

公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：100105F107

# 行政院農業委員會漁業署九十五年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：952764

計畫名稱：  
(英文名稱) **海藻植物油之研發 (第1年/全程1年)**  
**Development of an algal oil enriched vegetable oil**

計畫編號： 95農科-10.1.5-漁-F1(7)

全程計畫期間： 95年4月7日至95年12月31日  
本年計畫期間： 95年4月7日至95年12月31日

計畫主持人：  
執行機關：  
孫寶年  
國立台灣海洋大學

## 摘要

海藻脂質中富含多元不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty, 其中 eicosapentaenoic acid (EPA)、docosahexaenoic acid (DHA) 具有調節自體免疫、降低攝食者罹患心血管疾病等生理活性；此外，海藻脂質還含有抗發炎及抗癌之含硫醣脂質(Sulfoquinovosylacylglycerols (SQAGs)。依照 94 年度計畫 (藻類稀有高度不飽和脂肪酸之萃取、鑑定與應用, 94AS-12.1.3-FA-F1)，從二十一種藻類篩選出紫菜(*Porphyra crispate*)為最具有潛力之藻油萃取原料；本期計畫將探討紫菜 (*Porphyra crispate*) 油脂最適製程及海藻植物油之研發。

紫菜 (*Porphyra crispate*) 分別以熱風乾燥或冷凍干燥處理後，磨粉至粒徑 200 mesh，萃取油脂；以兩種方式干燥之海藻萃油率 (2.5%) 無顯著差異，但以熱風干燥萃出之藻油，其多元不飽和脂肪酸 (PUFA) 含量 10.12 mg/dry basis，為冷凍干燥者之 82.7%，其中 EPA 之含量為 5.36 mg/dry basis 為凍乾者之 73.9%。藻油中含重要之生理活性成分 Sulfoquinovosylacylglycerols (SQAGs) 約為 42 mg/g oil (4.2%)，其主要脂肪酸組成中，EPA (C20:5, 30%) 及花生四烯酸(C20:4, 12.7%) 共佔 42.7%，棕櫚酸油酸佔(C16:0, 33.3%)、油酸(C18:1, 7.52%) 及硬脂酸(C18:0, 6.83%)。直接以沙拉油萃取紫菜之干燥粉末，可使每克沙拉油含有 EPA 3.38 mg、SQAGs 0.32mg，此方法可避免溶劑之殘留及增加植物油之保健功效；分析藻油及紅藻沙拉油，皆無反式脂肪酸 (18:1 trans-9；18:2 trans-9,12) 存在。利用脂氧合酶之修飾可改善水產油脂中因多元不飽和脂肪酸(PUFA)之氧化而產生之魚腥味；為提高脂氧合酶之儲藏安定性及重覆使用性，發展以褐藻膠包埋部分純化之脂氧合酶，進行固定化，固定化酵素於 4°C 下儲藏安定性可提高 16.6 倍。利用多重固相(multiple solid-phase)萃尿管初步純化之 SQAGs 對肝癌細胞 HepG2 之抑制效果顯著，半抑制濃度(IC<sub>50</sub>)為 125 µg/mL。

## Abstract

Fresh red algae (*Porphyra crispate*) were dried with hot air or frozen-dried and ground to 200 mesh prior to extract. The yields (2.5%) of algal oil of the two dried methods were not different. But the polyunsaturated fatty acids (PUFAs, 10.12 mg/dry basis) and eicosapentaenoic acid (EPA, 5.36 mg/dry basis) contents in hot air dried algal oil are only for frozen-dried 82.7% and 73.9%, respectively. Sulfoquinovosylacylglycerols (SQAGs) separated by multiple solid-phase (SPE) from the algal oil were analyzed for fatty acid composition and the inhibition of proliferation of panel of human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2) were determined. The main fatty acids in SQAGs were palmitic acid (33.3%), eicopentaenoic (C20:5, 30.0%), and arachidonic acid (C20:4, 12.7%), oleic acid (C18:1, 7.52%) and stearic acid (C18:0, 6.83%). SQAGs strongly inhibited the growth of HepG2 cell line. After a 48-h continuous treatment, the IC<sub>50</sub> value for growth inhibition was 125 µg/mL. Salad oil was instead of organic solvent to extract dried algae for avoiding the residue of organic solvent in algal oil. EPA and SQAGs in salad oil increased by 3.38 and 0.32 mg/g oil, respectively. Neither trans acids were detected in the algal oil nor in the algal salad oil. Bing algal oil contains high PUFAs that were the undesirable odor of algal oil. For reducing the undesirable odor of algal oil used lipoxygenase (LOX) to modified oil to produce desirable volatile compounds. The stability of the immobilization of LOX on alginate beads was 16.6-fold greater than that of the unbound lipoxygenase at 4 °C in 0.05 M Tris buffer (pH7.5).

## 目錄

中文摘要 .....	i
英文摘要 .....	ii
一、前言 .....	1
二、材料與方法 .....	2
三、結果與討論 .....	8
四、結論 .....	23
五、參考文獻 .....	24

## 前言

於前期「稀有高度不飽和脂肪酸之萃取、鑑定與應用」(94 農科-12.1.3-漁-F1) 計畫中，已完成東北角海域二十一種海藻之總脂質含量及脂肪酸種類分析，並篩選出皺葉紫菜(*Porphyra crispata*)、角叉藻(*Cbondrus verrucosa*)、蜈蚣藻(*Grateloupia filicina*)、異枝軟骨凹頂藻(*Chondrophycus intermedius*)、紅羽凹頂藻(*Laurencia brongniartii*)、縱胞藻(*Centroceras clavulatum*)、海頭紅(*Plocamium telfairiae*)、小珊瑚藻(*Corallina pilulifera*)、小杉藻(*Chondracanthus intermedius*)、硬盾果藻(*Carpopeltis maillardii*)、小珊瑚藻(*Corallina pilulifera*)，等海藻有潛力成為富含 Eicosapentaenoic acid (EPA) 之藻油原料；經評估產量及取得方便性及大量養殖之可行性)，本期計劃即以皺葉紫菜(*Porphyra crispata*) 作為藻油原料，經冷凍乾燥後磨粉(200 mesh)，提高萃油率，測定 EPA 及生物活性成分 Sulfoquinovosylacylglycerols (SQAGs) 之含量。SQAGs 為含硫之醣脂質(glycerolipid)，廣泛存在於植物、藻類及微生物中，是構成植物葉綠體類囊膜及細菌原生質膜的主要組成成分之一 (Frentzen ., 2004)。SQAGs 具有抗發炎及抗癌細胞增生 (Berge *et al.*,2002 ; Sahara *et al.*, 2002; Bruno *et al.*,2005) 之生理活性，可抑制 DNA polymerases 及 HIV-reverse transcriptase (Loya *et al.*, 1998 ; Ohta *et al.*, 2000; Hanashima *et al.*, 2001; Murakami *et al.* 2002; Matsumoto *et al.*, 2005) 之活性。SQAGs 將有潛力成為抗病毒及抗癌之藥物。本期計劃亦探討萃取 SQAGs 之條件及分析方法，並觀察藻油中分離出之 SQAGs 對肝癌細胞 HepG2 之抑制效果，以強化藻油之保健功效；本計劃另利用脂氧合酶 (LOX) 修飾改善水產油脂因多元不飽和脂肪酸(PUFA) 之氧化而產生之魚腥味 (Hu and Pan., 2000)，但游離態 LOX 之儲藏安定

過 200 mesh 孔徑之篩網，篩得之粉末置於-20°C 備用。

## 2、脂質萃取

以含 0.2%BHT 之 methanol/chloroform (M/C = 1/2 v/v) 30 mL，分次萃取、合併溶劑層，經無水硫酸鈉脫水後減壓濃縮、真空後秤重。

