

人工養殖海蟑螂之蛋白酵素水解物的食用安全性與機能性

蔡慧君^{1*} · 陳玉真¹ · 李京樺¹ · 楊俊宏² · 戴宇鴻¹ · 吳純衡¹

¹ 行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

² 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所應用毒理組

摘要

奇異海蟑螂 (*Ligia exotica*) 在台灣各地的海岸隨處可見，但僅做為釣餌使用，是為產量豐卻低度利用的水產資源。本研究之主要目的在探討人工養殖海蟑螂的食用安全及其蛋白酵素水解物之機能性，藉以提升其多元化之應用層次與附加價值。試驗結果顯示海蟑螂乾物組成中以粗蛋白質含量最高，約佔總重 55.3%。游離胺基酸組成中則以甘胺酸 (glycine)、丙胺酸 (alanine)、牛磺酸 (taurine)、麩胺酸 (glutamic acid) 和精胺酸 (arginine) 等含量較豐，約佔總量之 73.6%。以 2 種蛋白酶共同水解海蟑螂之水解物中，分子量 <1500 Da 的胜肽約為 83.6 ~ 89.5%，並可顯現強抗氧化活性，其超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、亞鐵離子螯合能力與還原力等之 IC₅₀ 值分別為 12.4 ~ 43.4 mg/mL、0.3 ~ 0.7 mg/mL 和 10.1 ~ 10.6 mg/mL。此外海蟑螂及其酵素水解物皆具有抗凝血的效果，但僅酵素水解物能顯現抗凝血的劑量效應，且其作用之有效濃度為 40 mg/mL 與 30 mg/mL 肝素 (heparin) 相當，其活化部分凝血活酶時間 (activated partial thromboplastin time, APTT) 皆達血液無法凝固之臨界值 (> 100 秒)。另海蟑螂及其酵素水解物分別經由基因毒性試驗與 14 天口服 (15 g kg⁻¹ body weight) 急毒性試驗證實具有食用安全性。綜合以上結果顯示，海蟑螂之蛋白酵素水解物可能具有食用安全性、抗氧化與抗凝血等功能，建議可應用做為機能保健食品或營養補充品之海洋性新素材之發展潛力，達到活用低度利用性水產資源之目的。

關鍵詞：海蟑螂、游離胺基酸、抗氧化、抗凝血、急毒性試驗

前言

海蟑螂又名海蛆 (Wharf roach)、海岸水蟲，屬於節肢動物門 (Arthropoda)，甲殼綱 (Crustacea)，海蟑螂科 (Ligiidae)，海蟑螂屬 (*Ligia*)。全世界的海蟑螂計有 8 屬 117 種。台灣目前有紀錄的海蟑螂有奇異海蟑螂 (*Ligia exotica*) 和台灣海蟑螂 (*Ligia taiwanensis*) 兩種，其中奇異海蟑螂為一般常見種，全台灣各地海岸隨處可見 (蔡, 1996)。海蟑螂常棲息於海邊高潮線附近，以岩石上及水邊的小型生物、動物屍體及有機物碎屑為食，屬雜食性，是海邊重要的清道夫。另喜食紫菜，常成

群刮取海藻為食，造成紫菜養殖上一大困擾。

依據中藥辭海 (黃等, 1999) 指稱，海蟑螂具有清疔、活血和解毒之功效，可治小兒疳積和膿瘡腫毒。相傳在大陸沿海地區，將海蟑螂焙乾粉碎後用於口服以消腫止痛，或搗碎外敷用於治癬和消腫。海蟑螂之生理活性物質為核苷類化合物 - inosine disaccharide (Kim *et al.*, 2000; Faulkner, 2002)，其結構式為 3'-O-(R-D-glucosyl) inosine。曾等 (2002) 研究指出海蟑螂之藥理作用主為腺苷 (adenosine)，對小鼠的耳殼腫脹有顯著抑制作用，且抑制效果隨劑量的增加而增加。此外核苷類化合物經研究發現具有促進冠狀血管擴張及增加冠狀血管血量的功能，可用於冠狀血管障礙、狹心症、動脈硬化症及高血壓症等疾病的治療 (黃等, 2004)；亦可作為抑制血液凝固用藥 (Kitakaze *et al.*, 1993)。另有研究指出自魁蛤 (*Scapharca*

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2462-3306; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw

broughtonii) 所萃取的蛋白質 (Jung *et al.*, 2002) 或單環刺蝟 (*Urechis unicinctus*) 之胜肽 (Jo *et al.*, 2008) 也具有抗凝血功能。

現今研究在組織及血液中已發現有超過 40 種以上的物質會影響血液凝固，其中可促進血液凝固者，稱為促凝血劑 (procoagulant)，而抑制血液凝固者則稱為抗凝血劑 (anticoagulant)。血液凝固與否，全然取決於這兩類物質間的平衡 (林, 1993)。凝血的機制經研究發現，主要是由以下三個步驟所達成：(1) 凝血激素複合體 (prothrombinase complex) 在血管破裂或血液本身受到侵害時形成；(2) 凝血激素複合體會促使凝血酶原 (prothrombin) 轉變成凝血酶 (thrombin)；(3) 凝血酶將可溶性之纖維蛋白原 (fibrinogen) 轉變為不溶性之纖維蛋白絲 (fibrin thread)，絲狀的纖維蛋白再網住血小板、紅血球及血漿而形成血塊 (林, 1993; 何, 1993; 王, 1994; Edward *et al.*, 1997)。因此凝血作用是始自凝血激素複合體的形成，然而生物體有兩種途徑可以形成凝血激素複合體，分別是內在途徑 (intrinsic pathway) 和外途徑 (extrinsic pathway)。內在途徑是由受傷組織內的血液本身所引發一連串反應；外途徑是由血液與受傷的血管壁或血管外組織分泌組織因子 (tissue factor) 並釋放到血液內，在鈣離子和許多凝血因子的多重反應後，組織因子最後轉變成凝血酶，如 Fig. 1 所示 (何, 1993; Lubert, 1995)。在這兩種途徑中，一系列的血漿蛋白及其他參與凝血作用的因子，特別是扮演重要角色的血小板，合稱為凝血因子 (Van de Graaf and Fox, 1990)。

凝血作用測試的表示方法中，凝血酶原時間 (prothrombin time, PT) 係用以評量外在路徑和共同路徑，包括 I、II、V、VII、X 等凝血因子是否正常。另活化部分凝血活酶時間 (activated partial thromboplastin time, APTT)，則用以評量內在路徑與共同路徑 (common pathway) 的凝血因子是否正常，包括 XII、XI、IX、VII、X、V、I 和 prekallikrin、high molecular weight kininogen 等因子的活性，以及抗凝血劑 (如 heparin) 之存在 (何, 1993; 謝和楊, 2001)。

海螵蛸之利用現況，目前僅做為海釣用之釣餌，少有相關的研究報告。本研究主探討海螵蛸之機能成分，續以酵素水解法產製具有抗氧化與抗凝血功能之機能成分，並以安氏測試法及 14

天口服急毒性試驗，進行海螵蛸及其酵素水解物之食用安全評估，以研發海洋性與新穎性之機能性保健食品用素材，達到活用低度利用水產資源的目的。

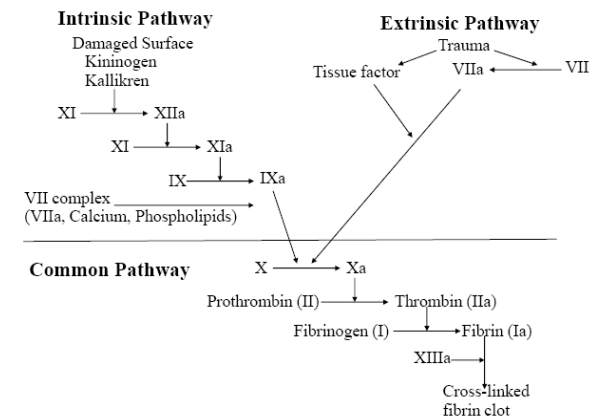


Fig. 1 The mechanism of human blood coagulation.

材料與方法

一、實驗材料

(一) 實驗原料

自澎湖採購由海岸邊以誘捕法所收集之野生型與人工養殖等 2 種奇異海螵蛸，冷藏運回實驗室後經凍結乾燥機 (Freeze drying system, Labcono AST Instruments Corporation, KS, U.S.A.) 凍乾、粉碎後置於 -20°C 凍藏備用。

(二) 試驗菌株

Salmonella typhimurium TA98 及 TA100 購自日本微生物菌種中心 (Japan Collection of Microorganisms RIKEN BioResource Center, Hirosawa, Japan)。

(三) 供試動物

五週齡 Sprague-Dawley 大鼠購自樂斯科生物科技股份有限公司 (BioLASCO Taiwan Co., Ltd, Taipei, Taiwan)，在動物飼育室觀察一週後，取體重相近之健康大鼠進行毒性試驗。試驗動物給予充足之鼠專用粒狀飼料 (LabDiet[®] 5001 Rodent diet, Purina Mills LLC, St. Louis, MO, U.S.A.) 及飲

水。動物飼育室控制狀況為溫度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相對濕度 50 ~ 70% 及 12 h 光/12 h 暗之光照週期。實驗動物使用與操作均依據『實驗動物管理與使用指南』規範進行 (Yu *et al.*, 2004)。

