

高淑雲¹，馮貢國¹，吳珮君¹，陳聰松¹，龔瑞林²

¹行政院農業委員會水產試驗所 水產加工系

²國立臺灣海洋大學 食品科學系

(1999 年 8 月 24 日接受)



魷仔魚水煮液加工條件對細胞免疫活性之影響

摘要

魷仔魚水煮液原液食鹽含量約為 7% 左右，經電氣透析脫鹽後之魷仔魚水煮液，食鹽含量降為 0.15%，脫鹽率 98%。取其脫鹽液以無血清動物細胞培養模式，來評估魷仔魚水煮液對於人類融合瘤 HB4C5 細胞增生情形，結果顯示，魷仔魚水煮液可促進細胞增生及 IgM 抗體分泌，並由顯微鏡觀察到細胞凝集現象；亦能促進人類單核球細胞 THP-1 與類似老鼠巨噬細胞 J774.1 等吞噬細胞增生。在模擬加工條件探討上，以不同鹽度水煮生鮮魷仔魚，發現以 5-7% 食鹽濃度所處理之魷仔魚，其水煮液經脫鹽後對於促進細胞活性為較佳。魷仔魚水煮液經 121°C 處理 20 分鐘仍維持 88% 之細胞增生活性，且抗體產量活性仍維持 93%，顯示魷仔魚水煮液具有良好之熱安定性。魷仔魚水煮液 pH 值安定性範圍為 2-7 左右，在 pH 值 8-10 鹼性部分則活性有下降之趨勢。取脫鹽液添加至 U937 及 UM ϕ 等巨噬細胞中測定其 NBT reducing，其結果顯示魷仔魚水煮液可以活化巨噬細胞。魷仔魚水煮液之不同加工方式，無論以高壓高溫殺菌、噴霧乾燥或凍結乾燥其細胞增生活性均能維持 80% 以上。本研究顯示魷仔魚水煮液在加工過程中品質頗為安定。

關鍵詞：魷仔魚水煮液，電氣透析，無血清培養，細胞增生，抗體分泌

水產罐頭、鰹節及水產乾製品等水產加工品，加工過程中會產生大量的蒸煮液，且煮液中含有高量的食鹽⁽¹⁾，如無妥善處理便會造成環保上的一大問題。因此資源的再利用是解決環保問題的最好方法。魷仔魚捕獲後很容易自家消化分解，所以漁民捕獲後立即以加鹽之沸水煮熟，而產生的大量廢液除了少量用來製造魚露作為烹煮之調味料外，其餘大多遺棄，這些水煮液如不加利用，不但形成資源的浪費，也會污染環境，因此，必須妥善加工利用，以增加漁獲物之經濟效益。由於此煮液中鹽分含量很高⁽²⁾，故必須先行脫鹽處理。當生鮮的魷仔魚捕獲上岸，如無妥善之處理，一但原料鮮度降低，魚體立即變軟，甚至呈現泥濘狀態，因此在魷仔魚加工方面，漁民大多採用添加食鹽之沸水煮熟⁽³⁾，其水煮時間極短（約 3-5 分鐘），即立刻將魷仔魚撈起。其留於煮鍋內之魷仔魚水煮液，漁民有

些利用為烹煮之調味料（魚露）使用，或當廢棄物丟棄，或直接排入水溝，造成環境污染。因此魷仔魚水煮液如能妥善利用，應可解決棄置後所造成的環保問題。基於此本文以無血清動物細胞培養模式進行細胞免疫活性探討，以期有效利用魷仔魚加工所產生之水煮液。

材料與方法

(一) 實驗材料

1. 魷仔魚水煮液之取得與處理

新鮮魷仔魚水煮液取自淡水地區，為能得到鮮度良好之魷仔魚水煮液，本實驗樣品收集是委託當地漁會人員協助。採樣方式為漁民水煮完畢放冷之後，以 20L 裝之容器，盛裝載運回實驗室。回實驗室後必須馬上

進行過濾及分裝工作，過濾是以 200 mesh 過濾器過濾，濾液則以每 2 l 為一袋包裝，置於-30°C 貯藏，供做日後實驗原料。

2. 電透析裝置

Micro Acilzer G 3 型，日本旭化成公司空見 (Asahi Chemical Industry CO. LTD)，透析膜 AC-110-400，電流密度為 5mA/cm²，液體流速為 400-900 ml/min。

3. 細胞株

本實驗中所使用之細胞株有分析細胞增生及抗體分泌之人體融合瘤細胞 HB4C5 (Human-human hybridoma, HB4C5) 與 SI102 (Human- mouse hybridoma, SI102)，類似人類巨噬細胞 U-937 (Human- macrophage-like cell, U-937) 與類似人類巨噬細胞 U-M (human-macrophage-like cell, UM ϕ)；人類單核球 THP-1 (Human-monocyte, THP-1) 與類似老鼠巨噬細胞 J774.1 (Mouse macrophage-like cell, J774.1)。

(二) 分析測定方法

1. 魷仔魚水煮液過氧化氫測定

在魷仔魚水煮液中，滴加 5% 硫酸鈦溶液，依中國國家標準法測定⁽⁴⁾，觀察是否呈淡黃至黃褐色，以此顏色的產生判斷是否含有過氧化氫。

2. 魷仔魚水煮液電氣透析處理

魷仔魚水煮液皆取自淡水地區，取回之魷仔魚水煮液先以 200 mesh 篩網過濾，除去雜質後，經 8,000 rpm (Beckman J-25) 離心 30 分鐘後，取上層澄清液以電氣透析脫鹽處理；首先將電氣透析裝置，裝上電氣透析透析膜，準備 2 個 1,000 ml 之燒杯，一個裝魷仔魚水煮液 (原液)，於裝原液燒杯的外圍添加冰塊，以防止脫鹽過程中鮮度降低，另一個裝去離子水 (接收食鹽廢液)。AC-110-400 透析膜之初運轉電壓為 14.5 V，運轉中採電壓自動控制模式，試料液及鹽廢液循環穩定後進行脫鹽處理。