## 3、藻油中 SQAGs 之 TLC 分析

將藻油 10 mg 以乙醚溶解，以脫脂棉塞於玻璃滴管中，吸取樣品液，輕輕塗抹於 TLC(silica gel 60 F<sub>254</sub> 20cm×20cm) 片，以 CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH : CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O (110 : 20 : 15 : 5 v/v/v/v) 為展開液，並刮取展開後之呈色斑點，SQAGs ( Sulfoquinovosyl-acylglycerols )(Rf=0.23) silica gel 於樣品瓶中，以 M/C ( 1:1 v/v ) 將附著於 silica gel 上之化合物洗出，再以 0.22- $\mu$ m PTFE 濾膜過濾，將過濾後之樣品液，減壓濃縮至乾，去除溶劑，計算其回收率，儲存於 -20°C 待用。

## 4、呈色劑之配置

- (1) AzureA：秤取 40 mg Azure A 加入 5 mL 0.05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，以二次水定容至 100 mL，過濾並保存於棕色瓶中。
- (2) Orcinol 試劑：秤取 0.1 g orcinol monohydrate 加入 40.7 mL conc. HCl，add 1ml 1% ferric (III) chloride, and dilute to 10ml Spray and heat at 80°C for 90 minutes. Glycolipids produce violet spots.
- (3) Anthrone 試劑：0.1 g Anthrone 加入 10 mL conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 5、SQAGs 分析

性低無法重覆使用，故本計劃亦探討利用海藻之脂氧合酶，將之固定化之最適條件，期能藉由固定化脂氧合酶修飾海藻油之風味，開發出風味清香之海藻油。

## 材料與方法

### 一、材料

#### 1、海藻

皺葉紫菜(*Porphyra crispata*)採集自東北角海岸，採集時間為九十四年十月至九十五年四月、九十五年十月至十二月。

#### 2、試藥

Sulfoquinovosylacylglycerol ( Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden). AzureA ( Chroma-Gesellschaft, Roboz. Surgical, Washington DC ), Orcinol monohydrate ( Sigma ,St. Louis, MO), Anthrone ( Ferak Berlin GmbH, Berlin ) 均為試藥級。

### 二、方法

#### 1、海藻前處理

採回後之海藻即刻以自來水清洗，挑去雜物後放入洗衣袋中置入脫水機脫水 20 分鐘，脫水後以剪刀剪碎；取 300 克平鋪至鐵盤中，放入 -80°C 冷凍，再置入冷凍乾燥機（金鳴 FD6-12 Liters, 台北, 台灣）中乾燥（100 millitorr ， 25°C ），三天後，取出秤重。凍乾之海藻以磨粉機（佑崎 D3V-10-2HP,彰化,台灣）磨成粉末後，

SQAGs 樣品分別加入 C/ M (chloroform /methanol/ =1/1 v/v) 5 mL、0.05M 硫酸溶液 5 mL 及 azure A 溶液 1 mL，搖勻一分鐘後，置於離心機 (KUBOTA 2100, Fujioka, Japan) 內，以 3000 rpm 離心五分鐘，移除上層(水層)後，保留下層(氯仿層)作波長掃描(700-600 nm)及測吸光值(Hitachi U-2000 spectrophotometer ,Tokyo, Japan)( Li *et al.*,2001 ; Tadano *et al.*,2001 )。

SQAGs 標準曲線之製作：

取 SQDAs 標準品 ( 10、20、30、40、50 $\mu$ g ) 分別以 SQAGs 分析方法於 652 nm 下測吸光值，得不同濃度標準品之吸光值，並作圖。

## 6、SQAGs 之分離方法

參照 Rizov and Doulis ( 2001 ) 方法，取藻油 1 克放入 aminopropyl 固相萃取管中 ( aminopropyl SPE 500 mg, from SULPCO, Bellefonte, PA, U.S.A )，以 4 mL 溶劑 ( chloroform : actone 4 : 1 ) 於 4°C 下流洗，此步驟可去除大部分色素，流洗完後於 aminopropyl 固相萃取管後再串聯一支相同之 aminopropyl 固相萃取管，並以混合溶劑 ( chloroform : actonitrile : propan-2-ol : methanol : methanolic 0.1M ammonium 1: 1 : 3 : 5 : 0.5 ) 5 mL 流洗，流洗液中主要為成分即為 SQAGs。

## 7、人類肝癌細胞株 HepG2 存活率試驗 ( MTT assay )

MTT 是一種 tetrazolium salt，全名是 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl ) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide，為一種黃色染劑，他可被活細胞吸收並被粒線體( mitochondria )中的 succinate tetrazolium reductase 還原成一種藍紫色不溶於水的 formazan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-formazan 結晶體，其藍紫色不溶於水的 formazan 結晶體



於 570nm 有最大吸光值，常用於檢測藥物對細胞的生長及存活的影响 (Plumb *et al.*, 1989)。

本研究取對數生長其之 HepG2 細胞離心 (430×g) 5 分鐘，取沉澱之細胞以細胞計數器技數後，將細胞濃度調為  $2 \times 10^5$  cell/ml，再將調整過的細胞培養液注入 96 孔培養盤中 (100  $\mu$ l/well)，培養於 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 4 個小時，接著吸掉培養液加入 120 $\mu$ l 以經過稀釋各個不同濃度的蜆分離物，於 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱中 48 個小時，最後加入 MTT (1mg/ml) : yolk lipoprotein (YLP) : PBS buffer = 1 : 1 : 8 之混合液 100  $\mu$ l，於 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱中反應 4 個小時，測其 570nm 之吸光值，並計算細胞之殘存率。

$$\text{細胞殘存率 ( \% )} = (\text{As}-\text{Ab}) / (\text{Ac}-\text{Ab}) \times 100\%$$

As : 樣品組之吸光值、Ac : 控制組之吸光值

## 8、脂肪酸分析

### (1) 脂肪酸甲酯化

參照 A.O.A.C (1995) 的方法進行脂肪酸的甲基酯化。取藻油 0.01g 與內標準品 0.1 mL (C<sub>13:0</sub>, 20 mg/mL) 混合，加入 0.5 N NaOH/methanol 2 mL，於沸水中迴流 10 分鐘，以 14 % BF<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 3 mL 迴流 2 分鐘，heptane 2 mL 迴流 2 分鐘，再添加飽和 NaCl 溶液，靜待分層，冷卻後取上層液，經無水硫酸鈉脫水過濾，再以氮氣吹乾，加入 0.1 mL hexane 溶解甲基酯化的油脂。

### (2) 氣液相層析儀分析脂肪酸條件

酯化的脂肪酸以氣液相層析儀 (Shimadzu GC-14A, Kyoto, Japan) 分析。液相為 Rtx-2330 (90% biscyanopropyl 10% cyanopropylphenyl polysiloxane, RESTEK, Bellefonte, PA, U.S.A) 毛細管柱 (30 m ×

0.25 mm I.D.)，遞送氣體為氮氣，流速為 3 mL/min。初溫為 130 °C，以 4 °C/min 線性升溫至 230 °C 後保持 10 分鐘，注射器及 FID 偵測器溫度均為 250 °C。以脂肪酸 C13:0 (Nu-Chek, Elysian, MI, U.S.A) 為內標準品，與脂肪酸標準品 (GLC-461, Nu-Chek) 之氣液相層析圖譜的滯留時間比對定性，並與內標準品的尖峰面積比對，定各脂肪酸之含量。

### (3) 層析數據處理

使用訊華股份有限公司「色層分析數據處理系統」(Chromatography Data System)，分析脂肪酸層析圖譜。

## 9、紅藻沙拉油之製備

實驗方法：紫菜(*Porphyra crispata*)、經冷凍乾燥後，磨粉並過 200mesh 篩網，分別取此粉末 5 g，放於樣品瓶內，加入 10 g 大豆沙拉油及磁石後充入氮氣並密封瓶口，放入超音波洗淨器中震盪 1 小時，再於攪拌器上攪拌 2 天，過濾後即得海藻沙拉油。

