



公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：120104U108

行政院農業委員會九十四年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：940209

計畫名稱：**酵素水解雞蛋白以製備具抗高血壓抑制雞精 (第1年/全程1年)**

(英文名稱) **Enzymatic production of ACE inhibitory peptides from egg white**

計畫編號：**94農科-12.1.4-牧-U1(8)**

全程計畫期間：**94年1月1日至94年12月31日**

本年計畫期間：**94年1月1日至94年12月31日**

計畫主持人：**蔡正宗**

執行機關：**私立東海大學**

利用酵素水解卵白蛋白製備抗高血壓肽

李明展 郭偉翔 翁千惠 蔡正宗

東海大學食品科學系

摘要

本研究目的是利用酵素水解卵白蛋白製備具有抗高血壓活性的肽。使用 thermolysin、chymotrypsin、esperase 和 alcalase 等蛋白酵素水解卵白蛋白，測定其水解物對 ACE 之抑制能力。結果顯示為 1 % 卵白蛋白於 pH 8、60 °C 下添加酵素比例 E / S = 1 / 500 (w/w) thermolysin 水解反應 4 hr 為最佳條件，其 IC₅₀ 為 33 µg / ml。採不同膜限值(MWCF)進行超過濾區分，其中以 MWCF 1000 具 14 µg / ml 抑制率。最後添加腸胃酵素分解水解液，探討其肽是否仍具抑制 ACE 之效果，Thermolysin 可應用超過率加以回收再利用四次，而不減其活性，SHR 動物實驗顯示，灌食 0.19g/kgBW，能有效降低血壓達 8 小時。

關鍵詞：明膠、卵白蛋白、ACE 抑制劑、血管收縮素轉化酶、肽

PRODUCTION OF ACE INHIBITORY PEPTIDE FROM EGG WHITE BY ENZYMIC HYDROLYSIS

Ming-Jan Li, Wei-Shiang, Chien-Hiu Weng and Tsun-Chung Tsai

Department of Food Science, Tunghai University

ABSTRACT

The purpose of the study was to produce ACE inhibitory peptide from ovalbumin by enzymatic hydrolysis. Egg ovalbumin was hydrolyzed by four selected proteases (thermolysin, chymotrypsin, esperase and alcalase) and ACE inhibition of hydrolysates were measured. The results showed that optimal condition for potent hydrolysates production was 1 % ovalbumin (pH 8) and (E / S =)0.2% thermolysin at 60 °C for 4hr. IC₅₀ of ACE of hydrolysate was about 33 µg / ml. The hydrolysate yield was found to be 87% . Further fractionation of hydrolysate by ultra-filtration, fractions of MWCF 1000 was found to have best ACE inhibition (14 µg / ml). Hydrolysate was stable to pepsin digestion, and pancreatin digestion would enhance

the inhibition activity. Thermolysin in hydrolysate could be recycled by filtration for four times without reduced activity. SHR experimental indicated that 0.19g/ kg BW would be enough to reduced hypertensive pressure for 8 h.

Keywords: ovalbumin, ACE inhibitor, ACE, peptide

一、前言

高血壓為國人近年來十大死亡原因之一，也是造成腦血管病變和心臟病的重要危險因子之一。所以血壓的控制對於國人健康是重要預防工作。在臨床上治療方式，大多服用合成的抗高血壓藥物，如：利尿劑、鈣離子通道阻斷劑、 α 及 β -blocker等來控制血壓，此類藥物需要每天服用，且藥效強，以致引起咳嗽(coughing)、過敏(allergic reaction)、味覺混亂(taste disturbances)、皮膚癢(skin rashes)等副作用(Lee et al.2004)。

血管收縮素轉化酵素(Angiotensin converting enzyme, 簡稱 ACE), 存在於人體中的肺、腎、腦及以可溶解的型式存在於血液或組織中，其中以肺的含量為最多(Godfrey and West, 1996)。而引起血壓升高的原因之一為，在腎臟產生的 Angiotensin I (血管收縮素 I；無活性)，藉由血液循環，經過肺臟中的 Angiotensin Converting Enzyme 之作用，將 Angiotensin I 轉化為具血管強力收縮活性的 Angiotensin II (血管收縮素 II)。另一方面，ACE 將具有血管舒張活性的 Bradykinin(緩激素)去活化，導致血管收縮引起高血壓。

第一個血管收縮素轉化酶抑制劑(ACE inhibitor)從毒蛇血清中被分離純化而得，近年來學者嘗試從動植物等天然食物中得到抗高血壓的胜肽，來

源如：植物性蔬果、大豆、玉米蛋白、無花果樹的乳汁；動物中由豬血萃取白蛋白、鮪魚、沙丁魚；發酵食物納豆、味噌、發酵乳 (Ariyosh, 1993; Hyun and Shin, 2000; Oshima et al. 1979; Yamamoto, 1997; Lee et al.2004; Maeno et al. 1996; Okamoto et al.1995; Sugiyama et al. 1991)。這些來自天然的 ACEI 胜肽，抑制 ACE 效果溫和，對人體不會有副作用。因此本研究主要目的：藉由從價格低廉、容易取得卵白蛋白(ovalbumin)，篩選出適合的蛋白質酵素將之水解，找出最佳水解條件，其水解液經過 ultra-filtration (超過濾)分區，製備具有抗高血壓的小分子胜肽片段，以便添加於食品，冀以達到控制血壓之效果。

二、材料與方法

一、材料

Chicken egg ovalbumin, Chymotrypsin、Pepsin、Pancreatin、Thermolysin, Angiotensin converting enzyme (ACE, from rabbit lung),and Hippuryl - L - histidyl - L - leucine (HHL)購自 Sigma (U.S.A.)。Esperase (type F), and Alcalase 2.4L 購自 NOVO Industry A / S (Denmark). Other chemicals 都是 reagent grade from Merck.