3. 蛋白質定量

採用 Bio-Rad DC (Detergent-Compatible) Protein Assay 之方法⁽⁵⁾，取 5 μ l standard 或 sample 溶液至 microtiter plate，加 25 μ l 反應試劑 A (Alkaline copper tartrate solution) 之後再加 200 μ l 反應劑 B (Folin reagent) 混合作用 15 分鐘，以 630 nm 測吸光值，並以 0.19、0.38、0.75、1.5、3 mg/ml 的牛血清蛋白 (Bovine serum albumin standard, Bio-Rad) 作為標準

蛋白質求出標準曲線，經由標準曲線內插換算樣品中蛋白質濃度。

4. 動物細胞培養

將細胞以 eRDF 培養基 (極東試藥) 及 5% 胎牛血清 (Gibco 試藥) 培養於 37°C、5% CO₂ 濃度下之細胞株以倒立式顯微鏡 (Olympus CK-2) 觀察，當細胞達滿盤時，在無菌操作臺 (Laminar flow) 內，以微量吸管將培養皿內含細胞之培養液吸入無菌離心管，經 1,500 rpm 離心 5 分鐘後，以抽氣機吸去上層液，沉澱物即為細胞。接著以 3 ml 新培養液沖散管內之細胞，吸取 1 ml 含細胞之培養液，加入置有 9 ml 新培養液之培養皿，前後左右搖晃培養皿使細胞均勻分散。最後以倒立式顯微鏡觀察細胞數是否足夠，再放入 37°C、5% CO₂ 培養箱培養。

5. 細胞增殖之測定 (MTT assay)

依 Kong 等人之方法⁽⁶⁾，將培養良好之細胞以細胞培養方式離心收集，用少量培養基混合均勻，取 0.5 ml 和 4.5 ml 稀釋液混合後，以細胞計數器計算細胞密度，再根據此數值將細胞密度調整為 1×10^5 cell/ml。另將測試樣品經連續二倍稀釋之後以 20 μ l/well 量加入 96 wells culture plate 中，隨後加入上述細胞培養液 (100 μ l/well) 放入 37°C、5% CO₂ 培養箱 (Napco 5410)，培養 48 小時後，以 100 μ l/well 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (1mg/ml) 及 YLP (Yolk lipoprotein) 等比例混合物，於 37°C 反應 4 小時，接著振盪 3 分鐘，即可測 570nm (Dyne-ex mrx ELISA 96wells plate reader) 吸光值。

6. 抗體產量之測定 (酵素聯結免疫分析法)

將培養良好之細胞以細胞培養方式離心收集，用少量培養基混合均勻，取 0.5 ml 和 4.5 ml 稀釋液混合後，以細胞計數器 (Sequoia-turner cell-dyn 300) 計算細胞密度，再根據此數值將細胞密度調整為 5×10^4 cell/ml。另將測試樣品經連續二倍稀釋後以 20 μ l/well 量加入 96wells culture plate 中，隨後加入上述細胞培養液 (100 μ l/well) 放入 37°C、5% CO₂ 培養箱培養 24 小時。測定 ELISA 前，先將 Goat anti-human- α light chain Ab、Goat anti-human- λ light chain Ab (Pierce 試藥) 用 50 mM Na₂CO₃ buffer (pH9.6) 作 1,000 倍稀釋後，以 100 μ l/well 量加入 96 well immunoplate，置於 4°C、overnight。取出後，以含有 0.05% Tween 20 之 PBS (清洗三次，以 50 μ l/well 量將待測液 (前述加入樣品培養 24 小時後離心之細

胞培養上清液)及稀釋 4,000 倍之 Human IgM 加入 well 內，行等倍稀釋後 (以此標準品繪製標準曲線，藉以求出樣品之 IgM 濃度)，置於 37°C、作用 1 小時後，將 HRPO conjugate goat anti-human IgM (Pierce 試藥) 抗體以 PBS (Phosphate-buffered saline) 作 2,500 倍稀釋，並以 100 μ l/well 量加入 well 內，置於 37°C 作用 1 小時，TPBS 反覆沖洗三次，並將 well 內水分除去，再將 ABTS (2, 2'-azinobis (ethylbenzothiazoline) -6-sulfonic acid) 以 100 μ l/well 量加入 well 內，置於 37°C 反應 15 分鐘後，加入 1.5% oxalic acid (100 μ l/well) 終止反應，並測 410 nm 吸光值。

7. 加鹽萃取試驗

取新鮮魷仔魚，分成 5 組，每組為 1 Kg，配製食鹽濃度為 (3、5、7、10、15%)，將食鹽溶液加熱至沸騰，將已事先分組之新鮮魷仔魚，分別放入沸騰的食鹽水中，以計時器計時 5 分鐘，立即以有孔漏勺撈起，撈起後置於鏤空之平盤上，以電風扇冷卻及風乾。其留於鍋中之液體為魷仔魚水煮液。此魷仔魚水煮液經過濾、離心後之澄清液，以電氣透析脫鹽、凍結乾燥保存於 4°C，爾後進行活性分析。

