

中國醫藥大學營養學系碩士班
碩士論文

**以商業蛋白酶水解鮪魚血合肉加工副產品
製備抗氧化活性胜肽之研究**

**The Study on Development of Antioxidative Peptides
Derived from Protein Hydrolysates of Tuna Dark
Muscle By-product by Commercial Proteases**

研究生：曾瑜菴 撰 Yu-Wan Tseng

指導教授：徐國強 博士 Dr. Kuo-Chiang Hsu

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

謝誌

光陰似箭，轉眼間在中國醫的日子即將要結束了，回首這兩年的研究生涯，有歡笑、有淚水，在這看似很短促的兩年內，我已經學會了很多東西，不僅是實驗的技巧，做事的態度，還有人與人之間的相處。很高興能來到這裡，讓沒實驗基礎的我直到自己獨力完成一本論文，過程之中跌跌撞撞，很辛苦但也很值得。

首先，我要感謝我的指導教授 徐國強 老師，我從大學就與您相識，在和您一同從中山醫來到了中國醫打拼，很榮幸成為你第一位研究生，也很謝謝您一直以包容與耐心的態度指導我與給予建議，在論文撰寫的部分，承蒙口試委員 饒家麟 老師、謝昌衛 老師及 黃至盛 老師撥冗審閱，並提供了諸多寶貴意見，讓學生我獲益匪淺，使得論文得以順利完成，在此致上最深誠的謝意。另外，感謝 蔡佳文 老師、楊惠婷 老師在平常的關心與照顧。感謝學姐 艾璇、佳陽、伊評、育儒、佳音、馨文、慧珊，謝謝你們在實驗及生活上的幫忙。還有感謝我的同學 佩璇、家媛、伊婷、施穎、盈禎、虹君、孟菡、前毅、永耀、紘綺、盈詩、文耀、佳璇、艾琳 及 鈺雯，很開心這兩年可以一起當同學，一起瘋狂，一起做實驗，一起寫論文。感謝我家學妹 潔攀，還有 梅寧、欣珮、怡君、惠璟、育瑄、毓軒、曉彤，謝謝你們貼心的服務。感謝我的朋友 祐德、敬恩 謝謝你們的陪伴與傾聽，讓我備感窩心。

最重要的我要感謝我最愛的家人，對我無怨無悔的付出並為我的生命中最堅實的後盾，讓我的研究生涯順利過關。更要謝謝所有曾經幫助過我的人，在此謹以本論文獻給你們，一同分享我的成果與喜悅。

若沒有大家的幫忙、大家的提點、大家的扶持、一同分享喜悅以及共患難，或許我還是與前兩年的今日一樣，沒有成長、沒有蛻變。很謝謝大家給了我這麼多美好的回憶，謝謝！

曾瑜苑

謹致於

中國醫藥大學 營養學系研究所

中國民國九十九年七月

目錄

目錄.....	i
圖目錄.....	iv
表目錄.....	vi
中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 前言.....	1
一、 台灣水產概況.....	1
二、 鮪魚分類及種類.....	1
(一) 鮪魚.....	1
(二) 副產品的利用.....	4
(三) 鮪魚血合肉及其營養價值.....	5
三、 蛋白質水解.....	5
(一) 蛋白質之水解方法.....	5
(二) 酶的種類及特性.....	6
(三) 酶之影響因子.....	7
(四) 潛在問題.....	8
(五) 蛋白質水解物性質介紹及應用.....	8
四、 自由基與抗氧化.....	9
(一) 自由基種類.....	9
(二) 抗氧化劑作用之原理與機制.....	12
第二章 文獻探討.....	15
一、 食物活性胜肽之探討.....	15
(一) 腸胃道系統.....	16
(二) 心血管系統.....	17

(三) 免疫系統	17
(四) 神經系統	18
二、 蛋白質水解物之相關抗氧化活性探討	18
三、 水產副產品活性物質之探討	24
四、 鮪魚加工副產品活性胜肽之探討	25
五、 研究目的	26
第三章 材料與方法	27
一、 實驗設計	27
二、 實驗材料	28
(一) 鮪魚加工副產品	28
(二) 商業蛋白酶	28
三、 實驗藥品	30
四、 實驗儀器及設備	32
五、 實驗方法	34
(一) 基本成分分析	34
(二) 鮪魚蛋白水解液製備	36
(三) 水解度測定	37
(四) 抗氧化活性分析	38
(五) 抗氧化活性胜肽之分離純化	41
(六) 抗氧化活性胜肽之胺基酸序列鑑定	42
(七) 統計分析	42
第四章 結果	43
一、 一般成分分析	43
二、 水解度	43
三、 鮪魚蛋白質水解物之抗氧化活性分析	46
(一) 清除 DPPH 自由基能力	46

(二) 亞鐵離子螯合能力	51
(三) 還原力	56
四、 鮪魚蛋白質水解物抗氧化活性物質的純化分離及其抗氧化活性	61
(一) 凝膠過濾法.....	61
(二) 高效能液相層析法	64
五、 抗氧化活性胜肽之鑑定	67
第五章 討論	72
一、 一般成分分析.....	72
二、 水解度測定.....	73
三、 鮪魚蛋白質水解物之抗氧化活性特性	74
(一) 清除 DPPH 自由基能力	74
(二) 亞鐵離子螯合能力	76
(三) 還原力	77
四、 鮪魚蛋白質水解物之分離純化與抗氧化活性	79
(一) 凝膠過濾法.....	79
(二) 高效能液相層析法	80
五、 鮪魚蛋白質水解物活性胜肽之胺基酸鑑定	81
第六章 結論.....	83
第七章 文獻參考	84

圖目錄

圖 1-1	鮪魚的分類表.....	2
圖 1-2	常見鮪魚之外觀型態.....	2
圖 2-1	食物活性胜肽之功效.....	16
圖 3-1	L-leucine 之檢量線.....	38
圖 4-1	鮪魚血合肉加工副產品經蛋白酶 (AM、PA) 水解後之水解度變化.....	45
圖 4-2	AM 蛋白質水解物在不同濃度下之清除 DPPH 自由基能力...48	
圖 4-3	PA 蛋白質水解物在不同濃度下之清除 DPPH 自由基能力.....	49
圖 4-4	BHT 在不同濃度下之清除 DPPH 自由基能力	50
圖 4-5	AM 蛋白質水解物在不同濃度下之亞鐵離子螯合能力	53
圖 4-6	PA 蛋白質水解物在不同濃度下之亞鐵離子螯合能力	54
圖 4-7	EDTA 在不同濃度下之亞鐵離子螯合能力.....	55
圖 4-8	AM 蛋白質水解物在不同濃度下之還原力.....	58
圖 4-9	PA 蛋白質水解物在不同濃度下之還原力	59
圖 4-10	BHT 和 L-ascorbic acid 在不同濃度下之還原力	60
圖 4-11	AMH 經 Sephadex G-25 凝膠過濾法分離後其亞鐵離子螯合能力 (A) 及沖提圖 (B).....	62
圖 4-12	PAH 經 Sephadex G-25 凝膠過濾法分離後其亞鐵離子螯合能力 (A) 以及沖提圖 (B).....	63
圖 4-13	AMH2 經高效能液相層析法純化後其亞鐵離子螯合能力(A) 以及 RP-HPLC 分析圖(B).....	65
圖 4-14	PAH1 經高效能液相層析法純化後其亞鐵離子螯合能力 (A) 以	

及 RP-HPLC 分析圖 (B).....	66
圖 4-15 AMH2e 的 De novo 序列圖	69
圖 4-16 PAH1a 的 De novo 序列圖	71
圖 5-1 BHT 與 DPPH 自由基的作用機制.....	76



表目錄

表 1-1	蛋白酶專一性及其抑制劑	8
表 1-2	活性氧物種攻擊體內細胞所造成的影響	11
表 1-3	常見抗氧化劑.....	14
表 2-1	常見的商業蛋白酶介紹	22
表 2-2	蛋白質水解物之抗氧化活性胜肽.....	23
表 3-1	商業蛋白酶之基本性質	29
表 4-1	鮪魚血合肉加工副產品之一般成分分析	44
表 4-2	鮪魚蛋白質水解物清除 DPPH 自由基能力之 EC_{50}	47
表 4-3	鮪魚蛋白質水解物的亞鐵離子螯合能力之 EC_{50}	52
表 4-4	鮪魚蛋白質水解物還原力之 EC_{50}	57
表 4-5	藉 MALDI TOF/TOF 鑑定 AMH2e 及 PAH1a 胜肽之胺基酸 序列及分子量.....	68

中文摘要

鮪魚是我國最重要的經濟魚類之一，一般以冷凍全魚或罐頭方式販售，其血合肉由於具特殊腥臭味，因此被製成經濟價值不高的魚粉或魚溶漿。近年來研究指出，酶水解蛋白質後可產生之具抗氧化活性胜肽，且發現此胜肽之胺基酸組成常為疏水性胺基酸。因此本實驗利用鮪魚血合肉加工副產品為原料，以作用於疏水性胺基酸之市售商業蛋白酶 protease XXIII (AM) 及 papain (PA) 於最適條件下進行 1~6 hr 水解，測定其鮪魚蛋白質水解物之水解度 (degree of hydrolysis; DH) 及抗氧化活性，將具最佳抗氧化活性之水解物藉凝膠過濾法 (gel filtration) 及高效能液相層析法 (RP-HPLC) 分離純化，並鑑定此抗氧化活性胜肽之胺基酸序列。實驗結果如下，

1. 鮪魚血合肉加工副產品之基本成分含量為水分占 68.39%、粗蛋白占 29.33%、灰分占 1.31%、粗脂肪占 1.79%。
2. AM 或 PA 蛋白質水解物皆在水解 1 hr 內的 DH 會顯著上升，爾後則隨水解時間增加而逐漸上升。當水解 6 hr 時，AM 及 PA 蛋白質水解物 DH 分別為 29.93 和 18.43%。
3. 在抗氧化活性測定方面，皆發現 AM 和 PA 蛋白質水解物之抗氧化活性與濃度 (0~30 mg of dried extract/mL) 呈正相關。且 AM 和 PA 蛋白質水解物分別在水解 3 hr 和 2 hr 皆具有最佳的亞鐵離子螯合能力 (EC_{50} 分別為 4.91 和 5.95 mg of dried extract/mL) 以及清除 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力 (EC_{50} 分別為 17.13 和 15.32 mg of dried extract/mL)。此外，AM 及 PA 蛋白質水解物分別以水解 1~3 hr 及水解 1、2、4 和 5 hr 還原力效果較佳。就整體而言，以水解 3 hr 之 AM 蛋白質水解物及 2 hr 之 PA 蛋白質水解物 (AMH 及 PAH) 最具有較佳抗氧化活性。故未來再分離純化則選用 AMH 和 PAH 時並以亞鐵離子螯合能力作為抗氧化活性指標。

4. 利用 Sephadex G-25 凝膠過濾法區分 AMH 和 PAH，其主要可分別分離出 4 個 (AMH1 ~ AMH4) 和 5 個 (PAH1 ~ PAH5) 區分物，並將各區分物冷凍濃縮後，濃度調整至 10 mg of dried extract/mL 並測定其亞鐵離子螯合能力，結果以 AMH2 (76.34%) 以及 PAH1 (92.4%) 為最佳。
5. 將 AMH2 以及 PAH1 以 RP-HPLC 法分離純化，分別分離出 6 個 (AMH2a ~ AMH2f) 和 3 個波峰 (PAH1a ~ PAH1c)，並將各區分物冷凍濃縮後，濃度調整至 0.5 mg of dried extract/mL 並測定其亞鐵離子螯合能力，結果以 AMH2e (18.89%) 以及 PAH1a (19.33%) 為最佳。
6. AMH2e 和 PAH1a 經 MALDI TOF/TOF 經分析鑑定後，分別可得 1 及 2 個胜肽之胺基酸序列：AMH2e 為 Arg-Pro-Pro-Arg-Arg (681.5 Da)；PAH1a 為 Asp-Thr-His-His-Arg-Arg-Lys-Pro (1046.6 Da) 和 His-Met-Leu -His-Lys-His-Met-Leu-Leu-His (1296.8 Da)。

綜合以上結果所述，鮪魚血合肉加工副產品之蛋白質水解物具有抗氧化活性且有利於機能性食品之開發並提升副產品的經濟價值。

關鍵字：鮪魚血合肉加工副產品、蛋白質水解物、抗氧化活性、胜肽

Abstract

Tuna, one of the most important economic fish in Taiwan, is mainly sold for frozen whole fish or canned food. The dark muscles are further processed into low market-value products, such as fish waste meal and fertilizer, due to their off-flavor. Previous studies have shown that antioxidative peptides can be obtained from proteins hydrolyzed by proteases. The hydrophobic amino acids contained in the antioxidative peptides were found to be necessary. Therefore, the objective of this study is to use the tuna dark muscle by-product as the material, to be hydrolyzed by two commercial proteases, protease XXIII (AM) and papain (PA) which are hydrophobic amino acids, for 1 ~ 6 hr. Then the degree of hydrolysis (DH) and antioxidative activities of the protein hydrolysates were determined. The hydrolysates possessed the highest antioxidative activities were further purified by gel filtration and reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) in sequence. Finally, the amino acid sequences of the antioxidative peptides were identified.

The results were shown as follows.

1. The moisture, crude protein, ash and crude fat contents of tuna dark muscle by-product were 68.39, 29.33, 1.31 and 1.79%, respectively.
2. DHs of tuna dark muscle by-product hydrolyzed with AM and PA increased rapidly within 1 hr and then increased slightly until 6 hr. The highest DHs for AM and PA hydrolysates were 29.93 and 18.43%, respectively, both obtained at 6 hr hydrolysis.
3. The results showed that all parameters of antioxidative activity of AM and PA hydrolysates determined in this study were correlated with the concentrations (0 ~ 30 mg of dried extract/mL) of hydrolysates. The highest metal ion chelating and DPPH radical scavenging activities of AM (EC₅₀ values: 4.91 and 17.13 mg of dried extract/mL, respectively) and PA hydrolysates (EC₅₀ values: 5.95 and 15.32 mg of dried extract/mL, respectively) were obtained after 3 and 2 hr hydrolysis, respectively. In

addition, AM hydrolysates were obtained after 1 to 3 hydrolysis and another PA hydrolysates were obtained after 1, 2, 4 and 5 hydrolysis were better reducing power. Overall views of AM and PA hydrolysates, they were obtained after 3 and 2 hr hydrolysis, respectively that had the best antioxidative activity. Metal ion chelating activity was chosen as antioxidative index for further separation and purification of AMH and PAH.

4. Fractionation of AMH and PAH on a Sephadex G-25 gel filtration chromatography, four (AMH1 to AMH4) and five (PAH1 to PAH5) major fractions were obtained from AMH and PAH, respectively. Each fraction was lyophilized and adjusted to the concentration of 10 mg of dried extract/mL, and then its metal ion chelating activity was measured. The results showed that the highest metal ion chelating activities of AMH and PAH fractions were observed in AMH2 (76.34%) and PAH1 (92.4%).
5. Six (AMH2a to AMH2f) and three (PAH1a to PAH1c) fractions were isolated from AMH2 and PAH1 by RP-HPLC. They were lyophilized and adjusted to the concentration of 0.5 mg of dried extract/mL, and then its metal ion chelating activity was measured. The results showed that AMH2e and PAH1a possessed the highest metal ion chelating activities (18.89 and 19.33%, respectively).
6. The amino acid sequences of AMH2e and PAH1a were identified by MALDI TOF/TOF, and they were Arg-Pro-Pro-Arg-Arg (681.5 Da) for AMH2e, Asp-Thr-His-His-Arg-Arg-Lys-Pro (1046.6Da) and His-Met-Leu-His-Lys-His -Met-Leu-Leu-His (1296.8 Da) for PAH1a.

According to the results, tuna dark muscle by-product hydrolysates possessed potent antioxidative properties. It may be useful ingredients in functional food applications and then elevate economic efficiency of marine by-product.

Key word: tuna dark muscle by-product 、 protein hydrolysate 、 antioxidative activity 、 peptide

第一章 前言

一、 台灣水產概況

台灣是一海島國家，蘊藏豐富的海洋資源，為我國最重要的飲食及經濟來源之一。行政院農委會漁業署會報統計在 2008 年之漁業生產量約為 134 萬公噸，總產值約為 889 億元，其中在遠洋漁業以鮪延繩釣為最大宗。其分布主要以臺灣東部及東北部海域產量最多，鮪魚占漁業生產量的 24.85% (33.3 公噸)，產值約 200 億元，是台灣重要的經濟魚類。另外，鮪魚加工已成為國內水產加工業重要的一環，主要以罐頭加工製造為主，包括了水煮、油漬、調味等產品。其總產量為 731,714 箱，總產值為 1.7 億元，僅次於鯖魚 (行政院農委會漁業署，2008)。另外，還可分為冷凍貯藏鮪魚 (-20℃ 或是 -50 ~ -60℃ 貯藏) 與冰藏鮪魚 (碎冰法保藏) 兩種，一般大多數主要外銷市場為日本，其次是美國 (周，1990)。

二、 鮪魚分類及種類

(一) 鮪魚 (tuna)

鮪魚又稱金槍魚，是一種非常重要的洄游性經濟食用魚種。鮪魚是用魚鰭前進並保持平衡，同時以鰓呼吸。此外，鮪魚的泳速瞬時時速可達 160 km/hr，平均時速約 60 ~ 80 km/hr，其肉色為紅色，主要是肌肉中含有了大量的肌紅蛋白 (myoglobin) 所致 (Brown, 2006)。

全世界的鮪魚共有 15 屬 50 餘種，而臺灣就有 9 屬 21 種。常見的有黃鰭鮪、長鰭鮪、大目鮪以及黑鮪。以下為鮪魚分類【圖 1-1】以及常見鮪魚之外觀型態【圖 1-2】。

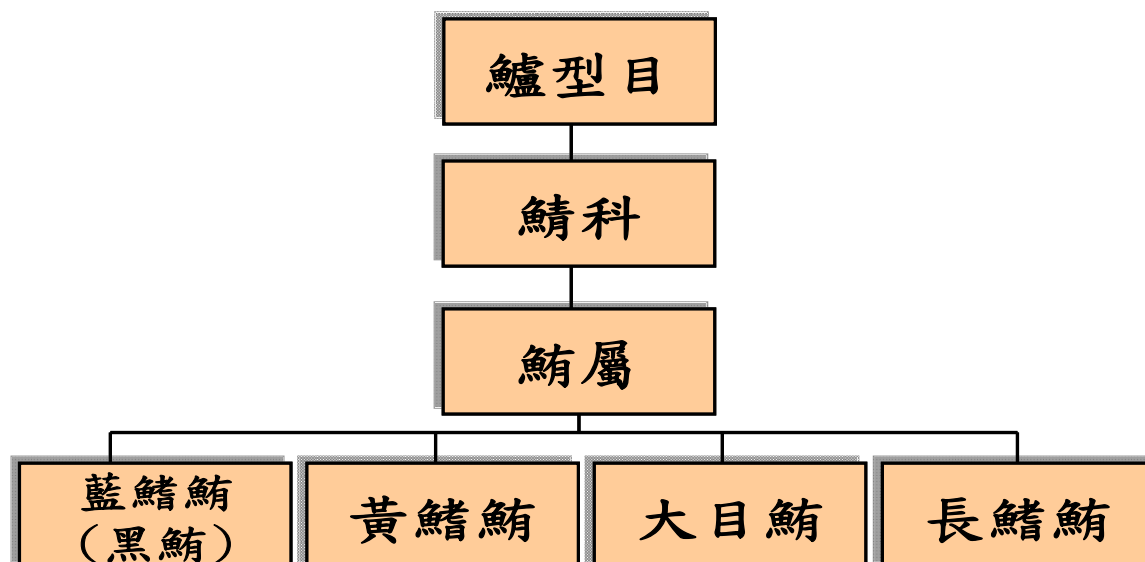


圖 1-1 鮪魚的分類表
Figure 1-1 Classification of tunas.



圖 1-2 常見鮪魚之外觀型態
Figure 1-2 The appearance of common types of tunas.

以下為常見鮪魚種類介紹：

(1) 黑鮪 (*Thunnus thynnus*)

英文名：Northern bluefin tuna

俗名：黑甕串

分類上屬鱸目、鯖科、鮪屬。為體型最大之鮪類，主要分布北半球的溫帶海域，包括大西洋（含地中海）及北太平洋海域。屬高度洄游性魚種，體長最大可達 300 cm、體重達 680 kg。每年 3~5 月為主要漁季。而太

平洋黑鮪則在每年 4~7 月間會洄游經臺灣東部海域，為我國小型延繩釣季節性作業之高經濟魚種，常被當作生魚片食用 (Caton et al., 1990)。

(2) 長鰭鮪 (*Thunnus alalunga*)

英文名：albacore

俗名：白肉串

分類屬鱸目、鯖科、鮪屬。體背藍黑、腹部銀白色，胸鰭特長且超過臀鰭是最明顯之特徵，因此名為長鰭鮪。廣範分布於三大洋之熱帶、溫帶海域，北緯可達 45~50 度間，南緯可達 30~40 度間之海域，惟赤道南北緯 10 度間較少發現其蹤跡。一般約體長 40~100 cm 間。其棲息之溫範圍在 10~28°C 之間，而最適水溫為 10~20°C 之冷水域 (Caton et al., 1990)。

(3) 南方黑鮪 (*Thunnus maccoyii*)

英文名：Southern bluefin tuna

俗名：油串

分類上屬鱸目、鯖科、鮪屬。南方黑鮪主要分布在三大洋南緯 30~50°C 之間的溫帶水域，屬高度洄游性魚種，體長最大可達 225 cm、體重達 200 kg 以上。在印度洋區其平均體長範圍在 160~200 cm 之間。南方黑鮪與黑鮪外形上主要之差別為南方黑鮪之胸鰭較長、尾部之隆起稜為黃色。較常出現之覓食場所多在 20°C 以下之冷水域，最適水溫約在 10~15°C 之間。目前所知之產卵場在爪哇、印尼南部與澳洲西北部海域 (Caton et al., 1990)。

(4) 大目鮪 (*Thunnus obesus*)

英文名：bigeye tuna

俗名：大目串、短鮪

分類上屬鱸目、鯖科、鮪屬。頭高眼大是其最明顯之特徵。大目鮪廣泛分布於三大洋之熱帶、亞熱帶海域，約為南、北緯 40 度間之海域。體長最大可達 200 cm、體重 200 kg 以上。其適水溫範圍在 10 ~ 15°C 之間。肉色鮮紅柔軟，主要漁獲銷售市場為供應日本生魚片市場 (Collette et al., 1983)。

(5) 黃鰭鮪 (*Thunnus albacores*)

英文名：yellowfin tuna

俗名：串仔

分類上屬鱸目、鯖科、鮪屬。體背藍黑色、腹部銀白色，第二背鰭與臀鰭呈黃色，廣泛分布於三大洋之熱帶、亞熱帶海域，約為南、北緯 40 度間之海域。體長最大可達 200 cm、體重 170 kg 以上，一般約體長 150 cm。其棲息之水溫範圍在 18 ~ 31°C 之間，游泳於躍溫層上下之水域，最適水溫為 19 ~ 26°C。它的肉質較為堅硬、味道清淡，比較不會有鮪魚特殊的氣味 (孫，1991)。

(6) 正鰹 (*Katsuwonus pelamis*)

英文名：skipjack

俗名：煙仔、卓鯤

分類上屬鱸目、鯖科、正鮪屬。魚體呈紡垂狀，腹部銀白色，側線下方有 4 ~ 10 條暗灰色之條紋。一般體長約在 80 cm，體重約為 8 ~ 10 kg。最大體長可達 100 cm、體重約 30 kg。分布於三大洋熱帶及溫帶水域。正鰹常群聚於表層水域，魚群經常伴隨著漂浮物、鯨、鯊或其它鮪類，並且有跳躍、索餌及海面產生泡沫等特徵 (孫，1991)。

(二) 副產品 (by-product) 的利用

人類所捕撈或養殖的水產物，大部分均是被用來當作食物來使用，但是像一些價值較低的魚介類或經加工後所廢棄的物質 (如：魚頭、魚骨、

魚尾、魚鰭、內臟等)，如可再次利用製成適當用途的產品，這些產品則稱之為水產加工副產品 (by-product) (Kim and Mendis, 2006)。

舉例來說，鮪魚罐頭工廠約有原料 20~25% 的魚頭及內臟，以及 10~15% 的煮熟皮、骨刺以及血合肉等副產品產生 (林和林, 1990)。此外，這些副產品的利用大多製成為經濟價值不高的魚油、魚粉及寵物飼料、魚溶漿等 (Choudhury and Bublitz, 1996)。

(三) 鮪魚血合肉 (tuna dark muscle) 及其營養價值

鮪魚血合肉位於魚體側線皮下處，具有較高含量的蛋白質，約佔全身的 5~10%，是魚肉特有的現象，其肌肉組織內儲存較多血含氧以及血液的地方 (Qian et al., 2007)。另外，也含有豐富的鐵、維生素 A、B₁、B₂、B₁₂、硫等主要元素，其中也含高含量之胺基酸，包含牛磺酸 (taurine)、甲肌肽 (anserine) 及肌酸 (creatine)，主要生理功能為貯存氧氣、調節體溫、供應骨骼生長、調節細胞滲透壓、防止膽結石形成、降低膽固醇、血糖、血脂以及調節神經衝動等作用 (Suzuki et al., 1987)。

三、 蛋白質水解

(一) 蛋白質之水解方法

蛋白質水解方法常見有 2 種，分別為酸水解以及酶水解。分別敘述如下：

(1) 酸水解：

利用強酸來分解蛋白質是很有效率的方法，可以將蛋白質完全分解成游離胺基酸。有研究指出，此法雖然有效率，但所製成的水解產物可能產生具有有毒致癌物質如：mono-chloropropanol (MCP)、dichloropropanol (DCP) (Manley and Ahmedi, 1995)。

(2) 酶水解：

利用酶分解而獲得分子量較低的短肽與胺基酸混合物，這些小分子肽易被人體吸收。另外，酶對蛋白質之水解作用使水解物具有以下三種特性：分子量降低、離子性基 (ion group) 數目增加及疏水性基 (hydrophobic group) 暴露 (Godfrey and West, 1996)，這些特性都會使蛋白質之官能基產生變化，進而達到增加保水性、改善乳化等目的 (Mahmoud, 1994)。蛋白質之水解度以 degree of hydrolysis (DH) 來表示，當 DH 越高表示肽鍵被切的數目越多，就會有許多游離胺基酸、低分子量肽生成 (鄭, 1997)。

雖然酸水解蛋白質之效率遠高於酶水解之方式，但酸水解會破壞水解物的原有功能特性，並使得 L-form 的胺基酸轉變成 D-form 胺基酸，因此形成如 lysinoalanine 等毒性物質 (Lahl and Grindstaff, 1994)，故後來基於健康訴求，酶水解方式逐漸取代酸水解方式。

(二) 酶的種類及特性

酶為一種由細胞的原生質所生成的高分子量蛋白質，在一定的溫度和酸度範圍內，仍促進特定的有機化合物發生特定的化學變化，而酶本身則不受到任何影響 (賴, 2006)。蛋白質藉由各種不同之胺基酸以共價鍵 (covalent bond) 方式相互結合而成，而每一個胺基酸羧基 (-COOH) 與另一胺基酸之胺基 (-NH₂) 間的共價鍵稱為肽鍵 (peptide bond)。

蛋白酶之分布相當廣泛，包括微生物、植物界及動物界，大致可分為外肽酶 (exopeptidase)，其主要作用於在游離之 α -胺基或 α -羧基之肽以及內肽酶 (endopeptidase)，其作用於蛋白質而切斷內部肽鍵兩大類 (Adler-Nissen, 1986)。另外也有學者以活性中心觸媒特性，將蛋白酶分為以下 4 大類，並將分別敘述如下：

(1) 絲胺酸型蛋白酶 (serine proteases)

是以絲胺酸 (serine; Ser) 為其觸酶活性有關之胺基酸殘基 (amino acid residue)。如：胰蛋白酶 (trypsin) 和胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin) 及

一些菌類分泌酶如：枯草菌酶 (subtilisin) 等皆是。絲胺酸型蛋白酶，幾乎均屬於內肽酶，可以水解蛋白質及胜肽類基質 (張，1977)。

(2) 硫醇型蛋白酶 (thiol proteases)

是以半胱胺酸 (cysteine; Cys) 為其活性中心最有關之胺基酸殘基。因 Cys 分子中含有 SH 基故得其名。此類均存在植物界為多，如：木瓜酶 (papain) 及鳳梨酶 (bromelain) 等 (張，1977)。

(3) 金屬型蛋白酶 (metalloproteases)

此類分子中含有重金屬，如：鋅，其金屬之有無與酶活性有密切關係，故得此稱，如：羧基側胜肽酶 A 及 B (carboxypeptidase A 和 B) (張，1977)。

(4) 酸性型蛋白酶 (acid proteases)

此群酶之活性最適酸鹼度在酸性範圍 (pH 1.0 ~ 5.0) 內，故謂 acid protease。如：胃蛋白酶 (pepsin) 及凝乳酶 (rennin) (張，1977)。

(三) 酶之影響因子

酶是一種可以催化與調節生物體內的物質，可有效完成許多生理活動。倘若細胞內酶活動受到抑制劑干擾【表1-1】，或溫度、pH 值、金屬與鹽類及水活性等因素，均可影響酶的活性及反應速率，最後使得整個生物體就可能出現異狀 (王等，2001)。

表 1-1 蛋白酶專一性及其抑制劑
Table1-1 Protease specificity and inhibitor.