(四) 蛋白酶

Protease N (由 *Bacillus* 分泌產生, 活性為 150,000 U/g, 最適 pH 為 7.0, 最適溫度為 50°C) ; protease 6 (由 *Bacillus* 分泌產生, 活性為 60,000 U/g, 最適 pH 為 8.0, 最適溫度為 45°C) ; protease A (由 *Bacillus* 分泌產生, 活性為 10,000 U/g, 最適 pH 為 7.0, 最適溫度為 $30 \sim 60^\circ\text{C}$) 均購自天野酶製品株式會社 (Amano Enzyme Inc. Nagoya, Japan)。

Protamex (由 *Bacillus* 分泌產生, 活性為 1.5 U/g, 最適 pH 為 5.5 ~ 7.5, 最適溫度為 $35 \sim 60^\circ\text{C}$) 購自 NoVo Nordisk A/S, Bagsværd, Denmark。

二、實驗項目與方法

(一) 海螵蛸組成成分分析

1. 一般成分：

依據 AOAC (1997) 的方法測定水分、灰分、粗脂肪、粗蛋白。

2. 脂肪酸組成分析：

樣品依 AACC (1983) 之方法萃油, 稱取 0.5 g 油脂, 另加入 0.35 mg 之 15 碳飽和脂肪酸 (C15:0) 做為內部標準品, 再依據 AOCS (1975) 方法, 以 $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 進行甲酯化後, 再以氣相層析儀 (Varian CP-3380, Varian Inc., Palo Alto, CA, U.S.A.) 分析脂肪酸組成。氣相層析之操作條件：分離管柱為 SUPEL COWAX 10, 30 m x 0.53 mm (Supelco. Inc., Bellefonte, PA, U.S.A.)。帶動氣體為 N_2 (流速為 30 mL/min)。溫度—注入器： 240°C ，烘箱： 180°C 恆溫，火焰離子化偵測器 (flame ionization detector)： 260°C 。

3. 游離胺基酸 (Free amino acid; FAA) 組成分析 (Konosu *et al.*, 1974)

(1) 製備三氯醋酸 (Trichloroacetic acid, TCA) 抽出物

取 10 g 樣品於預冷之 7% TCA 中, 以均質機均質 2 min 後, 於 4°C , 5,000 X g 下離心 30 min, 取上澄液, 沈澱部份再加入 7% TCA 重複以上步驟操作二次, 萃取全部所得之上澄液以 7% TCA 定容至 100 mL。取 40 mL TCA 抽出液於分液漏斗中, 加入等體積之乙醚振盪處理去除 TCA, 重複上述步驟四次後收集於濃縮瓶中以真空濃縮機 (Buchi REIII 型, Sibata Science Technology Co. Ltd., Tokyo, Japan) 濃縮, 所得之濃縮液以二次離子水 (Mill-Q UV, Millipore, Millipore Inc., Molsheim, France) 定容至 25 mL, 在 -20°C 下保存供作游離胺基酸分析用。

(2) 分析游離胺基酸

取 TCA 抽出物 1 mL 以 0.02 N HCl 適當稀釋及 0.2 μm (pore size) 濾膜過濾後, 以胺基酸分析儀 (Hitachi L-8500 Amino Acid analyzer, Hitachi High Technologies Co., Tokyo, Japan) 分析。

(二) 海螵蛸蛋白酶水解物之製備及品質分析

1. 酵素水解物之製備

將海螵蛸凍乾粉末分別加入蛋白酶 (W/W) : A 組 protease N + protease A ; B 組 protease N + protease 6 ; C 組 protease N + protamex ; D 組 protease N ; E 組 protease A ; F 組 protease 6 和 G 組 protamex 等 7 組之混合 2 種或單種蛋白酶, 在其酵素之最適反應溫度與 pH 值下進行水解後, 再以沸水隔水加熱 30 min 使酵素失活, 降溫至室溫再經離心分離 (15,000 X g、20 min) 取其上層液, 進行水分與粗蛋白測定, 由水解液中粗蛋白乾重 * 100 / 總粗蛋白乾重, 來計算酵素水解物之水解率 (%)。另將海螵蛸蛋白酶水解物經離心分離去除上層液後即為水解渣。

2. 可溶性蛋白質、胜肽及游離胺基酸分析

(1) 可溶性蛋白測定 (Lowery *et al.*, 1951)

取 5 μL 海螵蛸蛋白酶水解液和 bovine serum albumin (BSA, Sigma) 標準品 (2 mg/mL), 各加入 25 μL reagent A (Bio-Rad Dc Protein Assay Kit, Laboratories Inc., Hercules, CA, U.S.A.) 及 200 μL

reagent B 混合均勻並靜置 15 min 後，以分光光度計 (UV-160A UV-Visible Recording Spectrophotometer, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) 於波長 750 nm 測定吸光值。由 BSA 標準物質所測得之標準檢量線換算可溶性蛋白量 (mg/g)。

(2) 胜肽含量測定 (Church *et al.*, 1983)

A. o-Phthaldialdehyde (OPA) 試劑之配製

取 25 mL Sodium tetraborate (0.1 M)、2.5 mL sodium dodecyl sulphate (20%)、1 mL OPA 甲醇溶液 (40 mg OPA 溶於 1 mL 甲醇) 和 0.1 mL β -mercaptoethanol 混合，並以去離子水定容至 50 mL。

B. 測定方法

各取 0.1 mL 海螵蛸酵素水解液和 Leu-Gly 標準品 (1000 mg/100 mL)，分別加入 4 mL OPA 試劑反應 2 min 後，以分光光度計於波長 340 nm 測定吸光值。由標準品所測得之標準檢量線換算胜肽含量 (mg/g)。

(3) 游離胺基酸含量測定 (Doi *et al.*, 1981)

A. 2% 寧海準 (Ninhydrin)

取 1 g 茛三酮溶於 35 mL 熱水後，加入 40 mg 氯化亞錫 ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 攪拌過濾，加水定容至 50 mL。

B. pH 8.0 磷酸緩衝液

取 4.5 g 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 以去離子水溶解並定容至 500 mL。另取 12 g 磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4) 以去離子水溶解並定容至 500 mL。取上述 10 mL 之 KH_2PO_4 與 190 mL 之 Na_2HPO_4 混勻，即為 pH 8.0 的磷酸緩衝液。

C. 測定方法

各取 1 mL 海螵蛸酵素水解液及胺基酸標準液 (L-Tyrosine; 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於 25 mL 的刻度試管中，分別加水至 4 mL，加入 2% Ninhydrin 溶液及 pH 8.0 磷酸緩衝液各 1 mL，混合均勻，於沸水浴下加熱 15 min 後，取出迅速冷卻至室溫，再加水至 25 mL，搖勻、靜置反應 15 min 後，以分光光度計於 570 nm 測定吸光值。由標準物質 (L-Tyrosine) 所得之標準檢量線換算成胺基酸含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

3. 分子量組成分析 (Kim *et al.*, 2007a)

取 50 μL 海螵蛸酵素水解液注入 Superdex Peptide 10/300 GL 管柱 (Pharmacia Biotech AB Uppsala, Sweden)，以 pH 7.2 phosphate buffer (200 mM) 內含 0.25 M NaCl 為移動相進行流動 (流速為 0.5 mL/min) 後，再以蛋白質液相層析儀 (Biological DuoFlowTM Chromatography System, Bio-RAD Laboratories Inc., CA, U.S.A.) 於波長 214 nm 下進行偵測。將樣品與 Cytochrome C (12500 Da)、Aprotinin (6512 Da)、Vitamin B12 (1355 Da)、Cytidine (246 Da) 和 Glycine (75 Da) 等標準品 (Sigma) 之管柱滯留時間進行比對，計算樣品的分子量。

(三) 海螵蛸酵素水解物之抗氧化活性分析

將 7 組海螵蛸蛋白酵素水解液之凍乾粉末，分別配製 17.5% 水解液後進行下列各項抗氧化活性測定。

1. 清除 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力之測定

參考 Gyamfi *et al.* (1999) 方法，取 1 mL 之海螵蛸水解液加入 1 mL 之 DPPH 酒精溶液 (0.1 mM)，混合均勻置於室溫 (25 ~ 27 °C) 反應 30 min 後測 $\text{OD}_{517\text{nm}}$ ，吸光值愈低即表示抗氧化劑的供氧能力愈強。

計算 [(未加樣品之控制組吸光值-樣品吸光值)/未加樣品之控制組吸光值] x 100，表示清除效應之百分率。控制組之海螵蛸水解液改用蒸餾水 (1 mL) 取代。實驗中以維生素 C (L-ascorbic acid) 為正對照組 (positive control)。

2. 還原力測定

參考 Oyaizu (1988) 方法，取 1 mL 之海螵蛸水解液，加入 1 mL phosphate buffer (pH 6.6; 0.2 M) 及 1 mL 赤血鹽 (potassium ferricyanide; 1%)，於 50°C 水浴 20 min 後迅速冷卻，再加入 2 mL 三氯醋酸溶液 (10%)，取 0.5 mL 上層液，加入 0.5 mL 蒸餾水及 0.1 mL 氯化鐵溶液 (ferric chloride; 0.1%) 混合均勻，靜置 10 min 後測 $\text{OD}_{700\text{nm}}$ ，吸光值愈高代表試樣品之還原力愈佳。

3. 螯合亞鐵離子能力之測定

參考 Dinis *et al.* (1994) 方法，取 1 mL 的海螵蛸水解液，加入 3.7 mL 的甲醇及 0.1 mL $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 mM)，30 sec 後再加入 0.2 mL 的 Ferrozine (5 mM)，反應 10 min 後，測 $\text{OD}_{562\text{nm}}$ 。吸光值越低表示樣品螯合亞鐵離子能力越強。螯合能力百分比 (chelating effects %) = $[1 - (\text{樣品於 } 562 \text{ nm 之吸光值}) / (\text{未添加樣品之控制組於 } 562 \text{ nm 之吸光值})] \times 100$ 。

