

吳郭魚蛋白質酵素水解物之抗氧化性探討

吳蕙君

嘉南藥理科技大學餐旅管理系

摘 要

本研究以吳郭魚為原料，利用市售三種商業酵素（protease A、protease N、papain）於各種酵素之最適溫度及 pH 值下進行水解，分別水解 0、3、6、9 小時，探討魚肉蛋白質酵素水解物之可溶性蛋白質、胺基酸含量與抗氧化活性之相關性。三種酵素水解物的 pH 值分別有先降後升的趨勢；在水解物之可溶性蛋白質及胺基酸含量方面，二者皆隨水解時間的延長亦逐漸增加。各水解物皆具有抗氧化活性，其中又以 papain 水解物之抗氧化效果優於其他兩者。在捕捉 DPPH 自由基能力方面，三種酵素水解物皆以水解 6 小時者，其捕捉自由基之能力最佳，且隨著水解物濃度的增加有明顯上升之趨勢；在還原過氧化物能力方面，三種酵素水解物之還原力皆隨水解時間的延長而增加。統計分析顯示，吳郭魚肉蛋白質酵素水解物之抗氧化性強弱與胺基酸含量的多寡，有較大的相關性。

前 言

許多疾病的發生被認為和自由基的傷害有關，例如心血管疾病、糖尿病、癌症與老化等（Marx, 1987），因此自由基與抗氧化物質近年來已成為眾所矚目的焦點。忙碌緊張的生活及環境中各種污染物質充斥，使得人體中的氧化壓力增加，產生過多的自由基，而這些自由基的存在與心血管疾病、呼吸系統或神經系統方面的疾病及造成老化有關（Marx, 1987）。動物體內本身存在有抗氧化防禦系統，如抗氧化酵素系統（superoxide dismutase, SOD、glutathione peroxidase、glutathione reductase、catalase、peroxidase），可保護細胞免於氧化壓力的傷害，並保持體內氧化物與抗氧化物質之平衡（Halliwell and Gutteridge, 1998）。

天然抗氧化劑來源包括有穀類、豆類、蔬果、植物之根、皮、葉以及牛血清蛋白、卵白蛋白、小麥蛋白和大豆蛋白、梅納反應產物等，而有關蛋白質之水解物具有抗氧化活性方面的研究，以大豆蛋白質酵素水解物之研究較多。抗氧化活性的良窳與水解方式及酵素種類有關，但與水解率之關係不大（Yamaguchi et al., 1974）。Chen et al.(1995)以 protease N 與 protease S 來水解大豆蛋白質，兩者之水解程度幾乎相同，但 Protease S 水解液之抗氧化活性遠高於由 Protease N 所水解者，可知酵素水解液之水解程度與抗氧化活性並無良好之正相關。不同組成之胺基酸及胺基酸，其抗氧化活性亦不相同；Chen et al. (1996)之解析，含 histidine

與 proline 之胜肽抗氧化活性較強，且與其他抗氧化劑併用後其抗氧化活性有明顯的上升，其中又以 BHA 的效果為最佳、其次是 Tocopherol，而 BHT 的效果居末位。Kim et al.(2005)利用魚的腸內酵素來水解 Alaska pollack，經膜過濾可得五個區分物，其中又以分子量在 1kDa 以下的胜肽類具有較強的抗氧化性，經分離純化後所得之胺基酸序列為 Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr，其分子量約為 672 Da。顯示低分子量之胜肽類具有較強的抗氧化活性。

吳郭魚是本省養殖業的大宗漁獲物，其魚價低廉，為開發天然抗氧化劑最適之原料，故本研究擬探討由吳郭魚蛋白質水解物開發萃取天然抗氧化劑之可行性，以吳郭魚蛋白質抽出物為原料，利用 3 種酵素加以水解，探討水解物之抗氧化活性，並比較不同之水解方法、酵素種類之水解物抗氧化性強度之差異，確立水產物蛋白質作為天然抗氧化劑最適之水解方法，並分析水解物之可溶性蛋白質、胜肽含量與抗氧化性強度之相關性，以初步了解水解物具抗氧化性之可能機制，並作為進一步純化具抗氧化性之有效成分之特性。

材料與方法

(一)、實驗材料

- 1.吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*)，購自傳統市場，測定魚體平均體重、體長後，採其肌肉切碎混勻後抽取蛋白質以供水解及化學分析用。
- 2.蛋白分解酵素 Protease A、Protease N 購自廣華貿易公司 (製造商：Amano pharmaceutical CO., LTD. Nagoya, Japan)。Papain 購自 Sigma 化學公司 (St. Louis, Mo)。

(二)實驗方法

1.魚肉蛋白質酵素水解物之調製

將魚肉樣品切碎，各加入 2 倍 (W/W) 蒸餾水，以均質機均質 (Polytron PT 3000) 3 分鐘，再分別加入 0.5 % (W/W) 酵素 (Protease A、Protease N、Papain)，依其最適作用溫度和 pH 值進行不同時間水解取樣，水解物於 85°C 失活 10 分鐘後，以 4000 x g 離心 20 分鐘後，上層液經 Toyo 二號濾紙過濾，過濾液以乙醚同體積震盪去除脂肪，重複五次後去除乙醚，製成之水解物供可溶性蛋白質、胜肽、抑制亞麻油酸自氧化能力、捕捉 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力及還原過氧化物能力等分析用。