種類	範例	專一性	抑制劑
serine proteases	chymotrypsin	aromatic	DFP
	trypsin	basic	TPCK
			TLCK
thiol proteases	papain	non-specific	PCMB Leupeptin
metalloproteases	carboxyl	non-polar	EDTA
	peptides A		EGTA
acid proteases	pepsin	non-specific	Pepstatin
	renin		

(Dressler and Potter, 1991)

(四) 潛在問題

蛋白質利用酶水解後，會受到酶種類、受質、水解條件不同而產生不同程度的苦味，其這些苦味主要來源來自水解液中的胜肽 (Adler-Nissen, 1986)，其鏈長可短至 2~3 個胺基酸，也可以長達數十個胺基酸不等，由於這些疏水性胺基酸暴露，如：纈胺酸 (valine; Val)、異白胺酸 (isoleucine; Iso)、苯丙胺酸 (phenylalanine; Phe)、色胺酸 (tryptophan; Trp)、離胺酸 (leucine; Leu)、酪胺酸 (tyrosine; Tyr) 而導致苦味的產生 (Pederson, 1994)。如何降低蛋白質水解物的苦味，將會成為未來再開發產品之考慮因素之一。

(五) 蛋白質水解物性質介紹及應用

蛋白質為高分子有機化合物，係由碳、氫、氧、氮所構成，另有少量的硫和磷等成分。凡是動植物體中皆有存在，蛋白質主要構成最小單位為胺基酸 (賴等, 2006)。其功能為提供人體生長發育維持所需的胺基酸與能

量 (每公克可產 4 kcal)。食品中蛋白質不僅是胺基酸的提供者，經人體消化或食品加工過程中經酶水解後，可達增進營養特性、延緩腐敗時間、改善質地、增加或降低溶解度、增進起泡特性、增進乳化特性、除去異味等 (Lahl and Grindstaff, 1994)。另外，不同水解程度的蛋白質水解物之含氮化合物的組成分亦不相同，故水解前後的分子量大小則會影響到蛋白質水解物的成膠能力、乳化性質、濃稠度、風味、溶解度等功能性質 (Mahmoud, 1994)。如：蛋白質經水解後有特殊的呈味，可供食品作為食品增味劑，如麩胺酸鈉 (mono-sodium-L-glutamate; MSG) (賴等，2006)；另外，也可以產生短胜肽及易被人體吸收利用，以提高利用率，食入後不易被人體中的抗體辨識，故不會引發過敏反應，可以應用在特殊食品或是嬰兒食品的使用上 (Godfrey and West, 1996)。

四、 自由基與抗氧化

(一) 自由基種類

正常的化學物質通常是由原子和分子構成，同時攜帶成對電子來維持化學狀態的安定。而自由基表示軌域上具有一個或多個不成對電子而獨立存在的原子、離子或分子或任何包含奇數電子之化學物質 (Halliwell and Gutteridge, 1989)。而不成對電子是相當不穩定，通常自由基為了使結構穩定下來，會攻擊細胞內正常的原子，搶奪他們的電子造成殺傷力。如此週而復始的氧化還原電子轉移循環，稱之為自由基連鎖反應 (free radical chain reaction)。

在一般正常生理狀態下，生物體本身具有抗氧化防禦系統，產生抗氧化酶及抗氧化物來移除自由基與活性氧物種 (reactive oxygen species; ROS)，並修護系統修補所引發的傷害，一旦有疾病或是營養不良，體內的抗氧化物質會減少，平衡系統就會被破壞，自由基與活性氧物種就會增加，而 ROS 為人體代謝產生反應活性較基態氧強的含氧物種，像一些外來物質如藥物、致癌物及生活壓力等因素也會加速自由基產生，由於自由基與 ROS 反應

相當快速，當長期暴露在氧化壓力很大的情況下，自由基便會隨意攻擊細胞【表 1-2】，如：細胞中主要成分中的蛋白質、脂質、酶、醣類、DNA、RNA 等，因而導致嚴重氧化性傷害，最後可能會導致疾病發生像是糖尿病、癌症、神經退化、發炎、心血管疾病、中風、降低免疫力等疾病 (Butterfield et al., 2002; Kim et al., 2009; Pryor, 1982; Sheu et al., 2006)。

而常見 ROS 其組成包括以氧為中心的自由基及其他和氧有關的自由基，其分類如下：

(1) 超氧陰離子 (superoxide anion; $O_2^{\cdot-}$)

超氧陰離子是一個以氧為中心的自由基，不成對電子位於氧原子上，最主要來源是經由粒線體內膜上的電子傳遞鏈過程產生，是連鎖反應的起始因子 (initiator)，但反應有限且半衰期短，主要啟動產生其他 ROS，如：過氧化氫 (hydrogen peroxide; H_2O_2)、氫氧自由基 (hydroxyl radical; $\cdot OH$)、單態氧 (singlet oxygen) 等，生物體內的氧化壓力增加造成傷害 (Nordberg and Arner, 2001)。

(2) 過氧化氫 (hydrogen peroxide; H_2O_2)

過氧化氫在水中或是油脂中可以輕易的擴散，對細胞或組織的傷害很大，過氧化氫可以通過細胞膜，與體內的 Fe^{2+} 反應產生傷害性更大的氫氧自由基；超氧陰離子與過氧化氫在 Fe^{2+} 的作用下經由 Haber-Weiss 反應產生氫氧自由基，反應機制如下 (Nordberg and Arner, 2001)：

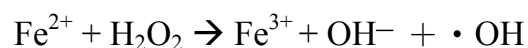


表 1-2 活性氧物種攻擊體內細胞所造成的影響

Table1-2 Effects of reactive oxygen species damage to lipids, proteins and DNA.

Oxidative damage to lipids
● Occurs via several mechanisms of ROS reacting with fatty acids in the membrane lipid bilayer, leading to membrane leakage and cell death.
● In food, lipid peroxidation causes rancidity and development of undesirable odors and flavors.
Oxidative damage to proteins
● Site-specific amino acid modifications (specific amino acid differ in their susceptibility to ROS attack)
● Fragmentation of the peptide chain
● Aggregation of cross-linked reaction products
● Altered electrical charge
● Increased susceptibility to proteolysis
● Oxidation of Fe-S centers by $O_2^{\cdot -}$ destroys enzymatic function
● Oxidation of specific amino acid “marks” proteins for degradation by specific proteases
● Oxidation of specific amino acid (e.g., Try) leads to cross-linking
Oxidation damage to DNA
● DNA deletions, mutations, translocations
● Base degradation, single-strand breakage
● Cross-linking of DNA to proteins

(Scandalios, 2005)

(3) 氫氧自由基 (hydroxyl radical; $\cdot OH$)

氫氧自由基是以氧為中心的自由基，主要是由經過氧化氫及超氧陰離子作用而產生 (陳，2000)。氫氧自由基是生物體內反應性及傷害性最大的自由基之一，可在自由基產生部位發生立即性反應，同時，也被認為是脂質過氧化的主要起始因子 (呂，1993)。

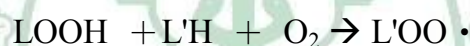
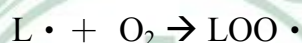
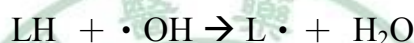
(4) 單態氧 (singlet oxygen; 1O_2)

體內穩定狀態的氧受到紫外線照射後會形成極易反應的單態氧，因電子逆向旋轉使氧分子處於能階較高的激發狀態且易與氫反應，此種單態氧

會直接攻擊不飽和脂肪酸經氧化作用形成氫過氧化物 (Dziezak, 1986)。

(5) 脂質過氧化氫 (lipid hydroperoxide; LOOH)

脂質過氧化是指存在身體內的多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid; PUFA) 受到氫氧自由基的氧化傷害，不飽和脂肪酸的雙鍵與氫氧自由基作用後會失去一個氫原子形成脂自由基 (L·)，當氫氧自由基得到一個氫原子形成水分子，接著一連串的連鎖反應，脂質自由基獲得氧分子形成過氧化脂自由基 (LOO·)，而過氧化脂自由基會結合附近脂質上的氫原子形成 LOOH，一連串的連鎖反應引起聚合作用，使得脂質最後可能會形成塊狀，進而破壞細胞膜蛋白質 (Nordberg and Arner, 2001)。



(二) 抗氧化劑作用之原理與機制

隨著時代的進步，快步調的生活使國人更易受到外在因子（工作壓力、環境污染、紫外線傷害），內在因子（遺傳、感染）以及生活習慣（熬夜、飲食不良、喝酒、抽菸和過度藥物使用）等危險因子影響，增加與自由基接觸的機會，而產生過量的自由基，可能導致疾病發生 (Je et al., 2004)。抗氧化劑，顧名思義為在低濃度下可以明顯抑制或延緩氧化的發生 (Ranathunga et al., 2006)，而不同的抗氧化劑可在氧化系統中扮演不同程度的作用。儘管動物體內具有抗氧化防禦系統可產生抗氧化物來降低體內自由基對於組織器官的傷害，但往往無法達到完全防禦的效果，因此需藉由額外的營養補充以減輕體內的氧化壓力。

常見抗氧化劑有過氧化氫酶 (catalase)、穀胱胺過氧化酶 (glutathione peroxidase; GSHPx)、維生素C (vit C)、維生素E (vit E)、β-胡蘿蔔素 (β-carotene)、butylated hydroxyanisole (BHA)、butylated hydroxytoluene

(BHT)、allopurinol 等，可見【表1-3】。以下是依具不同作用區分為 4 大類：

(1) 自由基終止型 (free radical terminator)

為是所謂的一級抗氧化劑，此類抗氧化劑大多為酚類，具苯酚環(phenolic hydroxyl group) 結構，可釋放出氫原子與自由基反應，以終止連鎖反應的進行其作用機制主要是干擾起始期自由基的形成或延遲連鎖增殖(propagation) 期作用，如：食品常用之 BHT、BHA、tertiary butylhydroquinone (TBHQ) 及 vit E 皆是此類 (Giese, 1996; Shahidi and Wanasundara, 1992)。

(2) 還原劑或氧清除劑 (reducing agent or oxygen scavengers)

主要藉由抗氧化劑本身氧化還原能力來抑制氧化。作用機制再於轉移氫原子及捕捉氧原子，將已被氧化的過氧化物還原，來減緩氧化作用進行，提供一個傾向還原狀態的環境。此類抗氧化劑可有效清除或不活化 $O^2\cdot$ 、 $\cdot OH$ 、peroxyl radicals ($ROO\cdot$) 等含氧自由基或是非自由基之 H_2O_2 ，使 ROS 喪失起始及加速氧化反應進行能力 (Namiki and Osawa, 1986)。

(3) 金屬螯合劑 (chelating agent)

主要作用可與金屬產生螯合作用而間接延緩自由基氧化作用的進行。當食品中含有金屬離子，即使含量少依然具有脂質氧化的作用。此類抗氧化劑本身無抗氧化效果，卻可螯合 Cu^{2+} 或 Fe^{2+} 等促進氧化能力強之離子，達到抗氧化的效果如：檸檬酸 (citric acid)、磷酸 (phosphoric acid) 及 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 等 (Dziezak, 1986)。

表 1-3 常見抗氧化劑

Table1-3 The commons of antioxidants.

Non-enzymatic antioxidant molecules		
Antioxidant molecules	Subcellular location	
Ascorbate (vitmin C)	Plastid; apoplast; cytosol; vacuole	
β -Carotene	Plastid	
Glutathione, reduce (GSH)	Plastid; mitochondrion; cytosol	
Polyamines (e.g., putrescine, spermine)	Nucleus; plastid; mitochondrion; cytosol	
α -Tocopherol (vit E)	Cell and plastid membranes	
Zeaxanthin	Chloroplast	
Antioxidant enzymes		
Enzyme	EC number	Subcellular location
Ascorbate peroxidase	1.11.1.11	Plastid stroma and membranes
Peroxidases (non-specific)	1.11.1.7	Cytosol; cell-bound
Catalase	1.11.1.6	Glyoxysome; peroxisome; cytosol; mitochondria
Superoxide dismutase (SOD)	1.15.1.1	Cytosol (Cu/ZnSOD); plastid (Cu/ZnSOD; FeSOD); mitochondrion (MnSOD); peroxisome
Dehydroascorbate reductase	1.8.5.1	Cytosol; plastid
Glutathione reductase	1.6.4.2	Mitochondrion; cytosol; plastid
Monodehydroascorbate reductase	1.6.5.4	Plastid stroma
Glutathione S-transferases	2.5.1.18	Cytosol; microsomal

(Scandalios, 2005)

(4) 單態氧抑制劑 (singlet oxygen inhibitor)

主要以破壞單態氧而抑制光氧化反應之進行。如： β -胡蘿蔔素、蕃茄紅素 (lycopene)、三乙基胺 (triethylamine) 等皆具有捕捉單態氧的能力 (Foot, 1976)。

而上述 2~4 項之抗氧化劑屬二級抗氧化劑，可以延緩氧化發生或者是將自由基轉變成穩定之分子而終止自氧化反應。

第二章 文獻探討

一、食物活性胜肽 (food-derived bioactive peptides) 之探討

一般而言，胜肽可以小到只有兩個胺基酸的雙肽，也可以複雜的長鏈或環狀多肽，且多半經過醣苷化 (glycosylation)、磷酸化 (phosphorylation)、醯化 (acylation) 衍生，顯示胜肽在細胞生理及代謝功能調節上，扮演相當重要角色。在食品應用上，胜肽或是蛋白質水解物已逐漸取代胺基酸作為氮源，主要是胜肽的滲透壓及通透性高於胺基酸 (陳, 1999)。許多來自食物中的蛋白質已經被證實具有生物活性，而這些活性胜肽可直接來自食物本身或從植物、動物中經過腸胃道消化或酶作用、食品發酵等方式獲得 (Korhonen and Pihlanto 2003)。在日常生活中常見的食物，如：禽肉 (Saiga, 2003)、魚肉 (Klompong et al., 2009; Mendis et al., 2005)、牛奶 (Meisel, 1998; Quiros et al., 2006)、大豆 (Pena-Ramos and Xiong, 2003; Zhong et al., 2007)、雞蛋 (Davalos et al., 2004; Sakanaka et al., 2004) 等，均發現具有豐富的生理活性的物質。其生理活性還包含抗菌 (antimicrobial) (Gobbetti et al., 2004)、類嗎啡 (opioid) (Meisel, 1998)、礦物質結合 (mineral-binding) (Li et al., 1989; Mellander, 1950)、抗血酸 (antithrombotic) (Chabance et al., 1995)、抗氧化 (antioxidative) (Byun et al., 2009; Qian et al., 2008; Sheih et al., 2009; Song et al., 2008)、調節免疫 (immunomodulatory) (Korhonen and Pihlanto, 2003)、降膽固醇 (cholesterol-lowering effect) (Zhong et al., 2007)、降血壓 (antihypertensive) (Je et al., 2005; Qian et al., 2007; Quiros et al., 2006) 等，以下分別介紹活性胜肽於人體各個系統的功能【圖 2-1】。

Cardiovascular system	Nervous system	Gastrointestinal system	Immune System
		Mineral binding	Immunomodulatory
Hypocholesterolemic		Antimicrobial	
Antioxidative		Opioid antagonist	
Antithrombotic		Opioid agonist	

(Hartmann and Meisel, 2007)

圖 2-1 食物活性胜肽之功效

Figure 2-1 Functions of food-derived bioactive peptides.

(一) 腸胃道系統 (gastrointestinal system)

(1) 礦物質結合特性 (mineral-binding)

食物中的蛋白質及胜肽在腸胃道中扮演調控的重要角色。Caseinophosphopeptides (CPPs) 早在 50 多年前被研究出可改善兒童佝僂症 (rachitic infants) 的症狀 (Mellander, 1950)。另外，可抑制 Ca^{2+} 在迴腸的沉澱，避免 Ca^{2+} 形成一些不溶性鹽類而流失 (Li et al., 1989)。

(2) 抗菌 (antimicrobial)

絕大部分抗菌胜肽可快速地殺掉目標細胞，且可以廣泛作用在各種微生物，如：格蘭氏陽性菌 (Gram-positive bacteria)、格蘭氏陰性菌 (Gram-negative bacteria)、酵母菌、絲狀真菌 (filamentous fungi)。所有抗菌胜肽都是帶有訊息序列較大的前驅物蛋白，是經由蛋白酶降解所產生。一般抗菌胜肽大約是由 12~50 個以下胺基酸所組成，其中疏水性胺基酸就占 50% (Rydlo et al., 2006)。

(3) 食慾控制 (antiappetizing)

Caseinomacropetide (CMP) 可抑制胃液的分泌、減慢胃收縮、刺激膽囊收縮素 (cholecystokinin; CCK) 釋放且會分泌到十二指腸幫助食物消化 (Yvon et al., 1994)。

(二) 心血管系統 (cardiovascular system)

(1) 降血壓 (antihypertensive)

降高血壓胜肽大多為短胜肽，通常帶有極性胺基酸側鏈，如：脯胺酸 (proline; Pro)，有研究指出，經 casein 分離出 Ile-Pro-Pro 之片段具有降血壓之功效，其半抑制濃度 (IC₅₀) 為 5.0 μM (Kohmura et al., 1989)，亦有自豬血漿中水解出之 angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide，其胺基酸序列為 Leu-Val-Leu (Hazato and Kase, 1986)。

(2) 抗氧化 (antioxidative)

一些蛋白質經水解產生的胜肽可抑制自氧化反應及過氧化物的含量，並阻止對人體有害的自由基形成。這些胜肽大多可抓住重金屬或促進過氧化物的分解。在後面蛋白質水解物相關抗氧化活性會詳加探討。

(3) 抗血栓 (antithrombotic)

κ-Casein 經 rennin 作用後可產生 glycomacropeptide，此胜肽可抑制血小板凝集和抑制纖維蛋白結合血小板的表面接收器，而達到抗血栓效果 (Chabance et al., 1995)。

(4) 降膽固醇 (cholesterol-lowering effect)

部份蛋白質或胜肽已被證實具有降膽固醇之功效，其中以大豆蛋白研究最為廣泛，Zhong et al. (2007) 指出大豆蛋白經 alcalase 作用所產生之蛋白質水解物，可降低小鼠體內 24% 血清膽固醇 (cholesterol) 及 34% 低密度脂蛋白 (LDL-C)；大豆球蛋白 (glycinin) 之蛋白質水解物可水解出一條四胜肽，此序列為 Leu-Pro-Tyr-Pro，也可以降低血膽固醇 (Kwon et al., 2002)。

(三) 免疫系統 (immune system)

牛奶中的 casein 或是 whey 之蛋白質水解物可藉由刺激淋巴細胞增

生、刺激抗體生成、調節細胞激素來增進免疫功能。這些具有免疫調節的胜肽，稱為 immunomodulatory peptides 或 cytomodulatory peptides。免疫調節胜肽可降低過敏患者之過敏症狀，增強腸道黏膜的免疫功能 (Korhonen and Pihlanto, 2003)。Kayser et al. (1996) 發現 lactorphin 及 κ -casein 中的胺基酸序列 Tyr-Gly 和 Tyr-Gly-Gly 皆具刺激人體周邊血液淋巴球增生。

(四) 神經系統 (nervous system)

類鴉片 (opioid)

類鴉片胜肽是一種被廣泛研究的活性胜肽，主要作用在神經系統，如：鎮靜、促進睡眠等。由 β -casein 水解所得之 β -casomorphins，可延長食物在腸胃中停留時間，增加食物中水分和電解質被吸收的機會，而達到抗腹瀉功能。此外，還可刺激胰島素分泌等功能 (Meisel, 1998)

由此可知，活性胜肽在人體的心血管系統、腸胃系統、免疫系統、神經系統都扮演重要的調控能力，而加強在食品及藥品應用的可能性。

二、蛋白質水解物之相關抗氧化活性探討

食物中所含的抗氧化物質除了可降低食物中之脂質氧化還可以抑制人類由於脂質氧化作用所引發的疾病或是老化現象 (Ames, 1989)，人工合成之抗氧化劑，如丙基沒食子酸 (*n*-propyl gallate)、BHA 和 BHT 早已在食品工業上大量被利用於食品保存及抗氧化 (Halliwell et al., 1995)，雖然可以有效延緩脂質氧化速率，但有文獻指出大量食用人工抗氧化劑之動物會造成畸胎，或是引起癌症發生 (Branen, 1975)。因此，有許多學者想嘗試開發安全與天然的抗氧化物質，並了解其對人體的生理功效與作用機制，以期能加以應用。

食物中的活性胜肽可利用酶水解，來切斷蛋白質的胜肽鍵而獲得的，近年來有許多研究學者針對蛋白質水解物進行探討，蛋白質水解物可來自於許多不同來源，像是海藻 (Sheih et al., 2009)，蛋黃 (Sakanaka et al., 2004)，

大豆蛋白 (Pena-Ramos and Xiong, 2003), 明蝦 (Suetsuna et al., 2000), 豬肝 (吳, 1998), 胡瓜魚 (Amarowicz and Shahidi, 1997) 等, 而這些蛋白質水解物中都被發現具有抗氧化活性胜肽。目前常見抗氧化活性分析研究包含抑制亞麻油酸過氧化作用 (inhibition of linoleic acid autoxidation)、還原力 (reducing power)、亞鐵離子螯合能力 (metal ion chelating activity)、清除 DPPH 自由基能力 (DPPH radical scavenging activity)、清除氫氧自由基 (hydroxyl radical)、總抗氧化能力 (trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC) 以及氧自由基吸收能力 (oxygen radical absorbance capacity; ORAC) 等, 許多文獻中發現胜肽片段或蛋白質水解物相較於蛋白質或胺基酸有很好的抗氧化活性, 這表明胜肽在抗氧化系統中扮演了一個很重要的角色【表 2-2】。例如: 鯖魚肉以 protease N 水解後, 測定其抗氧化活性, 發現水解物在 1,400 Da 之胜肽相較於 900 Da 及 200 Da 之胜肽具有較好的抑制亞麻油酸過氧化作用 (6.5 天)、清除 DPPH 自由基能力 (15.4%) 及還原力之吸光值為 0.08 (Wu et al., 2003)。將大豆蛋白分成加熱及未加熱組, 利用 pepsin、papain、chymotrypsin、alcalase、protamex 和 flavourzyme 水解, 結果顯示其 DH 介於 1.7 ~ 20.6% 之間且抗氧化活性介於 28 ~ 65%, 故可有效降低 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), 抑制丙二醛 (malondialdehyde; MDA) 生成 (Pena-Ramos and Xiong, 2002)。Chen et al. (1995) 研究經大豆蛋白質水解物分離出 6 種活性胜肽, 發現由 5 ~ 16 個胺基酸組成不等, 其中包含了 N 端之 Val 和 Leu 以及序列中之 Pro、組胺酸 (histidine; His) 或 Tyr。利用魚的腸內酶 (mackerel intestine crude enzyme) 來水解 Alaska pollack, 經薄膜過濾 (ultrafiltration; UF) 可得 5 個區分物, 其中又以分子量在 1 kDa 以下的胜肽具有較強的抗氧化活性, 再經分離純化後所得胺基酸序列為 Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr, 其分子量約為 672 Da, 且抑制氫氧自由基能力為 35% (53.6 μ M), 顯示出小分子量胜肽較具有較佳抗氧化活性 (Je et al., 2005)。鯖魚蒸煮液利用三種不同蛋白水解酶 (protease XXIII、orientase、papain) 在其各適溫度 (依序為

37°C、50°C、25°C) 進行水解，探討所得蛋白質水解物之還原力、TBARS、清除 DPPH 自由基能力等抗氧化活性；結果發現所得三種指標皆以 protease XXIII 蛋白質水解物在水解 3hr 之抗氧化活性最佳，因此再利用凝膠過濾法分割，得 5 個主要區分物，其中以 B 和 C 區分物中的胜肽物質擁有較佳的抗氧化特性，其分子量介於 390 ~ 1,400 Da，接者再利用 HPLC 分離 B 和 C 區分物中的胜肽物質，最後定序後，可分別得到 Pro-Ser-His-Asp-Ala-His-Pro-Glu、Ser-His-Asp-Ala-His-Pro-Glu、Val-Asp-His-Asp-His-Pro-Glu、Pro-Lys-Ala-His-Glu、Pro-Ala-Glu-Tyr、Pro-His-His-Ala-Asp-Ser、Val-Asp-Tyr-Pro 這 7 種抗氧化活性胜肽。這些胜肽幾乎是由 4 ~ 8 個胺基酸殘基所組成，其中包括有 Val、絲胺酸 (serine; Ser)、Pro、His、丙胺酸 (alanine; Ala)、天冬胺酸 (aspartic acid; Asp)、離胺酸 (lysine; Lys)、麩胺酸 (glutamic acid; Glu)、甘胺酸 (glycine; Gly) 和 Tyr 等 10 種不同的胺基酸殘基，其清除 DPPH 自由基能力為 66 ~ 81% (饒, 2002)。

Chen et al. (1996) 根據大豆蛋白水解物分離出之抗氧化活性胜肽為 Leu-Leu-Pro-His-His，並合成出 28 種胜肽序列，研究發現移除 C 端的 His 會降低抗氧化活性，但移除 N 端的 Leu 則無影響。在胜肽序列中，His 和 Pro 扮演著重要的抗氧化活性，在這些片段中又以 Pro-His-His 最具抗氧化活性。另外，經由卵白水解物分離出的最佳抗氧化活性胜肽為 Ala-His-Lys，其抗氧化活性是受 Ala-His 影響而非 His-Lys 或是游離胺基酸 (Tsuge et al., 1991)。

綜合以上結果均顯示，這些蛋白質水解物都具有抗氧化活性的特性，且抗氧化活性特性與還原力、清除自由基能力及螯合金屬離子能力具有密切的關係。通常具抗氧化活性胜肽分子量大約介於 500 ~ 1,800 Da (Jun et al., 2004; Kim et al., 2007; Ranathunga et al., 2006; Wu et al., 2003) 且 N 端如有疏水性胺基酸 (Val 或 Leu) 或序列中含有 Pro、His、Ala、Tyr、Trp、甲硫胺酸 (Methionine; Met) 和半胱胺酸 (Cysteine; Cys) 等胺基酸皆發現具有抗氧化活性 (Chen et al., 1995; Elias et al., 2006; Kim et al., 2001;

Uchida and Kawakishi, 1992), 甚至有些抗氧化活性胜肽與 α -生育醇在亞麻油酸 (linoleic acid) 乳化系統中之抗氧化活性相近 (Dong et al., 2008)。蛋白質是由 20 個胺基酸排列組成, 藉由彼此間交互作用可清除自由基。有文獻指出芳香族胺基酸如: Trp 和 Tyr 具有抗氧化活性, 因結構所含的吲哚 (indolic) 和酚基 (phenolic) 環可當作氫的供應者或提供電子而清除自由基, 以形成更穩定的 indoyl 和 phenoxyl 自由基 (Hernandez-Ledesma et al., 2005; Suetsuna, 2000)。雖然抗氧化胜肽可有效清除自由基, 機制尚未不明。His 雙胜肽也發現具有抗氧化活性, 可能原因是可貢獻氫原子來抑制脂質過氧自由基誘發, 此外, His 具有咪唑 (imidazole) 環可與金屬離子螯合 (Chan et al., 1994)。蛋白質水解物之抗氧化活性與原料、蛋白酶種類、水解度、胺基酸組成分、分子量及胜肽之胺基酸序列皆有關係 (Chen et al., 1998; Kim et al., 2001; Peña-Ramos et al., 2004)。其中蛋白酶的專一性是為主要因素, 酶之種類會直接影響水解時的胜肽結合位置與數目, 進而影響蛋白質的 DH 以及蛋白質水解物的特性, 因此可藉由選擇蛋白酶來預先決定蛋白質哪一部份會被分解, 哪些胺基酸可以特別使用在特殊胺基酸之間來分解, 而哪些蛋白酶可以再任意胺基酸之間分解 (鄭, 1999)。利用酶水解的方式常用在製備活性胜肽, 一般酶來源可分為來自微生物之 alcalase、neutrane、flavourzyme; 來自植物之 papain、bromelain、ficin; 來自動物之 pepsin、trypsin (Guérard, 2007)。另外,【表 2-1】為常見的商業蛋白酶介紹。

表 2-1 常見的商業蛋白酶介紹

Table 2-1 Lists of commercial proteases.