8. 熱安定性試驗

將已脫鹽之魷仔魚水煮液，經過濾、離心後，分裝於殺菌瓶內，設定殺菌釜之加熱條件，分別為 110°C，20 min 及 121°C，20 min。將熱處理後之水煮液凍乾燥保存於 4°C，爾後進行活性分析。

9. 真空凍結乾燥法

以 FTS Freeze Dryer Model No. TD - 2-372 DURA-DRY 真空凍結乾燥機乾燥，將魷仔魚水煮液置入凍結盤，保持水平置-30°C 中凍結，凍結後取出凍結盤放置真空凍結乾燥室，Cold Trap 之溫度為 -95°C，真空室內之壓力維持在 30 Miltorr (加熱板控制 40°C 供給昇華潛能)，進行真空凍結乾燥至樣品終點溫度 25°C (使其含水率約 4-6%)。

10. 噴霧乾燥方法

以 BÜCHI 190 Mini Spray Dryer 噴霧乾燥機進行乾燥。魷仔魚水煮液使用 0.5 mm 噴嘴噴霧，並調節幫浦壓力和噴射速度，以設定噴嘴口溫度 137 $\pm$ 2°C 和出口溫度 78 $\pm$ 5°C 進行乾燥。

11. 高溫高壓殺菌處理

Tomy Seiko 之高壓殺菌釜進行瓶裝罐殺菌。魷仔魚水煮液調整其蛋白質 (1.2 mg/ml) 含量後，以每瓶 100 ml 之體積分裝進行殺菌作業。其殺菌條件為

121°C (約 15 lb/in²，1 kg/cm² 錶壓力) 滅菌 20 分鐘。

12. 酸鹼安定性試驗

採用不同 pH 值之緩衝溶液系統，pH 2-3 為 Glycine/HCl buffer，pH 4-5 為 Citrate/phosphate buffer，pH 6-7 為 Glycine/phosphate buffer，pH 8 為 Tris/HCl buffer，pH 9-10 為 Glycine/NaOH buffer，將魷仔魚水煮液分別以 pH 2、3、4、5、6、7、8、9、10 之緩衝溶液溶解後，經 0.2 μ m 無菌過濾膜過濾，置入 Eppendorf tube 於室溫下處理 24 小時，再進行增生活性測試。

13. 超氧離子測定 (NBT reducing assay)

依 Andrea 等人之方法⁽⁷⁾，將培養良好之細胞以細胞培養方式離心收集，用少量培養基混合均勻，取 0.5 ml 細胞液和 4.5 ml 稀釋液混合後，以細胞計數器計算細胞密度，再根據此數值將細胞密度調整為 2 $\times$ 10⁵ cell/ml。隨後加入上述細胞培養液 (100 μ l/well) 放入 37°C，5% CO₂ 培養箱培養 24 小時後，以 100 μ l/well 量加入 Nitroblue tetrazolium (NBT) (2 mg/ml)，於 37°C 反應 90 分鐘，經 1,500 rpm 離心 5 分鐘，加入 70% Ethanol 100 μ l/well (終止反應)，經 1,500 rpm 離心 5 分鐘，加入 100% Methanol 100 μ l/well (以上步驟重覆 3 次)，而後置於恆溫乾燥箱 37°C，乾燥至 well 內無水分，加入 2M KOH 100 μ l/well，充分振盪 10 分鐘，加入 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 100 μ l/well，充分振盪 10 分鐘，測其 630 nm 吸光值。

14. 統計分析

實驗之測定結果以 SAS 之 Duncan's multiple comparison test 比較差異性，其顯著水準 (Significant level) 設 P 為 0.05。

結果與討論

一、過氧化氫檢測

將由淡水地區取回之魷仔魚水煮液，實驗中為考量應用於動物細胞培養，及排除水煮液中可能含有過氧化氫的疑慮，因此每次採樣前先以 5% 硫酸鈦進行檢測，其檢測結果為陰性反應，顯示煮液中並未殘留過氧化氫。

二、魷仔魚水煮液電氣透析處理

魷仔魚在水煮加工過程中往往添加食鹽⁽³⁾，鹽分的

含有影響了煮液的利用。為能提高煮液的利用價值，又能適用於細胞培養模式，因此必須脫除食鹽。由淡水取回的原液，導電度為 64ms/cm，食鹽含量在 7% 左右，水煮液於脫鹽處理時導電度之變化情形如 (Fig. 1) 所示。隨著脫鹽時間的進行，煮液中的導電度逐漸

下降，在終了導電度為 0.5 ms/cm，實際測得食鹽濃度為 0.15%，脫鹽率為 98%。在脫鹽過程中，為瞭解蛋白質的損失情形，於每隔 10 分鐘取少許鹽廢液測定 280 nm 吸光值，在脫鹽終了鹽廢液中吸光值為 0.09，顯示蛋白質損失率非常的低。