## 10、固定化海藻脂氧合酶之製備及活性測定

### (1) 固定化 LOX 的製備

參考李 (2006) 的方法修改，取純化之石蓴脂氧合酶溶液 10 mL (0.5 mg/mL) 與 0.2 g 褐藻酸鈉 sodium alginate 混合均勻。再將混合液以小型定量幫浦(Pharmacia LKB-Pump P-1)滴入 0.2 M CaCl<sub>2</sub> 50 mL 溶液中，形成珠粒 (直徑約 0.2 cm) 攪拌 1 小時後，使 alginate 完全形成膠體，經過濾器，得到珠粒，以 0.05M Tris 緩衝液 (pH 7.5) 10 倍體積清洗，將表面之氯化鈣清洗乾淨，即為

固定化之脂氧合酶。

## (2) 固定化 LOX 活性之測定

參考侯 (2001) 的方法，取固定化之海藻脂氧合酶 1 g，加入含 0.02% Tween 20 之 0.05M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 4.95 mL，與 100 mM 亞麻油酸之乙醇溶液 5  $\mu$ L 混合，放置於恆溫水浴槽 (BT-350R, Yihder, Taiwan)，在 25°C、75 rpm 震盪反應每 5 分鐘，共 3 小時，測  $A_{234nm}$ ，以定氫過氧化物的生成量，至  $A_{234nm}$  達最高，計算固定化脂氧合酶之總活性。

## 11、固定化 LOX 特性之測定

### (1) 操作穩定性 (Operational stability)

取固定化之海藻脂氧合酶 1 g 與 100 mM 亞麻油酸乙醇溶液 5  $\mu$ L 混合，放置於 25 °C 於 100 rpm 震盪反應 20 分鐘後，經過濾分離出含共軛雙烯之產物，測  $A_{234}$  值後，以緩衝液清洗固定化酵素至緩衝溶液於 234nm 不吸光，並重新加入 100 mM 亞麻油酸乙醇溶液，重複上述步驟。以第一次作用所測得的活性訂為 100%，重複使用，測每次固定化脂氧合酶之相對活性。

### (2) 儲存安定性

取固定化之海藻脂氧合酶珠粒 (直徑 0.2 cm)，置於 0.05 M 緩衝液 (pH 7.5)，1:5 (v/v) 之樣品瓶中，儲存於 4 °C，每週各取出一瓶 0.5 g 珠粒與 100  $\mu$ M 亞麻油酸乙醇溶液 5  $\mu$ L 於 25 °C、以 100 rpm 震盪反應 20 分鐘，以每克固定化酵素反應液的  $A_{234nm}$  定為酵素活性。以第一次作用所測得的活性訂為 100%，並每週

測固定化脂氧合酶之相對活性。

## 結果與討論

### 一、海藻萃取條件建立

#### 1、藻種之選擇

於前期計畫中 (94 農科-12.1.3-漁-F1) 已完成東北角海域二十一種海藻總脂質含量及脂肪酸種類分析，其中脂質含量以藻體乾重計算，紅藻含 1.85%~2.35、綠藻 1.54%~2.02%，褐藻為 1.31%~1.96%。海藻多元不飽和脂肪酸含量，紅藻平均  $7.70 \pm 2.77$  mg/g (乾重)、綠藻  $5.37 \pm 2.30$  mg/g (乾重)、褐藻  $3.90 \pm 0.72$  mg/g (乾重)，其中 EPA 含量以紅藻類之  $5.37 \pm 1.63$  mg/g (乾重) 高於綠藻類之  $0.43 \pm 0.3963$  mg/g (乾重) 及褐藻類之  $1.02 \pm 1.02$  mg/g (乾重)；海藻中多元不飽和脂肪酸 n-3 與 n-6 脂肪酸比值 (n3/n6) 紅藻除龍鬚菜 (0.04) 外，其餘比值皆高於 1.75，而綠藻則低於 0.40，褐藻除小海帶 (2.39) 外比值皆低於 0.37。由分析結果顯示紅藻類十三種樣品中除鹿角海蘿 (*Gloiopeltis tenax*) 及龍鬚菜屬 (*Gracilaria*) 外，皆有潛力為富含 EPA 之藻油萃取原料。

但考量萃油時所需大量之海藻及來源之穩定性，於是使用紫菜 (*Porphyra crispate*) 為要藻油研究之來源，因近年來澎湖縣政府已將紫菜養殖列入重點推廣計劃，並將白沙、講美後港北方海域 十二公頃 海域規劃為人工養殖紫菜專業生產區，94 年度產量約 2 公噸 (資料來源：澎湖縣水產種苗繁殖場)。

#### 2、海藻乾燥方式對脂質含量及脂肪酸之影響

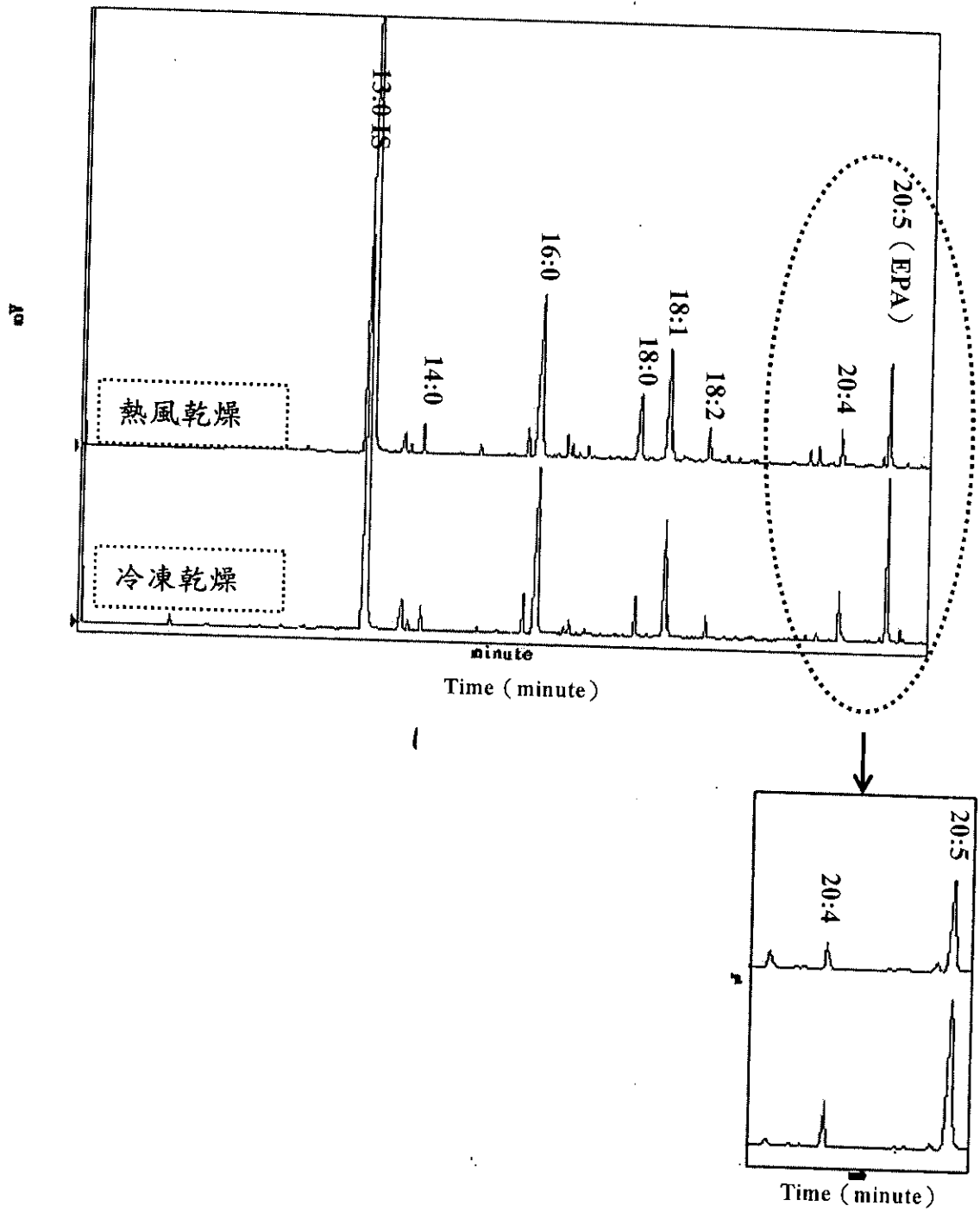
由於海藻本身厚度較薄且經過剪碎，增加其乾燥表面積，故乾燥速率較快，約 2-3 天即可達乾燥恆量狀態，從結果顯示熱風及冷凍乾燥法乾燥後，水分含量皆接近 78% (表一)，可見這兩種方式皆可獲得乾燥程度相似之海藻乾品。兩種方法乾燥後之海藻，磨成粉末後即篩取 200 mesh 以上之細粉，分別萃取分析粗脂肪之含量及作脂肪酸分析比較，結果如表二、表三及圖一。