2.化學分析方法

(1) 水解物蛋白質含量：

取 1mL 含適量蛋白質溶液，以 Lowry et al. (1951) 法測定 540 nm 吸光值，由

bovine serum albumin標準物質得到之標準檢量線換算可溶性蛋白質含量。

(2) pH 值：

取細碎魚肉 5g 加入 45 mL 蒸餾水均質 (Polytron PT 3000) 2 min 後，以 pH-Meter 測定。

(3) 胜肽含量測定：

依照 Nakamura et al. (1995) 方法，取樣品 1 g 以超純水定容至 10ml，經 0.22 μ m 濾膜過濾後在經由適當的稀釋後取 50 μ L，於室溫下加入 2ml 含有 O-Phthaldialdehyde 之試劑，反應 2 分鐘後於波長 340nm 下偵測其吸光值。以 Bactotrypton 為標準物質得到之標準檢量線換算胜肽的含量。

(4) 抑制亞麻油酸自氧化作用 (硫氰酸鐵法，ferric thiocyanate method)：

將樣品溶於 1.5 mL 之 0.1M 磷酸緩衝液中 (pH 7.0)，和 1.0 mL 50mM 亞麻油酸 (溶於乙醇溶液) 混合密封後置於暗處，以 60 $^{\circ}$ C 恆溫加熱，每隔適當反應時間後取出利用硫氰酸鐵法 (ferric thiocyanate method) (Chen et al., 1996) 檢測抽出物抗氧化性強度，取 50 μ L 反應液加入 2.35 mL 75% 乙醇、50 μ L 30% 硫氰酸銨 (Ammonium thiocyanate) 和 50 μ L 20mM 氯化鐵 (溶於乙醇溶液 3.5% HCl) 等作用 3 分鐘後，測定 500nm 之吸光值。

(5) 捕捉 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力：

參考 Shimada et al. (1992) 法，取 4mL 之蛋白質水解液加入 1mL 新鮮配製 0.1mM α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) (溶於 95% 乙醇)，均勻混合，靜置 30 分鐘後，以分光光度計於 517nm 下，測其吸光值。

(6) 還原力測定：

參考 Oyaizu (1988) 法，分別取不同濃度的蛋白質水解液 3mL，加入 3mL 0.2M phosphate buffer (pH 6.6) 及 3mL 1% 赤血鹽 (Potassium ferricyanide)，於 50 $^{\circ}$ C 水浴 20 分鐘後迅速冷卻，加入 3mL 10% trichloro acetic acid 溶液，均勻混合後，取 3mL，並加入 3mL 蒸餾水及 1mL 0.1% 氯化鐵 (ferric chloride) 溶液，混合均勻於 10 分鐘後，在 700nm 下測其吸光值。吸光值愈高表示還原力愈強。

結果與討論

1. 水解方法與時間對水解物之影響

(1) pH 值

將吳郭魚魚肉分別以 protease A、protease N 及 papain 等酵素，於各酵素之最適水解溫度及 pH 值下進行水解，0、3、6、9 小時後之 pH 值如表一所示。不

論使用何種酵素，三種魚肉水解物之 pH 值皆呈現先降後升之趨勢，其中又以 protease A 水解物 6~9 小時之 pH 值變動範圍較其他水解物為大。邱等（1995）與蕭等（1996）發現虱目魚在不同溫度貯藏期間及硬直過程中，其 pH 值變化不大，且虱目魚自死後至腐敗階段其肌肉 pH 值低且較穩定。魚肉水解液 pH 值下降可能是因酸的產生所致，如鯖、鮪及鰹等洄游性魚類，在死後 pH 值會急遽下降至 5.6-6.0 之間，魚貝類在死後時肌肉係處於缺氧的狀態下，此時肝糖會進行醱解用作（glycolysis）而生成乳酸，且 ATP 分解為 ADP 時釋放出氫離子，促使其本身之 pH 下降（Watabe et al., 1991），而後 pH 值上升是因水解時鹼性物質如氨的產生所致；如水解液之 pH 值在水解期間內持續下降。

（2）可溶性蛋白質

表一為吳郭魚魚肉經 protease A、protease N 及 papain 水解後之可溶性蛋白質含量變化。酵素水解物隨水解時間增加，其可溶性蛋白質含量則有下降的情況，乃因可溶性蛋白質受酵素水解逐漸分解成更小分子之胜肽、游離胺基酸及氨所致。Gildberg（1993）指出，酵素雖可加速自家消化的水解作用，但對於富含自體酵素之原料（如於內臟廢棄物），即使增加酵素添加量對水解速率無明顯的促進作用。

（3）胜肽

吳郭魚魚肉酵素水解物之胜肽含量隨水解時間增加而增加（表一），其中以 papain 之酵素水解物胜肽含量由原來的 34.3 mg/ml 增加至 112.2 mg/ml，明顯較其他組別為高，顯示 papain 有較強的蛋白質分解力。林（1999）指出，魚肉蛋白質經酵素水解後，其游離胺基酸及複合胺基酸含量有逐漸增加之趨勢，尤其是複合胺基酸的部份，顯示水解時間的延長，外添加酵素將大分子之蛋白質分解為胜肽類或游離胺基酸。

2. 酵素水解物之抗氧化活性

（1）抑制亞麻油酸自氧化能力

水解方法與時間對吳郭魚蛋白質水解物抑制亞麻油酸自氧化能力之影響如圖一所示。在水解 0 至 9 小時中，三種酵素水解物皆具有抑制亞麻油酸自氧化能力，且三者皆以 6 小時之水解物的抑制效果最佳；其中又以 protease N 及 papain 兩種酵素物之抗氧化性較 protease A 為強。Protease N 及 papain 6 小時之水解物，其氧化誘導期分別為 13.8 天及 17.5 天，約為控制組 2.8 天的 5~6 倍，亦較 0.05 mM BHA 之誘導期 8.3 天為強，顯示其具有良好之抗氧化性，當水解時間增加至 9 小時，其抑制能力則有逐漸減弱的現象。