4. 超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性測定

以 SOD assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, U.S.A.) 進行分析。取 20 μL 的海螵蛸水解液與 20 μL 之去離子水、200 μL WST 溶液 (water soluble tetrazolium salt, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) 溶液混合，再加入 20 μL 稀釋液及 20 μL 酵素液後，於 37 °C 下靜置 20 min，測 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 。

SOD 活性 (%) = $\frac{(\text{對照組} - \text{空白組}) - (\text{樣品組} - \text{空白組})}{(\text{對照組} - \text{空白組})} \times 100$ 。

(四) 海螵蛸酵素水解物之抗凝血功能評估

改良自 Athukorala *et al.* (2006) 的方法。部分凝血活酶時間 (activated partial thromboplastin time, APTT) 之評估方法，係海螵蛸及其蛋白酵素之水解液 (group A) 與水解渣分別凍乾後配製成不同濃度之溶液作為供試液，再各取 10 μL 之不同濃度的海螵蛸供試液分與 90 μL 人類血清混合後，在 37 °C 放置 1 min，加入 100 μL APTT 試劑 (Dade® Actin® FSL Activated PTT Reagent, Dade Behring, Marburg, Germany) 後於 37 °C 放置 5 min，加入 100 μL 25 mM CaCl_2 (Dade Behring, Marburg, Germany)，以 Blood Coagulation Analyzer Hematology (SYSMEX CA 1500 System, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Mundelein, IL, U.S.A.) 進行分析，記錄凝血時間 (sec)。

凝血酶原時間 (prothrombin time, PT) 則各取 10 mL 之不同濃度的海螵蛸供試液分與 90 μL 人類血清混合後，在 37 °C 放置 10 min，加入 200 μL PT 試劑 (Dade® Innovin®, Dade Behring,

Marburg, Germany) 混合後，以 Blood Coagulation Analyzer Hematology 進行分析，記錄凝血時間 (sec)。

(五) 海螵蛸及其酵素水解物之食用安全評估

1. 安氏測試法

(1) 海螵蛸之基因毒性試驗

以安氏測試法 (Ames, 1983) 測試樣品之致突變或抗致突變性效果前，假如樣品對 *Salmonella* (*S.*) *typhimurium* TA98 及 TA100 具有毒性，會使菌數降低，導致試驗結果之判斷錯誤，因此需要先進行樣品對 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 是否具有毒性的試驗。參照許 (2001) 之方法，取 0.1 mL 海螵蛸均質液及 0.5 mL S-9 混合物 (Sigma) 或代替的磷酸緩衝液和 0.1 mL 經活化之 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 菌液於試管中，在 37 °C 下預培養 20 min 後，取 0.1 mL 反應液稀釋至 $2 \sim 3 \times 10^2$ CFU/mL，再取 1 mL 稀釋液於培養皿中，加入 nutrient agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) 搖勻，凝固後置於 37 °C 培養箱培養 48 h 計數菌落數。對照組為不添加樣品者。

(2) 海螵蛸之致突變性試驗

在研究樣品抗致突變試驗時，若樣品具有致突變性則會影響測試菌株的菌落數量，而干擾抗致突變性的判斷。因此在測試樣品之抗致突變性之前，需先檢測試驗樣品是否具有致突變性。參照 Maron and Ames (1983) 所提出的方法，取 0.1 mL 海螵蛸均質液及 0.5 mL 磷酸緩衝液和 0.1 mL 經活化之 *S. typhimurium* TA98 或 TA100 菌液於試管中，加入 0.5 mL 之 S-9 混合物或代替的磷酸緩衝液 (PBS) 0.5 mL，在 37 °C 下預培養 20 min 後，再加入 2 mL 已溶解的 top agar (6 g agar/L、5 g NaCl/L、0.05 mM L-histidine、0.05 mM biotin)，混合均勻後倒入 minimal glucose plates (15 g agar/L、930 mL dd H_2O 、20 mL VB medium E stock、20 mL 40% glucose)，將此培養皿置於 37 °C 培養箱培養 48 hr 計數菌落數。對照組則以無菌水代替樣品。如果試驗組 His^+ revertants/plate 數目高於對照組兩倍以上，則表示樣品有致突變性。

2. 海螵蛸酵素水解物對大鼠之口服急毒性安全評估

依據衛生署 (1999) 健康食品安全性評估之口服急毒性試驗規範，並參考美國環保署農藥安全評估準則「口服急毒性」試驗規範 (Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 1998)，及經濟合作與發展組織「口服急毒性」試驗規範 (Organization for Economic Cooperation and Development, 2002) 等試驗規範進行口服急毒性試驗。

(1) 口服急毒性試驗

取 15 g 海螵蛸酵素水解粉以逆滲透水配成 0.25 g/mL 灌食濃度，每隔 3 h 各胃管灌注試驗 SD 大鼠 (公鼠和母鼠各 5 隻 / 組) 一次，每次灌食體積量為 20 mL/kg body weight (每次劑量為 20 mL/kg x 0.25 g/mL = 5 g/kg)，共灌注 3 次，總計劑量為 15 g/kg。口服急毒性試驗時，以塑膠針管套上胃管，強迫餵食大鼠並於胃管灌注處理後第 1、2 及 4 h 時記錄是否出現中毒症狀、症狀發生、復原及死亡時間，並自處理後第 2 天起，每日觀察一次，一直至處理後第 14 天為止；每週稱量大鼠體重一次。試驗期間若有死亡鼠隻立即解剖進行肉眼病理檢查。動物試驗結束後，若處理組動物死亡數超過處理動物數半數 (50%)，以 Probit analysis 分析求取藥劑量與死亡率之迴歸方程式，以取得動物半數致死劑量 (LD₅₀)。

(2) 血液學檢查 (蕭等, 2008)

口服急毒性試驗結束後，自麻醉的大鼠腹主動脈採集全血，放入含 EDTA 抗凝血劑試管 (K3 EDTA syringes, Vacutainer, NJ, U.S.A.)，於血球計數儀 (Sysmex K-4500, Toa Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japan) 檢測血液相，包括紅血球數 (red blood cell count, RBC count)、血紅素 (hemoglobin, HGB)、血球容積比 (hematocrit, Hct)、平均紅血球體積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均血球血色素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血球血色素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 及血小板 (platelet) 等項目。白血球分類 (differential

leukocyte count) 則先以血液抹片，經 Weigert's Iron Hematoxylin Stain Kit (A. J. P. Scientific Inc., NJ, USA) 染色後，於光學顯微鏡 400 倍下，計算白血球中淋巴球 (lymph)、嗜中性球 (neutrophil)、單核球 (monocyte)、嗜酸性球 (eosinophil) 及嗜鹼性球 (basophil) 之百分率。

(3) 血清生化檢查 (蕭等, 2008)

自麻醉的大鼠腹主動脈採集全血，放入離心機 (Kubota 2010, Tokyo, Japan) 以轉速 3230 X g、15 min 取上清液血漿，以自動血清生化儀 (Chiron Diagnostics Corporation, Oberlin, OH, U.S.A.) 檢測血清肝腎酵素值，包括天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、血脲氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酐 (creatinine) 等項目。

(六) 統計分析

實驗數據則以 SAS (statistical analysis system) 套裝 GLM (general linear model procedure) 軟體作單向變異數分析 (one-way analysis of variance)，並以鄧肯式多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組間之差異，顯著水準定在 0.05 (SAS, 1988)。

結果與討論

一、組成分分析

將自澎湖海岸邊以誘捕法所收集之野生型與人工養殖等 2 種奇異海螵蛸分別分析其組成分，結果顯示水分含量分別為 75.7% 和 70.4%，乾物中主要為粗蛋白質 (59.3%; 55.3%)，次為粗灰分 (22.1%; 18.9%) 和碳水化合物 (13.9%; 14.9%)。海螵蛸與蝦類同屬節肢動物門，甲殼綱。不同種類之蝦副產物 (包括蝦殼、蝦頭及尾) 其粗蛋白質、灰分及碳水化合物等含量約介於 44 ~ 52%；33 ~ 39% 和 10 ~ 13% (以乾物重計) (Ibrahim *et al.*, 1999; Heu *et al.*, 2003)。海螵蛸之粗蛋白與碳水化合物含量，經分析結果顯示近似於蝦副產物，然而其粗灰分量卻顯著較低，但卻與櫻花蝦 (*sakura shrimp*, *Sergia lucens*) (19.3%) 相近 (新食品成分研究調查會, 2006)。

Table 1 Proximate composition (%) of wild and cultured *Ligia exotica*

<i>Ligia exotica</i>	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Ash	Carbohydrate**
Cultured	70.4 ± 0.1	16.4 ± 1.2* (55.3) ¹	3.2 ± 0.1 (10.9)	5.6 ± 0.1 (18.9)	4.4 (14.9)
Wild	75.7 ± 0.1	14.4 ± 0.0 (59.3)	1.1 ± 0.0 (4.7)	5.4 ± 0.04 (22.1)	3.4 (13.9)

*Data were expressed as the mean ± SD (n = 3).

¹ Value was represented on the dry weight.