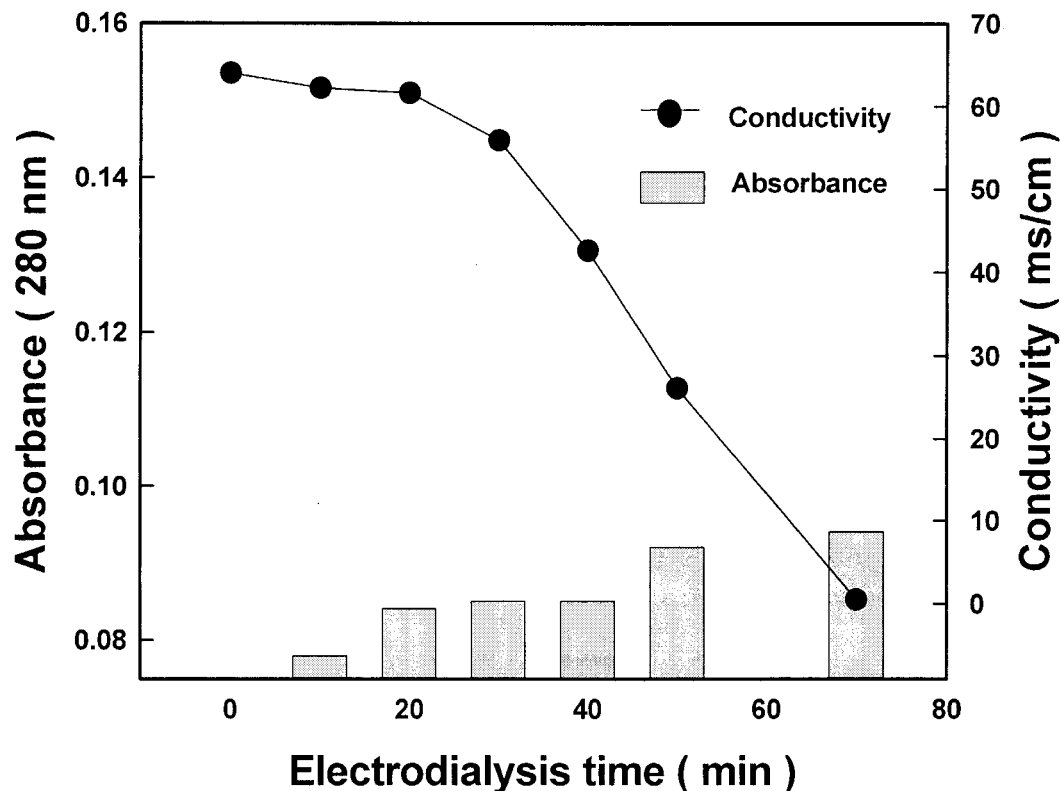


Fig. 1. Changes in the conductivity and absorbance at 280 nm of fish larvae (FL) cooking waste during electro dialysis.

二、細胞增殖活性及抗體分泌量

魷仔魚水煮液經脫鹽後取脫鹽液，調整其蛋白質濃度，發現隨蛋白質濃度的增加，對於能產生 IgM 抗體之人類融合瘤細胞 HB4C5⁽⁸⁾ 有其促進增殖及抗體分泌效果 (Fig. 2)，此活化反應類似於免疫反應中，受抗原刺激之輔助 T 細胞 (Help T cells; T_H) 分泌 IL-2 (Interleukin-2)，促使 B 細胞增生並分化成為漿細胞，以產生對抗抗原之抗體的生理作用⁽⁹⁾，且從顯微鏡下觀察細胞有明顯增殖及凝集現象 (Fig. 3)，顯示魷仔魚

水煮液含有活化或調節體液性免疫力之因子。

三、魷仔魚水煮液對各種細胞生長之試驗

由 (Table 1) 結果可知魷仔魚水煮液，對各種免疫細胞，皆具有促進增生之作用，其中蛋白質濃度為 119 g/m^l 時對 HB4C5 細胞增生促進能力為 2.76 倍，人類單核球細胞 THP-1 為 3.47 倍，而 SI102 為 1.51 倍，巨噬細胞 J774.1 在蛋白質濃度 7.44 μg/m^l 促進能力為 1.50 倍，UMφ 及 U937 則分別為 1.21 與 1.05 倍。

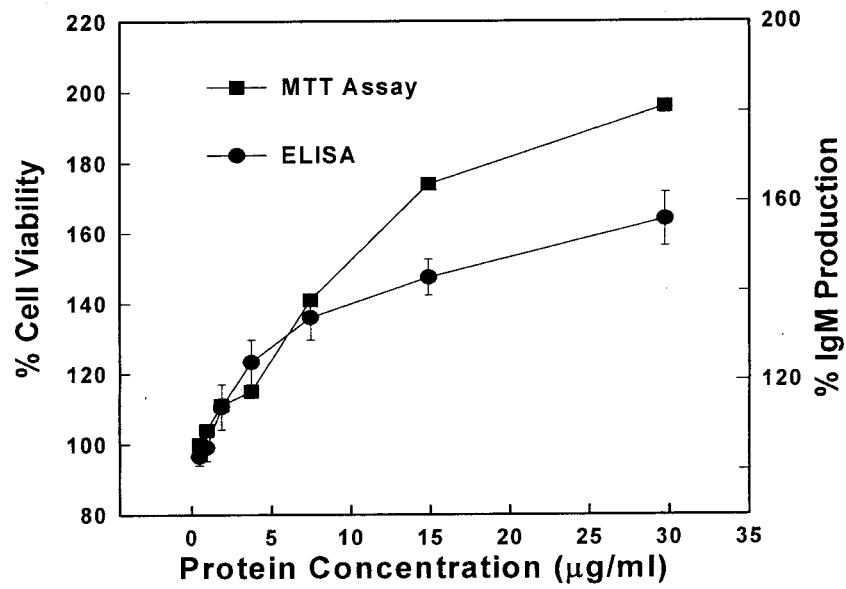


Fig. 2. Effect of protein concentration of FL cooking waste on the proliferation and IgM production of HB4C5 cells.

