

馬尾藻生理活性物質及其應用於豹鱸養殖之研究

林慧秋·許鐘鋼*·廖紫嫻·高雪卿·林金榮

行政院農業委員會水產試驗所澎湖海洋生物研究中心

摘要

本試驗為開發馬尾藻酵素水解萃取物粉末添加於飼料中用以餵養豹鱸並評估抗菌、抗氧化、酵素活性等效益。結果顯示，馬尾藻酵素水解物具有極佳的 DPPH 及 ABTS 自由基清除活性；對於仙人掌桿菌、金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、表皮葡萄球菌、枯草桿菌，具有良好的抗菌及抑菌功能。以 1 - 4% 馬尾藻粉末添加於豹鱸飼料中來餵養，結果顯示豹鱸之成長及魚肉一般成分，各組間幾乎沒有差異，但添加馬尾藻有效優化豹鱸之腸道微生物菌相。另外，豹鱸血液免疫指數-血清蛋白比值以馬尾藻酵素水解物添加 1、2 及 4% 較佳，抗蛋白酶活性以 3 及 2% 添加較佳，溶菌酶以 4 及 2% 添加較佳，呼吸爆則以 1 - 3% 添加較佳。而豹鱸以馬尾藻酵素水解物添加飼養 8 週後，其魚肉一般成分除了粗脂肪以 2 及 4% 較佳外，其他皆無差異。綜合以上結果顯示，以馬尾藻酵素水解物添加 2 及 4% 佳，但基於成本考量及其效益，建議以添加最適 2%。未來，海藻可應用於水產養殖之潛力值得關注。

關鍵詞：馬尾藻、豹鱸、飼料

前言

隨著全球陸續禁止在飼料添加抗生素，天然海藻添加物質成為一種新型的具有潛在營養價值飼料 (Buschmann *et al.*, 2001) 和作為魚飼料之可能性 (Appler, 1985; El-Sayed, 1994; Davies *et al.*, 1997; Wahbeh, 1997)。海藻用於飼料的價值在於其中所含豐富的動物必需微量元素和維生素及一些促進動物生長的活性成份。海藻的碳水化合物可被動物消化利用。研究證明在飼料中添加海藻可促進動物生長，並有利於維持動物健康 (劉, 2003)。

馬尾藻 (*Sargassum* spp.) 含有許多豐富的營養物質，包括維他命、礦物質及膳食纖維等，且馬尾藻中富有多種活性物質，例如：抗氧化 (Lin *et al.*, 2012)、抗菌 (Vijayabaskar *et al.*, 2011)、抗腫瘤 (Zandi *et al.*, 2010)、抗病毒 (Fabregas *et al.*, 1999)、

調節免疫力 (Hwang *et al.*, 2010) 及抗發炎 (Hwang *et al.*, 2011)，其潛在價值相當高。先前試驗證明海藻酵素水解具有較佳的活性物質 (Lin *et al.*, 2012)，故本試驗採用酵素水解方式進行。

豹鱸 (*Plectropomus leopardus*) 別名豹紋豹鱸、花斑刺鰓鮨、豹紋鰓棘鱸；澎湖俗稱紅條、青條、黑條、七星斑，香港則稱東星斑，是尚待開發的明星養殖物種，也是高單價的鮨科魚類。由於被大量捕獲，屬於 CITES 的近危物種 (Near Threatened)。漁民常以一支釣或魚槍等捕獲野生豹鱸，其單價達 1,000 元/kg 以上，天然海域之漁獲量早已供不應求。利用馬尾藻添加於飼料中，可開發本土飼料與優質配方，降低進口原料衝擊且提昇飼料效率。本試驗採集澎湖數量較多的馬尾藻，期待開發優質海藻飼料配方，增加魚體健康且提昇魚體免疫能力。

材料與方法

一、材料

*通訊作者 / 澎湖縣馬公市壽裡里 266 號，TEL: (06) 995-3416 ext. 231; FAX: (06) 995-3058; E-mail: dcks0511@ms23.hinet.net

(一) 馬尾藻酵素水解物粉末

馬尾藻主要採集自澎湖馬公市，將採集後之馬尾藻經多次自來水清洗及脫水機脫水後，以熱風乾燥機乾燥 (溫度 70 °C，風乾 24 hr)。乾燥後以粉碎機粉碎，即得乾燥藻體粉末。

(二) 海藻酵素水解

以蒸餾水配置醋酸緩衝溶液 20 L，調整 pH 至 4.5，加入 0.2% Viscozyme 酵素 (sigma Co.) 及海藻 10 kg 混合之，經過酵素水解 12 hr，以熱風乾燥機 70°C 烘至乾燥後磨粉，製成海藻添加物單元飼料。

二、馬尾藻特性分析

(一) 乾燥馬尾藻一般成分分析測定 (AOAC, 1984)

1. 水分

秤取 2 g 樣品置於已秤重且達恆重之坩鍋中，放於烘箱中以 105°C 乾燥 4 hr 後，取出坩鍋於真空乾燥器中，待溫度降至室溫秤重。

水分 (%) = (坩鍋與樣品的重量 - 坩鍋與乾燥後樣品的重量 / 坩鍋與樣品的重量 - 坩鍋的重量) × 100

2. 灰分

秤取 2 g 樣品置於已秤重且達恆重之坩鍋中，放入灰化爐中以 600°C 灰化 8 hr，灰化完畢取出坩鍋於真空乾燥器中，待溫度降至室溫秤重。

總灰分含量 (%) = (灰化後坩鍋與灰分的重量 - 坩鍋重量 / 樣品重量) × 100

3. 粗蛋白測定

粗蛋白依 micro-kjeldahl 的方法測定，取 2 g 樣品，加 5 g 催化劑及 18 ml 濃硫酸於分解管中，置於蛋白質分解爐 (BUCHI Speed Digester K-439) 中加熱 (480°C, 150 min) 分解至澄清狀，取出冷卻後加入 70 ml 蒸餾水，再以全氮蒸餾器 (BUCHI Kjeldahl unit K-350) 蒸餾出氮，蒸餾期間加入 40 ml 濃度為 40% 氫氧化鈉 (NaOH)，用濃度為 4% 硼酸 (H₃BO₃) 滴入 3 滴指示劑收集 5 min 後，以 0.1 N HCl 滴定至淡粉紅色。代入計算公式計算。

$$\text{粗蛋白}(\%) = [(S-B) \times F \times 0.0014 \times 6.25 / W] \times 100$$

S：樣品之 HCl 之滴定毫升數

B：空白之 HCl 滴定毫升數

N：HCl 之當量數

W：樣品重量 (g)

F：0.1N HCL 標準酸的力價

4. 粗脂肪測定

秤取藻粉 2 g 置研鉢中，加入 2 g 無水硫酸鈉 (Na₂SO₄) 研磨均勻後，以藥匙刮入圓筒濾紙中，上面塞入棉花，套上套環後吸附於套環轉接器 (VELP ser148)。接收杯秤重後倒入乙醚 (C₂H₅OC₂H₅)，置於接收架上拉下拉桿，進行迴流萃取，加熱器設定於 110 °C，打開水流及冷凝管使乙醚順利迴流，共分萃取、沖提及回收等 3 個步驟，待萃取完成將圓筒濾紙取出，取出接收杯置烘箱以 105°C 烘乾→冷卻→秤重至恆量。