二、方法

1. 酵素成品中之含蛋白質含量分析

因為所使用的商業酵素為混合酵素，未標示其蛋白質含量，所以採用 Bio-Rad Protein Assay 之染劑，加入酵素經過適度稀釋後，在 595 nm 偵測其吸光值。而標準品為牛的血清白蛋白(Bovine serum albumin)做出線性回歸曲線，再對照後換算出酵素的蛋白質含量，如此可依照酵素蛋白質含量來添加等量的酵素，分別比較各酵素水解基質之效力。

2. 酵素水解反應

配成適當濃度基質水溶液，以氫氧化鈉調整 pH 值後，加入 0.2% 蛋白質水解酵素(w/w of substrate)，在最適於酵素的溫度下去進行水解，並於不同水解時間取樣，之後立即放沸水浴中 15 min 使酵素失去活性，放冷後離心(13000xg, 5 min)，取上清液進行往後分析。而在此實驗所用酵素條件為 Alcalase : 55 °C、pH 7.5 ; Chymotrypsin : 37 °C、pH 8 ; Esperase : 60 °C、pH Thermolysin : 60 °C、pH 8。

3. 血管收縮素轉化酶抑制活性之測定

本實驗的設計是採用高效能液相層析法測量血管收縮素轉化酶(Angiotensin converting enzyme ; ACE) 的抑制活性，修飾 Cushman 和 Cheung (1971) 測量方法。取 45 μ l HHL 溶液當受質，加入 5 μ l 蛋白質水解物，vortex 數秒，在 37 °C 恆溫水浴下預熱 5 分鐘，之後加入 15 μ l 的 60 mU/ml ACE 溶液，亦在 37 °C 水浴中反應 30 分鐘，最後添加 65 μ l 0.1% 三氟醋酸(Trifluoroacetic acid; TFA) 終止酵素 ACE 終止反應。以 RP-HPLC 分析測定 ACE 抑制活性百分比。

$$\text{Percent activity of inhibition (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \%$$

A = 以未加水解物之 HA 波峰高度

B = 水解物添加後之 HA 波峰高度

4. 高效能液相層析之分析條件

HPLC 分離條件使用 Wu 和 Ding (2002) 之測量方法。實驗中採用 LiChrospher C₁₈ (250 \times 4 mm, 5 μ m) 管柱進行的分析。移動相為水與甲醇 1:1(v/v) 混合液，並含有 0.1% TFA。流速為 0.8 ml/min，樣品注射量為 20 μ l，在波長為 228 nm 下監測其吸光值。

5. OPA (o-Phthaldialdehyde) 測定 Church et al. 1983)

取適當稀釋後的 Peptide 液樣品 50 μ l 及 1mLOPA 試劑混合，於室溫下反應 2min 並測 320nm 吸光值，並以 L-Leucine 為標準品相比較，求得 Peptide 濃度。

6. 色澤分析(Color)

利用色差儀判定產物水解液及經乾燥後粉末顏色色彩變化，分別以 L、a、b 值表示。L 值表示亮度(lightness)，最高值為 100，最低值為 0，數值越大表示顏色越亮，反之表示顏色越暗。a 值為正，表示紅色，負值則為綠色。b 值為正，表示黃色，負值則為藍色。

7. 總生菌數測定(Total plate count)

本實驗採用 CNS(1993) 方法測定。先配製平板計數培養基(plate count agar, standard method agar)、水解液所需稀釋液(生理食鹽水)，均經過高壓滅菌釜滅菌，之後將水解液經適當稀釋

倍數之稀釋液以傾倒法(pour - plate technique)培養在 35 °C 培養箱中 48 小時後，計算菌落數(CFU / ml)。

8. 官能評估(Sensory Evaluation)

採五分制試驗對水解後的產物作官能評估。將冷凍乾燥後水解物溶於脫脂牛奶中(2 g / 100 ml)，由十位東海大學食品科學系研究生擔任品評員，針對氣味(odor)、苦味(bitterness)與整體接受度(overall acceptability)進行評分測試。評分標準為(1)氣味部分，五分表示明顯有異味，三分表示適中，一分表示沒有明顯異味。(2)苦味部分，五分表示很苦，三分表示略苦，一分表示沒有明顯苦味。(3)整體接受度部份，五分表示非常喜歡，三分表示不喜歡也不討厭，一分表示非常討厭。

9. 超過濾區分水解物(Ultra - filtration)

將最佳條件下獲得的水解液取部分進行超過濾區分。取水解物依序使用三種不同分子量限值(MW cut - off 10000、3000 及 1000)之濾膜，可以將水解物區分成三個區域(MWCF 10000 以上、3000-10000、1000-3000 及 1000 以下)，收集其產物作進一步 ACE 抑制活性測定。

10. 水解物經胃、腸道酵素之消化模擬試驗

修飾 Wu 等⁽¹⁵⁾方法。以最適條件下水解液將之乾燥成粉末，溶於 0.1 M KCl - HCl buffer(pH 2)，在 37 °C 下以 1 % (w / w)胃蛋白酶(pepsin)進行分解消化 4 hr，之後立即在沸水浴加熱 15 min，放冷後，以氫氧化鈉調成 pH 7，

取一部分作抑制 ACE 活性測定。剩下部分以 2 % (w / w)腸液酶(pancreatin)在 37 °C、消化 4 hr，立即在沸水浴 15 min 使酵素終止反應。離心後取上清液，進行對 ACE 抑制活性測試。

11. 分子量分布之測定

卵白蛋白經 UF 之水解液冷凍乾燥後，取 20 mg 溶於 1 ml 無菌水中，注入 Superdex Peptide HR 10 / 30 (300 × 10 mm)分子篩管柱，以 HPLC 測定，移動相為 0.1 M 磷酸鹽緩衝液(pH 7)，沖提流速為 0.25 ml / min，樣品注射量 50 µl，在 A₂₁₄ 下測其吸光值，偵測酵素水解後的蛋白質產物分布情形。實驗中使用的分子量標準品為下列所述：Cytochrome C (125 KDa)、Aprotinin (6.5 KDa)、Substance P(1349 Da)、(Gly)₆ (360 Da)、(Gly)₃ (189 Da) 及 Glycine (75 Da)，將標準品與各區間分區物作分子量分佈範圍比較。