Enzyme	Source	Type of proteases	Typical pH range ^a	Preferential specificity ^b	註
Pepsin	<i>animals Ox, pig</i>	aspartic protease	1-4	aromatic -COOH and NH ₂ , Leu-, Asp-, Glu-COOH	酸性 蛋白酶
Trypsin		serine protease	7-9	Lys-, Arg-COOH	
Chymotrypsin		serine protease	8-9	Phe-, Tyr-, Trp-COOH	
Papain (pure/crude)	<i>plants papaya fruit</i>	cystein protease	5-7 (pure)	Lys-, Arg-, Phe-X-COOH	中性 蛋白酶
		Mixture of papain, chymopapain and lysozyme	5-9 (crude)	Broad specificity	
Alcalase	<i>bacteria bacillus licheniformis</i>	serine protease	6-10	broad specificity, mainly hydrophobic -COOH	鹼性 蛋白酶
Neutrase	<i>bacillus amyloliquefacie ns (B. subtilis)</i>	metalloprotease	6-8	Leu-, Phe-NH ₂ and other	中性 蛋白酶
Fungal protease	<i>fungi Aspergillus oryzae (A. sojae)</i>	mixture of aspartic protease, metalloprotease, serine protease, carboxypeptidase	4-8	very broad specificity	

(Adler-Nissen, 1986)

^a Indicated application conditions.^b Terminal amino acid after cleavage.

表 2-2 蛋白質水解物之抗氧化活性胜肽

Table 2-2 Protein hydrolysates of antioxidative peptides.

Source	Enzyme	Peptide sequence	Scavenging activities of IC ₅₀ *	Reference
Venison	papain	1. Met-Gln-Ile-Phe-Val-Lys-Thr-Leu-Thr-Gly (9,854 Da) 2. Asp-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Gln-Gly-Val-Leu (11,213 Da)	Hydroxyl radical: 44 µg/mL DPPH radical: 77 µg/mL Superoxide radical: 217 µg/mL Peroxyl radical: 85 µg/mL	(Kim et al., 2009)
Chicken essence	TCA 萃取法	A1 : His-Val-Thr-Glu-Glu A2 : Pro-Val-Pro-Ala-Glu-Gly-Val	Inhibition on autoxidation of linoleic acid (day): A1: 0.003 Days/µg A2: 0.722 Days/µg	(Wu et al., 2005)
Marine rotifer	pepsin	1. Leu-Leu-Gly-Pro-Gly-Leu-Thr-Asn-His-Ala (1,076 Da) 2. Asp-Leu-Gly-Leu-Gly-Leu-Pro-Gly-Ala-His (1,033 Da)	DPPH radical scavenging activity: 1. 189.8 µM 2. 167.7 µM	(Byun et al., 2009)
Bullfrog skin	alcalase	Leu-Glu-Glu-Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Glu-Gly-Cys-Glu (1,487 Da)	DPPH radical: 16.1 µM hydroxyl radical: 12.8 µM superoxide radical: 34.0 µM peroxyl radical: 32.6 µM	(Qian et al., 2008)
Sardinelle	crude enzyme extract from viscera of sardine	Leu-His-Tyr (431.2 Da)	DPPH radical: 63 ± 1.57% at 150 µg/mL	(Bougatef et al., 2010)
Hoki frame protein	pepsin	Glu-Ser-Thr-Val-Pro-Glu-Thr-His-Pro-Ala-Cys-Pro-Asp-Pro-Asn (1801 Da)	DPPH radical: 41.37 µM hydroxyl radical: 17.77 µM peroxyl radical: 18.99 µM superoxide radical: 172.10 µM	(Kim et al., 2007)
Conger eel muscle	trypsin	Leu-Gly-Leu-Asn-Gly-Asp-Asp-Val-Asn (928 Da)	hydroxyl radicals: 74.1 µM carbon-centered radicals: 78.5 µM	(Ranathunga et al., 2006)

*IC₅₀ means the half maximal inhibitory concentration.

三、 水產副產品活性物質之探討

以魚的加工為例，大多以全魚方式販售或是製成罐頭食品，在加工過程中使用均為肌肉等可食部位且以取片 (filet) 為主，但其剩餘的如魚皮、魚頭、魚鰭、魚尾、內臟等皆廢棄不用。有研究指出這些物質具有活性成分 (Kim et al., 2001; Je et al., 2005)，可提供營養，促進健康，並提高經濟價值，以下為水產副產品之活性物質探討。

(1) 魚皮 (fish skin):

加工過後所剩的魚皮可經分離出膠原蛋白 (collagen) 和明膠 (gelatin)，被運用在食品、化妝品、生物醫學等工業上。膠原蛋白和明膠含有豐富的非極性胺基酸，如 Gly、Ala、Val 及 Pro。明膠之胜肽具有獨特的序列為 [Gly-Pro-Ala]_x，有研究指出明膠經由酶水解後可產生抗氧化活性胜肽 (Kim et al., 2001; Mendis et al., 2005)。此外，也有研究發現，Gly-Pro-Ala 在動物模式中還可以累積膳食中鈣的吸收和增加 Ca²⁺ 的生物可利用率 (bioavailability) (Kim et al., 1998)。

(2) 魚油 (fish oil):

魚油含量多寡取決於種類、飲食、地理環境、生殖和季節不同而有所改變，一般含量介在 2~30% 不等，其來源可自加工後所廢棄的內臟。魚油其主要是由 2 種形式的脂肪酸 (fatty acid) 所組成，分別為 ω-3 系列之不飽和脂肪酸之 eicosapentaenoic acid (EPA) 和 dicosahexaenoic acid (DHA)。ω-3 脂肪酸具有多樣的生理活性，研究指出，魚油可降低血清中的膽固醇，促進內皮細胞修復，降低血壓和改善發炎等症狀 (Kris-Etherton et al., 2003)，另外，也發現飲食中的魚油可以加速葡萄糖吸收，以維持正常血糖的代謝 (Berry, 1997)。

(3) 魚骨 (fish bone) :

魚骨是經魚肉分離下來的所剩的骨架，其中有機酸部分之膠原蛋白占 30% (Nagai et al., 2004)，剩餘還有 60~70% 的非有機酸物質，主要是磷酸鈣 (calcium phosphate) 和羥基磷灰石 (hydroxyapatite) 所組成。小魚體中含有豐富鈣來源，可有效被人體所吸收利用 (Larsen et al., 2000)。

(4) 魚肉蛋白 (fish muscle protein) :

經加工過後所剩餘得殘肉經酶作用之水解物可顯現不同的生理生化等特性且這些所含蛋白質為完全蛋白質，如：Sliver carp 魚肉以 alcalase 及 flavourzyme 進行水解，結果發現所得蛋白質水解物分子量都小於 5,000 Da，且當分子量越小，溶解性越佳，其因短肽具有較多極性的側基，可與 H^+ 結合，提升溶解度。抗氧化活性及 DH 方面，皆以 alcalase 水解所生成之蛋白質水解物為最佳 (Dong et al., 2008)。

四、 鮪魚加工副產品活性肽之探討

活性肽來自於動物、植物、微生物中水解出來，其中動物性肽可分為陸生及水生動物，但大部分的活性肽都取自陸生居多，較少以水生動物做探討。就目前鮪魚加工副產品之保健功能研究，有利用蒸煮液、血合肉、肝臟、骨頭等為原料進行。文獻指出，鮪魚蒸煮液利用發現具有降低血壓、抗氧化的功用 (Hwang and Ko, 2004; Jao and Ko, 2002)。利用大目鮪魚血合肉分別經由 alcalase、 α -chymotrypsin、pepsin、papain、neutrase 和 trypsin 等酶作用 8 hr，其中又以 pepsin 作用為最佳，結果發現可產生具有抗氧化活性肽為 H-Leu-Asn-Leu-Pro-Thr-Ala-Val-Tyr-Met-Val-Thr-OH (APTDM) (1,222 Da)，測定其抗氧化活性，發現可有效清除 DPPH 自由基、氫氧自由基、超氧陰離子、烷基自由基，其 IC_{50} 分別為 40.1 μ M、29.4 μ M、65.5 μ M 以及 24.5 μ M，接者更進一步做細胞實驗，也發現可有效清除細胞內 ROS、增加

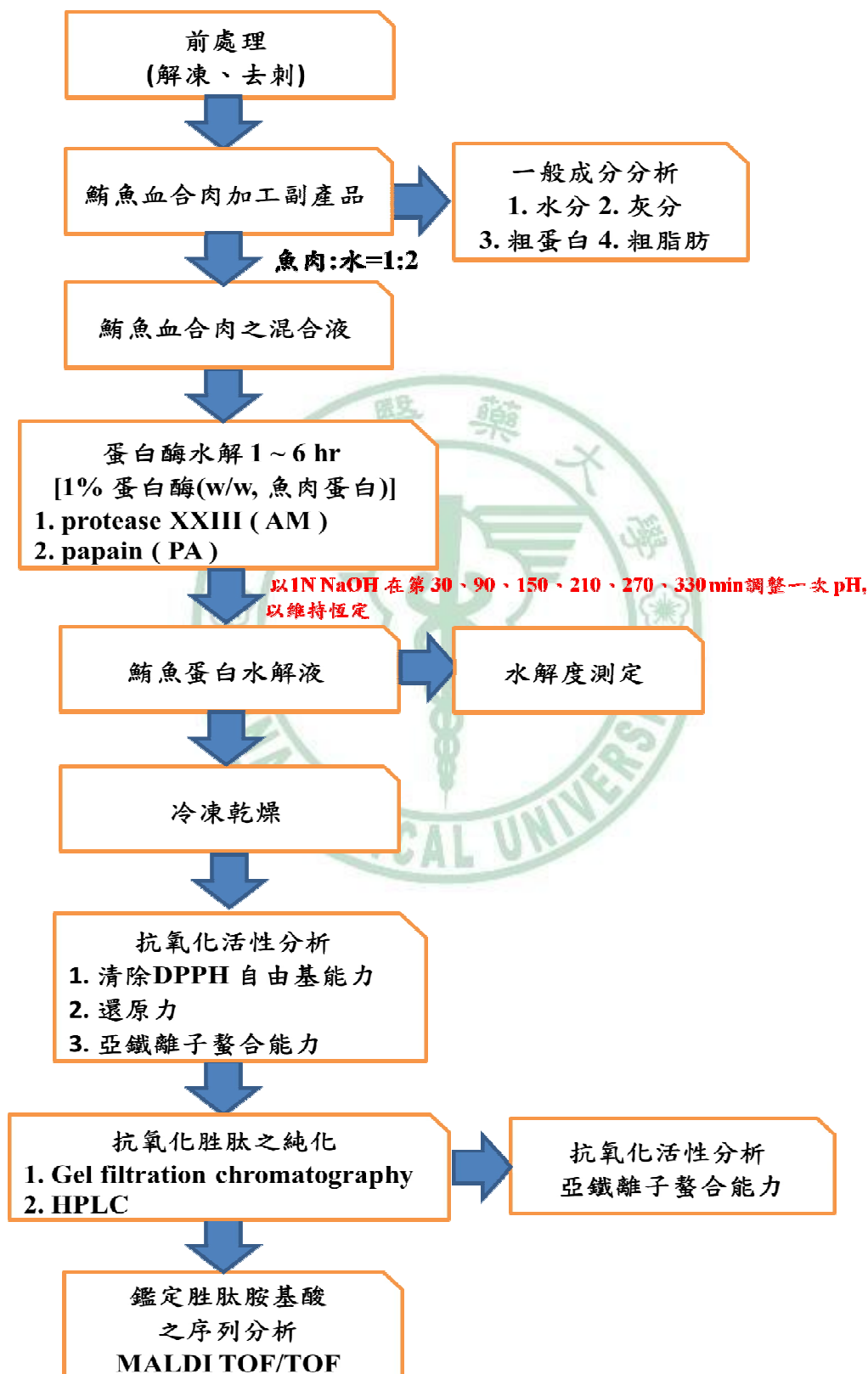
細胞存活度，未來可運用於保健食品或藥品開發 (Je et al., 2008)。此外，鮪魚血合肉發現可以有效抑制 ACE 的活性，具有降血壓功效 (Qian et al., 2007)。鮪魚骨之 peptic 水解物，經一系列的抗氧化活性測定及分離純化，最後經 Q-TOF ESI mass 可定序出一條最具抗氧化活性胜肽，此序列為 Val-Lys-Ala-Gly-Phe-Ala-Trp-Thr-Ala-Asn-Gln-Gln-Leu-Ser (1,519 Da) (Je et al., 2007)。由這些文獻顯示，鮪魚加工副產品是具有良好之生理機能與營養價值。

五、 研究目的

根據以上所述，抗氧化活性會受原料、蛋白酶種類等影響，以文獻指出蛋白質水解物可產生具抗氧化活性胜肽，且發現胜肽之胺基酸組成大多含有疏水性胺基酸。Protease XXIII 為混合型蛋白酶其作用位置為疏水性或芳香族胺基酸之 C 端肽鏈；papain 為硫醇型蛋白酶其作用位置為 Phe、Tyr、Leu、Glx、His 等胺基酸殘基之 C 端肽鏈 (Loffer, 1986; 張, 1997)。故本實驗擬利用鮪魚罐頭工廠所生產之血合肉加工副產品為原料，以作用於疏水性胺基酸之市售商業蛋白酶 protease XXIII (AM) 及 papain (PA) 在最適條件下水解 1~6 hr，測定其蛋白質水解物之 DH 及抗氧化活性，將具最佳抗氧化活性之蛋白質水解物進行凝膠過濾分劃其分子量分布範圍及 RP-HPLC 分離純化，並鑑定此抗氧化活性胜肽之胺基酸序列，以期能未來可應用於機能性食品之開發，進而提升副產品的經濟價值。

第三章 材料與方法

一、實驗設計



二、 實驗材料

(一) 鮪魚加工副產品

取自興毅冷凍食品工業股份有限公司 (嘉義, 台灣) 之鮪魚血合肉加工副產品, 以熱封袋分裝密封, 用覆冰法將原料運回實驗室, 置於 -20°C 下凍藏, 使用前先放置 4°C 冰箱解凍。

(二) 商業蛋白酶

本實驗所使用 2 種商業蛋白酶, 敘述如下【表 3-1】:

1. protease XXIII : 來自 *Aspergillus oryzae*, 屬 aspartic protease, metaballoprotease, carboxypeptidase, serine protease 混合型, 最適作用條件溫度為 37°C , pH 7.5。活性單位 3.2 units/mg solid (P4032, Sigma Co., USA)。
2. papain : 來自 *papaya latex*, 屬 cysteine protease 型, 最適作用條件溫度為 25°C , pH 6.2。活性單位 1.8 units/mg solid (P3375, Sigma Co., USA)。

表 3-1 商業蛋白酶之基本性質

Table 3-1 Basic properties of commercial protease.

Enzyme	protease XXIII	papain
Brand	Sigma	Sigma
Source	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Papaya latex</i>
Type	Aspartic protease, metalloprotease, carboxypeptidase, serine protease	Cysteine protease
Opt. pH	7.5	6.2
Opt. Temp.	37°C	25°C
Activity Specificity	3.2 units*/mg solid	1.8 units**/mg solid
Mark	AM	PA

* One unit will hydrolyze casein to produce color equivalent to 1 μ mole (181 μ g) of tyrosine per min at pH 7.5 at 37°C. (cited from Sigma Co.).

** One unit will hydrolyze one micromole of N-alpha-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) per minute at pH 6.2 at 25°C. (cited from Sigma Co.).

三、 實驗藥品

本實驗所使用藥品及廠牌如下：

藥品名稱	廠牌
a. 標準品	
ethylenedinitrilotetraessigsäure dinatriumsalz-2-hydrate (EDTA)	Ferak Eark Berlin
2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT)	Sigma
L-leucine	Sigma
L-ascorbic acid (vit C)	和光
bacitracin	Sigma
b. 一般試藥	
2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS)	Sigma
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma
3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulphonic acid)-1,2,4-triazine (Ferrorzine)	Sigma
ferrous chloride 4-hydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	J.T. Baker
ferric chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	島久
potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	島久
sodium sulfite, anhydrous (Na_2SO_3)	島久
sea sand	CHONEYE PURE CHEMICALS
sodium sulfate, anhydrous (Na_2SO_4)	島久
sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	CHONEYE PURE CHEMICALS
sodium phosphate dibasic ($\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	CHONEYE PURE CHEMICALS

其它一般化學試劑皆為試藥級

c. HPLC 級試藥

acetonitrile (ACN)

J.T. Baker

trifluoroacetic acid (TFA)

Alfa Aesar

methanol (MeOH)

Merck



四、 實驗儀器及設備

本實驗所使用儀器及廠牌如下：

儀器名稱	廠牌/型號	製造商/國家
pH meter	SUNTEX SP-2200	SUNTEX Instruments Co., Ltd., Taipei, Taiwan.
恆溫水浴鍋	YIH DER BT-150D	YIH DER Information Technology Co., Ltd., Taipei, Taiwan.
冷凍離心機	Hitachi himac CR21	Hitachi Instruments Co., Ltd., Tokyo, Japan.
分光光度計	Hitachi U-2000 Spectrophotometer	Hitachi Instruments Co., Ltd., Tokyo, Japan.
ELISA 光度計	Bio Tek μ QUANT	Bio Tek Instruments, Inc., U.S.A.
冷凍乾燥機	EYELA FDU-2000	Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan.
灰化爐	NEY M-525	Barkmeyer Division Yucaipa., Canda, U.S.A.
烘箱	YIH DER DK-500D	YIH DER Information Technology Co., Ltd., Taipei, Taiwan.
電子天平	AND GR-200	Mandarin Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan.
電磁加熱攪拌器	FARGO HMS-102	Macro Furtunate Co., Ltd., Taipei, Taiwan.
多用途試管 振盪器	Vortex-Genie G-560	Scientific Industries Inc., New York, U.S.A.

凝膠過濾器 (gel filtration)	pump : PERISTA pump	ATTO Bioscience &
	SJ-1211 H	Biotechnology., China.
	fraction collector :	Toyo Seisakusho Kaisha,
	ADVANTEC CHF 121 SA	Ltd., Tokyo, Japan.
	recorder : Opilcal unit type	Teledyne Isso Inc.,
	11	Lincoln NE, U.S,A.
	detector : Teledyne ISCO	Teledyne Isso Inc.,
	UA-6	Lincoln NE, U.S,A.
高效能液相層 析儀 (HPLC)	pump : ELITE LaChrom	Hitachi Instruments Co., Ltd., Tokyo, Japan.
	L-2130	
	autosampler : L-2200 UV detector : L-2400	

五、 實驗方法

(一) 基本成分分析

(1) 水分測定 (moisture)

1. 實驗步驟：

水分測定是參考 AOAC (1995) 之方法。精秤樣品重 3~5 g 於預先恆重的秤量瓶 (W_0) 並紀錄樣品與秤量瓶重 (W_1)，置於恆溫烘箱中，設定溫度 105°C 乾燥 24 hr 後，冷卻秤重，直至恆重 (W_2) 為止。

恆重的定義為：前後 2 次的稱量結果，重量差為 1 mg 以下。

2. 計算公式：

$$\text{moisture (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

W_0 ：秤量瓶的重量 (g)

W_1 ：秤量瓶的重量 + 樣品的重量 (g)

W_2 ： W_1 乾燥至恆重時的重量 (g)

(2) 灰分測定 (ash)

1. 實驗步驟：

灰分測定是參考 AOAC (1995) 之方法。精秤樣品重 3~5 g (W_{ash0}) 於預先恆重的坩堝 (W_{ash1}) 並紀錄樣品與坩堝重，置於灰化爐中，於 600°C 灰化 4~6 hr 後，至樣品殘灰呈灰白色粉末狀，冷卻秤重，直至恆重 (W_{ash2}) 為止。

2. 計算公式：

$$\text{ash (\%)} = \frac{W_{ash2} - W_{ash1}}{W_{ash0}} \times 100$$

W_{ash0} ：樣品的重量 (g)

W_{ash1} ：坩堝的重量 (g)

W_{ash2} ：樣品灰化後的重量 (g)

(3) 粗蛋白測定 (crude protein)**1. 實驗步驟：**

粗蛋白測定是參考 semimicro Kjeldahl method (李等, 2000) 稍作修改。精秤樣品重 1 g, 放入分解瓶中, 再加入 20 g K_2SO_4 及 1 g $CuSO_4$, 最後緩慢加入 40 mL 濃硫酸於分解瓶中, 置於微波消化器 ($400^\circ C$) 進行分解 1~2 hr 後, 靜置冷卻後, 加入 200 mL 蒸餾水與分解瓶中之液體混合, 並定量到 250 mL。再移至蒸餾裝置, 分別取 20 mL 收集液及 15 mL 飽和氫氧化鈉溶液, 與 25 mL 0.1 N H_2SO_4 溶液加入數滴甲基紅指示劑置於三角瓶中, 來進行蒸餾, 最後以 0.1 N NaOH 溶液滴定三角瓶的收集液, 並紀錄滴定量 (*a*)。空白組 (blank) 則以不加樣品進行分解、蒸餾及滴定 (*b*)。

2. 計算公式：

$$\text{crude protein (\%)} = \frac{(b-a) \times F \times 0.0014^* \times 6.25^{**} \times 100}{S_{pro}}$$

S_{pro} ：樣品重 (g)

a：本試驗的 0.1 N NaOH 標準溶液的滴定量 (mL)

b：空白試驗的 0.1 N NaOH 標準溶液的滴定量 (mL)

F：0.1 N NaOH 標準溶液的力價

力價：以 0.1 N 的草酸標定溶液 (必須正確調製且將標準物質溶解於蒸餾水調至正確的規定溶液當作標定溶液) 以滴定用的試劑溶液滴定標定溶液, 求正確的濃度, 算出力價, 作為滴定用標準溶液。

*：相當於 0.1 N NaOH 標準溶液 1 mL 的氮量 (g)

**：氮係數 (蛋白質平均含有 16% 的氮, 食品中雖除了蛋白質以外還有其他含氮化合物, 但含氮的成分大部分是蛋白質, 因此測量氮量乘以即 16/100 = 6.25 的係數即可求出粗蛋白量。)

(4) 粗脂肪測定 (crude fat)

1. 實驗步驟：

粗脂肪測定是參考 AOAC (1995) 之方法。精秤樣品重 3~5 g (S_{fat})，置於燒杯內，加入無水硫酸鈉 8~10 倍量，再加入少量精緻海砂，充分混合脫水後，乾燥、粉碎，裝入圓桶濾紙內，以索氏萃取器 (soxhlet extractor) 萃取。方法是將恆重後的受器 (W_{fat0}) 加入乙醚至約 2/3 的容積，連結冷凝器及受器在 50°C 水浴槽中加熱。6~8 hr 後，將圓桶濾紙取出，繼續加熱，當受器內乙醚全部移至萃尿管後，卸下受器，再將受器放入 100°C 的烘箱中乾燥 1 hr，然後放在玻璃乾燥器內冷卻，秤重 (W_{fat1}) 直到恆重為止。

2. 公式計算：

$$\text{crude fat (\%)} = \frac{W_{fat1} - W_{fat0}}{S_{fat}} \times 100$$

W_{fat0} ：受器的重量 (g)

W_{fat1} ：脂質萃取後受器的重量 (g)

S_{fat} ：樣品的秤取量 (g)

(二) 鮭魚蛋白水解液製備

參考 Cheng et al. (2007) 的方法，取 50 g 解凍後的鮭魚血合肉加工副產品 (約含 13.595 ~ 14.665 g 的 protein 量)，加入 100 mL 去離子水以 blender 攪拌 2 min，再用 1 N NaOH 調整到最適 pH (AM：pH 7.5；PA：pH 6.2) 並置於恆溫水浴鍋 (轉速 110 rpm) 中在酶最適溫度 (AM：37°C；PA：25°C) 下 20 min。每隔 30 sec 分別加入 1% 蛋白酶 (w/w, 魚肉蛋白重) 進行水解 1~6 hr。以每 1 hr 收集一次，在反應過程中維持 pH 恆定 (以 30、90、150、210、270、330 min 調整一次 pH)。我們將所得混合液立即放入 100°C 沸水浴鍋加熱 20 min 以終止反應，接者放入冰水浴 10 min 中使其冷卻後，

再以 1 N HCl 或 1 N NaOH 調整至 pH 7.0，在 4°C 下以 12000 g 離心 15 min，取上清液，以 Whatman NO.4 濾紙過濾，可得鮭魚蛋白水解液，並裝入塑膠瓶中，秤重，並紀錄之實際重量。

取部分鮭魚蛋白水解液進行 DH 測定，其餘的則用冷凍乾燥機進行冷凍乾燥，收集乾燥粉末，可得鮭魚血合肉加工副產品之蛋白質水解物 (hydrolysate, H) (即為鮭魚蛋白質水解物) 後保存於 -20°C 下備用。

(三) 水解度測定

1. 實驗步驟：

水解度測定參考 Adler-Nissen (1979) 和 Crowell et al. (1985) 之方法稍作修改。取 125 μ L 鮭魚蛋白水解液，加入 2 mL 0.2125 M sodium phosphate buffer (pH 8.2) 及 1 mL 1% TNBS 溶液，於 50°C 水浴 30 min，最後加入 2 mL Na₂SO₃ (終止反應)，混合均勻後，靜置室溫下 15 min，使用分光光度計測定 420 nm 之吸光值。游離胺基酸 (α -amino acid) 以 L-leucine 為表示，故以 L-leucine 為標準品，並繪製其標準曲線【圖 3-1】，樣品之濃度由內差法換算得出。

2. 計算公式：

$$DH(\%) = [(L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)] \times 100$$

L_t ：經不同水解時間所計算出來的游離胺基酸含量。

L_0 ：未經過蛋白酶水解所計算出來的游離胺基酸含量。

L_{max} ：經過酸水解所計算出來的總胺基酸含量 (取鮭魚血合肉加工副產品 0.1 g 加入 40 mL 6 N HCl，放入烘箱 (105°C) 水解 24 hr，冷卻，以 Whatman NO.1 濾紙過濾，再利用 6 N NaOH 調整到 pH 7.0)。

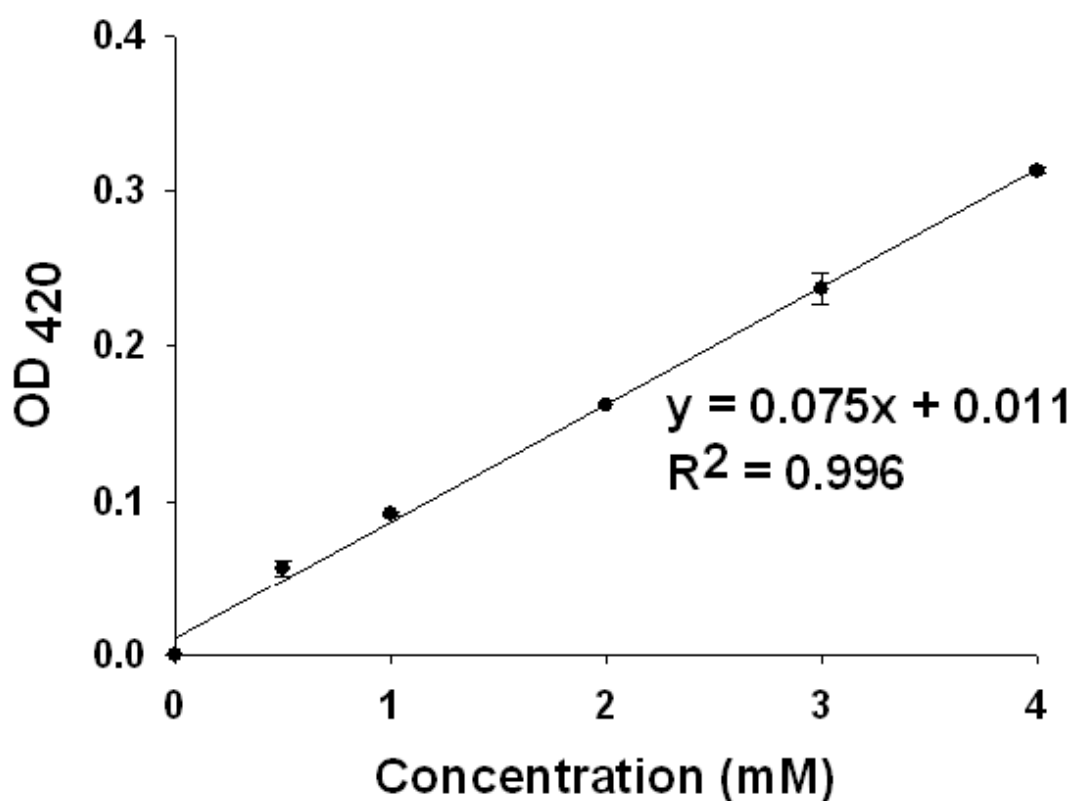


圖 3-1 L-leucine 之檢量線

Figure 3-1 Calibration curves of L-leucine.