**Carbohydrate = 100 - (Moisture + Ash + Crude protein + Lipid).

Table 2 Fatty acid compositions (%) of cultured *Ligia exotica*

Fatty acids	Compositions	Fatty acids	Compositions
Saturates	50.43	Monoenes	14.79
C13:0	0.20 ± 0.01*	C14:1	2.24 ± 0.03
C14:0	1.18 ± 0.02	C16:1	11.33 ± 0.01
C15:0	0.60 ± 0.01	C18:1	—
C16:0	22.62 ± 0.24	C20:1	0.63 ± 0.00
C18:0	25.21 ± 0.26	C22:1	0.33 ± 0.08
C20:0	0.52 ± 0.21	C24:1	0.26 ± 0.07
Unknown	5.61±0.30	Polyenes	28.76
		C18:2	7.98 ± 0.05
		C18:3	2.14 ± 0.00
		C20:3	9.55 ± 0.11
		C20:5	7.65 ± 0.05
		C22:6	1.44 ± 0.04

*Data were expressed as mean ± SD (n = 3).

養殖與野生海蟑螂其組成成分最大差異為粗脂肪量，分別為 10.9% 和 4.7% (Table 1)。養殖海蟑螂係以人工餵養，相較於野生型以海藻及紫菜為食，推測養殖與野生海蟑螂體成分中粗脂肪之差異係與其餌料有關。另外進一步分析養殖海蟑螂之脂肪酸組成，結果顯示其飽和脂肪酸 (saturated fatty acid) 佔脂肪酸總量 50.43%，單元不飽和脂肪酸 (mono unsaturated fatty acid) 及多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid) 量各為 14.79% 和 28.76% (Table 2)，其飽和/不飽和脂肪酸之比值為 1.2，顯示海蟑螂含有相對多量之飽和脂肪酸。然而依據 Ibrahim *et al.* (1999) 指出蝦廢棄物如蝦頭及蝦殼中卻含有較多量之不飽和脂肪酸不同，其飽和/不飽和脂肪酸之比值分別為 1/1.6 和 1/1.5。海蟑螂之主要脂肪酸為棕櫚酸 (palmitic acid; C16:0)、棕櫚烯酸 (palmitoleic acid; C16:1) 及硬脂酸 (stearic acid; C18:0)，其量分別為

22.62%、11.33% 及 25.21%，此外也含有多量的 n-3 不飽和脂肪酸，例如次亞麻油酸 (linolenic acid; C18:2) 和二十碳五烯酸 (eicopentaenoic acid; C20:5)，其量各為 7.98% 和 7.65%。

依據研究指出麩胺酸 (gluamic acid; Glu)、絲胺酸 (serine; Ser)、天門冬酸 (aspartic acid; Asp)、胱胺酸 (cystine; Cys)、白胺酸 (leucine; Leu) 和精胺酸 (arginine; Arg) 等胺基酸在一定的刺激強度下 (閾值)，對硬骨魚類皆具有誘引的作用 (Silver, 1979; Goh and Tamura, 1980)。養殖海蟑螂之胺基酸組成中以甘胺酸 (glycine; Gly)、丙胺酸 (alanine; Ala)、牛磺酸 (taurine; Tau)、Glu、Arg 等屬於甜味和誘引性的胺基酸含量較豐，約佔游離胺基酸總量之 73.6% (Fig. 2)，推測此可能是海蟑螂常做為釣餌之原因。另有研究指出無論是蝦肉或蝦殼中主要游離胺基酸皆以 Gly、Ala、Arg 和 Tau 為主，此乃甲殼類中游離胺基酸組成之共同特徵

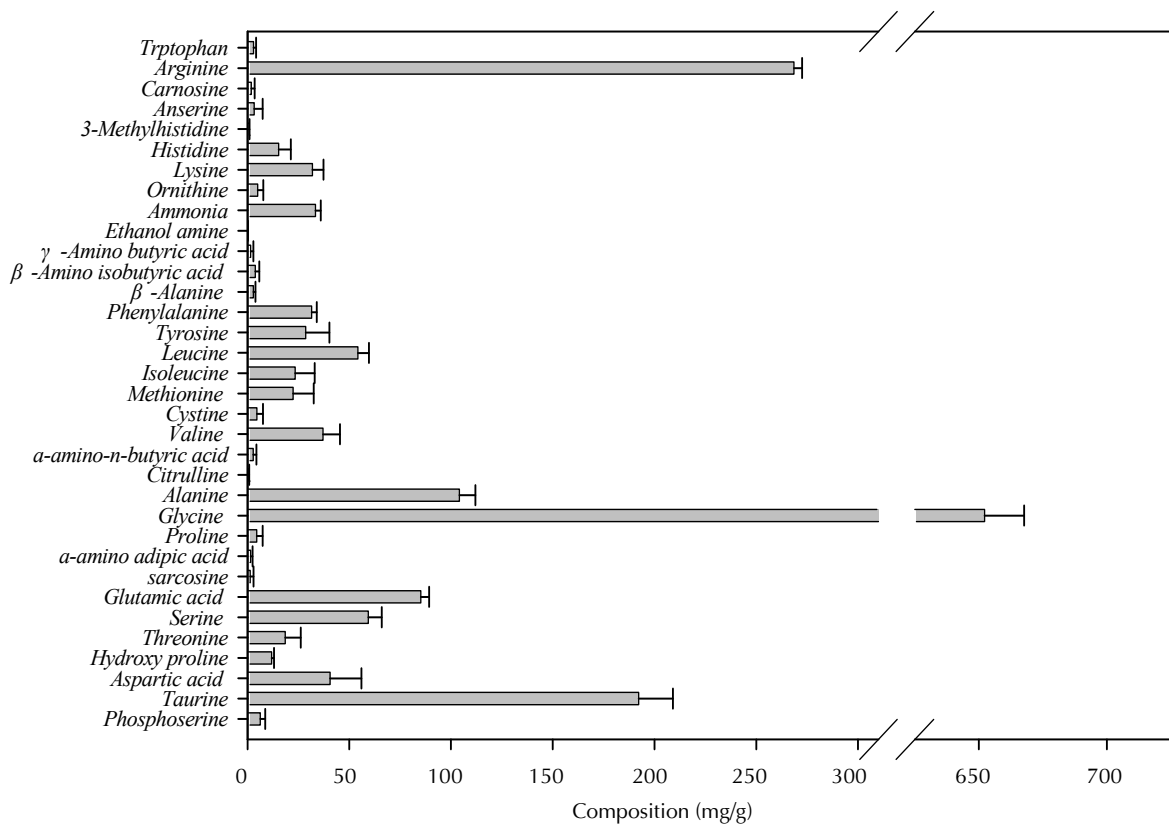


Fig. 2 Amino acid profile of cultured *Ligia exotica* (Data were expressed as mean \pm S.D., n = 3).

(Hayashi *et al.*, 1979 ; Konosu and Yamaguchi, 1982), 而海蟑螂屬甲殼綱, 其主要游離胺基酸組成經分析結果亦與蝦類一致。

二、蛋白酵素水解海蟑螂及其水解物之抗氧化能力分析

養殖海蟑螂以 2 種蛋白酶進行混合水解 (group A ~ C) 或單一蛋白酶水解 (group D ~ G), 其水解率以混合酵素處理組 (63.2 ~ 64.3%) 高於單種酵素處理組 (58.5 ~ 62.4%) (資料未顯示)。酵素水解物之主要組成爲胜肽和胺基酸 (Fig. 3), 其含量以混合酵素處理組 (292.1 ~ 342.9 mg/g; 286.8 ~ 297.6 mg/g) 顯著高於單種酵素處理組 (225.6 ~ 248.5 mg/g; 241.1 ~ 259.7 mg/g)。進一步分析酵素水解物之分子量 (molecular weight) 分布發現, 主要分子量區間係介於 1500 ~ 700 Da、700 ~ 300 Da 和 < 300 Da 之間, 合計約占總量之 83.6 ~ 89.5% (Fig. 4)。混合酵素處理組在分子量 1500 ~ 700 Da 區間約佔 25.3 ~ 26.9% 比單種酵

素處理組 (26.3 ~ 30.6%) 少且有統計差異, 但在 < 700 Da 的分子量區間卻有顯著較高的趨勢。

海蟑螂酵素水解物之抗氧化能力分析結果顯示 (Table 3), 混合酵素處理組除 DPPH 之清除能力外, 其還原力、螯合亞鐵能力和 SOD 皆顯著優於單種酵素處理組, 甚至高於 100 ppm ascorbic acid 及 200 ppm EDTA 的抗氧化表現, 或與 400 ppm 的 ascorbic acid 相當, 且經統計分析有顯著差異。將混合酵素處理組 (group A ~ C) 之水解物, 續探討其 SOD 活性、亞鐵離子螯合能力與還原力等之 IC_{50} 值 (concentration of peptide on scavenging 50% on radical activity), 分別為 12.4 ~ 43.4 mg/mL; 0.3 ~ 0.7 mg/mL; 10.1 ~ 10.6 mg/mL (Table 4)。三組混合酵素處理組間則以 A 組之抗氧化能力表現較好。

綜合以上的結果顯示, 混合酵素處理組利用不同蛋白酶間之協同作用以水解海蟑螂, 可顯現酵素作用間之相乘效果, 而產生較高的水解率及較多量的小分子胜肽, 同時也比單種酵素處理組有較高的抗氧化活性, 表現於 SOD 活性與還原

Fig. 3 Contents of soluble protein, peptides and amino acids in the hydrolysate from cultured *Ligia exotica* hydrolyzed by either two mixed proteases (Group A-C), or single protease (Group D-G). Data were expressed as mean \pm SD (n = 3) and different letters within each group represent a significant difference (p < 0.05).