比對抑制亞麻油酸自氧化能力與可溶性蛋白質及胜肽含量的變化（圖七、圖八），發現可溶性蛋白質與抑制能力之相關性小（ $r^2=0.63$ ），而胜肽對亞麻油酸

之抑制能力相關性高 ($r^2=0.80$)，顯示胜肽的種類及含量的多寡亦會對抗氧化性造成影響。Wu et al. (2003; 2005) 曾指出，含組胺酸相關化合物較多之鱈魚，具有抑制亞麻油酸自氧化能力，但抑制能力之高低則隨鍵結部位的不同而有所差異。Je et al. (2005)將鱈魚骨架等廢棄物以商業用酵素進行水解(Hoki frame protein hydrolysate, HPH)，再經膜過濾後可得 4 個區分物，分別為 HPH I (5-10 kDa)、HPH II (3-5kDa)、HPH III (1-3kDa)、HPH IV (<1kDa)，結果顯示 HPH III 具有較強之清除 DPPH 自由基、超氧陰離子及氫氧自由基之能力，其抗氧化效果可能與分子量大小有關。而 Kim et al.(2005)利用魚的腸內酵素來水解 Alaska pollack，經膜過濾可得五個區分物，其中又以分子量在 1kDa 以下的胜肽類具有較強的抗氧化性，經分離純化後所得之胺基酸序列為 Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr，其分子量約為 672 Da。顯示低分子量之胜肽類具有較強的抗氧化活性。

(2) 捕捉 α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力

各種酵素水解物之捕捉 DPPH 自由基能力如圖二所示，整體而言，三種酵素水解物具有較強的捕捉 DPPH 自由基能力，其中以 papain 酵素物之捕捉 DPPH 自由基能力最佳，其次為 protease N，而 protease A 之捕捉自由基能力則較其他二者差。在捕捉 DPPH 自由基能力方面，三種酵素水解物所呈現的結果與圖一有相似之傾向，同樣以水解 6 小時之水解物的效果為最佳；惟所測之三種酵素物對捕捉 DPPH 自由基之能力皆較 0.05 mM α -生育醇及 BHA 低。

各種酵素水解物之捕捉 DPPH 自由基能力與可溶性蛋白質及胜肽含量之相關性甚高 ($r^2=0.77$ 、 $r^2=0.81$) (圖七、圖八)，顯示酵素水解物對清除 DPPH 自由基的良窳與水解物中所含之蛋白質及胜肽含量有關。Chen et al. (1998) 指出大豆蛋白抽出物中含 His 相關化合物之胜肽類，具有清除 DPPH 自由基之效應。

三種酵素水解物在濃度 1~15 mg/ml 下皆隨著濃度的增加 (圖三~圖五)，其捕捉 DPPH 自由基能力有逐漸上升的趨勢；其中又以水解 6 小時者的捕捉效果為最佳。當濃度達到 10mg/ml 時，三種酵素水解物的捕捉能力皆可達 50%以上，特別是 papain 水解物在濃度 15mg/ml 時，更高達 95%以上，與 0.5mM BHA 之捕捉能力不相上下。Jung et al. (2005)由發酵的貽貝醬油中發現，經發酵 6 個月的醬油中有抗氧化胜肽的存在，進一步分離純化後得到的胺基酸序列為 FGHPY，分子量為 620Da，且在濃度 64.8 μ M 下可抑制氫氧自由基達 89.5%。

(3) 還原力

圖六為三種酵素水解物之還原過氧化物能力。結果顯示，三種酵素水解物皆會隨著濃度的增加，還原力亦隨之增大的趨勢，當水解時間達 3 小時，其吸光值分別為 0.806、0.706、0.731，皆較 0.05 mM BHA 為佳；但隨著水解時間的延長其增加趨勢並不顯著。進一步比對還原力與可溶性蛋白質及胜肽含量的變化 (圖七、圖八)，發現可溶性蛋白質與還原力之相關性大 ($r^2=0.85$)，而胜肽與還原力之相關性小 ($r^2=0.67$)，顯示可溶性蛋白質含量的多寡會對還原力造成影響。

結 論

- 1.三種酵素水解物隨水解時間增加，其可溶性蛋白質含量均有下降的趨勢；而胜肽含量則有逐漸增加之傾向。
- 2.吳郭魚肉酵素水解物皆具有抗氧化活性，且在各個水解時間點中皆是以 papain 水解物的抗氧化活性優於其他二者。統計分析顯示，酵素水解物之抗氧化能力與胜肽類含量的的多寡頗為密切，可知其抗氧化能力強弱可能與胜肽類胺基酸種類有關。

