指數 (65 歲以上人口/0-14 歲以上人口 × 100) 為 90.9%，預估 2018 年 65 歲以上老人達 14%，進入高齡社會；2025 年邁入超高齡社會，年醫療支出費用將成為政府經濟和家庭的負擔。研究證實，攝取機能

性的膳食補充品可以提供已有疾病症狀但未發病之人的食療效果而節省龐大醫療給付。為因應高齡化趨勢，利用紅藻機能成分研發海洋性骨質保健素材，應用於銀髮族營養膳食補充，以改善年長者之生活品質，可提升海藻類的附加價值和產業競爭力。

材料與方法

一、原料

鋸齒麒麟菜由本所東部海洋生物研究中心提供，再經 50°C 熱風乾燥 10 小時後備用 (圖 1a)。

二、一般成分分析

分別依據國家標準 CNS 5033 (水分)、CNS 5034 (灰分)、CNS 5035 (粗蛋白質) 和 CNS 5036 (粗脂肪) 等進行測定，碳水化合物之計算則以 100% 扣除水分、灰分、粗蛋白質和粗脂肪之加總量。

三、製備鋸齒麒麟菜萃取液

鋸齒麒麟菜分別經熱水解、酸水解和酵素水解處理，製備不同處理方法之低濃度 0.2% 及高濃度 2% 紅藻萃取液。

四、還原糖、總糖量、總多酚量和鈣含量之測定

(一) 還原糖含量測定

依據 Miller (1959) 方法，取 0.5 ml 樣品加入 0.5 ml DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) 試

劑，搖勻後於 100°C 沸水浴中靜置 5 分鐘，再加入 1 ml 去離子水，靜置 20 分鐘，以全波長微盤分析儀 (Infinite M200 PRO Microplate Reader, Tecan Co., Switzerland) 於波長 546 nm 測定其吸光值，並以半乳糖建立檢量曲線，再換算樣品之還原糖量 (mg/ml)。

(二) 總糖量測定

依據 Dubois et al. (1956) 方法，取 400 μ l 樣品加入 200 μ l 5% 酚溶液，再加入 1 ml 濃硫酸 (36 N)，於室溫靜置反應 30 分鐘，以全波長微盤分析儀於波長 480 nm 測定其吸光值，並以半乳糖建立檢量曲線，換算出樣品之總糖量 (mg/ml)。

(三) 總多酚量測定

參考 Singleton and Rossi (1965) 方法，取 0.25 ml 樣品加入 0.25 ml 福林試劑 (Folin-Ciocalteu reagent)，再加入 3.75 ml 去離子水，搖勻靜置 10 分鐘後，加入 0.5 ml 20% 碳酸鈉 (NaCO_3) 溶液，於 40°C 水浴中反應 20 分鐘後，以全波長微盤分析儀於波長 755 nm 測定其吸光值，吸光值越高表示總酚類化合物含量越多。以沒食子酸 (gallic acid) 建立標準曲線，總多酚量以每克樣品中所含沒食子酸當量毫克數表示 (mg gallic acid equivalent/g extract)。

(四) 鈣含量測定

取適量樣品加入 10 ml 濃鹽酸 (12 N) 後再以去離子水稀釋至 50 ml，取 20 ml 溶液加熱至沸騰，依序加入 40 ml 熱草酸銨溶液和 1-2 滴甲基紅，最後緩慢加入 6 M 氨水使草酸鈣沉澱至溶液呈黃色，靜置 30 分鐘，以去離子水清洗沉澱物，再加入 30 ml 去離

子水和 0.9 M 20 ml 硫酸溶解沉澱物，加熱至 60°C，最後以標定過的過錳酸鉀溶液滴定。

五、細胞活存率

MTS assay 試驗是依據 Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) 使用手冊進行測定。將人類類造骨細胞 MG-63 (Human osteoblast-like cells) 以 20,000 cells/well 之密度種入 96 孔盤，培養 1 天後，移除培養液，再加入含不同濃度 (0.625-10 mg/ml) 之麒麟菜萃取物的培養液 (無血清)，培養 24 小時後，移除培養液，再加入 19 μ l 的 MTS 和 1 μ l 吩嗪硫酸甲酯 (phenazine methosulfate, PMS) 溶液，於培養箱中反應 4 小時，以全波長微盤分析儀於波長 490 nm 測定其吸光值。