粗脂肪含量 (%) = (萃取乾燥後接收杯重量 - 空接收杯重量 / 樣品重量) × 100

(二) 馬尾藻酵素水解物安姆試驗 (Ames test)

試驗菌株 *S. typhimurium* TA100 及 98 來自靜宜大學謝尤敏老師實驗室。

1. 毒性試驗

在 nutrient agar 中加入 0.1 ml 隔夜活化之 TA 菌株 (菌數 OD 值：0.3 - 0.4)，0.1 ml 測試樣品與 0.1 ml 0.2 M phosphate buffer 混合，一組不加入 0.5 ml S9 mix (以 0.5 ml 磷酸鹽緩衝溶液取代)，另一組加入 0.5 ml S9 mix (S9 是由大鼠肝臟的子宮後膜部分組成的代謝活化系統)，混合均勻後傾倒於無菌培養皿內，待凝固後，於 37°C 倒置培養 48 hr，計數菌數。馬尾藻酵素水解物分別以無菌水或 DMSO 溶解配製成 3 個不同濃度，最高濃度者為 5 mg / plate，於所測試之劑量 (1 - 5 mg/plate) 範圍內，檢測其對 *S. typhimurium* TA100 及 98 之毒性。測試樣品組之菌數低於對照組 (不添加 0.1ml 測試樣品，以 0.1 ml DMSO 取代)，或菌落數隨著測試樣品濃度增加而降低時，表示測試樣品對 TA 菌株具有毒性 (Maron and Ames, 1983)。

2. 致突變性試驗

除了添加 0.2 ml histidine/biotin (0.5 Mm) 溶液混合外，其餘試驗步驟與毒性試驗相同。測試樣品中含致突變性時，其平板上的菌落數會高於自發性回復突變菌落數，高於 2 倍以上者或菌落數隨著測試樣品濃度增加而增加者為陽性反應。並以已知致癌劑 t-BHP 作為正對照組 (Maron and Ames, 1983)。

3. 抗致突變性試驗

除了添加 0.1 ml 商業化致癌劑 SA 或 4-NQO 和 0.2 ml histidine/biotin (0.5 Mm) 溶液混合外，其餘試驗步驟與毒性試驗相同。每一樣品於試驗時採三重覆。樣品試驗組之 His⁺ revertans plate 菌數顯著低於控制組者 (添加 t-BHP)，表示具有抗致突變性。樣品之抗致突變性以抑制百分比表示：

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (\text{樣品組之 His}^+ \text{ revertans} - \text{自發性突變數} / \text{控制組之 His}^+ \text{ revertans} - \text{自發性突變數})] \times 100$$

抑制百分比越高表示樣品之抗致突變性越強。

(三) 馬尾藻酵素水解物抗氧化活性分析

本研究選用國際期刊最常發表之抗氧化能力測定試驗方法，濃度為 0.1 - 20 mg/ml。

1. DPPH 自由基清除試驗

參考 Blois *et al.* (1958) 的方法，取馬尾藻酵素水解物，加入新鮮配置 0.1 mM DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 之乙醇溶液 2 ml，混合均勻後離心 3000 rpm，5 min，避光靜置 30 min 後，以分光光度計 (UV/VIS Spectrophotometer SP8001) 測其在 517 nm 波長下之吸光值。以 [空白組之吸光值 - (樣品溶於水吸光值 - 樣品溶於酒精吸光值) / 空白組之吸光值] \times 100%，得到清除效應百分率。

2. ABTS 自由基清除試驗

取純水加 H₂O₂、過氧化酶及 ABTS 溶液混合均勻，反應 1 hr，加入馬尾藻酵素水解物反應 10 min (空白組以去離子水替代)，於 655 nm 測定其吸光值。

3. 還原力

取馬尾藻酵素水解物，加入 0.2 mM 的磷酸緩衝溶液 (pH 6.6) 及 1% 的赤血鹽 (potassium ferricyanide)，震盪後於 50°C 水浴 20 min 後，冷水浴 10 min，加入 10% TCA (trichloroacetic acid) 溶液，經 3000 rpm，10 min 離心之後，取上層液 5 ml 並加入 5 ml 蒸餾水及 1 ml ferric chloride 溶液混合均勻後，靜置 10 min，於 700 nm 測定其吸光值。吸光值越高表示還原力越強，以 Abs 表示之。

(四) 馬尾藻酵素水解物之抗菌活性試驗

將各測試菌株 (BCRC10603 *Bacillus cereus*) 仙人掌桿菌、(BCRC 10447 *Bacillus subtilis*) 枯草桿菌、(ATCC 25922 *Escherichia coli*) 大腸桿菌、(BCRC15290 *Staphylococcus aureus*) 金黃色葡萄球菌、(BCRC 11030 *Staphylococcus epidermidis*) 表皮葡萄球菌及 (BCRC 10806 *Vibrio parahaemolyticus*) 腸炎弧菌塗抹於 TSA 培養基上，待乾後挖取孔洞，再分別注入 100 μ l 之馬尾藻酵素水解物，於 37°C 下培養 18 hr 後，記錄其抑菌圈大小。

(五) 馬尾藻酵素水解物對老鼠巨噬細胞之 MTT 試驗

老鼠巨噬細胞 (RAW264.7) 購自 BCRC，以 10% 胎牛血清 (FBS) + 1% 抗生素 (PSA) + 1% Pyruvate + DMEM 作為細胞用培養液活化 RAW 264.7 於 T-25 flask 中，培養條件為 37°C，5% CO₂。將細胞置於此條件培養箱，培養至八分滿後，以 PBS 清洗細胞後加入 0.05% Trypsin-EDTA 將細胞打散，並移至 T-75 flask 中，培養至八分滿後，以 PBS 清洗細胞後加入 0.05% Trypsin-EDTA 將細胞打散，加入 DMEM + 10% FBS 培養液平均加入 96 孔盤中，培養至隔夜，並以 PBS 清洗後，再加入不同濃度的馬尾藻酵素水解物於 37°C，5% CO₂ 培養 (以不添加樣品之培養基作為控制組)。以 PBS 清洗細胞後，加入含 0.5 mg/ml MTT 的 PBS 溶液中，置於 37°C 培養 2 hr 後，使用 DMSO 溶解，並於 ELISA 以 570 nm 下檢測其吸光值。

$$\text{細胞活存率 (\%)} = \frac{\text{樣品組織數值}}{\text{控制組織數值}} \times 100\%$$

(六) 馬尾藻酵素水解物對老鼠巨噬細胞生成 NO 試驗

如 (五) 操作步驟，加入不同濃度 (200、300、400、500、1000、2500、5000 $\mu\text{g/ml}$) 的馬尾藻酵素水解物及 LPS (100 ng/ml)，混合於 DMEM + 10% FBS 培養基中 (控制組為不加樣品與 LPS 之培養基，對照組為單純使用 LPS) 培養至隔夜，取上清液 100 μl 之樣品與標準品置於 96 孔盤中再以 100 μl griess reagent 混合，避光靜置 10 min 後，再以 540 nm 波長檢測。