12. Thermolysin 回收再應用:

在最適條件下反應後，水解液經離心除去不溶物，澄清之水解液經超過濾(MW cutoff 3KDa)，收集 80%之濾液，20%之殘留液含存有 Thermolysin，可添加新鮮之 Ovalbumin 液至原體積進行類似之二、三及四次水解，並測試其離心後及過濾後水解液的 ACE 抑制活性及應用 OPA 方法測定其 Peptide 濃度。

13. 動物實驗:

未包覆組：秤量 0.1g、0.05g、0.02g 白蛋白水解液凍乾粉，溶解於 1 mL

去離子水。

包覆組：秤量 0.05g、0.02g 白蛋

白水解液凍乾粉，溶解於 1 mL 去離子水。

參考 Abra, R.M. and Hunt, C.A (1981) 等的方法，以比例 1 : 0.25 的 lecithin : cholesterol (total lipid 300 μ mole) 溶於適量 (2-3 mL) chloroform，低溫減壓乾燥至一層薄膜，加入 2 mL 欲被包覆的液體。再放入適量玻璃珠(直徑 1.4cm)於 60°C 下攪拌 5 分鐘，靜置室溫下十分鐘冷卻。

量測大鼠尾壓：

將大鼠趕進拘束器 (rat holder) 後置入保溫器 (RMB1030, Muromachi co. LTD., Japan) 保溫 37°C 五分鐘，使用尾壓測量機 (MK1030, Muromachi co. LTD., Japan) 測量大鼠尾部血壓。

八週齡的 SHR (公鼠，台灣財團法人國家實驗動物中心) 自由飲食一般飼料及水一星期，於九週齡時進行實驗。一組五隻大鼠，實驗前晚禁食飼料。以胃管灌食白蛋白溶液 (0.372g/kg、0.186g/kg、0.074g/kg、0.186g in liposome/kg、0.074g in liposome/kg)，於灌食前、灌食後的二、四、六、八小時測量尾壓變化。

14. 統計分析

將官能評估實驗數據以 SAS(Statistical Analysis System) 套裝統計軟體進行分析。

三、結果與討論

1. 卵白蛋白水解物最適條件之建立：

在初步的預備實驗中，先固定卵白蛋白 1% (w/v)，酵素與基質比 (E/S = 1/100)，以 alcalase、esperase、thermolysin 及 chymotrypsin 酵素分別

依其適合的溫度與 pH 值條件下進行水解反應。圖 1 為不同的蛋白質酵素在 0 - 24 hr 下水解卵白蛋白得之水解液經 10 倍稀釋後再進行 HPLC 分析其抑制能力。

結果顯示，以 thermolysin 水解卵白蛋白在 0.5 hr 時，抑制率可達 70%，且抑制能力遠遠大於其他酵素的水解 (thermolysin > alcalase > esperase > chymotrypsin)，隨著時間增長，抑制率亦緩緩增加，在水解 24 hr 時，可到達約 80% 左右。其次為 alcalase，有 55% 抑制率。因此初步的酵素篩選，以 thermolysin 作為下一步實驗探討之條件。

(a) E/S 比例

考量到酵素價格問題，使用不同 E/S 比例進行，希望找出較低的濃度下水解卵白蛋白，其抑制效果亦不差。將條件設計為將基質比例固定為 1%，反應溫度固定在 60°C，pH 固定在 8，改變酵素與基質間比例，使 E/S = 0.2、0.4、0.8、1 及 1.5% (1/500、1/250、1/125、1/100 及 1/66)，在 5 種不同比例下進行 0 - 8 hr 水解，觀察其 ACE 抑制活性變化。圖 2 為不同酵素與基質比例水解卵白蛋白對 ACE 抑制活性作用。

由實驗結果顯示，E/S 比例越高，其抑制 ACE 能力越好。將時間拉長，抑制率曲線慢慢上升直至趨近平緩。當 E/S = 1/66，抑制 ACE 活性在水解時間 2 hr 時，可高達 80%，抑制 ACE 效果最好且水解時間又短。以 0 - 8 hr 來觀察，顯示 1/66 與 1/100 效果差不多，大於 1/500、1/250 及 1/125，若以高濃度

比例的酵素進行水解會不敷成本，因此考量到 thermolysin 為價格不便宜之酵素。當水解 4 hr 時，使用 1/500、1/250、1/125 其抑制效果趨近相同，皆具有 70 % 左右的抑制 ACE 酵素能力，所以選擇 E/S = 1/500 低濃度的比例進行往後的分析。

(b) pH 值

固定基質 1 % 及 E/S = 1/500(w/w)，選擇 thermolysin 最適合的 pH 7-9 及最適當溫度 60 °C 左右 (50、60 及 70 °C) 下進行反應。冀以篩選出適合 pH 值與溫度條件水解卵白蛋白以製備出高抑制率的胜肽。

實驗結果顯示(圖 3)，在 0 - 2 hr，在 pH 8 的抑制率(55 %)大於 pH 7(53.8 %)及 pH 9(41.3 %)。將時間拉長至 4 hr，pH 8 抑制活性(57.3 %)略大於 pH 9(57 %)，而 pH 7 抑制率只有 54.6 %。所以經篩選過後，選擇以 pH 8 下水解，進行下一步的溫度測定。

(c) 溫度

不同溫度以同樣條件水解卵白蛋白所得水解物對 ACE 的抑制活性作用。固定基質 1 % 及 E/S = 1/500、pH 8 後，選擇以 50、60、70 °C 三個不同溫度下進行 0、0.5、1、2 及 4 hr 的水解反應。將水解液稀釋 10 倍後測定。

