

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

利用酵素水解花生粕與芝麻粕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：CN9739

執行期間：97年7月1日至97年12月31日

計畫主持人：林國民

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：食品科技系

中華民國98年2月27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，水解經脫脂處理及其他前處理之花生粕與芝麻粕，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，蛋白酶水解物及其區分物清除 DPPH 之能力不佳，在樣品濃度 400ppm 下，清除率幾乎全部皆低於 20%，但水解物及其部分區分物具有良好之清除 ABTS⁺ 及抑制細胞 NO 生成的能力。在抗氧化能力上，蛋白酶 B 水解所得之水解物及其區分物表現較蛋白酶 A 及 R 佳，而後二者彼此之間並無明顯差異。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 NO 生成的能力，尤其是芝麻粕之蛋白酶 A 水解物經 95%EtOH 萃取所得之區分物，在樣品濃度 100ppm 下，即表現出非常良好之抑制能力。此外，蛋白質原料來源之差異性，對於多數水解物及其區分物清除 DPPH 與 ABTS⁺ 之能力，無明顯影響。然而蛋白酶水解專一性之不同，對於所評估之抗氧化能力卻有明顯影響。至於抑制細胞 NO 生成之能力，則受到蛋白質原料及蛋白酶水解專一性之不同而有顯著影響。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：花生粕、芝麻粕、酵素水解物、抗氧化、抗發炎

前言

近年來，許多的研究報告顯示，利用蛋白酶將食品蛋白質水解，所得到的蛋白質水解物已被證實具有各種不同的生理活性，而且具有生理活性的胜肽類物質已在許多蛋白質消化液中被確認出來 (Zioudrou et al., 1979; Loukas et al., 1983)，如從牛奶和黃豆中所分離出的功能性胜肽類物質，已被證實具有降低血壓 (Lee et al., 1983)、調節血清中膽固醇 (Yashiro et al., 1985)、促進鈣的吸收 (Astawan et al., 1995)、抗氧

化活性 (Amarowicz and Shahiai, 1997)、抑制油脂氧化作用 (Bishov and Henick, 1975) 等功能性。

此外，以大豆為主原料之傳統釀造食品，例如：納豆、醬油、味噌和天貝等，含有提升生理機能之胜肽類物質的文獻報告，亦常引起研究者的注意，而這些胜肽類物質至少有一部分，甚至是大部分，是由於微生物的酵素作用所產生 (范, 2005; Hesseltine, 1983; Okamoto et al., 1995; Lee et al., 2003; Matsuo & Takeuchi, 2003; Gibbs et al., 2004)。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，以期望製得具較佳抗氧化能力之胜肽類物質。至於原料方面，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，但相較之下，以花生或芝麻蛋白質 (尤其是後者) 在這方面的研究則顯得非常不足。而生理活性評估之研究，則以抗氧化活性為首，其他項目例如具 ACE 抑制活性達到抗高血壓作用之研究探討，為數亦不少。

花生粕主要來自於製造花生油所產生之副產物，而全球花生年產量超過 3 千萬公噸，在所有油籽作物產量中排第四或五位(美國農業部 USDA 統計資料)，在台灣每年也有約四至五萬公噸的花生產量，年產值約 23~36 億，為台灣重要雜糧之一(農委會農糧署資料庫 2006)。經過油脂提取後，花生粕之蛋白質含量非常高，約 50% 左右 (USDA-NAL 2005; Yu et al., 2007)，可謂相當豐富之蛋白質原料來源之一。芝麻全球年產量約二百至三百萬公噸，在台灣每年產量約四百多公噸，與花生相較，產量少很多(陳, 2005; 農委會農糧署資料庫 2006)。然而脫脂後之芝麻粕，其蛋白質含量相當高，約為 40~50% (Bandyopadhyay and Ghosh, 2002)，目前主要利用方式與花生粕及其它豆粕一樣，當做動物或水產飼料之基質，非常可惜。

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。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花生粕及芝麻粕蛋白質水解物及其區分物，並先以化學試驗評估其抗氧化活性、再以動物細胞試驗評估其抗發炎活性，以了解花生粕及芝麻粕供作機能性食品基質之潛力。