表一、紫菜 (*Porphyra crispate*) 之水分含量

乾燥	乾燥前重 (g)	乾燥後重 (g)	水分含量 (%)
熱風	100.08	22.01	78.01
冷凍	100.25	21.85	78.20

表二、乾燥方式對紫菜 (*Porphyra crispate*) 萃油率之關係

乾燥方式	萃油率 (%)
熱風	2.51±0.14
冷凍	2.55±0.21.



圖一、藻菜之脂肪酸圖譜

表三、紫菜乾燥法對脂肪酸種類及含量分析表

Fatty acids	熱風乾燥		冷凍乾燥	
	mg/g (dry basis)	%	mg/g (dry basis)	%
Saturated FA	9.27	42.93	9.31	39.10
C14:0	0.36	1.67	0.37	1.55
C16:0	6.41	29.67	6.44	27.00
C18:0	1.26	5.81	1.24	5.22
C21:0	0.28	1.32	0.29	1.21
C22:0	0.97	4.47	0.97	4.08
Monoenoic FA	2.21	10.21	2.27	9.53
C16:1	0.51	2.34	0.55	2.31
C18:1 (cis-9)	1.44	6.65	1.46	6.12
C22:1	0.27	1.23	0.26	1.10
PolyenoicFA	10.12	46.85	12.23	51.35
n6	4.76	22.03	4.99	20.95
C18:2 (cis-9,12)	1.12	5.19	1.07	4.50
C20:3cis-8,11,14)	1.66	7.67	1.70	7.15
C20:4cis-5,8,11,14)	1.98	9.17	2.21	9.30
n3	5.36	24.83	7.25	30.40
C20:5cis-5,8,11,14,17)	5.36	24.83	7.25	30.40
n3/n6	1.13		1.45	
Tatol	21.59		23.81	

由層析圖中明顯可看出，紫菜中高度不飽和脂肪酸 EPA 之波峰，於熱風乾燥條件之下高度明顯低於冷凍乾燥法，並從表三中看出熱風乾燥法中藻之 EPA 含量為 5.36 mg/g 而冷凍乾燥法為 7.52 mg/g，相差約 28.7%；而另一不飽和脂肪酸，花生四烯酸 (20:4) 於熱風乾燥後之含量 (1.98 mg/g)，亦低於冷凍乾燥 (2.21 mg/g)，總體而言熱風乾燥後紫菜中多元不飽和脂肪酸 (PUFA) 含量 (10.12 mg/g) 較凍乾後 (12.23 mg/g) 低，此可能是熱風乾燥過程中，藻中部分多元不飽和脂肪酸氧化，而造成含量之下降。

綜合以上結果可知，兩種乾燥方式之海藻萃油率無顯著差異，但熱風乾燥海藻萃出之藻油，其多元不飽和脂肪酸 (PUFA) 含量，為冷凍乾燥者之 82.7%，其中 EPA 之含量僅為凍乾者之 73.9%；故爾後藻中脂質萃取實驗，新鮮藻體皆以凍乾方式乾燥。

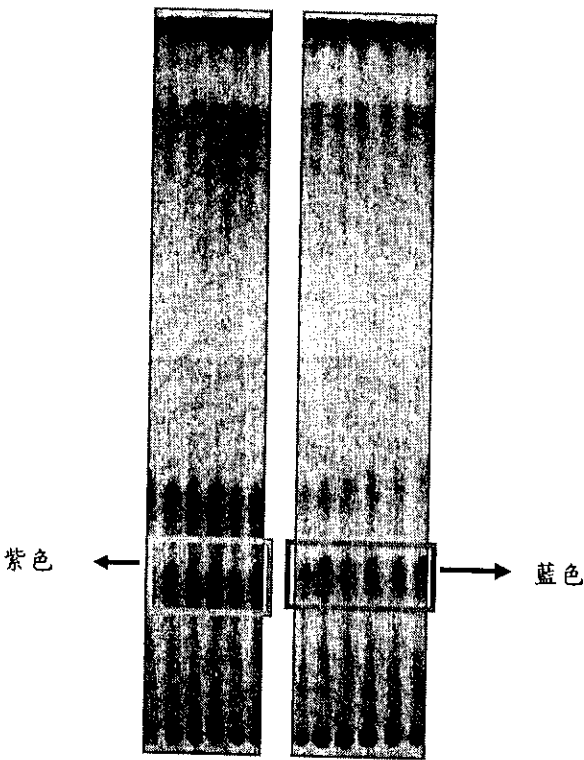
## 二、藻油中機能性成分 Sulfoquinovosylacylglycerols (SQAGs) 之分析

藻油經薄層層析 (TLC) 後，分別以 Orcinol 及 Anthrone 兩種呈色劑顯色；層析板噴以 Orcinol 試劑後，於  $R_f=0.23$  處有紫色斑點產生 (圖二)，此表示化油脂化合物含糖苷鍵 (glycosides)，另以 Anthrone 試劑顯色於相同條件展開之藻油層析板中，則於相同位置 ( $R_f=0.23$ ) 呈藍色斑點 (圖二)，表示此油脂化合物含有醣類，進一步將此斑點 ( $R_f=0.23$ ) 挖下，以 chloroform : methanol (1:1 v/v) 溶出，並與 azure A 試劑反應，反應後於氯仿層中，產生藍色化合物 (圖三)，此乃表示此油脂化合物含有亞硫酸根 ( $-\text{SO}_3^-$ )，由以上結果顯示，藻油利用 TLC 初步純化後於  $R_f=0.23$  處得一含有醣基及亞硫酸根之油脂化合物，此油脂化合物經與 SQAGs (圖四) 標準品比對，其呈色反應及 TLC 上之  $R_f$  值皆相同 (表四)，故確認藻油經 TLC 分析後，層析位置於  $R_f=0.23$  之油脂化合物為 SQAGs。

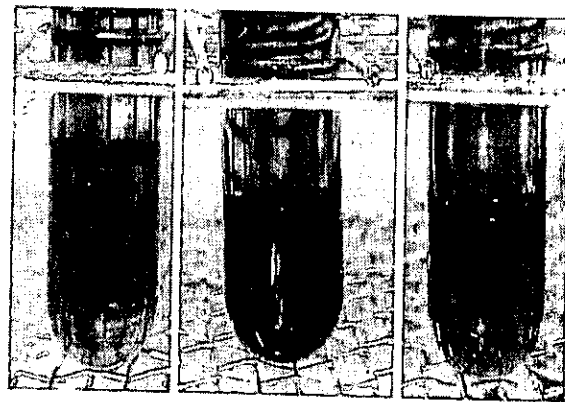


表四、SQAGs 標準品與藻油中油脂化合物 之 TLC 呈色反應

	Rf	Orcinol	Anthrone	azure A
SQDAs 標準品	0.23	紫(+)	藍(+)	藍(+)
藻油中油脂化合物	0.23	紫(+)	藍(+)	藍(+)