標準品 (亞硝酸鈉 sodium nitrite) 製作檢量線來計算樣品中的亞硝酸鹽濃度間接得知 NO 含量，濃度單位為 μM 。

三、海藻飼料餵養豹鱈試驗

(一) 豹鱈飼養管理與成長測量

1. 水質與投餵管理

(1) 水質管理

每天檢視換水量是否適當，避免造成水質惡化之可能，但仍須進行每日一次之吸底。打氣量亦須隨著魚隻成長而適度調整，盡量避免魚隻過度擾動。水質檢測時間為每日 10:00。每日記錄溫度、鹽度、DO、pH 值。

(2) 養殖系統

飼養桶具為 250 L 之圓形透明 PP 桶，為避免水質惡化，採適量流水式養殖，2 顆氣石打氣增氧。1 英寸中央排污管外另外套有 2 英寸之外管，底部排污。為避免魚隻因受驚嚇而跳出，每個養殖桶均有藍色上蓋。

(3) 試驗分組

將豹鱈幼魚共分成 5 組，分別為以自製之濕性飼料投餵，飼料共分為不含及含 1、2、3、4% 馬尾藻粉。每組三重複，每一重複使用 10 尾。

(4) 餌料投餵

豹鱈實驗用魚於上午 9 點投餵，投餵量以儘量避免餌料殘留為原則，減少水質惡化可能孳生之問題。

2. 豹鱈成長測量

飼養前後以電動游標尺 (Mitutoyo) 測量豹鱈體長及全長，電子秤測量體重。測量前先以 5 ppm 2-苯氧乙醇 (2- phenoxyethanol) 進行麻醉，測量完畢之豹鱈放回 PP 桶中繼續飼養。8 週飼養期間觀察其成長狀況，8 週後進行體重、全長及體長測定。

3. 豹鱈魚肉一般成分分析

每組不同海藻比例飼養豹鱈前後，採取全魚肉，進行水分、灰分、粗蛋白及粗脂肪分析各 3 重複。測定方法如上述二 (一) 項。

4. 豹鱈腸道微生物菌相測定

依 FDA 之 Bacteriological Analytical Manual for Foods (1996) 所述方法分析之。腸道微生物菌種之菌落數測定，包括厭氧菌、好氧菌、乳酸桿菌及大腸桿菌之菌落數，其單位以菌落形成單位 (colony forming unit, cfu) 表示之。取豹鱈腸道切開，於無菌操作台內，加入高壓滅菌釜 121°C / 30 min 滅菌的 phosphate buffer solution (PBS) 作序列稀釋 ($10^0 - 10^5$)，取適當稀釋倍數的菌液 0.1 ml 至培養皿中，再倒入同樣已經高壓滅菌釜滅菌之培養基，將菌液和培養基混合均勻後，待培養基凝固後，再倒置放入溫度控制在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下之培養箱中進行培養。菌數以菌落之對數值 (log cfu) 表示之，取菌落數在 30 - 300 間的培養皿來計算 (Kornegay and Risley, 1996)。

(1) 好氧菌菌數 (total aerobic flora) 測定

使用 Plate count agar (Merck 1.05463) 培養基，培養 24 hr 後計算其菌落數。

(2) 厭氧菌菌數 (total anaerobic flora) 測定

與 (1) 好氧菌測定相同，只有培養時需移置於厭氧袋中，並於袋中放置厭氧包 (Anaerocult® Merck 1.13829)，培養 24 hr 後計算其菌落數。

(3) 乳酸桿菌 (lactobacillus) 測定

使用 MRS-agar (Merck 1.0660) 培養基，培養於厭氧環境 72 hr 後，計算其菌落數。

(4) 大腸桿菌群 (coliform group) 測定

使用 Chomocult® Coliformenagar; Merck 1.10426 培養基，培養 48 hr 後計算其菌落數。

(二) 豹鱸之非特異性免疫反應

1. 血清總蛋白質、白蛋白及球蛋白測定

參考何等 (2013) 方法進行，用 1 ml 塑膠針筒配 25 G 針頭，自尾柄採集血液，將採得之血液於 4°C 下靜置一夜後，離心 (3000 × g、10 min、4°C)，吸取上層血清，存放於 -80 °C 冰櫃保存，用於血清總蛋白質、白蛋白、球蛋白、溶菌酶活性、抗蛋白酶 (antiprotease) 活性及呼吸爆等免疫指數分析。

總蛋白質及白蛋白之測定係利用 Randox (RANDOX Laboratories, Antrim, UK) 之血清總蛋白質及白蛋白測試套組進行，球蛋白含量係以總蛋白質及白蛋白之差值估算。

2. 抗蛋白酶活性測定、溶菌酶活性及呼吸爆之測定

(1) 抗蛋白酶活性測定

實驗參照 Bowden *et al.* (1997) 方法進行，並稍做修飾。先將 10 μL 血清與胰蛋白酶溶液 [trypsin bovine pancreas 溶於 0.01 M Tris-HCl (pH 8.2) 緩衝液] 混合，加入 500 μL 2 mM (1mg/ml) BAPNA (sodium-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide HCl)，以 0.1 M Tris-HCl (pH 8.2) 緩衝液加至體積為 850 μL，於 22 °C 反應 25 min；以 150 μL、30% 醋酸中止反應後，於波長 415 nm 下測定吸光值。血清中抗蛋白酶活性係以抑制胰蛋白酶百分比 (percentage trypsin inhibition) 表示，計算公式為：空白組胰蛋白酶的吸光值 - 樣品的吸光值 / 空白組胰蛋白酶的吸光值 × 100。

(2) 溶菌酶活性測定

實驗參照 Ellis (1999) 的方法。將雞蛋白溶菌酶溶於 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2) 配製溶菌酶標準溶液，其濃度分別為 0、2、4、6、8、16 及 32 μg/ml。另以 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2) 配製 0.2 mg/ml *Micrococcus lysodeikitus* 之菌液。取溶菌酶標準溶液 10 μL，加入 200 μL *M. lysodeikitus*，以盤式分光光度計

(microplate spectrophotometer, Thermo multiskan EX) 分別於第 1 分鐘及第 6 分鐘記錄在波長 530 nm 下之吸光值，根據不同濃度溶菌酶之標準溶液其每分鐘的改變量對溶菌酶濃度作圖，即得到檢量線。以魚隻血清代替溶菌酶的標準溶液重複以上步驟，紀錄第 1 分鐘及第 6 分鐘之吸光值，依據其吸光值的改變由檢量線推估血清中溶菌酶之濃度，以雞蛋白溶菌酶之濃度表示為溶菌酶活性。