材料與方法

一、材料

花生粕及芝麻粕購自傳統植物油壓榨工廠，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

花生粕及芝麻粕原料前處理

由於原料花生粕及芝麻粕來自於傳統植物油壓榨工廠，所以殘油量頗高，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。除了油脂之外，原料之醣類含量亦不少，約為 20~30% (Yu et al., 2007; Bandyopadhyay and Ghosh, 2002)，而這其中又以小分子醣類居多，尤其是花生粕。另外，此二種原料亦含有少量礦物質及微量生理活性物質，例如花生粕可能含有多酚類物質，而芝麻粕可能含有多酚類物質及水溶性芝麻素。水溶性芝麻素主要是木質酚(lignan)之 glucoside 型態(徐, 2001)，經油脂提製過後殘留於芝麻粕。上述物質在眾多文獻報告中，證實具有多種生理活性功能。為避免上述物質增加後續樣品製備與分離純化之困難度、導致其活性胜肽含量不足及影響其生理活性評估(不論是增強或減弱其活性表現)，酵素水解之前，脫脂原料需先進行 95% 乙醇及水洗處理。首先將脫脂原料加入於 5 倍量 95% 乙醇，攪拌 60 分鐘，去除過濾液之後，以同樣方式重複清洗二次並風乾後，再以蒸餾水清洗，方法如上述。水洗後，置於 60°C 烘箱內烘乾。前處理後之花生粕及芝麻粕貯存於冷凍庫備用。

酵素水解物之製備

分別取 10g 前處理後之花生粕及芝麻粕，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 6 hrs。水解後以 5,000 ×g 離心 10 min，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花生粕及芝麻粕酵素水解物各2g，以20mL 95% EtOH 溶液溶解後，以5,000 ×g 離心 10 min，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20mL 50% EtOH 溶液溶解後，以5,000 ×g 離心 10 min，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20mL RO水溶解後，以5,000 ×g 離心 10 min，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。常見的抗氧化劑是藉由提供氫原子來清除脂質過氧化物自由基，進而達到中斷氧化連鎖反應之進行。在抗氧化的研究上，通常使用 DPPH (C₁₈H₁₂N₆O₅) 來評估抗氧化劑的供氫能力。DPPH 是一種相當安定的自由基，其甲醇溶液在 517 nm 下有強吸收光譜。因此在 517 nm 的吸光值越低即表示抗氧化劑的供氫能力越強。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。

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

總抗氧力 (TEAC) 之測定

依 Miller(1995)之方法並作部分修飾。將相同體積之 (0.25ml) ABTS (100 μ M)、peroxidase (4.4 unit/ml) 以及 H₂O₂ (50 μ M) 混合均勻後，加入 0.25ml 經冷凍乾燥之花生粕及芝麻粕酵素水解物及其區分物 (0.2mg/ml)，反應 10 分鐘後，以分光光度計測 734nm 之吸光值。以抗氧化劑 Trolox 作為標準曲線，作為測試樣品清除 ABTS⁺ 陽離子自由基能力的標準值。ABTS⁺ scavenging effect % = $[1 - (A_{\text{sample at 734 nm}} - A_{\text{blank at 734 nm}}) / (A_{\text{control at 734 nm}} - A_{\text{blank at 734 nm}})] \times 100$ 。

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% NaHCO₃、pencillin 100 units/ml、streptomycin 100 μ g/ml 和 0.03% L-glutamine。細胞在含有 5% CO₂ 及飽和水蒸氣中的 37°C 恆溫培養箱中培養，當細胞生長至 10⁷ cells/ml (約 85% confluence) 時使用來進行評估生理活性之實驗。