由實驗結果得知(圖 4)，在 0 - 1 hr 間，在 70 °C(57 %)下水解其 ACE 抑制活性效果較 60 °C(55 %)及 50 °C(52 %)還佳。將時間延長到 4 hr，60 °C 的抑制率(63 %) 約略優於 70 °C(58 %)及 50 °C(54 %)，推測其原

因，雖然 thermolysin 的最適建議反應溫度為 70 °C，若溫度越高、隨著時間作用越久，其酵素活性降解會比低溫度 60 °C 及 50 °C 還快，所以選擇以 60 °C 反應溫度進行水解。

綜合以上結果討論，採用 1 % (w/v) 卵白蛋白，E/S = 1/500(w/v)，pH 8，60 °C，水解 4 hr，作為之後大量製備的最佳條件。

2. 水解液一般性質之測定

(a) 顏色及總生菌數

表 1 為卵白蛋白水解物之顏色分析。經色差儀測定水解液為淡黃色，其 L, a, b 值分別為 99.27、-0.94 及 5.82。在水解液的總生菌數方面，測定後為 TFTC(資料未列)。

(b) 官能評估

表 2 為對卵白蛋白水解液作官能評估測試。以脫脂鮮奶當對照組，實驗組為秤取 1 g 水解液粉末溶於 100 ml 脫脂鮮奶中。品評項目為異味、苦味及整體接受度。經官評員的品評後無不良異味，與脫脂鮮奶比較無顯著差異。苦味方面，以舌後根品嚐水解液，苦味得分低，與脫脂鮮奶對照，為無顯著差異。在整體接受度方面，傾向不喜歡、不討厭及喜歡之間，與脫脂鮮奶比較，無顯著差異。所以經三項品評測試後，此水解物的得分與市售脫脂鮮奶相近，表示品評人員受測後對此產物的接受度高，因此由酵素水解卵白蛋白製成的水解液具有很高的經濟價值。

3. 超過濾區分物對 ACE 之抑制活性作用

卵白蛋白與明膠水解液做比較，前者其抑制 ACE 效果較佳，因此此部分多做了 IC₅₀ 的測試。IC₅₀ 定義為可以抑制 50 % ACE 酵素活性所需的最低抑制劑濃度，當 IC₅₀ 值越小，表示其抑制劑的效果越佳即只需要很低的抑制劑濃度將 ACE 抑制 50 % 活性。將最佳水解條件下製備出的卵白蛋白水解液，經超過濾裝置後，收集到的分區產物對 ACE 抑制活性作用。

表 3 為經過 MW cut - off 10000 濾膜粗略的分區下，所得之殘留液中，大多是分子大的結構，會大幅降低與 ACE 結合的機會，相較於未分區的水解液(抑制效果為 IC₅₀ 為 33 µg / ml)，其抑制效力較差(抑制 ACE 活性 IC₅₀ 為 58 µg / ml)；除了膜分子量限值(MW cut - off 在 10000 以上的濾液抑制效果較低，隨著膜限值越小，其抑制率有越來越高的趨勢，分子量膜限值在 3000 ~ 10000、1000 ~ 3000 間及小於 1000 的濾液，IC₅₀ 值分別為 43、25 及 14 µg / ml。

4. 區分物分子量之分佈分析

經 UF 後將水解液，分別進行冷凍乾燥製成不同 MW 區分物粉末，調配適合水溶液以 HPLC 偵測，注射入 Superdex Peptide HR 10 / 30 管柱進行分析。圖 5 為卵白蛋白水解物經過超過濾裝置(MWCF 10000、3000 及 1000) 區分物濾液之分子量分佈圖。

首先注射蛋白質分子量標準品，移動相為磷酸緩衝液，偵測波長 214 nm 偵測出各區分物的分佈情況。由結果顯示，分子量最大的胜肽(MW cut - off 10000)其波峰很快地被沖提出來，而且座落範圍很廣，主要分佈在 75 Da

至 12.5 KDa 間，平均分子量 MW cut - off 10000 以上，其 IC₅₀ 值為所有區分物中最高的(值為 58 µg / ml)即對 ACE 抑制活性是最低的；MW cut - off 10000 區間的胜肽分子量主要分佈在 6500 Da 至 75 Da 間，其中有 2 個波峰存在，分別為 6500 Da ~ 1349 Da 及 1349 ~ 360 Da。又以分子量約在 1349 Da 附近，有最高的吸收光值；MW cut - off 3000 區間的胜肽分子量主要分佈在 1349 Da 至 189 Da 間，有一個明顯的波峰在，其分子量約為 1349 ~ 360 Da，其吸光值很高；MW cut - off 1000 區間的胜肽分子量分佈為 1349 Da 至 75 Da 範圍內，其主要有一個波峰在 360 Da 附近，具有極高的吸光值，亦呼應著藉由 UF 分離出的分子量小的胜肽，其抑制 ACE 能力最好(IC₅₀ 為 14 µg / ml)。

5. 胃腸酵素對水解物之 ACE 抑制活性作用

模擬經口服攝取後，在胃腸的體外消化試驗。胜肽水解物是需要通過消化道的吸收才能在人體內發揮降血壓效果，所以才要測試水解物在腸胃道的安定性作用。將水解液經冷凍乾燥後的卵白蛋白粉末調配成適當濃度，以胃蛋白酶(pepsin)及胰液酶(pancreatin)消化分解。由結果顯示(fig6)對 ACE 抑制活性作用，無任何腸胃酵素作用當控制組(70%)，經 pepsin 作用後抑制力可再提升至 70.9 %；而經 pancreatin (具有多種酵素在內，含有澱粉酵素、蛋白酵素、脂肪酵素等)作用，可提升至 72.9 % 的抑制 ACE 活性，推測原因為水解物中有些胜肽片段可以被 pepsin 及 pancreatin 有效水解成小