(3) 呼吸爆之測定

呼吸爆之測定方法是參照 Secombes (1990) 及 Stasiack and Baumann (1996) 所述之 nitroblue tetrazoloum (NBT) 色法進行測定。於 96 孔槽平底微量滴定盤中，每槽加入 100 μl 0.2% poly-L-lysine 覆蓋 30 min 後取出 poly-L-lysine，以增加血球吸附槽面。取 100 μl 巨噬細胞懸浮液加入處理過之 96 孔槽平底微量滴定盤中，於室溫培養 2 hr 使血球貼附槽底部，去除上清液後分別加入 100 μl 之 zymosan (0.2%) 及 Hank's balanced salt solution (HBSS)，於室溫誘發反應 30 min 後去除上清液，加入 100 μl NBT (0.3%) 在室溫中作用 30 min，加入 100% 酒精終止反應。以 70% 酒精沖洗三次後，風乾加入 120 μl 2 M KOH 及 140 μl dimethylsulfoxide (DMSO) 以溶解 cytoplasmic formazon，於 ELISA reader 波長 630 nm 下測定吸光值。未誘發免疫刺激組添加 HBSS 處理為 basal activity (BA)，誘發免疫刺激組添加 zymosan 處理為 stimulated activity (SA)，兩者之差值為呼吸爆裂活性 (respiratory burst activity, RBA) (Pick and Mizel, 1981)，來表示巨噬細胞產生超氧陰離子之增減。

四、統計分析方法

各試驗結果以 SPSS 套裝軟體 (Version 10.0) 進行變異數 (one way analysis of variance, ANOVA) 統計分析，測試各處理組間是否有顯著差異，所有試驗使用顯著水準為 $p < 0.05$ 。

結果與討論

一、海藻一般成分分析

Table 1 Toxicity of the extracts of *Sargassum viscozyme* hydrolyses toward *Salmonella typhimurium* TA strain

Strain	Extracts (mg/plate)	No. of colonies (Log CFU/ml) ^a	
		-S9 ^b	+S9
TA98	Control ^c	6.73±0.06	6.69±0.12
	1	6.84±0.09	7.43±0.01
	3	6.77±0.00	7.38±0.01
	5	7.03±0.06	7.43±0.04
	Control ^c	6.87±0.04	7.35±0.01
TA100	1	7.28±0.05	7.56±0.01
	3	7.21±0.02	7.65±0.01
	5	7.27±0.06	7.72±0.01
	Control ^c	6.87±0.04	7.35±0.01
	1	7.28±0.05	7.56±0.01

^aData are Mean ± SD of triplicates.

^bS9 is a metabolic activation system consisting of the postmitochondrial fraction of the livers of rats.

^cNegative control: treated with aseptic water without extract or DMSO; spontaneous revertants / plate.

Table 2 Mutagenicity of the extracts of *Sargassum viscozyme* hydrolyses toward *Salmonella typhimurium* TA strain

Strain	Extracts (mg/plate)	No. of colonies (Log CFU/ml) ^a	
		-S9 ^b	+S9
TA98	Control ^c	36.00±2.65	59.00±2.64
	1	45.00±1.00	59.30±4.72
	3	46.67±1.15	69.30±1.15
	5	51.00±3.61	65.00±3.00
	Control ^c	33.33±0.58	46.00±2.60
TA100	1	31.67±2.08	58.6±2.32
	3	41.67±1.15	53.00±3.13
	5	49.33±0.58	64.00±5.06
	Control ^c	33.33±0.58	46.00±2.60
	1	31.67±2.08	58.6±2.32

^aData are Mean ± SD of triplicates.

^bS9 is a metabolic activation system consisting of the postmitochondrial fraction of the livers of rats.

^cNegative control: treated with aseptic water without extract or DMSO; spontaneous revertants / plate.

乾燥馬尾藻一般成分分析，灰分為 25.71 ± 0.33%，粗蛋白含量為 12.29 ± 0.01%，水分為 6.48 ± 0.01%，脂肪含量為 0.8 ± 0.04%。

二、安姆試驗

(一) 毒性試驗

此 3 種樣品之毒性試驗結果顯示在測試劑量範圍內，無論有無添加 S9 mix 對所有 TA 試驗菌株，與對照組相較菌落數不會隨著測試樣品濃度增加而降低，故未呈現毒性反應 (Table 1)。

(二) 致突變性試驗

馬尾藻酵素水解樣品對 *S. typhimurium* TA100 及 98 之致突變性結果於試驗劑量 (1 - 5 mg/plate) 範圍內，不論有無添加 S9 mix，TA 菌株之 His⁺ revertants 菌落數目，均與自發性突變菌數相近，並無高於 2 倍以上或菌落數隨著測試樣品濃度增加而增加者，因此本試驗結果顯示樣品於測試劑量範圍內皆不具有致突變性 (Table 2)。

Table 3 The antimutagenicity effect of the *Sargassum viscozyme* hydrolyses on sodium azide-induced mutagenicity in TA strain of *Salmonella typhimurium*

Strain	Extracts (mg/plate)	Inhibition (%) ^a	
		-S9 ^b	+S9, B (a)P ^c
TA98	Control ^c	0	0
	4-NQO ^d +1	14.21	27.57
	4-NQO+3	24.72	54.59
	4-NQO+5	31.28	71.52
TA100	Control ^c	0	0
	SA ^d +1	14.77	15.20
	SA+3	24.85	17.13
	SA+5	4.43	22.78

^aData are Mean \pm SD of triplicates. Inhibition (%) = 1-(4-NQO (or SA) sample-control/4-NQO (or SA)-control)*100.

^bS9 is a metabolic activation system consisting of the postmitochondrial fraction of the livers of rats.

^cNegative control: without extract was treated with aseptic water or DMSO; spontaneous revertants/plate.

^dPostive control: 0.5 μ g / plate 4-nitroquinoline-N-oxid (4-NQO) or 50 μ g / plate sodium azide (SA).

^ePostive control: 0.5 μ g / plate benzo[a]pyrene [B (a)P].

