

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

利用酵素水解脫脂米糠以製備含生理活性胜肽之水解物

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CN9823

執行期間：98年7月1日至98年12月31日

計畫主持人：林國民

共同主持人：

計畫參與人員：王柏森、陳佑融

執行單位：食品科技系

中華民國 99 年 2 月 28 日

摘要

本研究利用由 *Aspergillus sp.*、*Rhizopus sp.* 及 *Bacillus sp.* 等不同種類之微生物所製得之商業蛋白酶，水解經 80% 酒精溶液及水處理過之脫脂米糠，以製備具生理活性胜肽之酵素水解物及其區分物，並評估其抗氧化及抗發炎活性。結果顯示，在五種抗氧化力評估項目中，本研究所製備的三種蛋白酶水解物及其區分物在清除 ABTS⁺· 的效力方面，表現最佳，而蛋白酶 R 及 B 水解物及其 RO 水區分物在亞鐵離子螯合能力的表現亦相當不錯。至於 DPPH、還原力及微脂粒氧化抑制等抗氧化能力的表現，則不甚理想。此外，蛋白酶水解專一性之不同對於所評估抗氧化能力之影響，則大多不明顯。除了蛋白酶 B 之外，水解物經 95% EtOH 萃取所得之區分物，表現出較佳之抑制細胞內 NO 生成的能力，尤其是蛋白酶 R 之 95% EtOH 區分物，在樣品濃度 100ppm 下，即表現出非常良好之抑制能力。同時，由試管外清除 NO 能力之評估試驗 (SNP 試驗) 結果可知，本研究所製備之水解物及其區分物確實具有直接清除 NO 之能力。不論細胞或試管試驗，蛋白酶 B 之水解物及其區分物彼此之間在清除 NO 的能力方面，並沒有明顯差異，且表現出與其他蛋白酶水解物及其區分物迥然不同之趨勢，可見蛋白酶水解專一性之不同對於其清除 NO 或抑制 NO 生成能力之影響。此外，細胞毒性試驗結果顯示，本研究所製備之蛋白酶水解物及其區分物對細胞不具毒性。

關鍵詞: 米糠、酵素水解物、生理活性胜肽、抗氧化、抗發炎

前言

由文獻資料得知，以大豆或牛奶蛋白質為原料製備含生理活性胜肽物質之研究已非常多且相當深入，水產蛋白質為素材之相關研究也很常見。相較之下，以米糠為素材，在這些方面的研究則顯得非常不足。根據聯合國糧農組織 (FAO) 的統計資料顯示，2007 年全世界稻米產量超過 6 億 5 千萬公噸，而台灣地區這幾年，每年亦有

1.1~1.3 百萬公噸的生產量 (行政院農委會農糧署統計資料, 2008)。因此隨著稻米碾白精製過程而產生高量之副產物--米糠。雖然稻米之蛋白質含量不高，但其蛋白質成分主要分佈於糠層，因此，米糠含有之蛋白質含量較稻米及精白米為高，隨著精白率之不同，其含量約在 10~15% 之間。迄今，米糠之主要利用型式是提製其油脂部分，做成米糠油，且已商業化量產。由於油脂工業衍生之脫脂米糠是經過高溫去有機溶劑處理，導致蛋白質及其他營養素受到嚴重熱變性與熱破壞，營養價值與食品應用性非常低，且在文獻報告中，亦很少研究者利用它來製備生理活性胜肽類物質。目前主要利用方式與油籽 (oil seed) 作物之粕一樣，當做動物或水產飼料之基質，經濟價值非常低，如能進一步加工精製成機能性食品成分，則應會深具經濟價值及實用性。

一般而言，胜肽類物質之抗氧化能力主要是受到分子大小 (亦即構造胺基酸之數目) 與構造胺基酸種類及其序列之影響，而這些因素取決於所使用蛋白質來源及酵素或是菌種之種類 (Gibbs et al., 2004)。在酵素方面，大多數使用商業化酵素如 pepsin、trypsin、chymotrypsin 等，以單獨或混合形式使用。另外，亦有使用諸如 alcalase 或由麴菌而來之蛋白酶等混合式商業化酵素，以冀望能製得分子量較小之胜肽 (Maruyama et al., 1985; Tsuge et al., 1991; Astawan et al., 1995; Lin et al., 1995; Linder et al., 1995; Chen et al., 1996; Amarowicz and Shahiai, 1997; Moure et al., 2001)。若是使用發酵方式製備具生理活性之胜肽類物質，則一般主要是使用一些常見於發酵食品中所使用且具有高活性蛋白酶之菌種，諸如：納豆菌、麴菌等。有些研究者使用單一菌株，而有些則混合使用數種不同之菌株，以期製得具較佳抗氧化能力之胜肽類物質。

目前在文獻報告中，雖已有利用酵素水解脫脂米糠製備具生理活性胜肽類物質的研究，但是非常稀少 (Adebiyi et al., 2008;

Heo et al, 2007), 而這其中, 關於抗氧化活性之相關研究, 僅以一種抗氧化活性試驗方法評估 (以Fe/ascorbate 促氧化系統作用於linoleic acid emulsion), 缺乏其他類型抗氧化機制之完整研究。此外, 從關於抗氧化及其作用機制與ROS或RNS等自由基和發炎反應之關係的研究報告中, 可推測得知, 具抗氧化活性物質可能會因具有捕捉ROS或RNS等自由基之能力而達到抗發炎或減緩發炎反應之產生。然而, 由酵素水解或利用發酵方式製備含活性胜肽之物質, 在抗發炎功能活性方面之研究與探討, 卻非常有限。因此, 若欲利用脫脂米糠當作蛋白質原料製備含生理活性胜肽物質, 則需進一步研究與探討。故本研究使用三種不同微生物來源所製得之商業蛋白酶進行水解, 製備具生理活性胜肽之脫脂米糠蛋白質水解物及其區分物, 並以化學試驗評估其各類型抗氧化能力及動物細胞試驗評估其抑制nitric oxide生成之能力, 希冀能因此而深入了解脫脂米糠供作機能性食品基質之潛力, 並作為日後探討活性胜肽在這些生理活性方面之作用機制或其對於DNA表現的影響之重要參考依據, 進而提升食品機能性成份成為可預防或甚至治療相關疾病之可行性。