參考文獻

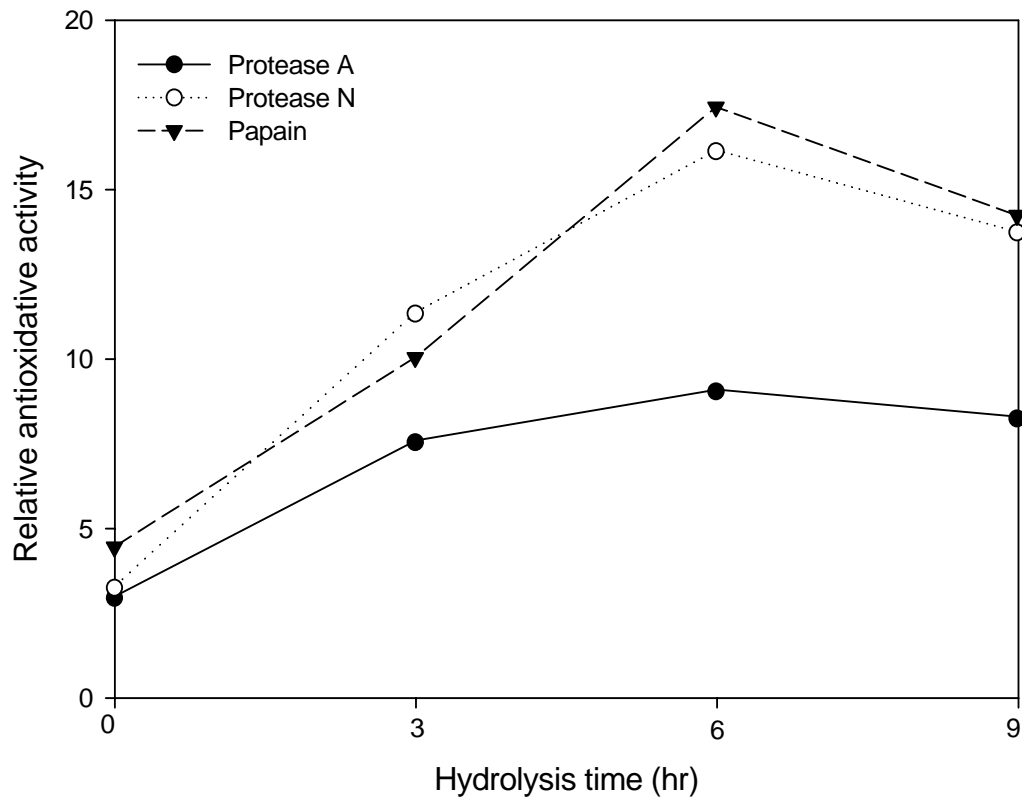
- Chen, H. M., Muramoto, K. and Yamauchi, F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *J. Agric. Food. Chem.* 43(3):574-578.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 44(9):2619-2622.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and 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(1):49-53.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1998. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1-4.
- Je, J. Y., Kim, S. Y. and Kim, S. K. 2005. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. *Eur. Food Res. Technol.* 221:157-162.
- Jung, W. K., Rajapakse, N. and Kim, S. K. 2005. Antioxidative activity of a low molecular weight peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. 220:535-539.
- Kim, S. K., Je, J. Y. and Park, P. J. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.* 38:45-50.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-269
- Marx, J. L. 1987. Oxygen free radicals linked to many disease. *Science* 235: 529-531.

- Nakamura, S., Ogawa, M., Nakai, S., Kato, A. and Kitts, D. D. 1998. Antioxidant activity of a Maillard-type phosphitin-galactomannan conjugate with emulsifying properties and heat stability. *J. Agric. Food Chem.* 46:3958-3963.
- Oyaizu, M. 1988. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 35(11):771-775.
- Shiau, C. Y., Pong, Y. J., Chiou, T. K. and Chai, T. 1996. Free amino acids and nucleotide-related compounds in milkfish(*Chanos chanos*) muscles and viscera. *J. Agric. Food Chem.* 44(9):2605-2653.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40:945-948.
- Watanabe, H., Yamanaka, H. and Yamakawa, H. 1992. Post-mortem biochemical changes in the muscle of disk abalone during storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58(11):2081-2088.
- Wu, H. C., Chen, H. M. and Shiau, C. Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Intl.* 36:949-957.
- Wu, H.C., Chang, C.L., Sun Pan, B. and Shiau, C.Y. 2005a. Low-molecular-weight peptides as related to antioxidant properties of chicken essence. *Journal of Food & Drug Analysis* 13(2):176-183.
- Yamaguchi, N., Yokoo, Y. and Fufimaki, M. 1975. Studies on antioxidative activities of amino compounds of fats and oils. Part II. Antioxidative activities of dipeptides and their synergistic effects on tocopherol. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 22(9): 425-430.
- 林玫欣, 1999。鯖魚肉與內臟水解物之抗氧化性研究。臺灣省水產學會87年年會, 台北, p.19。
- 邱思魁、游昭玲、蕭泉源, 1995。虱目魚貯藏中鮮度及呈味成份之變化, 食品科學, 22: 46-58。