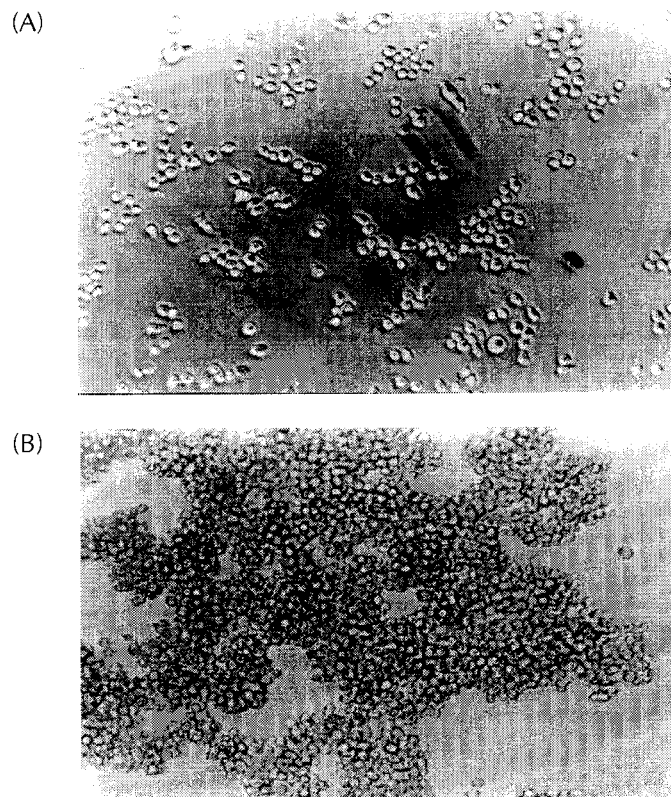


Fig. 3. Photomicrographs of HB4C5 cell proliferation aggregation caused by fish larvae cooking waste (FL). (A) untreated cells; (B) cells treated with FL (59.5 μg/ml).

Table 1. Effect of fish larvae cooking waste on different cells by MTT or mazaan ratio assay. The cells were treated with different concentration of fish larvae cooking waste (FL).

Protein ($\mu\text{g/ml}$)	Cells					
	HB4C5	SI102	THP-1	J774.1	U937	UM ϕ
Control	100 $\pm$ 1.00	100 $\pm$ 2.15	100 $\pm$ 0.14	100 $\pm$ 2.04	100 $\pm$ 2.28	100 $\pm$ 1.12
3.72	125 $\pm$ 3.00	114 $\pm$ 0.71	174 $\pm$ 1.15	129 $\pm$ 5.12	100 $\pm$ 1.14	105 $\pm$ 1.31
7.44	143 $\pm$ 1.04	133 $\pm$ 1.43	199 $\pm$ 3.16	150 $\pm$ 1.17	102 $\pm$ 2.13	102 $\pm$ 1.11
14.88	190 $\pm$ 1.24	160 $\pm$ 0.25	230 $\pm$ 2.15	148 $\pm$ 0.75	101 $\pm$ 5.11	105 $\pm$ 1.02
29.75	228 $\pm$ 1.32	171 $\pm$ 1.09	261 $\pm$ 4.02	146 $\pm$ 2.09	103 $\pm$ 5.23	114 $\pm$ 4.12
59.5	276 $\pm$ 2.77	171 $\pm$ 1.09	297 $\pm$ 3.47	131 $\pm$ 4.25	105 $\pm$ 4.27	118 $\pm$ 2.13
119	276 $\pm$ 4.17	151 $\pm$ 1.34	347 $\pm$ 3.41	110 $\pm$ 2.45	105 $\pm$ 1.15	121 $\pm$ 1.12

四、加工條件探討

1. 加鹽萃取試驗

生鮮魷仔魚加工處理，漁民大多採用添加食鹽之沸水水煮，因此本實驗模擬現場加工方式，試

著以不同鹽度水煮生鮮魷仔魚，發現以 5-7% 食鹽濃度，所水煮之魷仔魚水煮液，經過脫鹽處理後，對於細胞活性為較佳 (Fig. 4)。此一結果與魷仔魚加工現場，攜回之魷仔魚水煮液食鹽濃度很類似。

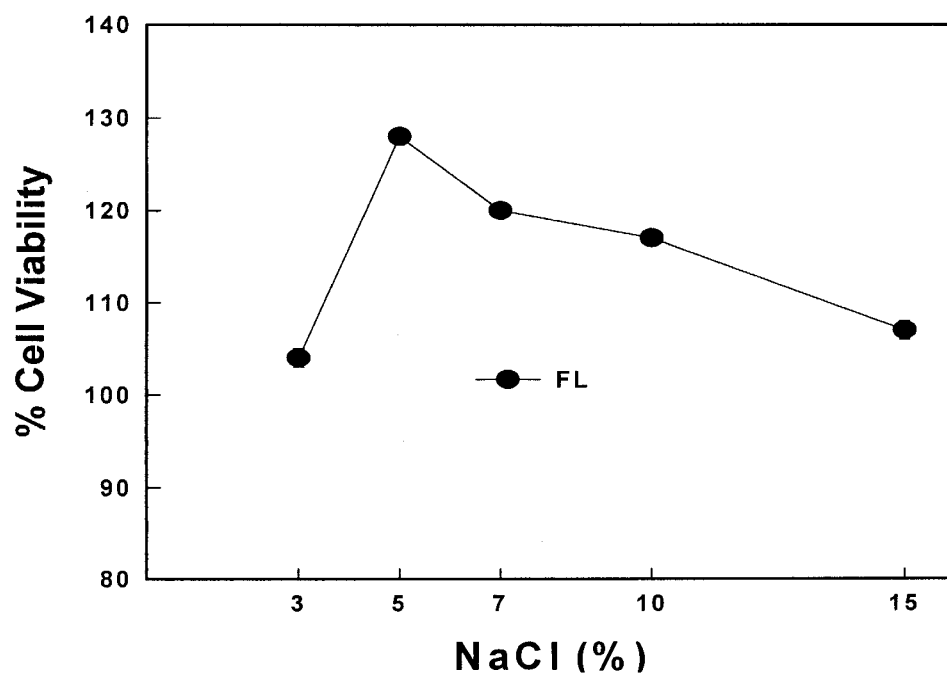


Fig. 4. Effect of desalting content of FL cooking waste on the cell viability to HB4C5.