六、鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性分析

因鹼性磷酸酶被視為與造骨細胞活性有關的標記之一，為分子量 65,000 Dalton 大小的糖蛋白，因此藉由測量骨細胞分泌 ALP 活性來作為造骨細胞功能的指標。

依據 Huang et al. (2011) 方法測定，將 MG-63 細胞 (10,000 cells/well) 種入 96 孔盤，待細胞貼附後，加入含脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 1 μ g/ml 及分化劑的培養基，培養 10 天後，用磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 2 次，再加入 200 μ l 的 p-硝苯基磷酸 (p-Nitrophenyl phosphate, pNPP) 溶液 (Sigma, N2770)，25°C 下以鋁箔紙包覆 96 孔盤避光 30 分鐘，再加入 50 μ l 3M 氫氧化鈉 (NaOH)，以全波長微盤分析儀於波長 405 nm 測定其吸光值。

結果與討論

一、一般成分分析

鋸齒麒麟菜主要成分為碳水化合物，約佔 52.22%，灰分佔約 $25.69 \pm 0.16\%$ 、水分 $13.77 \pm 0.07\%$ 、粗蛋白 $13.51 \pm 0.12\%$ 、粗脂肪 $0.24 \pm 0.07\%$ 。此結果與游 (2012) 和王 (2009) 對鋸齒麒麟菜和耳突麒麟菜的分析相較，以灰分、碳水化合物和粗蛋白等含量差異較大，此可能係因品種、採收地點和時間不同所致，而水分差異之原因為本次測試藻體為已乾燥藻體，故水分較低 (表 1)。

二、還原糖、總糖量、總多酚量和鈣含量之變化

因鋸齒麒麟菜主要成分為碳水化合物，故測定還原糖、總糖量和多酚量可以更加了解麒麟菜萃取前後糖量以及與後續分析有關之成分變化。測定以水、酵素和檸檬酸三種萃取法製備之 2% 和 0.2% 之鋸齒麒麟菜萃取液 (圖 1b、1c、1d) 的總糖量、還原糖、總多酚量和鈣含量之變化，結果顯示，2% 和 0.2% 之鋸齒麒麟菜水萃取液所測得的含

量分別為 2.67 與 0.58 mg/ml、0.03 與 0.01 mg/ml、2.13 與 0.41 mg/ml、80 與 5 ppm；酵素萃取液分別為 85.78 與 19.59 mg/ml、1.83 與 1.19 mg/ml、29.14 與 38.41 mg/ml、650 與 140 ppm；檸檬酸萃取液則分別為 65.89 與 16.83 mg/ml、2.40 與 0.26 mg/ml、104.73 與 28.69 mg/ml、830 與 100 ppm (表 2、3、4)。比較鋸齒麒麟菜萃取液中之總糖量、還原糖、總多酚量和鈣含量皆出現濃度效應，以 2% 高於 0.2% 處理組。三種萃取法中，檸檬酸萃取液除總糖外，其於含量均高於另 2 種萃取法。

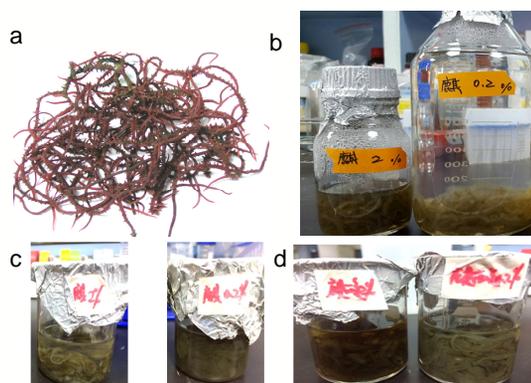


圖 1 a：鋸齒麒麟菜；b：水萃取液；c：酵素萃取液；d：檸檬酸萃取液

表 1 麒麟菜一般成分分析 (%)

	水分	粗蛋白	粗脂肪	灰分	碳水化合物
<i>Euclima serra</i> ¹	13.77 ± 0.07	11.65 ± 0.11	0.21 ± 0.06	22.15 ± 0.15	52.22 ± 0.26
<i>Euclima serra</i> ²	46.47 ± 0.07	9.18 ± 0.09 (17.15) ⁴	1.61 ± 0.19 (3.01)	17.65 ± 0.36 (32.97)	25.09 ± 0.49 (46.87)
<i>Euclima cottonii</i> ³	40.42 ± 0.98	3.16 ± 0.17 (5.30)	0.55 ± 0.01 (0.92)	29.72 ± 1.33 (49.88)	26.15 ± 1.76 (43.89)