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。之後，加入 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。由於 NO 非常不穩定，在細胞內生成後，會快速氧化成亞硝酸鹽 (Nitrite) 和硝酸鹽 (Nitrate)。因此，利用測定亞硝酸鹽含量，當作一氧化氮 (NO) 生成之指標。於 24well 盤中接種老鼠巨噬細胞 2.5 × 10⁶ 個，37°C 培養 12 小時後，依實驗設計分別加入不同濃度花生粕及芝麻粕酵素水解物及其區分物與 LPS (100 ng/ml) 處理 24 小時，控制組則不添加任何水解物及其區分物。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% sulphanimide in 5% phosphoric acid 和 0.1% naphthylenediamide 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，水解經前處理過之花生粕與芝麻粕，以製備具生理活性胜肽之酵素水解物及其區分物。選擇 *Aspergillus sp.* 及 *Rhizopus sp.* 是根據前述文獻提及傳統釀造食品（例如：醬油、味噌與天貝）所常使用之菌種。至於選擇 *Bacillus sp.* 是依據納豆是由俗稱納豆菌所發酵產生，而牠是枯草桿菌 (*Bacillus Subtilis*) 之類源菌。因此，期望利用這三類微生物菌種所產製之商業蛋白酶水解蛋白質原料而能製得具較佳及多種生理活性胜肽之水解物。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) 水解經前處理之花生粕與芝麻粕的水解物及其區分物，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 20% (圖 1 至圖 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 與 R 所製得之水解物，再經 RO 水萃取之區分物及蛋白酶 B 所製得之水解物與其 RO 水萃取之區分物 (圖 1 至圖 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，而本研究之蛋白酶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。

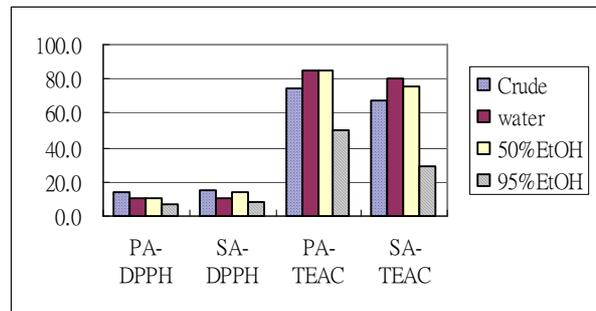


圖 1. 蛋白酶水解物及其區分物清除 DPPH 與 ABTS⁺ (TEAC) 之能力；以百分率表示；PA 是花生粕經 *Aspergillus sp.* 之蛋白酶水解；SA 是芝麻粕經 *Aspergillus sp.* 之蛋白酶水解；Crude 是蛋白酶水解物；water, 50%EtOH 及 95%EtOH 分別表示水解物經其處理而溶解之區分物。

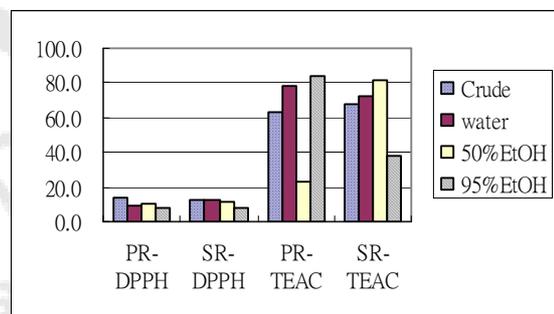


圖 2. 蛋白酶水解物及其區分物清除 DPPH 與 ABTS⁺ (TEAC) 之能力；以百分率表示；PR 是花生粕經 *Rhizopus sp.* 之蛋白酶水解；SR 是芝麻粕經 *Rhizopus sp.* 之蛋白酶水解；其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

若比較蛋白質原料來源-花生粕與芝麻粕，則可發現，除了蛋白酶 R 所衍生之 50% 及 95%EtOH 區分物有明顯差異外，其餘之各種水解物及其區分物清除 DPPH 與 ABTS⁺ 之能力，沒有明顯不同。然而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，經蛋白酶 B 水解所得之水解物及其區分物表現較蛋白酶 A 及 R 佳，而後二者彼此之間並無明顯差異，這可能歸因於蛋白酶水解力與專一性之不同。顯然地，對製備具抗氧化力之蛋白酶水解物而言，若使用花生粕及芝麻粕為原料，則蛋白酶 B 比蛋白酶 A 與 R 適合。