2. 熱安定性試驗

為瞭解魷仔魚水煮液，對於細胞活性因子的熱安定性，乃以不同加熱條件處理，魷仔魚水煮液經 110°C；處理 20 分鐘細胞活性為 93%，抗體產量活性為 98%，以 121°C；處理 20 分鐘為 88%，其細胞增生

活性約下降了 12%，抗體產量活性仍維持 93% (Fig. 5)，此現象間接說明魷仔魚水煮液對於能刺激細胞分泌抗體的原因，並不是由於細胞數增加的關係，因此魷仔魚水煮液所具細胞增生及抗體產生活性應為不同物質刺激所致⁽¹⁰⁾。

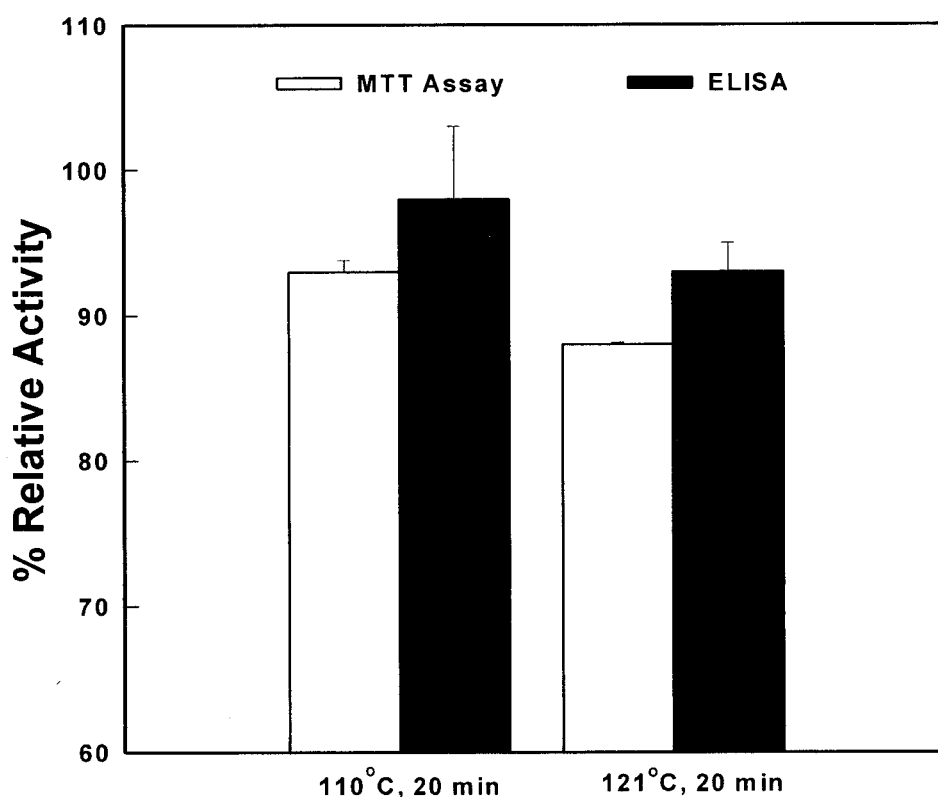


Fig. 5. Heat stability of FL cooking waste (The FL cooking waste was sterilized at 110 or 121°C for 20 min before estimating the activity).

3. 不同加工方式之試驗

為能評估魷仔魚水煮液應用於食品加工，以配合實際加工製程，分別以凍結乾燥、噴霧乾燥及高溫高壓殺菌方式加工，所得樣品進行細胞增生評估，其結果以 121°C；處理 20 分鐘為 88%，噴霧乾燥為 97%，凍結乾燥則不受影響 (Fig. 6)。

4. 酸鹼安定性試驗

魷仔魚水煮液分別以 pH 值 2、3、4、5、6、7、8、9、10 之緩衝溶液於室溫下處理 24 小時後，評估酸鹼處理對細胞增生活性的影響。結果顯示對 HB4C5 之細胞增生活性，pH 值安定性範圍為 2-7 左右；且在 pH 值 2、5 部份有活性之最高表現。而 pH 值 8-10

鹼性部分則活性有下降之趨勢 (Fig. 7)。整體而言，魷仔魚水煮液活性物質較不受酸處理影響，但鹼性的環境下可能會造成部分的活性喪失。

五、超氧離子測定 (NBT reducing assay)

NBT (Nitroblue tetrazolium) 之產生是評估巨噬細胞在宿主防禦系統中免疫力的指標。當吞噬細胞進行吞噬作用時，會隨著細胞內氧化代謝速率增加，而產生超氧離子⁽¹¹⁾以消滅異物⁽¹²⁾，為探討魷仔魚水煮液對非特異性免疫機能之影響，即將魷仔魚水煮液自蛋白質濃度 119 µg/ml 連續二倍稀釋後，添加至 U937⁽¹³⁾及 UMφ 等細胞中，共同培養 24 小時，爾後加入

NBT，經過 4 小時的刺激反應後，測定其 NBT reducing，由測得吸光值隨魷仔魚水煮液，添加濃度增加而上升之結果可知，魷仔魚水煮液中亦有活化吞噬細胞之作用 (Fig. 8)。