Table 4 DPPH, ABTS radical scavenging activity and reducing power of *Sargassum viscozyme* hydrolyses

	0.1 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml
DPPH (%)Abs	13.01 \pm 3.30 ^b	28.35 \pm 3.21 ^a	54.76 \pm 1.08 ^a	81.23 \pm 1.00 ^a	91.20 \pm 1.29 ^a	97.02 \pm 3.98 ^a
ABTS (%)Abs	2.06 \pm 1.29 ^b	19.88 \pm 0.79 ^a	58.70 \pm 1.16 ^a	84.66 \pm 1.04 ^a	88.69 \pm 0.26 ^a	88.52 \pm 0.15 ^a
Reducing power Abs	0 ^b	0.17 \pm 0.003 ^a	0.61 \pm 0.001 ^a	0.84 \pm 0.003 ^a	0.85 \pm 0.001 ^a	0.87 \pm 0.006 ^a
Trolox Abs				85.06 \pm 0.11		

Data in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

(三) 抗致突變性試驗

馬尾藻酵素水解樣品於測試濃度範圍 (1 - 5 mg/plate) 內，對 *S. typhimurium* TA100 及 98 菌株於致突變劑 (4-NQO) 及 sodium azide (SA) 存在下，依其百分率計算結果樣品抗致突變百分比高於對照組，抗致突變效果除了 *S. typhimurium* TA100 未添加 S9 組外，其餘皆隨著樣品濃度的上升，抗致突變效果也越好，所以具有抗致突變效果 (Table 3)。

三、抗氧化活性分析

DPPH、ABTS 自由基清除活性及還原力，隨著濃度上升而增強。在濃度 20 mg/ml 時 DPPH 自

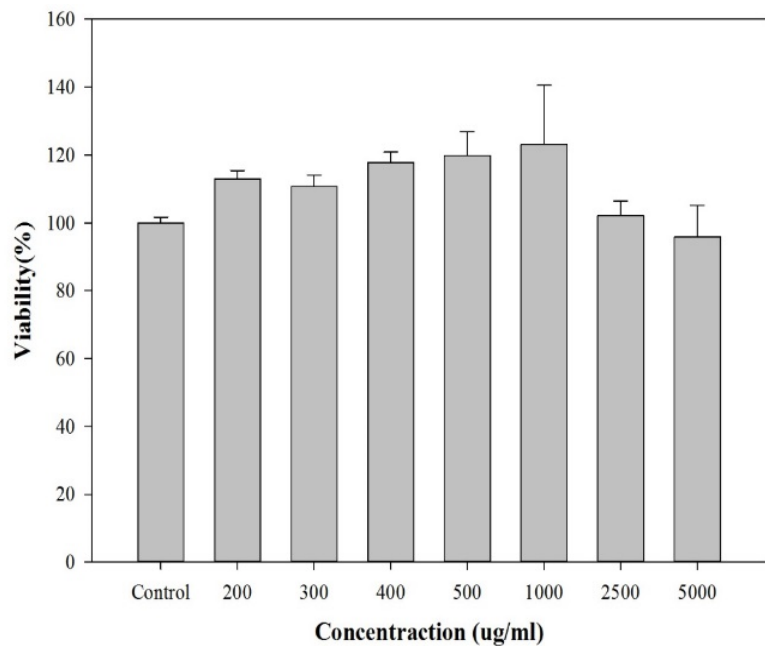
由基清除活性為 97.02 \pm 3.98%，ABTS 自由基清除活性 88.52 \pm 0.15%，還原力試驗為 0.872 \pm 0.006，結果與標準品 Trolox 相比較，在濃度 10 mg/ml 時，其抗氧化效果相近，可見馬尾藻酵素水解物具有良好抗氧化效果 (Table 4)。

四、抗菌活性試驗

馬尾藻酵素水解物擴散法抑菌圈 在 (*E. c*) 大腸桿菌最好，濃度 50 mg/ml 可達 29 mm，其次是 (*S. e*) 表皮葡萄球菌、(*B. s*) 枯草桿菌及 (*S. a*) 金黃色葡萄球菌，抑菌圈都有 24 mm 以上，抑菌效果都很好 (Table 5)，通常海藻抗菌活性以革蘭氏陽性菌較易受到抑制，許多藻類萃取液抗菌研究也顯示對格蘭氏陽性菌之生長較具抑制作用

Table 5 The inhibition zone and minimum inhibitory concentration of the *Sargassum viscozyme* hydrolyses

Concentration mg/ml	<i>B. cereus</i> ^a	<i>B. subtilis</i> ^b	<i>E. coli</i> ^c	<i>S. aureus</i> ^d	<i>S. epidermidis</i> ^e	<i>V. parahaemolyticus</i> ^f
	DD ^g	DD	DD	DD	DD	DD
50	19	25	29	24	26	15
25	12	22	25	20	22	10

^aBCRC10603 *Bacillus cereus*^bBCRC10447 *Bacillus subtilis*^cATCC25922 *Escherichia coli*^dBCRC15290 *Staphylococcus aureus*^eBCRC11030 *Staphylococcus epidermidis*^fBCRC10806 *Vibrio parahaemolyticus*^gDiameter of inhibition zone including well diameter of 8 (mm).**Fig. 1** MTT assay of the *Sargassum viscozyme* hydrolyses to RAW 264.7.

(Jain *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2007), 原因為格蘭氏陰性菌具脂多醣外膜及細胞壁構造，會對抗外來物質 (Faik *et al.*, 2008; Hayouni *et al.*, 2007)，而本試驗馬尾藻萃取物對大腸桿菌抑制較佳，可能具有海藻特殊之抗菌性質。

五、馬尾藻酵素水解物老鼠巨噬細胞之 MTT 試驗

為探討馬尾藻酵素水解物是否對 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞的存活率造成影響，因此先進行 MTT 分析，以避免所使用之樣品對 RAW 264.7 產生毒性而影響 LPS 所誘導 NO 的生成。以不同濃度的馬尾藻酵素水解物與控制組培養基培養之

RAW 264.7，經計算後得知 RAW 264.7 與樣品一起隔夜培養之存活率 (Fig. 1)。所有樣品之細胞存活率皆沒有顯著性差異，且存活率幾乎都達 80% 以上，結果顯示當酵素水解物之濃度上升時，不會對巨噬細胞造成毒性傷害，證明其為安全無毒之萃取物。

六、馬尾藻之巨噬細胞 NO 試驗

利用馬尾藻酵素水解物與 LPS 共同處理 18 hr 後，馬尾藻酵素水解物濃度為 200、400、500、1000、2500、5000 $\mu\text{g/ml}$ ，與對照組 LPS (濃度 100 $\mu\text{g/ml}$) 一氧化氮生成量 $41.08 \pm 1.07 \mu\text{M}$ 相比較，馬尾藻酵素水解物在 500 $\mu\text{g/ml}$ 以上，隨著濃度的增加而

Table 6 The proximate composition (%) of *Sargassum* feed formulations

Seaweed feed Ingredient (%)	0	1	2	3	4
Fish batter (mackerel)	43.75	42.08	40.75	39.75	38.42
Eel powder	54.25	54.25	54.25	54.25	54.25
Multivitamin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Minerals	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Sargassum</i> spp. powder	0	1.00	2.00	3.00	4.00
Water	0	0.67	1	1	1.33
Proximate composition (%)					
Moisture	33.85±0.57 ^a	34.51±0.27 ^a	33.85±0.45 ^a	33.61±0.40 ^a	33.80±0.77 ^a
Ash	9.17±0.07 ^b	9.29±0.14 ^{ab}	9.54±0.20 ^{ab}	9.64±0.14 ^a	9.67±0.22 ^a
Crude protein	33.94±0.38 ^a	33.96±0.42 ^a	33.68±0.16 ^a	33.76±0.16 ^a	33.80±0.38 ^a
Crude fat	6.69±0.13 ^a	6.69±0.05 ^a	6.39±0.07 ^{ab}	6.21±0.23 ^b	6.35±0.11 ^{ab}
Total calories (kcal/100 g)	261.41	258.29	258.40	258.05	260.26