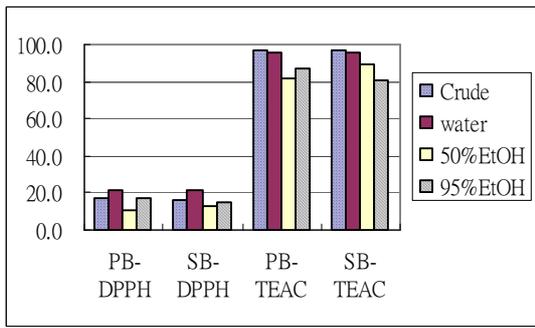


圖 3.蛋白酶水解物及其區分物清除 DPPH 與 ABTS⁺ (TEAC)之能力;以百分率表示;PB是花生粕經 *Bacillus sp.*之蛋白酶水解;SB是芝麻粕經 *Bacillus sp.*之蛋白酶水解;其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

許多研究顯示，免疫細胞在發炎反應期間受到刺激及活化，導致引發或活化許多與產生自由基有關之酵素，例如 NADPH oxidase, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)等，因而生成大量 ROS，最終將導致一些不同疾病的發生，例如癌症、動脈粥樣硬化等 (Behrend et al., 2003; Schimmel and Bauer, 2002; Barbieri et al., 2004; Rose et al., 2004; Chun et al., 2004)。這其中，iNOS 會催化 NO 之生合成。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 4 至圖 9。

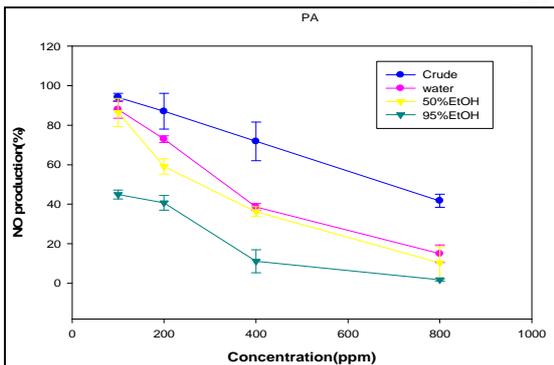


圖 4.花生粕經 *Aspergillus sp.*之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物抑制經 LPS 處理之細胞生成一氧化氮的能力;以控制組之 NO 生成量為 100%表示之;橫軸之數值表示樣品濃度;其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

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 NO 生成的能力，尤其是芝麻粕之蛋白酶 A 水解物經 95%EtOH 萃取所

得之區分物，在樣品濃度 100ppm 下，即表現出非常良好之抑制能力。然而花生粕之蛋白酶 A 及 R 水解物經 95%EtOH 萃取所得之區分物，需要在樣品濃度 400ppm 下，才能表現出非常良好之抑制能力。顯然地，不同蛋白質原料來源，表現出不同之抑制 NO 生成的能力。

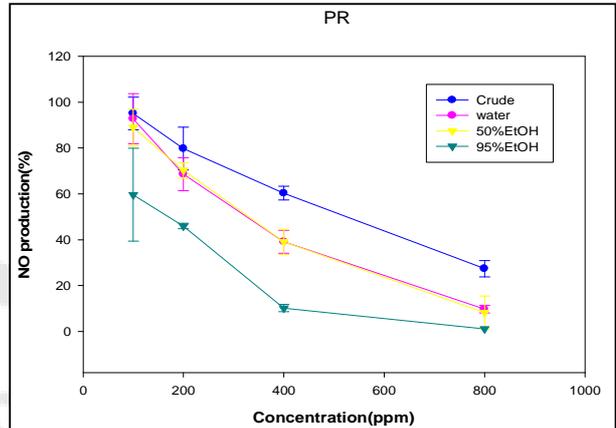


圖 5.花生粕經 *Rhizopus sp.*之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物抑制經 LPS 處理之細胞生成一氧化氮的能力;其餘標示所代表之意義與圖 1 及圖 4 相同。

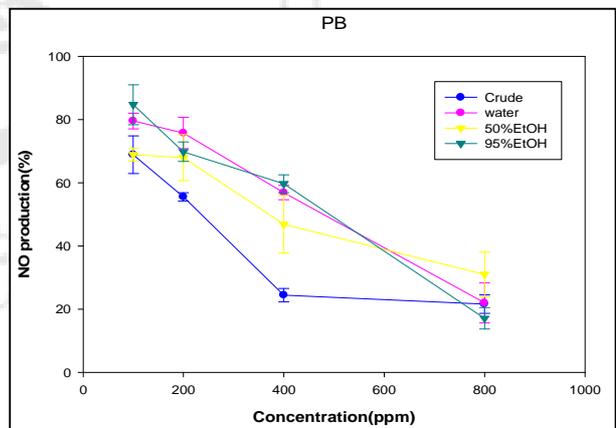


圖 6.花生粕經 *Bacillus sp.*之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物抑制經 LPS 處理之細胞生成一氧化氮的能力;其餘標示所代表之意義與圖 1 及圖 4 相同。

