行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

於膜反應器中利用酵素水解豬血生產生物活性胜肽(第一年)

Manufacture of bioactive peptides by enzymatic hydrolysis of porcine blood in a membrane reactor (the first year)

計畫編號：NSC 90-2214-E-002-037

執行期限：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

主持人：蔣丙煌 教授　國立臺灣大學食品科技研究所

計畫參與人員：魏任廷　國立臺灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

豬隻全血液中約有 17～18 %之粗蛋白質，為一良好的動物性蛋白質來源。本研究分別利用豬血球、血漿、去纖維蛋白原血漿為受質，於幾種酵素組合下進行水解，探討生產生物活性胜肽的可行性。其中以血球為受質，使用單一酵素 trypsin 水解 24 小時，可得到較佳之還原力，如果使用 trypsin、chymotrypsin、 thermolysin 所組成的混合酵素水解，水解 6 小時，可得到較佳抑制 ACE 能力，IC_{50} 為 0.58 mg/ml，水解 10 小時可得到較佳的清除 DPPH 自由基效果，其清除能力為 64.9% ，而水解液之胜肽分子量主要集中於 1002~1450 Da，初步推論較具活性成分之胜肽為 9~13 胺基酸組成。

關鍵詞：生物活性胜肽、豬血、酵素水解、膜反應系統

Abstract

Porcine blood contains 17~18% protein, is a good source of protein for food. In this study, hydrolysates of red blood corpuscle, blood plasma and defibrinated blood plasma were prepared by enzymatic hydrolysis with several proteases, and evaluated for the possibility of using the enzymatic processes for manufacturing bioactive peptides. Results showed that trypsin hydrolysate of red blood corpuscle had the highest reducing power after 24 hours hydrolysis. The hydrolysate produced by hydrolyzing red blood corpuscle with trypsin, chymotrypsin and thermolysin showed the highest ACE inhibitory activity (IC_{50} = 0.58 mg/ml) and the highest scavenging effect on DPPH (scavenging effect = 64.9%) after 6 hours and 10 hours hydrolysis, respectively. The major peptides produced having molecular weight ranged from 1002 to 1450 Dalton, composed of 9 ~ 13 amino acids.

Keywords: bioactive peptides, procine blood, enzymatic hydrolysis.

二、緣由與目的

台灣地區每年家畜屠宰量相當可觀。每頭豬隻採血量約三公升，全血液中約有 17-18%為粗蛋白質[1]，為一良好的動物性蛋白質資源。目前除少部分豬血製成豬血糕、豬血塊供食用或做為肥料、飼料外，其餘大部分均以廢棄物方式處理。此不僅易造成環境污染，且為蛋白質資源之一大浪費。

近年來國人在藥補不如食補的觀念影響之下，保健食品的市場佔有率逐年提高，而動物性保健食品中以雞精類之產品最受國人的喜好。若以此產品的模式應用於其他動物蛋白質酵素水解物上，確立其生理功能後，應可開發更具價值之機能性食品。

利用各種動植物蛋白質生產生物活性胜肽(bioactive peptides)已有相當多的研究，如：抗菌性胜肽[2. 3. 4]、類鴨片胜肽[5]、血管收縮素轉化酶抑制劑(ACEI) [6. 7. 8. 9]、免疫活性胜肽[10]、抗氧化胜肽[11. 12. 13. 14]、抗腫瘤等活性[15. 16. 17 18]。

Table 1. Peptide yields and ACE inhibitory activities of the hydrolysates of red blood corpuscle, blood plasma and defibrinated blood plasma.