材料與方法

一、材料

米糠購自傳統碾米工廠, 三種不同微生物來源 (*Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*及 *Bacillus sp.*)之蛋白酶購自Sigma藥品公司。

二、方法

米糠原料脫脂及其他前處理

由於米糠含油量頗高, 一般約在15~20%之間。因此, 為避免油脂影響蛋白酶水解效率, 水解前, 原料需先以己烷行脫脂處理。新鮮米糠原料先以10倍

量己烷萃取油脂成分1hr, 去除慮液後, 以5倍量己烷及同樣方式重複萃取二次後, 置於110°C烘箱內, 以利去除己烷。採取如此高溫去溶劑之主要目的是模擬食用油脂工業去溶劑之條件, 以製備類似於其加工副產物--脫脂米糠。同時, 為了避免天然存在於米糠且極性有機溶劑或水可溶之機能性成分影響酵素水解物及其區分物生理活性評估之結果 (不論是增強或減弱其活性表現), 酵素水解之前, 脫脂米糠需先進行前處理。首先將脫脂米糠加入於5倍量80%乙醇溶液中並攪拌30分鐘, 以溶出小分子醣類及其他可溶物。去除過濾液之後, 以同樣方式重複二次。之後加入5倍量蒸餾水, 攪拌30分鐘, 去除過濾液之後, 以同樣方式重複水洗二次後, 置於60°C烘箱內烘乾。前處理後之脫脂米糠貯存於冷凍庫備用。

酵素水解物之製備

分別取10g前處理後之脫脂米糠, 與100mL適當之緩衝液及0.15g商業酵素充分混合。若使用源自*Aspergillus sp.*及*Rhizopus sp.*之蛋白酶進行水解時, 以pH4之碳酸緩衝液於室溫下水解隔夜, 若使用源自*Bacillus sp.*之蛋白酶進行水解時, 則以pH8之磷酸緩衝液於60°C下, 進行水解反應6hrs。水解後以5,000×g離心10min, 取上層液, 先經減壓濃縮處理後再冷凍乾燥, 並保存於-20°C下備用。

酵素水解物之區分

分別取經冷凍乾燥之脫脂米糠水解物各2g, 以20mL95%EtOH溶液溶解後, 以5,000×g離心10min, 取上層液後, 以減壓濃縮機處理至乾燥並保存於-20°C下備用。不溶於95%EtOH溶液之沉澱物則以20mL50%EtOH溶液溶解後, 以5,000×g離心10min, 取上層液後, 以減壓濃縮機處理至乾燥並保存於-20°C下備用。最後則將不溶於95%EtOH及50%EtOH溶液之沉澱物以20mLRO水溶解後, 以5,000×g離心10min, 取上層液後, 以減壓濃縮機處理至乾燥並保存於-20°C下備用。

α, α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基清除能力

參考 Hatano 等(1988)之方法。取 120 μ l 不同濃度的樣品，加入 80 μ l 新鮮配製的 1 mM DPPH 甲醇溶液，振盪混合均勻 10 min 後，使用分光光度計檢測 517 nm 之吸光值。吸光值越低表示樣品清除 DPPH 自由基的能力越強。

$$\text{抑制率(\%)} = (1 - \text{樣品吸光值} / \text{控制組吸光值}) \times 100$$

Trolox 當量抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) 分析

參考 Arnao et al. (2001) 之方法經過修飾。配製 ABTS⁺·，依所需用量體積，取適當克數的試藥量溶解於二次水，待 ABTS·、過氧化氫以及過氧化酶完全溶解，定量到所需用量體積之後，將三者混合暗反應一小時即可。配製樣品，依所需用量體積，取 0.1 克萃取物的量溶解於 10ml 80% 酒精中，若有不溶解現象則須經離心處理，使樣品呈現澄清狀態的測試液即可。以 96well 每一 well 所需之量 (200 μ l / well)，樣品和 ABTS⁺· 的部分總共體積為 200 μ l；樣品 20 μ l、ABTS⁺· 180 μ l。所加入樣品的量依所設計需要的濃度而定，不足體積 20 μ l 則用 80% 乙醇補足，樣品加完之後，再加入 180 μ l ABTS⁺·，震盪混合均勻，室溫下反應 5 分鐘後，檢測 620nm 吸光值。依吸光值判定 ABTS⁺· 清除能力。當 620nm 吸光值越低者，則表示測試樣品的清除能力越強。吸光值判讀的結果利用 Trolox 標準曲線，做出相對於 Trolox 的濃度表示之。

還原力測定 (Reducing power measurement)

參考顏和劉(1997)之方法並加以修

飾。取 40 μ l 不同濃度樣品，加入 0.2M 磷酸緩衝溶液 (pH 6.6) 200 μ l 和 200 μ l 1% 赤血鹽 (potassium ferricyanide, $K_3Fe(CN)_6$)，於 50°C 水浴中反應 20min，經快速冷卻後加入 200 μ l 10% TCA (trichloroacetic acid) 溶液，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液 0.5 ml 加入 0.5 ml 蒸餾水和 0.1 ml 0.1% 的氯化鐵 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, ferric chloride) 溶液，混合均勻於 10 分鐘後測定 OD 700 nm，並與 1 mg/ml 之 Vitamin C 作為對照比較之。吸光值愈高表示還原力愈強。

