

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 牡蠣剝?廢水之回收利用與其功能性評估
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 孫至柔
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-041-010-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 蕭慧美

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學保健營養系
(含碩士班)

中華民國

103年03月24日

題目：牡蠣剝殼廢水之回收利用與其功能性評估

【摘要】

牡蠣 (oyster) 為台灣最重要的養殖經濟貝類之一。牡蠣的開殼取肉為食用加工利用上的第一步驟，在剝殼取肉作業中常會有廢水產生，此廢水主要含有蛋白質、胺基酸、核苷酸及其他營養成份，大多被當成廢棄物，容易造成環境上的污染及資源的浪費。本研究以牡蠣剝殼廢水作為原料回收濃縮含氮量較高的回收物。並評估此等回收物是否具有相關的保健功效。在短期動物實驗中，餵食自發性高血壓大鼠 (spontaneously hypertension rat, SHR) 不同劑量的牡蠣剝殼廢水回收物，能否具有降低血壓的效果。由此實驗發現在較低劑量下牡蠣剝殼廢水回收物即具有相當好的穩定血壓效果。顯示牡蠣剝殼廢水中具有可開發抗高血壓的保健成份的潛力。

【前言】

牡蠣為一種營養價值頗高的水產品，其一般成分中，水份約佔 85.0%、粗蛋白 8.6%、粗脂肪 1.0%、灰分 1.9%與肝醣 0.7%，另外還含有豐富的維生素 (A、B1、B2、D、C)、牛磺酸 (taurine; Tau) 及礦物質如鋅 (zinc; Zn) 與硒 (selenium; Se) 等 (Jeng *et al.*, 1979)。

在台灣地區現有養殖種類主要為長牡蠣 (*Crassostrea gigas*)，又稱巨牡蠣或真牡蠣，主要養殖區域大多分布在中南部沿海，而養殖方式是以開闊海域垂掛養殖及潮間帶平掛養殖方式為主。依據漁業統計年報的統計，台灣地區每年所產生的牡蠣高達 2~4 萬公噸之多。牡蠣的開殼取肉為食用加工利用上的第一步驟，目前美國及日本所採用的開殼法為加熱法，係將牡蠣在 115°C，12 Psi 之條件下加熱，則蚶殼完全打開，但是蚶肉會有 60~70% 的收縮，同時伴隨著重量的減少，於蒸煮後再用機器以滾動式或垂直摔落法將蚶肉抖出外殼，以供加工。但是此加工的作法所生產的牡蠣產品並不為國內民眾所接受，仍以生鮮蚶肉為主要消費形態，因此免不了依賴手工剝取蚶肉 (Jeng and Chen, 1980)。以加熱蒸煮法剝取蚶肉後，所產生的廢水，因都是工廠大量加工製造的，所以收集利用容易，因其含有高量的胺基酸及核苷酸等呈味物質，可將其回收做為牡蠣高湯 (oyster soup) 及牡蠣醬油 (oyster sauce) (Shiau and Chai, 1999)。近年來保健議題醞酵，已有人利用此回收廢水研究其保健功效 (Abe *et al.*, 2006)。然而台灣目前仍以手工剝取蚶肉，廢水回收相對不易，大多直接排放至水溝中，因此相關的研究相當少。本研究將回收牡蠣剝殼廢水，予以回收精製，再進行一般成分分析，了解其主要的組成。同時將進行胺基酸分析，了解此等廢水中的胺基酸組成，再來研擬功效評估的方向。在預備實驗時，曾分析嘉義東石所採集的牡蠣剝殼廢水，其固形物約佔 2.18%，進一步分析固形物發現粗蛋白量佔 6.1%，粗脂肪佔 1.0%，碳水化合物

