

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☒ 成果報告
☐ 期中進度報告

利用酵素水解豬血生產含生物活性胜肽
且具生理機能性之產品

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2214-E-002-007

執行期間：93 年 08 月 01 日 至 94 年 07 月 31 日

計畫主持人：蔣丙煌

共同主持人：

計畫參與人員：魏任廷

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☐ 精簡報告 ☒ 完整報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☐ 一年 ☒ 二年後可公開查詢

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

中 華 民 國 九 十 四 年 十 月 三 十 一 日

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。本研究分別以豬血球、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，添加複合酵素(trypsin、chymotrypsin、thermolysin)進行水解，水解 6 hr，可得到較佳抑制ACE能力之水解物，IC₅₀為 0.58 mg/ml；水解 10 hr可得到較佳的清除DPPH自由基，清除能力為 64.9%，而且將該水解液添加在含有 β -amyloid(25-35)之RBE4 培養液中，RBE4 細胞存活率可由 67%升高至 82%，具潛在預防Alzheimer's Disease效果。血球之酵素水解液亦具有其他機能性，包括還原力、促進皮膚纖維母細胞增生、免疫調節、抑制腫瘤細胞生長等，雖然所表現之效果未優於其他已知產品或研究，但在一水解產品中同時存在各類機能性亦屬難得。

綜合上述結果，豬血球水解液在抑制 ACE 能力、清除 DPPH 自由基優於許多動植物蛋白水解液，且同時具潛在預防 Alzheimer's Disease 效果及存在其他功能性，為值得發展成產品。因此，為有效率生產含生物活性胜肽且具生理機能性之產品，本研究進一步利用膜反應器系統連續式量產。當酵素受質比為 1/5，駐留時間 100 min，於操作 2hr 以後，透流液抑制 ACE 活性及清除 DPPH 自由基效果則維持穩定 steady state，抑制 ACE 率達 86%、清除 DPPH 自由基效果達 54%。繼續延長操作時間至 6 小時，該二項機能性未有顯著變化。整體研究結果，在連續式膜反應器生產下，能有效利用豬血生產含生物活性胜肽產品，同時也因節省酵素使用量及具初步脫色的效果，更降低生產成本及提高消費大眾對產品接受度。

關鍵詞：豬血、酵素水解、生物活性胜肽、機能性

Abstract

Porcine blood with 17~18% protein content 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 the hydrolysate produced by hydrolyzing red blood corpuscle with the mixture of trypsin, chymotrypsin and thermolysin had 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. And for the potential protection against Alzheimer's disease, adding this hydrolysate into the RBE4 cell culture medium which contained β -amyloid (23-25) could raise the survival rate of RBE4 cell from 67% to 82%. In respect of other functionalities, including reducing power, proliferation effect on the skin fibroblast WS1 cell, immunomodulatory effect, anti-proliferative activity on the tumor cell line, although the hydrolysates did not show superior capabilities than the other well-known products, this study proved that the hydrolysate did possess such functionalities mentioned above.

Because of the health-promoting functions possessed by the hydrolysate of red blood corpuscles, attempt was made to evaluate the possibility of manufacturing the product continuously using enzymatic membrane reactor. It was found that when the enzyme/substrate ratio was at 1/5 and the residence time 100 min, the system reached a steady state processing condition in 2 h. The ACE inhibitory activity of the product during steady state process was 86%, and its scavenging effect on DPPH was 54%. The steady state process could be maintained for at least 6 h. It was also found that the membrane process decolorated the enzyme hydrolyzed product, and improved the appearance of the product. Therefore, it can be concluded that hydrolyzing the red blood corpuscles in a membrane reactor with a mixture of proteases is a potentially feasible method for producing a health-promoting product.

Keywords: porcine blood, enzymatic hydrolysis, bioactive peptides, functionality

目錄

一、前言.....	1
二、文獻整理.....	1
(一)血液的組成.....	1
(二)血球.....	2
(三)血漿.....	2
(四)蛋白質之酵素水解.....	2
(五)生物活性胜肽.....	4
(六)膜過濾.....	6
(七)膜反應器.....	7
三、研究目的.....	8
四、研究方法.....	8
五、結果討論.....	11
(一)一般成分.....	11
(二)豬血水解液機能性分析.....	12
(三)機能性水解液區分.....	14
(四)膜反應器連續式生產.....	14
六、計畫成果自評.....	15
七、參考文獻.....	15

表次

表一、豬血液組成.....	20
表二、血液中主要脂肪酸組成.....	20
表三、血漿蛋白基本性質.....	21
表四、血球、血漿及去纖維蛋白原血漿凍乾粉末之組成分..	21
表五、豬血球酵素(A)混合酵素[trypsin, chymotrypsin, thermolysin], (B) alcalase 水解過程雙胜肽 Carnosine 之變化情形.....	22
表六、豬血酵素水解液抑制 ACE 活性.....	22
表七、豬血酵素水解液清除 DPPH 自由基效果.....	23
表八、豬血酵素水解液還原力.....	23
表九、豬血酵素水解液刺激 RAW 264.7 細胞釋放 TNF- α	24
表十、以混合酵素(Trypsin、Chymotrypsin、Thermolysin) 水解豬血球 6 小時之水解液其四個分子量區之 ACE IC ₅₀	25
表十一、以混合酵素(Trypsin, Chymotrypsin, Thermolysin) 水解豬血球 10 小時之水解液其四個分子量區之 DPPH 自由基清除率.....	25

圖次

圖一、血液的主要成份.....	26
圖二、腎酵素及血管收縮素系統中血管收縮素轉化酶的催化反應.....	27
圖三、豬血球水解液膠體層析圖.....	28
圖四、豬血球水解液促進 WS1 細胞增生機能。酵素： (A)Trypsin , (B) mixture of Trypsin, Chymotrypsin 、 Thermolysin.....	29
圖五、豬血球、血漿、去纖維蛋白原酵素水解液抑制 (A)B16F10, (B)Hep G2 腫瘤細胞增生效果.....	30
圖六、Transferrin 抑制(A)B16F10, (B)Hep G2 腫瘤細胞 增生效果.....	31
圖七、不同濃度 β -amyloid(25-35)對 Neuro2A 細胞存活數 影響.....	32
圖八、添加混合酵素(Trypsin, Chymotrypsin, Thermolysin) 酵素水解豬血球液於含 β -amyloid(24-35)培養基中對 Neuro 2A 細胞的影響.....	32
圖九、添加(A) Alcalase, (B)複合(trypsin, chymotrypsin, thermolysin) 酵素水解豬血球液於含 β -amyloid 培 養基中對 RBE4 細胞的影響.....	33
圖十、於不同酵素/受質比及駐留時間下膜反應器連續式操 作對豬血球酵素水解液抑制 ACE 活性之影響.....	34
圖十一、於不同酵素/受質比及駐留時間下膜反應器連續式 操作對豬血球酵素水解液清除 DPPH 自由基之 影響.....	34

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

利用酵素水解豬血生產含生物活性胜肽 且具生理機能性之產品

Enzymatic hydrolysis of porcine blood to yield products containing bioactive peptides and possessing healthy promoting functionalities

計畫編號：NSC 93-2214-E-002-007

執行期限：93 年 08 月 01 日至 94 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、前言

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。現今利用各種動植物蛋白質生產生物活性胜肽(bioactive peptides)且具保健功能之產品已有相當多的研究，如：抗菌性胜肽[1-3]、類鴨片胜肽[4-6]、血管收縮素轉化酶抑制劑(ACEI)及降血壓效果 [7-10]、免疫活性胜肽[11-13]、抗氧化胜肽[14-16]、抗腫瘤 [17-18]、保護細胞免受 β -amyloid 攻擊[19] 等活性。

臺灣地區每年家畜屠宰量相當可觀。每頭豬隻採血量約 3 公升，全血液中約有 17-18%粗蛋白質[20]，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。在動物性保健食品中以雞精類之產品最受國人的喜好，若能以該產品的模式應用於豬血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。

二、文獻整理

(一)血液的組成

血液由血球(blood corpuscles)和血漿(blood plasma)所組成。血球又分紅血球(red blood cell)、白血球(white blood cell)、血小板(blood platelet)。紅血球的最主要功能是運送氧氣，白血球與免疫有關，血小板則是與凝血作用有關。血漿則是血球懸浮於內之液體，可運送養分與廢物。

新鮮血液之總固形物約 20.9%，其中 86~91%為蛋白質，脂肪量少於 1%，灰分中以鐵為最重要[21]。血漿及紅血球的水分含量分別為 89% 及 63%[22]。表一為血液中的一般組成[20]，另將主要成分表示於圖一。

以下分別介紹血液的成分：

1、血液蛋白質

血液蛋白(blood proteins)分為血漿蛋白(plasma proteins)與血球蛋白(globin)。血球蛋白主要成份是血紅素，而血漿蛋白則可再分為血清白蛋白(serum albumin)、血清球蛋白(serum globulin)與纖維蛋白原(fibrinogen)。

(1)血球蛋白

血紅素(hemoglobin)之分子量為 64,500，由 4 個多胜鏈組成(2 條 142 胺基酸組成之 α -蛋白鏈和 2 條 152 胺基酸組成之 β -蛋白鏈)，各鏈之間以非共價性交互作用維持空間構形安定性。在血球蛋白中間則是原血紅素(heme)，原血紅素乃原紫質 IX(protoheme IX)與中心一鐵原子所組成。

(2)血清白蛋白

分子量約 66,000~68,000，為 582 個胺基酸組成之單鏈結構[23]。在循環系統中負責運輸各類脂肪酸，以及維持血液滲透壓等重要工作。世界上每年需求量在 300 噸以上。

(3)血清球蛋白

又可分為真球蛋白(euglobulin)、假球蛋白(pseudoglobulin)。另一種分類為 α -、 β -、 γ -球蛋白； α -球蛋白(α -globulin)為醣

蛋白(glycoprotein)與脂蛋白(lipoprotein)所構成，可與血球蛋白結合成珠蛋白(hapto- globin)； β -球蛋白(β -globulin)則以與金屬離子結合成金屬結合蛋白(metal-binding protein)形式存在； γ -球蛋白(γ -globulin)則由4個多肽鏈(2個重鏈，2個輕鏈)所組成，它可以與外來抗原結合，具重要的免疫功能。

(4)纖維蛋白原

分子量約340,000[24]的大分子，多由肝臟製造。可經由凝血酵素催化，達成體內重要的凝血反應。

(5)微量蛋白質

除了上述量較多的蛋白質外，尚有數十種以上的微量蛋白質存在於血漿中，各具有特殊的生理用途。其中凝血因子VIII(Clotting Factor VIII)若是功能不健全或缺乏，即會造成A型血友病之生成。經臨床証明，豬的凝血因子VIII在注入患者體內後，可有效治療其症狀，且引起之抗體反應遠較注入人的凝血因子VIII濃縮品要來得低。此外，不會有感染AIDS或肝炎等病毒之可能，具有很高的利用價值[25-27]。

2、血液中胺基酸

血液含有豐富胺基酸，其中以離胺酸(lysine)、白胺酸(leucine)含量最高，甲硫胺酸(methionine)及異白胺酸(isoleucine)則是限制胺基酸。要食用時，最好搭配甲硫胺酸及異白胺酸含量多的食物種類(如穀類)。

3、血液中脂質

血液中脂質含量約272~447mg/100ml。主要脂肪酸組成如表二[96]。

4、血液中鐵質

血液中的鐵含量約占0.3~0.4%，遠較其他畜產品高，且近九成為血質鐵(heme iron)結合型式存在。膳食中鐵的來源分為血質鐵及非血質鐵(nonheme iron)兩類，血質鐵可不經轉換成離子型式而直接為小腸黏膜所吸收[28]。

5、血液中其他微量成份

維生素(vitamin)A、B群、C，菸鹼酸(nicotinic acid)、葉酸(folic acid)、泛酸(pantothenic acid)等；胰島素(insulin)、降血鈣素(calcitonin)等內分泌素；乳酸去氫酵素

(lactate dehydrogenase)、鹼性磷酸酵素(alkaline phosphatase)等酵素，與縮水肌氨酸(creatinin)，尿素(urea)等代謝產物。

(二)血球

利用簡單的離心，即可將血球與血漿分開。分開後的血球，可再進一步分為原血紅素及血球蛋白。其中的原血紅素是色素，可以供作食品添加用，而且內含豐富的血質鐵，可以再進一步製備成鐵劑。

(三)血漿

綜合前述主要的血漿蛋白，整理其基本資料於表三[97-98]。

(四)蛋白質之酵素水解

1、蛋白質水解產物之簡介

(1)分類

若以分子量的分佈範圍作為分類基礎，蛋白質水解產物可略分為三大類：經輕微、中度和高度水解所得之蛋白質水解產物[29,100]。

蛋白質經過高度水解後，其產物的分子量大多小於500Da，且不具有分子量大於5kDa的肽。由於此類水解產物的分子量極小，無法被抗體中的辨識群(determinant)所辨識，所以不會引起人體過敏反應。因此經過高度水解後的蛋白質適合應用於低過敏性嬰兒食品配方(hypoallergenic infant formula)中。

中度水解後的蛋白質，其水解產物的分子量分佈範圍較廣。與未經水解的蛋白質相比，此類蛋白質水解物的粘度較低，具熱安定性，功能性佳。有別於高度水解後的蛋白質，中度水解後的蛋白質水解產物並不具有低過敏性的特點，不適於添加在嬰兒食品配方中。但由於此類蛋白質水解產物營養價值高、功能性佳，且較未經水解的蛋白質易於消化吸收，故適合添加於成人營養配方食品，如運動飲料、體重控制配方以及老年人的飲食中。

(2)特性及應用

水解反應有利於蛋白質溶解度的提昇。經過水解後的蛋白質，在其等電點附近的溶解度有明顯的改善[30-32]。這主要是因為蛋白質經過水解之後，分子量降低，且暴露出許多游離化的胺基(amino group)和羧基(carboxyl group)，此二官

能基可增加蛋白質水解產物的親水性，進而提昇它的溶解度。

蛋白質水解物在高溫下不容易形成聚集，縱使某些蛋白質水解產物在高溫下形成聚集，但其聚集物溶解度佳，故並無沉澱產生[33]。

蛋白質水解物的乳化特性與其水解率有相當密切的關係。經過適當水解後的酪蛋白和乳清蛋白，其產物乳化活性(emulsion activity)佳，但是乳化安定性有下降的驅勢。這是由於適度的水解反應可以將在蛋白質內部的疏水性胺基酸暴露於外，而疏水性胺基酸又因可吸附於水與油或水與空氣的界面，故具有乳化活性。

以化學方法水解蛋白質，由於水解程度較完全，因此比較沒有苦味的問題。倘若以酵素水解蛋白質，基本上，會受酵素種類、受質以及水解條件的不同，而產生不同程度的苦味。蛋白質水解產物的苦味性，可能與胜肽的分子量及其疏水性胺基酸含量的多寡與位置有關[34]。

2、蛋白質水解方式

蛋白質可利用酸分解而形成游離胺基酸，並藉由水解物 pH 值的降低以抑制腐敗菌生長[35-36]。雖然以酸來水解蛋白質之效率遠高於酵素水解之方式，但酸水解不僅會破壞水解物原有之功能特性，並使得 L-form 之胺基酸轉變為 D-form 胺基酸，因而形成如 lysinoalanine 等毒性物質[37-38]，此外，也可能會含有微量的 mono-chloropropanol (MCP) 及 di-chloropropanol (DCP) 等致癌物質[39]。酸水解常用的無機酸為鹽酸、硫酸或磷酸[40-41]，而有機酸則為甲酸、丙酸[42]和檸檬酸[43]，亦有利用各種有機酸與無機酸混合酸來進行水解者[43-45]。