分子序列，因此抑制 ACE 的活性可以再增加。

6. thermolysin 回收再應用

圖 7 顯示 thermolysin 回收再利用的活性，在 20% 的超過濾殘留液中，peptide 之濃度遠較濾液高，回收再應用，由於累積效應，造成反應液，離心液及濾液中的 peptide 濃度隨著使用的次數而持續增高，尤其在初期的再利用，更為明顯，濾液與離心液的胜肽濃度雖有很大的差異，但其對 ACE 之抑制則相近似，由此可知具抑制活性的 peptide 的分子量分佈該集中在 3kDa 以下，雖經四次回收的使用，Thermolysin 仍能維持其原有之活性，重複使用，將可大大地降低生產成本。

7. SHR 動物實驗：

圖 8 顯示 SHR 血壓的下降與灌食胜肽劑量成反比，形成 Liposome 的胜肽效果較單獨胜肽效果好，各劑量的最佳效果呈現於灌食後 2 小時，灌食 0.19g 胜肽/公斤體重對於維持有效降低血壓 12mmHg 達 8 小時。

四、結論

使用酵素水解卵白蛋白製備出抗高血壓胜肽，最佳條件為基質 1%，60 °C 下以 thermolysin 與卵白蛋白間比例 (E/S = 1/500)，pH 8，反應 4 hr，其 IC₅₀ 為 33 µg/ml。將水解液經 UF 後 (濾液 MWCF 1000)，有最低 IC₅₀ 值為 14 µg/ml。

以卵白蛋白水解液的抑制 ACE 效果為佳，在官能評估測試，無明顯苦味及異味，整體接受度高。在模擬胃腸酵素消化卵白蛋白抑制劑試驗，結果顯示其抑制 ACE 活性未明顯下降，具有高度的安定性在，Thermolysin 頗具安定性，能重複回收再利用而降低成本，灌食胜肽 0.19g/kg 體重能有效降低血壓。

Table 1. Color analysis of ovalbumin hydrolysate

Product	L	a	b
Ovalbumin hydrolysate (liquid)	99.27	- 0.94	5.82
Ovalbumin hydrolysate (powder)	93.1	- 1.2	4.93

Table 2. Sensory evaluation of skim milk and ovalbumin hydrolysate. ^a

Product	Odor ^b	Bitterness ^c	Overall acceptability ^d
Skim milk	2.00 ± 0.00x	1.44 ± 0.53x	3.70 ± 0.48x
Ovalbumin hydrolysate	2.33 ± 0.82x	1.50 ± 0.53x	3.56 ± 0.53x

Mean values in the same column that are followed by different letters are significantly different. ($p < 0.05$)

^a Values are Mean ± S.D. (n = 10)

^b A five – point scale (5 = extremely smell , 4 = moderate smell , 3 = slightly smell , 2 = trace of smell , 1 = no smell).

^c A five – point scale (5 = extremely bitter, 4 = moderate bitter, 3 = slightly bitter , 2 = trace of bitterness, 1 = not bitter).

^d A five – point scale (5 = like very much , 4 = like slightly , 3 = neither like nor dislike , 2 = dislike slightly , 1 = dislike very much).

Table 3. Inhibitory of ACE activity of the filtrates obtained of ovalbumin hydrolysate by ultra – filtration membranes.

Fraction (MW cut – off)	Total volume (ml)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (µg / ml)
Hydrolysate(未經 UF)	100	90.8	33
MW>10000	48	75	58
3000< MW<10000	47.5	85	43
1000< MW<3000	49	92	25
MW<1000	48.4	93	14

^a The IC₅₀ value was defined as the concentration of peptide needed to inhibit 50 % of the ACE activity.

^b From Sigma ovalbumin hydrolysate.

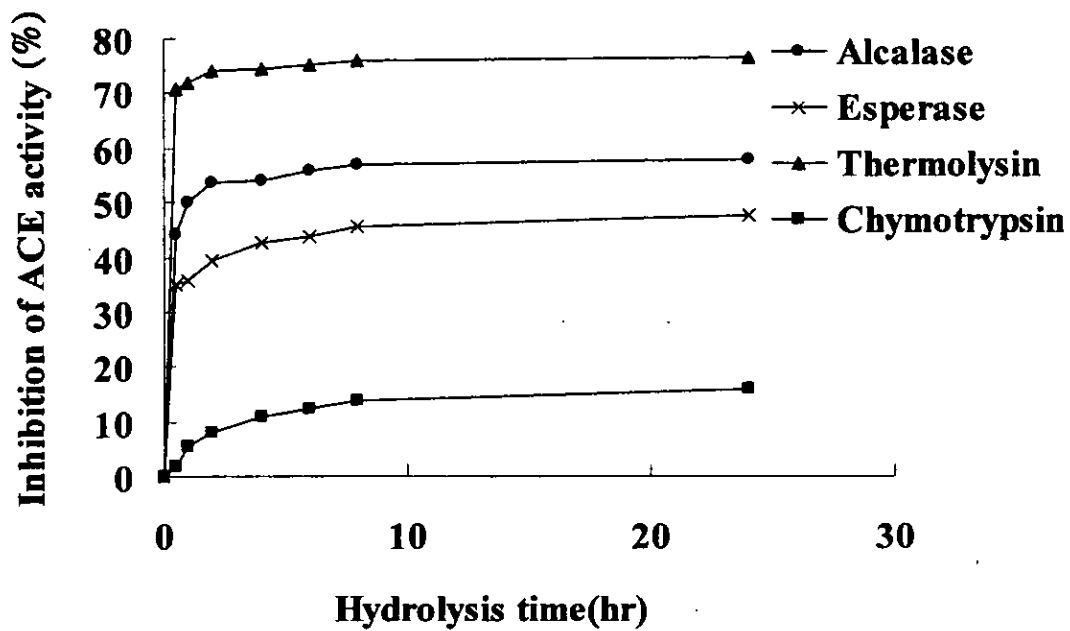


Fig 1. Inhibition of ACE activity by ovalbumin hydrolysate produced with various enzymes.