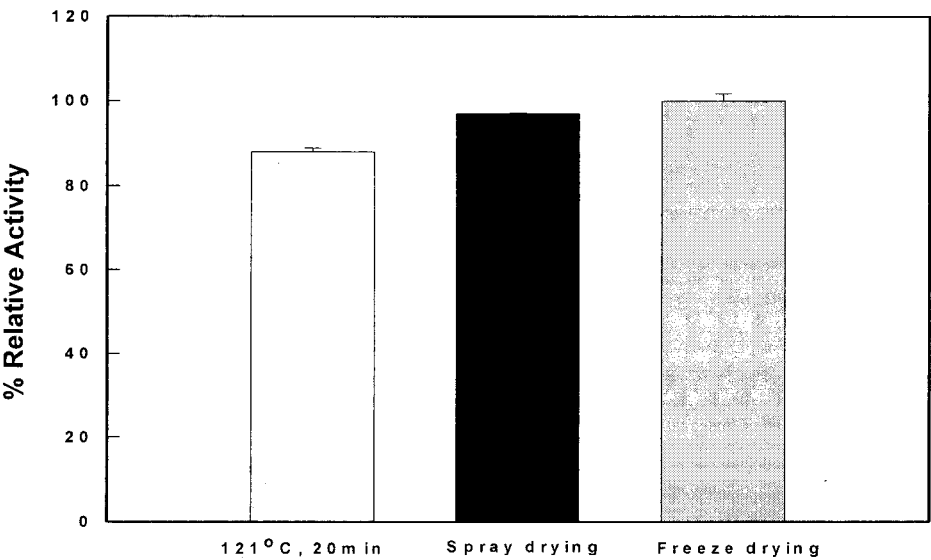


Fig. 6. Heat stability of FL. FL with different processing toward HB4C5.

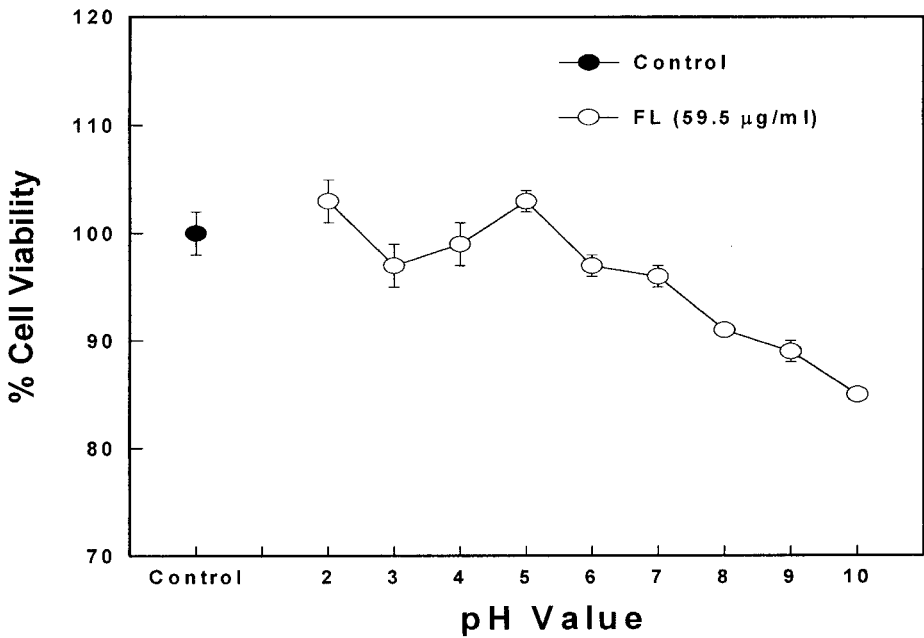


Fig. 7. The pH stability of FL cooking waste. (The FL cooking waste was incubated at various pHs and 25°C for 24 h before estimating the activity).

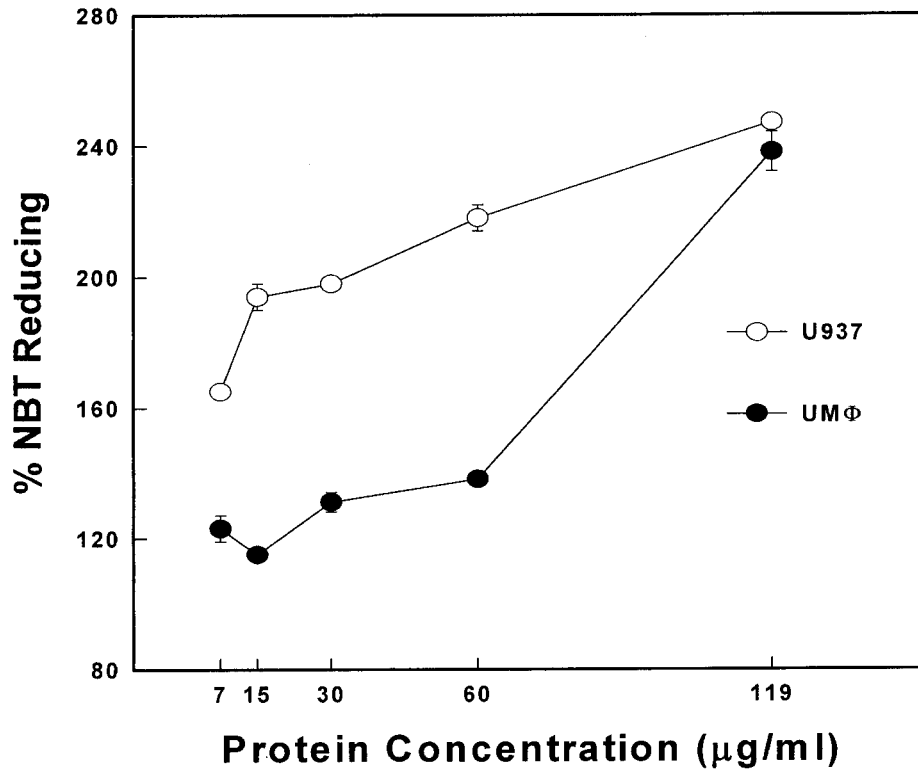


Fig. 8. Effect of the protein concentration of FL cooking waste on NBT reducing activity to UMφ and U937.