蛋白質亦可利用酵素水解。目前，酵素水解方式已逐漸取代酸水解方式。酵素對蛋白質之水解作用使產物具有分子量降低、離子性基數目增加及疏水性基露等特性[46]，使得蛋白質之官能性質產生變化，酵素切斷蛋白質之胜肽鍵使其成為小分子，水解率值愈高表示鍵被切斷之數目愈多。蛋白質受酵素作用時，可依序分解成 proteose、peptone、peptides，最後分解成游

離胺基酸，因此水解程度不同時，水解物含氮化合物之組成亦不相同。水解前後分子量大小亦會影響產物之成膠能力、乳化性質、濃稠度、風味、免疫性及溶解性等功能性質[47]。進行蛋白質酵素水解時，酵素的種類、酵素對受質的濃度、水解系統之 pH 與離子強度、受質本身的性質、水解時的溫度及時間等皆會影響水解率的強弱與最終水解液之性質[48]。

3、影響酵素水解蛋白質之因子

(1) 酵素種類

酵素之種類會直接影響蛋白質的水解率以及水解物的特性。比較各種蛋白酵素對沙丁魚肉的水解能力，使用的蛋白酵素包括 alcalase、actinase、proleather 等鹼性蛋白酶，neutrase、papain 等中性蛋白酶，以及 mosin、pepsin、neulase 等酸性蛋白酶。在這些酵素之最適作用條件下，鹼性蛋白酶水解沙丁魚肉之蛋白質溶解率較酸性、中性蛋白酶為高，這是因為鹼性蛋白酶之活性較酸性、中性蛋白酶強，故蛋白質水解率也較高[49]。而無論是使用酸性或鹼性蛋白酶皆隨水解作用時間之延長，水解物之 pH 值都趨向中性[50]；又細菌分泌的蛋白分解酵素的活性較真菌佳[49]；釀造常用之麴菌有 *Aspergillus oryzae* 和 *A. sojae* 兩種，其中以 *A. oryzae* 可分泌較高活性之澱粉分解酶、酸性蛋白酶和 acid carboxypeptidase，而 *A. sojae* 分泌之麩胺醯胺分解酶和 endopolygalacturonase 的活性較高[51-52]。

(2) pH 值與溫度

酵素在進行蛋白質水解時，多半選擇其最適的 pH 值與溫度作用範圍，影響所及的是酵素活性所能表現出的程度。一般的蛋白質水解酵素最適 pH 值約在 7.0 左右，最適溫度約在 30~50℃，當超過 50℃ 時，則內生性酵素開始失活[38, 44, 49, 53-54]。自家消化的水解作用在中性 pH 進行時，主要的水解酵素為 trypsin 或 trypsin-like enzyme[55]，而 pH 值低於 5.5 以下時，則以 pepsin 之作用為主[42]；以鳳梨酵素水解蛋白質時，在 pH5.0、溫度 40 與 50℃ 時，其胜肽鍵的平均長度是 3.9 及 2.4，而在 pH7.0、溫度 40 與 55℃，其

胜肽鍵的平均長度則是 4.8 及 2.8，顯示當 pH 由 5 改變至 7 時，會有較多大分子胜肽聚集的現象[56-57]。

(3) 酵素濃度

酵素與基質的比例(E/S)影響了蛋白質水解時的分解速率，假如酵素與基質的濃度達到飽和後，就可以強迫每個可用的酵素分子與基質作用，由於沒有自由的酵素存在，使得其間的碰撞機率達到最大，否則酵素濃度太低時會降低水解反應速率，而濃度太高反而提高生產成本。將濃度 0.1% 至 0.4% 之 Alcalase 水解脫脂沙丁魚肉，結果發現，隨著酵素濃度的增加，水解率也隨之提高[58]；雖然水解初期的效果以濃度高者較佳，但水解率並不因為水解時間的延長而繼續提昇，這是因為水解產物對酵素與基質間發生抑制作用，而減緩了反應速率[59]。

(五) 生物活性胜肽

1、生物活性胜肽的來源

近年來很多胜肽從細菌、真菌、植物、動物等中被純化出來，証明具有生物活性(bioactive)，而被稱為生物活性胜肽(bioactive peptide)。生物活性胜肽可以從天然食品中分離出來，也可以藉由水解蛋白質後產生。這些食品包含了牛乳、米糠、玉米、蛋白、魚肉、大豆、小麥、黑麥(rye)、膠原質(collagen)、血液等，其中以牛乳蛋白水解物被研究最多。

2. 生物活性胜肽的種類與功能

(1) 抗菌胜肽

包含了 cyclic peptides、glycopeptides 和 lipopeptides。例如 nisin, lactocin, subtilin 可用來當作食品的天然防腐劑[60-61]。豬脊髓中亦分離出具有抑菌之活性胜肽[1, 62]。

(2) 類鴉片胜肽(opioid peptide)

類鴉片胜肽是第一種被廣泛研究的生物活性胜肽。主要作用在神經系統，如痛覺接收的調節、鎮靜、促進睡眠等。這類胜肽多來自牛乳、魚、大豆、穀類蛋白的水解物。由酪蛋白水解產物中分離出來的類鴉片胜肽有 casomorphins 和 casoxins，其中 casomorphins 有類似鴉片的作用，反之，casoxins 則具拮抗作用。

Lactorphins 是一由乳清蛋白水解產物中所分離出來的類鴉片胜肽。為了與內生性類鴉片胜肽(endorphins)有所區別，由食物中所分離出來的類鴉片胜肽，統稱為外生性類鴉片胜肽(exorphins)。這些胜肽均具有 X-Tyr-Phe、Tyr-X-X-Phe 或 Tyr-X-X-Tyr 的胺基酸片段，使其發揮類鴉片作用[63]。由 β -casein 水解所得之 β -casomorphins，可以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。另外， β -casomorphins 還可藉由調節進食後胰島素和生長激素釋放抑制因子的分泌而影響代謝。

(3) 酵素調節胜肽

包含了 caerulein, cholecystokinin, 和 glutathione。這些胜肽對很多人體生化代謝途徑中的酵素扮演調控的角色。最著名的就是被用來做抗血壓劑的 angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor。由蛇毒液中發現有 ACE inhibitory peptide 後[64]，便有許多學者以水解蛋白質、合成或萃取的方法得到各種不同的 ACE inhibitory peptides [65-68]。以 collagenase 水解明膠，由水解產物中分離出 9 種不同的 ACE inhibitory peptide，首先由食物來源蛋白質中分離出來者。以 trypsin 水解牛乳酪蛋白而得 ACE inhibitory peptide [65]；亦有自豬血漿中分離出之 ACE inhibitory peptide，其胺基酸序列為 Leu-Val-Leu [68]；1996 年 Park 等也以 4% trichloroacetic acid 處理豬血漿，再經過濾層析得到 IC₅₀ 值為 2 μ M 的 ACE inhibitory peptide，其胺基酸序列為 Gly-Val-His-Gly-Val [69]；Matsui 等(1993)亦以 alkaline protease 水解沙丁魚肉而得之[70]。另也有學者以 thermolysin 水解 α -玉米膠蛋白(α -zein)而產生許多 ACE inhibitory peptides，這些胜肽大多由三個胺基酸所組成，其中抑制能力較好的有：Leu-Arg-Pro、Leu-Ser-Pro、Leu-Glu-Pro。它們均在 C—終端有一個 proline 殘基[66]，但也有學者發現不具此一特性的 ACE inhibitory peptides [67]。

(4) 荷爾蒙或荷爾蒙調節

包含了 oxytocin、vasopressin、prolactin、gastrin 等。這些胜肽在重要生理代謝及生長發展中，扮演著荷爾蒙或調節荷爾蒙反應的角色[71]。

(5) 免疫活性胜肽

包含了 interleukins 和 interferons 等可活化及調節免疫系統的重要胜肽。其中有些是從牛乳及小麥蛋白質中發現的[72]。Paker 等(1984)發現由酪蛋白水解產生的免疫胜肽可刺激老鼠及人體巨噬細胞的吞噬作用，保護老鼠免受 *Klebsiella pneumoniae* 所感染。Parker 等認為此因為免疫胜肽能夠刺激 T 細胞及自然殺手細胞(natural killer cell)的增生和成熟，增強免疫能力[73]。Kayser and Meisel (1996)由牛乳蛋白中分離出之胜肽，利用 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 螢光物質，測定人體淋巴球細胞 DNA 複製現象及利用 [3H]leucine 測定胞蛋白質合成情形，發現可促進淋巴球 DNA 複製及蛋白質合成，因此顯示其可刺激淋巴球增生效果，增加人類非專一性之免疫能力[11]。

(6) 抗氧化胜肽

一些蛋白質水解產生的胜肽可抑制自氧化反應及 hydroperoxide 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 hydroperoxides 的分解，例如 Carnosine(β -Ala-His)即在很多動物肌肉中存在。此外已知如卵白[74]、紅豆、大豆等蛋白質水解物皆具有抗氧化性[75-78, 100]。

Chen 等(1995)以五種蛋白質水解酵素水解 β -大豆球蛋白(β -conglycinin)，比較蛋白質水解程度與其抗氧化活性之相關性，發現水解物之抗氧化活性與水解程度並不一定是正相關[77]。Yamaguchi 等(1979)以十種酵素水解大豆蛋白，利用硫氨酸鐵法在 500 nm 測吸光值，結果得知水解率(hydrolyzing ratio)最高(34%)者達氧化誘導期的時間卻最短；水解率最低(5%)者達氧化誘導期的時間卻非最長。某些酵素之水解率雖只有 9%、8%與 6%，但抗氧化活性卻是十種酵素水解液中最強者，約達 25 天[76]。林(1999)利用各種酵素來水解鯖魚肉，發現各酵素水解物皆

有抑制亞麻油酸自氧化能力。林推測酵素水解所產生之胜肽種類是決定抗氧化性強弱之主要因子，與水解時間之長短關係不大[79]。

Chen 等(1996)研究大豆蛋白水解液於亞麻油酸中，在不同 pH 值下對抗氧化活性之影響，結果發現，添加大豆蛋白水解液可以使抗氧化活性明顯增加，且 pH 值介於 6.7-6.9 時對抑制亞麻油酸自氧化反應有最佳之延緩效果[78]。Shahidi and Amarowicz (1996)以不同濃度之 capelin protein hydrolysates (CPH)及 seal protein hydrolysates (SPH)添加在 β -carotene / linoleate 模式系統中，發現 CPH 這一組中，除了含 1 mg CPH 者，其餘濃度在各時間階段裡皆有顯著之抗氧化活性，其中添加 5 mg 與 10 mg CPH 者其抗氧化能力相似，並明顯優於添加 1 mg 與 2 mg CPH 者；在 SPH 組中，添加 5 mg SPH 者在 60 及 75 分鐘時與添加 10 mg SPH 者在所測時間內皆表現出促氧化作用，而添加 1 mg SPH 者在 45、105 及 120 分鐘時與添加 2 mg SPH 者在 30-120 分鐘內和控制組無明顯差異，其餘時間中也只有微弱的抗氧化活性[80]。

Chen 等(1996)指出大豆蛋白水解物之小分子胜肽中，抗氧化活性較強的 Leu-Leu-Pro-His-His (LLPHH) 與 BHT 及 BHA 比較，發現同在 $8 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-4} M$ 的濃度範圍內，抗氧化活性大於 BHA；除了 BHT 之外，整體來說，濃度與抗氧化活性之間並未有良好的正相關性，須視樣品本身的性質給予最適濃度來決定抗氧化活性。為得知大豆蛋白酵素水解液中抗氧化性最強部分之分子量[78]，Yamaguchi 等(1979)以 Sephadex G-25 分離水解液並測量抗氧化活性，發現抗氧化活性最強處之分子量略高於維生素 B12(分子量 1357.4)，而分子量較低處其抗氧化活性則較弱[76]。Chen 等(1995)將抗氧化活性較強之大豆蛋白 Protease S 水解物利用 Sephadex G-25 分離之，發現分子量接近 1400 Da 之胜肽類含量最多[77]。林(1999)將抗氧化活性較強之鯖魚肉水解物利用 Superdex peptide 預注管柱進行劃分，結

果顯示分子量在 660-920 Da 範圍內之胜肽類為鯖魚肉酵素水解物中具有較強抗氧化活性之化合物。綜上結果可知，小分子胜肽具有較強的抗氧化活性[79]。

Bishov and Henick (1972) 以 Hydrolyzed vegetable protein (HVP) 與 BHA 及生育醇(tocopherol, vitamin E)同時作用，發現 HVP 與 BHA、Vitamin E 具有抗氧化之相乘效果(synergistic effect) [81]。Chen 等(1996) 以大豆蛋白中的三種成分 (glycinin、 β -conglycinin 及 basic 7S globulin) 利用酵素水解，結果顯示此三種成分之水解液本身的抗氧化性較低，但與抗氧化劑併用後其抗氧化活性有明顯的上升，其中以 BHA 的效果為最佳，次為 tocopherol，而 BHT 的效果居末位[78]。

(7)抗高血壓胜肽

血管收縮素轉化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)屬於腎酵素-血管收縮素系統(rennin-angiotensin system, RAS)的一員，如圖 2 其作用是將 Angiotensin I (不活化型)水解生成具有強力血管收縮作用的 Angiotensin II，且使具有血管擴張作用的緩激素(bradykinin)降解而失去其作用，故血壓因而上升[101-102]。如果能阻斷這個酵素的作用，便可舒緩血壓上升的現象。ACEI (血管收縮素轉化酶抑制劑)可與 ACE 結合，影響 ACE 活性，減緩 angiotensin II 的生成與 bradykinin 的破壞，因此，如果飲食中含有 ACEI，對於減輕高血壓的症狀，應有正面的效果[103]。Oshima 等在 1979 年就已經從食品蛋白質中分離出具有降血壓功能的胜肽，能夠有效的遏阻血壓升高。[104]；Masuda 等於 1996 年曾利用先天性高血壓大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)進行活體試驗，結果發現由發酵乳萃取出來的 ACEI 胜肽可以有效地降低老鼠血壓[105]；而類似的實驗，有很多學者嘗試過，亦有相當好的結果。取自食品的 ACE 抑制物，來源主要是食品蛋白質的水解產物，包括酪蛋白(casein)、玉米蛋白(zein)；或是經由肉類水解獲得，如沙丁

魚肉、鯉魚肉[106]。

利用不同的基質與酵素水解，其產物的 ACE 抑制活性不同。陳等(1997) 以 pepsin 水解大豆蒸煮汁，獲得 ACE 抑制活性很高的胜肽片段[107]；而 Arihara 等人以豬之骨骼肌為原料，選用 9 種酵素分別進行水解，結果以 pepsin 水解液抑制率 30%為最低、thermolysin 水解物抑制率 86%為最高[108]。Jeon 等將鱈魚水解物進行超過濾膜分離，結果相較於全水解液，3kD 以下區分物提升了 5 倍抑制能力[109]。

ACEI 胜肽相較於 ACEI 藥物 (Captopril 等)用於治療高血壓具有許多優點，不但生活品質和新陳代謝不受到影響，對於氣喘、慢性肺阻塞的病人也可以使用，同時可避免使用 ACEI 藥物所帶來的副作用。