Protein source	Protease*	Peptide yield (%)	ACE inhibitory activity	
			hydrolysis time (h)	IC50 value (mg/ml)
red blood corpuscle	T	10	10	2.80
	TCT	27	6	0.58
	A	3	2	1.60
	AF	23	10	1.24
blood plasma	T	5	10	4.10
	TCT	4	2	0.80
	A	16	6	1.24
	AF	18	2	1.37
defibrinated blood plasma	T	-	-	-
	TCT	3	2	1.06
	A	5	24	2.20
	AF	-	-	-

* T: trypsin, TCT: trypsin. chymotrypsin. thermolysin, A: alcalase, AF: alcalase. flavozyme

由於豬血的蛋白質含量豐富具有生產生物活性胜肽的潛力，因此，本研究利用豬血為原料，以酵素水解方式生產生物活性胜肽。

豬血可離心分離成血球及血漿。由於血漿中的纖維蛋白原(fibrinogen)和凝血因子Ⅷ (Clotting Factor Ⅷ) 對血友病患者治療有很高的利用價值，因此以冷凍沈澱法將其沈澱分離出來，而上清液仍含有大量的蛋白質，亦為本研究的酵素水解基質之一，再加上血球及血漿，本研究分別以這三部分為酵素水解的基質，探討生產生物活性胜肽的可行性。本報告為三年期計畫之第一年成果，研究目的為探討如何利用豬血生產生物活性胜肽，找出適當之酵素與受質組合、水解條件以及具潛力之生物活性胜肽。

三、結果與討論

(A)抑制血管收縮素轉化酶測試

本研究選擇常用於生產活性胜肽之水解酵素(trypsin, chymotrysin, thermolysin, alcalase, flavozyme 等)來水解豬血成分，所獲得水解液之抑制 ACE 活性的能力如表一所示。結果顯示，使用單一酵素 trypsin 水解血漿之水解液之抑制 ACE 活性最差，可能是因為血漿部份含有水解酵素抑制劑所致[19]。若使用複合的 trypsin. chymotrypsin. thermolysin 酵素，隨著水解時間增加，ACE 抑制活性增加。水解血球 6 小時，可達到最佳的 ACE 抑制效果，IC_{50} 為 0.58 mg/ml。文獻指出 ACE 抑制劑多為含有 2 ~12 個胺基酸的短鏈胜肽，水解物的水解程

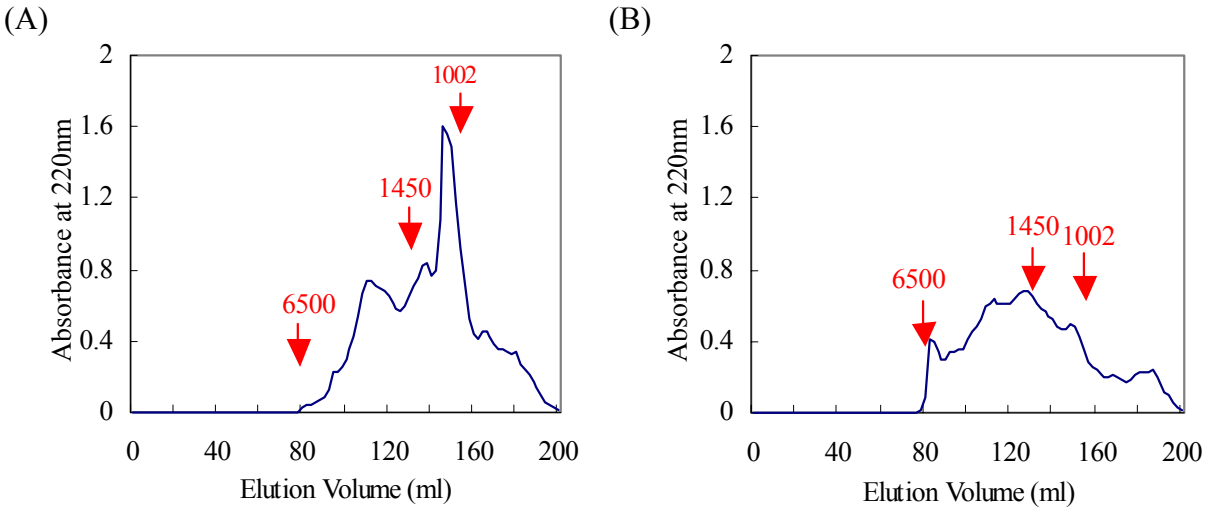

Fig. 1. Elution patterns of porcine red blood corpuscle solution on Sephadex G-25 columnchromatography after (A) 10 hour (B) 2 hour hydrolysis with trypsin. chymotrypsin and thermolysin. Column: 1.5 × 90cm

Table 2. Peptide yields and scavenging effect on α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) radical of the hydrolysates of red blood corpuscle, blood plasma and defibrinated blood plasma.