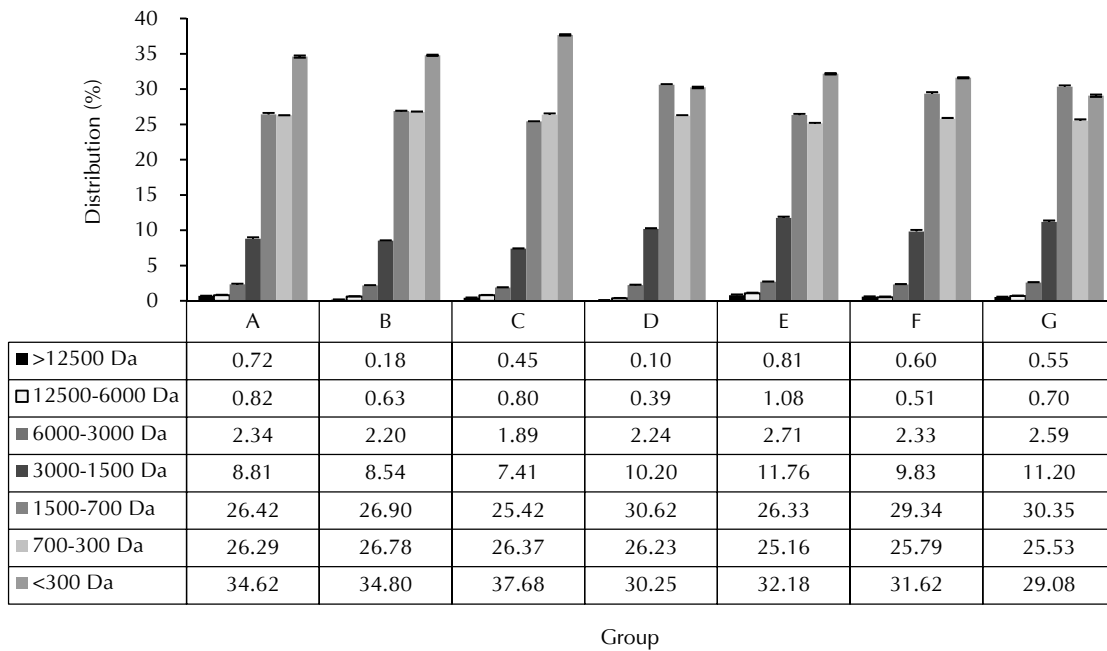
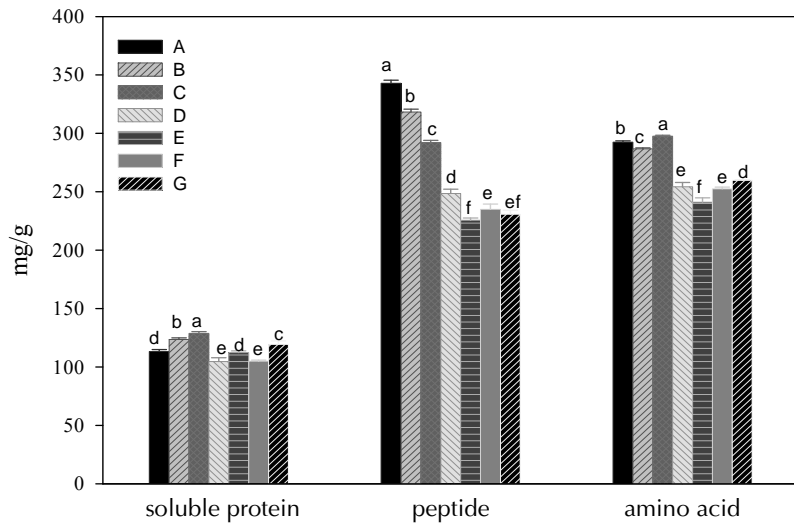


Fig. 4 Molecular weight (Da) distribution of the hydrolysate from cultured *Ligia exotica* hydrolyzed by either two mixed proteases (Group A-C), or single protease (Group D-G).

力。依據文獻指出低分子量 (1000 ~ 3000 Da) 胜肽可表現較強之抗氧化活性 (Mendis *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2008)，同時胜肽之組成胺基酸的種類和排序則可影響其抗氧化活性的表現 (Rajapakse *et al.*, 2005a; Je *et al.*, 2007)，而其抗氧化的作用機制可能是脂質自氧化的抑制劑；自由基的清除劑或金屬離子的螯合劑 (Rajapakse *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2007b)。本試驗之結果與學者等之研究一致，另在7組之海蟑螂酵素水解物間，分子量分

布於1000 ~ 3000 Da 之胜肽含量在單一酵素處理組 (group D ~ G) 雖顯著高於混合酵素處理組 (資料未顯示)，但依抗氧化之表現仍以混合酵素處理組較好，推測不同酵素處理可能左右其胜肽之組成胺基酸的種類和排序，進而影響其抗氧化活性的表現。又混合酵素處理組間以 Group A 之抗氧化活性較高 (Table 4)，故續進行凝血功能評估。

Table 3 Antioxidant activity of various hydrolysate from cultured *Ligia exotica* treated with two mixes proteases (Group A-C) and single protease (Group D-G)

Treatment	DPPH (%)	Reducing power	Chelating activity (%)	SOD activity (%)
Ascorbic acid (10 ppm)	99.41 ± 0.65*			
Ascorbic acid (100 ppm)		1.30 ± 0.06 ^{b**}		
EDTA (200 ppm)			98.15 ± 0.02 ^e	
Ascorbic acid (400 ppm)				89.74 ± 2.32 ^a
Group A	—	3.51 ± 0.05 ^a	99.65 ± 0.10 ^{ab}	94.50 ± 3.30 ^a
Group B	—	3.48 ± 0.10 ^a	99.85 ± 0.08 ^{ab}	90.43 ± 2.22 ^a
Group C	—	3.41 ± 0.20 ^a	99.88 ± 0.13 ^a	86.37 ± 3.27 ^{ab}
Group D	11.28 ± 4.95	1.57 ± 0.32 ^b	99.58 ± 0.24 ^{cb}	75.08 ± 2.91 ^{cd}
Group E	13.83 ± 4.22	1.56 ± 0.11 ^b	99.58 ± 0.22 ^{cb}	68.00 ± 6.24 ^d
Group F	14.38 ± 0.75	0.80 ± 0.10 ^c	99.37 ± 0.13 ^c	57.05 ± 6.15 ^e
Group G	15.25 ± 0.78	0.97 ± 0.25 ^c	98.98 ± 0.10 ^d	79.09 ± 10.04 ^{cb}

—: Not detectable.

*Data were expressed as mean ± SD (n = 3).

**Different superscript within the same column represent a significant difference (p < 0.05).

Table 4 Concentration of peptide on scavenging 50% of radical activity (IC₅₀) of antioxidant activity on the hydrolysate which cultured *Ligia exotica* treated with different proteases

Group	IC ₅₀ (mg/mL)		
	SOD activity	Chelating activity	Reducing power
A	12.4	0.3	10.1
B	41.0	0.5	10.6
C	43.4	0.7	10.6

三、海螵蛸酵素水解物之抗凝血功能

依據中藥辭海 (黃等, 1999) 指稱「海螵蛸具有清疔、活血和解毒之功效」, 因此探討海螵蛸是否具有抗凝血之功能。一般在凝血作用測試的表示方法中, 活化部分凝血活酶時間 (APTT) 之評估方法是以過量的活化部分凝血酶及檸檬酸鹽、血漿混合, 加適量的鈣離子, 立即引起內在路徑活化, 最後產生纖維蛋白, 記錄一連串反應的時間即為 APTT, 用以評量內在路徑與共同路徑 (common pathway) 的凝血因子是否正常 (謝和楊, 2001)。另凝血酶原時間 (PT) 係在血漿中加入 tissue-thromboplastin 和鈣離子以進行凝固反應, 故可以評量外在路徑和共同路徑的凝血因子

是否正常 (Marjorie, 1983)。在實際臨床應用上, 其 PT 的正常值為 9.1 ~ 12.2 sec, APTT 的正常值為 26.9 ~ 36.3 sec。當 PT 或 APTT 大於正常值, 代表凝血時間增長, 顯示具有抗凝血的效果; 但當 PT > 40 sec 或 APTT > 100 sec 時, 則代表血液無法凝固的臨界值。

肝素 (heparin) 結構為 sulfated glycosaminoglycan, 存在於哺乳動物和脊椎動物體內, 由肥胖細胞 (mast cell) 和嗜鹼性球 (basophils) 所產生, 可抑制凝血酶原 (prothrombin) 轉成凝血酶 (thrombin), 防止血塊的形成, 現被廣泛地應用於臨床醫學作為抗凝血劑、抗血栓形成劑和預防結石用藥 (Dietrich *et al.*, 1999; Nader *et al.*, 2004)。在本試驗中人類血清 (負對照組; negative control) 其 PT 值為 10.7 sec; APTT 值為 31.0 sec, 皆在正常凝血範圍內。肝素 (正對照組; positive control) 與血清反應後, 當濃度僅為 0.1 mg/mL 時, 血液即無法凝固其 APTT 值達 105 sec; 濃度為 30 mg/mL 時, 其 PT (> 60 sec) 與 APTT (> 180 sec) 均已達血液無法凝固之臨界值 (Table 5)。

將不同濃度之海螵蛸凍乾粉及其混合酵素水解物 (group A) 與水解後之水解渣分別加入人類血清以探討其抗凝血之效果, 試驗結果顯示, 海螵蛸凍乾粉在試驗濃度為 40 mg/mL 時其 APTT 值為 50.9 sec, 始顯現抗凝血作用, 之後隨試驗濃