物佔 22.3% (肝醣約佔 20.5%)。而在進行胺基酸分析時，其主要含有牛磺酸 (約 26 mg/g)，其次為甘胺酸。

黃 (2009) 研究蜆、文蛤及牡蠣對四氯化碳誘導大鼠肝損傷和肝纖維化之影響時發現，牡蠣與文蛤及蜆可減少四氯化碳誘導肝損傷的大鼠之血漿轉化生長因子 (TGF-beta1) 之濃度；蜆、牡蠣及文蛤皆明顯下降血漿腫瘤壞死因子 (TNF-alpha) 之濃度而推測蛤、蜆及牡蠣等皆能顯著延緩肝臟纖維化及改善肝臟功能，文蛤、牡蠣及蜆具有保肝功效，推測成分中的肝醣可能扮演重要的角色。Abe *et al.*(2006) 以牡蠣以加熱蒸煮法剝取蚶肉後所產生的廢水進行實驗，將廢水以乙醇沉澱法將大分子如蛋白質及肝醣沉澱下來，再將上層液部分進行實驗，發現上層液部分含有高量的牛磺酸，將此部分加入含有高膽固醇含量的飼料中餵食大鼠，可使大鼠的血清或肝臟的膽固醇濃度明顯低於單純餵食含有高量膽固醇飼料的大鼠。因此本研究將進行手工剝取牡蠣肉後產生的牡蠣廢水進行研究，首先將開發簡便的回收、濃縮、分劃之方法，以此方法製備牡蠣廢水回收物，並多以進行一般成分分析及抗氧化活性分析。再進行相關的保健功效評估。

【材料與方法】

1. 牡蠣剝殼廢水之回收、濃縮、分劃

(1). 研究原料

實驗用牡蠣剝殼廢水收集至嘉義東石，於牡蠣剝殼作業中即新鮮收集，收集後以保溫箱底層置碎冰，運至實驗室立即進行處理。

(2). 牡蠣剝殼廢水之濃縮及分畫

牡蠣剝殼廢水先以Toyo No.2濾紙過濾去除雜質，再以迴轉真空濃縮儀減壓濃縮。再加入有機溶劑將大分子如蛋白質及肝醣沉澱下來，凍結乾燥成粉末，即為牡蠣剝殼廢水回收物。

2. 牡蠣剝殼廢水回收物之成分分析及抗氧化活性分析

(1) 一般成分 (粗蛋白、粗脂肪、水分、灰分)

(a)水分含量測定：依據 [中國國家標準CNS5033食品中水分之檢驗方法] 中的 [常壓乾燥法] 進行。取樣品 W g 放入已達恆重之坩堝 (W1) 中，放入 105°C 烘箱中乾燥，取出置於乾燥器中放冷秤重，反覆直到恆重 (W2) 為止。

$$\text{水分含量 (\%)} = \{ [5 - (W2 - W1)] / W \} \times 100\%$$

(b)粗灰份含量測定：依據 [中國國家標準CNS5034食品中粗灰分之檢驗方法] 進行。取樣品 W g 放入已達恆重之坩堝 (W1) 中，放入 105°C 烘箱中乾燥，取出置於乾燥器中

放冷，再置於灰化爐中灰化 6 小時以上 (550°C) 至灰白色，取出置於乾燥器中放冷秤重，再反覆直到恆重 (W3) 為止。

$$\text{灰分含量 (\%)} = [(W3 - W1)/W] \times 100\%$$

(c)粗蛋白質含量測定：依據 [中國國家標準CNS5035食品中粗蛋白質之檢驗方法] 進行。

取樣品 0.5 g (W) 於 105°C恆溫乾燥後放入分解管中，再加入觸媒 5 g (K₂SO₄ : CuSO₄ · 5H₂O = 9:1) 及 15 mL 濃硫酸，置於蛋白質分解爐中加熱 (380°C) 分解 3 小時至澄清狀。取出冷卻後加入 70 mL 蒸餾水及 60 mL 35% NaOH，再以全氮蒸餾器 (Kjeltec system 1002 Distilling unit) 蒸餾出氮，用 20 mL 4% 硼酸 (加入 2滴指示劑) 收集 5 分鐘後，以 0.1 N 硫酸滴定至淡粉紅色，記錄樣品 (V2) 及空白組 (V1) 所滴定量。將總氮量乘於6.25 即為粗蛋白含量。

$$\text{粗蛋白含量 (\%)} = [0.014 \times (V2 - V1) \times 0.1/W] \times 6.25 \times 100\%$$