至於蛋白酶方面，蛋白酶 A 與 R 之水解物及其區分物在抑制 NO 生成能力之趨勢上，只表現出些微差異 (圖 4 vs 圖 5 及圖 7 vs 圖 8)，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。花生粕之蛋白酶 B 水解物比其區分物表現稍佳之抑制能力，而其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 6)。

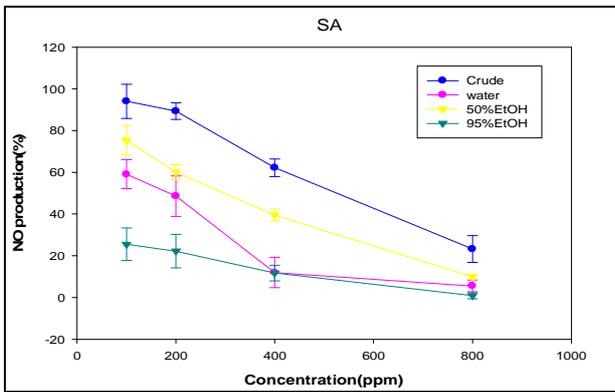


圖 7. 芝麻粕經 *Aspergillus sp.* 之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物抑制經 LPS 處理之細胞生成一氧化氮的能力；其餘標示所代表之意義與圖 1 及圖 4 相同。

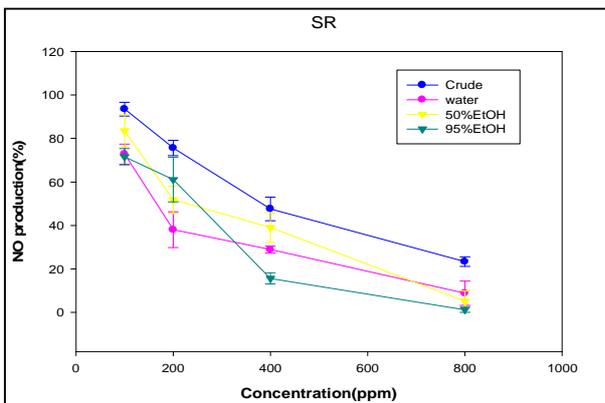


圖 8. 芝麻粕經 *Rhizopus sp.* 之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物抑制經 LPS 處理之細胞生成一氧化氮的能力；其餘標示所代表之意義與圖 1 及圖 4 相同。

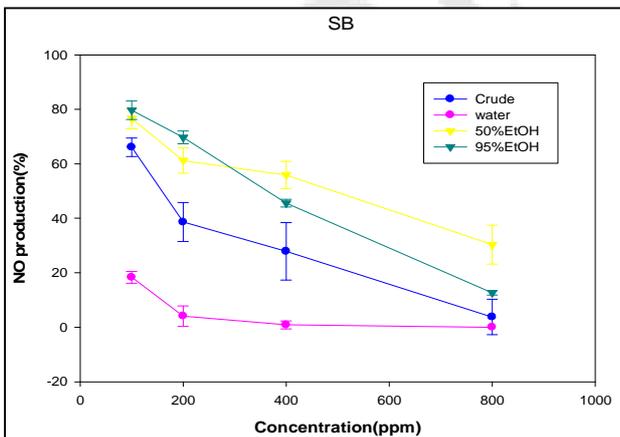


圖 9. 芝麻粕經 *Bacillus sp.* 之蛋白酶水解所得之水解物及其區分物抑制經 LPS 處理之細胞生成一氧化氮的能力；其餘標示所代表之意義與圖 1 及圖 4 相同。

另一方面，芝麻粕蛋白酶 B 水解物經水萃取之區分物，表現出比水解物本身及其他區分物更佳之抑制 NO 生成能力。在濃度 100ppm 下，其 NO 生成量約只有控制組的 20%，而在濃度 400ppm 以上時，則幾乎已沒