亞鐵離子螯合能力

參考 Carter (1971) 之方法並加以修飾。取 80 μ l 不同濃度的樣品及控制組，加入 80 μ l 的甲醇，先加入 1 mM 的 $FeCl_2$ 10 μ l，再加入 10 μ l 1 mM ascorbic acid 並搖均勻後，加入 5 mM 的 ferrozine 20 μ l，反應 10 分鐘後，檢測 562 nm 的吸光值。

$$\text{螯合率(\%)} = (1 - \text{樣品 OD 值} / \text{控制組 OD 值}) \times 100$$

微脂粒 (liposome) 氧化作用之抑制

參考 Yen 等(2005)之方法。典型製備微脂粒的脂質分子是卵磷脂 (Lecithin)，並利用 TBA (thiobarbituric acid) 之呈色法 (測定 532 nm 之吸光值) 來測定脂質過氧化之產物 (malondialdehyde, MDA)。取 300 mg 之卵磷脂，加入 30 ml 之 20 mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 緩衝溶液 (pH 7.4)，以超音波震盪成均質懸浮液，製備成微脂粒溶液 (10 mg/ml)。反應液中含有微脂粒懸浮液 (0.1 ml)、400 μ M $FeCl_3$ (0.1 ml)、400 μ M ascorbic acid (0.1 ml)、20 mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 緩衝溶液 (pH 7.4, 0.1 ml) 及加入 0.1 ml 不同濃度樣品，及不添加樣品之空白試驗，並同時將這些反應液置於 37°C 2 小時後，加入 10 mg/ml TBQH 10 μ l、TCA-TBA-HCL 0.2 ml，於 100°C 水浴加熱 15

分鐘，冷卻後測 532 nm 吸光值。

清除 nitric oxide 能力之測定

參考 Duh 等(2004)之方法。以 PBS 配製 12.5 mM 之 SNP，SNP 在加入 PBS 後震盪。取 0.12 mL 樣品 加入 0.08 mL SNP 溶液，於室溫下反應 30 分鐘後，加入 0.02 mL 1 % sulfanilamide 之 5 % H_3PO_4 溶液及 0.02 mL 0.1 % N-(1-naphthyl) - ethylenediamine dihydrochloride 水溶液，混勻後震盪 5 分鐘，以 ELISA reader 測 550 nm 之吸光值。吸光值越低表示清除能力越強。

細胞生長培養液製備與細胞之培養

取 DMEM 培養基粉末，先以 900 mL 二次水攪拌溶解後，調整 pH 為 7.1-7.2，補二次水至 940 mL，在無菌操作台中加入 10 mL 三合一抗生素，再以 0.22 μ m filter 過濾到一公升血清瓶中，儲存於 4°C 冰箱中備用。使用前加入 100 mL Fetal bovine serum (FBS) 來進行細胞培養。老鼠巨噬細胞培養於 DMEM 培養液，其中含有 10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)，0.45 % glucose、0.37 % $NaHCO_3$ 、pencillin 100 units/ml、streptomycin 100 μ g/ml 和 0.03% L-glutamine。細胞在含有 5% CO_2 及飽和水蒸氣中的 37°C 恆溫培養箱中培養，當細胞生長至 10^7 cells/ml (約 85% confluence) 時便用來進行生理活性之各項實驗。

細胞存活率之試驗

參考 Dirsch 等(1998)之方法。添加有無試驗物與細胞共同處理下，作用 20 小時。100 μ l 5mg/ml 的 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 溶液，反應 45 分鐘後，移除上層液，再加入 250 μ l DMSO，於

暗室下反應至少 2 小時以上，以 SPECTRA microplate reader (SLT-Labinstruments) 測定 570nm 下之吸光值。以控制組 (不添加樣品) 的光學密度值 (O.D.) 為 100% 表示。

細胞內一氧化氮 (NO) 生成之測定

參考 Shen et al. (2002) 之方法並加以修飾使用。依實驗設計分別加入不同濃度酵素水解物之膠過濾區分物與 LPS (100 ng/ml) 處理 24 小時，控制組則不添加任何酵素水解物之膠過濾區分物。處理完後，根據 Griess reaction 原理進行亞硝酸鹽的定量。取 100 μ l 的上層液，加入 100 μ l Griess reagent (包括 1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid 和 0.1% naphthylenediamine dihydrochloride in water) 混合均勻後，以 enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (ELISA reader)，測其 550nm 之吸光值。

結果與討論

本研究採用由 *Aspergillus sp.*、*Rhizopus sp.* 及 *Bacillus sp.* 等三種不同種類之微生物所生產之商業蛋白酶，水解經脫脂及其他前處理過之米糠，以製備具生理活性肽之酵素水解物及其區分物。結果顯示，本研究所使用的三種商業蛋白酶 A、R 與 B (A 是指源自於 *Aspergillus sp.* 之蛋白酶；R 是指源自於 *Rhizopus sp.* 之蛋白酶；B 是指源自於 *Bacillus sp.* 之蛋白酶) 水解經脫脂及其他前處理過之米糠所得之水解物及其區分物，其清除 DPPH 之能力不佳，在樣品濃度 400ppm 下，清除率幾乎全部皆低於 25% (表 1 至表 3)。反觀水解物及其區分物清除 $ABTS^+$ 之能力，在樣品濃度 400ppm 下， $ABTS^+$ 清除率大都有不錯的表現，尤其是蛋白酶 A 所製得之水解物，再分別經 RO 水及 50% EtOH 萃取之區分物及蛋白酶 B 所製得之水解物經 95% EtOH

萃取之區分物（表 1 至表 3）。DPPH 清除能力不好但 ABTS⁺清除能力佳之原因可能是因為 DPPH 是一種烷基自由基，比較偏脂溶性，而本研究之蛋白水解物及其區分物是比較屬於水溶性，因此其對於 DPPH 之作用亦相對較弱。

若比較不同蛋白酶水解所得之水解物及其區分物清除 DPPH 與 ABTS⁺之能力則發現，本計畫所使用的三種商業蛋白酶水解脫脂米糠所得之水解物及其區分物彼此之間並無顯著差異，顯然地，蛋白酶專一性之不同並無造成其清除 DPPH 與 ABTS⁺之能力的差異。