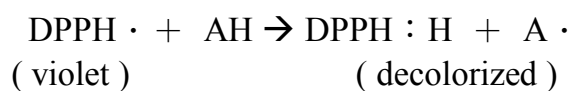
1. The absorbance was measured at 420 nm and α -amino acid was expressed in terms of L-leucine.
2. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

(四) 抗氧化活性分析

(1) 清除 DPPH 自由基能力

1. 原理：

清除 DPPH 自由基能力是參考 Yen and Wu (1999) 之方法稍作修改。DPPH 為一相當穩定的自由基，其甲醇（或乙醇）溶液在 517 nm 有強烈之吸光值，當 DPPH 經由抗氧化劑所提供的 H^+ 將其還原後，其吸光值會降低。故當吸光值越低則表示樣品對 DPPH 自由基的清除能力越強。其反應可能如下：



2. 實驗步驟：

將蛋白質水解物溶於去離子水中，並稀釋成各種濃度 (2.5、5、10、20、40、60 mg of dried extract/mL)，取 1 mL 適當樣品稀釋液，加入 250 μ L 0.05% DPPH 之甲醇溶液 (需新鮮配製)，均勻混合後靜置 30 min，以分光光度計測定 517 nm 之吸光值。並以 L-ascorbic acid 水溶液、BHT 甲醇溶液作為正對照組比較。實驗數據以濃度 v.s 清除 DPPH 自由基能力繪製出線性迴歸曲線，代入迴歸公式求得出 EC_{50} (the effective concentration providing 50% antioxidant activity) 即表示清除 DPPH 自由基能力達 50% 所需的濃度。

3. 計算公式：

$$\text{scavenging activity (\%)} = [1 - (A_{517SC} - A_{517S}) / A_{517C}] \times 100\%$$

A_{517SC} ：樣品原液本身顏色

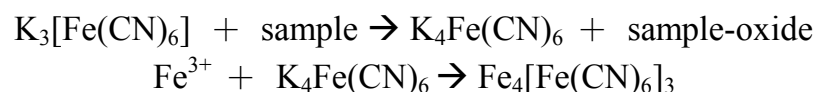
A_{517S} ：樣品之吸光值

A_{517C} ：以去離子水取代樣品之吸光值

(2) 還原力

1. 原理：

還原力參考 Shi et al. (1991) 之方法。還原力測定是以普魯士藍 ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$) 之生成量做為指標。原理是將赤血鹽 [$K_3Fe(CN)_6$] 還原成黃血鹽 [$K_4Fe(CN)_6$]，黃血鹽與 Fe^{3+} 形成普魯士藍，藉由測量 700 nm 下之吸光值的變化來檢驗還原力大小，當吸光值越高表還原力越強。其反應可能如下：



2. 實驗步驟：

先將蛋白質水解物溶於去離子水中，並稀釋成各種濃度 (2.5、5、10、15、

20、30 mg of dried extract/mL), 取 250 μ L 適當樣品稀釋液, 加入 125 μ L 1% $K_3Fe(CN)_6$ 及 125 μ L 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6), 於 50°C 水浴中反應 20 min 後, 迅速冷卻, 再加入 125 μ L 之 10% TCA、1250 μ L 去離子水及 125 μ L 0.1% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 混合均勻反應 10 min, 以分光光度計測定其 700 nm 之吸光值, 並以 L-ascorbic acid 水溶液、BHT 甲醇溶液作為正對照組比較。實驗數據以濃度 v.s OD_{700} 繪製出線性迴歸曲線, 代入迴歸公式求得 EC_{50} (以吸光值為 0.5 所需濃度則表還原力之 EC_{50})。

(3) 亞鐵離子螯合能力

1. 原理：

亞鐵離子螯合能力是參考 Boyer and Craig (1987) 之方法。金屬離子的促氧化作用為造成脂質過氧化的主因之一, 只需要少量的金屬離子, 便可藉由氧化還原循環 (redox cycle) 反應產生自由基, 其會促進脂質氧化作用的進行。在多種金屬離子中, Fe^{2+} 是最具影響力的助氧化劑, 而 ferrozine 對於 Fe^{2+} 具有特異性之結合力, 其所形成之複合物在 562 nm 波長下有最大吸光值, 藉此吸光值的變化, 可測得樣品對 Fe^{2+} 的螯合能力。當樣品螯合 Fe^{2+} 時, 會造成 562 nm 吸光值的降低, 其反應可能如下：



2. 實驗步驟：

先將蛋白質水解物溶於去離子水中, 並稀釋成各種濃度 (2.5、5、10、15、20、30 mg of dried extract/mL), 取 400 μ L 適當樣品稀釋液, 加入 40 μ L 2 mM $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 及 1480 μ L 去離子水, 最後再加入 80 μ L 5 mM ferrozine, 混合均勻後, 靜置 20 min 後, 以分光光度計測定其在 562 nm 之吸光值, 吸光值越低, 表示樣品亞鐵離子螯合能力愈強。並以 EDTA 作為正對照組比較。實驗數據以濃度 v.s 亞鐵離子螯合能力繪製出線性迴歸曲線, 代入迴歸公式

求得出 EC_{50} 即表示亞鐵離子螯合能力達 50% 所需的濃度。

3. 計算公式：

$$\text{chelating activity (\%)} = [1 - (A_{562\text{ SC}} - A_{562\text{ S}}) / A_{562\text{ C}}] \times 100\%$$

$A_{562\text{ SC}}$ ：樣品原液本身顏色

$A_{562\text{ S}}$ ：樣品之吸光值

$A_{562\text{ C}}$ ：以去離子水取代樣品之吸光值

(五) 抗氧化活性胜肽之分離純化

(1) 抗氧化活性胜肽之分子量分布

1. 實驗步驟：

胜肽之分子量分布是參考 Astawan et al. (1995) 方法。將具抗氧化活性胜肽予以分離純化。取 50 mg 鮪魚蛋白質水解物，將分別溶於 1 mL 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 中，再利用 0.45 μm 濾膜過濾，取上清液，再將其注入膠過濾管柱 (Sephadex G-25 column, 2.5 \times 50 cm) 進行第一次分離，以每 10 min 的方式收集區分物，再將收集到的不同區分物冷凍乾燥，最後將區分物配製濃度為 10 mg of dried extract/mL 並進行亞鐵離子螯合能力測定，以了解具有抗氧化活性之胜肽分子量分布，再選其最佳區分物進行高效能液相層析法純化。標準品分子量以 bacitracin (1,423 Da) 在以上述相同條件下沖提標定之。

(2) 抗氧化活性胜肽之純化

參考 Qian et al. (2008) 之方法稍做修改。取最具抗氧化活性區分物 10 mg 溶於 1 mL 0.1% TFA，再利用 0.45 μm 濾膜過濾，取上清液，取 90 μL 注入 HPLC 管柱 (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 \times 250 mm)。分析條件如下：A 液為去離子水；B 液為溶於 acetonitrile 之 0.1% TFA；並以 B 液

5 ~ 15%/20 min 的濃度梯度為移動相；移動相流速為 1 mL/min，再將收集到的不同區分物冷凍乾燥，並將區分物配製濃度為 0.5 mg of dried extract/mL 並利用 ELISA 光度計進行亞鐵離子螯合能力測定，最後將最佳抗氧化活性胜肽片段進行胜肽之胺基酸序列鑑定。

(六) 抗氧化活性胜肽之胺基酸序列鑑定

將最佳抗氧化活性胜肽送至中國醫藥大學貴重儀器中心以輔助雷射脫附游離飛行式質譜儀 [Matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometer, MALDI TOF / TOF (Bruker Daltonics, UltraFlex III)] 鑑定胜肽之胺基酸序列。

分析條件：

ion source : maldi

m/z range : 200 ~ 4000

sequence analysis : bruker biotool software 3.2

(七) 統計分析

本實驗數據皆三重覆並以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 做表示，採用 SPSS 統計套裝系統軟體作單因子變異係數分析並以鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 法測定各組間之差異，當 $p < 0.05$ 表示有顯著差異。

第四章 結果

一、 一般成分分析

參考 AOAC (1995) 方法，將鮪魚血合肉加工副產品做一般成分的分析，包括：水分、灰分、粗蛋白、粗脂肪之基本成分測定【表 4-1】。鮪魚血合肉加工副產品之組成分，其中粗蛋白占 28.26%，水分含量占 68.96%，灰分含量占 1.42%、粗脂肪占 2.18%。

二、 水解度

本實驗利用鮪魚血合肉加工副產品分別加入不同 2 種商業蛋白酶分別為 AM 和 PA，其各最適溫度分別為 37°C 及 25°C 和最適 pH 值 7.5 及 6.2，於此條件下反應 1 ~ 6 hr 後，測定其 DH 之變化【圖 4-1】。DH 表示則是經不同水解時間所釋放出來的游離胺基酸占總胺基酸含量之比值。以 L-leucine 為標準品，並繪製其標準曲線【圖 3-1】換算出游離胺基酸的含量來求得出在不同水解時間下之 DH。發現 L-leucine 在濃度 4 mM 以下與吸光值 (OD_{420}) 可呈線性關係 ($R^2 = 0.996$)，故選用濃度範圍為於 0 ~ 4 mM。此外，當水解條件一定時，DH 隨著水解時間增加而增加。在水解 0 ~ 1 hr 間，不論是 AM 或 PA 蛋白質水解物，DH 則有顯著上升趨勢 ($p < 0.05$)。其水解 1 hr 時所測得 DH 分別為 13.35% 和 12.71%。當 AM 蛋白質水解物在水解 6 hr 時，DH 為 29.93%；PA 蛋白質水解物在水解反應 1 ~ 5 hr 過程中，DH 則無顯著變化，當水解 5 hr 時，DH 為 15.30%，爾後隨水解時間增加則 DH 有顯著上升，至 6 hr 時其 DH 為 18.43% ($p < 0.05$)。

因此，本實驗將更進一步探討鮪魚血合肉加工副產品經蛋白酶水解後的蛋白質水解物在不同時間下的抗氧化活性。

表 4-1 鮪魚血合肉加工副產品之一般成分分析

Table 4-1 The proximate compositions of tuna dark muscle by-product.

Compositions	Content (%) ^a
Crude protein	28.26 ± 1.51
Crude fat	2.18 ± 0.55
Ash	1.42 ± 0.16
Moisture	68.96 ± 0.81

^a All values are means ± standard deviation of data from triplicate.



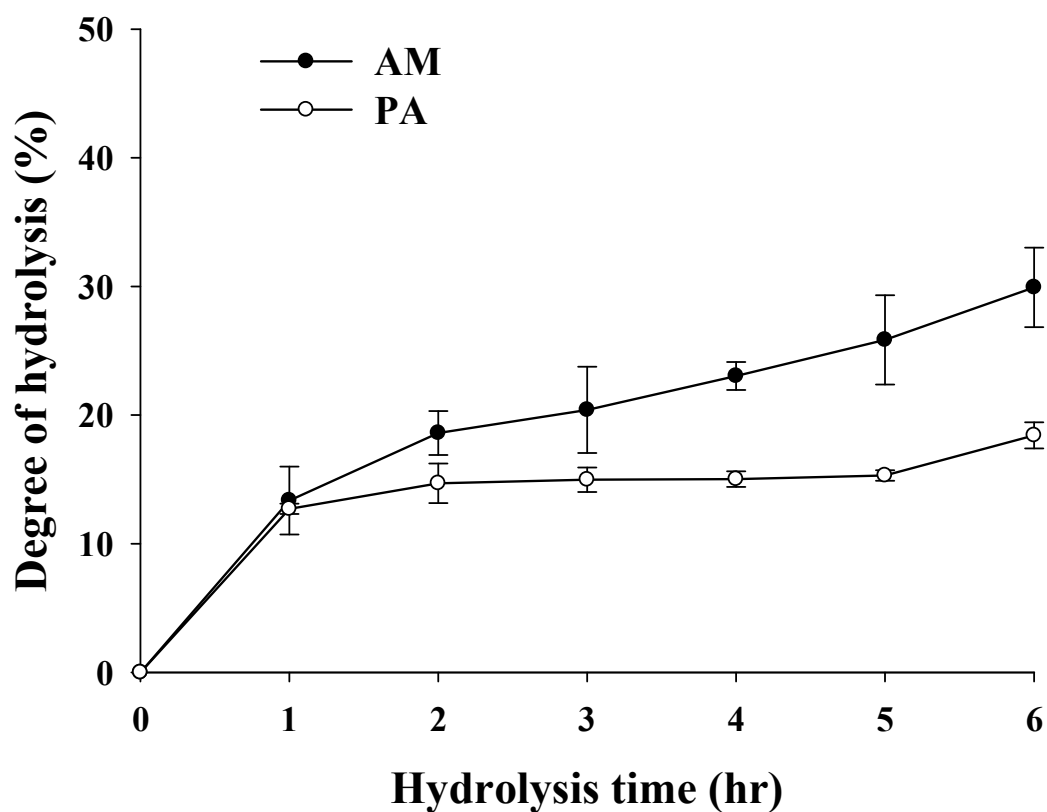


圖 4-1 鮪魚血合肉加工副產品經蛋白酶 (AM、PA) 水解後之水解度變化
Figure 4-1 Changes in degree of hydrolysis of tuna dark muscle by-product hydrolyzed by proteases (AM、PA).

1. Tuna dark muscle by-product were hydrolyzed with AM (37°C; pH 7.5) and PA (25°C ; pH6.2) for 1 ~ 6 hr.
2. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

三、 鮭魚蛋白質水解物之抗氧化活性分析

為了解鮭魚蛋白質水解物之抗氧化活性，故本研究針對不同水解時間下的 AM 及 PA 蛋白質水解物，進一步以清除 DPPH 自由基能力、還原力、亞鐵離子螯合能力為測定指標，探討各時間點下蛋白質水解物與抗氧化活性之相關性，分別以 L-ascorbic acid、BHT、EDTA 為正對照組。實驗數據是以不同濃度繪製出之線性迴歸曲線，並計算求出其 EC_{50} 。

(一) 清除 DPPH 自由基能力

本實驗是利用 AM 與 PA 兩種蛋白酶進行水解 1~6 hr，測定不同水解時間下鮭魚蛋白質水解物清除 DPPH 自由基能力。結果顯示，在水解過程中，AM 及 PA 蛋白質水解物之清除 DPPH 自由基能力則會隨濃度增加而增加 (0~60 mg of dried extract/mL) 【圖 4-2 及圖 4-3】，當濃度達 60 mg of dried extract/mL 時，清除 DPPH 自由基能力都達 70% 以上。進一步，我們藉由不同濃度點求得出各個水解時間下的 EC_{50} 即清除 50% 的 DPPH 自由基能力所需的濃度【表 4-2】。發現在水解 1~6 hr 過程中，清除 DPPH 自由基能力以水解 3 hr 的 AM 蛋白質水解物可顯著高於其他水解時間下的蛋白質水解物 ($p < 0.05$)，其 EC_{50} 為 17.13 mg of dried extract/mL。另外，在水解 1~3 hr 過程中，PA 蛋白質水解物的清除 DPPH 自由基能力則無顯著性差異 ($p > 0.05$)，但隨著水解時間 (2~6 hr) 增加，發現清除能力會逐漸下降 (EC_{50} 從 15.32 提升至 32.96 mg of dried extract/mL)。以整體來看，還是以水解 2 hr 的 PA 蛋白質水解物具有較佳的清除 DPPH 自由基能力，其 EC_{50} 為 15.32 mg of dried extract/mL。本實驗以 BHT 作為正對照組 【圖 4-4】，結果顯示 BHT 在 1.25 mM (0.275 mg/mL) 濃度下與清除 DPPH 自由基能力呈線性關係 ($R^2 = 0.992$)，且當濃度高於 1.25 mM 則趨於平衡，其清除能力最高為 90.10% ($EC_{50} = 0.18$ mg/mL)。

表 4-2 鮪魚蛋白質水解物清除 DPPH 自由基能力之 EC₅₀Table 4-2 EC₅₀ of DPPH radical scavenging activity of protein hydrolysates derived from tuna dark muscle by-product.

Hydrolysis time	AM		PA	
	EC ₅₀ (mg dried of extract /mL)	Equation, R ²	EC ₅₀ (mg dried of extract /mL)	Equation, R ²
1	23.71 ± 2.36 ^b	y = 1.971x + 3.265, 0.975	17.69 ± 1.25 ^a	y = 2.792x + 0.601, 0.994
2	24.40 ± 1.65 ^b	y = 1.963x + 2.084, 0.984	15.32 ± 1.36 ^a	y = 3.148x + 1.780, 0.992
3	17.13 ± 1.13 ^a	y = 2.912x + 0.107, 0.997	16.81 ± 0.51 ^a	y = 2.891x + 1.390, 0.990
4	24.08 ± 3.23 ^b	y = 1.978x + 2.355, 0.981	23.42 ± 0.57 ^b	y = 1.937x + 4.627, 0.963
5	24.31 ± 2.82 ^b	y = 1.954x + 2.479, 0.983	25.94 ± 1.83 ^b	y = 1.798x + 2.683, 0.971
6	25.93 ± 2.94 ^b	y = 1.875x + 1.364, 0.985	32.96 ± 2.56 ^c	y = 1.492x + 0.810, 0.984
BHT	0.180 ± 0.005	y = 277.2x - 0.748, 0.992		

- ^{a-c} Values with different superscript letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).
- *EC₅₀ means the effective concentration of protein hydrolysates providing 50% DPPH radical scavenging activity.
- All values are means ± standard deviation of data from triplicate.
- Regression equations were obtained from linear region of AM and PA protein hydrolysates.

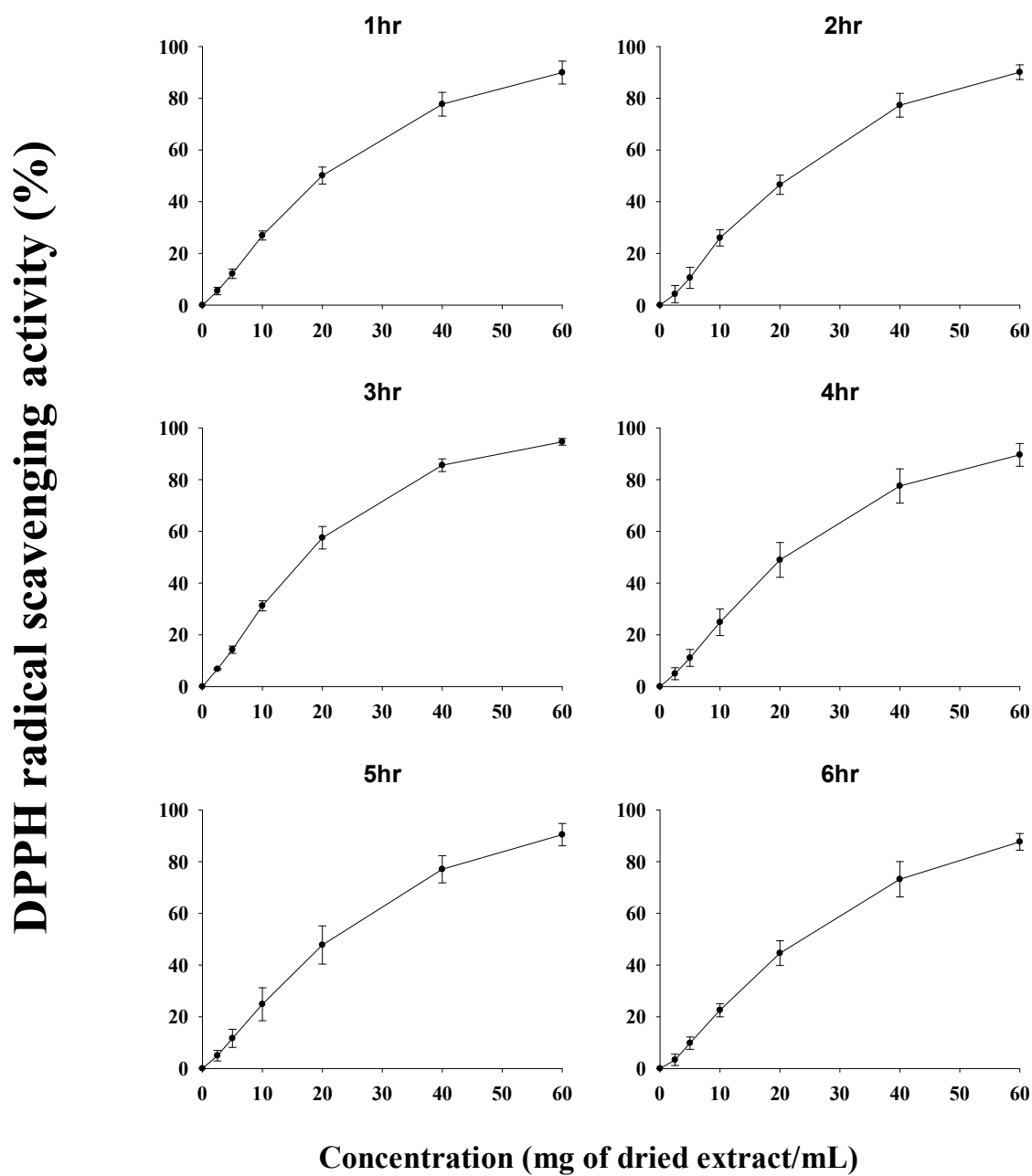


圖 4-2 AM 蛋白質水解物在不同濃度下之清除 DPPH 自由基能力
Figure 4-2 DPPH radical scavenging activities of AM protein hydrolysates at various concentrations.

1. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

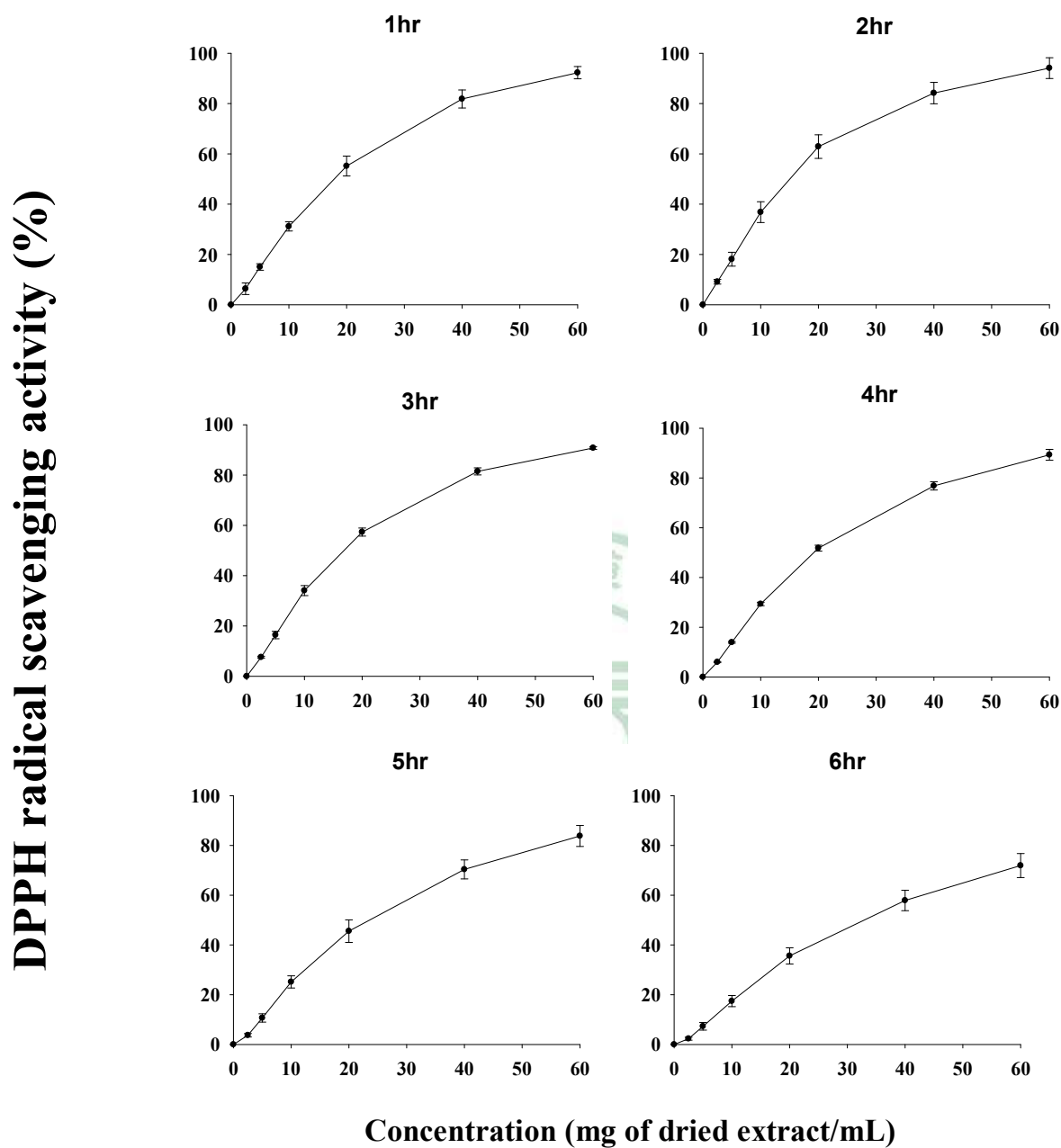


圖 4-3 PA 蛋白質水解物在不同濃度下之清除 DPPH 自由基能力
Figure 4-3 DPPH radical scavenging activities of PA protein hydrolysates at various concentrations.

1. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

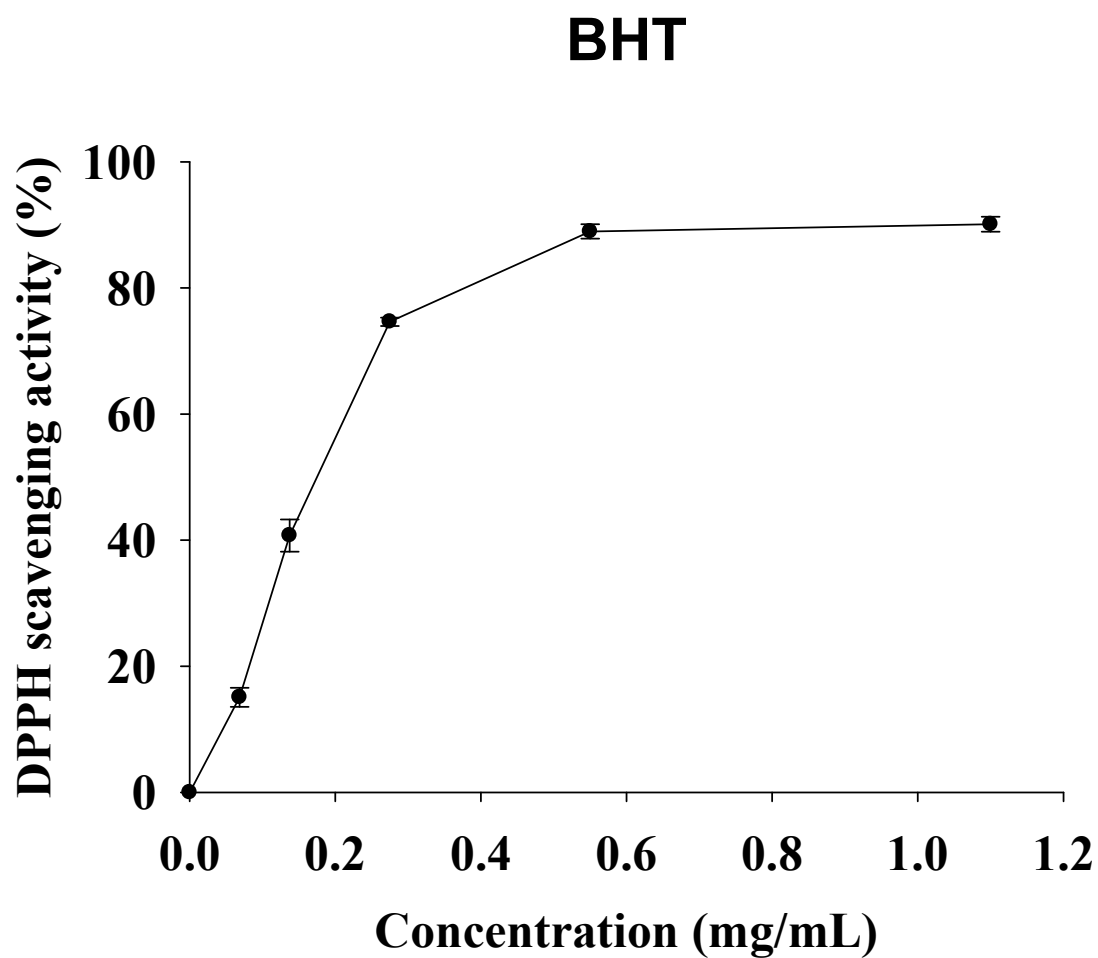


圖 4-4 BHT 在不同濃度下之清除 DPPH 自由基能力
Figure 4-4 DPPH radical scavenging activities of BHT at various concentrations.

1. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

(二) 亞鐵離子螯合能力

本實驗利用 AM 與 PA 兩種蛋白酶進行 1 ~ 6 hr 水解，測定不同水解時間下鮪魚蛋白質水解物之亞鐵離子螯合能力【表4-3】，結果顯示，在水解 3 hr 的 AM 蛋白質水解物可顯著高於其他水解時間下之蛋白質水解物，其 EC_{50} 為 4.91 mg of dried extract/mL ($p < 0.05$)。當水解時間越久，螯合能力則有下降的趨勢，以水解 6 hr 的 AM 蛋白質水解物螯合能力為最弱，此時的 EC_{50} 為 7.21 mg of dried extract/mL。PA 蛋白質水解物以水解 2 hr 時的螯合亞鐵離子能力顯著高於其他水解時間下的蛋白質水解物 ($p < 0.05$)，其 EC_{50} 為 5.95 mg of dried extract/mL。在相同水解時間下，不論是 AM 或 PA 蛋白質水解物之亞鐵離子螯合能力會隨著濃度增加而逐漸上升。結果得知以水解 1 和 3 hr 的 AM 及水解 2 hr 的 PA 蛋白質水解物濃度均於 10 mg of dried extract/mL 以下；而水解 2 和 4 ~ 6 hr 的 AM 及水解 1 和 3 ~ 6 hr 的 PA 蛋白質水解物其濃度於 15 mg of dried extract/mL 以下與亞鐵離子螯合能力呈線性關係，爾後則趨於平緩，其亞鐵離子螯合能力最高可達 96%【圖4-5 及圖4-6】。

另外，本實驗以 EDTA 作為正對照組【圖 4-7】，結果發現於 0.25 mM (0.093 mg/mL) EDTA 濃度下與亞鐵離子螯合能力呈線性關係 ($R^2 = 0.9951$)，且當濃度高於 0.25 mM (0.093 mg/mL) 後，此螯合能力則不再增加，其螯合能力為 99.06% ($EC_{50} = 0.05$ mg/mL)。

表 4-3 鮪魚蛋白質水解物的亞鐵離子螯合能力之 EC_{50} Table 4-3 EC_{50} of metal ion chelating activity of protein hydrolysates derived from tuna dark muscle by-product.

Hydrolysis time	AM		PA	
	EC_{50} (mg dried of extract /mL)	Equation, R^2	EC_{50} (mg dried of extract /mL)	Equation, R^2
1	5.66 ± 0.36^b	$y = 8.567x + 1.499, 0.996$	6.78 ± 0.46^b	$y = 7.572x - 1.342, 0.997$
2	5.98 ± 0.40^b	$y = 7.705x + 3.869, 0.982$	5.95 ± 0.20^a	$y = 8.276x - 0.701, 0.999$
3	4.91 ± 0.18^a	$y = 9.751x + 2.087, 0.991$	8.79 ± 0.68^{cd}	$y = 5.869x - 1.580, 0.995$
4	6.68 ± 0.22^{bc}	$y = 7.158x + 2.177, 0.995$	8.14 ± 0.64^{cd}	$y = 6.340x - 1.639, 0.996$
5	7.13 ± 0.61^c	$y = 6.712x + 2.138, 0.994$	7.89 ± 0.21^c	$y = 6.615x - 2.161, 0.994$
6	7.21 ± 0.53^c	$y = 6.839x + 0.670, 0.999$	9.33 ± 0.28^d	$y = 5.550x - 1.776, 0.998$
EDTA	0.050 ± 0.001	$y = 401.9x - 0.005, 0.995$		

- ^{a-d} Values with different superscript letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).
- * EC_{50} means the effective concentration of protein hydrolysates providing 50% metal ion chelating activity.
- All values are means \pm standard deviation of data from triplicate.
- Regression equations were obtained from linear regression of AM and PA protein hydrolysates.

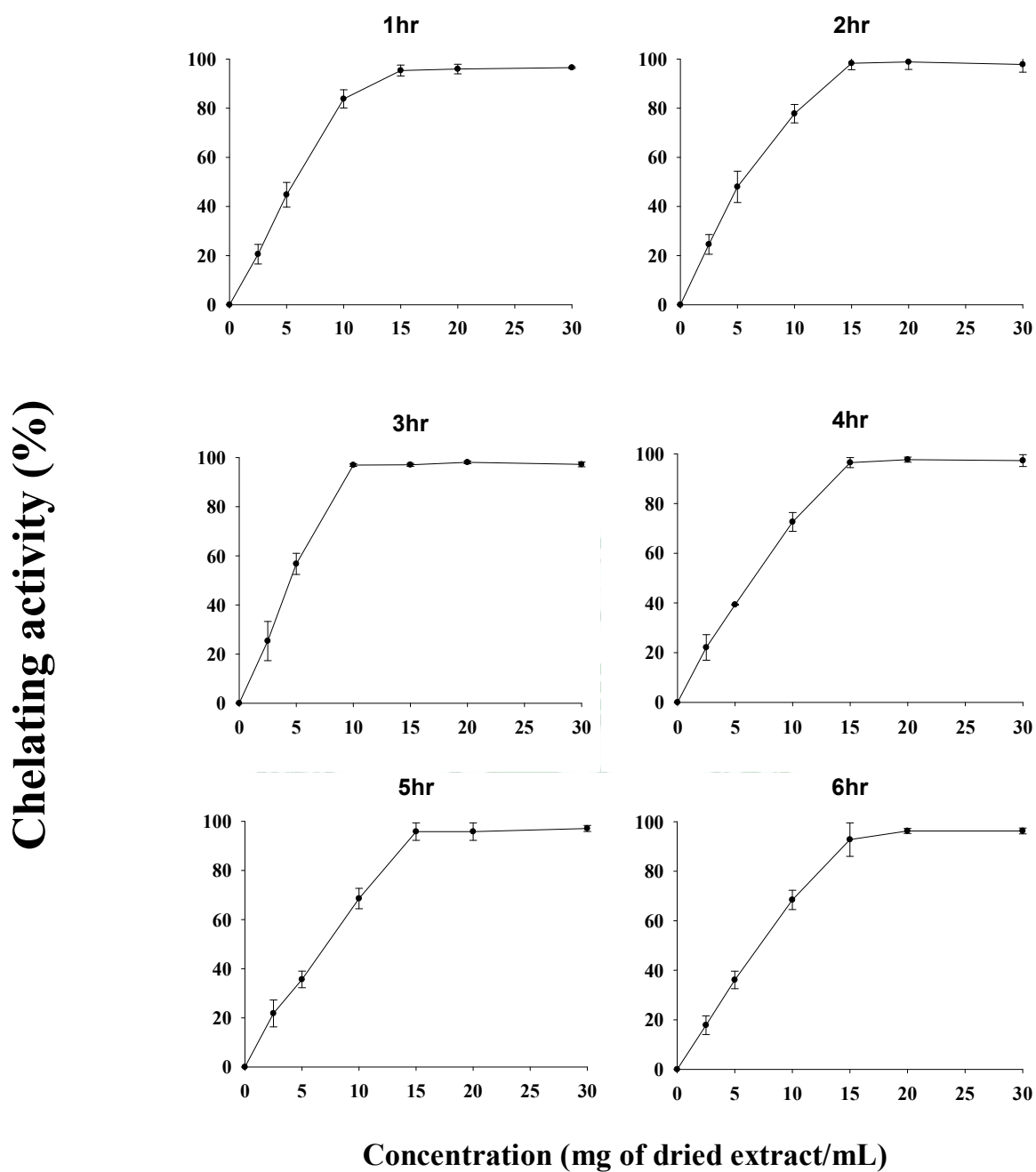


圖 4-5 AM 蛋白質水解物在不同濃度下之亞鐵離子螯合能力

Figure 4-5 Metal ion chelating activity of AM protein hydrolysates at various concentrations.

1. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

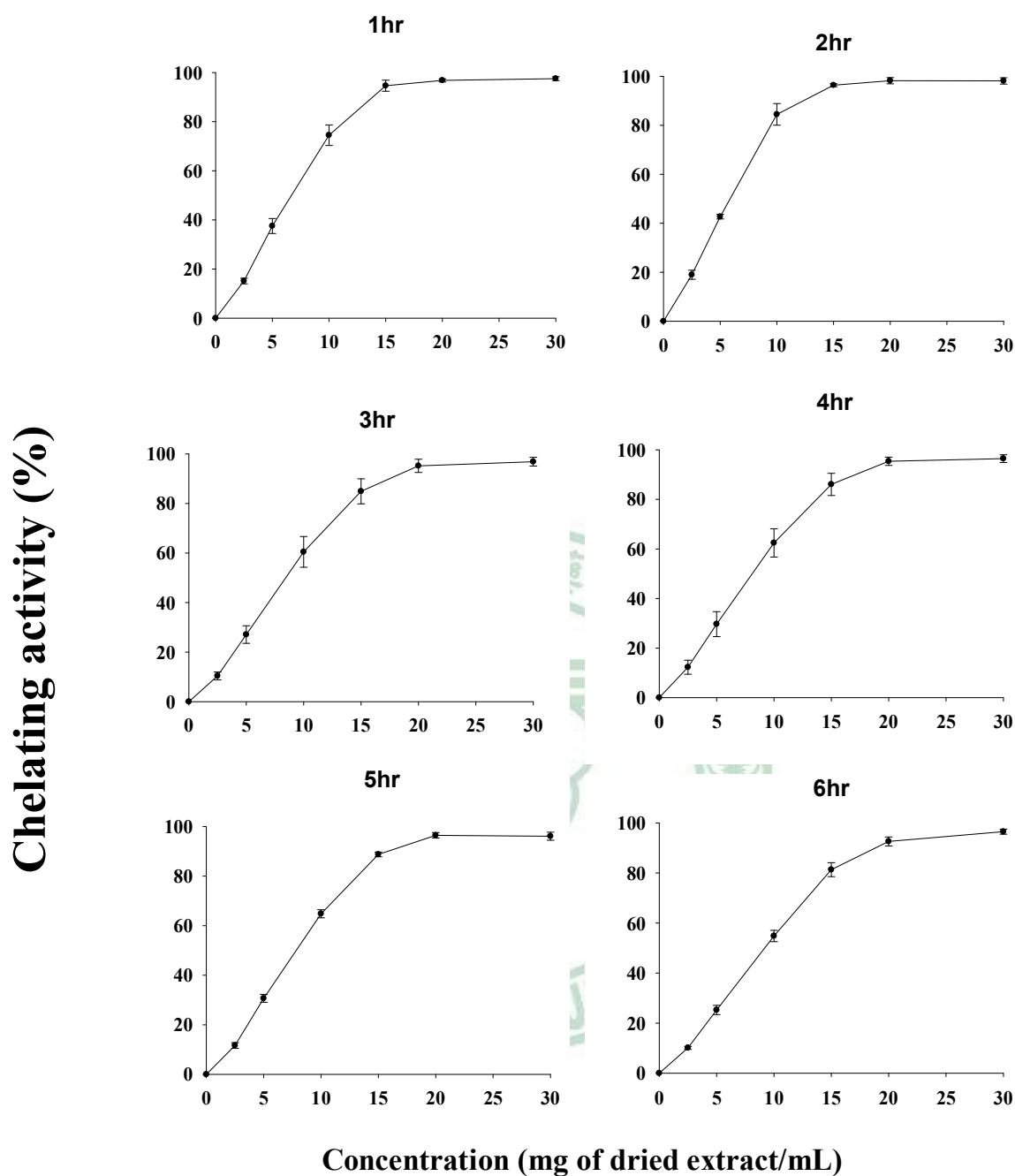


圖 4-6 PA 蛋白質水解物在不同濃度下之亞鐵離子螯合能力

Figure 4-6 Metal ion chelating activity of PA protein hydrolysates at various concentrations.

1. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

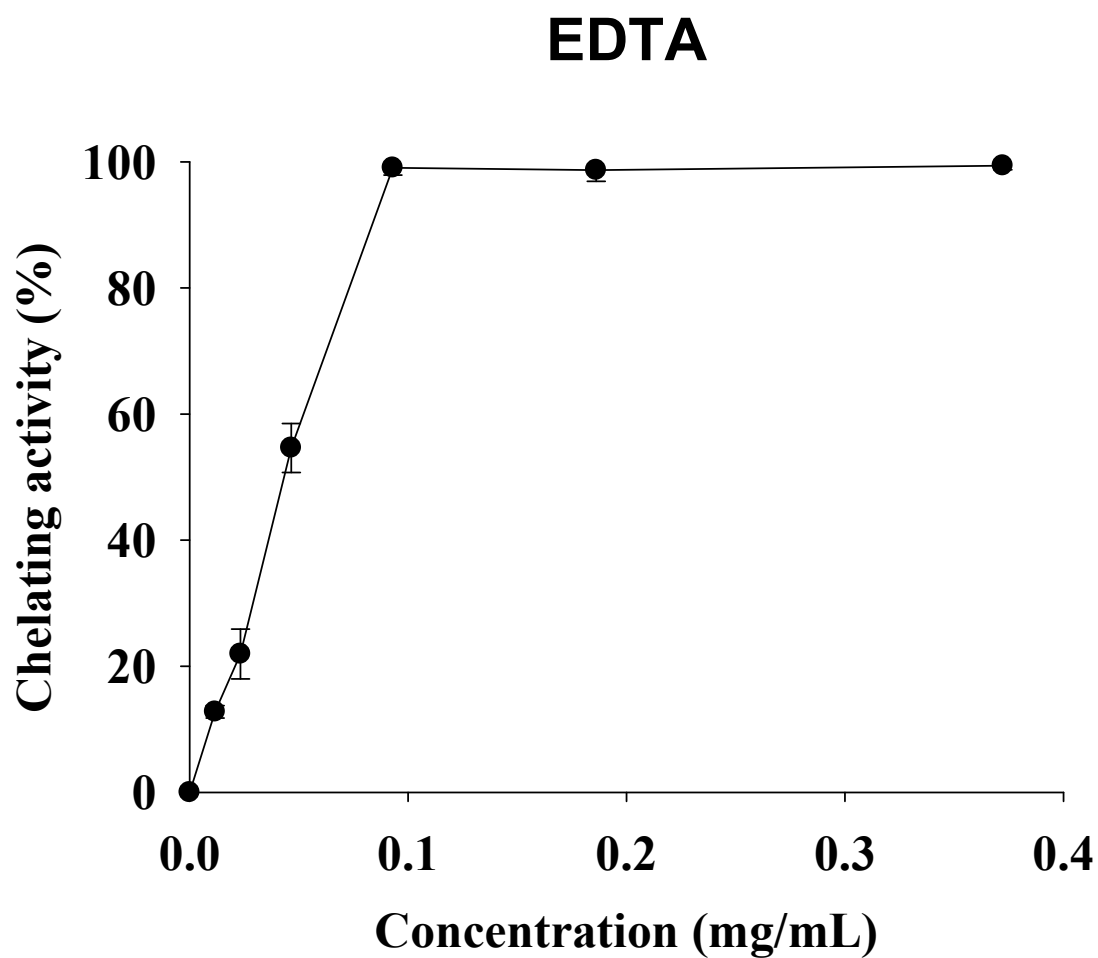


圖 4-7 EDTA 在不同濃度下之亞鐵離子螯合能力

Figure 4-7 Metal ion chelating activity of EDTA at various concentrations.

1. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

(三) 還原力

利用 AM 與 PA 兩種蛋白酶進行 1 ~ 6 hr 水解，測定不同水解時間蛋白質水解物之還原力【表4-4】。當吸光值越高則表示還原力越好，實驗數據以 EC_{50} (吸光值達 0.5 所需的濃度) 呈現，依結果顯示，AM 蛋白質水解物還原力會隨水解時間增加而有逐漸下降的趨勢，其 EC_{50} 從 5.90 提升至 9.54 mg of dried extract/mL，且又以水解 1 和 2 hr 顯著高於 5 ~ 6 hr 之蛋白質水解物 ($p < 0.05$)；PA 蛋白質水解物於水解 2 和 4 ~ 5 hr 之間其還原力高於水解 1 hr，而在統計上無顯著性差異，但顯著高於水解 3 和 6 hr 之蛋白質水解物 ($p < 0.05$)。在相同水解時間下，隨著濃度 (0 ~ 30 mg of dried extract/mL) 上升，還原力也會明顯增加【圖4-8 及圖4-9】。當 AM 和 PA 蛋白質水解物濃度達 10 mg of dried extract/mL，此時，還原力吸光值均可達 0.5 以上。當濃度達 30 mg of dried extract/mL 以上，則會有沉澱物產生，故在測定還原力時，選用濃度範圍以 30 mg of dried extract/mL 以下為主。另外，本實驗以 Lascorbic acid、BHT 作為正對照組【圖4-10】，結果顯示 L-ascorbic acid 和 BHT 濃度分別在 0.5 mM (0.088 mg/mL) 和 1.25mM (0.28 mg/mL) 下呈線性關係 ($R^2 = 0.993$ 及 0.972)，且吸光值達 1.609 及 1.432 (EC_{50} 分別為 0.03 及 0.07 mg/mL)。

綜合以上結果所述，鮪魚血合肉加工副產品經蛋白酶水解後皆可產生抗氧化活性，但仍以 Lascorbic acid、BHT、EDTA 效果較佳。AM 及 PA 蛋白質水解物分別在水解 3 hr 和 2 hr 皆具有最佳的清除 DPPH 自由基能力和亞鐵離子螯合能力；AM 蛋白質水解物之還原力以水解 1 ~ 3 hr 效果較佳；PA 蛋白質水解物則以水解 1、2、4 和 5 hr 效果較佳。整體看來，AM 蛋白質水解物及 PA 蛋白質水解物以水解 3 hr 和 2 hr (AMH 及 PAH) 最具有抗氧化活性。因此，本實驗為了更進一步提升鮪魚蛋白質水解物之抗氧化活性，故未來則選用 AMH 以及 PAH 作後續的實驗，首先以 Sephadex G-25 做分劃並估計其分子量範圍，接著再以 RP-HPLC 作純化，以期能找到最

表 4-4 鮪魚蛋白質水解物還原力之 EC_{50} Table 4-4 EC_{50} of reducing power of protein hydrolysates derived from tuna dark muscle by-product.

Hydrolysis time	AM		PA	
	EC_{50} (mg dried of extract /mL)	Equation, R^2	EC_{50} (mg dried of extract /mL)	Equation, R^2
1	5.90 ± 0.27^a	$y = 0.080x + 0.028, 0.993$	7.80 ± 0.47^{ab}	$y = 0.059x + 0.040, 0.996$
2	6.84 ± 0.38^a	$y = 0.070x + 0.021, 0.995$	7.75 ± 0.62^a	$y = 0.059x + 0.043, 0.996$
3	7.37 ± 0.93^{ab}	$y = 0.065x + 0.021, 0.995$	8.07 ± 0.20^b	$y = 0.058x + 0.032, 0.998$
4	9.07 ± 1.88^{bc}	$y = 0.052x + 0.028, 0.995$	7.68 ± 0.19^a	$y = 0.060x + 0.039, 0.996$
5	9.20 ± 1.53^c	$y = 0.052x + 0.031, 0.994$	7.44 ± 0.31^a	$y = 0.061x + 0.046, 0.995$
6	9.54 ± 1.30^c	$y = 0.050x + 0.023, 0.997$	8.25 ± 0.16^b	$y = 0.057x + 0.030, 0.997$
L-ascorbic acid	0.030 ± 0.001	$y = 16.01x + 0.032, 0.993$		
BHT	0.070 ± 0.004	$y = 6.360x + 0.082, 0.972$		

- ^{a-d} Values with different superscript letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$).
- * EC_{50} means the effective concentration of protein hydrolysates providing 50% reducing power.
- All values are means \pm standard deviation of data from triplicate.
- Regression equations were obtained from linear region of AM and PA protein hydrolysates.

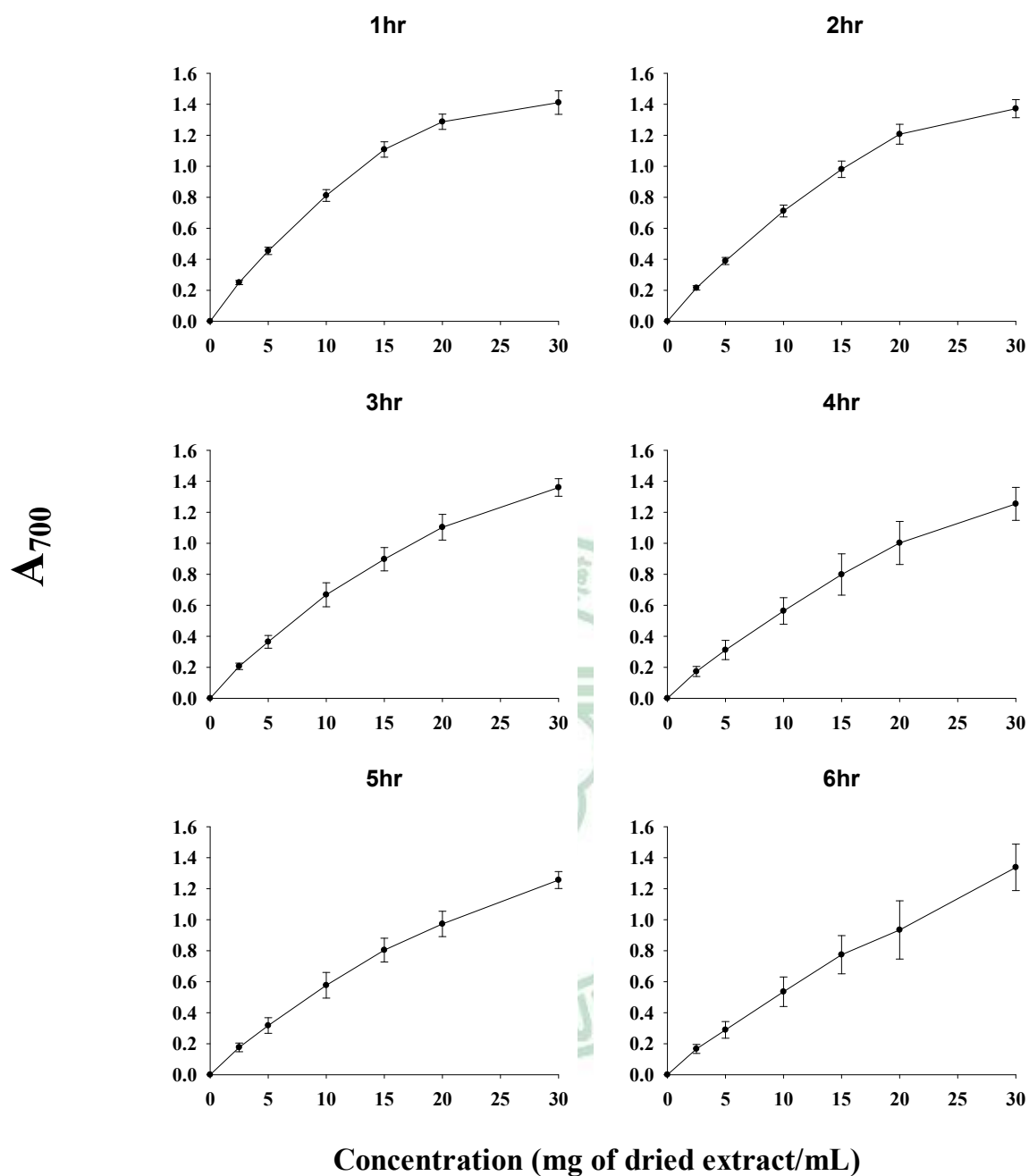


圖 4-8 AM 蛋白質水解物在不同濃度下之還原力
Figure 4-8 Reducing power of AM protein hydrolysates at various concentrations.

1. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

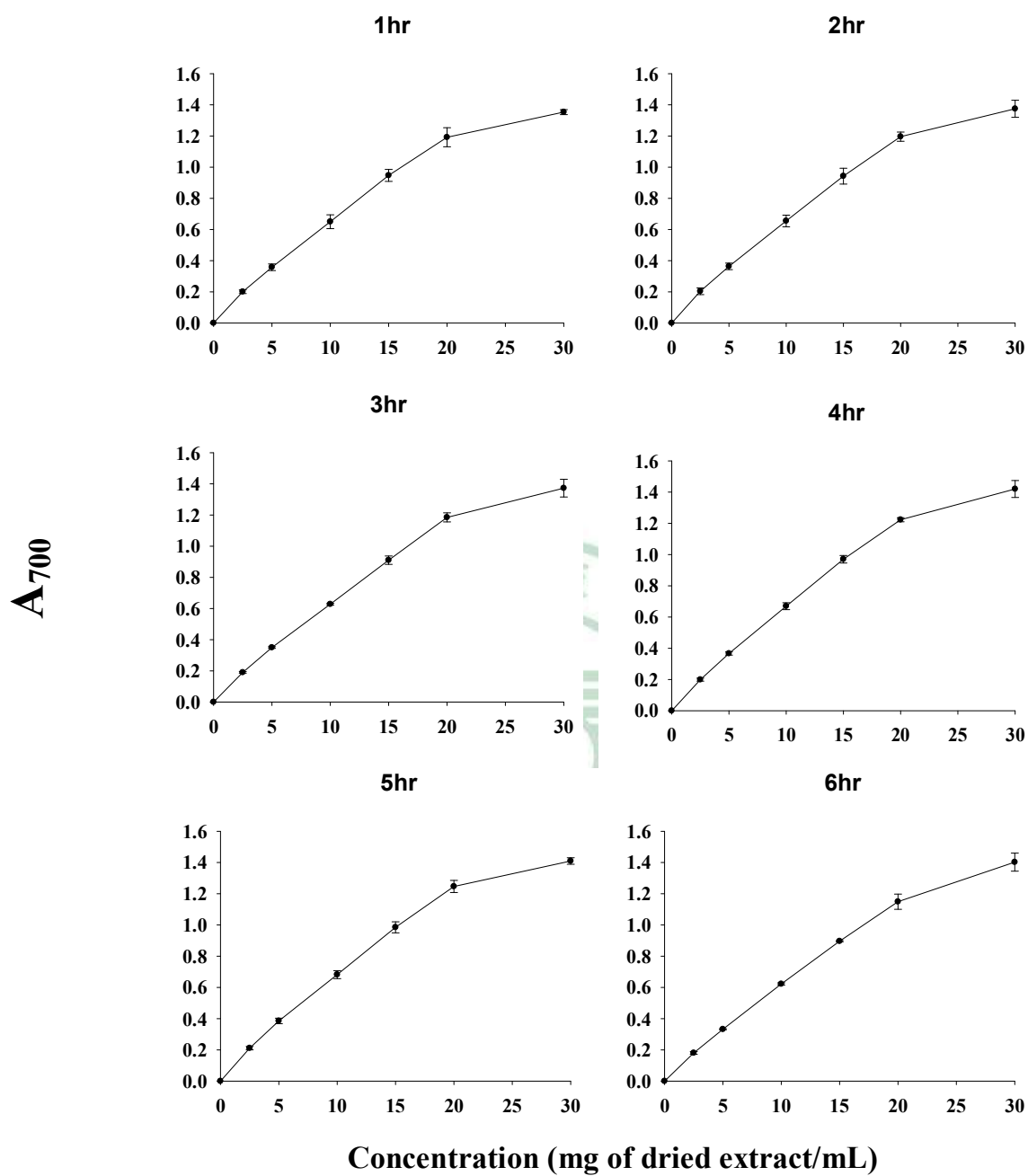


圖 4-9 PA 蛋白質水解物在不同濃度下之還原力
 Figure 4-9 Reducing power of PA protein hydrolysates at various concentrations.

1. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

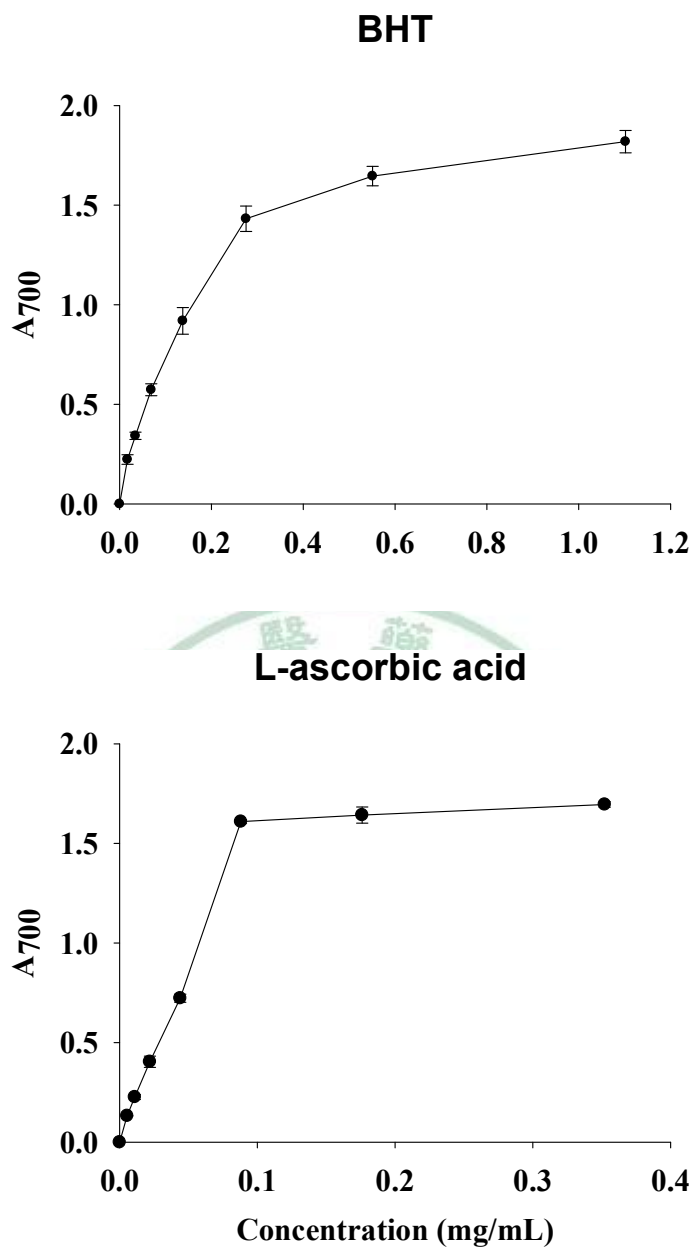


圖 4-10 BHT 和 L-ascorbic acid 在不同濃度下之還原力
Figure 4-10 Reducing power of BHT and L-ascorbic acid at various concentrations.

1. Values are means \pm standard deviation of three replicate analyses.

佳的抗氧化活性胜肽。

四、 鮭魚蛋白質水解物抗氧化活性物質的純化分離及其抗氧化活性

(一) 凝膠過濾法

(1) AMH

AMH 經凝膠過濾分離後可分出 4 個區分物 (AMH1 ~ AMH4) 【圖 4-11 B】，分別是 AMH1 (No. 12 ~ 22)、AMH2 (No. 23 ~ 35)、AMH3 (No. 36 ~ 41)、AMH4 (No. 42 ~ 68)，分別將 AMH1 ~ AMH4 經多次收集、冷凍乾燥後，並測定其各區分物之亞鐵離子螯合能力 (濃度均調整至 10 mg of dried extract/mL) 【圖 4-11A】，其依序結果為 74.73%、76.34%、72.87% 以及 72.79%，在統計上，彼此間則無顯著性差異 ($p > 0.05$)，但整體看來以 AMH2 的亞鐵離子螯合能力為最佳，故本實驗則選用此區分物再做更進一步純化分離。

(2) PAH

PAH 經凝膠過濾分離後可分出 5 個區分物 (PAH1 ~ PAH5) 【圖 4-12B】，分別 PAH1 (No. 11 ~ 15)、PAH2 (No.16 ~ 28)、PAH3 (No. 29 ~ 35)、PAH4 (No.36 ~ 42)、PAH5 (No. 43 ~ 60)，分別將 PAH1 ~ PAH5 經多次收集、冷凍乾燥後，並測定其各區分物的亞鐵離子螯合能力 (濃度均調整至 10 mg of dried extract/mL) 【圖 4-12A】。其依序結果為 92.40%、79.43%、81.73%、88.92% 以及 77.92%。其中以 PAH1 的亞鐵離子螯合能力顯著高於其他區分物 ($p < 0.05$)，其次為 PAH4，最弱則為 PAH2。

由以上結果得知，鮭魚蛋白質水解物經凝膠過濾後所得的區分物皆具有亞鐵離子螯合能力，且分子量皆落在 1,423 Da 以下，其中又以 AMH2 和 PAH1 亞鐵離子螯合能力為最佳。因此，推測鮭魚血合肉加工副產品中可能具有抗氧化特性的良好的胜肽類物質，故接著再將 AMH2 和 PAH1 進行更進一步的純化。

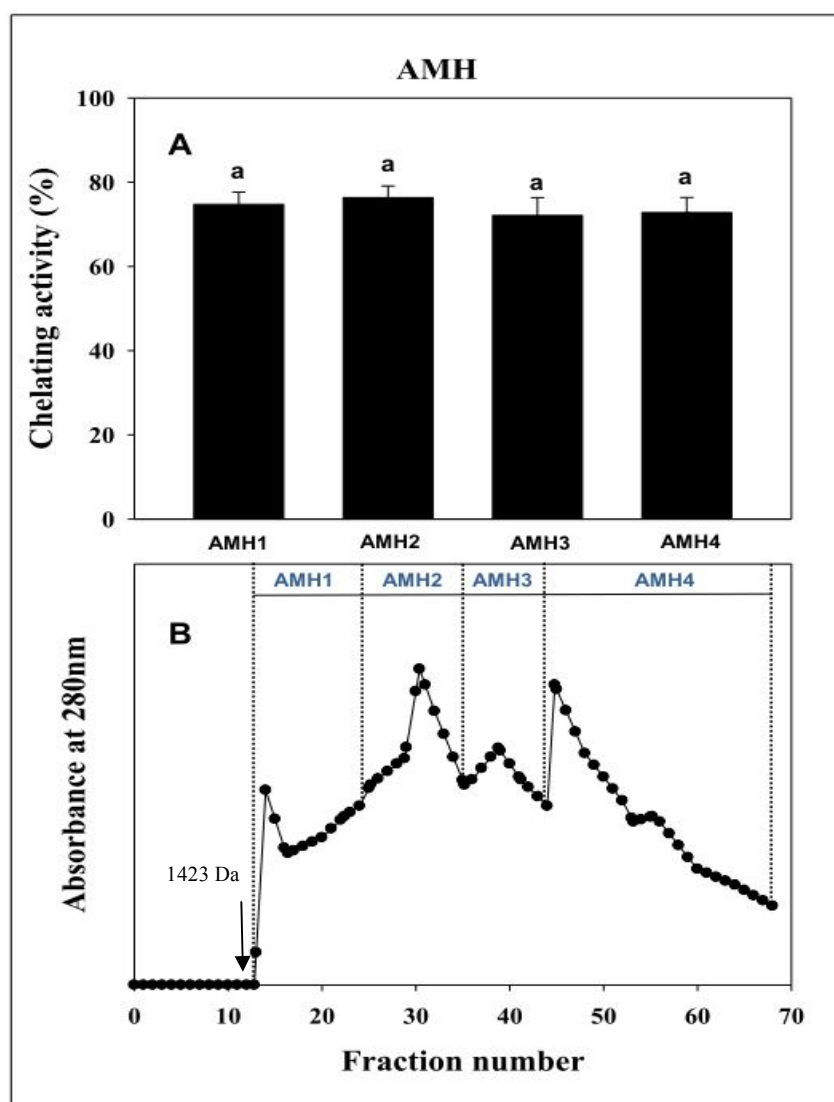


圖 4-11 AMH 經 Sephadex G-25 凝膠過濾法分離後其亞鐵離子螯合能力 (A) 及沖提圖 (B)

Figure 4-11 Metal ion chelating activity (A) and elution profile (B) of AMH separated with gel filtration chromatography on Sephadex G-25.

1. Bars represent standard deviations from triplicate determinations.
2. Different letters on the bars of AMH indicate significant differences ($p < 0.05$).
3. The column (2.5×50 cm) was equilibrated and eluted with 0.05 M, pH 6.5 phosphate buffer, at a flow rate of 42 mL/hr. Each fraction (10 mg of dried extract/mL) was used to determine the metal ion chelating activities.

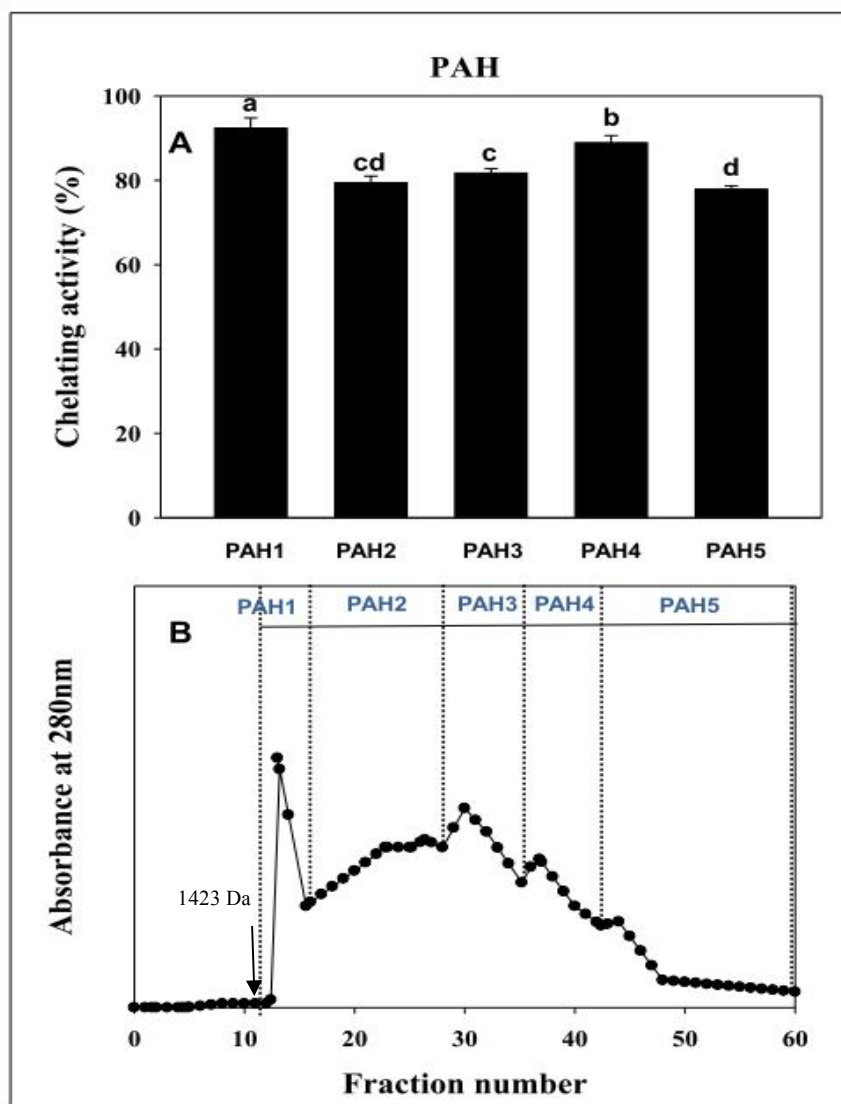


圖 4-12 PAH 經 Sephadex G-25 凝膠過濾法分離後其亞鐵離子螯合能力 (A) 以及沖提圖 (B)

Figure 4-12 Metal ion chelating activity (A) and elution profile (B) of PAH separated with gel filtration chromatography on Sephadex G-25.

1. Bars represent standard deviations from triplicate determinations.
2. Different letters on the bars of PAH indicate the significant differences ($p < 0.05$).
3. The column (2.5×50 cm) was equilibrated and eluted with 0.05 M, pH 6.5 phosphate buffer, at a flow rate of 42 mL/hr. Each fraction (10 mg of dried extract/mL) was used to determine the metal ion chelating activities.

(二) 高效能液相層析法

(1) AMH2

將凝膠過濾之區分物 AMH2 經高效能液相層析法再次分離後，從圖譜則可看出 AMH2 可得到 6 個波峰【圖 4-13B】，分別表示為 AMH2a ~ AMH2f，經多次收集、冷凍乾燥後，並測定其各區分物的亞鐵離子螯合能力 (濃度均調整至 0.5 mg of dried extract/mL)【圖 4-13A】，其結果依序分別為 12.08%、12.05%、13.36%、13.49%、18.89% 以及 12.89%，其中 AMH2e 的亞鐵離子螯合能力顯著高於其他區分物 ($p < 0.05$)。

(2) PAH1

將凝膠過濾之區分物 PAH1 經高效能液相層析法再次分離後，從圖譜則可看出 PAH1 可得到 3 個波峰【圖 4-14B】，分別表示為 PAH1a ~ PAH1c，經多次收集、冷凍乾燥後，並測定其各區分物的亞鐵離子螯合能力 (濃度均調整至 0.5 mg of dried extract/mL)【圖 4-14 A】，其結果依序分別為 19.33%、14.4% 以及 11.2%，其中 PAH1a 的亞鐵離子螯合能力顯著高於其他區分物 ($p < 0.05$)。

最後，再將亞鐵離子螯合能力最佳的 AMH2e 及 PAH1a 送至中國醫藥大學貴重儀器室鑑定其抗氧化活性胜肽之胺基酸序列。

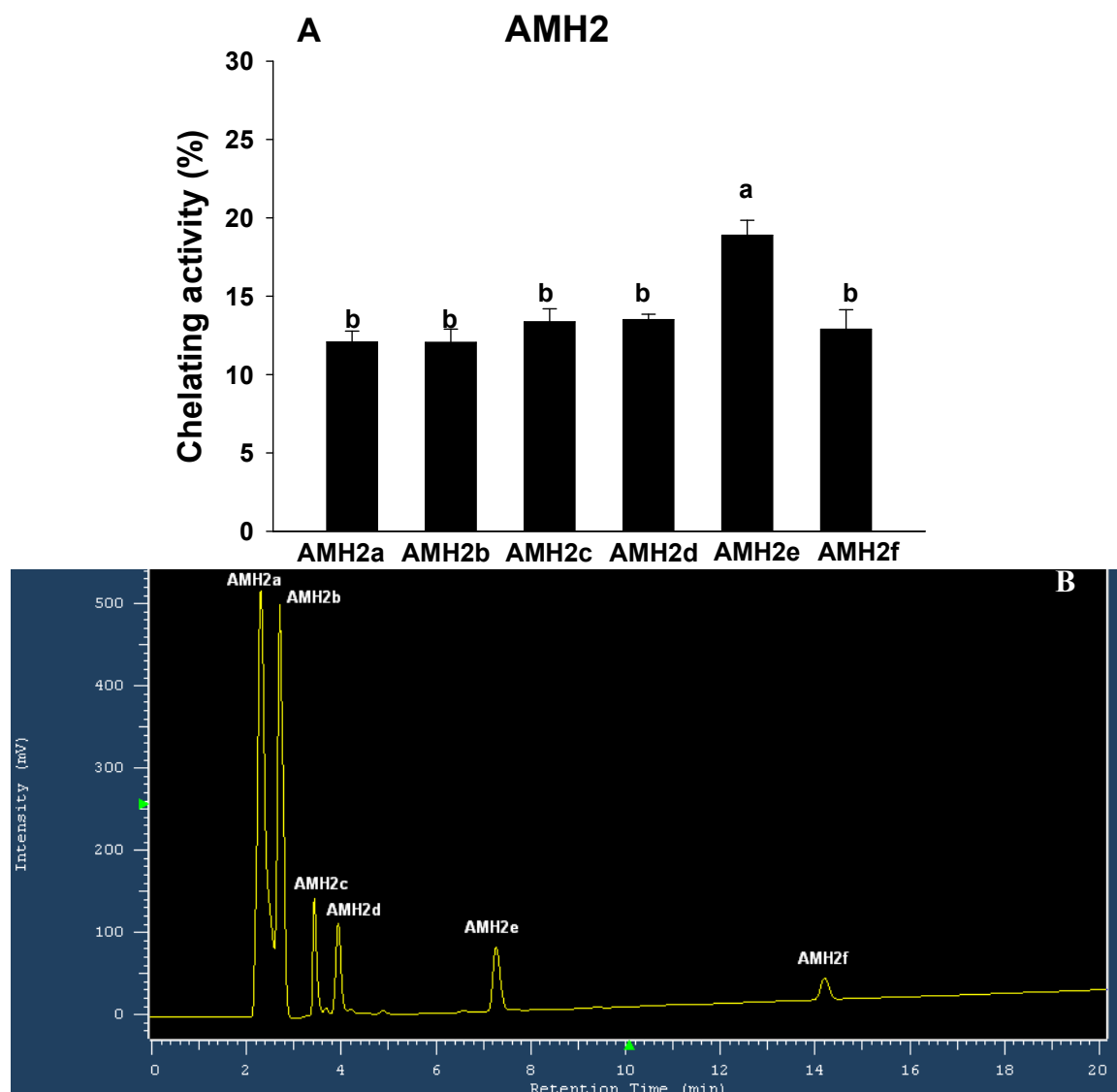


圖 4-13 AMH2 經高效能液相層析法純化後其亞鐵離子螯合能力(A) 以及 RP-HPLC 分析圖(B)

Figure 4-13 Metal ion chelating activity (A) and RP- HPLC elution patterns (B) of AMH2 purified by RP-HPLC.

1. Bars represent standard deviations from triplicate determinations.
2. Different letters on the bars of AMH2 indicate the significant differences ($p < 0.05$).
3. It was applied to a RP-C18 column (4.6×250 mm) equilibrated with deionized water and eluted with a linear gradient of acetonitrile (5 ~ 15%) in 0.1% TFA at a flow rate of 1mL/min. Each fraction (0.5 mg of dried extract/mL) was used to determine the metal ion chelating activities.

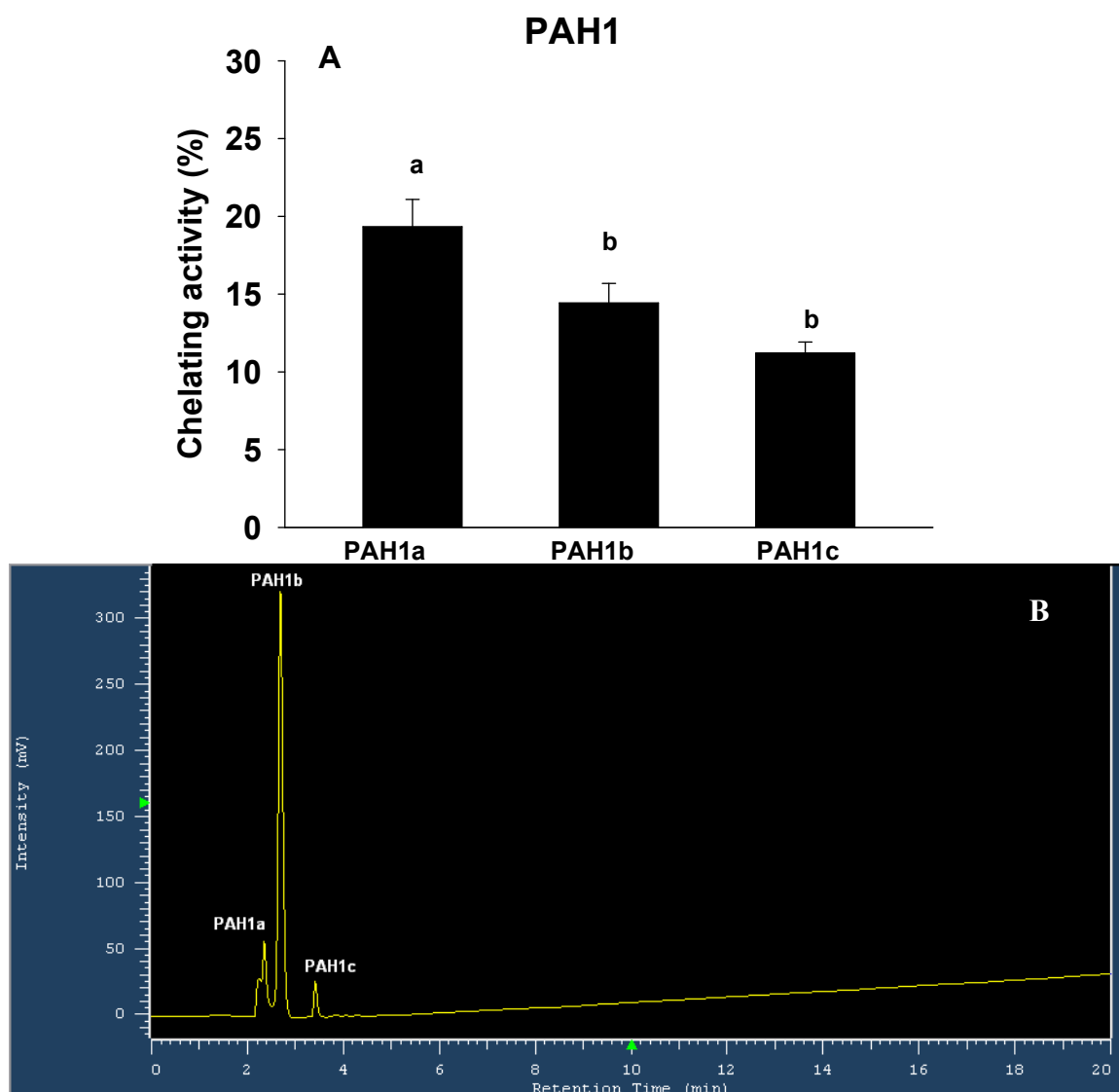


圖 4-14 PAH1 經高效能液相層析法純化後其亞鐵離子螯合能力 (A) 以及 RP-HPLC 分析圖 (B)

Figure 4-14 Metal ion chelating activity (A) and RP- HPLC elution patterns (B) of PAH1 purified by RP-HPLC.

1. Bars represent standard deviations from triplicate determinations.
2. Different letters on the bars of PAH1 indicate the significant differences ($p < 0.05$).
3. It was applied to a RP-C18 column (4.6×250 mm) equilibrated with deionized water and eluted with a linear gradient of acetonitrile (5 ~ 15%) in 0.1% TFA at a flow rate of 1mL/min. Each fraction (0.5 mg of dried extract/mL) was used to determine the metal ion chelating activities.

五、 抗氧化活性胜肽之鑑定

將經高效能液相層析法分離出的 AMH2e 和 PAH1a 以 MALDI TOF/TOF 鑑定其最佳抗氧化活性胜肽之胺基酸序列及分子量【表 4-5】和 De novo 序列圖【圖 4-15 及圖 4-16】。其結果如下：

AMH2e 及 PAH1a 分別可得 1 及 2 個胜肽之胺基酸序列。

- a. AMH2e：Arg-Pro-Pro-Arg- Arg (681.5 Da)。
- b. PAH1a：Asp-Thr-His-His-Arg-Arg-Lys-Pro (1,046.6 Da) 和 His-Met-Leu-His-Lys-His-Met-Leu-Leu-His (1,296.8 Da)。



表 4-5 藉 MALDI TOF/TOF 鑑定 AMH2e 及 PAH1a 胜肽之胺基酸序列及分子量

Table 4-5 Identification of molecular mass and amino acid squences of AMH2e and PAH1a by MALDI TOF/TOF.

No.	Sequences	Mw
AMH2e	Arg-Pro-Pro-Arg-Arg	681.5 Da
PAH1a	Asp-Thr-His-His-Arg-Arg-Lys-Pro	1,046.6 Da
	His-Met-Leu-His-Lys-His-Met-Leu-Leu-His	1,296.8 Da



(A) 序列為 Arg-Pro-Pro-Arg-Arg (681.496 Da)

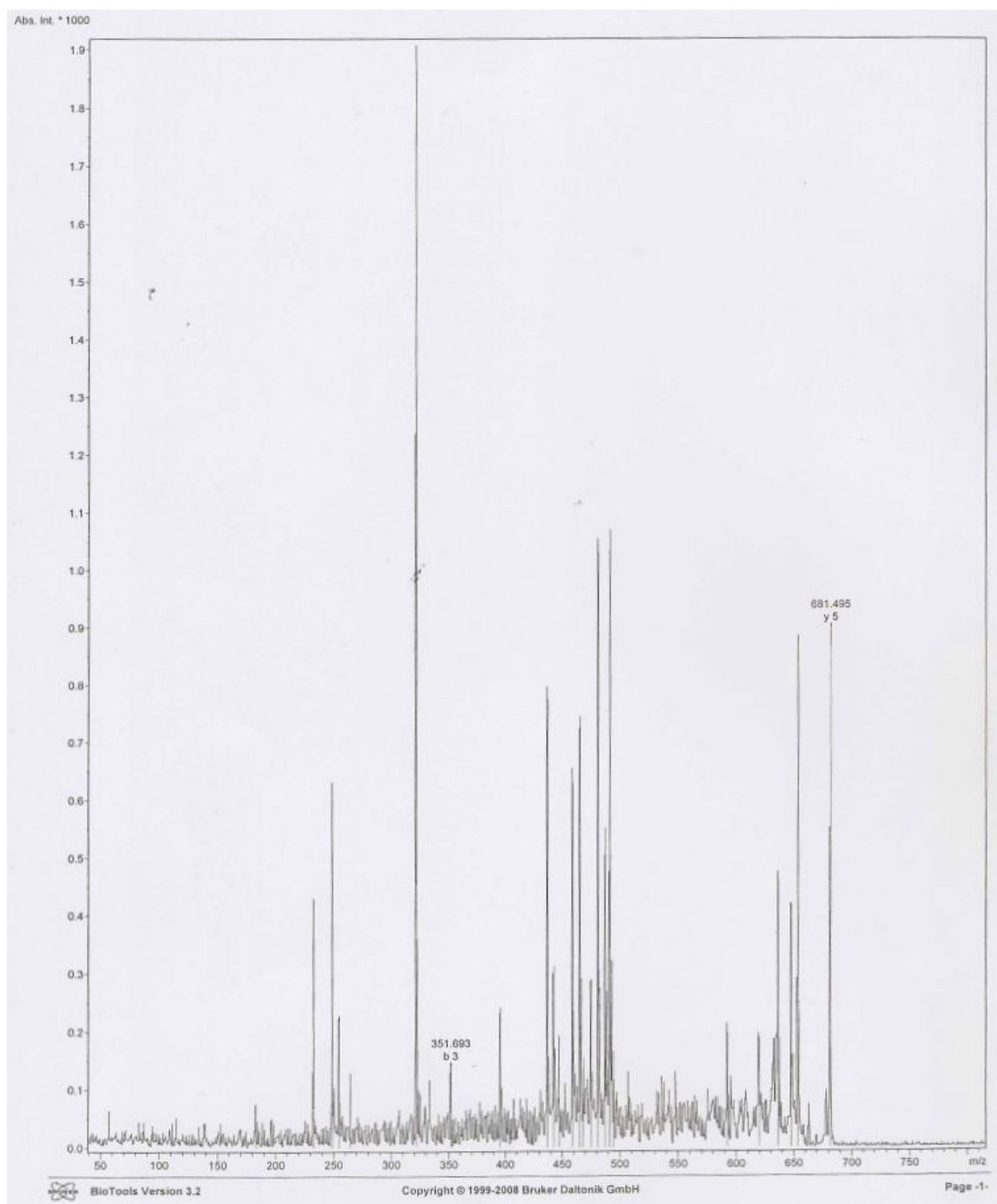


圖 4-15 AMH2e 的 De novo 序列圖

Figure 4-15 De novo sequencing of AMH2e.