表一、吳郭魚肉水解物之 pH 值、可溶性蛋白質及胜肽含量在水解期間之變化

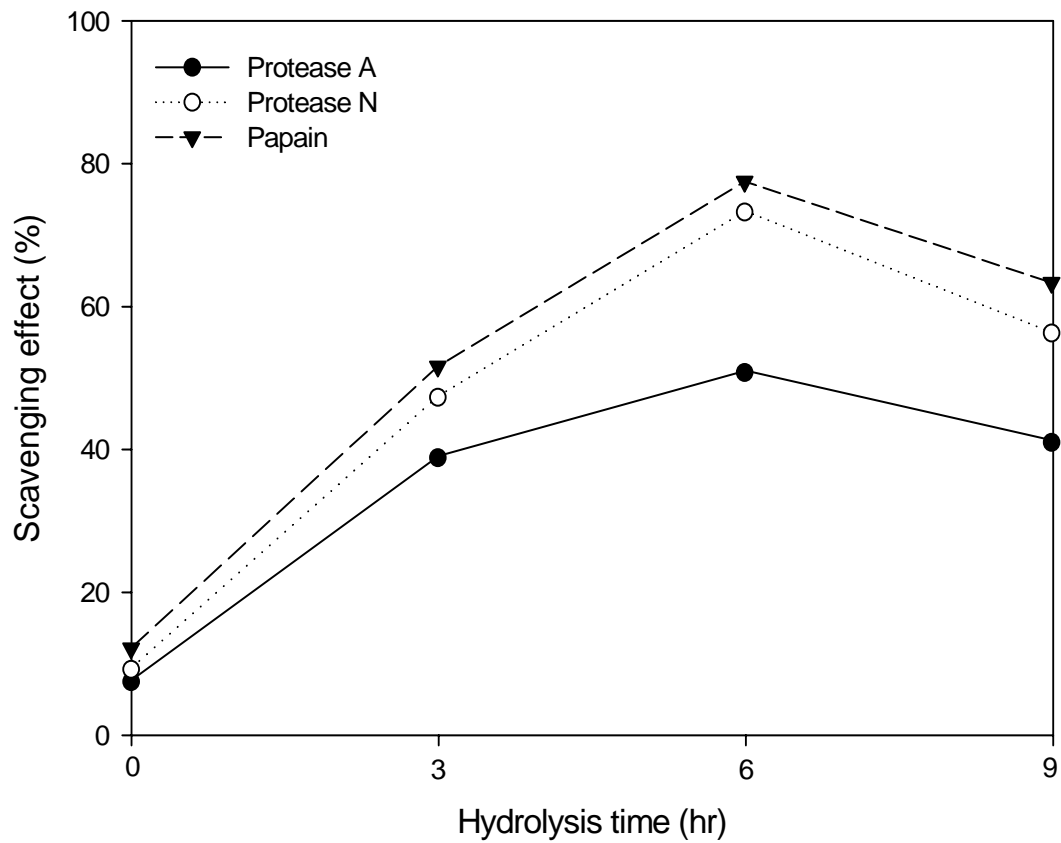
Table 1. Change in pH, soluble protein and peptide contents of tilapia meat hydrolysates during hydrolysis

Enzyme	Hydrolysis time (hr)	pH	Soluble protein (mg/ml)	Peptide (mg/ml)
Protease A	0	6.64	16.6	34.2
	3	6.37	128.7	72.5
	6	6.19	152.8	81.5
	9	6.96	126.7	90.4
Protease N	0	6.59	17.5	42.7
	3	6.32	151.4	94.5
	6	6.15	144.5	96.4
	9	6.20	164.0	104.8
Papain	0	6.52	19.3	34.3
	3	6.28	183.0	95.4
	6	6.20	148.0	102.7
	9	6.10	160.8	112.2



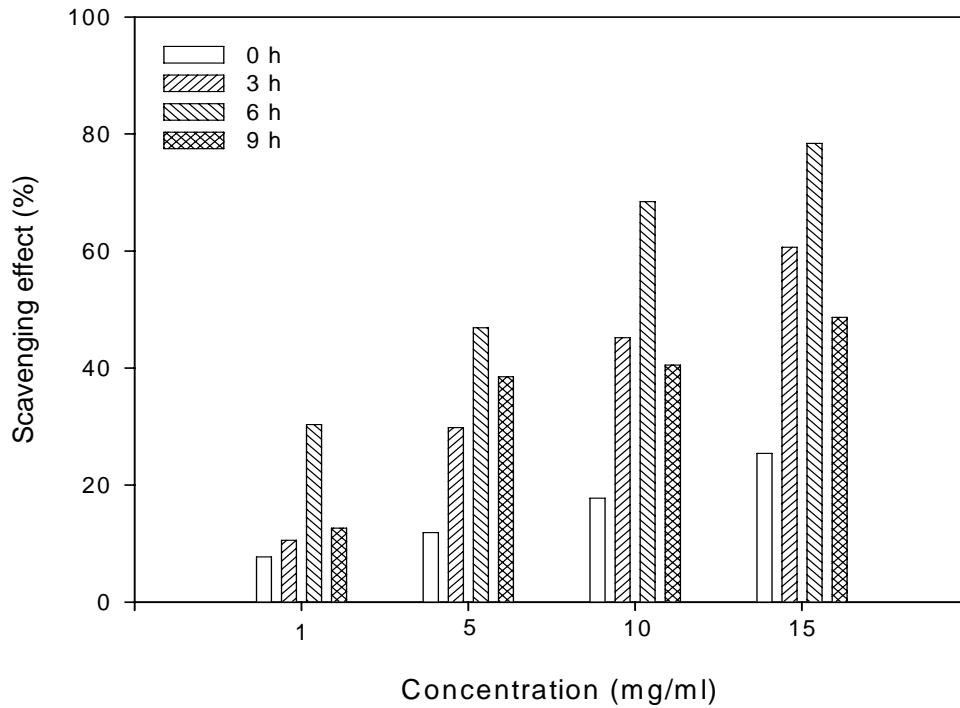
圖一、吳郭魚肉酵素水解物抑制亞麻油酸自氧化能力

Fig. 1. Effect of hydrolysis method and time on the inhibition of linoleic acid of tilapia meat hydrolysates. The numbers of the relative antioxidative activity were based on the days of induction period. The induction period of control group was 2.8 day.