表一：Aspergillus sp.之蛋白酶水解物及其區分物之各項抗氧化力評估結果

樣品	濃度 (ppm)	DPPH 抑制率 (%)	TEAC 抑制率 (%)	亞鐵離子螯合率 (%)	還原力 (相當於 Vit. C 的含量; ppm)	微脂粒氧化抑制率 (%)
Crude	50	N/D	N/D	3.42±0.37	1.22±0.29	3.06±0.89
	100	N/D	N/D	16.37±0.37	1.73±0.14	4.34±0.96
	200	N/D	N/D	25.91±0.80	3.63±0.09	8.15±0.71
	400	21.62%±0.90	78.62%±1.13	42.23±0.35	5.78±0.26	15.48±0.62
H ₂ O	50	N/D	N/D	1.28%±0.36	0.57±0.22	1.54±0.24
	100	N/D	N/D	3.17±0.76	1.90±0.27	1.57±0.24
	200	N/D	N/D	9.18±0.76	3.55±0.14	1.91±0.18
	400	19.37%±0.20	85.46%±0.50	22.87±0.92	5.65±0.56	3.15±0.37
50%EtOH	50	N/D	N/D	4.08±0.46	1.50±0.29	1.03±0.27
	100	N/D	N/D	7.97±0.76	2.71±0.05	3.38±0.18
	200	N/D	N/D	13.32±0.66	4.83±0.41	4.91±0.57
	400	23.05%±1.16	90.58%±0.36	19.40±0.64	9.48±0.20	8.38±0.09
95%EtOH	50	N/D	N/D	2.32±0.47	1.65±1.37	2.46±0.15
	100	N/D	N/D	11.25±0.71	2.30±0.15	2.89±0.21
	200	N/D	N/D	13.75±0.71	4.68±0.28	2.83±0.40
	400	8.03%±0.55	55.86%±2.24	19.23±0.55	7.82±0.17	5.28±0.35

註：Crude 是蛋白酶水解物；H₂O, 50%EtOH 及 95%EtOH 分別表示水解物經其處理而溶解之區分物；結果以 Mean ± SD (n=3)表示之。

N/D 是指樣品在該濃度下未做評估測試。

表二：Rhizopus sp.之蛋白酶水解物及其區分物之各項抗氧化力評估結果

樣品	濃度 (ppm)	DPPH 抑制率 (%)	TEAC 抑制率 (%)	亞鐵離子螯合率 (%)	還原力 (相當於 Vit. C 的含量; ppm)	微脂粒氧化抑制率 (%)
Crude	50	N/D	N/D	18.20±0.88	0±0.18	3.26±0.48
	100	N/D	N/D	35.51±0.47	0.49±0.04	4.21±0.67
	200	N/D	N/D	51.65±0.91	1.75±0.10	6.36±0.25

	400	18.589%±0.55	72.87%±0.53	79.09±0.44	3.15±0.16	23.18±1.81
H ₂ O	50	N/D	N/D	22.67±0.42	1.45±0.09	2.37±0.52
	100	N/D	N/D	32.06±0.28	2.80±0.25	6.98±0.68
	200	N/D	N/D	52.18±0.63	4.50±0.28	11.89±0.68
	400	14.77%±0.75	77.64%±1.76	80.30±0.56	7.62±0.30	36.69±2.20
50%EtOH	50	N/D	N/D	2.43±0.52	1.92±0.07	20.97±0.20
	100	N/D	N/D	10.49±0.68	3.35±0.22	24.07±0.69
	200	N/D	N/D	18.16±0.52	5.56±0.19	27.87±0.36
	400	15.74%±1.39	76.21%±0.30	53.47±0.61	8.89±0.27	29.61±0.78
95%EtOH	50	N/D	N/D	14.77±1.26	0.91±0.42	8.30±1.33
	100	N/D	N/D	21.32±0.55	2.11±0.03	16.33±0.73
	200	N/D	N/D	26.37±0.68	4.09±0.11	20.88±1.52
	400	9.03%±0.63	31.90%±0.90	43.30±0.55	7.06±0.18	25.17±4.68

註：所有註解同表一。

表三：Bacillus sp.之蛋白酶水解物及其區分物之各項抗氧化力評估結果

樣品	濃度 (ppm)	DPPH 抑制率 (%)	TEAC 抑制率 (%)	亞鐵離子螯合率 (%)	還原力 (相當於 Vit. C 的含量; ppm)	微脂粒氧化抑制率 (%)
Crude	50	N/D	N/D	7.24±0.53	1.18±0.86	4.14±0.86
	100	N/D	N/D	23.97±0.67	1.88±0.28	6.46±0.72
	200	N/D	N/D	43.99±0.81	3.91±0.37	8.63±1.88
	400	17.67%±0.98	76.26%±2.18	69.67±0.62	6.74±1.60	10.79±0.63
H ₂ O	50	N/D	N/D	21.88±0.92	0.41±0.14	0.00±0.00
	100	N/D	N/D	31.15±0.38	0.68±0.64	1.29±0.17
	200	N/D	N/D	51.88±0.56	1.52±0.06	3.89±0.95
	400	19.87%±1.68	81.51%±1.24	78.18±0.48	1.59±0.32	5.90±0.39
50%EtOH	50	N/D	N/D	3.78±0.59	0.55±0.18	1.03±0.27
	100	N/D	N/D	11.28±0.52	0.56±0.07	3.38±0.18
	200	N/D	N/D	20.19±0.59	3.11±0.20	4.91±0.57
	400	14.23%±0.34	71.12%±1.05	55.95±0.52	4.98±0.27	8.38±0.09
95%EtOH	50	N/D	N/D	10.29±0.62	0.89±0.18	1.87±0.12
	100	N/D	N/D	14.72±0.54	2.90±0.12	3.90±0.20
	200	N/D	N/D	21.81±0.43	4.91±0.38	5.24±0.15
	400	21.97%±1.70	86.99%±0.34	37.97±1.99	7.30±0.20	11.21±0.87