(8)其他胜肽

有些由莢豆類、雞豆、扁豆及黃豆來的胜肽具有抑制癌症誘發作用[82]。從酪蛋白(casein)經 trypsin 水解來的 caseinophosphopeptides (CPP)可和帶正電荷的鈣離子結合，抑制磷化鈣沉澱，提高鈣離子的溶解度，增進人體對鈣的吸收。大部分的 CPP 均具有 SerP-SerP-SerP-Glu-Glu 胺基酸片段[83]。

(六)膜過濾

膜過濾一般應用於工業上的純化、分離與濃縮等單元操作上，依所使用之膜孔徑大小分為 (1) 精密過濾 (microfiltration, 簡稱 MF) (2) 超過濾 (ultrafiltration, 簡稱 UF) (3) 奈米過濾 (nanofiltration, NF) (4) 逆滲透 (reverse osmosis, 簡稱 RO)。一般是用分子量劃分數值 (molecular weight cut-off, 簡稱 MWCO) 來表示所區分之最大分子量。精密過濾膜所能區分之分子範圍約在 0.02 - 2.0 μm 之間，操作壓力約在 1 - 5 bar 之間；超過濾膜所能區分之分子約在 0.002- 0.2 μm ，即約為 500 - 300,000 Dalton 之分子，操作壓力約在 1 - 10 bar 之間；奈米過濾能區分 200-1000Dalton 之分子；逆滲透的操作原理乃是在溶質濃度較高的一側施予一高於溶液兩側之滲透壓差之壓力，迫使水由高溶質濃度側往低溶質濃度側移動，進而達到濃縮的

目的。逆滲透膜孔徑在 5–15 Å 以下，操作壓力約在 20-80 bar 之間。

過濾膜之選擇是膜分離加工能否成功之重要關鍵。迄今市售的超過濾膜種類繁多，雖然都標明分子量劃分數值 (MWCO)，但是由於材質的不同 (cellulose acetate；polysulfone；polyether；polyamide；teflon；alumina 等)，縱使 MWCO 的值相同，其實際分離效果也可能不同。綜合而言，在選擇分離膜時所需考慮的條件有下列幾點：

- 1、耐熱性 --- 操作之溫度除了考慮膜作用之最適溫度，溫度越高，進料液體之黏度較低，有利於膜分離操作，同時在較高的溫度下操作，可以抑制常溫性微生物之生長。
- 2、耐壓性 --- 物質通過膜的速率隨著操作壓力的增加而增加，故使用耐壓性較佳之膜較適合。
- 3、耐酸鹼性 --- 酵素作用有其最適之酸鹼值；且實際操作時，經常會使用酸鹼等溶液來清洗膜系統，耐酸鹼性較佳的膜較適合。
- 4、區分能力 --- 必需能將不同大小分子有效區分。

在膜過濾操作上，除了膜的選擇外，裝置 (module) 的選擇亦相當重要。膜過濾的裝置有很多種，常見的有管狀、螺旋狀、平板狀與中空纖維狀。各種裝置均有其優劣之處，需做適當的選擇。

進行膜分離時，通過膜的部分稱為透流液 (permeate)，不能通過的部分稱為滯留液 (retentate)。透流速率 (permeation rate) 簡稱透流率 (flux)，是決定操作效益的主要因素。影響透流率的因素有操作壓力、流速、溫度、原料的性質及組成成份。

(七)膜反應器

生物反應器與膜結合的概念是以生物催化劑 (酵素或微生物) 不能通透膜，而在反應中生成之小分子產物可以通過半通透膜為基礎。酵素反應於一連續式攪拌反應槽 (CSTR) 內進行反應，反應液連續不斷地循環流過超過濾膜裝置，酵素與未反應之受質因分子量大於膜分離孔徑，因此不會穿過膜可連續不斷地在系統中循環，而產物則因分子量小於膜分子量劃分而隨透流液穿過膜。酵素於系

統中重複使用，使得產率增加。由於酵素是均勻地分佈於溶液中，因此可以避免質傳限制。

目前常見的有三種形式的連續式攪拌膜反應槽：終端式攪拌槽 (dead-end stirred cells, DESC)、循環式膜反應器 (membrane recycle reactors, MRR)、串連式膜反應器 (cascade membrane reactors, CMR)。

1、終端式攪拌槽 (DESC)：

大多數討論酵素膜反應器的文獻皆屬此類。操作時，酵素滯留於系統中，而受質溶液則不斷地以與透流液相同的速度加入系統中。為了改善反應速率並降低濃度極化的現象，因此整個系統必需加以攪拌。此系統之效率遠低於循環式膜反應器。

2、循環式膜反應器 (MRR)：

於一連續式攪拌槽 (CSTR) 內進行反應，反應液連續不斷地循環流過超過濾膜裝置，酵素與未反應之受質因分子量大於膜分離孔徑，因此不會穿過膜可連續不斷地在系統中循環，而產物則因分子量小於膜分子量劃分而隨透流液穿過膜。酵素於系統中重複使用，使得產率增加。由於酵素是均勻地分佈於溶液中，因此可以避免質傳限制。此系統最常使用於天然聚合物，如蛋白質與碳水化合物之水解。

3、串聯式膜反應器 (CMR)：

由於連續式攪拌反應槽中，轉換速率偏低，此乃是由於系統中受質濃度較低所致。為克服此限制，可以用將連續式攪拌反應器以串聯方式加以解決。目前常見的串聯式膜反應器有下列兩種，一是每一段使用一分離膜，進料於第一段送入反應器中，而已反應之溶液則經膜過濾後，透流液進入下一段反應器中，滯留液則回到此段。此類反應器較為昂貴，但常用於多種酵素反應的操作，如從澱粉生產高果糖糖漿。而另一種則是在最後一段使用分離膜，構造較為簡單，酵素等不能通透膜者滯留於膜中後返回第一段反應槽中。此設計的優點在於只使用一分離單元，但無法做串聯式反應。

選擇膜反應器中使用之酵素，需考慮下面幾個因素：

- 1、反應速率要高 ---- 反應速率會影響反應

器的設計。

2、酵素的取得要方便且價格低。

3、酵素作用之酸鹼值、最適作用溫度與長期操作之穩定性。

4、酵素分子之大小 ---- 酵素分子量太小，有部份會透過膜而損失，重新添加之機率變大，操作成本因而提高。

三、研究目的

每頭豬隻採血量約 3 公升，全血液中約有 17-18%粗蛋白質，為一良好的動物性蛋白質資源。目前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。由於豬血的蛋白質含量豐富具有生產生物活性勝肽的潛力，且利用各種動植物蛋白質生產生物活性勝肽已有相當多的研究，但是其中鮮少有利用血液蛋白來研究，因此，本研究期利用豬血為原料，以酵素水解方式生產生物活性勝肽。其中，豬血可經簡單的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，供治療用途。然而該上清液仍含有大量的蛋白質，亦可作為本研究的酵素水解基質之一，再加上血球及血漿二部分，合計三種受質供作酵素水解，探討生產生物活性勝肽的可行性。

四、研究方法

(一)樣品製備

全豬血液於桃園縣中美肉品之屠宰場採集，採集後迅速添加檸檬酸鈉(抗凝血劑)使最終濃度達 0.5% w/v；全血經由離心(6000×g) 15 分鐘，分離血球及血漿，兩分離液儲存於 -20°C 備用；一部份血漿利用冷凍沈澱法[84]製備成去纖維蛋白原血漿。血球、血漿、去纖維蛋白原血漿分別凍乾儲存，待作為後續酵素水解基質。

(二)批式酵素水解

分別以磷酸緩衝溶液將血球、血漿、去纖維蛋白原血漿配製成濃度為 1%之受質溶液。酵素則使用兩工業上常用酵素 Alcalase 及 Flavourzyme (購自 Novo Nordisk,

Bagsvaerd, Denmark)及三種粗酵素 trypsin (購自 Biocon, Nagoya, Japan), chymotrypsin 及 thermolysin (購自 Sigma, St. Louis, USA)，水解條件之溫度、pH、酵素分別為 I: 38°C, 7.0, trypsin、II: 35°C, 7.5, trypsin、chymotrypsin 及 thermolysin 之 1:1:1 混合物，III: 55°C, 7.5, Alcalase，IV: 55°C, 7.0, Alcalase 及 Flavourzyme 之 1:1 混合物。將 2 ml 0.5% 酵素溶液加至 50 ml 受質溶液中 (E/S=1/50)，並於 0, 2, 6, 10, 24 小時取樣。取樣之水解液於 100°C 加熱 15 分鐘，使水解酵素失活，並離心(23400×g) 15 分鐘，上清液於 4°C 儲存備用。

(三)游離胺基酸及複合胺基酸分析[85]

0.3 ml 10% 5-sulfosalicylic acid (SSA) 加入 1.2 ml 水解液，於 4°C 下靜置 30 min 後，4°C 下離心(6000×g)10 分鐘。上清液以 0.45 μm 濾膜過濾，並以高效胺基酸分析儀分析 (Beckman 6300, Fullerton, CA, USA)。

(四)勝肽濃度測定[86]

25ml 100mM sodium tetraborate、2.5ml 20 % SDS、1 ml OPA (40 mg o-Phthaldialdehyde 溶於甲醇中)、100 μl β-mercaptoethanol，上述藥品用棕色瓶定量至 50 ml，取 2 ml 混合液加 50 μl sample 反應兩分鐘後立即測 340nm 吸光值，標準曲線以 1、0.8、0.6、0.4、0.2 mg/ml Leu-Gly 製作。

(五)水解率(Degree of hydrolysis)測定[87]

1、胺基態氮(amino nitrogen)

取 0.25ml 水解液，置於棕色試管中，加入 2ml 0.2125M 磷酸緩衝液(pH 8.2)及 2ml 0.1% OPA，於 50°C 下振盪反應 60min(全程注意避免光照)，最後加入 4ml 0.1N HCl 終止反應。並於室溫下靜置至少 30min 後測定波長 340nm 之吸光值。

2、反應液總氮(total nitrogen)

取反應 0hr 之 0.1ml 酵素水解液(酵素液先於沸水中加熱 10min，再加入基質液)，置於分解管中，加入 4 ml 6N HCl，減壓抽氣並真空封管。再將分解管置入 110°C 溫箱內，反應 24hr，水解液加入 2ml 蒸餾水減壓濃縮去除鹽酸至乾，再溶於 1ml 蒸餾水中，以 OPA 法測定取出完全水解液。

3、標準曲線建立

以 0.25 ml 之不同濃度 0.25 mM、0.125

mM 及 0.025 mM 的 L-leucine 溶液替代樣品，其餘步驟與樣品液的處理相同。

$$DH(\%) = (h - h_0) / (h_{\text{tot}} - h_0) \times 100\%$$

h：酵素水解液胺基態氮的濃度

h₀：未水解前之胺基態氮的濃度

h_{tot}：完全水解液中胺基態氮的濃度

(六)一般成分分析

1、水分

依 A.O.A.C. (1984) 方法測定。取大約 3 g 之凍乾樣品於預先乾燥之坩鍋，並記錄樣品與坩鍋重，置於 105°C 之乾燥箱中 8 小時。取出後置於乾燥器內放冷，稱至衡重並由以下公式計算水分含量。

$$\text{水分}(\%) = (A + B - C) / A \times 100$$

A：樣品重

B：坩鍋重

C：105°C 乾燥後之樣品與坩鍋之總重

2、粗脂肪

參考 A.O.A.C. (1984) 方法，以 Soxhlet 裝置，秤取適量樣品先行於圓筒濾紙中，105°C 烘箱乾燥 4h，以乙醚萃取法萃取。

3、粗蛋白質

係以凱氏法(Kjeldahl method)(A.O.A.C., 1984)加以分析。取 0.5 g 凍乾樣品加入 20 mL 硫酸，以凱式氮分解裝置 (Model 2006, Foss tecator, Sweden) 分解後以凱式氮蒸餾裝置 (Model 2100, Foss tecator, Sweden) 測得樣品之總氮量。所得之總氮含量值再乘以 6.25，即為樣品粗蛋白質之含量。

4、灰分之測定

精秤 2 g 凍乾樣品，置入已恆重的坩鍋中，以 550-600°C 之灰化爐灰化，至成乳白色為止。取出放入乾燥器中，冷卻後稱量。灰分量依下式計算：

$$\text{灰分}(\%) = (W_1 - W_0) / S \times 100$$

W₀：坩鍋恆重(g)

W₁：樣品灰化後之坩鍋恆重(g)

S：樣品重(g)

(七)清除 DPPH 自由基測試[88]

首先取 1 ml 樣品，加入 4 ml 75 μM 的 DPPH(甲醇溶液)，充分混合下靜置 60 min，然後在波長 517 nm 處檢測其吸光值，並以 α-tocopherol 及 BHT 作正控制組。

$$\% \text{ Inhibition} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\%$$

A₀反應前吸光值

A 反應後(添加萃出物)吸光值

A_s萃出物本身的吸光值

(八)還原力測試[89]

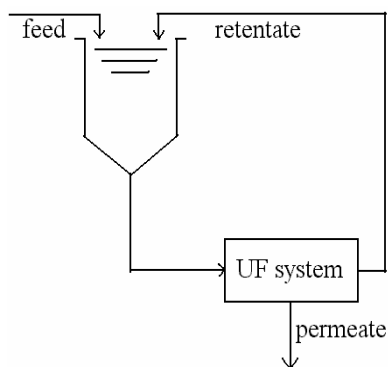
取 0.5 ml 不同水解時間之水解物，加入 0.5 ml 0.1 M Phosphate buffer (pH 6.6) 及 0.5ml 0.1% Potassium ferricyanide，於 50°C 水浴 20 分鐘後，冰浴快速冷卻，加入 0.5 ml 10% trichloroacetic acid (trichloroacetic acid in 95% ethanol) 溶液，再用 0.45 μm 膜過濾處理去除不溶物，其濾液再加入 4ml 蒸餾水及 0.8ml 0.1 ferric chloride (氯化鐵溶在 3.5% HCl) 溶液，混合均勻於 10 分鐘後測定 700 nm 之吸光值並以 100, 200 ppm Vit C 作還原力比較。

(九)抑制血管收縮素轉化酵素(ACE)活性[90-91]

取 300μl 0.33mM hippuryl-his-leu 及 30μl 水解液，再加入 50μl 0.16U/ml ACE(以 300mM NaCl 之 100mM 硼酸緩衝液 pH 8.3 配製)，於 37°C 水浴槽內振盪反應 30 分鐘後，加入 380μl 之 1N HCl 終止反應。在空白組(blank)是以蒸餾水替代酵素水解液。控制組中，同樣以蒸餾水替代酵素水解液，但在未加入酵素之前先加入 380μl 之 1N HCl，其餘步驟與樣品液相同。反應終止後各加入 1.5ml 乙酸乙酯，激烈振盪 15 秒，萃取反應中的 hippuric acid。再離心(1800×g) 5 分鐘，取上層液 1ml，置入另一試管內。將此試管水浴加熱至乾燥為止，再加入 1ml 蒸餾水，測水溶液在波長 228nm 之吸光值。

(十)機能性水解液區分[92]

採用中空纖維狀之超過濾膜(Hollow fiber ultrafiltration membrane)進行分離，使用之超過濾膜之分子量區分(Molecular weight cut-off)分別為 1000、3000 及 10,000 Da。使用之操作溫度為 25°C，壓力為 20 psi。首先將 400ml 水解液以 10k Da 的膜進行分離，分離過程繼續補充去離子水，使透流液(permeate)體積為原體積之 6 倍，最後使滯留液(retentate)體積為 100ml，透流液濃縮成 300ml，如此可區分得到分子量小於 10 kD 的透流液及分子量大於 10 kD 的滯留液，再將此部分所得之滯留液以 3000、1000Da 的膜進行分離，依上述方法可得四個區分(>10000, 10000~3000, 3000~1000, <1000 Da)。結構簡圖如下：