(d) 粗脂肪含量測定：依據 [中國國家標準CNS5036食品中粗脂肪之檢驗方法] 進行。取樣品 W g 於 105°C 恆溫乾燥後，置入圓筒濾紙並裝入Soxhlet 萃取裝置，接上已達恆重之受器 (W1)，並在受器中裝入八分滿的乙醚，以脂肪抽出器 (Soxtec System HT-1043 Extraction Unit)迴流 3 小時 (95°C) 進行萃取。萃取完畢後，將受器放置於加熱板上使乙醚揮發，將受器放入 105°C 烘箱中乾燥，取出置於乾燥器中放冷秤重，反覆直到恆重 (W2) 為止。

$$\text{脂肪含量 (\%)} = [(W2 - W1)/W] \times 100\%$$

(2) 牡蠣剝殼廢水回收物之抗氧化活性分析

正對照組包括Vit C、Vit E、BHA、BHT 等抗氧化劑及EDTA。

(a).抑制血紅蛋白催化亞麻油酸過氧化之能力

依Kuo *et al.* (1999) 之方法，取200 μL樣品與20 μL 之4 mM亞麻油酸，混合150 μL之0.1 M磷酸鹽緩衝液(含0.1% Tween 20, pH 7.0)，於37 °C維持3分鐘，加入20 μL之0.035% Hb，於37°C振盪反應10分鐘，加入5 mL之0.6% HCl-ethanol終止反應，並依序加入30%硫氰酸鉍溶液與 0.02 M之氯化亞鐵溶液各0.1 mL，震盪均勻後測定480 nm之吸光值。

(b). α, α-Diphenyl- β-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基清除能力測定

取 1 ml樣品加入 1 ml 0.1 mM之DPPH溶液 (溶於 95%酒精)，混合均勻置於室溫 (25-27°C)反應 30 min。測OD517nm，吸光值愈低即表示抗氧化劑的供氫能力愈強。計算: [1-(樣品吸光值/未加樣品之控制組吸光值)]*100%，表示清除效應之百分率。實驗中以維生素C (L-ascorbic acid) 當做正對照組 (Positive control) (Shimada *et al.*,1992)。

(3).還原力測定 (Oyaizu 1988)

取 1 ml樣品加 1ml 200 mM磷酸鹽緩衝溶液 (pH6.6) 與 1 ml 1%赤血鹽 (potassium

ferricyanide) 混合均勻後於 50 °C 水浴反應 20 分鐘，急速冷卻後，加入 1 ml 10% trichloroacetic acid 溶液 (以 95% 乙醇配製)。於 3000 rpm 離心 10 分鐘後，取上清液 100 μL 加 100 μL 蒸餾水及 20 μL 0.1% ferric chloride (FeCl₃·6H₂O) 溶液 (以 3.5% 鹽酸溶液配製)，混合均勻放置 10 分鐘後於 700 nm 測吸光值，吸光值愈高，表示樣品還原力愈強。

(4) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (Miller *et al.*, 1993)

以磷酸緩衝液 (PBS buffer, 1L PBS buffer 中含 8.18 g NaCl、0.27 g KH₂PO₄、1.42 g Na₂HPO₄ 及 0.15 g KCl, pH 7.4) 配製 2.0 mM 的 2,2'-azono-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)，以蒸餾水配製 70 mM K₂S₂O₈。使用前 16 小時混合上述兩試劑成為 ABTS·+stock solution (此 stock solution 在室溫下可穩定超過兩天)，臨用前以 PBS buffer 稀釋到吸光值 0.800±0.30。取 10 μL 樣品加上 990 μL 經稀釋的 ABTS·+stock solution 均勻混合在避光條件下靜置 6 分鐘，以分光光度計測定 734 nm 的吸光值， $[(OD_{734} control - OD_{734} sample) / OD_{734} control] \times 100$ 表示清除 ABTS 自由基之能力 (%)，OD₇₃₄ control 為取 PBS buffer (pH 7.4) 10 μL 在相同反應條件下進行作用所測得的 OD₇₃₄ 之值。Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid) 為維生素 E 的水溶性相似物，利用不同濃度之 Trolox 在相同條件下製作檢量線，對照所得結果即為 TEAC 以 mM 表示。