1. MS/MS experiments were performed on MALDI TOF/TOF mass spectrometer. Sequencing of active peptide was acquired over the m/z range 200 ~ 4,000 and sequenced by using the bruker biotool software 3.2 analysis.

(A) 序列為 His-Met-Leu-His-Lys-His-Met-Leu-Leu-His (1,296.763 Da)

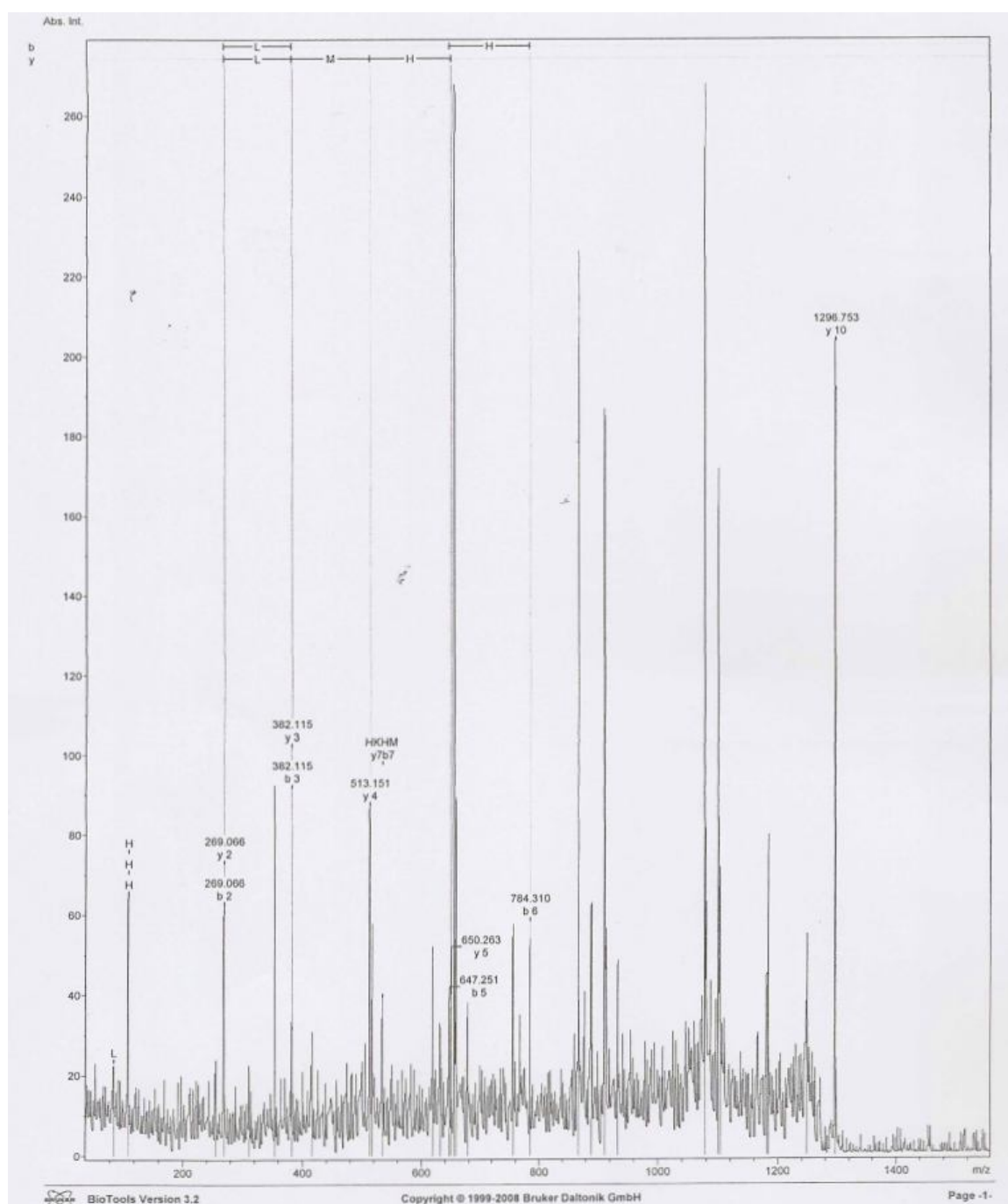


圖 4-16 PAH1a 的 De novo 序列圖

Figure 4-16 De novo sequencing of PAH1a.

1. MS/MS experiments were performed on MALDI TOF/TOF mass spectrometer.. Sequencing of active peptide was acquired over the m/z range 200 ~ 4,000 and sequenced by using the Bruker BioTools software 3.2 analysis.

(B) 序列為 Asp-Thr-His-His-Arg-Arg-Lys-Pro (1,046.559 Da)

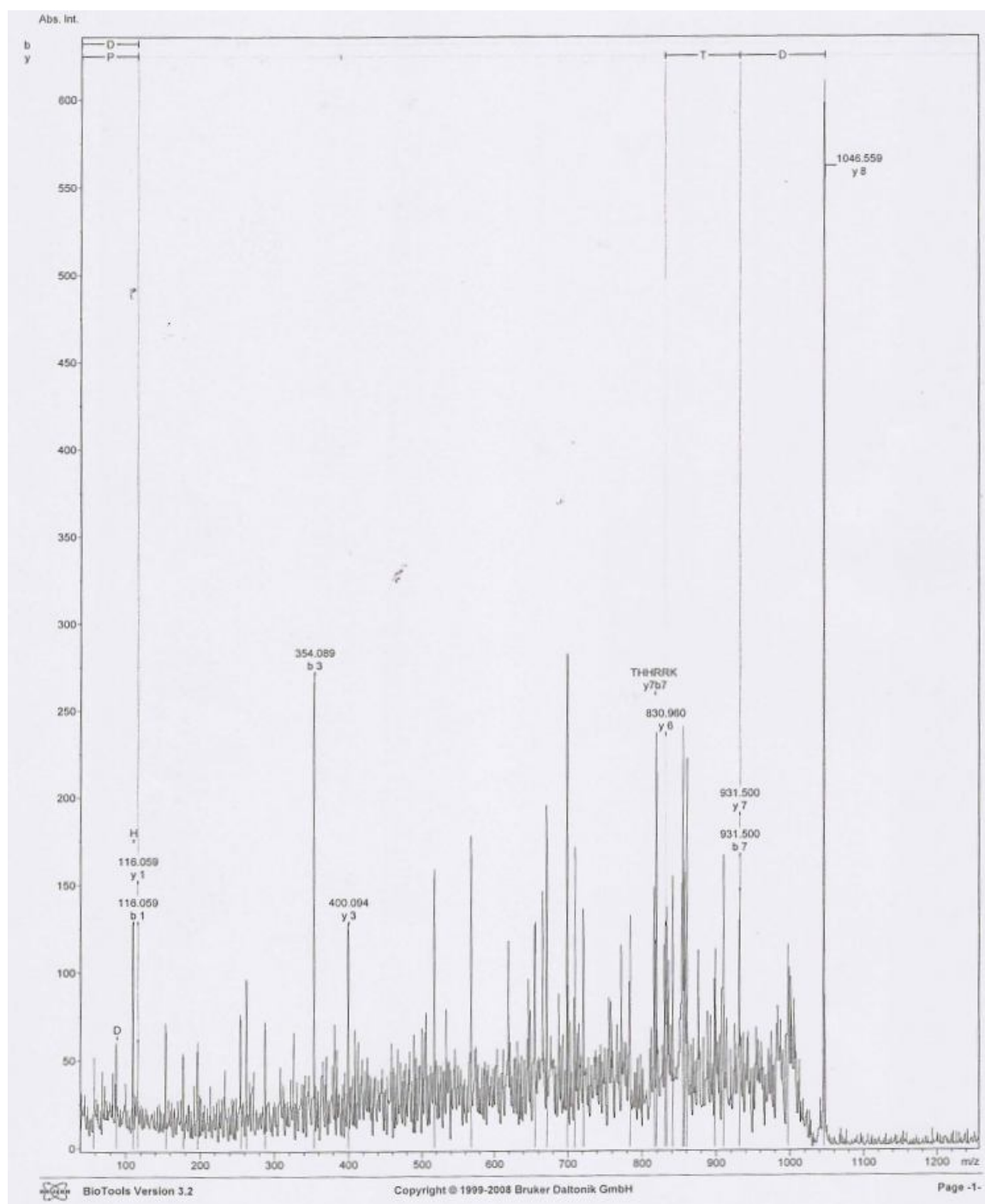


圖 4-16 PAH1a 的 De novo 序列圖 (續)

Figure 4-16 De novo sequencing of PAH1a.

1. MS/MS experiments were performed on MALDI TOF/TOF mass spectrometer. Sequencing of active peptide was acquired over the m/z range 200 ~ 4,000 and sequenced by using the bruker biotool software 3.2 analysis

第五章 討論

一、 一般成分分析

鮪魚是鯖科魚類中最大者，一般以冷凍全魚或罐頭方式販售，其營養成分為水分 73.3%；粗蛋白 24.3%；粗脂肪 0.5%；灰分 1.4% (孫等, 1991)。本實驗原料是鮪魚血合肉其來自鮪魚加工廠所蒸煮過後廢棄的物質。一般水產加工廠會將這些物質製成經濟價值不高的魚粉再次利用 (Choudhury and Bublitz, 1996), 但它其實是具有很好的營養價值, 如蛋白質 (Qian et al., 2007)。與本實驗研究最為相關的為粗蛋白占總成分的 28.26%，其大部分為肌紅蛋白，屬於可溶性蛋白質 (Kendrew et al., 1960)。且與一般鮪魚白肉相比之下，顯示出鮪魚血合肉加工副產品具有高蛋白質，近年來有研究指出，一般胜肽物質大多以不活性的狀態隱藏在大的蛋白質長鏈胜肽中，當蛋白質經蛋白酶水解後會將活性物質釋放出來 (Margare et al., 1997)。先前文獻指出，鮪魚蒸煮液以 protease XXIII 水解以及鹿肉以 papain 水解下之蛋白質水解物可產生較強的抗氧化活性胜肽 (Jao et al., 2002; Kim et al., 2009)。因此我們想藉由選用這 2 個蛋白酶來水解鮪魚血合肉加工副產品，探討是否可將蛋白質中的活性物質釋放出來，如果能善加利用則可以成為一個營養價值很高的加工副產品。

食品中過多的油脂可能導致自氧化發生，最終使食品產生劣變、營養價值降低等情況發生 (Qian et al., 2008)，故本實驗在水解之前也曾將原料進行脫脂，此方法是參考 Sikorski and Nacz (1981) 的方法稍做修改，結果顯示，鮪魚血合肉加工副產品經脫脂後油脂含量從 2.18 降至 0.91%，但在過程中不斷重複加熱以及使用大量的異丙醇，最後再經風乾後，魚肉外型已改變。發現在整個實驗過程中所耗費的時間與成本卻無法有效將油脂去除。有文獻指出，如果大量使用有機溶劑以及不斷加熱，易使得疏水性基團暴露、蛋白質產生凝聚以及構型改變，而且還會造成溶解度以及水解度大幅下降 (Klompong et al., 2007)。另外，經脫脂後的魚肉表面水分減少可能會降低水解

時受質與蛋白酶的作用 (Hoyle and Merritt, 1994)。

本實驗基於經濟效益及水解效率之考量，故之後的抗氧化活性及 DH 測定皆以利用未脫脂鮪魚血合肉加工副產品為原料。

二、 水解度測定

當蛋白質受蛋白酶作用時，可依序分解成蛋白胨 (proteose)、蛋白腓 (peptone)、peptides，最後分解成游離胺基酸 (Adler-Nissen, 1986)。當 DH 越高表示肽鍵被切斷數目越多，有許多低分子量之肽生成，也就是說完整之蛋白質其水解度為 0%；而完全水解之蛋白質其 DH 為 100% (鄭, 1997)。本實驗是利用 AM 以及 PA 這 2 種商業蛋白酶，分別在最適作用條件下來水解鮪魚血合肉加工副產品，且 DH 表示則是經不同水解時間下所釋放出來的游離胺基酸含量占總胺基酸含量之比值，游離胺基酸則以 L-leucine 作為水解程度的指標。結果發現在水解過程中，鮪魚血合肉加工副產品以水解 1 hr 內反應速度最快。推測因水解剛開始時，基質濃度高，所以與蛋白酶作用位置多，使得水解速率較快 (張, 1977)。另有研究指出，Sliver carp 魚肉利用 alcalase 和 flavourzyme 水解，結果顯示於水解在一開始前 15 min 反應最快，此後則趨於平緩 (Dong et al., 2008)。另外，以黃鰭鮪的胃當做原料利用不同酶與基質比 ($E/S = 0.1 \sim 1.5\%$) 水解 4 hr，結果發現水解度也會隨水解時間增加而趨緩，而在水解作用前 50 min 水解程度為最快 (Guerard et al., 2002)，本實驗與上述結果相符。

隨水解時間增加，DH 會逐漸增加，表示所產生的游離胺基酸含量也隨之增加。經由水解時蛋白質水解度的變化，以藉此來判斷蛋白酶之水解效果。林 (1999) 指出魚肉蛋白質經蛋白酶水解後，其游離胺基酸及複合胺基酸含量有逐漸增加的趨勢，尤其是複合胺基酸的部分，顯示當水解時間的增加，蛋白酶作用會將大分子之蛋白質分解成肽類或是游離胺基酸。

另外，從結果中發現利用 PA 水解鮪魚血合肉加工副產品時在水解 2 ~

5 hr 過程中 DH 無顯著變化，但在水解 5~6 hr 則有顯著上升的趨勢。推測我們為了讓蛋白酶於最適條件下作用，因此在水解過程中調整 pH 值而產生了時間差，故可能為導致水解度上升之原因。鮪魚蒸煮液以 protease XXIII (A-O) 作用 6 hr (E/S = 1:25 v/v)，所測得知 DH 為 32.5% (饒, 2002)。此外，本實驗以相同蛋白酶水解鮪魚血合肉加工副產品 6 hr，其 DH 為 29.93%。故蛋白酶分解蛋白質時，DH 會受蛋白酶種類、酶對受質的濃度、受質本身的特性、酶作用之溫度及 pH 等影響 (張, 1977)。

三、 鮪魚蛋白質水解物之抗氧化活性特性

(一) 清除 DPPH 自由基能力

ROS 會造成體內產生大量自由基進而傷害到細胞，使得人們產生疾病，因此，降低自由基產生與 ROS 的生成是可以有效對抗許多疾病發生 (Halliwell and Gutteridge, 1989)。脂質在自氧化的過程中會產生自由基而造成脂質酸敗，常見的抗氧化研究通常以 DPPH 用以評估抗氧化物藉由提供氫來清除脂質過氧化物自由基，進而達到抑制氧化連鎖反應之進行 (Jin and Chen, 1998)。本實驗中，使用 DPPH 自由基為自由基來源，供鮪魚蛋白質水解物去除自由基能力的測定，其結果發現，最具清除 DPPH 自由基能力為 AMH 及 PAH 其 EC_{50} 分別為 17.3 及 15.32 mg of dried extract/mL。另有研究以雞精萃取物測定其抗氧化活性，結果發現清除 DPPH 自由基能力會隨濃度增加而有上升的趨勢，當濃度達 120 mg/mL 則清除能力已不再增加，此時清除能力僅為 59% (Wu et al., 2005)。與本實驗在相同濃度 (60 mg of dried extract/mL) 情況相較下，AM 及 PA 蛋白質水解物皆可清除 70% 以上的 DPPH 自由基，明顯高於雞精萃取物 (約 35%)。故顯示出鮪魚蛋白質水解物中可提供一些抗氧化活性物質而中止自由基的連鎖反應。

L-ascorbic acid、BHT 作為本實驗的正對照組，結果發現 BHT 之甲醇溶液在濃度 5 mM (1.1 mg/mL) 下，已具有相當高的清除能力 (90.10%)，其因

BHT 之本身結構具有可提供 H^+ 給自由基 (Bondet et al., 1997) 【圖 5-1】，可穩定不安定的自由基分子，然後阻斷脂質氧化的進行。雖然 BHT 可有效清除自由基，但是文獻指出使用人工合成抗氧化劑可能會誘發癌症發生 (Branen, 1975)，故基於健康理由，現今都改以天然的抗氧化物取代。另外，發現以 L-ascorbic acid 之水溶液作為對照組，則無法偵測出 EC_{50} ，最高僅有 12.42 % (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (數據未顯示)。尚有文獻指出，ascorbic acid 濃度為 40 μM (7.04 mg/mL) 時，此時清除 DPPH 自由基能力約為 45 % (Sheih et al., 2009); Lee et al. (2008) 以 ascorbic acid 作為發酵大豆蛋白清除 DPPH 自由基能力的正對照組，結果顯示最高清除能力僅有 24.1% (1 mg/mL)。由以上結果皆無法偵測出 L-ascorbic acid 之 EC_{50} ，故推測原因為 DPPH 是一種烷基自由基，偏脂溶性，而 L-ascorbic acid 是一種水溶性抗氧化劑，則不易與 DPPH 產生作用所致 (林，2009)。



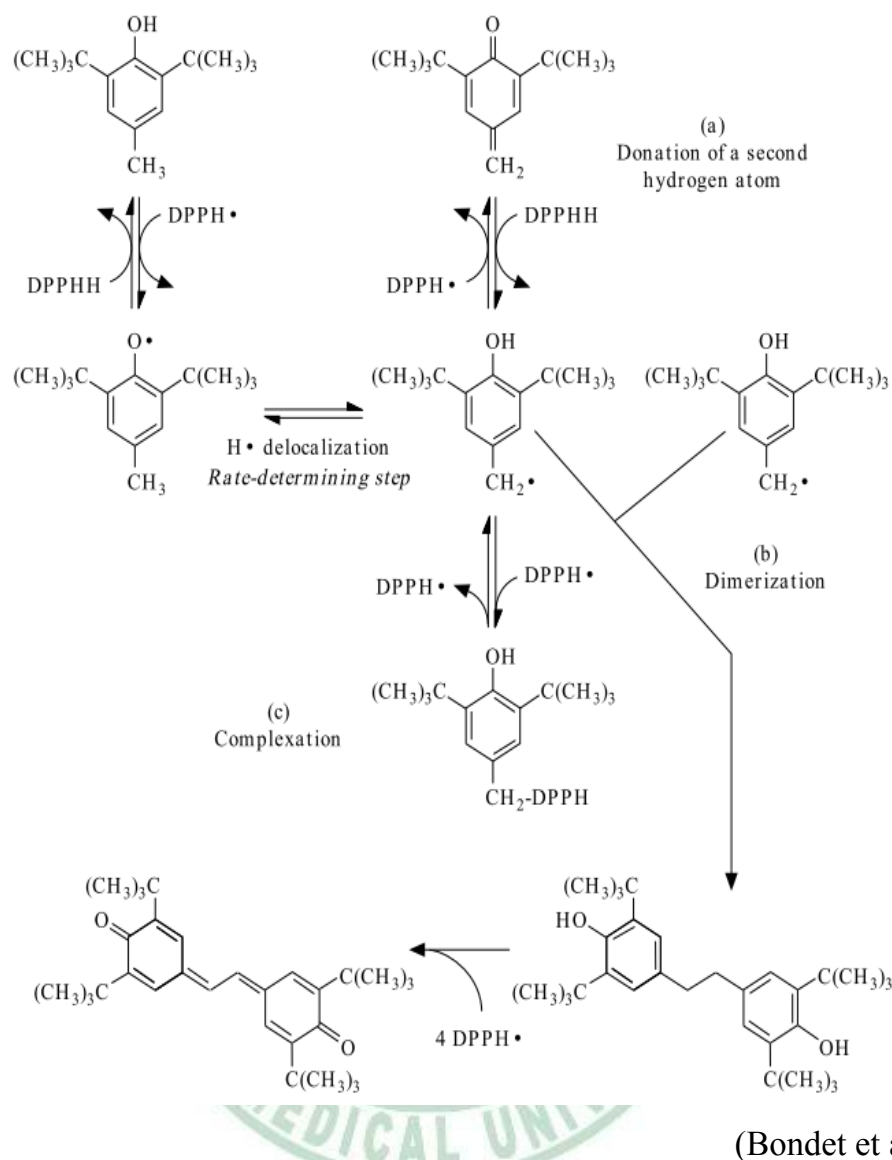


圖 5-1 BHT 與 DPPH 自由基的作用機制

Figure 5-1 Proposed mechanism for BHT/DPPH• reaction.

(二) 亞鐵離子螯合能力

在多種過渡金屬中，如：鐵、鈷、銅等金屬離子，於食品中會催化油脂氧化反應，特別當 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 存在下與過氧化氫作用，便會產生大量自由基，加速油脂氧化反應的進行，也因此可能會造成食品的風味、顏色以及營養價值降低 (Gordon, 2001)；反之，食品中若存有少量金屬離子，具有促進脂質氧化作用，倘若胜肽能與這些金屬離子螯合，便能降低脂質氧化的起始反應速率，以減少脂質氫過氧化作用 (Klompong et al., 2007)。其研究發現，藉由某

些胜肽或蛋白質具螯合金屬，減少 ROS 產生 (Sakar, 1987)。本結果顯示，經過酶水解後所產生之鮪魚蛋白質水解物的亞鐵離子螯合能力，以水解 2 hr 的 AM 和 3 hr 的 PA 蛋白質水解物為效果最佳，其 EC_{50} 分別為 4.91 和 5.19 mg of dried extract/mL。先前文獻顯示，具有螯合能力的蛋白質水解物可降低油脂氧化，是因胜肽的斷裂而增加酸性與鹼性胺基酸之側鏈羧基及胺基端的濃度，增加與 Fe^{2+} 的結合能力 (Dong et al., 2008)。然而，當 AM 及 PA 蛋白質水解物濃度為 20 mg of dried extract/mL 時，其亞鐵離子螯合能力則可高達到 97% 以上。有學者將 silver carp 魚肉利用 alcalase 水解，結果發現其亞鐵離子螯合能力顯示出小分子量的蛋白質水解物具有較佳的螯合能力 92.7 % (5 mg/mL) (Dong et al., 2007)。由此可見，鮪魚血合肉加工副產品經蛋白酶水解後可產生短胜肽物質，且具有良好的螯合能力，故可當作一個天然的金屬螯合劑。

(三) 還原力

還原力為一種測量樣品提供電子讓 Fe^{3+} 還原成 Fe^{2+} 的能力，以波長 700 nm 下測定，吸光值越高則表示還原力越高 (Oyaizu, 1986)，可當作抗氧化活性指標之一。由先前文獻指出，鮪魚蛋白質水解物經 protease N 水解 0 ~ 25 hr，結果發現還原力會隨水解時間的增加而逐漸上升 (吸光值為從 0.38 上升至 0.65) (Wu et al., 2003)。但也有研究指出，以 yellow stripe trevally 為原料利用 alcalase 水解，測其不同 DH (5、15 和 25%) 下的還原力，結果顯示隨水解度上升，還原力也有逐漸下降的趨勢 (吸光值從 0.56 降至 0.42) (Klompong et al., 2007)；另外也有以 alkaline-aided channel catfish 當作原料以 protamex 水解，研究發現還原力也會隨水解時間增加而下降 (吸光值從 0.33 降至 0.17) (Theodore et al., 2008)。而本實驗結果顯示，AM 蛋白質水解物還原力之 EC_{50} 會隨水解時間增加而逐漸下降 (EC_{50} 從 5.90 至 9.54 mg of dried extract/mL)，與後 2 者的結果相似。有研究顯示，還原酮 (reductones) 如

ascorbic acid 可直接與過氧化物及其相關的前驅物可有效預防自由基生成 (Shimada et al., 1992)。實驗發現 L-ascorbic acid 在濃度 0.03 mM (0.088 mg/mL) 下則具有很好的還原力，此時，吸光值為 1.609。以整體來說，還原力會受蛋白酶種類不同而有所影響，推測鮪魚蛋白質水解物中可能含有一些物質可藉由提供電子給自由基而此達到抗氧化效果 (Murase et al., 1993)。

綜合以上所述，AM 及 PA 蛋白質水解物皆具有亞鐵離子螯合能力與清除 DPPH 自由基能力及還原力。其中又分別以水解 3 和 2 hr AM 及 PA 蛋白質水解物最具抗氧化活性，由此可見，鮪魚蛋白質水解物可作為一級或是二級抗氧化物。有研究指出，抗氧化活性主要會受與原料、蛋白酶種類、水解度、胺基酸組成分以及胜肽之胺基酸序列等影響 (Kim et al., 2001; Wu et al., 2003)，本實驗所使用 2 種商業蛋白酶 (AM 及 PA) 其主要作用位置為疏水性胺基酸之 C 端胜肽鍵 (Loffler, 1986)，如當疏水性胺基酸增加可以增加在油脂中的溶解度，也就是說疏水性胺基酸增加及脂質的親和力較高有關，可以達到抗氧化效果 (Mendis et al., 2005)。另外，在實驗中發現鮪魚蛋白質水解物之亞鐵離子螯合能力濃度在小於 6 mg of dried extract/mL 即可達到 EC_{50} ，還原力濃度在小於 8 mg of dried extract/mL 即可達到 EC_{50} ，清除 DPPH 自由基能力則需濃度小於 18 mg of dried extract/mL 才可達到 EC_{50} ，相較之下，以亞鐵離子螯合能力所需濃度較低。當樣品濃度越低則表抗氧化活性越好。故基於成本考量下，後續實驗則選用抗氧化活性最好的 AMH 及 PAH 做進一步的純化分離，並以亞鐵離子螯合能力作為抗氧化活性指標。

由本實驗結果發現 DH 與抗氧化活性並無太大相關性，有其他相關 DH 先前有文獻指出，以 flavourzyme 水解 silver carp 魚肉 0 ~ 6 hr，結果發現抗氧化活性會隨 DH 而逐漸上升 (Dong et al., 2008)；Jun et al. (2004) 將 yellowfin sole 利用 mackerel intestine crude enzyme (MICE)、alcalase、chymotrypsin、papain、pepsin、pronase E 等多種蛋白酶水解後並測定其 DH，結果顯示最高與最低之 DH 分別為 67% (MICE) 及 22% (pepsin)，並測其各

抗氧化活性。結果顯示 pepsin 水解物具有最佳抑制亞麻油酸過氧化作用 (70%)，由此得知在低 DH 下抗氧化活性較佳。綜合以上所述，再次證明 DH 與抗氧化活性無一定關聯性。

此外，鮪魚蛋白質水解物之清除 DPPH 自由基、還原力以及亞鐵離子螯合能力皆與水解物濃度 (0 ~ 30 mg of dried extract/mL) 呈正相關。在 Sheih et al. (2009) 文獻中指出，海藻蛋白質水解物在清除 DPPH 自由基能力 (0 ~ 30 μ M) 與 ABTS⁺ 自由基 (0 ~ 60 μ M) 也會隨濃度的增加而提升抗氧化活性，本實驗結果與此文獻一致。