(十一)抑制癌細胞增生測試[93]

將濃度 1×10^4 /ml 細胞分散於 96 well 培養盤中(100 μ l/well)隔夜培養後，於每well內加入 10 μ l 水解液，培養 24 小時後，將培養液換成不含 FBS 血清之培養液，並加入 50 μ l 2mg/ml MTT，培養 2 小時後，將well內溶液移除，並加入 150 μ l DMSO 混合均勻後，於 570nm 測定吸光值。

(十二)Raw 264.7 細胞培養及 TNF- α 分析

1、Raw 264.7 細胞培養

Raw 264.7 購自財團法人食品工業發展研究所細胞保存中心。培養於 90% DMEM、10% FBS、100 units/ml penicillin 及 100 μ g/ml streptomycin 培養基，並放置 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱，當細胞數達 4×10^7 /mL 以上時進行繼代培養。欲進行實驗時，當細胞增殖至 9 成滿時，以刮刀將細胞取下，計算細胞數，取適當細胞濃度種於 24 well microplate 中(每well 900 μ l 培養液，細胞數 1×10^5)，培養 24 h 後，更換無血清培養基並添加 100 μ l 樣品培養 72h 後，將培養液取出進行細胞激素含量分析。

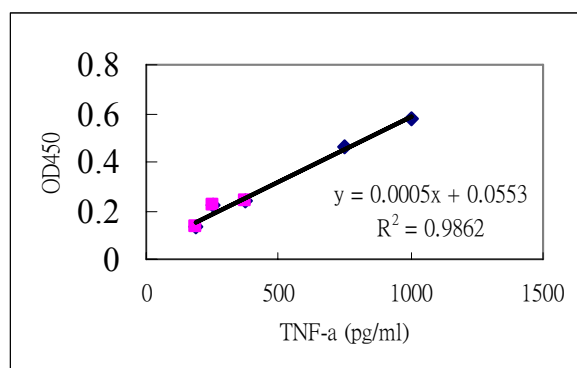
2、TNF- α 分析

使用 R&D SYSTEMS DuoSet cytokine kit 測定巨噬細胞株 Raw 264.7 分泌之細胞激素含量，測定方法依照廠商提供的操作步驟進行。

加入 100 μ l 0.8 μ g/ml Capture Antibody 於 96 well 中，於室溫下放置隔夜(14~16 hr)。

將液體吸出，並以 Wash Buffer 清洗三次(每次 200 μ l，且須移除乾淨)，最後一次清洗完後，把盤子倒置於衛生紙上。加入

300 μ l/well Block Buffer，於室溫下放置至少 1 小時，如前步驟清洗三次。加入 100 μ l standard 或 sample(細胞培養液)，放置 2hr，如前步驟清洗三次，加入 100 μ l/well Detection Antibody，放置於室溫 2 hr，如前步驟清洗三次，加入 100 μ l/well Streptavidin-HRP，避光放置於室溫 20 min，如前步驟清洗三次，加入 100 μ l/well Substrate Solution，避光放置於室溫 20 min，加入 50 μ l/well Stop Solution 終止反應並溫和確實混合均勻，迅速測定 450 nm 吸光值(並且最好以 540nm 或 570nm 校正)。以標準品製作之檢量線如下：



(十三)WS1 細胞培養

WS1 購自財團法人食品工業發展研究所細胞保存中心。培養於 90% MEM、10% FBS、200 units/ml penicillin 及 200 μ g/ml streptomycin 培養基，並放置 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱，當細胞數達 1×10^6 /mL 以上時進行繼代培養。欲進行實驗時，當細胞增殖至 9 成滿時，以 trypsin-EDTA 將細胞取下，計算細胞數，取適當細胞濃度種於 96 well microplate 中(每well 90 μ l 培養液，細胞數 5×10^3)，培養 24 h 後，更換無血清培養基並添加 10 μ l 樣品培養 24 h 後，進行 MTT 分析。

(十四)保護細胞免受 β -amyloid 攻擊分析[93]

1、Neuro 2A 細胞培養

Neuro 2A 購自財團法人食品工業發展研究所細胞保存中心。培養於 89% MEM、10% FBS、1% NEAA、100 units/ml penicillin 及 100 μ g/ml streptomycin 培養基，並放置 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱，當細胞數達 1×10^6 /mL 以上時進行繼代培養。欲進行實驗時，當細胞增殖至 9 成滿時，以 trypsin-EDTA 將細胞取下，計算細胞數，取

適當細胞濃度種於 96 well microplate 中(每 well 90 μ L 培養液, 細胞數 5×10^3), 培養 24 h 後, 更換為 1% 血清及 15 μ M β -amyloid(25-35)培養基或含僅 1% 血清, 並添加 10 μ L 樣品培養 48h 後, 進行 MTT 分析。

2、RBE4 細胞培養[94]

RBE4 細胞株感謝由 Dr. Roux 提供。培養於 44% α -MEM、44% Ham's F10、10% FBS、1% penicillin/streptomycin、1% Geneticin、0.1% bFGF 培養基, 並放置於 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱, 當細胞數達 1×10^6 /mL 以上時進行繼代培養。欲進行實驗時, 當細胞增殖至 9 成滿時, 以 trypsin-EDTA 將細胞取下, 計算細胞數, 取適當細胞濃度種於 96 well microplate 中(每 well 90 μ L 培養液, 細胞數 5×10^3), 培養 48 h 後, 更換為 1% 血清及 15 μ M β -amyloid(25-35)培養基或含僅 1% 血清, 並添加 10 μ L 樣品培養 48h 後, 進行 MTT 分析。

(十五) MTT 分析

MTT 是一種 tetrazolium salt, 全名是 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, 為一黃色的染劑, 它可被活細胞吸收並被粒線體 (mitochondria) 中的 succinate tetrazolium reductase (一種 succinate dehydrogenase) 還原成藍色的 formazan, 常用於檢測藥物對細胞的生長及存活的影响。

測試時先將培養液移除, 加入 50 μ L 的 MTT solution (2 mg/ml MTT in PBS), 二小時後, 將 MTT solution 移除, 並加入 150 μ L 的 DMSO, 混合均勻後迅速測波長 570 nm 的吸光值, 吸光值越高則表示細胞數越多。

(十六) 膜反應器操作

1、膜反應器系統

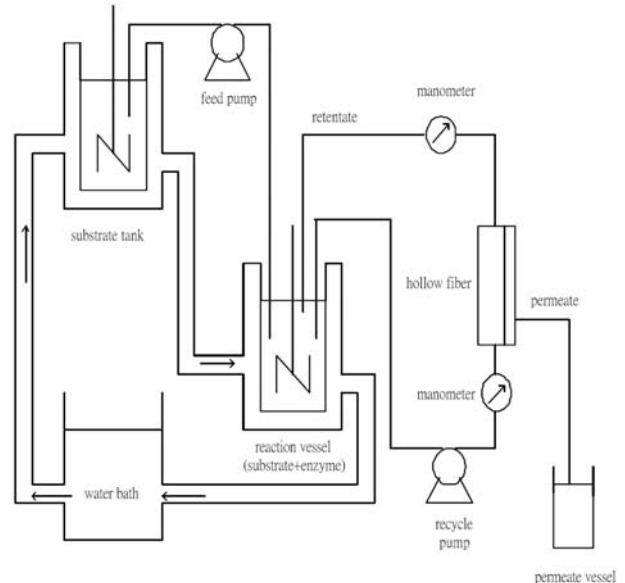
系統使用中空纖維型分離膜 (A/G Technology Polysulfone Membrane ; UFP-3-c-4MA), 分子篩為 3000 Daltons, 纖維管徑 0.5 mm, 膜表面積為 0.065 m², 於 25-50°C 下操作時進口壓力上限為 45 psi, pH 值適用範圍為 2-13。

整個反應系統以玻璃二重保溫缸配合恆溫水槽, 維持進料槽與反應槽酵素水解所需要的溫度, 兩槽內以電磁攪拌攪拌, 反應液體積以液面高度維持控制器 (level controller) 配合電磁閥維持, 使進料速度與透流率相同, 維持反應溶液體積。操作時

膜反應器條件在 35°C 與 pH 7.5; 反應體積為 500 mL, 受質濃度為 1%, 酵素為組合 trypsin、chymotrypsin、thermolysin。操作時間為 6 小時。溶液在反應槽中駐留時間 (residence time, RT) 之計算方式為: $RT = \text{反應液體積} / \text{透流速率}$ 。

2、操作步驟

使用之受質為 1% 之豬血溶於 0.1M, pH 7.5 磷酸緩衝液中, 攪拌溶解。首先將受質溶液充填於保溫的反應槽中, 加入所需酵素濃度的酵素量, 使酵素均勻分散於受質溶液中。利用調整膜進出口壓力使透流率維持一定, 反應液以幫浦打入超過濾膜中, 透流液 (含有可自由通透膜之肽) 經流量計後以容器收集, 而滯留液則重回到反應槽中繼續水解, 此時, 進料槽的幫浦打入與收集之透流液等量的受質溶液進入反應槽, 使反應體積維持恆定。膜反應器構造圖如下:



五、結果與討論

(一) 一般成分

1、組成分分析

三種受質(血球、血漿及去纖維蛋白原血漿)凍乾粉末的組成分分析結果如表四, 三種受質中蛋白質含量均大於 75%, 其中, 凍乾血球的蛋白質含量最高, 達 85%。另外, 三種受質中血漿及去纖維蛋白原血漿灰分含量較高, 可能與採血時, 添加抗凝血劑(檸檬酸鈉)有關。

2、水解過程 pH 變化

受質於酵素水解過程中，水解液之氮含量會隨著水解時間增長而增加(data not shown)。其中，動物死後其ATP會受到酵素作用產生一連串的分解過程：ATP→ADP→AMP，而AMP會受 5'-nucleotidases作用降解為IMP與NH₃，其含量則與核苷酸酶活性有關，這三種受質水解液氮含量之增加可能與上述因子有關，且顯示血球、血漿中可能存在自消化酵素作用。也由於水解液之氮含量增加，可能造成水解液pH值改變。

經分析各水解過程 pH 變化，pH 值變動幅度小於±0.1(data not shown)，主因為水解在緩衝溶液中進行。因此水解過程可以維持各酵素組合可以在較佳的 pH 環境下進行水解。

3、胺基酸及雙胜肽含量分析

有文獻證實雙胜肽 anserine、carnosine 具有抗氧化等能力，而本研究分析各水解條件之水解液中 anserine、carnosine 含量，發現各水解液中皆無 anserine 存在，而血球以 trypsin、chymotrypsin、thermolysin 組成之混合酵素或使用單一酵素 Alcalase 可發現水解過程會產生 carnosine，該含量變化如表五。

(二)豬血水解液機能性分析

1、抑制血管收縮素轉化酶測試

因生物活性胜肽之功能性，可能與其胺基酸序列及胜肽 N 端 C 端有關連性，而利用酵素水解生產活性胜肽中，酵素的種類決定了胜肽的 N 端 C 端。本研究選擇文獻中常用於生產生物活性胜肽且水解條件在中性環境之酵素(trypsin, chymotrypsin, thermolysin, alcalase, flavyzyme 等)來水解豬血成分，期望能得到較佳的生物活性且避免水解後因中和產生大量鹽類。水解時採單一酵素或混合具相近水解條件(pH, Temp)之酵素進行水解。由表六結果顯示，使用單一酵素 trypsin 水解之水解液，其抑制 ACE 活性較差，其中血漿及去纖維蛋白原血漿最差，可能與 trypsin 僅能對特定胺基酸序列進行剪切，因而未能有效水解受

質，產生較多的 ACEI 胜肽，此外，也可能因為血漿部份含有水解酵素抑制劑所致[110]。若使用複合的 trypsin, chymotrypsin, thermolysin 酵素水解血球，隨著水解時間增加，ACE 抑制活性快速增加，水解血球 6 小時，可達到最佳的 ACE 抑制效果，IC₅₀ 為 0.58 mg/ml，與具良好抑制 ACE 活性之酪蛋白水解液[111]擁有相近活性，與前人研究比較，雖以 thermolysin 水解 Chicken muscle、Ovalbumin 及 Chum Salmon Muscle 效果稍優於本研究結果[111-114]，但因其單純以 thermolysin 作為酵素，成本非常高昂，並不適合用於工廠量產。另外，文獻指出 ACE 抑制劑多為含有 2~12 個胺基酸的短鏈胜肽，水解物的水解程度越高，其平均胜肽鏈就越短，因而可能得到對血管收縮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三所示，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。

2、清除自由基能力測試

水解液清除 DPPH 自由基能力方面如表七所示。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、500 ppm BHT 及 10mg/ml Carnosine 這三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%、90.6%及 82.6%。由先前分析胺基酸及雙胜肽含量結果中，清除 DPPH 自由基效果較佳者，其皆含有相當量之 carnosine。前人研究中，以 Actinase 及 papain 水解 porcine myofibrillar proteins 之清除 DPPH 自由基效果為 65%及 70%，與本研究結果相近[115]。

3、還原力測試

水解液之還原力如表八所示。還原力之測定參考 1988 年 Oyaizu 之方法 [89]，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 小時所得之水解液有較佳的還原力，OD700 為 0.223，在其他受質與酵素組合中，還原力普遍均不佳。與已知具強還原力的物質 100 ppm、200 ppm ascorbic acid 對照比較，其 OD700 分別為 0.830 及 1.483，水解液之還原力不佳，但仍顯示水解液中之仍少部份胜肽具有還原力。

4、胜肽免疫調節活性

以酵素水解液刺激巨噬細胞株 RAW 264.7，探討其是否能刺激細胞產生 $\text{TNF-}\alpha$ 細胞激素，藉以觀察豬血水解液是否具有免疫調節機能。由表九的結果顯示，本研究所使用的酵素對血球、血漿及去纖維蛋白原血漿，均具有些許刺激 RAW 264.7 巨噬細胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 。與已知可誘發巨噬細胞之 Lipopolysaccharide (LPS) 相比較，1 $\mu\text{g/ml}$ LPS 可刺激 Raw 264.7 細胞產生 1436 pg/ml $\text{TNF-}\alpha$ ，使用 Alcalase 水解血球 10 小時及使用複合 trypsin、chymotrypsin、thermolysin 水解血漿，可分別產生 692 及 601 pg/ml $\text{TNF-}\alpha$ 。而市售雞精則具有刺激 RAW 264.7 分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 1101 pg/ml 的效果 [116]。其效果較佳，可能是由於市售雞精採萃取方式生產，萃取而得的多是大分子胜肽或蛋白質，因此對 RAW 264.7 可產生外來物刺激的效果，相對於酵素水解液多為小分子物質，因此效果較差。

5、促進纖維母細胞增生

以皮膚纖維母細胞 WS1 觀察水解液對皮膚細胞的增生表現。如圖四(A)結果顯示，未經水解之豬血球，不具有促進 WS1 細胞增生效果，但經過 trypsin 水解 2 小時後，對 WS1 增生效果在 113%，但統計後無顯著差異，於水解 10 小時可達最高 124%；如使用 trypsin、chymotrypsin、thermolysin 酵素，由圖四(B)結果顯示，水解 2 小時，即可達到最高 136%，但是隨著水解時間增加，增生效果並不再提升，整體上增生效