結 論

生鮮魷仔魚以 5-7% 食鹽沸水處理，經脫鹽後其細胞增生活性為較佳，魷仔魚水煮液在不同加工條件處理下，均能維持極佳的安定性。

以無血清動物細胞培養模式，評估魷仔魚水煮液之生理活性，此水煮液經脫鹽後，可促進各種免疫細胞增生，與活化巨噬細胞；亦可促進融合瘤細胞分泌抗體。顯示魷仔魚水煮液在免疫調節上，具有其功能。

謝 辭

本篇報告得以完成，感謝淡水區漁會總幹事江春貴先生在原料收集上之大力協助。又試驗期間本所陳宗雄副研究員及澎湖分所陳再發副研究員提供寶貴的相關資料，及其他未具名審查者之不吝賜見，謹一併致上由衷之謝忱。最後感謝所長廖一久院士之鼓勵與支持。

參考文獻

1. 陳再發，高雪卿，藍惠玲，邱思魁 (1994) 電氣透析法對魷及蝦煮液之脫鹽效果與呈味成分回收之探討，水產研究, 2(1): 57-68.
2. 陳再發，薛月娥 (1984) 水產乾製品之食鹽含量及其測定方法之比較，臺灣省水產試驗所試驗研究報告, 37: 211-223.
3. 陳聰松 (1987) 魷仔魚-物小而美老少咸宜，農業周刊, 13(50): 17-20.
4. 食品中殺菌劑之檢驗法-過氧化氫之檢驗，中國國家標準法，總號 10893，類號 N6189。
5. Lowry, O. H., N. T. Rosebriugh, Farr, A. L. and Randul, R. J. (1951) Protein measurement with Folin reagent. J. Biol. Chem., 193: 265.
6. Kong, Z. L., H. Murakami, and K. Shinohara (1992) Effect of extracts of some vegetables on proliferation and Antibody secretion of human- human hybridoma

- cell lines cultured in serum-free medium. *Nippon Shokohin Kogyo Gakkaishi*, **39**: 79-87.
7. Andrea, F., Roberto N., L. M. Soccora, D. P. Guido, and D. A. Raffaele (1990) Flow cytometric evaluation of nitro blue tetrazolium (NBT) reduction in human polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry*, **11**:907-912.
8. Hiroshi, S., M. Hiroki, D. Shun'ich, S. Kazuki and D. Hirochisa (1986) Human-human hybridoma secreting IgM-like immunoglobulin with and heavy chains. *Agric Biol. Chem.*, **50**(2): 2217-2223.
9. Kishimoto, T. and T. Hirano (1988) Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu. Rev. Immunol.*, **6**: 485-493.
10. Yamada, H., Mizuguchi, J. and Nakanishi, M. (1991a) Antigen receptor-mediated calcium signals in B cell as revealed by confocal fluorescence microscopy. *FEBS Lett.*, **284**: 249-251.
11. Falasca, G. F., , R. Anand A. K. Kathleen, R. O. Carolyn, and J. R. Antonio (1993) Superoxide anion production and phagocytosis of crystals by cultured endothelial cells. *Arthritis & Rheumatism*, **36**(1): 105-116.
12. Segal, A. W. (1974) Nitroblue-tetrazolium test. *Lancet*, 1248-1252.
13. Kong, Z. L., H. Murakami and K. Shinohara, (1990) Establishment of dialyzate fractions of spinach on growth of human-derived cells. *Cytotechnology*, **7**: 113-119.

Shwu-Yun Gau¹, Kung-Kou Feng¹, Pei-Chun Wu¹,
Tsong-Song Chen¹ and Zwe-Ling Kong²

¹Department of Marine Food Technology, Taiwan Fisheries
Research Institute, 199 Hou-Ih Rd., Keelung 202, Taiwan.

²Department of Food Science, National Taiwan Ocean
University, Keelung 202, Taiwan.

(Accepted 24 August 1999)



Effect of Processing Conditions on the Cell-mediated Immunity of the Cooking Waste from Fish Larvae

Abstract

To evaluate the effect of processing condition on the cell-mediated immunity of the fish larvae (FL) cooking waste, the bioactive factor, cell proliferation, immune response and phagocyte function were measured by using serum-free cultured human hybridoma cell lines, MTT assay, ELISA method, and the ability to reduce the dye nitroblue tetrazolium (NBT), respectively. About 98% of salt could be removed from the FL cooking waste by electrodialysis. The optimal salt content for desalting of FL cooking waste was 5-7%. The data revealed that FL contained biological active compounds with strong growth promoting and aggregating effect toward HB4C5, THP-1 and J774.1 cell lines, and could induce NBT reducing activity toward U937 and UM ϕ . No significant difference in the cell viability among the FL cooking wastes processed by freeze-drying, spray drying and sterilization (121°C, 20min) was observed ($p>0.05$). The optimal pH for the stability of FL cooking waste was 2-7. These results suggested that the quality of FL cooking waste was stable during processing.

Key words: Fish larvae cooking waste, Electrodialysis, Serum-free culture, Cell proliferation, Immunoglobulin production