度的增加其 APTT 值有漸增的趨勢，並在 275 mg/mL 時達血液無法凝固之臨界值，其 PT 值及 APTT 值分別 > 60 sec 和 > 180 sec (Fig. 5A)。然而其混合酵素水解物之 APTT 值隨著試驗濃度之增加而增加，顯示酵素水解物不僅具有抗凝血作用，且具有濃度效應 (dose-dependent)。當試驗濃度為 40 mg/mL，其 APTT 值為 100.4 sec，已達血液無法凝固之臨界值 (Fig. 5B)。此外 group A 之水解渣在試驗濃度為 1000 mg/mL，才略為顯現抗凝血作用其 PT 值 > 60 sec，表示抗凝血的效果僅展現於水解物中。綜合以上的結果顯示，海螵蛸本身即具有抗凝血之作用，然而利用酵素水解不僅可提升水解物中抗凝血的機能成分，延長 APTT 的效果，並使其作用之有效濃度由 275 mg/mL 降為 40 mg/mL。

Table 5 Anticoagulant assay of heparin

Concentration (mg/mL)	PT (sec)	APTT (sec)
0.01	12	33.9
0.1	13.3	105.3
1	14.7	> 180
5	17.1	> 180
10	21	> 180
15	31.3	> 180
30	> 60	> 180
50	> 60	> 180
100	> 60	> 180

學者等研究指出海螵蛸之生理活性物質為核苷類化合物 (Faulkner, 2002; 曾等, 2002; Kim *et al.*, 2000)。依此本試驗取腺苷標準品測其抗凝血之效果，結果顯示在試驗濃度 (0.01 ~ 5 mg/mL) 範圍內，PT 及 APTT 值仍在凝血之標準值內 (資料未顯示)，表示無抗凝血作用。又當腺苷濃度高於 5 mg/mL 時，溶液則呈現過飽和並產生沉澱。又海螵蛸酵素水解渣中所測得之腺苷含量 (636.10 ± 14.83 ppm) 高於水解物 (398.23 ± 93.13 ppm)，故推測海螵蛸酵素水解物中抗凝血之機能成分並非源自腺苷。另 Jung *et al.* (2002) 研究指出，由魁蛤中萃取純化抗凝血蛋白質 (分子量為 26 KDa)，在蛋白濃度為 100 µg/mL 時，APTT 可由 32 sec 延長至 325 sec；自單環刺蝟萃取抗凝

血胜肽 (分子量為 3.3 KDa)，在濃度為 1000 µg/mL，可延長 APTT 由 32.3 ~ 192.8 sec (Jo *et al.*, 2008)。本試驗結果與此等研究相同地皆可延長 APTT 時間，顯示其凝血之作用機制主要是由內在路徑與共同路徑的凝血因子所引發之一連串凝血反應。至於水解物中之抗凝血機能成分推測可能是蛋白質或胜肽所致，則尚待進一步研究。

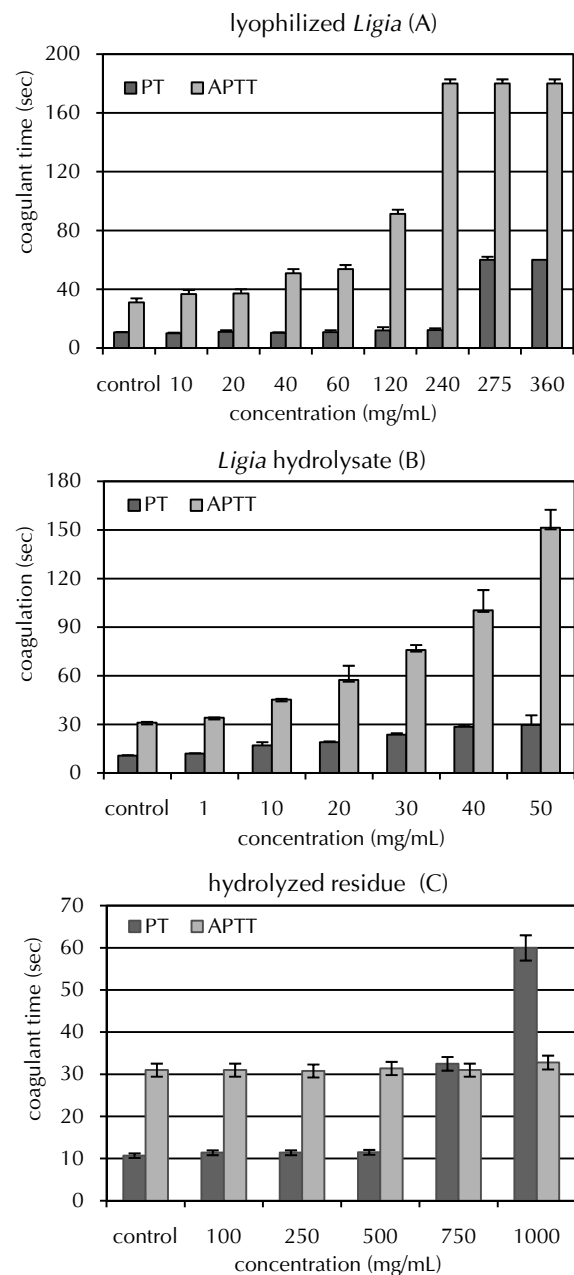


Fig. 5 Anticoagulant effect of lyophilized cultured *Ligia exotica* (A), hydrolysate (B) and its residue (c) of cultured *Ligia exotica* were hydrolyzed with protease (group A). Data were expressed as mean ± SD (n = 3).

四、海螵蛸及其酵素水解物之食用安全評估

在本研究中發現海螵蛸之酵素水解物具有抗氧化與抗凝血之功能，然而海螵蛸及其酵素水解物依據健康食品法規 (衛生署, 1999) 之規範非屬傳統食用者，故進一步進行基因毒性試驗及 14 天口服急毒性試驗，以評估其食用安全性。

(一) 安氏測試法 (Amest test) 探討海螵蛸之食用安全性

將試驗菌株 *Salmonella* (*S.*) *typhimurium* TA98 及 TA100 分別進行組織胺需求性 (histidine requirement)、*rfa* 突變、*uvrB* 突變、R-factor 等測試以確認其基因型態 (Ames, 1983) 後，始進行下列各項試驗：

1. 毒性試驗

在安氏測試法中，欲進行樣品之致突變性和抗致突變性效果測試前，須評估樣品對測試菌株 *S. typhimurium* 是否具有毒性，以避免樣品對測試菌株因毒性而降低菌數，造成測試結果的誤判 (Maron and Ames, 1983)。將海螵蛸均質液分別加入 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 的培養基中，在 37 °C 下培養 48 h 後，其平均菌數為 53 和 86 colonies/plate (Table 6)，各約為對照組的 104% 和 88%。依 Ames (1983) 指出，當試驗組平均菌數相較於對照組平均菌數均高於 80%，即顯示試驗樣品不會造成 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 的死亡，故試驗結果顯示海螵蛸對 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 不具毒性。

2. 致突變性試驗

由於測試菌株 *S. typhimurium* TA98 與 TA100 均為 His 基因缺陷型 (His^+)，其體內無法自行合成組胺酸 (histidine)。然而依據先前分析結果顯示海螵蛸體成分中約含有的 16% 的組胺酸 (Fig. 3)，可能會促進測試菌株的生長，進而影響實驗結果，因此本實驗於進行致突變性試驗前，依據 Patrinely *et al.* (1996) 之方法，先排除海螵蛸中的組胺酸對試驗菌株之干擾後，再依傳統法測定海螵蛸之致突變性。試驗結果如 Table 7 所示，海螵蛸在統計學上對誘導 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 回復突變菌株數目 (His^+ revertants/plate) 未超過自發性突變 (control) 菌

株數目的 2 倍，顯示其對於測試菌株不具致突變性。綜合以上微生物基因毒性之體外試驗證實，海螵蛸具有食用安全性。

Table 6 Toxicity of cultured *Ligia exotica* treated with *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

	<i>S. typhimurium</i> TA98 (colonies/plate)*	<i>S. typhimurium</i> TA100 (colonies/plate)
Control	51 ± 2	98 ± 11
<i>Ligia exotica</i>	53 ± 3	86 ± 6

*Data were expressed as mean ± S.D (n = 3).

Table 7 Mutagenicity (without S9 mixture) of cultured *Ligia exotica* exposed to *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

	<i>S. typhimurium</i> TA98 (colonies/plate)*	<i>S. typhimurium</i> TA100 (colonies/plate)
Control	136.7 ± 15.1 ^a	191 ± 24.5 ^a
<i>Ligia exotica</i>	167.0 ± 14.5 ^a	210 ± 17.06 ^a

*Data were expressed as the mean ± SD (n = 3), and no significant difference compared to control at p < 0.05.

(二) 海螵蛸酵素水解物對大鼠之口服急毒性安全評估

本試驗除以安氏測試法證實海螵蛸之食用安全性外，另依據衛生署 (1999) 健康食品安全性評估之口服急毒性試驗規範，將海螵蛸之酵素水解物視為最終的產品型式，並以農產保健食品類之最高劑量 (15 g kg⁻¹body weight) 進行 SD 大鼠之口服急毒性安全試驗評估 (蕭等, 2008)。首先，海螵蛸酵素水解粉以逆滲透水調配成 0.25 g mL⁻¹ 灌食濃度，每隔 3 h 胃管灌注 SD 大鼠一次，每次灌食體積量為 20 mL kg⁻¹ body weight (每次劑量為 20 mL kg⁻¹ × 0.25 g mL⁻¹ = 5 g kg⁻¹)，每日共灌注 3 次，總計劑量為 15 g kg⁻¹，連續 14 日。試驗結果顯示，飼育期間對照組及處理組之大鼠均無任何中毒症狀或死亡。大鼠體重之變化 (Table 8)，在餵食海螵蛸水解物處理組，其雌、雄 SD 大鼠於第 0、7 及 14 天之平均體重與對照組相較，無顯著差異。

Table 8 Mean body weight (MBW) of 6-week-old SD rats oral administered with the cultured *Ligia exotica* hydrolysate for 0, 7 and 14 days

Sex	Group	Dose (g/kg)	MBW(g)		
			0 day	7 day	14 day
Male	Control	0	206 ± 16	217 ± 19	246 ± 25
	Treated	15	208 ± 13	232 ± 17	260 ± 22
Female	Control	0	184 ± 7	199 ± 11	214 ± 7
	Treated	15	186 ± 15	206 ± 17	217 ± 15

Data are expressed as the mean ± SD (n = 5). No significant difference between control and treated groups at p < 0.05 by Student's t-test.