註：所有註解同表一。

至於亞鐵離子螯合能力方面，蛋白酶 A 水解物在樣品濃度 50~200ppm 之螯合能力表

現不佳，但樣品濃度 400ppm 時，其螯合能力尚可（約 42.2%），此值相當於 EDTA 在相同

條件且濃度為 8ppm 之螯合能力 (Data not shown)。反觀蛋白酶 A 水解物之各種區分物，在所有測試濃度下，其亞鐵離子螯合能力表現都不佳 (表 1)。另一方面，蛋白酶 R 及 B 水解物及其區分物，雖然在樣品濃度 50~200ppm 時，亞鐵離子螯合能力表現不理想，但在樣品濃度 400ppm 時，其螯合能力表現皆甚佳，除了 95%EtOH 之區分物之外 (表 2 及表 3)。這其中又以蛋白酶 R 之水解物及其 RO 水區分物表現最佳，螯合率分別為 79.1%及 80.3%，約相當於 EDTA 在相同條件且濃度為 15~16ppm 之螯合能力 (Data not shown)。同時，蛋白酶 R 及 B 水解物之 RO 水區分物，其螯合能力皆比其他區分物強。顯然地，蛋白酶專一性之不同造成其亞鐵離子螯合能力的差異。因此若要使用米糠製備具較佳亞鐵離子螯合能力之蛋白酶水解物，則蛋白酶 R 比蛋白酶 A 與 B 適合。

在還原力的表現方面，本計畫係採測試樣品在相同條件下相當於多少濃度之抗壞血酸的還原力。由結果得知，所有蛋白酶水解物及其區分物的還原力表現皆非常弱，即使樣品濃度高達 400ppm，其還原力皆低於 10ppm 抗壞血酸於相同條件下所表現之還原力 (表 1 至表 3)。至於抑制微脂粒氧化方面，除了蛋白酶 R 水解物之 RO 水區分物在 400ppm 時，具有 36.7%抑制率外，其餘樣品之抑制率皆低於 30%。在相同條件下，8ppm 之生育酚即表現出 31%抑制率 (Data not shown)，由此可清楚得知，所有水解物及其區分物抑制微脂粒氧化的表現不佳。

綜觀表一至表三之結果可知，本研究所製備的水解物及其區分物在清除 ABTS⁺· 的效果，整體而言，表現較佳，蛋白酶 R 及 B 水解物及其 RO 水區分物在亞鐵離子螯合能力的表現亦相當不錯。至於其餘抗氧化能力的表現，則不甚理想。

許多研究顯示，免疫細胞在發炎反應期間受到刺激及活化，導致引發或活化 inducible nitric oxide synthase (iNOS)，而 iNOS 會催化 NO 之生成。因此，本研究即藉由刺激動物巨噬細胞誘發發炎反應，並加入待評估之試樣培養一段時間後，分析比較實驗組與控制組 NO 之濃度，以此評估受測試樣是否具有抗發炎活性。此項結果整理於圖 1 至圖 3。

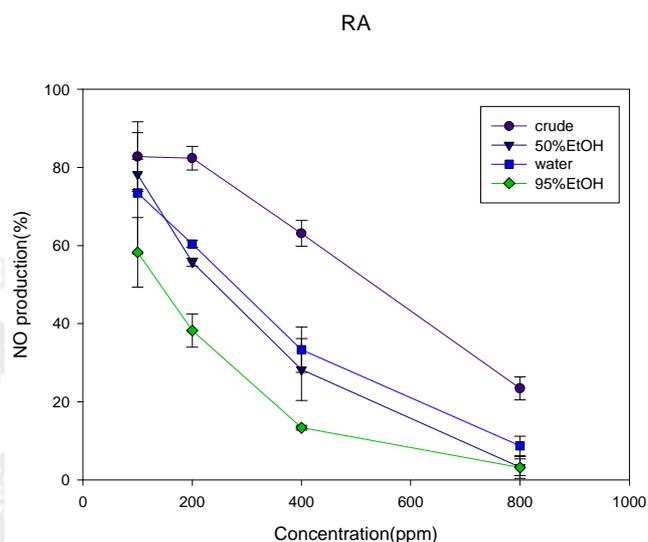


圖 1. 脫脂米糠經 *Aspergillus sp.* 之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物抑制經 LPS 處理之細胞生成一氧化氮的能力；以控制組之 NO 生成量為 100% 表示之；橫軸之數值表示樣品濃度；Crude 是蛋白酶水解物；H₂O, 50%EtOH 及 95%EtOH 分別表示水解物經其處理而溶解之區分物。

由結果可發現，除了蛋白酶 B 之外，水解物經 95%EtOH 萃取所得之區分物，表現出較佳之抑制細胞內 NO 生成的能力，尤其是蛋白酶 R 水解物經 95%EtOH 萃取所得之區分物，在樣品濃度 100ppm 下，即表現出良好之抑制能力，而蛋白酶 A 水解物經 95%EtOH 萃取所得之區分物，需要在樣品濃度 400ppm 下，才能表現出良好之抑制能力。

蛋白酶 A 與 R 之水解物及其區分物在抑制細胞內 NO 生成能力之趨勢上，只表現出些微差異 (圖 1 vs 圖 2)，然而蛋白酶 B 之水解物及其區分物卻表現出與前述之水解物及其區分物迥然不同之趨勢，其水解物及區

分物彼此之間在抑制 NO 生成能力方面，並沒有明顯差異（圖 3）。由以上結果可發現，不同蛋白酶具有不同之水解專一性，導致水解物所含之胜肽種類與特性不同，使得其表現出不同之抑制 NO 生成能力。

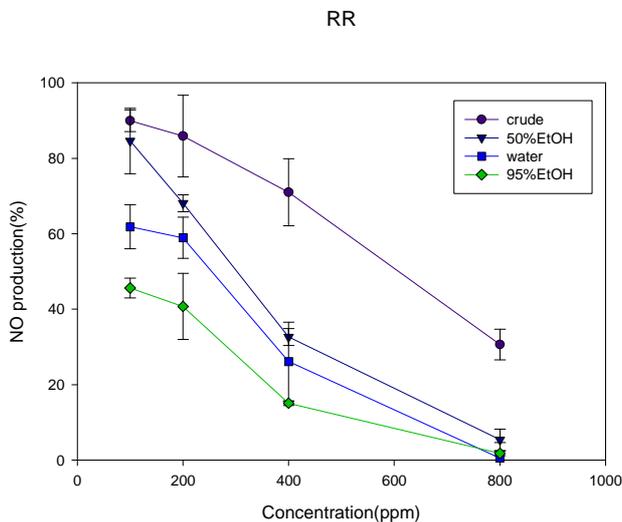


圖 2. 脫脂米糠經 *Rhizopus sp.* 之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物抑制經 LPS 處理之細胞生成一氧化氮的能力；其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