¹藻類來源為本所東部海洋生物研究中心；²游 (2012)；³王 (2009)；⁴此為乾藻時之重量

表 2 不同萃取法之 0.2% 和 2% 鋸齒麒麟菜水解物中總糖和還原糖量之比較

	總糖量 (mg/ml)		還原糖量 (mg/ml)	
	2%	0.2%	2%	0.2%
熱水萃取	2.67 ± 1.06	0.58 ± 0.42	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00
檸檬酸萃取	85.78 ± 2.75	19.59 ± 0.48	2.40 ± 0.30	0.26 ± 0.01
酵素萃取	65.89 ± 2.43	16.83 ± 1.23	1.83 ± 0.13	1.19 ± 0.07

表 3 不同萃取法之 0.2% 和 2% 鋸齒麒麟菜水解物中總多酚含量之比較

	總多酚量 (mg/ml)	
	2%	0.2%
熱水萃取	2.13 ± 0.21	0.41 ± 0.03
檸檬酸萃取	104.73 ± 47.10	28.69 ± 2.45
酵素萃取	29.14 ± 0.63	38.41 ± 0.77

表 4 不同萃取法之 0.2% 和 2% 鋸齒麒麟菜水解物中鈣含量之比較

	鈣含量 (ppm)	
	2%	0.2%
熱水萃取	80 ± 4	5 ± 2.5
檸檬酸萃取	830 ± 41.5	100 ± 50
酵素萃取	650 ± 32.5	140 ± 70

三、不同萃取法的鋸齒麒麟菜萃取液對人類類造骨細胞 MG-63 之細胞毒性試驗

將不同方法與濃度 (0.625、1.25、2.5、5 和 10 mg/ml) 之鋸齒麒麟菜萃取液，分別與 MG-63 細胞反應 24 小時後，以 MTS assay 測試細胞活存率，並以未添加樣品為控制組 (control)。結果顯示，鋸齒麒麟菜水萃取物和酵素水解物與人類類造骨細胞 MG-63 反應 24 小時後，活存率分別為 103.84–115.97% 和 87.21–108.84%，並無細胞毒性 (圖 2a、2b)，但鋸齒麒麟菜檸檬酸水解物與

人類類造骨細胞 MG-63 反應 24 小時後，活存率僅介於 8.29–11.92%，推測可能係檸檬酸水解物的 pH 值太低，導致細胞無法承受，而呈現較低的細胞活存率 (圖 2c)。進一步將鋸齒麒麟菜酵素水解物與人類類造骨細胞

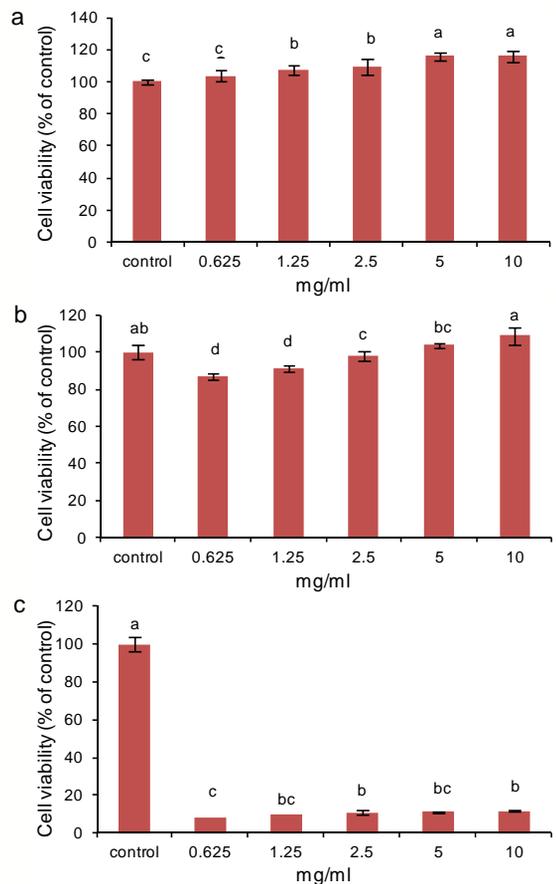


圖 2 2% 鋸齒麒麟菜之 a：水萃、b：酵素、c：檸檬酸萃取物與人類類造骨細胞 MG-63 反應 24 小時之細胞活存率

MG-63 反應 48 小時後，與未添加樣品為控制組以及 10 mg/ml 麒麟菜水萃物做比較，活存率為 100.83–133.78%，確認並無細胞毒性，且隨著劑量增加，活存率也跟著上升；與麒麟菜水萃水解物比較，顯示相同劑量下，酵素水解物可得到較高的細胞活存率(圖 3)。