果並不顯著。而以血漿或去纖維蛋白原血漿為受質，於各組酵素水解下，均未能促進 WS1 細胞增生 (data not shown)。

由 McFarland 及 Holliday 的研究中 [117]，於培養基中添加 carnosine (一種雙胜肽)，可促進纖維母細胞 MRC-5 增生。由於先前分析胺基酸及雙胜肽含量結果中，豬血球經過酵素水解後，會產生 carnosine 雙胜肽，而豬血漿及去纖維蛋白原血漿均未能生成 carnosine，因此促進 WS1 細胞增生效果，推論可能源自於 carnosine，另外，於前人研究中 [118]，膠原蛋白胜肽片段對於皮膚細胞亦具增生效果，因此豬血球水解液中，可能其他胜肽亦具有促進皮膚細胞增生效果。

6、抑制腫瘤細胞生長

本研究以單獨 Alcalase 酵素及 Alcalase、Flavozyme 兩混合酵素水解豬血球、血漿、去纖維蛋白原血漿並於不同水解時間取樣，測試水解液抑制 B16F10 及 Hep G2 腫瘤細胞生長效果，結果顯示水解液並沒有顯著的抑制效果 (圖五)。前人的研究顯示 [119]，牛乳之乳鐵蛋白對腫瘤細胞有顯著的抑制效果，另外，也有學者研究 [120]，經過酵素水解後，可大大的提升乳鐵蛋白之抑制腫瘤細胞增生效果；而乳鐵蛋白與本研究之血漿中運鐵蛋白結構十分相似，故以 transferrin 運鐵蛋白對兩腫瘤 (B16F10, Hep G2) 進行測試，結果顯示 (圖六)，當 transferrin 濃度達 1 mg/ml 時 B16F10 仍無顯著的效果，但對 Hep G2 時即有顯著的抑制增生效果。故推論水解液中仍具有抑制腫瘤細胞增生之活性胜肽，但是其於水解液中含量少，故無法顯現。

7、保護神經細胞 Neuro 2A 及腦血管上皮細胞 RBE4 避免受到 β -amyloid 攻擊

前人研究推論 β -amyloid 為一種神經毒 [121]，可造成腦部功能不正常，且與 Alzheimer's Disease 息息相關， β -amyloid 藉由誘導培養的神經細胞走向細胞凋亡產生氧化壓力或其他原因而促使細胞死亡。而 β -amyloid 中以 25~35 序列最具毒性 [122]。因 Neuro 2A 廣泛被使用的神經模式細胞，因此本研究使用 Neuro 2A 神經細胞，並與

β -amyloid(25-35)及水解液一同培養，以確認水解液對神經細胞的保護作用。

由結果顯示，隨著 β -amyloid 濃度上升，Neuro 2A 細胞存活數降低，當 β -amyloid 15 μ M 時，與控制組(未含 β -amyloid)相比，細胞存活 67%，並以 β -amyloid 15 μ M 進行後續實驗。於 Neuro 2A 培養液中，添加豬血酵素水解液，由結果顯示，水解液對 Neuro 2A 並無抑制生長或促進增生的現象(data not shown)。

當於 Neuro 2A 培養液中，一併添加 β -amyloid 及豬血酵素水解液時，由圖八結果顯示，使用 trypsin、chymotrypsin、thermolysin 水解 10 小時，可保護 Neuro 2A 細胞，細胞存活數 75%，但保護效果並不顯著。以血漿或去纖維蛋白原血漿為受質，於各組酵素水解下，均未能保護 Neuro 2A 細胞避免受到 β -amyloid 攻擊(data not shown)。

對 Neuro 2A 細胞保護效果不佳，可能是前人以 Neuro 2A 模式測試 β -amyloid 攻擊研究中，主要以酚類、flavonoid、維生素 E 等來保護細胞，尚無學者以蛋白質或胜肽作為樣品，因此可能胜肽能提供之保護效果在 Neuro 2A 細胞無法顯現。在另一學者，則分別以胺基酸及雙胜肽測試其保護 RBE4 細胞避免受到 β -amyloid 攻擊細胞結果[19]，因此本研究進一步依該模式測試豬血水解液的功能性。

當於 RBE4 細胞培養液中，一併添加 β -amyloid 及豬血酵素水解液時，由圖九(A)結果顯示，使用 Alcalase 水解 10 小時，可保護 RBE4 細胞，細胞存活數 80%，但保護效果並不顯著。由圖九(B)結果顯示，使用複合 trypsin、chymotrypsin、thermolysin 水解 10 小時，可保護 RBE4 細胞，細胞存活數 82%。以血漿或去纖維蛋白原血漿為受質，於各組酵素水解下，均未能保護 RBE4 細胞避免受到 β -amyloid 攻擊(data not shown)。

因 β -amyloid 藉產生氧化壓力，誘導培養的神經細胞走向細胞凋亡，而於先前的研究，以複合 trypsin、chymotrypsin、thermolysine 水解豬血球 10 小時，可達到較高的清除 DPPH 效果，與 RBE4 的保護

效果趨勢相同，因此，推論豬血水解液可保護 RBE4 細胞免受 β -amyloid，與水解液抗氧化性相關。另外，於前人研究中[19]，carnosine 及 β -alanine 具有保護老鼠腦部 RBE4 細胞避免受到 β -amyloid 攻擊，由先前分析胺基酸及雙胜肽含量結果中，trypsin、chymotrypsin、thermolysine 水解豬血球後，水解液含 carnosine，可能也是貢獻保護效果的來源。

(三)機能性水解液區分

由先前的機能性分析中，得知豬血球經混合酵素 trypsin、chymotrypsin、thermolysin 水解後，可獲得較佳的 ACE 抑制能力及 DPPH 自由基清除效果，為瞭解功能性胜肽主要分佈的分子量範圍，以利後續膜反應器設計的參考，本研究進一步利用濾析將水解液依分子量區分。於抑制 ACE 活性上(表十)，以 1~3 kDa 間之 IC50 值最低，顯示此區分為水解液主要提供抑制 ACE 酵素活性者。於清除 DPPH 自由基方面(表十一)，分子量 1~3 kDa 之區分對於水解液清除自由基的貢獻較大，而分子量小於 1 kDa 者次之。由先前分析胺基酸及雙胜肽含量結果中，於不同酵素與受質的水解條件下所製備之水解液之中，有二水解液具較好的清除自由基效果，且經分析各個水解液中 anserine 及 carnosine (已知之具有抗氧化性之雙胜肽)含量，也發現僅此兩水解液含有 carnosine 雙胜肽，且其含量隨著水解時間增加而上升，且以水解 24 小時含量最高。但是，本研究發現此二水解液最具清除 DPPH 能力之水解時間為 10 小時，且於水解 24 小時反而降低其抗氧化能力，而藉由濾析區分之實驗結果可以推論水解液中除了 carnosine 具清除 DPPH 自由基外，分子量 1~3 kDa 之胜肽也同樣具有重要的地位，也因此水解 24 小時，使大分子量之胜肽水解成較小分子之胜肽，故水解液之清除 DPPH 自由基能力下降。

(四)膜反應器連續式生產

為能連續式生產生物活性胜肽，本研究藉由膜反應器方式，以豬血球為受質，使用組合酵素(trypsin、chymotrypsin、thermolysin)於反應器內將受質水解，並使分子量小於 3kDa 胜肽，能隨時透流出膜，不再被水解，同

時連續式加入受質，使反應體積維持一定，連續式生產生物活性胜肽。另外，為能得到較佳連續式生產條件，實驗中改變不同酵素/受質比及駐留時間等條件，期能得到生產生物活性胜肽的較佳連續操作方式。

1、抑制血管收縮素轉化酶測試

由圖十結果顯示，以 E/S 比為 1/100，駐留時間為 100min 時，隨著操作時間增加，透流液之抑制 ACE 活性也逐漸提升，操作 6 hr 時，抑制率達 56%，同時表示整體反應器在操作 6 hr 時仍無法達 steady state。當 E/S 比提高至 1/10，駐留時間 100 min 時，雖使抑制 ACE 活性上升，但 6hr 內仍未達 steady state，再把 E/S 比提高至 1/5 時，於操作 1 hr 時，即可取得抑制 81% ACE 活性之產物，於操作 2hr 以後，抑制 ACE 活性則維持穩定 steady state，抑制率達 86%，操作 6 hr 時，抑制率仍未有減少的現象，表示酵素活性於 6 hr 操作時間內沒有顯著的變化。

雖然提高 E/S 比，將增加酵素使用量，而使操作成本上升，且容易造成過度水解，不利於批式水解環境生產生物活性胜肽。但在膜反應器系統中，因酵素於反應起始添加後，即不再加入，一直留於反應器中，連續水解受質，且受質維持在一定的駐留時間下，使活性胜肽不致於過度水解而損失，因此總體而言，提高酵素濃度是對本研究膜反應器連續生產生物胜肽，可有效加速生產活性胜肽速度。

2、清除 DPPH 自由基能力測試

在膜反應器連續生產 DPPH 自由基能力測試上，在不同酵素/受質比及駐留時間等條件下，與抑制血管收縮素轉化酶測試有相同現象，在 E/S 比為 1/100 時，6 hr 內清除 DPPH 自由基結果逐漸上升，未能達到 steady state，當提高 1/5 時，操作 2hr 所獲得之透流液清除 DPPH 自由基效果可達 54%，繼續延長操作時間，清除自由基效果未有顯著變化。

六、計畫成果自評

研究結果證實豬血球酵素水解液於體外試驗具有降高血壓及抗氧化活性，而且將該水解液添加在含有 β -amyloid(25-35)之 RBE4

培養液中，RBE4 細胞存活率可提升，具潛在預防 Alzheimer's Disease 效果。相較於擁有良好抑制 ACE 活性之酪蛋白水解液[111]具有相近活性，且優於許多其他動植物水解液之研究結果。另外，血球之酵素水解液亦同時具有其他機能性，包括還原力、促進皮膚纖維母細胞增生、免疫調節、抑制腫瘤細胞生長等，雖然所表現之效果未優於其他已知產品或研究，但在一水解產品中同時存在各類機能性亦屬難得，因此值得發展為產品。所以本研究在已蒐集的文獻中，首先運用膜反應器方式，連續式生產生物活性胜肽。此連續式生產方式，除可快速連續生產活性胜肽及有效節省酵素使用量外，亦可避免蛋白質或胜肽過度水解而損失其活性，同時也因具初步脫色的效果，使暗紅色之豬血球水解液，經膜過濾後，轉變成金黃色，更提高消費大眾接受度。

雖然血漿及去纖維蛋白原血漿於本研究測試的多種生物活性中，均未發現具有較顯著的機能性，然而該二受質亦含豐富蛋白質，如以廢棄物處理實屬可惜，在相關前人研究中[124]，牛血漿經酵素水解後，具有顯著的 antigenotoxic 效果，因此後續血漿水解液如繼續朝該方向研究或者往其他方向加以利用，將能增廣豬血酵素水解液之用途，及有效利用環境資源。

七、參考文獻

- [1] 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.
- [2] Park Y, Lee DG, Jang SH, Woo ER, Jeong HG, Choi CH, Hahm KS. 2003. A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1645:172-182.
- [3] Powers J-PS, Hancock REW. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24:1681-1691.
- [4] Anne PL. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Sci Technol* 11:347-356.
- [5] Dhulster P, Kapel R, Froidevaux R, Nedjar-Arroume N, Fertin-Bazus A, Choisnard L, Guillochon D. 2002. Advancement in intermediate opioid peptide production in an enzymatic membrane reactor assisted by solvent extraction. *Desalination* 148:221-216.
- [6] Bitri L. 2004. Optimization study for the production

- of an opioid-like preparation from bovine casein by mild acidic hydrolysis. *International Dairy Journal* 14:535-539.
- [7] 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.
- [8] Arihara K, Nakashima Y, 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.
- [9] Vermeirssen V, Bent A, Camp JV, Amerongen A, Verstraete W. 2004. A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. *Biochimie* 86:231-239.
- [10] Suetsunaa K, Maekawab K, Chen JR. 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutri Biochem* 5:267-272.
- [11] Kayser H, Meisel H. 1996. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters* 383:18-20.
- [12] Salmon AL, Cross LJM, Irvine AE, Lappin TRJ, Dathei M, Krause G, Canning P, Thim L, Beyermanni M, Rothmundi S, Bienerti M, Shaw C. 2001. Peptide Leucine Arginine, a potent immunomodulatory peptide isolated and structurally characterized from the skin of the northern leopard frog, *Rana pipiens*. *Journal of biological chemistry*. *J Dairy Journal* 14:175 - 183.
- [13] Mercier A, Gauthier SF, Fliss I. 2004. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *International Dairy Journal* 14:175 - 183.
- [14] 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.
- [15] Wua HC, Chenb HM, Shiau CY. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res International* 36: 949 - 957.
- [16] Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res International* 37:123 - 131.
- [17] Qureshi A, Colin PL, Faulkner J. 2000. Microsclerodermins F-I, antitumor and antifungal cyclic peptides from the lithistid sponge *Microscleroderma* sp. *Tetrahedron* 56:3679-3685.
- [18] 林哲雄。2002。Melittin 抑制鰐鼠黑色素瘤細胞 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。
- [19] Preston JE, Hipkiss AR, Himsworth DTJ, Romero IA, Abbott JN. 1998. Toxic effects of β -amyloid (25-35) on immortalized rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and β -alanine. *Neuroscience Letters* 242:105-198.
- [20] Ockerman HW, Hansen CL. 1988. *Animal by-product processing* p. 232. Ellis Horwood Ltd, Chichester, England.
- [21] Dukes HH. 1947. *The Physiology of Domestic Animal*. p. 176. Comstock co. Ithaca.
- [22] 陳明造、劉登城、郭秀蘭。1984。禽畜血液蛋白在肉品加工上的應用。I.血液之血漿，血球蛋白之功能性質測定及影響因素之調查。中國農業化學會誌 22(3-4):201。
- [23] Brown JR. 1975. Structure bovine serum albumin. *Fed Proc.* 34:591.
- [24] Doolittle RF. 1975. Fibrinogen and fibrin. In *The Plasma Proteins*. 2nd ed., F. W. Putnam (Ed.), pp. 109-161. Academic Press. New York.
- [25] Gatti L, Mannucci M. 1984. Use of porcine factor VIII in the management of seventeen patients with factor VIII antibodies. *Thromb Haemostas* 51(3):379.
- [26] Hultin MB, Hennessey J. 1989. The use of poly electrolyte-fractionated porcine factor VIII in the treatment of a spontaneously acquired inhibitor to factor VIII. *Thromb Res* 55:51.
- [27] Kessler CM. 1994. Porcine factor VIII in factor VIII antibody positive hemophiliacs. *J Interf res.* 14:175.
- [28] 翁夢遙。1991。膳食中銅缺乏對老鼠鐵代謝之影響。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
- [29] Mahmoud MI. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.* 48(10):89-95.
- [30] Jost R, Monti JC. 1997. Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. *J Dairy Sci.* 60:1387-1393.
- [31] Monti JC, Jost R. 1978. Enzymatic solubilization of heat-denatured cheese whey protein. *J Dairy Sci.* 61:1233-1237.
- [32] Kester JJ, Richardson T. 1984. Modification of whey proteins to improve functionality. *J Dairy Sci.* 67:2757-2774.
- [33] Hidalgo J, Gamper E. 1977. Solubility and heat stability of whey protein concentrates. *J Dairy Sci.* 60:1518.
- [34] Alder-Nissen J. 1986. *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Pub., New York.
- [35] Tatterson IN. 1982. Fish silage-preparation, properties and uses. *Animal Feed Sci Technol.* 7: 153-159.
- [36] Hole R, Oines S. 1991. Can fish silage be used as nutritional solution to reduce aquaculture waste when considering the slaughtering quality of fish. In "Nutritional Strategies and Aquaculture Waste", pp. 103-109. Eds. Cowey, C. B. and Cho, C. Y., Univ. of Guelph, Guelph, Canada.
- [37] Diniz EM, Martin AM. 1997. Effect of the extract of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensm Wiss Technol.* 30: 266-272.
- [38] Lahl WJ, Braun SD. 1994. Enzymatic production