Data in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

增加 NO 抑制效果。樣品濃度在 5000 $\mu\text{g/ml}$ ，NO 生成量即降至 $23.61 \pm 0.41 \mu\text{M}$ (Fig. 2)。

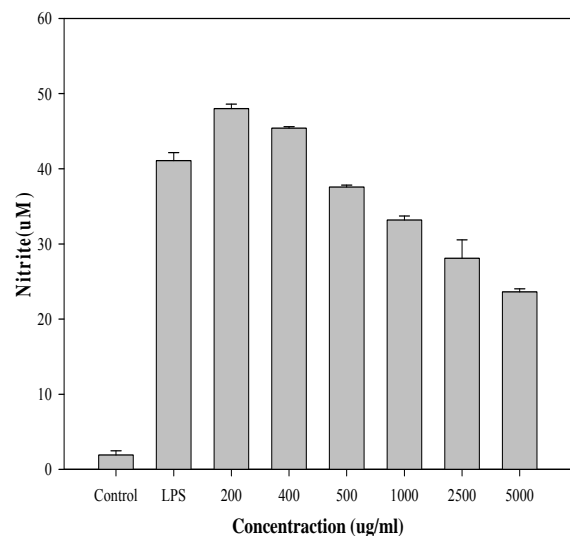


Fig. 2 Effects of the extracts of *Sargassum viscozyme* hydrolyses on LPS-induced NO production in RAW 264.7.

七、海藻飼料添加試驗

(一) 豹鱈飼養試驗

試驗期間水質檢測為水溫 25.2 - 29.4 $^{\circ}\text{C}$ ，鹽度 31.1 - 34.4 psu，溶氧量 6.2 - 8.68 ppm，pH 值

7.75 - 8.33，根據一般海水養殖規範，皆在容許範圍內。

馬尾藻飼料配方及一般成分分析如 Table 6。馬尾藻飼料 0 - 4% 添加，一般成分分析：水分 33.61 - 34.51%，灰分 9.17 - 9.67%，粗蛋白 33.76 - 33.96%，粗脂肪 6.21 - 6.69%，熱量 258.05 - 261.41 kcal/100 g，添加 0 - 4% 馬尾藻飼料各組間數據相近，無明顯差距 (Table 6)。

餵食不同含量馬尾藻配方 8 週後，豹鱈體重、體長、BMI 及肥滿度，以及其增重率、飼料轉換率、蛋白質利用效率和每日成長率，在各組間皆無顯著差異 (Tables 7, 8)。另，豹鱈魚肉之水分、灰分及粗蛋白，在各組間也無差異，僅添加 2% 及 4% 馬尾藻組粗脂肪含量較高 (Table 9)。

飼料中添加馬尾藻經 8 週餵養試驗，豹鱈腸道微生物菌相測定結果如 Table 10。乳酸桿菌以添加馬尾藻 1 及 3% 較高，大腸桿菌群以無添加馬尾藻組較高。乳酸桿菌與大腸桿菌比值，添加馬尾藻組均優於對照組，顯示馬尾藻添加有利於改善豹鱈腸道菌相。

(二) 豹鱈之非特異性免疫反應影響

1. 血清總蛋白質、白蛋白及球蛋白測定

Table 7 Body weight (BW), body length (BL), body mass index (BMI), and condition factor (CF) of *Plectropomus leopardus* fed with different *Sargassum* feed formulations for 8 weeks

<i>Sargassum</i> spp. powder content (%)	BW (g)	BL (mm)	BMI ¹	CF ²
0	136.30±16.50	210.71±8.01	3.02±0.21	2.43±0.13
1	136.29±15.85	209.91±7.79	3.04±0.24	2.49±0.14
2	136.93±12.44	209.64±7.13	3.07±0.16	2.49±0.12
3	127.15±11.36	204.21±7.52	2.87±0.18	2.40±0.11
4	136.28±13.83	207.25±7.58	2.99±0.24	2.48±0.12

¹BMI = weight gain/g protein consumed.²CF = Final weight / Initial weight/ Days of experiment**Table 8** Weight gain (WG), feed conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER), and specific growth rate (SGR) of *Plectropomus leopardus* fed with different *Sargassum* feed formulations for 8 weeks

Seaweed content (%)	WG (%) ¹	FCR ²	PER ³	SGR ⁴
0	88.97±13.89	1.81±0.13	1.63±0.11	1.13±0.18
1	89.02±17.97	1.82±0.20	1.69±0.18	1.13±0.23
2	90.95± 9.83	1.76±0.13	1.69±0.12	1.15±0.12
3	68.81±17.42	2.23±0.45	1.36±0.25	0.88±0.22
4	80.97±6.35	1.92±0.06	1.54±0.05	1.03±0.08

¹WG = 100 x (Final body weight-Initial body weight)/ Initial body weight²FCR = 100 x Feed intake/ (Final body weight – Initial body weight)³PER = weight gain/g protein consumed⁴SGR = Ln (Final weight / Initial weight)/Days of experiment**Table 9** The proximate composition (%) of muscle of *Plectropomus leopardus* meat after being fed with different *Sargassum* feed formulations for 8 weeks

Seaweed content (%)	Moisture	Ash	Crude protein	Crude fat
0	77.82±0.59 ^a	1.29±0.68 ^a	21.00±0.18 ^a	0.44±0.21 ^b
1	77.70±0.34 ^a	1.70±0.12 ^a	21.08±0.49 ^a	0.31±0.15 ^b
2	77.69±0.62 ^a	1.42±0.15 ^a	20.93±0.23 ^a	0.95±0.09 ^a
3	77.92±0.21 ^a	1.47±0.10 ^a	21.05±0.07 ^a	0.49±0.08 ^b
4	77.88±0.16 ^a	1.50±0.16 ^a	20.68±0.09 ^a	0.97±0.10 ^a

Data in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

白蛋白 (albumin) 和球蛋白 (globulin) 的比值, 是反應肝細胞合成蛋白質能力的一個試驗, 對於瞭解肝臟合成能力有很重要的意義。血清蛋白濃度常被用於幫助診斷肝、胃腸道和腎臟等方面疾病和身體的營養狀態。血清的蛋白主要是白蛋白和球蛋白。一般來說, 白蛋白濃度都大於球蛋白, 如果白蛋白與球蛋白的比值小於 1 時, 就必須

注意是否有慢性肝病的可能。

餵食不同含量馬尾藻配合飼料 8 週後, 豹鱸血清中之總蛋白質、白蛋白與球蛋白含量如 Table 11。白蛋白與球蛋白比值, 添加馬尾藻 1、2 及 4% 各為 1.04、1.24 及 1.34 為正常, 添加馬尾藻 0 及 3% 組, 其比值較低為 0.78 及 0.47。

Table 10 Effect of *Sargassum* feed formulations on intestinal microflora in *Plectropomus leopardus*