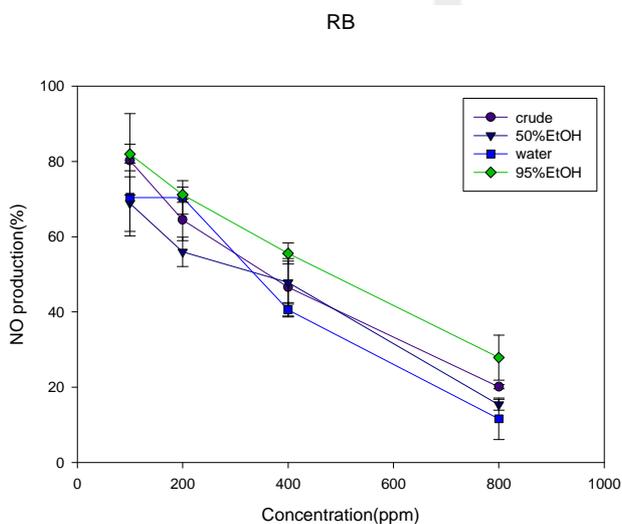


圖 3. 脫脂米糠經 *Bacillus sp.* 之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物抑制經 LPS 處理之細胞生成一氧化氮的能力；其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

由於抑制細胞內 NO 生成能力可能來自水解物或區分物誘發細胞生理變化所導致，而非直接受其清除 NO 能力之影響。因此，本計畫亦進行水解物及其區分物試管外清除 NO 能力之評估試驗（SNP 試驗）。由試驗

結果可得知，本研究所製備之水解物及其區分物確實具有清除 NO 之能力（圖 4 至圖 6），且其能力隨樣品濃度增加而增加。除了蛋白酶 B 之外，水解物經 95%EtOH 萃取所得之區分物，表現出較弱之清除 NO 的能力，尤其是蛋白酶 A 水解物經 95%EtOH 萃取所得之區分物。此結果與細胞試驗結果相異，可能是因為分子量大小分佈不同影響其進入細胞的比例（一般而言，95%EtOH 區分物內所含小分子 peptides 的量較水解物及其他區分物多）。此外，蛋白酶 B 之水解物及其區分物彼此之間在清除 NO 的能力方面，並沒有明顯差異（圖 6），且表現出與其他蛋白酶水解物及其區分物迥然不同之趨勢（圖 4 至圖 6），可見蛋白酶水解專一性之不同對於其清除 NO 能力之影響，且此項結果與細胞試驗結果一致。

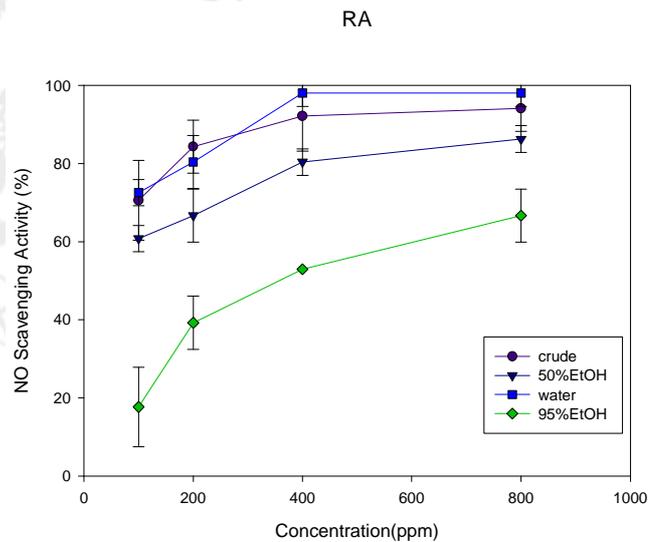


圖 4. 脫脂米糠經 *Aspergillus sp.* 之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物清除一氧化氮的能力；其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

本研究在 TEAC 抗氧化力試驗及 SNP 試驗中，RA 及 RR 組之 95%EtOH 區分物清除 ABTS⁺ 及 NO 能力比同組其他區分物與水解物差甚多（表 1 與表 2 及圖 4 與圖 5），但其抑制細胞內 NO 生成能力並沒有相對應地減弱，甚至表現得比較強（圖 1 及圖 2）。這可能因為 TEAC 抗氧化力及 SNP 試驗是試管內試驗，不受分子量大小之影響，而抑制

細胞內 NO 生成能力是細胞試驗，在此情況下，水解物或其區分物所含 peptides 分子量的大小，會影響其是否被細胞吸收進入胞內而產生作用，進而影響其抑制 NO 生成之能力。一般而言，分子量較小的 peptides 較能溶於 95%EtOH 溶液，因此使得其區分物內所含小分子 peptides 的量較水解物及其他區分物多，導致雖然其試管試驗結果比同組其他區分物與水解物差甚多，但其抑制細胞內 NO 生成能力並沒有相對應地減弱，甚至表現得比較強。

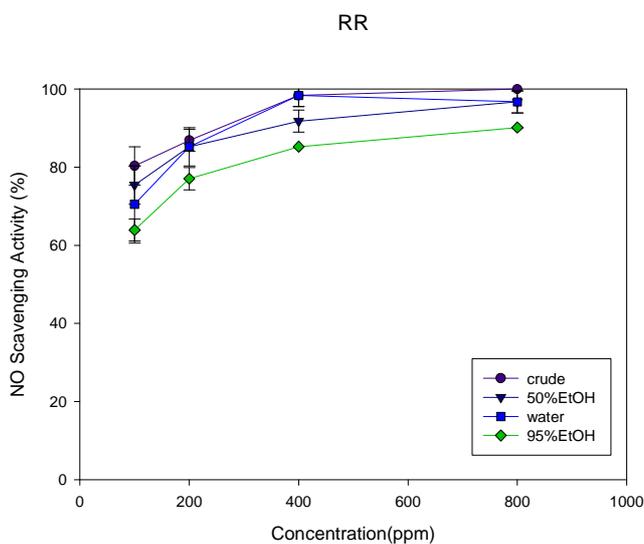


圖 5 脫脂米糠經 *Rhizopus sp.* 之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物清除一氧化氮的能力；其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