- of protein hydrolysates for food use. Food Technol. 48(10):68-71.
- [39] Manley CH, Ahmedi S. 1995. The development of process flavors. Trends Food Sci Technol 6(2): 46-51.
- [40] Tatterson IN. 1982. Fish silage-preparation, properties and uses. Animal Feed Sci Technol. 7: 153-159.
- [41] Ockerman HW. 1991. Food Science Source Book. Van Nostrand Reinhold, New York.
- [42] Gildberg A, Raa J. 1977. Properties of propionic acid/formic acid preserved silage of cod viscera. J Sci Food Agric. 28: 647-653.
- [43] Lo KV, Liao PH, Bullock C. 1993. Silage production from salmon farm mortalities. Aquacultural Engineering. 12: 37-45.
- [44] Gildberg A, Raa J. 1977. Properties of propionic acid/formic acid preserved silage of cod viscera. J Sci Food Agric. 28: 647-653.
- [45] Sikorski ZE, Ruiter A. 1994. Changes in proteins and nonprotein nitrogen compounds in crude fermented and dried seafood. In "Seafood Protein", pp. 113-126. Eds. Zdzislaw, New York.
- [46] Godfrey T, West S. 1996. Industrial Enzymology. Macmillan Press, London.
- [47] Mahmoud MI. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. Food Technol. 48(10):89-95.
- [48] Gildberg A. 1993. Enzymatic processing of marine raw materials. Process Biochem. 28: 1-15.
- [49] Rebeca BD, Pena-Vera MT, Diaz-castaneda, M. 1991. Production of fish protein hydrolysates with bacterial protease, yield and nutritional value. J Food Sci. 56(2): 309-314.
- [50] 三宅義章。1982。魚類加工殘渣酵素處理可溶化。日水誌。29(2):117-123。
- [51] Hayashi K, Terada M, Mizunuma T. 1981. Some difference in characteristics of soy sauce fermentation between species of koji-molds, *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. Sauce Res. 7(4): 166-172.
- [52] 賴慶隆。1994。醬油釀造微生物-麴菌。食品工業，26(12)：31-38。
- [53] Yoshinaka R, Sato M, Tsuchiya N, Ikeda S. 1983. Production of fish saue by utilization of its viscera enzyme. Bull Jap Soc Sci Fish. 49(3):463-469.
- [54] Fagbenro O, Jauncery K. 1993. Chemical and nutritional quality of raw, cooked and salted fish silage. Food Chem. 48: 331-335.
- [55] Orejana FM, Liston J. 1982. Agents of proteolysis and its inhibition in Patis (fish sauce) fermentation. J Food Sci. 47:198-203.
- [56] Sen DP, Sripathy NV, Lahiry NL, Sreenivasan A, Subrahmanyam V. 1962. Fish hydrolysates. I. Rate of hydrolysis of fish flesh with papain. Food Technol. 5: 138-140.
- [57] Sripathy NV, Sen DP, Lahiry NL, Sreenivasan A, Subrahmanyam V. 1962. Fish hydrolysates II. Standardization of digestion conditions for preparation of hydrolysed rich in pepones and proteoses. Food Technol. 5: 141-142.
- [58] Quaglia GB, Orban E. 1987. Enzymic solubilisation of sardin (*Sardina pilchardus*) by commercial protease. J Sci Food Agric. 38: 263-269.
- [59] Mackie IM. 1982. Fish protein hydrolysates. Process Biochem 31: 26-31.
- [60] Barnby-Smith FM. 1992. Bacteriocins: Applications in food preservation. Trends Food Sci Technol. 3:133-136.
- [61] Stiles ME, Hastings JW. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: Potential for use in meat preservation. Trends Food Sci Technol. 2:247-251.
- [62] 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.
- [63] Fiat AM, Daniele MS, Pierre J. 1993. Biological active peptides from milk proteins with two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. J Dairy Sci. 76:301-310.
- [64] Ondetti MA, Williams NJ, Sabo EF, Pluscec J, Weaver ER, Kocy O. 1971. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. Biochemistry 10:4033-4039.
- [65] Maruyama S, Nakagomi K, Tomizuka N, Suzuki H. 1985. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from and enzymatic dydrolysate of casein. II. Isolation and Bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. Agric Biol Chem. 49:1405-1409.
- [66] Miyoshi S, daneko T, Yoshizawa Y, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S. 1991. Hypotensive activity of enzymatic zein dydrolysate. Agric Biol Chem. 55(5):1407-1408.
- [67] Kohama Y, Matsumoto S, Oka H, Teramoto T, Okabe M, Mimura T. 1988. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. Biochem Biophys Res Comm. 155:332-337.
- [68] Hazato T, Kase R. 1986. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from porcine plasma. B B S. 139:52-55.
- [69] Park E, Won M, Lee H, Song KB. 1996. Angiotensin converting enzyme inhibitory pentapeptide isolated from supernatant of pig plasma treated by trichloroacetic acid. Biotechnol Tech. 10:479-480.
- [70] Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. 1993. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. Biosci Biotech Biochem. 57(6):922-925.
- [71] Tager HS, Steiner DF. 1974. Peptide hormones. Ann. Rev Biochem. 45:510-538.
- [72] Baldo BA. 1984. Milk allergies Aust. J Dairy Res. 39:120-128.
- [73] Parker F, Migliore-Samour D, Floc'h F, Zerial A, Werner GH, Jolles J, Casaretto H, Jolles P. 1984.

- Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological poroperties. *Eur J Biochem.* 145:677-682.
- [74] Tsuge N, Eikawa Y, Nomura Y, Yamamoto M, Sugisawa K. 1991. Antioxidative activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg-white albumin. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 65(11): 1635-1641.
- [75] Tsuda T, Fujii M, Watanabe M, Nakakuki H, Ohshima K, Osawa T, Kawakishi S. 1994. Antioxidative activity of red bean extract and its application to food. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 41(7): 475-480.
- [76] Yamaguchi N, Yokoo Y, Fujimaki M. 1979. Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 26(2): 65-70.
- [77] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-conglycinin. *J Agric Food Chem.* 43(3): 574-578.
- [78] Chen HM, 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(9): 2619-2622.
- [79] 林政欣, 1999。鯖魚肉與內臟水解物之抗氧化性研究, 國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文, 基隆。
- [80] Shahidi F, Amarowicz R. 1996. Antioxidant activity of protein hydrolysates from aquatic species. *JAOCS* 73(9): 1197-1199.
- [81] Bishov SJ, Henick AS. 1972. Antioxidant effect of protein hydrolyzates in a freeze-dried model system. *J Food Sci.* 37: 873-875.
- [82] Messina M, Messina V. 1991. Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. *J Am Diet Assoc.* 91:836-840.
- [83] Mesisel H, Frister H. 1989. Chemical characterization of bioactive peptides from in vivo digest of casein. *J Dairy Sci.* 56:343-349.
- [84] Slichter SJ, Henderson CR, Harker LA. 1976. Preparation of cryoprecipitated factor VIII concentrates. *Transfusion* 16(6):616.
- [85] Spackman DH, Stein WH, Moore S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry* 30(7):1190-1206.
- [86] Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, Catignani GL. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci* 66:1219-1227.
- [87] Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J Food Sci* 66:642-647.
- [88] Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable, free radical. *Nature* 181:1199-1200.
- [89] Oyaizu M. 1988. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent on thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 35:771-775.
- [90] Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 30:1637.
- [91] Maruyama S, Suzuki H. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric Biol Chem* 46(5):1393-1394.
- [92] Beaton NC, Klinkowski PK. 1983. Industrial ultrafiltration design and application of diafiltration process. *J Separ Proc Technol* 4(2):1.
- [93] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119:203-210.
- [94] Preston JE, Hipkiss AR, Himsworth DTJ, Romero IA, Abbott JN. 1998. Toxic effects of β -amyloid(25-35) on immortalized rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and β -alanine. *Neurosci Lett* 242(2):105-108.
- [95] Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourre JM, Strosberg AD, Couraud PO. 1994. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol.* 159:101-113.
- [96] Federation of American Societies for Experiment Biology. 1961. Blood and Other Body Fluid. Washington D.C.
- [97] Pennell RB. 1960. Fractionation and isolation of purified components by precipitation methods. In *the Plasma Proteins*, ed. Putnam, F. W., Vol.1, p. 9. Academic Press, Inc. U.S.A.
- [98] Putnam FW. 1984. Progress in plasma protein. in "The Plasma Proteins :structure, function, and genetic control" p. 1. Academic Press, Inc. U.S.A.
- [99] 陳姿利. 1999。利用雞蛋白水解物生產血管收縮素轉化酶抑制劑。臺灣大學食品科技研究所博士論文。
- [100] 曾吉偉. 2001。酵素水解魚肉生產胜及其抗氧化特性之研究。臺灣海洋大學食品科學系碩士論文。
- [101] Soffer RL. 1976. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *J Biol Chem* 250:6762-6768.
- [102] Ehlers MR, Riordan JF. 1989. Angiotensin - converting enzyme new concepts converting its biological role. *Biochemistry* 28:5311-5317.
- [103] 楊詠翔. 1999。食品中抗高血壓胜肽的發展現況。食品工業月刊 31:9-18。
- [104] Oshima G, Shimabkuro H, Nagasawa K. 1979. *Biochim Biophys Acta* 566:128-137.
- [105] Masuda O, Nakamura Y, Takano T. 1996. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 126:3063-3068.
- [106] Ariyoshi Y. 1993. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci Technol* 4:139-144.
- [107] 陳怡宏. 1997。蛋白質酵素水解液之生產技術。

食品工業月刊 29(11): 34-40。

- [108] Arihara K, Nakashima Y, Mukai 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.
- [109] Jeon YJ, Byun HG, Kim SK. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry* 35:471-478.
- [110] 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。
- [111] 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.
- [112] Hiroyuki F, Keiichi Y, Masaaki Y. 2000. Classification and Antihypertensive Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins. *J Food Sci* 65(4):564-569.
- [113] Ono S, Hosokawa M, Miyashita K, Takahashi K. 2003. Isolation of Peptides with Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Effect Derived from Hydrolysate of Upstream Chum Salmon Muscle. *J Food Sci.* 68(5):1611-1614.
- [114] Arihara K, Nakashima Y, 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.
- [115] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. 2003. Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. *J Agric Food Chem.* 51(12):3661-3667.
- [116] 魏韶宏。2003。利用酵素水解雞頭與黑豆生產含生物活性肽之機能性產品。國立臺灣大學食品科技研究所碩士論文。
- [117] McFarland GA, Holliday R. 1999. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* 34(1):35-45.
- [118] 賴永沛。1997。吃的化妝品原料 collagen peptides。食品資訊。143:40-44。
- [119] Eliassen LT, Berge G, Sveinbjørnsson B, Svendsen JS, Vorland LH, Rekdal Ø. 2002. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. *Anticancer Res* 22(5):2703-2710.
- [120] Yoo YC, Watanabe S, Watanabe R, Hata K, Shimazaki K, Azuma I. 1998. Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv Exp Med Biol* 443:285-291.
- [121] Yan SD, Chen JF, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Mgele A, Nawroth P, Stern D and Schmidt AM. 1996. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382:685-691.
- [122] Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic effects of Amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279-282.
- [123] Preston JE, Hipkiss AR, Himsworth DTJ, Romero IA, Abbott JN. 1998. Toxic effects of β -amyloid (25-35) on immortalized rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and β -alanine. *Neuroscience Letters* 242:105-198.
- [124] Park KJ, Hyun CK. 2002. Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. *Enzyme and Microbial Technology* 30:633-638.

表一、豬血液組成

	Blood	Blood plasma	Red blood corpuscle concentrate
Dry solids (%)	18 ~ 20	8 ~ 9	28 ~ 37
Protein (%)	13 ~ 15	6 ~ 8	28 ~ 38
Fat (%)	<1	0.1 ~ 1	1
Carbohydrate (%)	<1	<1	<1
Salts (%)	2	1.5	1 ~ 3
Water (%)	80 ~ 82	90 ~ 91	61 ~ 63

表二、血液中主要脂肪酸組成

	50 (mg/100 ml)	In red blood cell
Cholesterol	152 ~ 154	In plasma
Lecithin	72	In plasma
Sphingomyelin	21	In plasma
Linoleic acid	27 ~ 42	In plasma
Linolenic acid	0.7 ~ 4.0	In plasma
Arachidonic acid	21 ~ 24	In plasma

表三、血漿蛋白基本性質

血漿蛋白	分子量	等電點	生理作用、用途
白蛋白	66,300	4.7	維持滲透壓、運送脂肪
α -球蛋白	44,000	2.7~5.8	運送營養
β -球蛋白	93,000	4.4~6.4	可結合金屬離子
γ -球蛋白	160,000	7.3	抗體、免疫能力
纖維蛋白原	340,000	5.5	凝血、凝膠
凝血因子VIII	285,000	5.6~6	凝血 (血友病 A)

表四、血球、血漿及去纖維蛋白原血漿凍乾粉末之組成分

	血球	血漿	去纖維蛋白原 血漿
水分	10%	14%	11%
灰分	3%	9%	10%
脂質	0.9%	0.8%	0.7%
蛋白質	85%	75%	77%

Table 5. Changes in related dipeptide carnosine of porcine red blood corpuscle during hydrolysis with (A)mixture of trypsin, chymotrypsin, thermolysin (B) alcalase .

Enzyme	hydrolysis time (h)				
	0	2	6	10	24
	(µg /ml)				
TCT	-	45.7	125.2	157.3	123.3
Alcalase	-	-	-	90.9	119.1

*TCT: a mixture of trypsin, chymotrypsin, thermolysin

Table 6. ACE inhibitory activities of the hydrolysates of red blood corpuscle, blood plasma and defibrinated blood plasma.

Protein source	Protease*	ACE inhibitory activity	
		hydrolysis time (h)	IC ₅₀ value (mg/ml)
red blood corpuscle	T	10	2.80
	TCT	6	0.58
	A	2	1.60
	AF	10	1.24
blood plasma	T	10	4.10
	TCT	2	0.80
	A	6	1.24
	AF	2	1.37
defibrinated blood plasma	T	-	-
	TCT	2	1.06
	A	24	2.20
	AF	-	-

* T: trypsin, TCT: mixture of trypsin, Chymotrypsin and thermolysin, A: alcalase, AF: mixture of alcalase and flavourzyme

Table 7. 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*	DPPH scavenging effect (%)	
		hydrolysis time (h)	DPPH
red blood corpuscle	T	24	20.2
	TCT	10	64.9
	A	10	62.3
	AF	-	-
blood plasma	T	24	11.5
	TCT	24	24.4
	A	24	30.8
	AF	-	-
Defibrinated blood plasma	T	-	-
	TCT	24	22.4
	A	24	23.4
	AF	-	-

* T: trypsin, TCT: mixture of trypsin, Chymotrypsin and thermolysin, A: alcalase, AF: mixture of alcalase and flavourzyme

Table 8. Reducing power of the hydrolysates of red blood corpuscle, blood plasma and defibrinated blood plasma.