有 NO 生成（圖 9）。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。

許多文獻報告指出，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。然而在本研究之 TEAC 抗氧化力試驗中，PA, SA, SR 組之 95%EtOH 區分物清除 ABTS⁺ 能力比同組其他區分物與水解物差甚多（圖 1 與圖 2），但其抑制 NO 生成能力並沒有相對應地減弱，甚至表現得比較強（圖 4、圖 7 及圖 8）。這可能因為 TEAC 抗氧化力是試管內試驗，不受分子量大小之影響，而抑制 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 分子量之大小，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，導致雖然其清除 ABTS⁺ 能力比同組其他區分物與水解物差甚多，但其抑制 NO 生成能力並沒有相對應地減弱，甚至表現得比較強。由於經化學試驗證實具有生物活性之胜肽類物質在細胞或生體內是否會被進一步消化分解而失去作用、是否可被吸收、或是被吸收後是否在細胞內仍具有生物活性等之疑慮存在，因此，有學者提出，動物細胞可作為一個優良的生物模型，以提供生理機能評估之 in vitro 研究 (Balasinska&Troszynska, 1998; Moure et al., 2001)。

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，其結果整理於表一及表二。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。

結論

本研究所製備之蛋白酶水解物及其區分物清除 DPPH 之能力不佳，但水解物及其部分區分物具有良好之清除 ABTS⁺ 及抑制細胞 NO 生成的能力。蛋白質原料來源-花生粕與

芝麻粕之差異性，對於多數水解物及其區分物清除 DPPH 與 ABTS⁺ 之能力，無明顯影響。然而蛋白酶水解專一性之不同，對於所評估之抗氧化能力卻有明顯影響。至於抑制細胞 NO 生成之能力，則受到蛋白質原料及蛋白酶水解專一性之不同而有顯著影響。這其中，以芝麻粕蛋白酶 B 水解物經水萃取之區分物，表現出最佳之抑制 NO 生成能力。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。

表一：花生粕水解物及其區分物之細胞毒性試驗

	PR-95% EtOH		PR-50% EtOH		PR-water		PR-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	100.82	2.99	99.64	8.89	91.20	7.62	88.37	9.65
200ppm	101.51	3.86	95.08	6.45	99.95	7.28	78.24	8.03
400ppm	98.26	3.09	89.13	2.51	88.80	7.23	107.71	0.97
800ppm	96.44	2.03	90.67	8.07	82.84	7.23	93.07	12.19
100ppm+LPS	101.60	1.29	102.15	4.81	79.23	6.01	81.37	2.04
200ppm+LPS	99.91	1.94	106.00	3.07	89.02	7.62	91.05	6.15
400ppm+LPS	91.05	1.50	102.00	4.19	89.95	5.19	89.93	3.06
800ppm+LPS	87.76	1.54	95.74	4.73	97.10	0.34	89.15	6.25
	PA-95% EtOH		PA-50% EtOH		PA-water		PA-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	103.97	1.98	101.44	6.45	85.14	5.50	77.71	3.83
200ppm	99.13	2.61	102.00	2.27	87.87	6.71	83.99	8.27
400ppm	97.67	3.50	90.82	5.78	88.96	1.64	81.76	11.16
800ppm	95.07	4.71	86.72	2.90	80.49	9.53	90.00	15.98
100ppm+LPS	94.43	2.55	74.92	5.12	91.04	17.46	74.38	4.32
200ppm+LPS	95.02	2.38	72.56	4.54	87.54	1.24	82.68	13.60
400ppm+LPS	82.60	4.52	74.97	5.34	91.53	8.66	73.01	5.60
800ppm+LPS	83.52	1.82	70.15	6.90	95.57	10.85	78.63	8.79
	PB-95% EtOH		PB-50% EtOH		PB-water		PB-Crude	
	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD
control	100.25	6.64	100.25	6.64	100.25	6.64	100.25	6.64
LPS	88.38	6.62	88.38	6.62	88.38	6.62	88.38	6.62
100ppm	139.41	7.60	118.33	4.63	103.53	6.43	108.58	2.10
200ppm	145.49	3.18	116.86	3.49	121.27	15.48	111.47	6.02
400ppm	143.87	3.62	116.03	0.44	91.96	7.60	108.73	4.64
800ppm	131.72	12.29	123.97	18.29	99.36	2.72	91.67	11.26
100ppm+LPS	119.02	12.25	74.12	10.01	85.59	5.74	76.72	10.72
200ppm+LPS	123.82	10.20	84.46	2.91	85.93	5.47	85.59	8.32
400ppm+LPS	131.96	6.78	83.73	1.45	73.58	5.52	80.49	6.81
800ppm+LPS	139.56	3.62	97.79	3.04	95.39	5.62	86.62	2.45