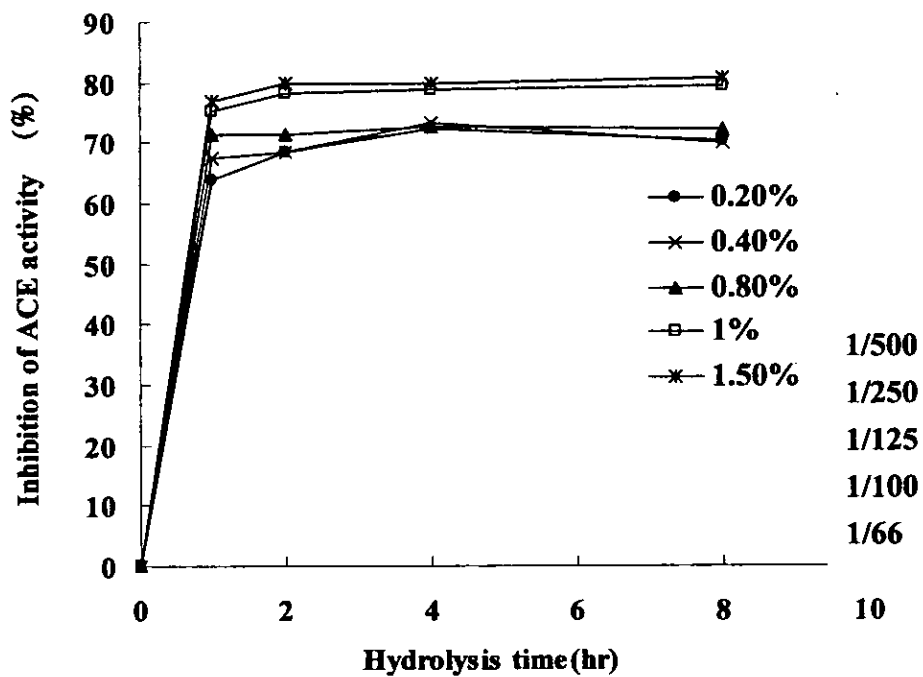


Fig 2. Inhibition of ACE activity by ovalbumin hydrolysate produced with various E / S ratios.

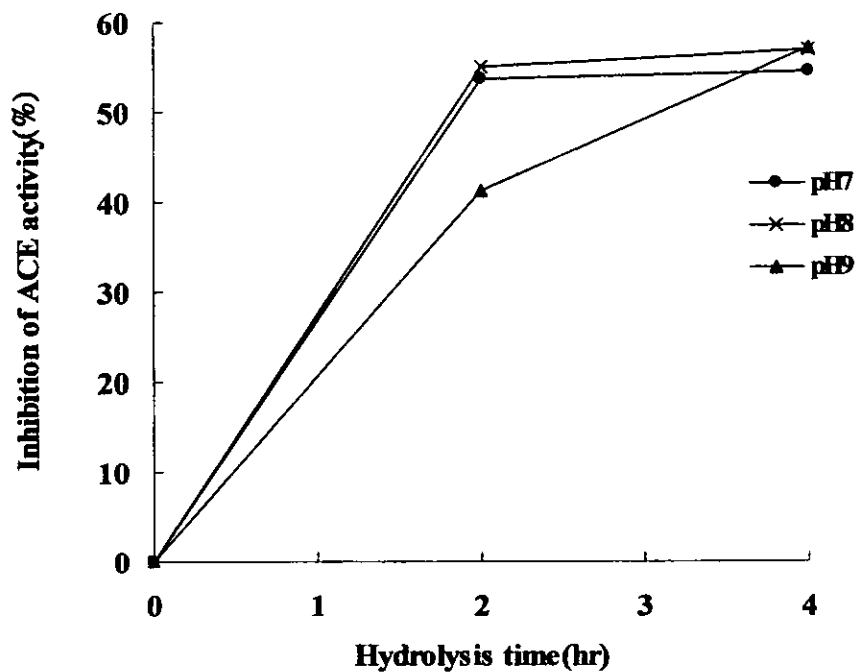


Fig 3. Inhibitory of ACE activity of ovalbumin hydrolysate by ovalbumin hydrolysate produced with various pH values (hydrolysate was 10 fold diluted for inhibitory activity measurement).

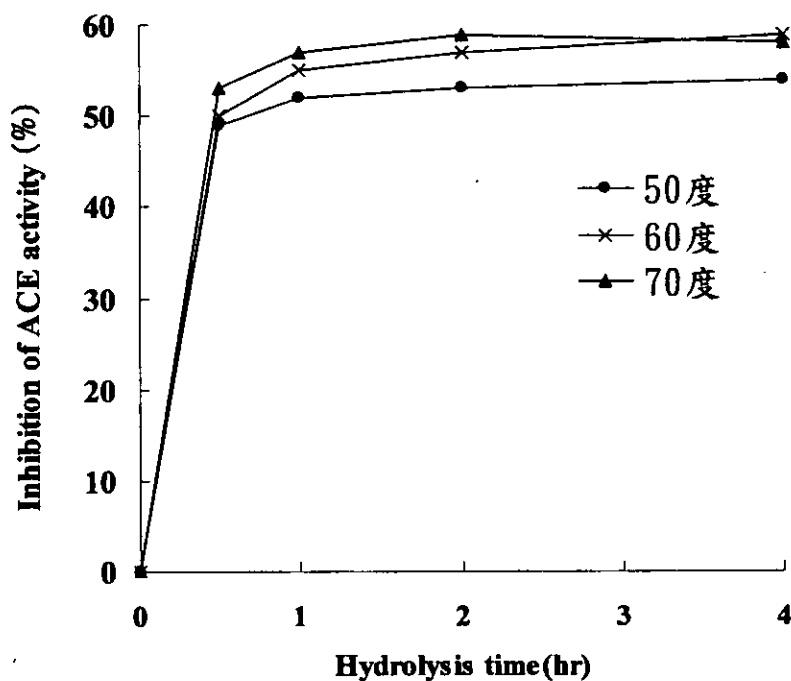


Fig 4. Inhibitory of ACE activity of ovalbumin hydrolysate by ovalbumin hydrolysate produced with various temperature values.(hydrolysate was 10 fold diluted for inhibitory activity measurement)