為了確認細胞內 NO 生成量降低是受到蛋白酶水解物及其區分物的抑制作用，而不是因為其對細胞具有毒性而導致之結果，本研究同時進行細胞毒性試驗，其結果整理於表四。表中大多數水解物及其區分物在濃度 800ppm 以下與細胞一起培養後，其存活率皆高於 80%。由此可見，本研究所製備之蛋白

酶水解物及其區分物對細胞不具毒性，也因此確認其具有抑制細胞內 NO 生成之能力。

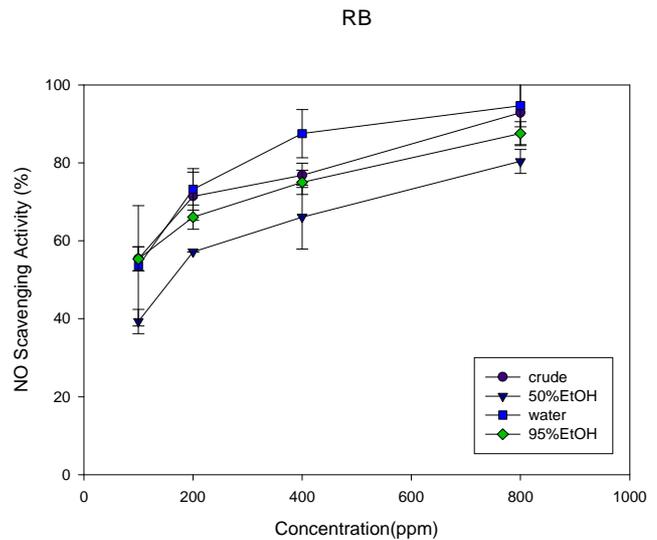


圖 6. 脫脂米糠經 *Bacillus sp.* 之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物清除一氧化氮的能力；其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

結論

本研究所製備之蛋白酶水解物及其區分物在所有抗氧化能力及清除 NO 能力之評估項目中，只具有良好之清除 ABTS⁺ 及抑制 NO (包含試管與細胞試驗) 生成的能力。這其中，以蛋白酶 R 水解物經 95%EtOH 萃取之區分物，表現出最佳之抑制細胞內 NO 生成之能力。至於蛋白酶水解專一性之不同對於所評估抗氧化能力之影響，大多不明顯，然而在清除 ABTS⁺ 及抑制 NO (包含試管與細胞試驗) 生成的能力方面，則受到蛋白酶水解專一性之不同而有顯著影響。同時，細胞毒性試驗結果確認本研究所製備之蛋白酶水解物及其區分物對細胞不具毒性。

參考文獻

- 范繼宗。納豆對活性氧之抗致突變性及抗氧化性。碩士論文，國立台灣大學食品科技研究所，台北，台灣(2005)。
- 徐永鑫。芝麻粕中 Lignans 及 glycosides 之分析及抗氧化性探討。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。台北，台灣(2001)。

表四：脫脂米糠蛋白酶水解物及其區分物之細胞毒性試驗

	RR-95%EtOH		RR-50%EtOH		RR-water		RR-Crude	
	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD
control	99.77	2.45	99.74	1.94	100.44	8.36	83.20	4.81
LPS	94.98	1.71	108.72	8.31	107.54	4.10	110.20	1.22
100ppm	95.34	2.28	90.92	7.18	107.32	6.08	93.33	3.66
200ppm	92.15	3.04	98.82	5.53	112.24	9.02	97.52	1.50
400ppm	97.08	4.73	95.49	19.44	100.11	9.86	98.76	0.49
800ppm	98.31	0.68	91.64	5.47	94.92	5.42	105.03	6.34
100ppm+LPS	92.01	1.50	109.44	9.83	118.80	3.57	119.22	11.10
200ppm+LPS	93.74	6.18	95.85	8.85	114.26	5.49	112.55	1.19
400ppm+LPS	95.25	3.27	106.67	8.38	94.10	6.51	91.63	1.20
800ppm+LPS	94.79	1.75	103.33	6.23	90.82	1.73	100.00	6.93
	RA-95%EtOH		RA-50%EtOH		RA-water		RA-Crude	
	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD
control	99.77	2.45	99.74	1.94	100.44	8.36	99.61	6.34
LPS	94.98	1.71	108.72	8.31	107.54	4.10	108.17	6.40
100ppm	91.55	1.60	102.05	13.50	91.97	6.07	90.98	4.56
200ppm	98.58	2.25	93.18	9.50	93.01	2.61	89.87	10.69
400ppm	91.28	4.35	105.85	6.43	80.82	7.17	90.33	9.49
800ppm	92.97	5.16	77.69	2.17	86.01	4.35	88.50	6.47
100ppm+LPS	83.97	2.85	100.87	4.09	99.18	6.31	91.57	5.85
200ppm+LPS	80.37	8.78	95.44	4.85	97.87	4.67	94.90	5.34
400ppm+LPS	83.84	1.03	100.82	14.37	78.58	6.60	106.01	11.52
800ppm+LPS	78.49	2.86	107.44	1.09	87.65	1.94	91.76	5.04
	RB-95%EtOH		RB-50%EtOH		RB-water		RB-Crude	
	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD
control	100.25	6.64	99.45	15.64	99.94	24.42	99.45	15.64
LPS	88.38	6.62	100.05	12.12	94.94	11.91	100.05	12.12
100ppm	97.50	7.90	109.18	4.57	84.33	15.45	81.69	4.17
200ppm	108.58	13.71	112.24	4.97	86.50	10.58	76.28	2.59
400ppm	95.64	7.10	90.82	5.80	92.50	5.81	83.01	9.89
800ppm	99.95	11.32	94.04	3.78	96.67	5.51	100.27	15.31
100ppm+LPS	112.65	10.23	95.30	14.58	98.61	11.21	105.74	3.76
200ppm+LPS	115.20	5.44	110.87	2.50	99.33	17.54	115.63	9.70
400ppm+LPS	119.95	1.20	93.88	10.33	111.39	8.33	111.15	7.89
800ppm+LPS	130.29	4.19	95.03	7.78	110.61	9.92	115.85	6.99