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；其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

表二：芝麻粕水解物及其區分物之細胞毒性試驗

	SR-95%EtOH		SR-50%EtOH		SR-water		SR-Crude	
	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD
control	99.87	1.95	99.87	1.95	99.87	1.95	107.78	13.53
LPS	97.50	1.87	97.50	1.87	97.50	1.87	88.17	7.87
100ppm	85.92	1.30	106.97	2.97	84.43	2.96	98.50	6.86
200ppm	89.69	2.84	98.25	7.33	85.70	4.08	97.58	1.33
400ppm	92.63	5.02	100.88	4.73	84.52	3.12	97.65	11.11
800ppm	87.89	6.50	104.56	11.84	82.76	7.98	88.95	1.47
100ppm+LPS	88.11	4.56	84.34	4.36	78.64	5.15	90.33	9.31
200ppm+LPS	89.25	4.58	91.27	1.72	78.60	2.13	95.49	5.91
400ppm+LPS	81.54	3.35	90.79	4.30	76.05	2.54	72.88	1.78
800ppm+LPS	75.79	1.71	87.89	4.61	72.46	2.48	66.54	5.15
	SA-95%EtOH		SA-50%EtOH		SA-water		SA-Crude	
	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD
control	99.87	1.95	99.87	1.95	99.87	1.95	81.18	8.77
LPS	97.50	1.87	97.50	1.87	97.50	1.87	83.46	3.08
100ppm	95.00	4.00	94.87	2.54	87.59	3.16	77.91	7.26
200ppm	98.60	2.10	91.67	3.65	85.31	5.70	81.90	3.34
400ppm	106.01	3.98	95.09	4.03	81.58	4.50	75.95	2.01
800ppm	108.07	3.59	93.11	3.70	73.29	3.65	78.89	8.56
100ppm+LPS	86.84	5.28	79.52	0.68	71.71	2.38	75.69	8.92
200ppm+LPS	95.35	5.68	80.44	2.27	74.17	2.48	87.78	5.78
400ppm+LPS	92.72	0.65	81.01	7.67	79.39	2.52	74.64	2.37
800ppm+LPS	88.42	3.54	74.65	0.08	71.97	4.44	79.08	4.60
	SB-95%EtOH		SB-50%EtOH		SB-water		SB-Crude	
	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD	存活率(%)	SD
control	100.25	6.64	100.25	6.64	100.05	4.75	100.25	6.64
LPS	88.38	6.62	88.38	6.62	92.55	3.76	88.38	6.62
100ppm	117.94	12.67	112.45	4.17	126.96	12.55	105.74	2.42
200ppm	124.02	15.93	115.83	10.62	127.16	8.32	97.06	2.17
400ppm	123.58	6.09	105.15	7.42	112.35	8.38	92.30	6.01
800ppm	111.23	3.75	104.41	8.84	103.87	10.36	99.46	3.88
100ppm+LPS	125.00	8.02	89.02	7.48	114.80	12.42	59.41	12.10
200ppm+LPS	136.42	0.61	97.11	5.14	79.07	2.92	70.93	2.85
400ppm+LPS	137.30	7.81	82.40	0.89	83.77	2.21	74.26	3.71
800ppm+LPS	139.61	6.28	81.81	10.71	78.33	5.59	86.62	2.60

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；其餘標示所代表之意義與圖 1 相同。

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）。

- 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).
- Balasinska, 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 bases 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-kappaB. *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 a-casein-derived exorphins. *Biochemistry*, 22: 4567- 4573 (1983).
- Maruyama, S. Nakagomi, K. Tomizuka, N. and Suzuki, H. Angiot- ensin 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).