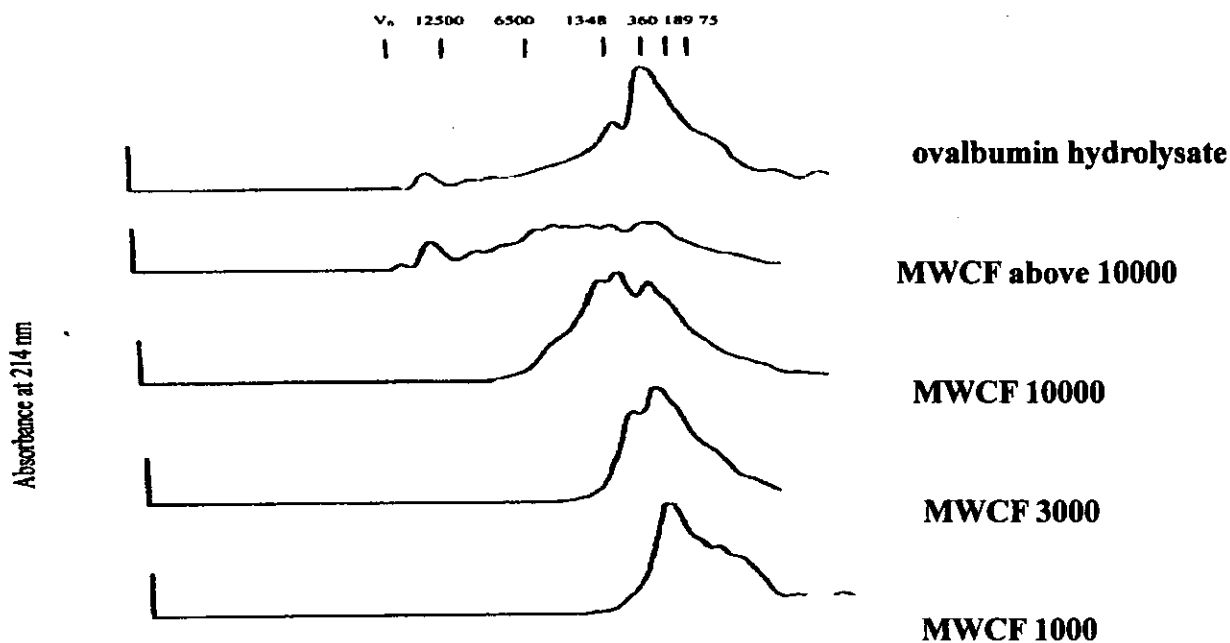


Fig 5. The MW distribution of ovalbumin hydrolysate and its filtrates by UF(MWCF 10000, 3000 and 1000). Separating condition : Superdex Peptide HR 10 / 30 column (300×10 mm) ; mobile phase : 0.1 M phosphate buffer (pH 7) ; flow rate : 0.5 ml /min ; injection volume : 20 μ l ; detection wavelength : 214 nm.

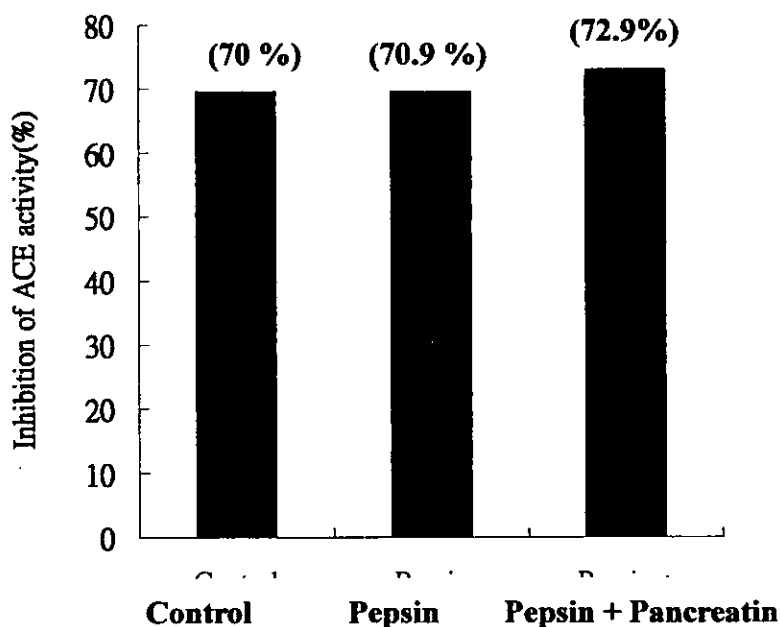


Fig 6. Activity of the hydrolysate following digestion by gastrointestinal proteases.