註：LPS 是指 Lipo polysaccharide；Crude 是蛋白酶水解物；water, 50%EtOH 及 95%EtOH 分別表示水解物經其處理而溶解之區分物；SD 是指標準偏差；RR 是前處理後之脫脂米糠經 *Rhizopus sp.* 之蛋白酶水解之水解物；RA 是前處理後之脫脂米糠經 *Aspergillus sp.* 之蛋白酶水解之水解物；RB 是前處理後之脫脂米糠經 *Bacillus sp.* 之蛋白酶水解之水解物。

陳佩蓉。芝麻及其成分物質對動脈粥樣硬化危險因子之影響。輔仁大學食品營養學系(所) 博士論文。台北，台灣(2005)。

- Amarowicz, R. and Shahidi, F. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolyzates. *Food Chemistry*, 58: 355-359 (1997).
- Astawan, M. Wahyuni, M. Yasuhara, T. Yamada, K. Tadokoro, T. and Maekawa, A. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59: 425-429 (1995).
- Balaszka, B., & Troszynska, A. (1998). Total antioxidant activity of evening primrose (*Oenothera paradoxa*) cake extract measured in vitro by liposome model and murine L1210 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3558±3563.
- Bandyopadhyay K. and Ghosh S.: Preparation and Characterization of Papain-Modified Sesame (*Sesamum indicum* L.) Protein Isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6854-6857 (2002)
- Barbieri, S.S. Cavalca, V. Eligini, S. Brambilla, M. Caiani, A. Tremoli, E. and Colli, S. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanism. *Free Radic. Biol. Med.*, 37: 156-165 (2004)
- Behrend, L. Henderson, G. and Zwacka, R.M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.*, 31: 1441-1444 (2003)
- Bishov, S.J. and Henick, A.S. Antioxidant effect of protein hydrolyzates in freeze-dried model system. *J. Food Sci.*, 40: 345-348 (1975).
- Chen, H. M. Murumoto, K. Yamauchi, F. and Nokihara, K.: Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 2619-2623 (1996).
- Chun, K.S. Cha, H.H. Shin, J.W. Na, H.K. Park, K.K. Chung, W.Y. and Surh, Y.J. Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF- κ B. *Carcinogenesis*, 25: 445-454 (2004)
- Dirsch, V.M., Kiemer, A.K., Wagner, H., Vollmar, A.M. Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis*. 1998, 139, 333-339.
- Gibbs, B. Zougman, A. Masse, R. and Mulligan, C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37: 123-131 (2004).
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasahara, T., and Okuda, T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: Their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36: 2090-2097 (1988).
- Hesseltine, C. Tempeh: A mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Critical Reviews in Microbiology*, 19: 137-188 (1983).
- Lee, S.J. Ryu, S.H. Lee, Y.S. Song, Y.S. and Moon, G.S. Protective effect of soybean sauce and melanoidin on lipid oxidation in rats fed high PUFA oils. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 32: 913-920 (2003)
- Lee, Y. S. Noguchi, T. and Naito, H.: Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acid mixture: the role of casein phosphopeptides. *Br. J. Nutr.*, 49: 67-76 (1983).
- Lin, M. T. Park, J. W. and Morrissey, M. T. Recovered protein and reconditioned water from surimi processing waste. *J. Food Sci.*, 60: 4-9 (1995).
- Linder, M. Fanni, J. Parmentier, M. Sergent, M. and Phan-tan-luu, R. Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci.*, 60: 949 (1995).
- Loukas, S. Varoucha, D. Zioudrou, C. Streaty, R.A. and Klee, W.A. Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins. *Biochemistry*, 22: 4567- 4573 (1983).
- Maruyama, S. Nakagomi, K. Tomizuka, N. and Suzuki, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolyzate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 49: 1405-1409 (1985).
- Moure, A. Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C. Natural antioxidants from residual sources: A Review. *Food Chemistry* 72:145-171 (2001)

- Okamoto, A. Hanagata, H. Kawamura, Y. and Yanagida, F. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Foods Human Nutrition*, 47:39-47 (1995).
- Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y. and Koizumi, Y. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59: 1147–1149 (1995)
- Rose, J.W. Hill, K.E. Watt, H.E. and Carlson, N.G. Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the multiple sclerosis lesion. *J. Neuroimmunol.*, 149: 40-49 (2004)
- Schimmel, M. and Bauer, G. Proapoptotic and redox state-related signaling of reactive oxygen species generated by transformed fibroblasts. *Oncogene*, 21: 5886-5889 (2002)
- Shen, S.C. Lee, W.R. Lin, H.Y. Huang, H.C. Ko, C.H. Yang, L.L. and Chen, Y.C. In vitro and in vivo inhibitory activity of rutin, wogonin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur. J. Pharmacol.*, 446: 187-194 (2002)
- Tsuge, N. Eikawa, Y. Nomura, Y. Yamamoto, M. and Sugisawa, K. Antioxidative activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg-white albumin. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 65: 1635-1641 (1991).
- Yashiro, A. Oda, S. and Sugano, M. Hypocholesterolemic effect of soybean protein in rats and mice after peptic digestion. *J. Nutr.*, 115: 1325-1336 (1985).
- Yu, J. Ahmedna M. and Goktepe, I: Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing, *Food Chemistry*, 103:121–129 (2007)
- Zioudrou, C. Streaty, R.A. and Klee, W.A. Opioid peptides derived from food proteins. *J. Bio. Chem.*, 254: 2446-2449 (1979).