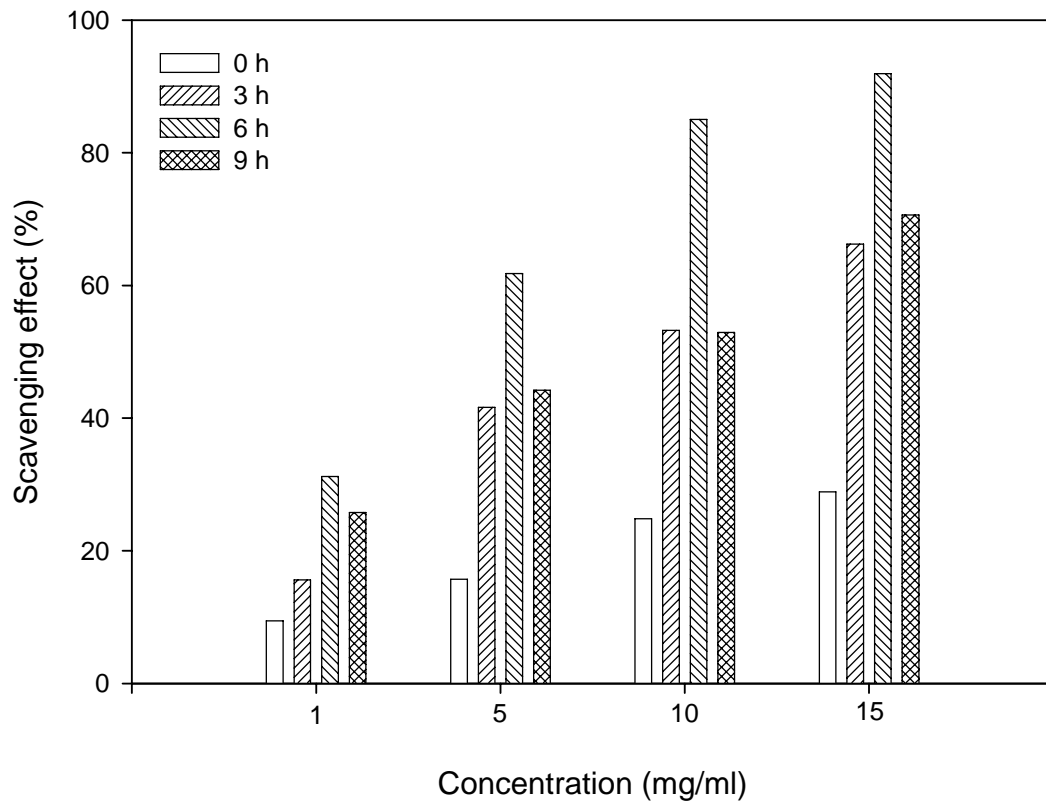
圖二、水解方法與時間對吳郭魚肉水解物清除 DPPH 自由基之影響

Fig. 2. Influence of hydrolysis method and time on scavenging effect of α,α -diphenyl- β -picryl hydrazyl (DPPH) radical of tilapia meat hydrolysates.



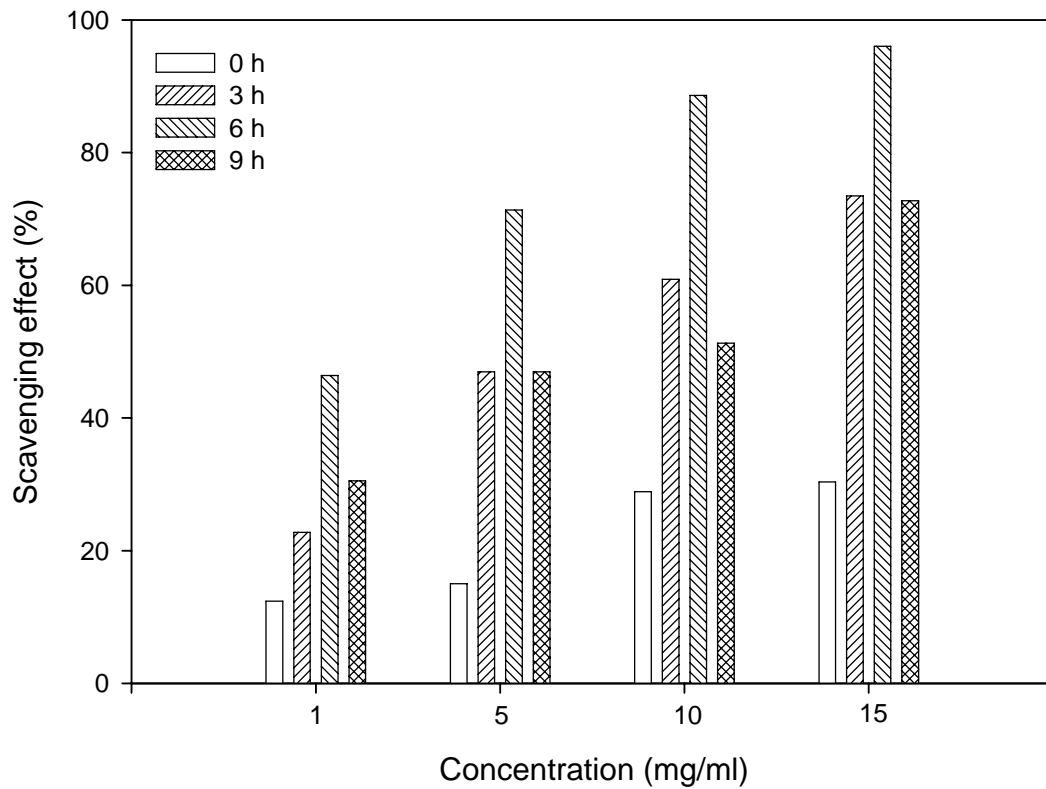
圖三、吳郭魚之 Protease A 酵素水解物在不同濃度下清除 DPPH 自由基之能力

Fig. 3. Effect of concentration of tilapia meat hydrolysates by Protease A on scavenging effect of α,α -diphenyl- β -picryl hydrazyl (DPPH) radical.