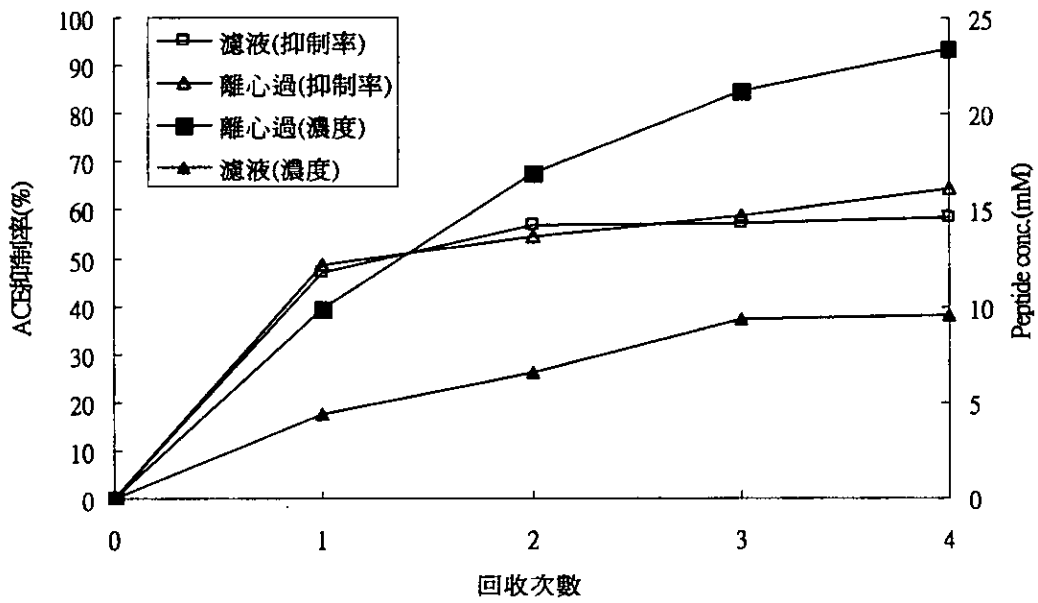


Fig. 7. Application of recycled thermolysin solution. (hydrolysate was 10X fold diluted for ACE inhibition measurement)

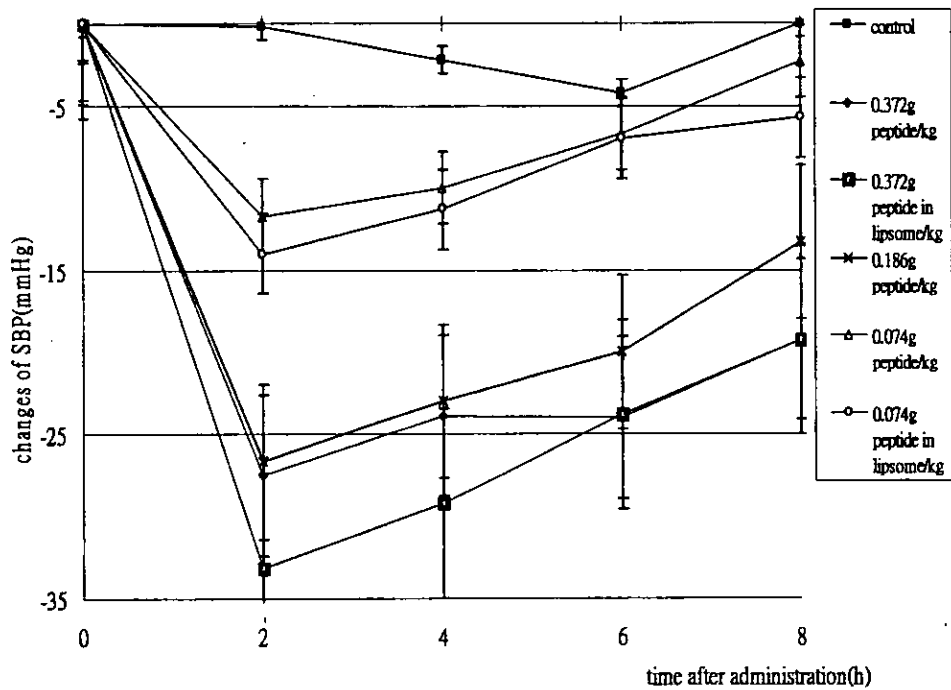


Fig 8. Change of systolic blood pressure (SBP) after single oral administration of hydrolysate on SHR

五、誌謝

本研究承蒙農業發展委員會(94

農科-12.1.4.牧-U1(8))補助，特此表示謝忱。

六、參考文獻

- (1) 經濟部中央標準局。1993。食品微生物之檢驗法－生菌數之檢驗。中國國家標準(CNS),10890, N6186.
- (2) Ariyoshi, Y. (1993) Angiotensin – converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trend in Food Sci. and Technol.* 4 : 139-144.
- (3) Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. and Catignani, G. L. (1983) Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66:1219-1227.
- (4) Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20 : 1637-1648.
- (5) Godfrey, T. and West, S. (1996) *Industrial Enzymology* second edition. Macmillan press, London.
- (6) Hyun, C. K. and Shin, H. K. (2000) Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I – converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochem.* 36 : 65-71.
- (7) Lee, D. H., Kim, J. H., Park, J. S. , Choi, Y. J. and Lee, J. S.(2004) Isolation and characterization of a novel angiotensin I – converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptide.* 25 : 621- 627.
- (8) Maeno, M., Yamamoto, N. and Takano, T. (1996) Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 79 : 1316-1321.
- (9) Oshima, G., Shimabukuro, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y., Koizumi, Y., and Yanagida, F. (1979) Peptide inhibitors of Angiotensin I – converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim. Biophys. Acta* 566 : 128-137.
- (10) Okamoto, A., Hanagata, H., Kawamura, Y., Koizume, Y. and Yanagida, F. (1995) Angiotensin converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 : 1147-1149.
- (11) Sugiyama, K., Egana, M., Onzuka, H. and Oba, K. (1991) Characteristics of sardine muscle hydrolysate prepared by various enzymatic treatments. *Nippon*

Suisan Gakkaishi. 57 : 475- 479.

- (12) Wu, J. P. and Ding, X. L. (2002)
Characterization of inhibition and stability of soy – protein – derived angiotensin I – converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.* 35 : 367-375.
- (13) Yamamoto, N. (1997)
Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopoly.* 43 : 129-134