Seaweed content/ Ileum (Log ₁₀ CFU ^{-g})	0 %	1 %	2 %	3 %	4 %
Aerobe bacteria	5.01±0.15 ^{ab}	4.91±0.15 ^b	3.25±0.04 ^d	5.25±0.06 ^a	4.38±0.11 ^c
Anaerobic bacteria	3.98±0.47 ^b	5.14±0.08 ^a	2.58±0.14 ^c	4.28±0.22 ^b	3.79±0.06 ^b
Lactobacillus	2.84±0.19 ^b	3.20±0.03 ^a	2.78±0.05 ^b	3.29±0.19 ^a	3.01±0.05 ^{ab}
Coliform	5.03±0.20 ^a	4.21±0.05 ^b	4.33±0.01 ^b	4.14±0.04 ^b	4.40±0.47 ^b
Lactobacillus/Coliform ratio	0.57±0.06 ^c	0.76±0.00 ^{ab}	0.64±0.01 ^{bc}	0.79±0.04 ^b	0.69±0.06 ^{ab}

Data in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 11 Levels of serum total protein, albumin, and globulin of *Plectropomus leopardus* after being fed with different *Sargassum* feed formulations for 8 weeks

Seaweed content (%)	Total protein (mg/ml)	Albumin (mg/ml)	Globulin (mg/ml)
0	37.97±0.58 ^a	16.68±3.16 ^{ab}	21.29±3.73 ^a
1	26.54±0.52 ^c	13.70±0.00 ^b	13.14±0.18 ^b
2	30.91±0.29 ^b	17.09±0.62 ^a	13.82±0.36 ^b
3	30.32±0.73 ^b	9.76±0.23 ^b	20.56±0.96 ^a
4	29.40±0.63 ^b	16.82±3.69 ^b	12.58±3.14 ^b

Data in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

2. 抗蛋白酶活性、溶菌酶活性及呼吸爆測定

抗蛋白酶活性以未添加海藻組較添加海藻組高，結果顯示有添加海藻粉的處理組與控制組相比較，豹鱸血清中抗蛋白酶活性以馬尾藻 3% 添加效果較好，可有效提升抗蛋白酶的活性。

溶菌酶是魚類免疫系統組成的重要部份，可水解細菌的細胞壁造成溶菌，它也被稱為調理素或吞噬細胞 (Divyagnaneswari *et al.*, 2007)。溶菌酶可以當作是非特異性免疫的調節者，它可以抵抗寄生蟲、微生物以及各種感染源 (Yano, 1996)。溶菌酶在血液中的濃度會因外來物質的感染、入侵而增加 (Siwicki and Studnicka, 1987)。血清或黏液中的溶菌酶對於魚類來說是一個重要的殺菌劑 (Grinde, 1989)。豹鱸血清中溶菌酶活性以海藻 4% 添加較佳，可提高豹鱸免疫力。

吞噬細胞在抗菌防禦中扮演重要角色，他們會產生許多活性氧物質及其衍生物來殺菌，而超氧陰離子 (O₂⁻) 為第一個產生的物質，因此用來作為呼吸爆的指標 (Ellis, 1999)。超氧陰離子的濃

度已被認定可作為評估呼吸爆強度 (Misra *et al.*, 2006)。本實驗結果顯示有添加海藻粉的處理組與控制組相比較差異不大，但以添加 2% 海藻粉組呼吸爆較佳 (Table 12)。

結論與建議

藻類除了做為蛋白質營養價值的替代物外，也是魚飼料作為脂肪源的一個重要貢獻 (Nakagawa *et al.*, 1987)。馬尾藻為澎湖地區數量較多的藻類之一，具有良好抗菌及抗氧化功能 (Lin *et al.*, 2012)，不具毒性且有抗發炎功效。以 1-4% 馬尾藻粉末添加於豹鱸飼料中，其成長及魚肉一般成分各組間幾乎沒有差異。馬尾藻酵素水解物隨著濃度的增加而增加 NO 抑制效果。與謝 (2012) 馬尾藻多醣作用細胞 24 hr 可抑制 64.77% NO 產量結果相似，具有抗發炎的效果。腸道微生物菌相，馬尾藻添加可有效減少豹鱸腸內壞菌大腸桿菌含量及增加好菌乳酸桿菌含量。豹鱸血液免疫指數分析結果顯示，以馬尾藻酵素水解粉未添

Table 12 Levels of serum antiprotease activity, lysozyme activity, and respiratory burst of *Plectropomus leopardus* after being fed with different *Sargassum* feed formulations for 8 weeks

Seaweed content (%)	Antiprotease activity (%)	Lysozyme activity (U/ml)	Respiratory burst
0	51.72±0.88 ^c	7.68±1.10 ^b	0.23±0.046 ^{ab}
1	43.29±1.17 ^d	7.61±3.76 ^b	0.23±0.017 ^{ab}
2	60.84±0.30 ^b	8.97±2.11 ^{ab}	0.24±0.002 ^a
3	70.46±0.42 ^a	8.15±1.11 ^b	0.23±0.020 ^{ab}
4	52.83±1.07 ^c	11.12±0.95 ^a	0.19±0.018 ^b

Data in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

加 2 及 4% 較佳，但基於成本考量及其效益，建議以 2% 添加為最好，可提高豹鱸免疫力，增加魚隻非特異性免疫功能。

利用馬尾藻添加於飼料中，可開發本土飼料與優質配方，降低進口原料衝擊且提昇飼料效率。目前許多國家都建有海藻飼料加工廠，儘管現代農業及飼養技術大為發展，但海藻飼料的加工利用仍蓬勃發展，甚至有的科學家預言，未來海藻可能成為一種最廉價的飼料資源。因此，有關海藻應用於水產養殖之潛力值得關注。

參考文獻

- 劉永綱 (2003) 用海藻做飼料. 飼料營養雜誌, 4: 19-25.
- 何書廷, 黃美瑩, 林金榮 (2013) 點帶石斑血液中白血球分離技術探討. 水試專訊, 41: 9-12.
- 謝孟宸 (2012) 以細胞模式評估馬尾藻抗發炎及抗前列腺癌活性. 國立臺灣海洋大學 碩士論文摘要.
- Alexis, M. N. (1997) Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. *In* Feeding Tomorrow's Fish Cahiers Options Méditerranéennes (A. G. J. Tacon and B. Basurco eds.), Zaragoza, CIHEAM, 22: 183-204.
- Appler, H. N. (1985) Evaluation of *Hydrodictyon reticulatum* as protein source in feeds for *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *J. Fish Biol.*, 27: 327-334.
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 29:1199-1200.
- Bowden, T., R. Butler, I. R. Bricknell and A. E. Ellis (1997) Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 377-385.
- Buschmann, A. H., J. A. Correa, R. Westermeier, M. Hernández-González and R. Norambuena (2001) Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture*, 194: 203-220.
- Davies, S. J., M. T. Brown and M. Camilleri (1997) Preliminary assessment of the seaweed *Porphyra purpurea* in artificial diets for thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*). *Aquaculture*, 152: 249-258.
- Divyagnaneswari, M., D. Chistybapita and R. D. Michael (2007) Enhancement of non-specific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. *Fish Shellfish Immunol.*, 23: 249-259.
- Ellis, A. E. (1999) Lysozyme assays. *In* Techniques in Fish Immunology: Fish Immunology Technical Communication I (J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. B. Muiswinkel eds.), SOS Publication, Fair Haven, NJ, USA., 101-103 pp.
- El-Sayed, A. F. M. (1994) Evaluation of soybean meal, Spirulina meal and chicken offal meal as protein sources for silver seabream (*Rhabdosargus sarba*) fingerlings. *Aquaculture*, 127: 169-176.
- Faik, A. A., H. A. Sema, A. K. Sengul, G. Jiri, V. Katerina, U. Jitka and S. Miroslav (2008) Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chem.*, 107: 19-25.
- Fabregas, J., D. García, M. Fernandez-Alonso, A. I. Rocha, P. Gómez-Puertas, J. M. Escribano, A. Otero and J. M. Coll (1999) In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antivir. Res.*, 44: 67-73.
- Grinde, B (1989) Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent

- against fish pathogens. *J Fish Dis* 12: 95-104.
- Hayouni, E. A., M. Abedrabba, M. Bouix and M. Hamdi (2007) The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.*, 105: 1126-1134.
- Hwang, P. A., C. H. Wu, S. Y. Gau, S. Y. Chien and D. F. Hwang (2010) Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*. *J. Mar. Sci. Tech.*, 18: 41-46.
- Hwang, P. A., S. Y. Chien, Y. L. Chan, M. K. Lu, C. H. Wu, Z. L. Kong and C. J. Wu (2011) Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 2062-2068.
- Jain, N., M. E. Light and J. Van. Staden (2008) Antibacterial activity of hairy-root cultures of *Maytenus senegalensis*. *S. Afr. J. Bot.*, 74:163-166.
- Kornegay E.T., C.R. Riskey (1996) Nutrient digestibilities of a corn-soybean meal diet as influenced by Bacillus products fed to finishing swine. *J. Anim. Sci.*, 74: 799-805.
- Lahaye, M., J. L. Gomez-Pinchetti, M. J. Rio and G. Garcia-Reina (1995) Natural decoloration, composition and increase in dietary fiber content of an edible marine algae, *Ulva rigida* (Chlorophyta) grown under different nitrogen conditions. *J. Sci. Food Agric.*, 68: 99-104.
- Lin, H. C., W. S. Tsai and T. H. Chiu (2012) Antioxidant Properties of Seven Cultivated and Natural Edible Seaweed Extracts from Taiwan. *J. Aquat. Food Prod. Tech.*, 21: 248-264.
- Maron, D.M. and B.N. Ames (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113, 173-215.
- Misra, C. K., B. K. Das, S. C. Mukherjee and P. Pattnaik (2006) Effect of multiple injections of β -glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish Shellfish Immunol.*, 2: 137-151.
- Nakagawa, H., S. Kasahara and T. Sugiyama (1987) Effect of *Ulva* meal supplementation on lipid metabolism of black sea bream, *Acanthopagrus sclegeli* (Bleeker). *Aquaculture*, 62(2): 109-121.
- Pick, E. and D. Mizel (1981) Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*, 46: 211-216.
- Shan, B., Y. Z. Cai, D. J. Brooks and H. Corke (2007) The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int. J. Food Microbiol.*, 117(1): 112-119.
- Secombes, C. J. (1990) Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *In Techniques in Fish Immunology* (J. S. Stoken, D. P. Fletcher, B. S. Anderson and W. B. Van Muiswinkel eds.), S.O.S Publication, Fair Haven, NJ. 137-152.
- Siwicki, A. K. and M. Studnicka (1987) The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp (*Cyprinus carpio*). *J. Fish Biol.*, 31: 57-60.
- Stasiack, A. S. and C. P. Baumann (1996) Neutrophil activity as a potent indicator of concomitant analysis. *Fish shellfish Immunol.*, 37: 539-542.
- Vijayabaskar, P. and V. Shiyamala (2011) Antibacterial Activities of Brown Marine Algae (*Sargassum wightii* and *Turbinaria ornata*) from the Gulf of Mannar Biosphere Reserve. *Advances in Biological Research*, 5 (2): 99-102.
- Wahbeh, M. I. (1997) Amino acid and fatty acid profiles of four species of macroalgae from Aqaba and their suitability for use in fish diets. *Aquaculture*, 159: 101-109.
- Yano, T. (1996) The nonspecific immune system: humoral defense. In: Iwama G, Nakanishi T (eds) *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Academic Press, San Diego, pp 105-157.
- Zandi, K., S. Ahmadzadeh, S. Tajbakhsh, Z. Rastian, F. Yousefi, F. Farshadpour and K. Sartavi (2010) Anticancer activity of *Sargassum oligocystum* water extract against human cancer cell lines. *Eur. Rev. for Med. and Pharmacol. Sci.*, 14: 669-673.

The Physiological Activity of *Sargassum* spp. Extracts in Aquatic Feed for *Plectropomus leopardus*

Hui-Chiu Lin, Chung-Kang Hsu*, Tzu-Yen Liao, Hsueh-Ching Kao and Kim-Jung Lin

Penghu Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop *Sargassum* enzyme hydrolysis extract powders to be added to the diets of *Plectropomus leopardus* and to assess their effects in terms of antibacterial, antioxidant, and enzyme activity. The results indicated that the *Sargassum* enzyme hydrolysis extracts had good antibacterial and bacteria-inhibiting effects against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Vibrio parahaemolyticus*, as well as high DPPH and ABTS radical scavenging activity. The growth and proximate analysis results of *P. leopardus* fed with diets supplemented with *Sargassum* enzyme hydrolysis extracts were not significantly different from those of fish fed with a control diet. However, *P. leopardus* fed with diets supplemented with *Sargassum* enzyme hydrolysis extracts had optimum intestinal microbial flora. According to a blood immune analysis of *P. leopardus*, the serum protein ratio was better in fish fed with the addition of 1%, 2%, and 4% of the hydrolyzed powder of *Sargassum*. The antiprotease activity was better at 3% and 2% added, and the lysozyme activity was better with 4% and 2% added. In terms of the proximate composition of muscle of *P. leopardus* meat after being fed with *Sargassum* feed formulations for 8 weeks, the level of crude fat was better when the *Sargassum* composition of the diet was 2% or 4%, while there were no significant differences at other composition levels. According to the above findings, better results were achieved when the hydrolyzed *Sargassum* powder composition of the diet was 2% or 4%, but a composition of 2% appeared to be best when the cost and benefits were considered. More generally, the results indicate that diets supplemented with seaweed in aquaculture.

Key words: *Sargassum*, *Plectropomus leopardus*, feed

*Correspondence: Penghu Marine Biology Research Center, Fisheries Research Institute. TEL: (06) 995-3416 ext. 231; FAX: (06) 995-3058; E-mail: dcks0511@ms23.hinet.net