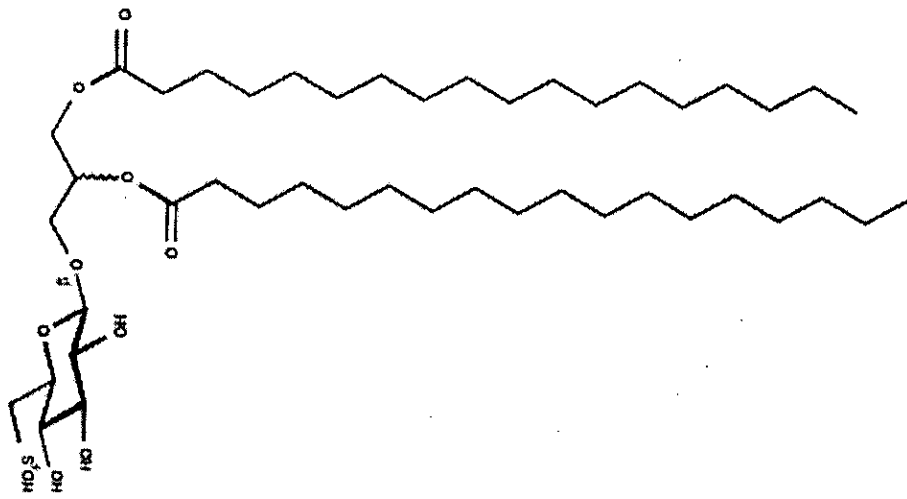
Orcinol 呈色    Anthrone 呈色



Blank    algal oil    SQAGs standard

圖二、藻油薄層層析(TLC)圖

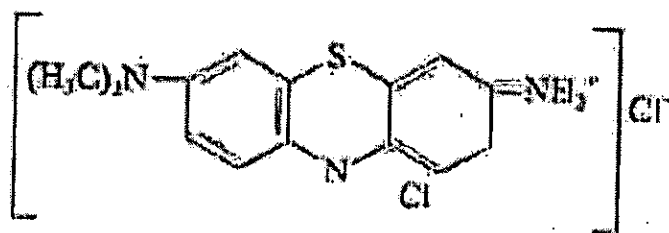
圖三、樣品與 azure A 反應之呈色圖



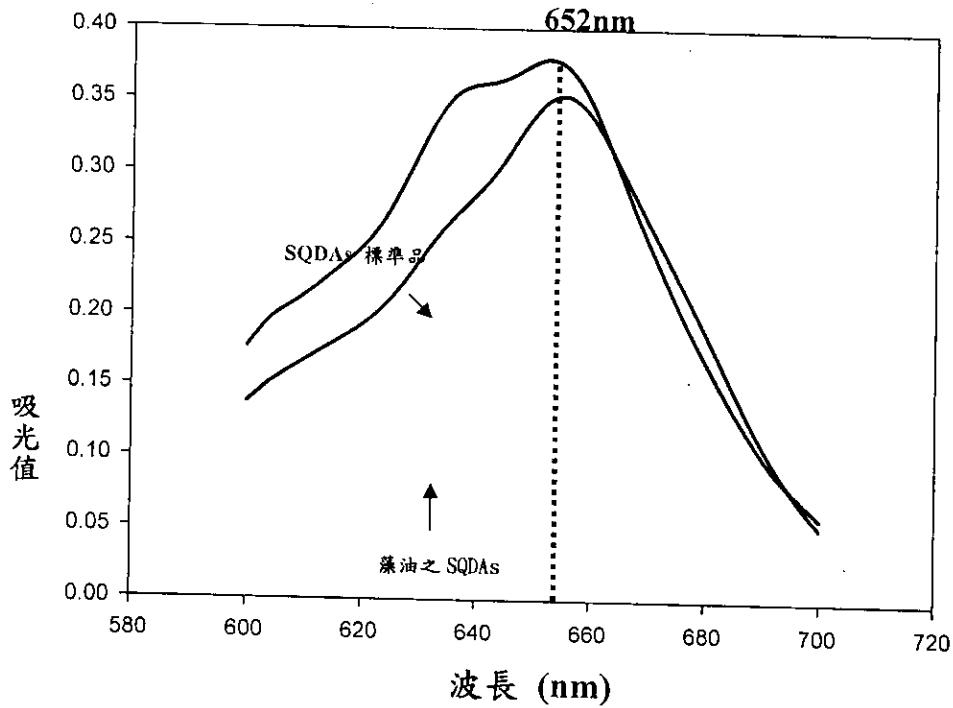
圖四、Sulfoquinovosylacylglycerols(SQAGs)之分子結構圖  
 (1,2-Diacyl-3-(6-sulfo-alpha-D-quinovosyl)-sn-glycerol)  
 (sulfoquinovosyl = 6-deoxy-6-sulfono-glucoside)

### 1、藻油中 SQAGs 之定量

SQAGs 可利用 azure A 方式定量( Li *et al.*,2001 ; Tadano *et al.*,2001 )，azure A 化學結構如圖五，為一種鹼性染料，其上之正電荷可與 SQAGs 的亞硫酸根(-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)負電荷結合，生成易溶於氯仿之藍色複合物，此複合物經波長掃描後(600-700nm)，於波長 652 nm 處有最大吸收波峰(圖六)，而藻油經 TLC 初步純化，並刮取 R<sub>f</sub> 0.23 處之油脂化合物，經 azure A 溶液反應後，經波長掃描，亦可得到與標準品相同之最大吸收波峰(圖六)。



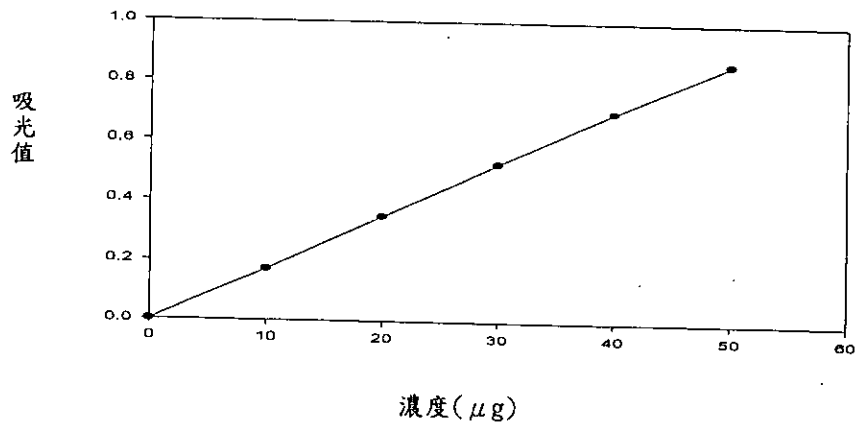
圖五、azure A 之化學結構



圖六、SQAGs 與 azure A 形成之複合物之波長掃描圖

以SQAGs標準品(10、20、30、40、50 $\mu$ g)分別與azure A 溶液反應，並於波長652nm測吸光值，繪製成檢量線如圖七，利用此檢量線定量藻油中SQAGs含量，得藻油中SQAGs含量約為42mg/g oil (4.2%)；而Bergea (2002)曾分析紫球藻 (*Porphyridium cruentum*) 中SQAGs含量約為4.6%；Alonso (1998) 分析三種微藻SQAGs含量，結果等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*) 含量6%、紫球藻 (*Porphyridium cruentum*) 含量5%、三角褐指藻(室內蓄養)(*phaeodactylum tricornutum* (indoor culture))含量2%、三角褐指藻(戶外蓄養)(*phaeodactylum tricornutum* (outdoor culture))含量6%。可見微藻中SQAGs含量約為2-6% 且隨藻種及蓄養環境之不同而有差異，而 SQAGs 之含量亦常受環境之鹽分含量所影響，如海茴香 (*Crithmum Maritimum*) 會隨環境之鹽分提高而增加 SQAGs 之含量( Ben Hamed., *et al* 2005)，長春花(*Catharanthus*

roseus)組織培養液中鹽份從 0 提高到100 Mm，SQAGs含量增加 1.34倍 (Elkahoui *et al.*, 2004)，推測SQAGs在細胞膜上之功用可能與維持植物體滲透壓之平衡有密切之關係(Bavaro *et al.*, 2006)。