Table 9 Changes of hematological parameters of 6-week-old SD rats oral administered with the cultured *Ligia exotica* hydrolysate for 14 days

Sex	Group	WBC* (10 ³ /μL)	RBC (10 ⁶ /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
Male	Control	9.9 ± 2.7**	7.9 ± 0.3	16.2 ± 0.5	47.5 ± 2.1	60.4 ± 1.3	20.6 ± 0.5	34.1 ± 0.6
	Treated	9.5 ± 1.8	7.6 ± 0.3	16.1 ± 0.3	46.1 ± 1.0	60.7 ± 1.8	21.2 ± 0.7	34.9 ± 0.7
Female	Control	11.8 ± 6.4	7.3 ± 0.3	15.2 ± 0.5	43.7 ± 1.9	59.7 ± 1.1	20.8 ± 0.3	34.9 ± 0.4
	Treated	8.0 ± 1.2	7.2 ± 0.4	15.4 ± 0.6	43.3 ± 1.6	60.0 ± 1.1	21.3 ± 0.5	35.4 ± 0.7

*WBC: White blood cell; RBC: Red blood cell; HGB: hemoglobin; Hct: hematocrit; MCV: Mean corpuscular volume; MCH: Mean corpuscular hemoglobin; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration.

**Data were expressed as mean SD (n = 5). No significant difference between control and treated groups at p < 0.05 by Student's t-test.

血液學分析結果如 Table 9 所示，當紅血球數 (red blood cell, RBC) 以 10⁶/μL 為計算單位時，對照組雄鼠的紅血球數平均為 7.9 ± 0.3 單位、處理組為 7.6 ± 0.3 單位，二者未有明顯差異；比較對照組與處理組之雌鼠的紅血球數也未見明顯差異 (7.3 ± 0.3 與 7.2 ± 0.4 單位)。對照組雄鼠每 100 mL 血液中的血紅素 (hemoglobin, HGB) 含量為 16.2 ± 0.5 g、處理組則為 16.1 ± 0.3 g；供試雌鼠對照組與處理組的血紅素含量分別為 15.2 ± 0.5 g 和 15.4 ± 0.6 g。計算血球容積比 (hematocrit, HCT) 的數值顯示，對照組雄鼠為 47.5 ± 2.1%，處理組則為 46.1 ± 1.0%；供試雌鼠對照組的數值為 43.7 ± 1.9%，處理組為 43.3 ± 1.6%。檢測雄鼠和雌鼠平均紅血球體積 (mean corpuscular volume, MCV) 的結果，則不論是對照組或處理組，供試雄鼠和雌鼠的數值均介於 59.7 ~ 60.7 fL，彼此間無明顯差異。另外，比較雄鼠和雌鼠血液中之平均血球血色素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH) 及平均血球血色素濃度 (mean

corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 等項目，不論是雄鼠或雌鼠，其對照組與處理組亦未見明顯差異。另將供試大鼠血液經抹片後再染色、鏡檢以進行白血球分類，結果如 Table 9 所示，當白血球數 (White blood cell, WBC) 以 10³/μL 為計算單位時，對照組雄鼠的白血球數平均為 9.9 ± 2.7 單位、處理組為 9.5 ± 1.8 單位；供試雌鼠對照組的數值為 11.8 ± 6.4 單位，處理組為 8.0 ± 1.2 單位。以上血液分析結果顯示在對照組及處理組間均無任何顯著異常現象，表示對紅血球生成、白血球免疫或血小板凝血功能，無任何血液毒性。

以血清生化儀檢測大鼠血清肝腎酵素值，結果如 Table 10，對照組雄鼠之丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT) 含量，在對照組雄鼠每公升含量為 46.3 ± 6.6 國際單位 (U)，處理組則為 42.1 ± 8.5 U；供試雌鼠對照組的數值為 32.9 ± 3.9 U/L，處理組為 31.9 ± 3.7 U/L。另天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST) 每

Table 10 Serum biochemistry changes in liver and renal function of 6-week-old SD rats oral administered with the cultured *Ligia exotica* hydrolysate for 14 days

Sex	Group	ALT* (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Male	Control	46.3 ± 6.6**	135.9 ± 27.5	13.8 ± 1.7	0.4 ± 0.0
	Treated	42.1 ± 8.5	109.8 ± 11.7	16.5 ± 2.4	0.4 ± 0.1
Female	Control	32.9 ± 3.9	128.5 ± 8.0	16.5 ± 3.3	0.5 ± 0.0
	Treated	31.9 ± 3.7	111.2 ± 57.8	14.7 ± 2.8	0.5 ± 0.1

Sex	Group	LDH (mg/dL)	Total protein (mg/dL)	Albumin (mg/dL)
Male	Control	1410.4 ± 310.2	5.4 ± 0.4	4.0 ± 0.3
	Treated	893.6 ± 345.8	5.0 ± 0.8	3.7 ± 0.5
Female	Control	1710.4 ± 186.0	5.5 ± 0.4	4.2 ± 0.3
	Treated	1014.6 ± 966.3	6.0 ± 0.4	4.4 ± 0.2

*ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; BUN: Blood urea nitrogen; LDH: lactate dehydrogenase.

**Data were expressed as mean ± SD (n=5). No significant difference between control and treated groups at $p < 0.05$ by Student's t-test.

公升含量為 135.9 ± 27.5 U，處理組則為 109.8 ± 11.7 U；供試雌鼠對照組的數值每公升含量為 128.5 ± 8.0 U，處理組則為 111.2 ± 57.8 U。無論是 ALT 或 AST 在其對照組與處理組皆無明顯差異，顯示肝功能無異常現象。

雄鼠之血尿酸 (blood urea nitrogen, BUN) 含量，在對照組每 100 mL 的血清中含有 13.8 ± 1.7 mg，處理組為 16.5 ± 2.4 mg；供試雌鼠對照組與處理組的數值分別為 16.5 ± 3.3 mg/dL 和 14.7 ± 2.8 mg/dL。另肌酐 (creatinine) 含量之變化，則不論是供試雄鼠或雌鼠，其對照組與處理組之含量均介於 $0.4 \sim 0.5$ mg/dL。此等結果經比較後，在其對照組與處理組間皆未見明顯差異，顯示腎功能無異常現象。乳酸去氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 之評估結果顯示，每 100 mL 血清中對照組雄鼠的 LDH 含量為 1410.4 ± 310.2 mg、處理組則為 893.6 ± 345.8 mg；供試雌鼠對照組與處理組的 LDH 含量分別為 1710.4 ± 186.0 mg 和 1014.6 ± 966.3 mg；另總蛋白 (total protein) 與白蛋白 (albumin) 含量之變化，則不論是供試雄鼠或雌鼠，其對照組與處理組之含量均介於 $5.0 \sim 6.0$ mg/dL 和 $3.7 \sim 4.4$ mg/dL 之間，此等結果經比較後，在其對照組與處理組間皆未見明顯差異，顯示對試驗動物之細胞毒性與營養功能均無異常

現象。綜合安氏測試法和口服急毒性安全評估之結果證實，海螵蛸及其蛋白酶水解物皆具有食用安全性。

結 論

本研究為首篇探討海螵蛸之組成分，同時以蛋白酶水解產製具有抗氧化與抗凝血功能的機能成分，並佐以基因毒性試驗與口服急毒性試驗證實海螵蛸及其蛋白酶水解物可能具有食用安全性。因此海螵蛸之蛋白酶水解物未來可能應用做為機能保健食品或營養補充品之海洋來源新素材的發展潛力，達到活用低度利用水產生物資源之目的。

參考文獻

- 王文憲編譯 (1994) 人體生理學. 合記圖書出版社, 台北, 台灣, 602-611.
- 何敏夫 (1993) 血液學. 合記圖書出版社, 台北, 台灣, 241-258.
- 林昇鋒編譯 (1993) 血液學概論. 合記圖書出版社, 台北, 台灣, 274-301.