Protein source	Protease*	Peptide yield (%)	DPPH scavenging effect (%)	
			hydrolysis time (h)	DPPH
red blood corpuscle	T	12	24	20.2
	TCT	30	10	64.9
	A	12	10	62.3
	AF	-	-	-
blood plasma	T	7	24	11.5
	TCT	16	24	24.4
	A	26	24	30.8
	AF	-	-	-
defibrinated blood plasma	T	-	-	-
	TCT	17	24	22.4
	A	5	24	23.4
	AF	-	-	-

* T: trypsin, TCT: trypsin. chymotrypsin. thermolysin, A: alcalase, AF: alcalase. flavozyme

度越高，其平均胜肽鏈就越短，因而可能得到對血管收素轉化酶抑制活性較高的產物。使用膠體管柱層析得到水解液分子量分佈如圖一所示，隨著水解時間增加，分子量逐漸集中於 1002~1450 Da 之間，約為 9~13 胺基酸所組成之胜肽。水解超過 6 小時後，水解物之抑制 ACE 活性逐漸降低，可能是過度水解造成活性胜肽降解成小分子胜肽或胺基酸。

(B)清除自由基能力測試

水解液清除 DPPH 自由基能力方面如表二所示。使用複合的 trypsin. chymotrypsin. thermolysin 酵素，隨著水解時間增加，清除自由基能力增加，水解血球 10 小時所得到之水解液有最佳的清除自由基效果，捕捉能力為 64.9%。以 500 ppm tocopherol 及 500 ppm BHT 這二個已知具強抗氧化能力的物質對照比較，捕捉能力分別為 90.0%及 90.6%。已有文獻證實雙胜肽 anserine、carnosine 具有抗氧化能力，而本研究分析各種酵素水解液之 anserine、carnosine 含量，發現雖然各水解液中皆無 anserine 存在，但清除 DPPH 自由基效果較佳者，其皆含有相當量之 carnosine (表三)。

(C)還原力測試

水解液之還原力如表四所示。還原力之測定參考 1988 年 Oyaizu 之方法 [20]，分析樣品對赤血鹽(potassium ferricyanide)中 Fe^{3+}還原成 Fe^{2+}之亞氰錯離子，而此亞氰錯離子再與 Fe^{3+}生成亞鐵氰化鐵即普魯士藍(Prussian blue)，普魯士藍在 700nm 下有較強之吸光值，吸光值越高即還原力愈強。

使用單一酵素 trypsin 酵素水解，隨著水解時間增加，水解液還原力增加。水解血球 24 小時所得到之水解液有最佳的還原力，OD_{700} 為 0.223。與已知具強還原力的物質 100 ppm、200 ppm ascorbic acid 對照比較，其 OD_{700} 分別為 0.830 及 1.483，水解液之還原力仍失色許多。故仍需選擇適當之酵素予以改進水解液之還原力。

四、計畫成果自評

研究初步結果，證實豬血酵素水解液於體外試驗具有降高血壓及抗氧化活性，而且與具良好抑制 ACE 活性之酪蛋白水解液[11]具有相近活性，但仍需進一步進行動物試驗，確認於體內試驗同樣具有功效，並鑑定該活性胜肽序列，以選擇適當之膜反應系統，提高活性胜肽之濃度。此外，對豬血酵素水解液之其他活性也應該進行測試(如：免疫活性、抗腫瘤活性)，以了解豬血酵素水解液是否還有生產其他活性胜肽之可行性，增廣豬血酵素水解液之用途。

Table 3. Changes in related dipeptide carnosine of porcine red blood corpuscle during hydrolysis with (A) trypsin, chymotrypsin, thermolysin (B) alcalase . (μg /ml)

peptide	hydrolysis time				
	0	2	6	10	24
A	-	45.7	125.2	157.3	123.3
B	-	-	-	90.9	119.1

Table 4. Peptide yields and reducing power of the hydrolysates of red blood corpuscle, blood plasma and defibrinated blood plasma.