(5) 螯合亞鐵離子效果 (Dinis *et al.*, 1994)

取 1 ml 樣品，加入 3.7 ml 的甲醇及 0.1 ml 之 2 mM FeCl₂，30 秒後再加入 0.2 mL 之 5 mM Ferrozine，反應 10 min 後，測 OD₅₆₂。吸光值越低表示樣品螯合亞鐵離子能力越強。螯合亞鐵離子能力以 Chelating effects (%) = $[1 - (\text{absorbance of sample added at 562 nm} / \text{absorbance of control added at 562 nm})] \times 100$ 。

3. 牡蠣剝殼廢水回收物輔助調節血壓功能評估。

將參考 健康食品之輔助調節血壓功能評估方法 衛署食字第 0950405557 號公告附件。(衛生署，2006) 進行。

本實驗採用動物實驗模式，降血壓實驗原理乃以受試物給予原發性高血壓動物 (如 SHR 等)，觀察受試物對高血壓動物模型的收縮壓與舒張壓指標的影響，評價受試物的調節血壓作用。

(1) 動物飼養

原發性高血壓老鼠以 SHR 為主，對照組動物為 WKY (Wistar Kyoto) 老鼠。動物隻數每組至少 8 隻。牡蠣廢水回收物濃度劑量分為高、低及對照組三組，每日以口胃管灌餵食

一次。原發性高血壓老鼠，飼養於 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 及相對濕度為 $60\pm 3\%$ 之動物室中，控制每天光照及黑暗期各為 12 小時。飼養期間實驗飼料和飲水採自由攝取。每週紀錄飲水量、體重與生長狀況等。

(2) 血壓測定

實驗前一週對受試動物進行血壓測量。依據測壓儀器的要求進行動物安靜狀態下的血壓的測定。實驗開始後每二週測血壓 1 次。每次測定數值應為 3-5 次測定值之平均值。收縮壓與舒張壓的測定建議採用尾動脈間接測定法。動物的飼養環境應保持安靜，以排除環境因素對血壓的影響。

(3) 實驗數據統計分析：

採用 SAS 電腦統計套裝軟體(SAS institute, Cary, NC)進行變異數分析(analysis of variance, ANOVA)，並以 Duncan's test 來測試不同處理間顯著差異效果($P < 0.05$)。

【結果與討論】

(1) 牡蠣剝殼廢水回收物之抽出率及一般成份分析

牡蠣剝殼廢水回收物之抽出率及一般成份分析之結果如表 1。牡蠣剝殼廢水之固形物約佔廢水的 $2.42\pm 0.12\%$ ，分析固形物發現粗蛋白量佔 2.6%，粗脂肪佔 1.0%，碳水化合物佔 20.1%，同時有 60.0% 的灰份，灰份以鹽份為主，此為在利用牡蠣剝殼廢水最大的難題。因此本研究開發出以有機溶劑沉澱法將回收牡蠣剝殼廢水較大分子量的物質，同時並達成脫鹽的效果，得到的牡蠣剝殼廢水回收物之固形物佔 $0.55\pm 0.30\%$ ，而固形物之粗蛋白量佔 30.8%，粗脂肪佔 1.7%，碳水化合物佔 67.8%，灰份則減至 1.7%。可成功的達到濃縮並脫鹽的效果。