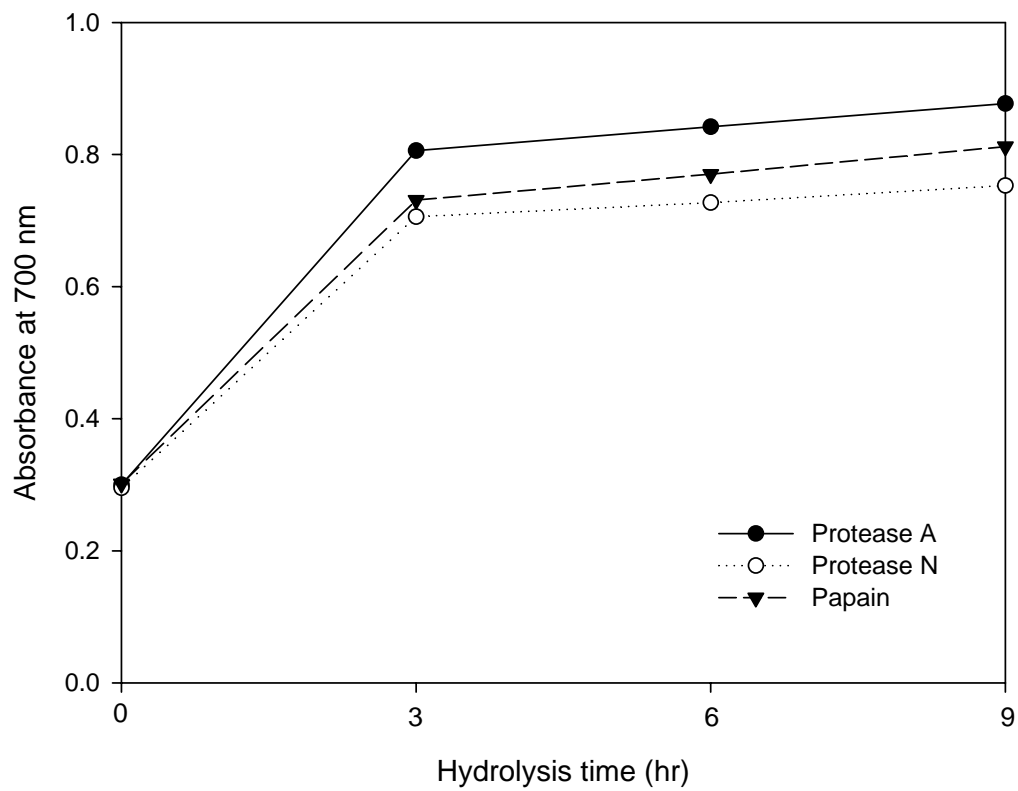
圖四、吳郭魚之 Protease N 酵素水解物在不同濃度下清除 DPPH 自由基之能力

Fig. 4. Effect of concentration of tilapia meat hydrolysates by Protease N on scavenging effect of α,α -diphenyl- β -picryl hydrazyl (DPPH) radical.



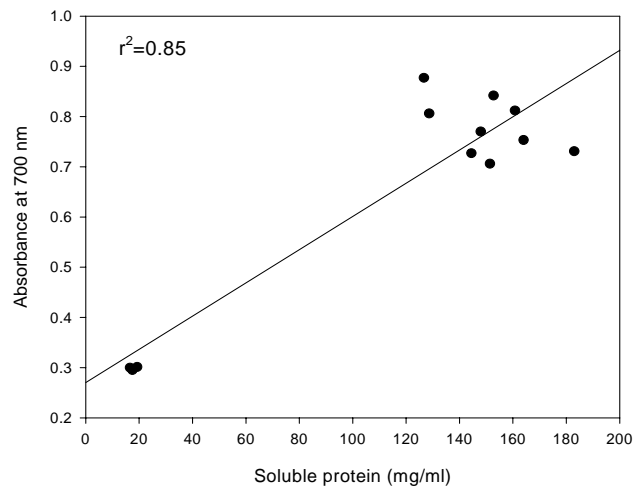
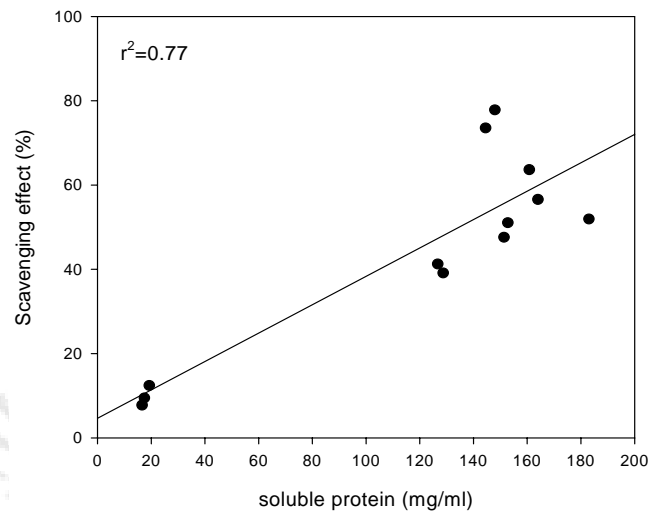
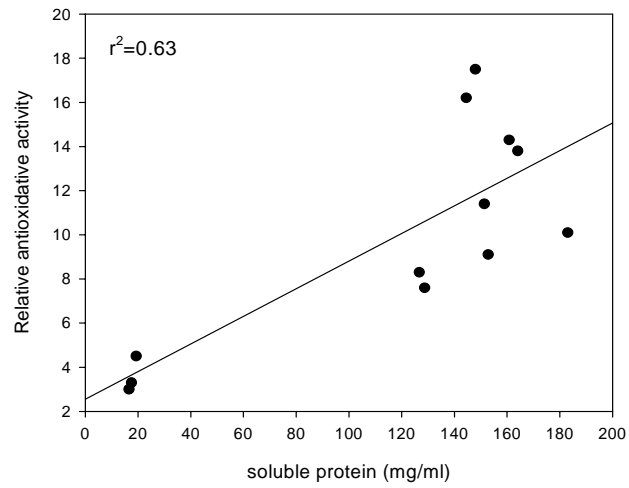
圖五、吳郭魚之 Papain 酵素水解物在不同濃度下清除 DPPH 自由基之能力