Protein source	Protease*	Peptide yield (%)	Reducing power	
			hydrolysis time (h)	OD_{700}
red blood corpuscle	T	12	24	0.223
	TCT	33	24	0.099
	A	3	2	0.182
	AF	-	-	-
blood plasma	T	-	-	-
	TCT	16	24	0.082
	A	20	10	0.051
	AF	-	-	-
defibrinated blood plasma	T	-	-	-
	TCT	17	24	0.059
	A	5	24	0.031
	AF	-	-	-

* T: trypsin, TCT: trypsin. chymotrypsin. thermolysin, A: alcalase, AF: alcalase. flavozyme

五、參考文獻

[1] Ockerman HW, Hansen CL. 1988. Animal by-product processing p. 232. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England.

[2] Kang JH, Shin SY, Jang S, Kim KL, Hahm KS. 1999. Effects of tryptophan residues of porcine myeloid antibacterial peptide PMAP-23 on antibiotic activity. Biochem Biophys Res Commun 264:281-286.

[3] Lee DG, Kim DH, Park Y, Kim HK, Kim HN, Shin YK, Choi CH, Hahm KS. 2001. Fungicidal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Candida albicans*. Biochem Biophys Res Commun 282:570-574.

[4] Yu PL, Choudhury SD, Katja A. 2001. Purification and characterization of the antimicrobial peptide, ostricacin. Biotechnology Letters 23:207-210.

[5] Fiat AM, Daniele MS, Pierre J. 1993. Biological active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunodulating activities. J dairy Sci 76: 301-310.

[6] Arihara K, NakashimaY, Muka, T, Ishikawa S, Itoh M. 2001. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. Meat Sci 57:319-324.

[7] Suetsuna K, Chen JR. 2001. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. J Mar Biotechnol 3:305-309.

[8] Wu J, Ding X. 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. J Agric Food Chem 49:501-506.

[9] Hyun CK, Shin HK. 2000. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. Process Biochemistry 36:65-71.

[10] Kayser H, Meisel H. 1996. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. FEBS Letters 383:18-20.

[11] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. 1998. Antioxidative properties of histindine- containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. J Agric Food Chem 46(1):49-53.

[12] Jao CL, Ko WC. 2002. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. Fisheries Sci 68:430–435.

[13] Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS, Shahidi F. 2001. Isolation and Characterization of Antioxidative Peptides from Gelatin Hydrolysate of Alaska Pollack Skin. J Agric Food Chem 49:1984-1989.

[14] Suetsuna K. 2000. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. J Mar Biotechnol 2:5-10.

[15] 林哲雄。2002。Melittin 抑制鼷鼠黑色素瘤細胞 B16F10 的侵犯和轉移作用之研究。國立臺灣大學毒理學研究所碩士論文。

[16] 吳柏義。2002。人類血纖維蛋白溶脢原之 kringle 結構區對血管新生抑制作用之研究。國立成功大學生物化學研究所碩士論文。

[17] 程靜暐。2002。不同血纖維蛋白溶脢原片段抑制血管新生能力及在基因治療上的療效。國立成功大學生物化學研究所碩士論文。

[18] 葉嘉新。2000。蛇毒蛋白抑制血管新生作用之機轉研究。國立臺灣大學藥理學研究所碩士論文。

[19] 陳炳勳。1980。豬血清中蛋白質水解酵素抑制劑之研究。國立臺灣大學生化科學研究所碩士論文。

[20] Oyaizu M. 1988. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent an thin-layer chromatography. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 35:771-775.

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※　　※
※　於膜反應器中利用酵素水解豬血生產生物活性胜肽　※
※　　※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：■個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號：NSC 90-2214-E-002-037

執行期間：　90 年　08 月　01 日至　91 年　07 月　31 日

計畫主持人：蔣丙煌　教授　國立臺灣大學食品科技研究所

計畫參與人員：魏任廷　國立臺灣大學食品科技研究所

本成果報告包括以下應繳交之附件：

□赴國外出差或研習心得報告一份

□赴大陸地區出差或研習心得報告一份

□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

□國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

中　華　民　國　九 十 一 年　十 月　三 十 日