四、鮪魚蛋白質水解物之分離純化與抗氧化活性

(一) 凝膠過濾法

凝膠過濾法是利用交聯聚合物具有分子篩效果，將物質按分子量大小不同而做分離之方法 (Vink, 1970)。本實驗利用此方法先大致區分鮪魚蛋白質水解物之分子量範圍，AMH 及 PAH 經分離後可分出 4 個和 5 個區分物。發現經由蛋白酶作用後可以有效將蛋白質水解成短肽，其分子量大多落在 1,423 Da 以下。在分子量方面，有許多文獻發現，蛋白質水解物具有抗氧化的活性肽其分子量皆不大，一般為 500 ~ 1,800 Da，如：巨大鮭魚明膠水解物 (880 Da 和 1,242 Da) (Mendis et al., 2005)；海鰻水解物 (928 Da) (Ranathunga et al., 2006)；yellow stripe trevally 水解物 (656 Da 和 617 Da) (Klompong et al., 2009)；海水輪蟲水解物 (1,076 Da 和 1,033 Da) (Byun et al., 2009)；牛蛙明膠蛋白質水解物 (1,487 Da) (Qian et al., 2008) 等。在抗氧化活性測定方面，常見包含有抑制亞麻油酸過氧化作用、清除 DPPH 自由基能力、清除氫氧自由基、總抗氧化能力、亞鐵離子螯合能力等。近年有許多文獻指出，利用 pepsin 水解出的 hoki 骨架蛋白質水解物 (Hoki fame protein hydrolysate; HPH)，再經 UF 法後可分離出 4 個區分物，分別為 HPH I (5 ~ 10 kDa)、HPH II (3 ~ 5 kDa)、HPH III (1 ~ 3 kDa)、HPH IV (<1kDa)，並分析

抗氧化活性，發現 HPH III (1 ~ 3 kDa) 可有效抑制 80% 氫氧自由基和 DPPH 自由基能力以及降低 85% 烷基自由基生成 (Je et al., 2005a)。結果顯示，將各區分物測定其亞鐵離子螯合能力在濃度為 10 mg of dried extract/mL，以 PAH1 效果最為顯著 (92.36%)；AMH2 各區分物雖在彼此間無顯著性差異，但以數據結果來看，以 AMH2 (76.34%) 的效果為最佳。有文獻指出，鮭魚、鮪魚、鯖魚等遠洋性魚類，其含有一些 His 雙胍肽物質 (carnosine 和 anserine) (Van Waarde, 1988)。Carnoise 具有螯合金屬能力的結構可有效與金屬離子形成化合物以減少促氧化能力 (Chan et al., 1994)。由此推測鮭魚蛋白質水解物中可能含有具有螯合金屬能力的胍肽物質。在鮭魚相關研究方面，有學者利用鮭魚蒸煮液經蛋白酶水解 3 hr 所得之 protease XXIII 蛋白質水解物再經凝膠過濾法區分其分子量範圍，可得 5 個主要區分物，其中以 B 和 C 區分物中的胍肽物質擁有較佳的清除 DPPH 自由基能力 (5 mg/mL) 分別為 94% 和 75%，其分子量介於 390 ~ 1,400 Da (饒, 2002)。由此可知，具有抗氧化活性胍肽量其分子量皆小於 1,500 Da 以下，本實驗結果與此文獻相符。

(二) 高效能液相層析法

高效能液相層析系統主要是由固定相 (stationary phase) 及移動相 (mobile phase) 兩者所組成，二者各有不同的極性或非極性強度；本實驗所使用為逆相層析法，其因蛋白質分子表面有部份疏水性區域，若在極性很強的環境中，則會被吸附在固定相，而留滯原地；相反的與移動相親和力大者，易隨移動相移動，則可被分離出來，因而達成分離的目的 (Marx et al., 1991)。藉此原理本實驗再將最具抗氧化活性物質 AMH2 以及 PAH1 再進一步純化，以期找到更佳純化的活性物質，本實驗結果發現，AMH2e 及 PAH1a 亞鐵離子螯合能力為最佳，在濃度 0.5 mg of dried extract/mL 其螯合力分為 18.89 及 19.33%。有研究指出，發酵大豆蛋白水解物經由 RP-HPLC 分離可得到 6

個區分物 (P1~P6)，其中以 P2 的螯合銅離子能力為最佳 (43.75%)。經酶水解後之蛋白質水解物導致高親和性的金屬螯合基團暴露或是形成，如 imidazole 團和羧基團，此物可增加與 Cu^{2+} 之間的交互作用 (Amadou et al., 2010)。此外，也有研究證實，藉由螯合金屬離子可以有效清除氫氧自由基而達抗氧化的效果 (Nam et al., 2008; Pena-Ramos et al., 2002)。Murase et al. (1993) 等人認為 His 上之 imidazole group 具有金屬離子的螯合能力。故推測本實驗鮭魚蛋白質水解物之胺基酸組成中可能含有較高含量的 His 以及酸性或鹼性胺基酸。

綜合以上所述，這些抗氧化活性胜肽分子量均皆小於 1,423 Da，因此，本實驗與之前研究結果 (介於 500 ~ 1,800 Da) 相符合 (Kim et al., 2007; Ranathunga et al., 2006)。有文獻指出，經酶水解後所產生的胜肽類物質其抗氧化活性機制主要是清除自由基與螯合金屬離子作用 (Chen et al., 1996; Decker et al., 1992)。推論鮭魚血合肉加工副產品在水解過程中會產生具有螯合性的胜肽結構和胺基酸殘基，此類物質會與金屬離子螯合，可以有效降低油脂氧化。

五、 鮭魚蛋白質水解物活性胜肽之胺基酸鑑定

在氧化-抗氧化調節系統中，蛋白質或是胜肽的抗氧化活性是取決於分子量大小與化學特性所判斷 (Suetsuna et al., 2000)。研究顯示，大部分具有抗氧化活性的胜肽皆屬於低分子量 (<1,400 Da) (Rajapakse et al., 2005; Pihlanto, 2006) 且胜肽長度皆為 5 ~ 16 個胺基酸殘基所組成 (Chen et al., 1995; Wu et al., 2003)。根據以前學者報告指出，具有抗氧化活性的胺基酸像是序列中包含了疏水性和電子轉移的胺基酸殘基如：Ala、Val、Pro、Leu 等非極性脂肪族胺基酸，可與多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids; PUFA) 結合，進而降低油脂氧化；Tyr、His、Trp、Phe 等芳香族胺基酸殘基可藉由電子的直接轉移來抑制 ROS 生成以及提供 H^+ 之胺基酸有 Gly、Asp、Glu、Tyr，

可以抑制未成對的電子或是自由基 (Qian et al., 2008)，這些胺基酸都與抑制自由基有相關。

本實驗是利用 MALDI TOF/TOF 為一種應用於蛋白質體學研究的質譜儀，可先用一次質譜先測定待測樣品之分子量，接著經二次質譜儀所碰撞出的碎裂片段經軟體分析去鑑定可能的胜肽之胺基酸序列 (Suckau et al., 2003)，本結果顯示，AMH2e 和 PAH1a 分別可得 1 及 2 個胜肽之胺基酸序列：AMH2e 為 Arg-Pro-Pro-Arg-Arg (681.5 Da)；PAH1a 為 Asp-Thr-His-His-Arg-Arg-Lys-Pro (1,046.6 Da) 和 His-Met-Leu-His-Lys-His-Met-Leu-Leu-His (1,296.8 Da) 是具有最佳的亞鐵離子螯合能力，其中與胜肽的胺基酸組成分和分子量大小占有很大的關聯性。先前文獻指出，胜肽的斷裂可增加酸性與鹼性胺基酸之側鏈羧基及胺基端的濃度，增加與 Fe^{2+} 的螯合能力，降低 ROS 生成，而抑制油脂氧化 (Dong et al., 2008)。His 具有 imidazole 環也可以與金屬離子螯合 (Chan et al., 1994; Chen et al., 1998)。本實驗 AMH2 及 PAH1a 胺基酸序列中包含了鹼性胺基酸 (Arg、Lys)、酸性胺基酸 (Asp) 以及 His，分別占 60%、75% 以及 50%。這些胜肽是由 5~10 個胺基酸殘基組成其分子量為 681.5、1,046.6、1,296.8 Da。有研究出，鮭魚蒸煮液經 protease XXIII 水解之水解產物具有抗氧化活性胜肽，結果發現 7 個最具有抗氧化活性胜肽中其中有 5 個活性胜肽皆含有 His (Jao, 2002)。驗證這些胺基酸殘基是造成 AMH2e 和 PAH1a 之亞鐵離子螯合能力為最佳的因素，本實驗結果與之前文獻相符。

綜合以上所述，AMH2e 與 PAH1a 為最具亞鐵離子螯合能力，故鮭魚血合肉加工副產品經蛋白酶水解後可產生不具副作用的抗氧化活性胜肽可利於機能性食品之開發。另外，序列中也包含 Arg、His、Leu、Lys、Met、Thr 等必需胺基酸，在食品應用上則可以當作額外的營養添加劑。

第六章 結論

蛋白質是由許多胺基酸所構成的，其中某些胺基酸或是胜肽是具有抗氧化活性及抑制脂質氧化能力。我們藉由將鮪魚血合肉加工副產品利用商業蛋白酶 (AM 及 PA) 水解，再經過一系列的分離純化，再經質譜儀分析鑑定後找到 AMH2e 與 PAH1a 之最具抗氧化活性胜肽胺基酸序列，序列為 Arg-Pro-Pro- Arg-Arg (681.5 Da) ; Asp-Thr-His-His-Arg-Arg-Lys-Pro (1,046.6 Da) 和 His- Met-Leu-His-Lys-His-Met-Leu-Leu-His (1,296.8 Da)，可得知這些序列含有鹼性、酸性胺基酸殘基及 His，提供了很好的金屬螯合能力，可以間接清除自由基，進而降低油脂氧化，故鮪魚血合肉加工副產品可當作一種無副作用天然又安全的抗氧化劑使用。除此之外，還可以提供一些必需胺基酸包含 Arg、His、Leu、Lys、Met、Thr，在食品應用上，可以提供額外的營養價值。因此，在未來可將這 2 種鮪魚蛋白質水解物鑑定出的抗氧化活性胜肽之胺基酸序列進行模擬以合成相同序列，觀察其是否也具有類似抗氧化活性效果，最後可再深入做細胞實驗或動物實驗。因此，鮪魚血合肉加工副產品有利於機能性食品之開發且提升副產品的經濟價值。

第七章 文獻參考

- 王正德，王惠珠，李嘉展，孫芳明，陳政雄，劉世銓，駱錫能，韓建國，蘇正德。2001。新編食品化學。華格那出版社。台中市。345-347。
- 李秀，賴滋漢，柯文慶。食品分析與檢驗。2000。富林出版社。台中市。171-173。
- 行政院農委會漁業署。2008。行政院農業委員會漁業署 2008 年報。台北市。4-11。
- 行政院農委會漁業署。2008。民國 97 年漁業統計年報-水產罐頭製品產量及價值。台北市。
- 呂鋒洲。1993。抗氧化酵素之介紹。自由基生物學與醫學。21, 1-17。
- 林油潭，林志誠。1990。罐頭製造業台灣水產加工業現況專輯。台灣省漁業局。台北市。50-55。
- 林國民，王柏森，陳佑融。2009。利用酵素水解脫脂米糠以製備含生理活性胜肽之水解物。嘉南藥理科技大學食品科技系。1-13。
- 林玫欣。1999。鯖魚肉與內臟水解物之抗氧化性研究。國立海洋大學食品科學系碩士論文。
- 周照仁。1990。冷凍品。台灣水產加工業現況專輯。台灣省漁業局。台北市。11-12。
- 張文重。1977。蛋白質分解酵素。國立編譯館。台北市。
- 陳天任、賴景陽、何平合、柳芝蓮、陳章波。1996。台灣常見魚貝類圖說 (下)-魚類。農委會漁業署。台北市。235。
- 陳如茵。2000。食品之氧化控制及抗氧化成分。科學與技術。32 (8), 43-50。
- 陳怡宏。1999。生物活性胜肽及其合成。食品工業。31, 1-8。
- 孫寶年，李國浩，翁秀貞。1991。台灣地區常見食用魚貝類圖說。行政院衛生署 編印。台北市。58-59。
- 鄭名凡。1999。蛋白質水解物的功能與應用。食品資訊。160, 49-54。
- 鄭靜桂。1997。蛋白質之水解與水解液之利用。食品工業。29(5), 10-17。

- 賴滋漢，金安兒。2006。食品加工學。富林出版社。台中市。91，127-131。
- 饒家麟。2002。鮪魚蒸煮液蛋白質酵素水解物之製備與抗氧化機能之研究。國立中興大學博士論文。
- Adler-Nissen, J., 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem*, 27, 1256-1262.
- Adler-Nissen, J., 1986. Enzymatic hydrolysis of food protein. Elsevier.
- Amadou, I., Gbadamosi, O. S., Shi, Y. H., 2010. Identification of antioxidative peptides from *Lactobacillus plantarum* Lp6 fermented soybean protein meal. *Res J Microbiol*, 5 (5), 372-380.
- Amarowicz, R., Shahidi, F., 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chem*, 58, 355-359.
- Ames, B. N., 1989. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat Res*, 214, 41-46.
- AOAC, 1995. Official methods of analytical chemist (16thed.) Arlington: The Association of Official methods of analytical chemists Inc.
- Astawan, M., Wahyuni, M., Yasuhara, T., Yamada, K., Tadokoro, T., Maekawa, A., 1995. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances devired from indonesian drived-salted fish n blood pressure of rats. *Biosci Biotech Biochem*, 59, 425-429.
- Berry, E. M., 1997. Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 66, 991-997.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C., 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH • free radical method. *Food Sci Technol*, 30, 609-615.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., Nasri, M., 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chem*, 118, 559-565.

- Boyer, R. F., McCleary, C. J., 1987. Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferritin iron release. *Free Radic Biol Med.* 3(6), 389-395.
- Branen, A. L., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc*, 52, 59-63.
- Brown W. D., The Concentration of myoglobin and hemoglobin in tuna flesh. *J Food Sci*, 27, 26-28.
- Butterfield, D., Castegna, A., Pocernich, C., Drake, J., Scapagnini, G., Calabrese, V., 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*, 13, 444.
- Byun, H. G., Lee, J. K., Park, H. G., Jeon, J. K., Kim, S. K., 2009. Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Process Biochem*, 44, 842-846.
- Caton, A., McLoughlin, K. and Williams, M., 1990. Southern bluefin tuna: Scientific background to the debate. Bureau of Rural Resources Bulletin No. 3 Australian Government Publishing Service. Canberra, p.4.
- Chabance, B., Jolles, P., Izquierdo, C., Mazoyer, E., Francoual, C., Drouet, L., Fiat, A. M., 1995. Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *Br J Nutr*, 73, 583-590.
- Chan, K. M., Decker, E. A., Lee, J. B., Butterfield, D. A., 1994. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging ability of carnosine and related dipeptides. *J Agric Food Chem*, 42, 1407-1410.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *J Agric Food Chem*, 43, 574-578.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K., 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*, 46, 49-53.

- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K., 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*, 44, 2619-2623.
- Cheng, F. Y., Lin, Y. T., Wan, T. C., Chen, C. M., Lin, L. C., 2007. The study on development of bioactive peptide derived from chicken leg bone protein II antioxidative activity. *J Agric Food Chem*, 45(2), 84-90.
- Choudhury, G. S., Bublitz, C. G., 1996. Computer-based controls in fish processing industry. In G. S. Mittal (Ed.), *Computerized control systems in the food industry*. New York: Marcel Dekker Inc. 513-538.
- Crowell, E. A., Ough, C. S., Bakalinsky, A., 1985. Determination of alpha amino nitrogen in musts and wines by TNBS method. *Am J Enol Vitic*, 36(2), 175-177.
- Collette, B. B., Nauen, C. I., 1983. *FAO Species catalogue. Vol.2. Scombrids of the world . An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B., Lopez-Fandino, R., 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Prot*, 67, 1939-1944.
- Decker, E. A., Crum, A. D., Calvert, J. T., 1992. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J Agr Food Chem*, 40, 756-759.
- Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., Yang, H., 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem*, 107, 1485-1493.
- Dressler, D., Potter, H., 1991. *Discovering Enzymes*. New York, NY: Scientific American Library.
- Dziezak, J. D., 1986. Preservatives: antioxidant. *Food Technol*, 40, 94-102.
- Elias, R. J., Bridgewater, J. D., Vachet, R. W., Waraho, T., McClements, D. J., Decker, E. A., 2006. Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of

- β -Lactoglobulin in food lipid dispersions. *J Agric Food Chem*, 54, 9565-9572.
- Foot, C. S., 1976. Photosensitised oxidation and singlet oxygen: consequences in biological system, In *Free Radical in Biology*., Pryor, W. A., (Ed.) II, 85-133.
- Frokjaer, S., 1994 Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol*, 48(10), 86-88.
- Giese, J., 1996. Antioxidants tool for preventing lipid oxidation. *Food Technol*, 50, 73-82.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C. G., 2004. Angiotensin I- converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int J Dairy Technol*, 57, 173-188.
- Godfrey, T., West, S., 1996. *Industrial Enzymology*. Macmillan Press, London.
- Gordon, M., 2001. Antioxidants and food stability. In *J Pokorny, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.). Antioxidant in Food*. New York, USA: CRC Press, 7-21
- Guérard, F., 2007. Enzymatic methods for marine by-products recovery. In: Shahidi F, editor. *Maximizing the value of marine by-products*. Cambridge, England: Woodward Publishing Limited, 107-143.
- Guerard, F., Guimas, L., Binet, A., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B Enzyc*, 19-20, 489-498.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., Aruoma, O. I., 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol*, 33, 601-617.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1989. Free radicals, aging and disease. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon press, Oxford. *J Free Radic Biol Med*, 484-487.
- Hartmann, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol*, 18, 163-169.
- Hazato, T., Kase, R., 1986. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from porcine plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, 139, 52-55.

- Hernandez-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B., Amigo, L., 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem*, 53, 588-593.
- Hoyle, N. T., Merritt, J. H., 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J Food Sci*, 59, 76-79.
- Hwang, J. S., Ko, W. C., 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates from tuna broth. *J Food Drug Anal*, 12(3), 232-237.
- Jao, C. L., Ko, W. C., 2002. Utilization of cooking juice of young tuna processed into canned tuna as condiments: Effect of enzymatic hydrolysis and membrane treatment. *Fish Sci*, 68, 1344-1351.
- Je, J. Y., Kim, S. Y., Kim, S. K., 2005a. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. *Eur Food Res Technol*, 221, 157-162.
- Je, J. Y., Park, P. J., Byun, H. G., Jung, W. K., Kim, S. K., 2005. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *Bioresour Technol*, 96, 1624-1629.
- Je, J. Y., Park, P. J., Kim, S. K., 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res Int*, 38, 45-50.
- Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., Kim, S. K., 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem*, 42, 840-846.
- Je, J. Y., Qian, Z. J., Lee, S. H., Byun, H. G., Kim, S. K., 2008. Purification and antioxidant properties of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) dark muscle peptide on free radical-mediated oxidative systems. *J Med Food*, 11, 629-637.
- Je, Y. J., Park, P.J. Kim, S.K., 2004. Free radical scavenging properties of heterochitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. *Food Chem Toxicol*, 42, 381-387.

- Jin, Z. Q., Chen, X., 1998. A simple reproducible model of free radical-injured isolated heart induced by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). *J Pharmacol Toxicol Methods*, 39, 63-70.
- Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., Kim, S. K., 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur Food Res Technol*, 219, 20-26.
- Kayser, H., Meisel, H., 1996. Stimulation of human peripheral lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters*, 383, 18-20.
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. G., Davies, D. R., Phillips, D. C., Shore, V. C. 1960. Structure of myoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 2 angstrom resolution. *Nature*, 185, 422-427.
- Kim, E. K., Lee, S. J., Jeon, B. T., Moon, S. H., Kim, B., Park, T. K., Han, J. S., Park, P. J., 2009. Purification and characterisation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. *Food Chem*, 114, 1365-1370.
- Kim, G. H., Jeon, Y. J., Byun, H. G., Lee, Y. S., Kim, S. K., 1998. Effect of calcium compounds from oyster shell bound fish skin gelatin peptide in calcium deficient rats. *J Korean Fish Soci*, 31, 149-159.
- Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Nam, K. S., Joo, D. S., Shahidi, F., 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J Agric Food Chem*, 49, 1984-1989.
- Kim, S. K., Mendis, E., 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Res Int*, 39, 383-393.
- Kim, S. Y., Je, J. Y., Kim, S. K., 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *J Nutr Biochem*, 18, 31-38.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F., 2007. Antioxidative

- activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem*, 102, 1317-1327.
- Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., Hayes, K. D., 2009. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *J Food Sci*, 74, 126-133.
- Kohmura, M., Nio, N., Kudo, K., Minoshima, Y., Munekata, E., Ariyoshi, Y., 1989. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human α -casein. *Agric Biol Chem*, 53, 2107-2114.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des*, 9(16), 1297-1308.
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., Appel, L. J., 2003. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: New recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 151-152.
- Kwon, D. Y., Oh, S. W., Lee, J. S., Yang, H. J., Lee, S. H., Lee, J. H., Lee, Y. B., Sohn, H. S., 2002. Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptides originated from glycinin hydrolyzate. *Food Sci Biotechnol*, 11, 56-61.
- Lahl, W. J., Grindstaff, D. A., 1994. Enzymatic production of protein hydrolyzate for food use. *Food Technol*, 48(10), 68-71.
- Larsen, T., Thilsted, S. H., Konsbak, K., Hansen, M., 2000. Whole small fish as a rich calcium source. *B J Nutr*, 83, 191-196.
- Lee, Y. L., Yang, J. H., Mau, J. L., 2008. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybean. *Food Chem*, 106, 1128-1137.
- Li, Y., Tome', D., Desjeux, J. F., 1989. Indirect effect of casein phosphopeptides on calcium absorption in rat ileum in vitro. *Reprod Nutr Dev*, 29, 227-233.
- Loffler, A., 1986. Proteolytic enzymes: Sources and applications. *Food Technol*, 40 (12), 63-70.
- Mahmoud, M. I., 1994. Physicochemical and functional properties of protein

- hydrolysates in nutritional products. *Food Technol*, 48(10), 89-95.
- Manley, C. H., Ahmedi, S., 1995. The development of process flavors. *Trends Food Sci Technol*, 6, 46-51.
- Marx, C. T., Hodges, R. S., 1991. High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analysis, and conformation, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London. p5.
- Meisel, H., 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J*, 8, 363-373.
- Mellander, O., 1950. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta o Soc Med Uppsal*, 55, 247-255.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., Kim, S. K., 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci*, 77, 2166-2178.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S. K., 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem*, 53, 581-587.
- Mullally, M. M., Meisel, H., FitzGerald, R. J., 1997. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int Dairy J*, 7, 299-303.
- Murase, H., Nagao, A., Terao, J., 1993. Antioxidant and emulsifying a ctivity of N-(long-chain-acyl) histidine and N-(Long-chain-acyl) carnosine. *J Agric Food Chem*, 41, 1601-1604.
- Nagai, T., Izumi, M., Ishii, M., 2004. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. *Int J Food Sci Tech*, 39, 239-244.
- Nam, K. A., You, S. G., Kim, S. M., 2008. Molecular and physical characteristics of squid (*Todarodes pacificus*) skin-collagens and biological properties of their enzymatic hydrolysates. *J Food Sci*, 73, 249-255.
- Namiki, M., Osawa, T., 1986. Antioxidants/antimutagens in foods. *Basic Life Sci*, 39, 131-142.

- Nordberg, J., Arner, E. S., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 31, 1287-312.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44, 307-315.
- Peña-Ramos, E. A., Xiong, Y. L., Arteaga, G. E., 2004. Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *J Sci Food Agric*, 84, 1908-1918.
- Pederson, B., 1994. Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technol*, 48(10), 96-98.
- Peña-Ramos, E. A., Xiong, Y. L., 2002. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *J Food Sci*, 67, 92952-92956.
- Peña-Ramos, E. A., Xiong, Y. L., 2003. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Sci*, 64, 259-263.
- Pihlato, A., 2006. Review: antioxidative peptides derived from milk protein. *Int Dairy J*, 16, 1306-1314.
- Pryor, W. A., 1982. Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging. *Ann N Y Acad Sci*, 393, 1-22.
- Qian, Z. J., Jung, W. K., Kim, S. K., 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana*. *Shaw Bioresour Technol*, 99, 1690-1698.
- Qian, Z. J., Je, J. Y., Kim, S. K., 2007. Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *J Agric Food Chem*, 55, 8398-8403.
- Quiros, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Martin-Alvarez, P. J., Aleixandre, A., Recio, I., 2006. Determination of the antihypertensive peptide LHLPLP in fermented milk by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Dairy Sci*, 89, 4527-4535.
- Ranathunga, S., Rajapakse, N., Kim, S. K., 2006. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger*

- myriaster*). *Eur Food Res Technol*, 222, 310-315.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. G., Kim, S. K., 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative system. *J Nutr Biochem*, 16, 562-569.
- Rydlo, T., Miltz, J., Mor, A., 2006. Eukaryotic antimicrobial peptides: promises and premises in food safety. *J Food Sci*, 71, 125-135.
- Saiga, A., 2003. Studies on functional properties of peptides derived from meat proteins- Antioxidant and antihypertensive activities. *J Grad Sch Biosp*, 42, 65-67.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Raj Juneja, L., 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chem*, 86, 99-103.
- Sarkar, B., 1987. Metal protein interactions. *Prog Food Nutr Sci*. 11, 363-400.
- Scandalios, J. G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 38, 995-1014.
- Shahidi, F., Wanasundara, P. K., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 32, 67-103.
- Sheih, I. C., Wu, T. K., Fang, T. J., 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour Technol*, 100, 3419-3425.
- Sheu, S. S., Nauduri, D., Anders, M. W., 2006. Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction. *Biochim Biophys Acta*, 1762, 256-265.
- Shi, X., Dalal, N. S., Jain, A. C., 1991. Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem Toxicol*, 29(1), 1-6.
- Sikorski, Z. E., Naczek, M., 1981. Modification of technological properties of fish protein concentrate. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 14, 201-230.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin

- emulsion. *J Agri Food Chem*, 40, 945-948.
- Song, L., Li, T., Yu, R., Yan, C., Ren, S., Zhao, Y., 2008. Antioxidant activities of hydrolysates of *Arca subcrenata* prepared with three proteases. *Mar Drugs*, 6, 607-619.
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A., 2003. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem*, 376, 952-965.
- Suetsuna, K., 2000. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. *Mar Biotechnol*, 5-10.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H., 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem*, 11, 128-131.
- Suzuki, T., Hirano, T., Suyama, M., 1987. Free imidazole compounds in white and dark muscles of migratory marine fish. *Comp Biochem Physiol B*, 87, 615-619.
- Theodore, A E., Raghavan, S., Kristinsson, H. G., 2008. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. *J Agric Food Chem*, 56, 7459-7466.
- Tsuge, N., Eikawa, Y., Namura, Y., Yamamoto, M., Sugisawa, K., 1991. Antioxidative activity of peptides prepared by enzymic hydrolysis of egg white albumin. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 65, 1635-1641.
- Uchida, K., Kawakishi, S., 1992. Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper(II)/ascorbate. *J Agri Food Chem*, 40, 13-16.
- Van Waarde, A., 1988. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production. *Comp Biochem Physiol*, 91, 207-228.
- Vink, H., 1970. Principles of gel chromatography. *J Chromatogr A*, 52, 205-212.
- Wu, H. C., Chen, H. M., Shiau, C. Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int*, 36, 949-957.
- Wu, H. C., Pan, B. S., Chang, C. L., Shiau, C. Y., 2005. Low-molecular-weight

- peptides as related to antioxidant properties of chicken essence. *J Food Drug Anal*, 13(2), 176-183.
- Yen G., Wu J., 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extract from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem*, 65, 375-379.
- Yvon, M., Beucher, S., Guilloteau, P., Le Huerou-Luron, I., Corring, T., 1994. Effects of caseinomacropptide (CMP) on digestion regulation. *Reprod Nutr Dev*, 34, 527-537.
- Zhong, F., Liu, J., Ma, J., Shoemaker, C. F., 2007. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Res Int*, 40, 661-667.