Protein source	Protease*	Reducing power	
		hydrolysis time (h)	OD700
red blood corpuscle	T	24	0.223
	TCT	24	0.099
	A	2	0.182
	AF	-	-
blood plasma	T	-	-
	TCT	24	0.082
	A	10	0.051
	AF	-	-
defibrinated blood plasma	T	-	-
	TCT	24	0.059
	A	24	0.031
	AF	-	-

* T: trypsin, TCT: mixture of trypsin, Chymotrypsin and thermolysin, A: alcalase, AF: mixture of alcalase and flavourzyme

Table 9. Effects of the hydrolysates of red blood corpuscle, blood plasma and defibrinated blood plasma on the stimulation of RAW 264.7 secreting TNF- α .

Protein source	Protease*		
		hydrolysis time (h)	TNF- α (pg/ml)
red blood corpuscle	T	10	94
	TCT	2	336
	A	10	692
	AF	10	305
blood plasma	T	2	160
	TCT	24	601
	A	10	314
	AF	6	83
defibrinated blood plasma	T	24	341
	TCT	2	429
	A	6	329
	AF	6	189

* T: trypsin, TCT: mixture of trypsin. Chymotrypsin and thermolysin, A: alcalase, AF: mixture of alcalase and flavourzyme

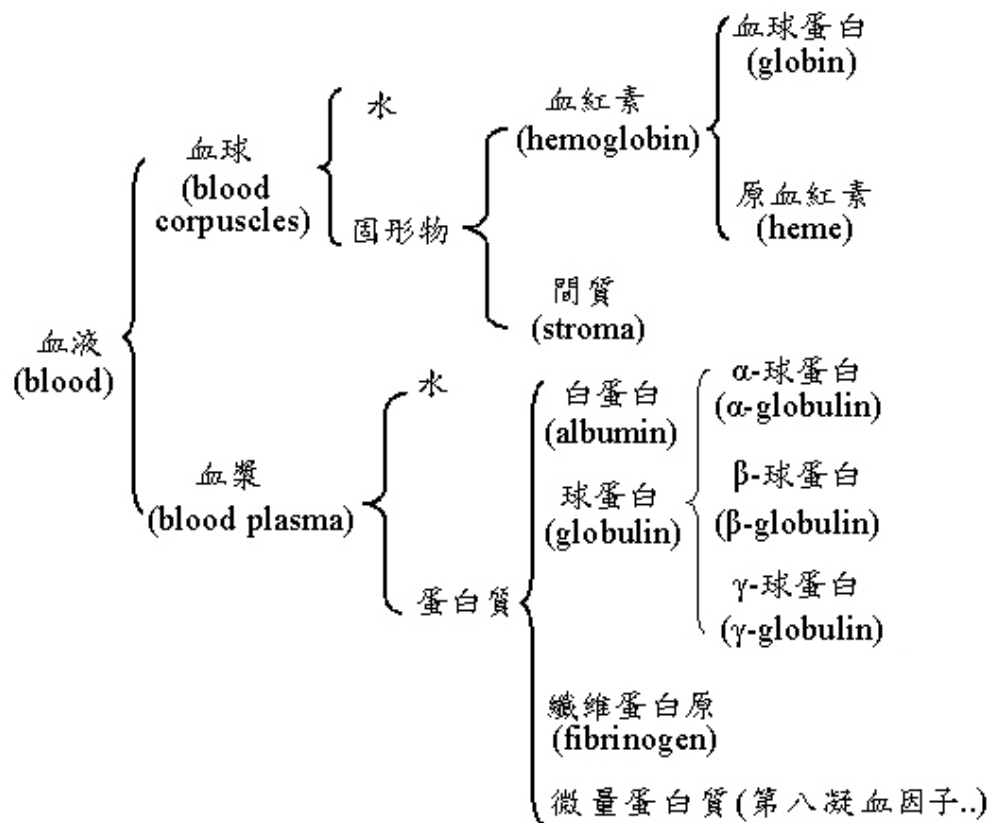
Control: 28.04 TNF- α pg/ml

表十、以混合酵素(Trypsin、Chymotrypsin、Thermolysin)水解豬血球 6 小時之水解液其四個分子量區之ACE IC₅₀ (mg/ml)

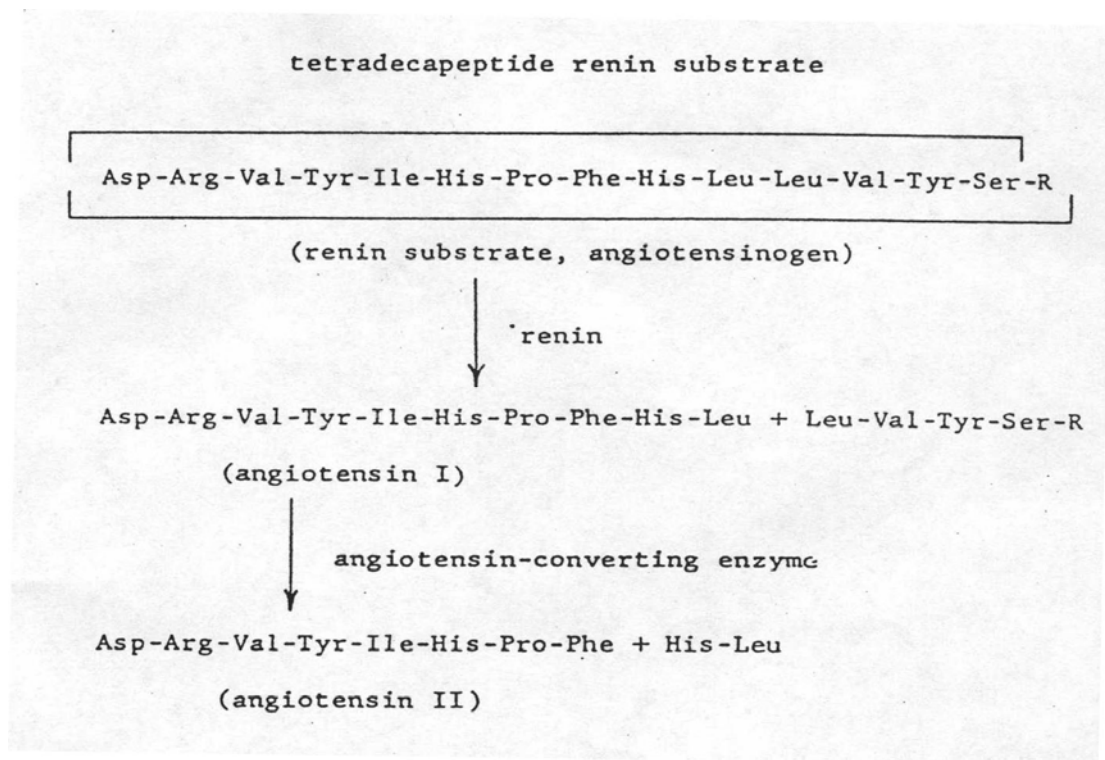
Molecular weight	ACE IC ₅₀ (mg/ml)
<1000	0.66
1000~3000	0.38
3000~10000	1.08
>10000	2.23

表十一、以混合酵素(Trypsin、Chymotrypsin、Thermolysin)水解豬血球 10 小時之水解液其四個分子量區之 DPPH 自由基清除率

Molecular weight	DPPH scavenging effect (%)
<1000	21%
1000~3000	65%
3000~10000	13%
>10000	4%
500 ppm α -tocopherol	95%
500 ppm BHT	95%



圖一、血液的主要成份



圖二、腎酵素及血管收縮素系統中血管收縮素轉化酶的催化反應

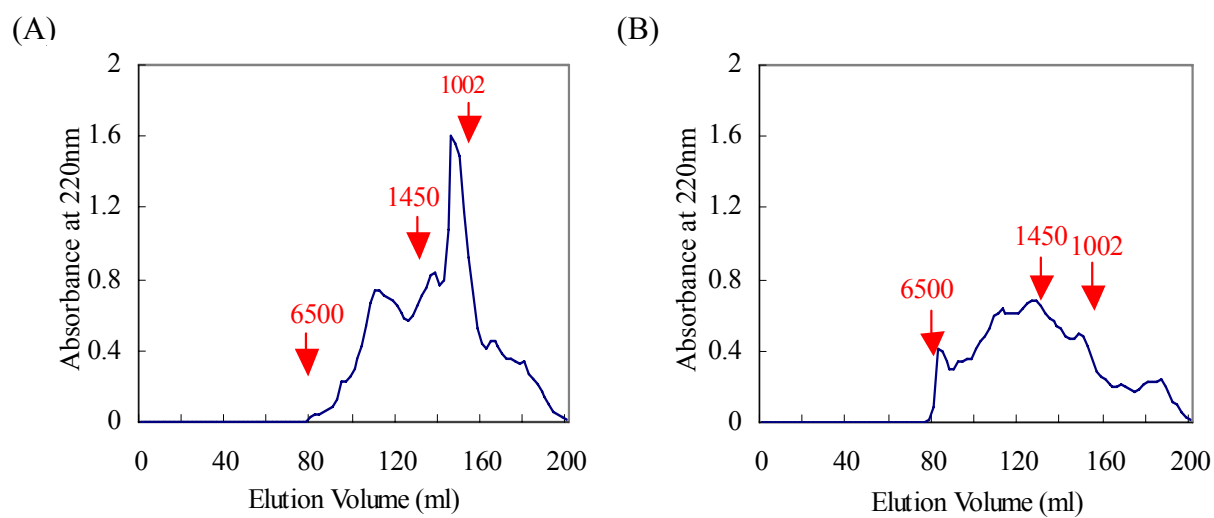
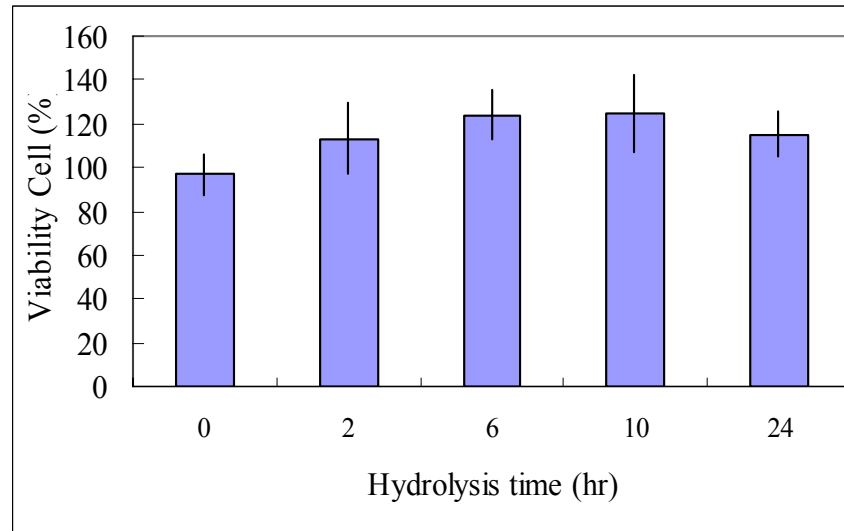
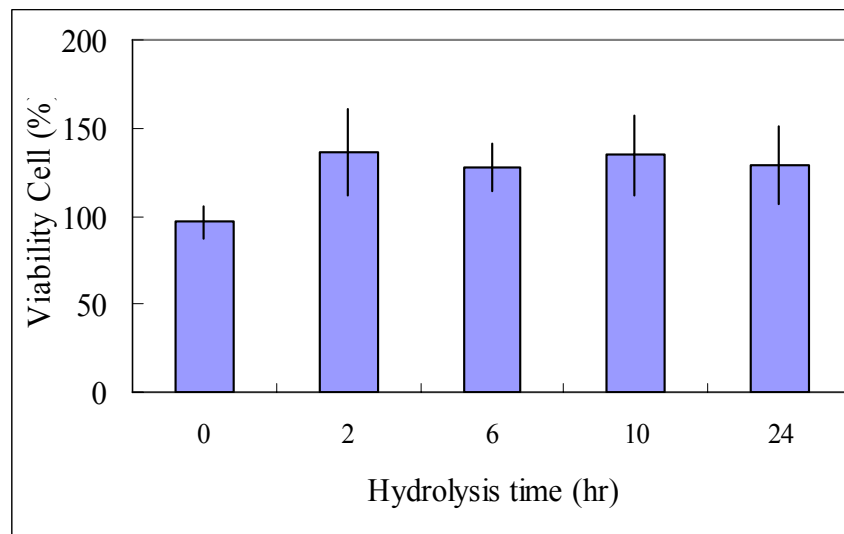


Fig. 3. Elution patterns of porcine red blood corpuscle solution on Sephadex G-25 column chromatography after (A) 10 hour (B) 2 hour hydrolysis with mixture of trypsin, chymotrypsin and thermolysin. Column: 1.5×90 cm

(A)

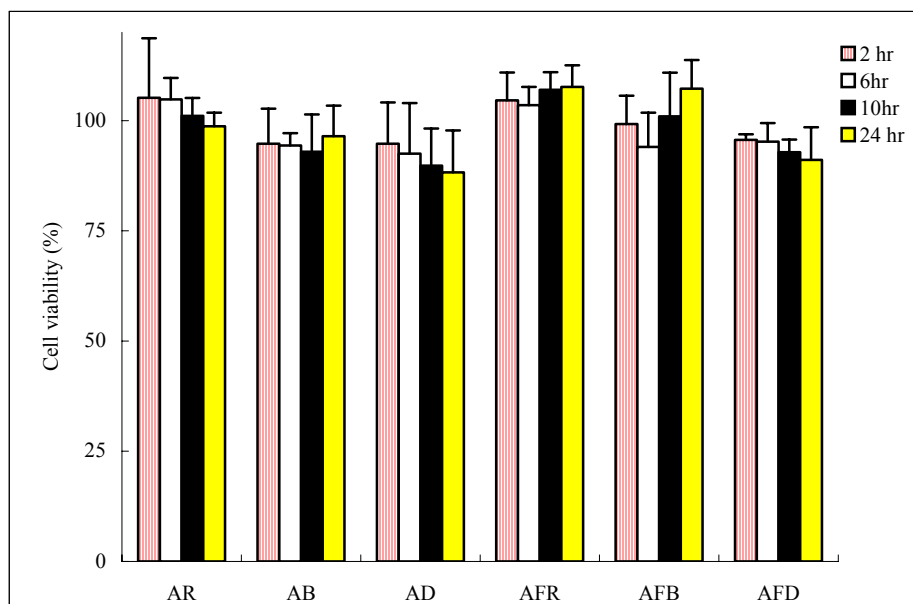


(B)