Fig. 5. Effect of concentration of tilapia meat hydrolysates by Papain on scavenging effect of α,α -diphenyl- β -picryl hydrazyl (DPPH) radical.



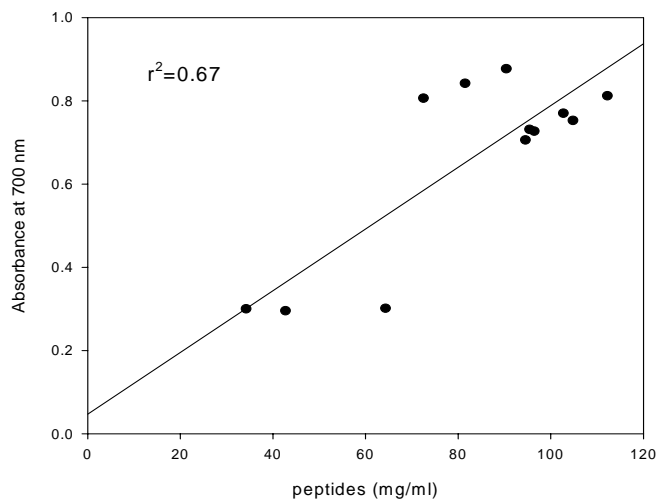
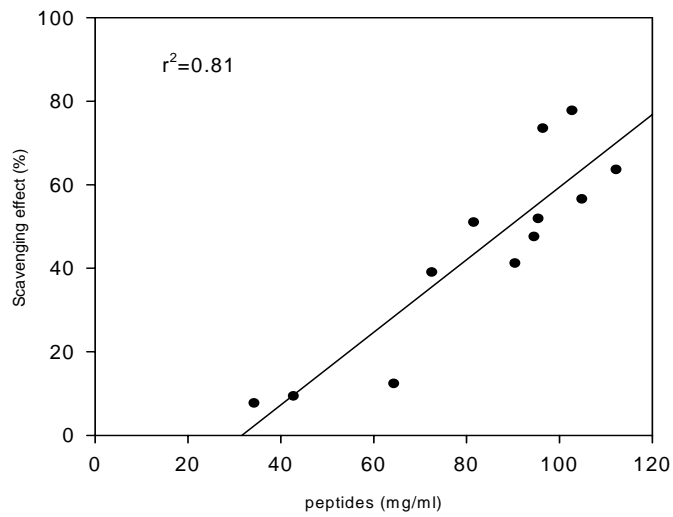
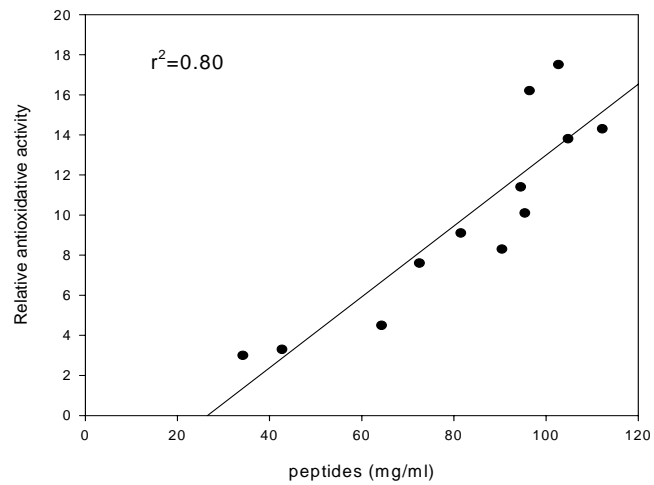
圖六、水解方法與時間對吳郭魚肉水解物還原力之影響

Fig. 6. Effect of hydrolysis method and time on the reducing power of tilapia meat hydrolysates.



圖七、吳郭魚肉水解物抗氧化能力與可溶性蛋白質含量之關係

Fig. 7. Relationship between antioxidative activity and soluble protein in tilapia meat hydrolysates.



圖八、吳郭魚肉水解物抗氧化能力與胜肽含量之關係

Fig. 8. Relationship between antioxidative activity and peptides in tilapia meat hydrolysates.