(2) 牡蠣剝殼廢水回收物之抗氧化活性分析

進一步觀察剝殼廢水回收物之抗氧化力，DPPH 自由基清除力結果如圖 1、還原力如圖 2、螯合亞鐵離子能力如圖 3，發現牡蠣剝殼廢水回收物在這三種抗氧化指標上均不高。

(3) 牡蠣剝殼廢水回收物之對 SHR 之抗高血壓功能性評估

在短期動物實驗中，餵食自發性高血壓大鼠 (spontaneously hypertension rat, SHR) 不同劑量的牡蠣剝殼廢水回收物，觀察能否具有降低血壓的效果，結果如表 2。由此實驗發現牡蠣剝殼廢水回收物 (oyster L 及 H) 具有相當好的穩定血壓效果。由於實驗仍在進行中，可藉由相關的生理指標了解牡蠣剝殼廢水回收物穩定血壓的機制。

表 1. 牡蠣剝殼廢水回收物之抽出率及一般成份分析

	Dry matter	crude protein	carbohydrates	crude lipid	ash
牡蠣剝殼廢水	2.42±0.12%	2.6%	20.1%	1.0%	60.0%
牡蠣剝殼廢水回收物	0.55±0.30%	30.8%	67.8%	0.7%	1.7%

表 2 牡蠣剝殼廢水回收物之對 SHR 之抗高血壓功能性評估

Group	Systolic pressure (mmHg)			
	Before	1st week	2nd week	3rd week
WKY	144±9	156±6	156±6	161±8
control	203±10	226±6	226±7	234±4
oyster L	204±6	222±2	219±4	219±3
oyster H	202±8	217±7	215±4	215±4