圖七、SQAGs 之標準曲線圖

## 2、藻油中 SQAGs 之純化

利用含陰離子 aminopropyl 固相萃取，可吸附油脂中 SQAGs，並利用混合溶劑 (chloroform : acetonitrile : propan-2-ol : methanol : methanolic 0.1M ammonium 1:1:3:5:0.5) 5 mL 流洗，收集流洗液，經減壓濃縮去除溶劑後，所得之樣品以 azure A 方式測定 SQAGs 之含量，其中每 100 mg 純化之樣品中約含 85 mg 之 SQAGs，以此方式可獲得純度約 85%之 SQAGs。此方式雖然簡便，但每次處理藻油量只有 1g，純化量太小，故將繼續開發更大量之純化方式，以便 SQAGs 生物活性之檢測。

## 3、人類肝癌細胞株 HepG2 存活率試驗

藻油經 aminopropyl 固相萃取初步純化之 SQAGs，以 MTT assay

方式分析對人類肝癌細胞株 HepG2 存活率試驗，初步結果 SQAGs 對 HepG2 細胞株之半抑制濃度(  $IC_{50}$  )為  $125\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而文獻中以紫球藻純化出的 SQAGs 對不同癌細胞株 (colon adenocarcinoma DLD-1, breast adenocarcinoma MCF-7, prostatic adenocarcinoma PC-3 cells, and malignant melanoma cells M4-Beu) 進行抑制細胞分化實驗 (Berger *et al*, 2002) 結果對癌細胞抑制細胞分化之  $IC_{50}$  隨癌細胞種類不同而異，範圍介於 20 至  $250\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而對 DNA-polymerase 之半抑制濃度為  $378\mu\text{g}/\text{mL}$ ；綜合以上實驗，藻類中 SQAGs 之生物活性，主要包含有抗腫瘤、抗 HIV 和抗發炎等功效，很有開發潛力。

#### 4、SQAGs 中脂肪酸分析

藻油中 SQAGs 脂肪酸組成如表五，其中飽和脂肪酸(saturated fatty acid) 與單元不飽和脂肪酸 (monoenoic fatty acid) 總合，含量佔總脂肪酸 47.6%，其中脂肪酸種類主要為 C16:0 (33.3%)、C18:0 (6.83%)、C18:1 (7.52%)；而多元不飽和脂肪酸 (poly unsaturated fatty acid, PUFA) 約佔總脂肪酸含量一半以上(52.4%)，其中以 C20:5(EPA)含量最高(33.0%)其次為 C20:4(12.7%)；藻油中 SQAGs 與藻油脂肪酸組成(表二) 比例相似，但其中 C14:0、C22:0 及 C16:1 三種脂肪酸，於 SQAGs 中並未發現。藻油中 SQAGs 之主要脂肪酸組成為 C16:0 (33.3%)、C20:5 (30%)、C20:4(12.7%)、C18:1 (7.52%) 及 C18:0 (6.83%) 與陸生植物(extracted from spinach leaves)以 C18:3 (61%)、C16:0 (28%) C18:2 (6%)、C18:1 (3%) 及 C18:0 (2%) 之組成不同 ( Kuriyama *et al*,2005 ) ；Hanashima (2001)曾將 SQAGs 結構拆成硫酸根、醣基、甘油酯和脂肪酸四部份 (圖四)；探討 SQAGs 結構 對抑制 DNA 聚合酶活

性之影響，結果顯示(1) SQAGs 需有完整之四部份，才有抑制活性 (2) 不同種類糖基及糖苷鍵的類型( $\alpha$ 、 $\beta$ )對抑制活性無明顯差異性(3) SQAGs 上脂肪酸碳數越高，抑制效果越好。由脂肪酸分析結果可知藻油中 SQAGs 含有比例較高之長碳鏈脂肪酸 C20:5 (30%)、C20:4(12.7%)，依照 Hanashima 之研究，其生理活性應比陸生植物之 SQAGs 生物活性高，故可藉由純化之方式來提高藻油中 SQAGs 含量，強化藻油之生理功效。

表五、藻油及藻油中 SQAGs 脂肪酸分析

Fatty acids	藻油		藻油中 SQAGs	
	mg/g	%	mg/g	%
Saturated FA	331	38.8	336	40.1
C14:0	13.5	1.59		
C16:0	236	27.7	279	33.3
C18:0	45.5	5.34	57.2	6.83
C22:0	35.6	4.18		
Monoenoic Acids	73.6	8.63	62.9	7.52
C16:1	20.1	2.36		
C18:1 (cis-9)	53.5	6.27	62.9	7.52
PUFA	448	52.6	438	52.4
n6	183	21.4	151	18.1
C18:2 (cis-9,12)	39.3	4.61	23.4	2.8
C20:3 (cis-8,11,14)	62.4	7.31	21.8	2.61

C20:4 ( cis-5,8,11,14)	81.2	9.52	106	12.7
n3	266	31.2	287	34.3
C20:3 ( cis-11,14,17)	10.2	1.2	10.9	1.3
C20:5 ( cis-5,8,11,14,17)	255	30	276	33
n3/n6	1.4		1.9	
TOTAL	853		837	

### 三、紅藻沙拉油之製備

一般油脂之萃取方式皆以有機溶劑為主，萃出之油脂有溶劑殘留問題，如能以不含 EPA 之植物油，直接萃取富含 EPA 之海藻，不但可改善溶劑殘留之問題，且可藉此修飾植物油，而達保健之功效。實驗中以沙拉油直接萃取紫菜藻粉，所得之海藻修飾油，脂肪酸分析結果如表六。從表六可知，沙拉油之主要脂肪酸為 palmitic acid (16:0)、oleic acid (18:1) 及 linoleic acid (18:2) 其中以 linoleic acid (18:2) 含量最多佔 55.68%，油中並不含有 EPA；而經修飾後之紫菜沙拉油中 EPA 含量為 3.38 mg/g oil，而 SQAGs 含量為 0.32 mg/g oil；此方式可有效提高植物油中 EPA 及 SQAGs 含量，強化植物油之保健功效。