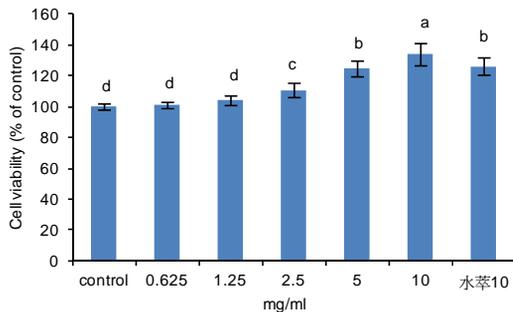


圖 3 2% 鋸齒麒麟菜酵素水解物與人類類造骨細胞 MG-63 反應 48 小時之細胞活存率

四、不同濃度鋸齒麒麟菜酵素水解物對人類類造骨細胞 MG-63 之鹼性磷酸酶活性評估

在培養基中未添加分化劑時，不同濃度 (0.625、1.25、2.5、5 和 10 mg/ml) 之鋸齒麒麟菜酵素水解物，可顯著提高 ALP 酵素活性達 158.10–247.59%，與控制組有顯著差異。

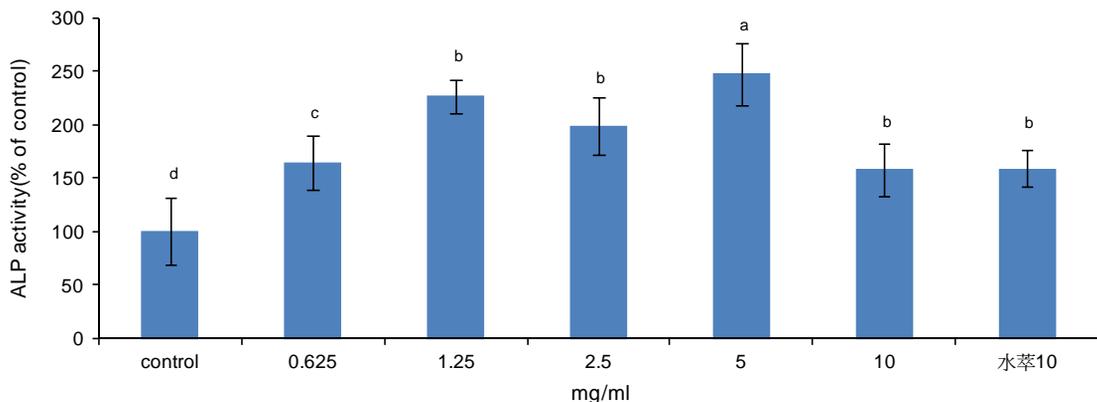


圖 4 2% 鋸齒麒麟菜酵素水解物對人類類造骨細胞 MG-63 的細胞分化 ALP 試驗

在濃度為 0.625–5 mg/ml 時，酵素水解物之酵素活性表現量皆高於水萃水解物 (159.17%)，且以濃度 5 mg/ml 處理組有最高的 ALP 酵素活性表現 (247.59%)，兩組間有顯著差異。綜上結果顯示，鋸齒麒麟菜酵素水解物可提高人類類造骨細胞 MG-63 的分泌，亦即具有促進骨細胞分化的能力(圖 4)。

結語

以細胞模式分析三種萃取方法 (水、酵素和檸檬酸) 所獲得之鋸齒麒麟菜水解物，結果顯示均可獲得較高的還原糖、總糖量、總多酚量和鈣含量，而其中又以檸檬酸萃取後的還原糖、總多酚和鈣含量為最高。在 MG-63 細胞模式下，無論是水萃或酵素萃取水解物對 MG-63 細胞皆無毒性，而檸檬酸水解物則因 pH 較低，細胞活存率不佳。在促進人類類造骨細胞 MG-63 之分化作用方面，對於成本的考量，以酵素萃取水解物的效果最佳，具有開發作為海洋性骨質保健素材之潛力，未來將進一步加強相關研究，期能研發安全又有效之強化骨質健康食品。