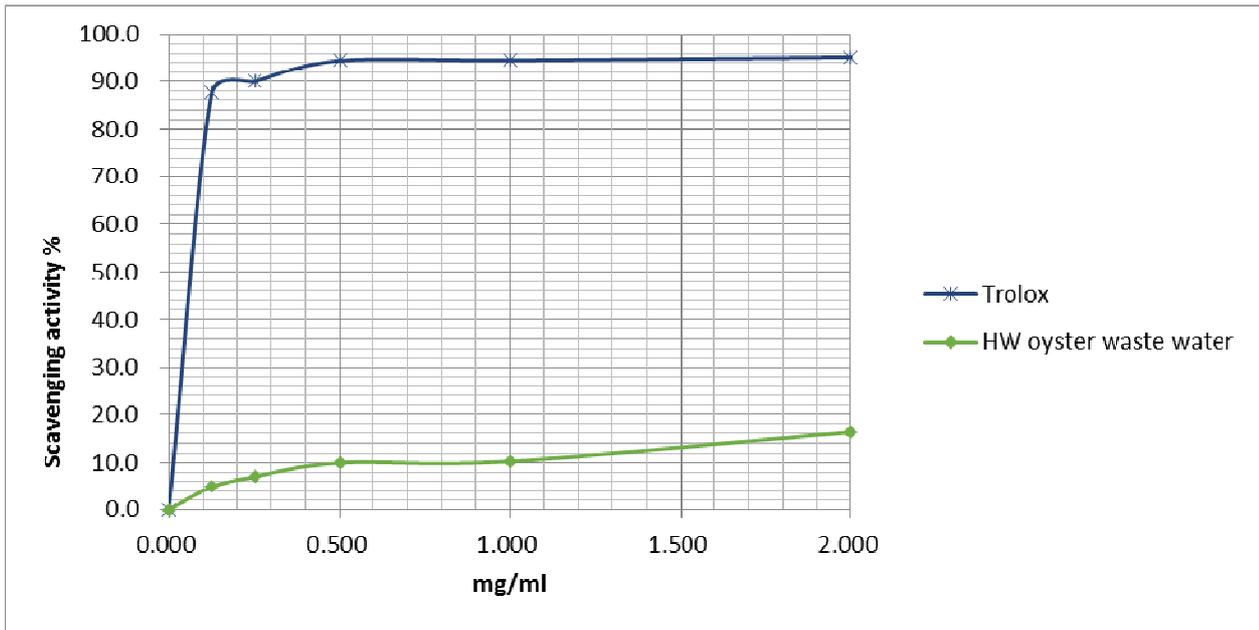


圖.1 牡蠣剝殼廢水抽出物之清除 DPPH 能力

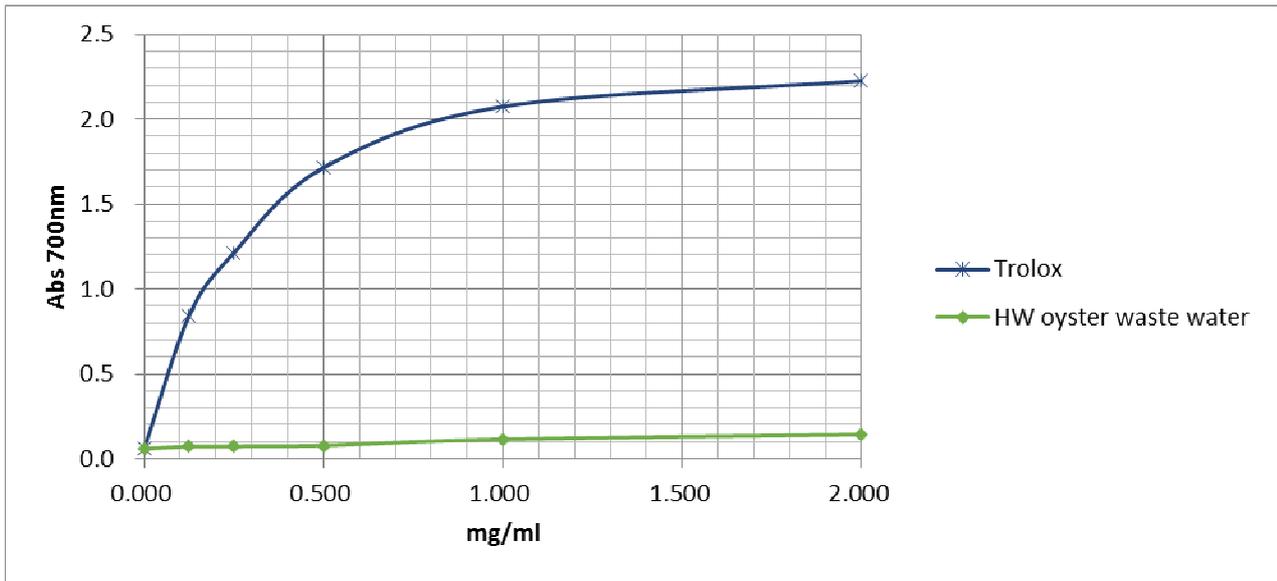


圖 2 牡蠣剝殼廢水抽出物之 FRAP (Ferric-Reducing antioxidant power)