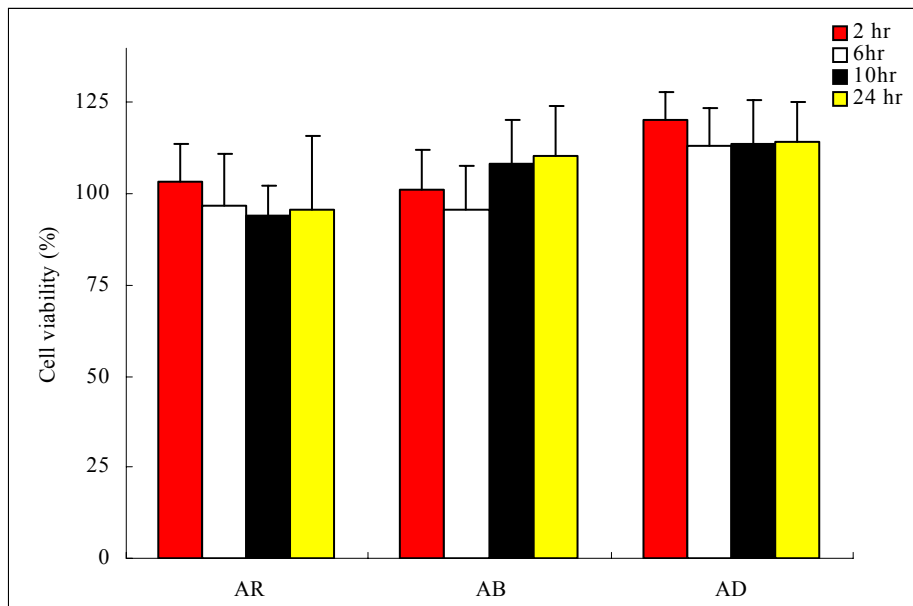


圖四、豬血球水解液促進 WS1 細胞增生機能。酵素：(A)Trypsin , (B) mixture of Trypsin, Chymotrypsin 、Thermolysin

(A)



(B)

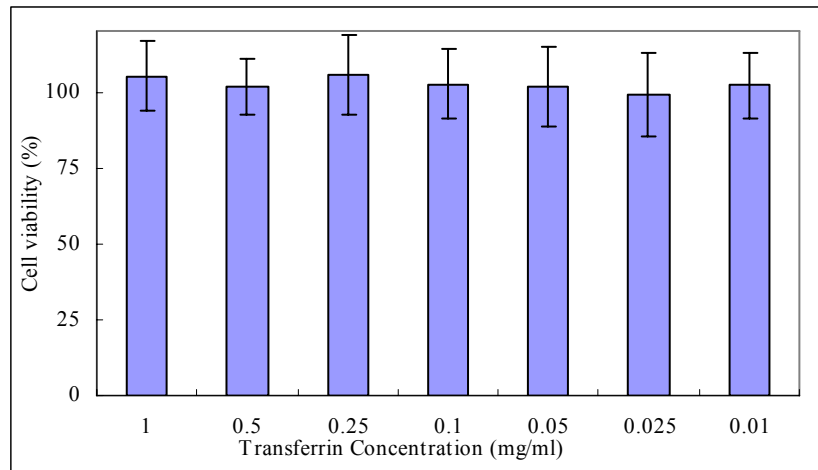


*Enzyme - A: Alcalase, F: Flavozyyme,

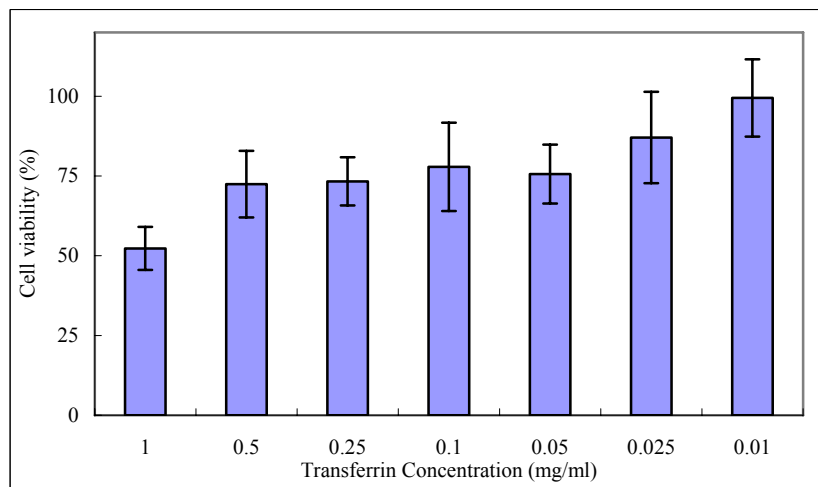
Substrate - R: Red blood corpuscle, B: blood plasma, D: Defibrinated plasma

圖五、豬血球、血漿、去纖維蛋白原酵素水解液抑制(A)B16F10, (B)Hep G2 腫瘤細胞增生效果

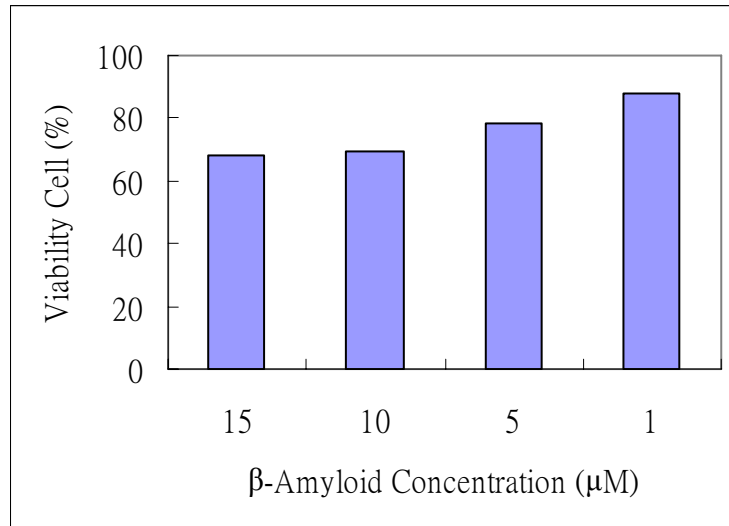
(A)



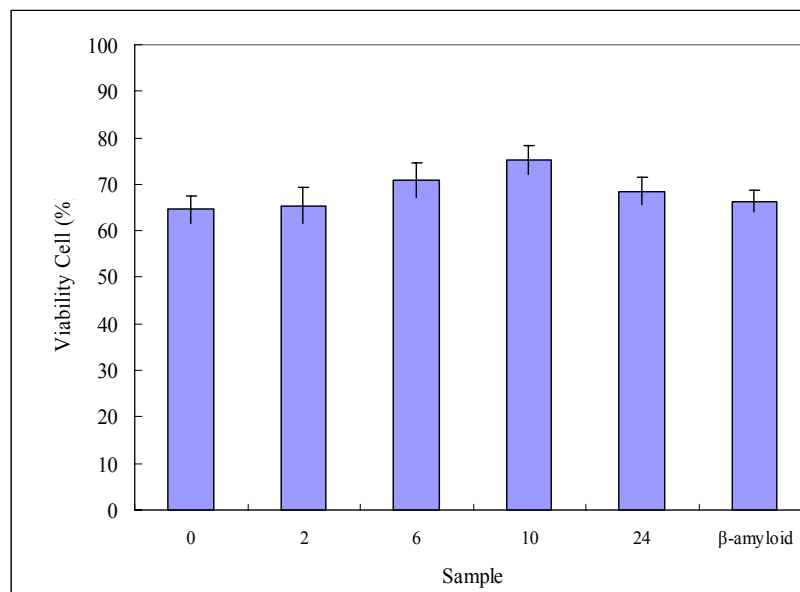
(B)



圖六、Transferrin 抑制(A)B16F10, (B)Hep G2 腫瘤細胞增生效果

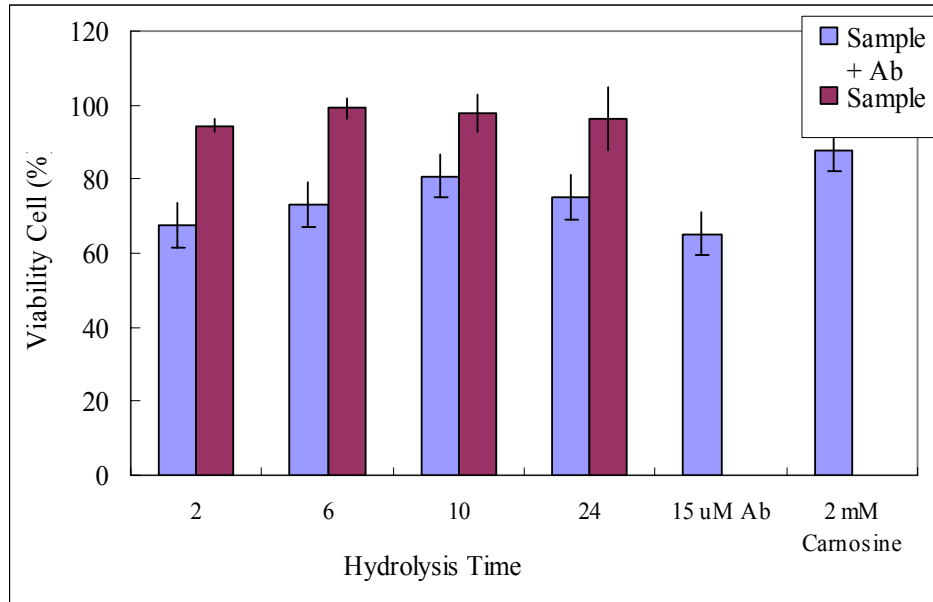


圖七、不同濃度 β -amyloid(25-35)對 Neuro2A 細胞存活數影響

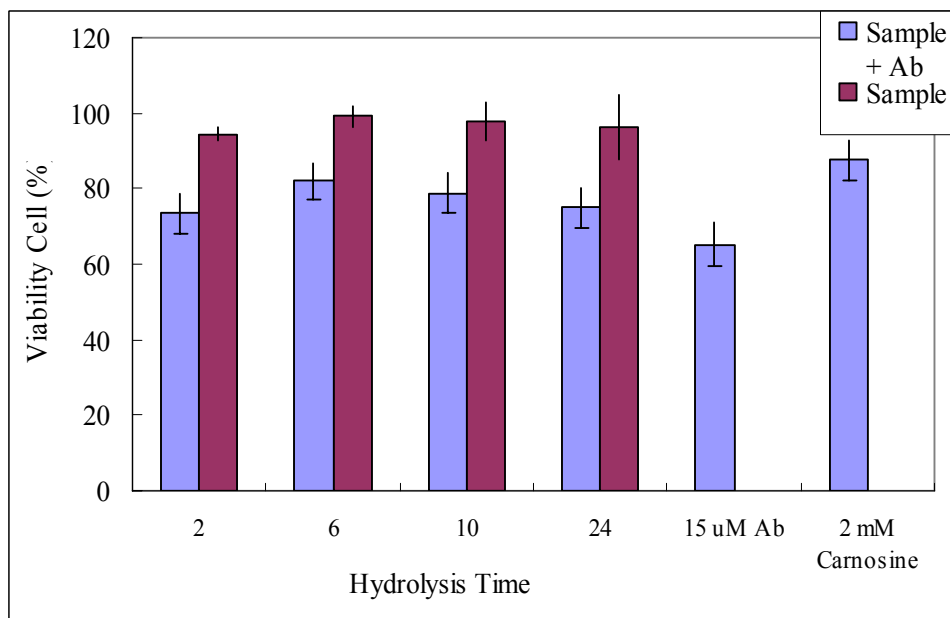


圖八、添加混合酵素(Trypsin, Chymotrypsin, Thermolysin)酵素水解豬血球液於含 β -amyloid(24-35)培養基中對 Neuro 2A 細胞的影響

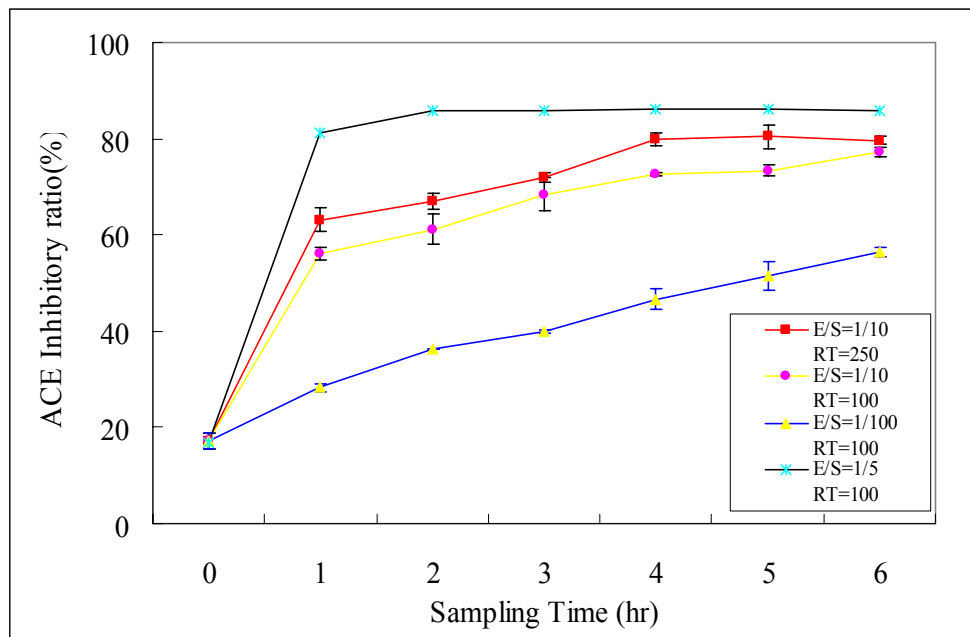
(A)



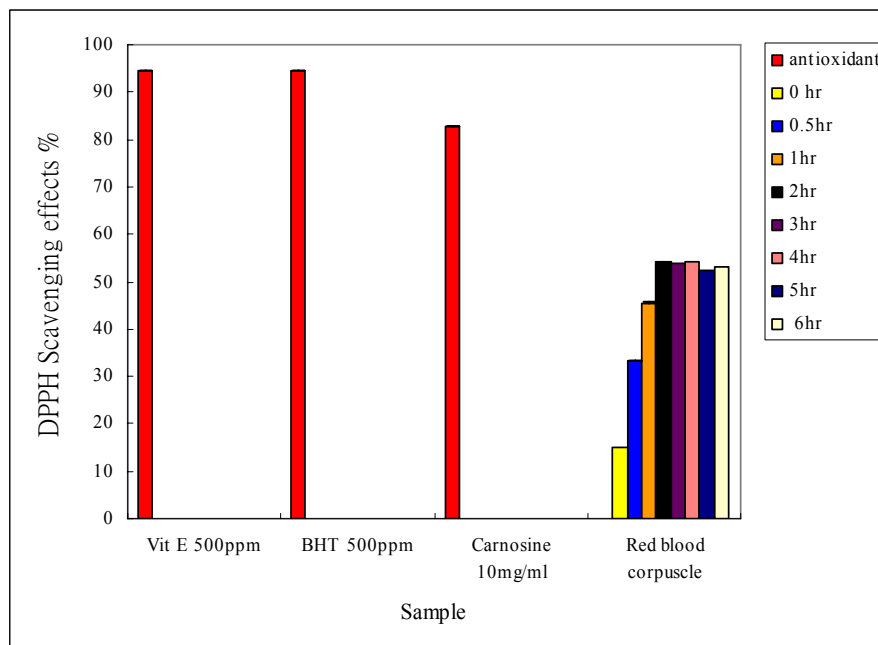
(B)



圖九、添加(A) Alcalase, (B)混合酵素(Trypsin, Chymotrypsin, Thermolysin)水解豬血球液於含 β -amyloid 培養基中對 RBE4 細胞的影響



圖十、於不同酵素/受質比及駐留時間下膜反應器連續式操作對豬血球酵素水解液抑制 ACE 活性之影響



圖十一、於不同酵素/受質比及駐留時間下膜反應器連續式操作對豬血球酵素水解液清除 DPPH 自由基之影響