表六、紫菜沙拉油之脂肪酸分析

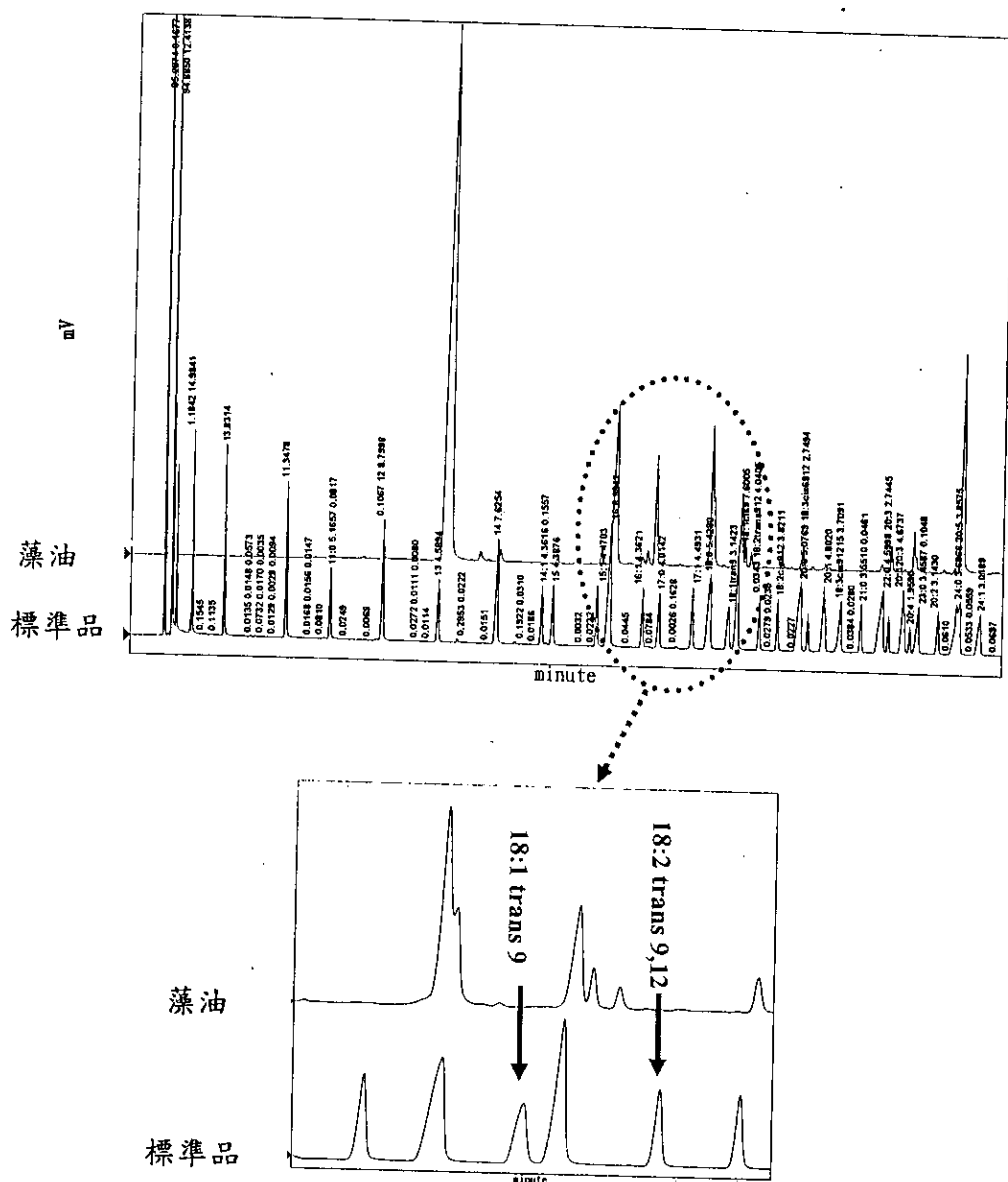
Fatty acids	沙拉油		紫菜沙拉油	
	mg/g	%	mg/g	%
Saturated FA	148.36	15.42	190.69	20.16
C14:0				
C16:0	103.39	10.75	141.02	14.91
C18:0	41.04	4.27	45.71	4.83
C22:0	3.93	0.41	3.97	0.42
Monoenoic Acids	277.98	28.90	271.94	28.75
C18:1	214.96	22.34	205.28	21.70
C20:1	63.02	6.55	66.66	7.05
PUFA	535.66	55.68	483.22	51.09
n6	535.66	55.68	478.85	50.63
C18:2 (cis-9,12)	535.66	55.68	478.44	50.53
C20:4 (cis-5,8,11,14)			1.41	0.15
n3			3.38	0.41
C20:5 (cis-5,8,11,14,17)			3.38	0.4
Total	962.00		945.85	
SQAGs	0		0.32	

#### 四、藻油中反式脂肪酸分析

本實驗室已開發出利用氣液相層析儀，分析反式脂肪酸之方法，即使用 Rt-2560 ( 90% biscyanopropyl 10% phenylcyanopropyl polysiloxane, RESTEK, Bellefonte, PA, U.S.A ) 毛細管柱 (100 m × 0.25 mm I.D.) 為固定相，遞送氣體為氦氣，流速為 6 mL/min。管柱初溫為 130 °C，保持 12 分鐘以 3 °C/min 線性升溫至 240 °C 後保持 20 分鐘，注射器及 FID 偵測器溫度均為 250 °C。以脂肪酸 C13：



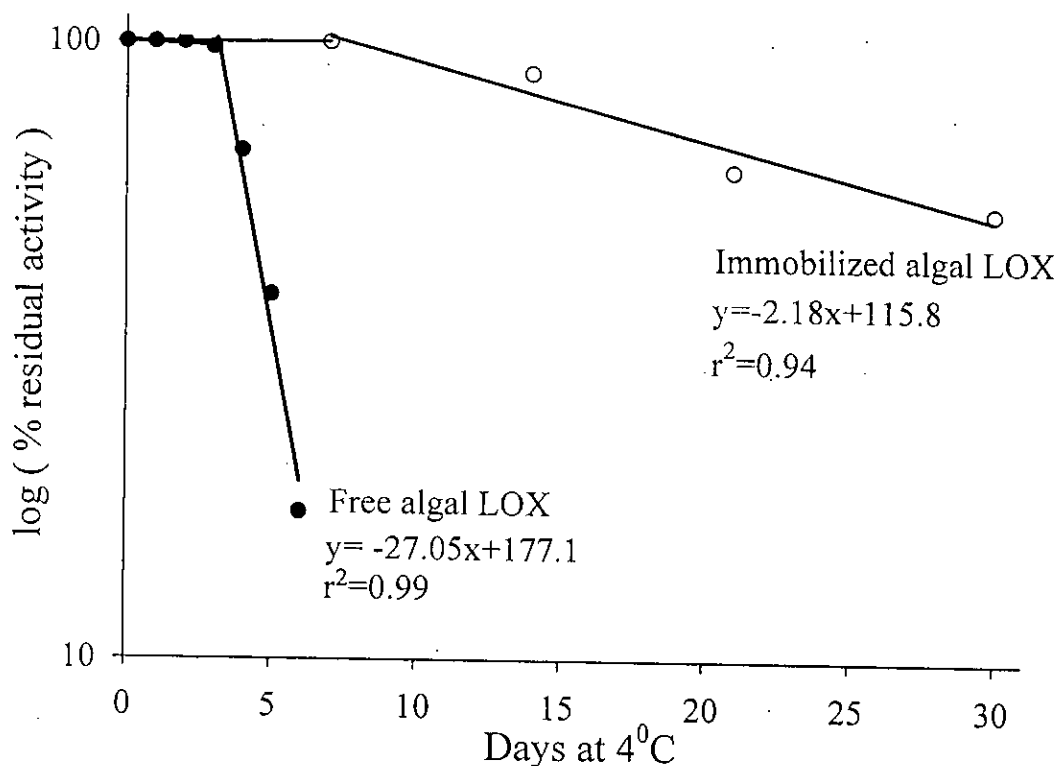
0 ( Nu-Chek, Elysian, MI, U.S.A ) 為內標準品，與脂肪酸標準品 ( F.A.M.E. Mix C4-C24, SUPELCO, Bellefonte, PA, U.S.A ) 之氣相層析圖譜的滯留時間比對定性，並與內標準品的尖峰面積比對，定各脂肪酸之含量。藻油層析圖如圖八，海藻中脂肪酸經與標準品比對，皆無反式脂肪酸 ( 18:1 trans-9 ; 18:2 trans-9,12 )，而經海藻修飾之沙拉油亦不含反式脂肪酸。



圖八、藻油中反式脂肪酸分析

#### 四、藻中脂氧合酶固定化

參照李(2006)方法純化及固定化石蓴脂氧合酶，並探討其儲存安定性；游離態石蓴脂氧合酶 (0.73 mg / mL) 置於 Tris 緩衝液溶 (0.05M, pH 7.5)，並於 4 °C 儲存，其殘餘活性與儲存時間呈半對數關係，儲存第 4 天後，活性快速下降 (圖九)。以回歸方程式計算，脂氧合酶活性下降 90% (a log cycle) 為 2.5 天。固定化脂氧合酶 0.5g (0.89 $\mu$ mole/g beads) 置於相同儲存條件(0.05M, pH 7.5 Tris buffer, 4°C) 其儲存至第 14 天後，酵素活性緩慢失活；以回歸方程式計算，固定化 LOX 活性下降至 90% 時為 41.5 天，顯示 LOX 經固定化後，於 4 °C 儲存時安定性可大幅提高，完成海藻中脂氧合酶固定化及最適條件之探討後，下一步將利用此固定化脂氧合酶之風味修飾，開發出風味更佳之海藻油。



圖九、游離態(0.73 mg / mL)及固定化海藻脂氧合酶 0.5 g (0.89  $\mu$ mole /g beads)於 0.05 M Tris 緩衝液 pH 7.5、4 °C 之儲存安定性。

## 結論

- 一、藻油製程中，藻體之乾燥皆以冷凍乾燥方式處理，以避免 EPA 之損失，乾燥後之藻體經粉碎後，篩取 200 mesh 以上之藻粉，作為萃油之原料。
- 二、溶劑萃取藻油，萃油率 2.55 %，藻油中 EPA 含量佔所有脂肪酸之 30% ( 255 mg/g oil)、SQAGs 含量 4.2 % (42 mg /g oil)。
- 三、SQAGs 為藻油中主要之硫脂質，其主要脂肪酸組成中多元不飽和脂肪酸 EPA (C20:5, 30%)及花生四烯酸(C20:4, 12.7%)共佔 42.7%，棕櫚酸油酸佔 33.3% C16:0 (33.3%)、其他有油酸(C18:1, 7.52%) 及硬脂酸(C18:0, 6.83%) 等。
- 四、藻油中以 SQAGs 以 MTT assay 方式分析對人類肝癌細胞株 HepG2 之半抑制濃度( $IC_{50}$ )為 125 $\mu$ g /mL。
- 五、以沙拉油萃取，藻油中含 EPA 3.38 mg/g oil、SQAGs 0.32 mg /g oil ，有潛力成為廣大素食者之營養保健食品。
- 六、以褐藻膠包埋純化之海藻脂氧合酶固定化的方法，於 4 $^{\circ}$ C 儲藏安定性為原有之 16.6 倍。

## 參考文獻

- 黃淑芳。2000。台灣東北角海藻圖錄。國立台灣博物館。台北。
- 侯秀儀。2002。利用固定化脂氧合酶修飾雞油氣味之可行性。國立台灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。基隆。
- 李武峰。2006。石蓴( *Ulva fasciata* )脂氧合酶淨化及固定化之生產特性。國立台灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。基隆。
- Alonso, D. L., Belarbi, E., Rodríguez-Ruiz, J., Segura, C. I., and Giménez, A. 1998. Acyl lipids of three microalgae . *Phytochemistry*. 47: 1473-1481.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, (Lipid was determined by solvent extraction Method 991.36)
- Bavaro, L., Catucci, L., Depalo, N., Ventrella, A., Corcelli, A. and Agostiano, A. 2006. Lipid content in higher plants under osmotic stress. *Bioelectrochemistry*. In press.
- Ben Hamed, K., Ben Youssef, N., Ranieri, A., Zarrouk, M. and Abdelly, C. 2005. Changes in content and fatty acid profiles of total lipids and sulfolipids in the halophyte *Crithmum maritimum* under salt stress. *J Plant Physiol*. 162:599-602.
- Bergea, J. P., Debiton, E., Dumay, J., Durand, P. and Barthomeuf, C. 2002. In Vitro Anti-inflammatory and Anti-proliferative Activity of Sulfolipids from the Red Alga *orphyridium cruentum*. *J. Agric. Food Chem*. 50 : 6227-6232.
- Elkahoui, S., Smaoui, A., Zarrouk, M., Ghrir, R. and Limam, F. 2004. Salt-induced lipid changes in *Catharanthus roseus* cultured cell suspensions *Phytochemistry*. 65 :1911-7.

- Frentzen, M. 2004. Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Current Opinion in Plant Biology*.7:270–276.
- Hanashima, S., Mizushina, Y. and Yamazaki, T. 2001. Synthesis of sulfoquinovosylacylglycerols, inhibitors of eukaryotic DNA polymerase  $\alpha$  and  $\beta$ . *Bioorg Med Chem*. 9:976.
- Hanashima, S., Mizushina, Y., Yamazaki, T., Ohta, K., Takahashi, S. and Sahara, H. 2001. Synthesis of sulfoquinovosylacylglycerols, inhibitors of eukaryotic DNA polymerase  $\alpha$  and  $\beta$ . *Bioorg Med Chem*. 9:367–76.
- Hu, S. P. and Pan, B. S. 2000. Modification of fish oil aroma using a macroalgal lipoxygenase. *J. Am. Oil. Chem. Soc*, 77, 343-348.
- Kuriyama, I., Musumi, K., Yonezawa, Y., Takemura, M., Maeda, N., Iijima, H., Hada, T., Yoshida, H. and Mizushina, Y. 2005. Inhibitory effects of glycolipids fraction from spinach on mammalian DNA polymerase activity and human cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem*. 16:594-601.
- Li, X.C., You, M. Y., Niu, R.L., Han, L.J. and Fan, X. 2004. A Spectrophotometric Method for Quantitative Determination of 3-(6-Deoxy-2,6-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-sn-Acylglycerol from Macroalgae. *Periodical of ocean university of china* .34: 1029-1032.
- Loya, S., Reshef, V., Mizrahi, E., Silberstein, C., Rachamim, Y., Carmeli, S. and Hizi, Amnon .1998. The Inhibition of the Reverse Transcriptase of HIV-1 by the Natural Sulfoglycolipids from Cyanobacteria: Contribution of Different Moieties to Their High Potency. *J. Nat. Prod.* 61: 891-895.
- Matsumoto, K., Sakai, H., Takeuchi, R., Tsuchiya, K., Ohta, K., Sugawara, F., Abe, M. 2005. Sakaguchi K. Effective form of sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) vesicles for DNA polymerase

- inhibition. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 46:175-81.
- Murakami, C., Yamazaki, T., Hanashima, S., Takahashi, S., Ohta, K. and Yoshida, H. 2002. Structure-activity relationship of synthetic sulfoquinovosylacylglycerols as a mammalian DNA polymerases inhibitor and apoptosis inducer. *Arch Biochem Biophys*. 403: 229– 36.
- Ohta, K., Hanashima, S., Mizushima, Y., Yamazaki, T., Saneyoshi, M. and Sugawara, F. 2000. Studies on a novel DNA polymerase inhibitor group, synthetic sulfoquinovosylacylglycerols: inhibitory action on cell proliferation. *Mutat Res*. 467:139– 52.
- Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B. 1989. Effects of the pH dependence of MTT bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res*. 49:4435-4440.
- Rizov, I. and Doulis, A. 2001. Separation of plant membrane lipids by multiple solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 922, 347-354.
- Sahara, H., Hanashima, S., Yamazaki, T., Takahashi, S., Sugawara, F. and Ohtani, S. 2002. Anti-tumor effect of chemically synthesized sulfolipids based on sea urchin's natural sulfonoquinovosylmonoacylglycerols. *Jpn J Cancer Res*. 93:85 – 92.
- Tadano, K. and Ishizuka, I. 1983. Determination of peracetylated sulfoglycolipids using the azure A method. *Journal of Lipid Research*. 24, 1368-1375.
- Tadano, K., Hikita, T., Suzuki, A., Toyoda, H., Toida, T. and Ishizuka, I. 2001. Determination of lipid-bound sulfate by ion chromatography and its application to quantification of sulfolipids from kidneys of various mammalian species. *Journal of Lipid Research*. 42: 1604-1608.