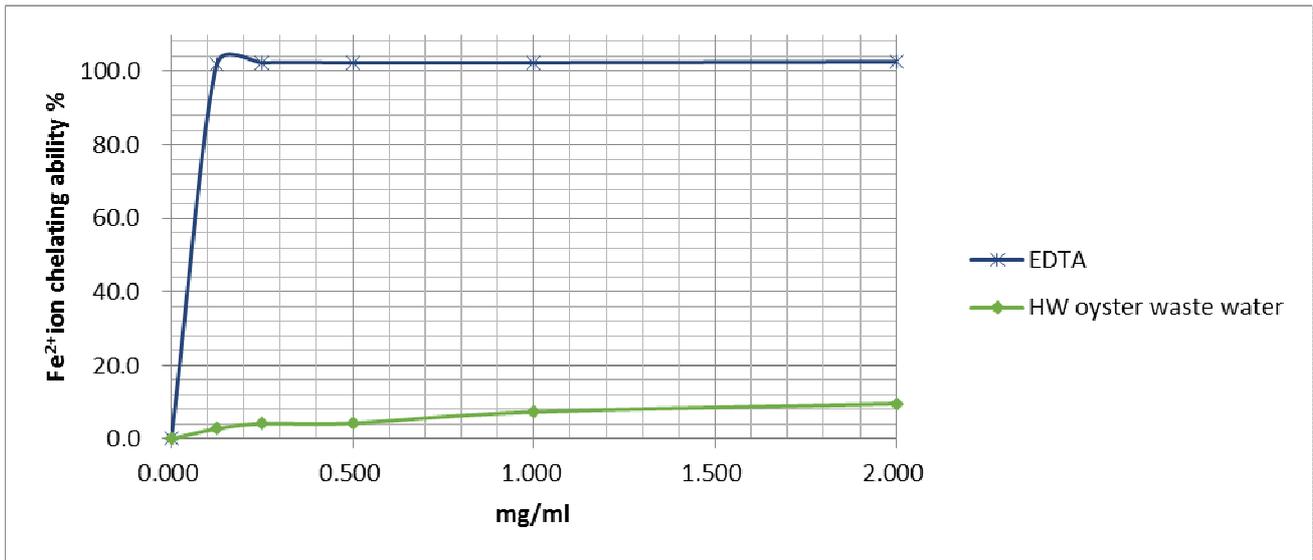


圖 3 牡蠣剝殼廢水抽出物之螯合亞鐵離子能力 (Fe²⁺ ion chelating ability)

【參考文獻】

- 漁業署 (2012) 中華民國台灣地區漁業年報，農委會漁業署，台北。
- 衛生署 (2006) 健康食品之輔助調節血壓功能評估方法衛署食字第0950405557號公告附件，衛生署，台北。
- 中國國家標準(1988) CNS5033 食品中水分之檢驗方法。經濟部中央標準局。台北。
- 中國國家標準 (1988) CNS5034 食品中粗灰分之檢驗方法。經濟部中央標準局。台北。
- 中國國家標準 (1988) CNS5035 食品中粗蛋白質之檢驗方法。經濟部中央標準局。台北。
- 中國國家標準 (1988) CNS5036 食品中粗脂肪之檢驗方法。經濟部中央標準局，台北。
- 黃建智 (2009) 蜆、文蛤及牡蠣對四氯化碳誘導大鼠肝損傷和肝纖維化之影響。國立臺灣海洋大學碩士論文，基隆。
- Abe, M., Matsuda, Y., Komura, N. and Yoshida M (2006) Recovery of a Useful Component from Waste during Production of Oyster Extract (*Crassostrea gigas*) and Assessment of Its Availability. *Trace Nutrients Research* 23 : 89-92.
- Shiau, C.Y. and Chai, T. (1990). Characterization of Oyster Shucking Liquid Wastes and Their Utilization as Oyster Soup. *Journal of Food Science* 55(2), 374-378.
- Jeng, S. S., Hsu, S. Y. and Wang, G. S. (1979) Chemical composition of Taiwan's oysters and clams. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica* 18: 1-10.
- Jeng, S.T. and Chen, M.S. (1980) The effect of frozen methods on the shucking of oysters. *Bulletin of taiwan fisheries research institute*, 32:377~381.
- Shiau, C.Y. and Chai, T (1999) Protein recovered from oyster wash water by ultrafiltration and their utilization as oyster sauce through fermentation. *Journal of Marine Science and Technology*, 7: 110-116.
- Trace Nutrients Research* 23 : 89-92
- Carroll, N. V., Longley, R. W. and Roe, J. H. 1956. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* 220: 583-591.
- Konosu, S., Watanabe, K. and Shimizu, T. (1974) Distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts of eight species of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 40: 909-915.
- Kuo, J. M., Yen, D. B. and Pan, B. S. 1999. Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3206-3209.
- Oyaizu, M. 1988. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 35: 771-775.
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T., Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992 ; 40 : 945-948.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V. and Milner A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84 (1993), pp. 407-412.
- Dinis, T.C., V.M. Madeira and L.M. Almeida, (1994). Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 315: 161-169.