- 許建民 (2001) 乳酸菌對 MNNG 抗致突變性探討. 國立中興大學食品科學系碩士論文, 台中, 台灣, 88 pp.
- 曾化武, 卞俊, 蔡定國 (2002) 中華人民共和國發明專利 99124016.2. 北京, 中國.
- 黃政德, 葛金文, 張玉生 (2004) 缺血預處理對家兔缺血再灌注損傷心肌的延遲保護作用. 中國醫師雜誌, 6(2): 200-203.
- 黃康泰, 余傳隆, 黃泰康, 丁志遵等, 王明時, 王強, 劉天培 (1999) 中藥辭海. 中國醫藥科技出版社, 北京, 中國, 2429 pp.
- 新食品成分研究調查會編 (2006) 日本食品成分表. 醫齒藥出版株式會社, 東京, 日本, 152 pp.
- 蔡明利 (1996) 恆春半島兩種半陸棲型等腳類 *Ligia exotica* 及 *Ligia taiwanensis* (Isopoda: Ligiidae) 生活史特徵、陸地適應及登陸之研究. 國立臺灣大學動物學研究所博士論文, 台北, 台灣, 18-20.
- 衛生署 (1999) 28 天餵食毒性試驗. 健康食品安全及功效評估方法, 衛署食字第 88037803 號, 台北.
- 蕭翌柱, 廖俊旺, 吳明哲 (2008) 台灣金線蓮生技產品之毒理安全性評估. I. 台灣金圓酒對大鼠之口服急性毒性試驗. 台灣農業研究, 57(3): 183-192.
- 謝博生, 楊泮池 編 (2001) 一般醫學檢驗與判讀. 國立台灣大學醫學院出版, 台北, 台灣.
- American Association of Cereal Chemists (1983) Approved Methods of the AACCC. 8th ed. The Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, U.S.A.
- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science, 221: 1256-1264.
- A.O.A.C. (1997) Official Methods of Analysis (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, U.S.A.
- A.O.C.S. (1975) Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists Society (3rd ed.). Champaign, IL, U.S.A., Method number Ce 2-66.
- Athukorala, Y., W. Jung, T. Vasanthan and Y. Jion (2006) An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. Carbohydr. Polym., 66: 184-191.
- Church, F. C., H. E. Swaisgood, D. H. Porter and G. L. Catignani (1983) Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J. Dairy Sci., 66: 1219-1227.
- Dietrich, C. P., J. F. Paiva, R. A. B. Castro, S. F. Chavante, W. Jeske, J. Fareed, P. A. J. Gorin, A. Mendes and H. B. Nader (1999) Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. Biochim. Biophys. Acta, 1428: 273-283.
- Dinis, T. C. P., V. M. C. Madeira and L. M. Almeida (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Arch. Biochem. Biophys., 315: 161-169.
- Doi, E., D. Shibata and T. Matoba (1981) Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. Anal. Biochem., 118: 173-184.
- Edward, M., E. M. Conway, S. Pollefeyt, D. Collen and M. Steiner-Mosonyi (1997) The amino terminal lectin-like domain of thrombomodulin is required for constitutive endocytosis. Blood, 89: 652-661.
- Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (1998) Acute oral toxicity. In: OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 870.1100, EPA 712-C-98-190, Washington, DC, U.S.A., 10 pp.
- Faulkner, D. J. (2002) Marine natural products. Nat. Prod. Rep., 19: 1-48.
- Goh, Y. and T. Tamura (1980) Olfactory and gustatory response to amino acids in two marine teleosts-red sea bream and mulet. Comp. Biochem. Physiol., 66C: 217-224.
- Gyamfi, M. A., M. Yonamine and Y. Aniya (1999) Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. Gen. Pharmacol., 32: 661-667.
- Heu, M. S., J. S. Kim and F. Shahidi (2003) Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. Food Chem., 82: 235-242.
- Hayashi, T., K. Yamaguchi, and S. Konosu (1979) Studies on flavor components in boiled crabs. III. Sugars, organic acid and minerals in the extracts. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45: 1325-1329.
- Ibrahim, H. M., M. F. Salama and H. A. El-Banna (1999) Shrimp's waste: Chemical composition, nutritional value and utilization. Nahrung, 43(6): 418-423.
- Je, J. Y., Z. J. Qian, H. G. Byun and S. K. Kim (2007) Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Proc. Biochem., 42: 840-846.
- Jo, H. Y., W. K. Jung and S. K. Kim (2008) Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus*. Proc. Biochem., 43:179-184.
- Jung, W. K., J. Y. Je, H. J. Kim and S. K. Kim (2002) A novel anticoagulant protein from *Scapharca broughtonii*. J. Biochem. Mol. Biol., 35(2): 199-205.

- Kim, S. H., S. M. Yoo, I. S. Park and Y. H. Kim (2000) A new inosine disaccharide from the crustacean *Ligia exotica*: Isolation and structure elucidation by total synthesis. *J. Nat. Prod.*, 63(9): 1188-1191.
- Kim, S. Y., J. Y. Je and S. K. Kim (2007a) Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *J. Nutr. Biochem.*, 18: 31-38.
- Kim, H. J., I. Y. Bae, C. W. Ahn, S. Lee and H. G. Lee (2007b) Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from blace soybean protein hydrolysate. *Peptides*, 28: 2098-2103.
- Kitakaze, M., M. Hori and T. Kamada (1993) Role of adenosine and its interaction with α -adrenoceptor activitgin ischaemic and reperfusionin jury of the myocardiam. *Cardiovasc. Res.*, 27: 18-22.
- Konosu, S., K. Watanabe and T. Shimizu (1974) Distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts of eight species of fish. *Jap. Soc. Fish. Sci.*, 40: 909-914.
- Konosu, S. and K. Yamaguchi (1982) The flavor components in fish and shellfish, *In Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products* (Martin, R. E., G. J. Flick, C. E. Hebard and D. R. Ward eds), AVI Publishing, Westport, CT, U.S.A., 367-404 pp.
- Lowery, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Lubert, S. (1995) *Biochemistry* (4th Ed.). W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A., 476-503 pp.
- Marjorie, S. (1983) *Library of Congress cataloging in publication data*, (2nd Ed.). Lea and Febiger 600 South Washington Square Philadelphia, Patent 19106, U.S.A., 1-16 pp.; 112-160 pp.
- Maron, R. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215.
- Mendis, E., N. Rajapakse, H. G. Byun and S. K. Kim (2005) Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci.*, 77: 2166-2178.
- Nader, H. B., C. C. Lopes, H. A. O. Rocha, E. A. Santos and C. P. Dietrich (2004) Heparins and heparinoids: Occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. *Curr. Pharm. Des.*, 10: 951-966.
- Organization for Economic Cooperation and Development (2002) Acute oral toxicity. In *OECD Guideline for Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects*. Paris, France, No. 401, Adopted 24 February 1987, Paris, France. 7 pp.
- Oyaizu, M. (1988) Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Jap. Soc. Fish. Sci.*, 35: 771-775.
- Patrineli, A., M. N. Clifford, R. Walker and C. Ioannides (1996) Mutagenicity of white grape juice in the Ames test. *Food Chem. Toxicol.*, 34: 559-562.
- Qian, Z. J., W. K. Jung and S. K. Kim (2008) Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Biores. Technol.*, 99(6): 1690-1698.
- Rajapakse, N., E. Mendis, H. G. Byunb and S. K. Kim (2005a) Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J. Nutr. Biochem.*, 16 : 562-569.
- Rajapakse, N., E. Mendis, W. K. Jung, J. Y. Je and S. K. Kim (2005b) Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res. Int.*, 38: 175-182.
- SAS (1988) *SAS User's Guide* (4th ed.): Basic Statistical Analysis. SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.
- Silver, W. L. (1979) Olfactory responses from a marine elasmobranch, the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Mar. Behav. Physiol.*, 6: 297-305.
- Van de Graaf, K. M., and S. I. Fox (ed.) (1990) "Circulatory system: Blood", *In Concepts of Human Anatomy and Physiology*, W.C. Brown, IA, U.S.A. 20:531-542.
- Yu, J. Y. L., C. K. Cheng, B. J. Chen, M. J. Cheng, H. H. Cheng, W. J. Chang, H. H. C. Chen, C. C. Hong, P. J. Lee, S. C. Liang, K. S. Sheu, Y. Y. Sung, C. N. Weng, C. W. Tsai, C. S. Wang, M. H. Wang, L. S. Yen, C. K. Yu and J. Y. L. Yu (2004) *A Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals* (2nd Ed.). Chinese Society for the Laboratory Animal Science. Taipei, Taiwan, R.O.C., 207 pp.

The Functional Properties and Edible Safety of Hydrolysate of Cultured *Ligia exotica*

Huey-Jine Chai^{1*}, Yu-Chen Chen¹, Jing-Hua Li¹, Chun-Hung Yang², Yu-Hong Dai¹
and Chung-Heng Wu¹

¹Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

²Department of Applied Toxicology, Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

ABSTRACT

Ligia exotica are common crustacean around the coast in Taiwan; and some of them are used as baits for fishing. In order to complete the utilization and to increase its added-value, the edible safety and functional properties of cultured *Ligia exotica* and its hydrolysate were evaluated. Results showed that crude protein was the mainly composition and accounts for 55.3% on a dry weight basis. Glycine, alanine, taurine, glutamic acid, and arginine were the predominant free amino acids. Hydrolysate of cultured *Ligia exotica* which were hydrolyzed by two mixed proteases contained 83.6 ~ 89.5% peptides with the molecular weight less than 1500 Da. The concentration of scavenging 50% of radical activity (IC₅₀) in hydrolysate on the Fe²⁺ chelating activity and reducing power were 0.3 ~ 0.7 mg/mL and 10.1 ~ 10.6 mg/mL, respectively. In addition, *Ligiae exotica* and its hydrolysate possessed anticoagulant ability, and hydrolysate showed the dose-dependent effect. The anticoagulant activity of hydrolysate at a concentration of 40 mg/mL was close to that of heparin at 30 mg/mL, while the critical value of blood coagulation at APTT in both were greater than 100 sec. Based on the Ames and acute toxicity animal model test, *Ligiae exotica* and its hydrolysates might be edible safety. Results indicated that hydrolysate of cultured *Ligia exotica* could be a suitable source for antioxidant and anticoagulant agents and use as healthy food.

Key words: *Ligia exotica*, free amino acid, antioxidant activity, anticoagulant ability, acute toxicity

*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101; Fax: (02) 2462-3306; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw