

壹、文獻回顧

一、雞蛋蛋白簡介

1. 基本性質

雞蛋蛋白為一種半流動的膠狀物質，體積約佔全蛋的 57 ~ 58.5%，其中含有約 10.5%的蛋白質，以及豐富的維生素、礦物質、胺基酸，為自然界最為營養經濟的蛋白質來源。

雞蛋蛋白中的蛋白質為其主要固形物成分，其中分為許多不同種類的蛋白質，不同種類的蛋白質各自擁有不同的特性(表一)。雞蛋蛋白含有人體所需的八種必需胺基酸，為高品質蛋白質，常被用來做為評斷食品中蛋白質品質的標準。(陳，1999)

2. 應用

雞蛋蛋白也具有食療的功效。本草綱目記載：「卵白象天，其氣清，其性微寒。精不足者補之以氣，故卵白能清氣治伏熱、目赤、咽痛諸疾。」由此可知，單獨食用蛋白，具有清熱、補氣的作用。

在食品加工方面，由於雞蛋蛋白中的球蛋白，具有優秀的起泡性，而卵黏蛋白能提供泡沫安定性(foam stability)，所以雞蛋蛋白常被應用在烘培食品的製作上，以提供鬆軟、綿密的口感如：蛋糕。除此之外，經過乾燥後的蛋白粉末也可添加於食品中，提高食品中的蛋白質含量。(張，1986)

表一、雞蛋蛋白中蛋白質之性質與特徵

Table 1. Properties and characteristics of the principal egg white proteins

Protein	Amount	Isoelectric point	Molecular mass	T _d ¹	Characteristics
	%		Da	°C	
Ovalbumin	54	4.5	45,000	84.0	Phosphoglycoprotein
Ovotransferrin	12	6.1	76,000	61.0	Binds metallic ions
Ovomucoid	11	4.1	28,000	79.0	Inhibits trypsin
Ovomucin	3.5	4.5–5.0	5.5–8.3 × 10 ⁶	—	Sialoprotein, viscous
Lysozyme	3.4	10.7	14,300	75.0	Destroys some bacteria
G ₂ globulin	4.0	5.5	3.0–4.5 × 10 ⁴	92.5	—
G ₃ globulin	4.0	4.8	—	—	—
Ovoinhibitor	1.5	5.1	49,000	—	Inhibits serine-proteases
Ovoglycoprotein	1.0	3.9	24,400	—	Sialoprotein
Ovoflavoprotein	0.8	4.0	32,000	—	Binds riboflavin
Ovomacroglobulin	0.5	4.5	7.7 × 10 ⁵	—	Strongly antigenic
Cystatin	0.05	5.1	12,700	—	Inhibits thiol-proteases
Avidin	0.05	10	68,300	85	Binds biotin

¹ T_d is the denaturation temperature in the water or buffer.

(Miguel and Alexandre, 2006)

3. 卵白蛋白

卵白蛋白(Ovalbumin, Ovoalbumin)為雞蛋蛋白中主要之蛋白質，佔蛋白中蛋白質的百分之五十四，球狀醣蛋白，等電點在 pH 4.5，由 385 個胺基酸組成，分子量約 45,000 道耳吞 (Nisbet *et al.*, 1981)。卵白蛋白由單一多胜肽鏈所構成，每一分子中含有一個醣鏈，其一次結構序列如圖一。卵白蛋白屬水溶性蛋白質，在雞蛋中的功能為控制水分含量，維持蛋白膠質特性的穩定。

卵白蛋白是蛋白中唯一擁有四個游離硫氫基(-SH group)的蛋白質，蛋白易受熱變性即卵白蛋白之故。原因是球蛋白分子受熱展開，含硫氫基之卵白蛋白引起硫氫基-雙硫鍵交換反應或硫氫基氧化反應，形成分子間的雙硫鍵(陳，2006)。

至今已有許多研究，探討過食品蛋白質所衍生的活性胜肽，但極少有探討卵白蛋白活性胜肽的研究，其中較有名的活性胜肽僅有 Fujita 等人(1995)以胃蛋白酶(pepsin)水解出的 ovokinin，這是一種八胜肽的第二型血管收縮素受器阻斷劑(Angiotensin II Receptor Blocker; ARB)，此活性胜肽序列(FRADHPFL)與人體內本有的降血壓胜肽 Bradykinin(RPPGFSPFR)，以及促進血壓上升的 Angiotensin II(DRVYIHPF)在結構上皆相似，所以可以競爭性抑制 Bradykinin 和 Angiotensin II 與 AT₁ receptor (Angiotensin II Receptor Type 1)結合，阻止訊息傳遞。作者以 25 mg/ Kg 活性胜肽混合 30% 卵黃乳化後餵食原發性高血壓大鼠(spontaneous hypertensive rats; SHR)，2~6 小時後 SHR 大鼠收縮壓較控制組低 15 mmHg，以 100 mg/ Kg 活性胜肽混合卵黃餵食，在 4 小時後較控制組低 25 mmHg，且效果可持續 24 小時以上。相同作者於 2000 年，將 ovokinin 以 10 mg/ Kg 靜脈注射 SHR 大鼠，在注射 2 小時後收縮壓降低 45 mmHg。可見卵白蛋白確實具有生產抗高血壓活性胜肽的潛力。

Ac-Gly-Ser-Ile-Gly-Ala-Ala-Ser-Met-Glu-Phe-Cys-Phe-Asp-Val-Phe-Lys-Glu-Leu-Lys-Val-His-His-Ala-Asn-Glu-Asn-Ile-Phe-Tyr-Cys-Pro-Ile-Ala-Ile-Met-Ser-
 Ala-Leu-Ala-Met-Val-Tyr- Leu-Gly-Ala-Lys-Asp-Ser-Thr-Arg-Thr-Gln-Ile-Asn-Lys-Val-Val-Arg-Phe-Asp-Lys-Leu-Pro-Gly-Phe-Gly-Asp-Ser-Ile-Glu-Ala-
 Gln-Cys-Gly-Thr-Ser-Val-Asn-Val-His-Ser-Ser-Leu-Arg-Asp-Ile-Leu-Asn-Gln-Ile-Thr-Lys-Pro-Asn-Asp-Val-Tyr-Ser-Phe-Ser-Leu-Ala-Ser-Arg-Leu-Tyr- Ala-
 Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu-Pro-Glu-Tyr-Leu-Gln-Cys-Val-Lys-Glu-Leu-Tyr-Arg-Gly-Gly-Leu-Glu-Pro-Ile-Asn-Phe-Gln-Thr-Ala- Ala-Asp-Gln- Ala- Arg-
 Glu-Leu-Ile-Asn-Ser-Trp-Val-Glu-Ser-Gln-Thr-Asn-Gly-Ile-Ile-Arg-Asn-Val-Leu-Gln-Pro-Ser-Ser-Val-Asp-Ser-Gln-Thr-Ala-Met-Val-Leu-Val-Asn-Ala-Ile-
 Val-Phe-Lys-Gly-Leu-Trp-Glu-Lys-Ala-Phe-Lys-Asp-Glu-Asp-Thr-Gln-Ala-Met-Pro-Phe-Arg-Val-Thr-Glu-Gln-Glu-Ser-Lys-Pro-Val-Gln-Met-Met-Tyr-Gln-
 Ile-Gly-Leu-Phe-Arg-Val-Ala-Ser-Met-Ala-Ser-Glu-Lys-Met-Lys-Ile-Leu-Glu-Leu-Pro-Phe-Ala-Ser-Gly-Thr-Met-Ser-Met-Leu-Val-Leu-Leu-Pro-Asp-Glu-Val-
 Ser-Gly-Leu-Glu-Gln-Leu-Glu-Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu-Thr-Glu-Trp-Thr-Ser-Ser-Asn-Val-Met-Glu-Glu-Arg-Lys-Ile-Lys-Val-Tyr-Leu-Pro-Arg-Met-
 Lys-Met-Glu-Glu-Lys-Tyr-Asn-Leu-Thr-Ser-Val-Leu-Met-Ala-Met-Gly-Ile-Thr-Asp-Val-Phe-Ser-Ser-Ser-Ala-Asn-Leu-Ser-Gly-Ile-Ser-Ser-Ala-Glu-Ser-Leu-
 Lys-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-Glu-Val-Val-Gly-Ser-Ala-Glu-Ala-Gly-Val-Asp-Ala-Ala-Ser-Val-Ser-Glu-Glu-
 Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu-Phe-Cys-Ile-Lys-His-Ile-Ala-Thr-Asn-Ala-Val-Leu-Phe-Phe-Gly-Arg-Cys-Val-Ser-Pro

Disulphide bridge between positions 75 and 120.

(P) at position 68, (CHO) at position 292, (ASP) at position 312.

The positions of the phosphoserines are indicated by (P); the carbohydrate by (CHO); the genetic variant by (ASP).
 (Nisbet *et al.*, 1981)

圖一、卵白蛋白的胺基酸序列。

Figure 1. Amino acid sequence of ovalbumin.

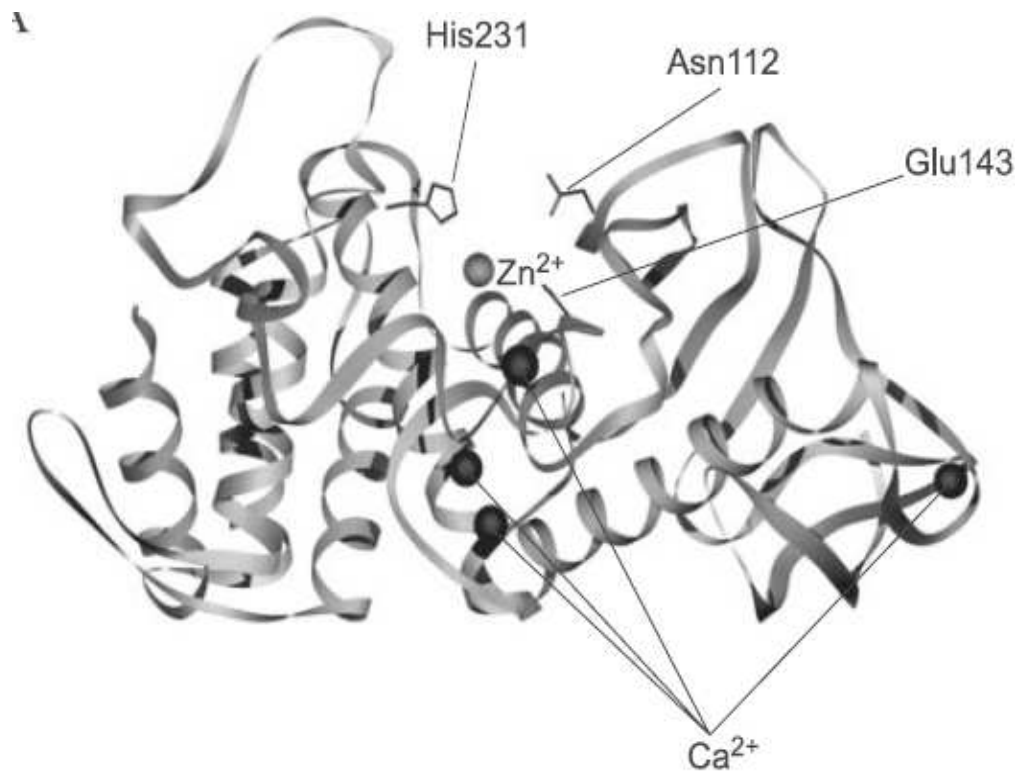
二、熱水解酵素(Thermolysin)簡介

1. 基本性質

Thermolysin(EC 3.4.24.27)產自於 *Bacillus thermoproteolyticus rokko*，其結構穩固且熱抗性高，是一種熱穩定性(thermostable)的胞外金屬性外切胜肽水解酵素(metalloexopeptidase)，需要一個鋅離子與四個鈣離子來維持結構穩定(圖二)。許多研究指出，Thermolysin的辨識作用位置，是胺基酸側鏈中具有長鏈疏水性基團(Leucine、Isoleucine、Valine)、側鏈為芳香族基團的胺基酸(Phenylalanine)和為Proline的氮端，且 thermolysin 對於不同的基質或不同的作用環境下，會有不只催化胜肽鍵裂解的效果存在。(Ligne *et al.*, 1997)

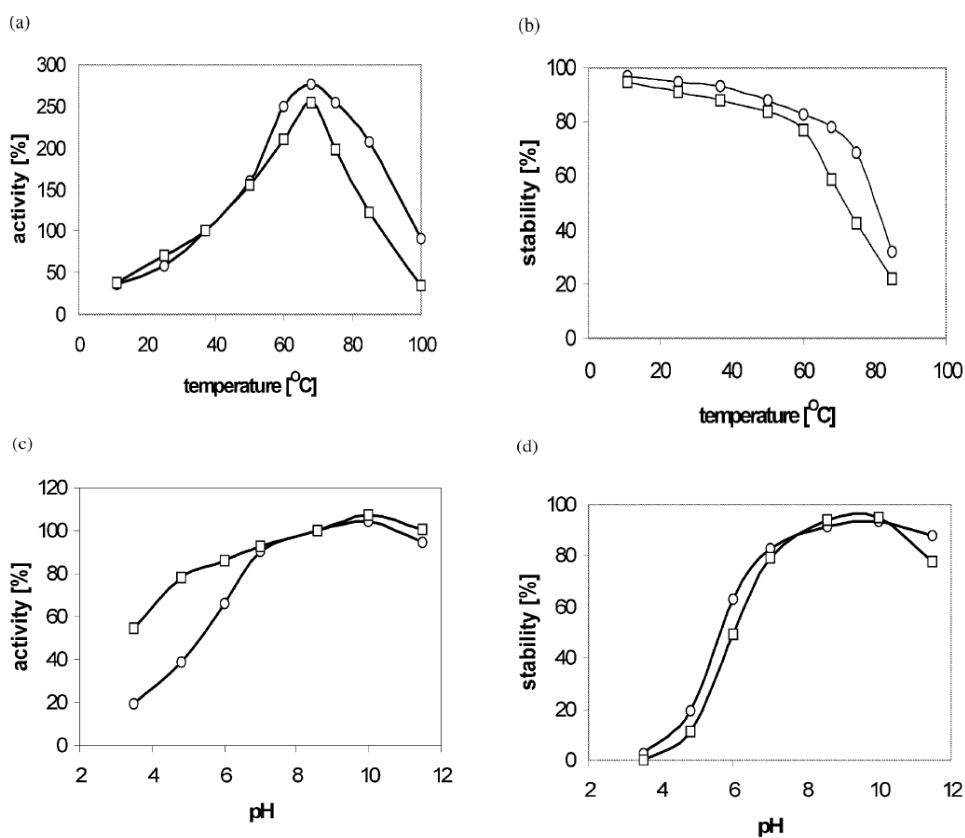
2. 最適作用環境

Trusek-Holownia (2003) 以 Tris-HCl 緩衝液與 Tris-HCl/Acetate-Ethyl 雙緩衝液系統測試 Thermolysin 活性與穩定度(圖三)。pH 值固定於 7 時，在 60°C~80°C 之間擁有最高的作用活性，在溫度高於 70°C 之後，thermolysin 穩定度隨溫度升高逐漸下降。當維持恆溫於 60°C，pH 值自 11.5 降至 5.5 作用時，酵素活性在 pH 7~10 之間擁有較佳活性，在 pH 6~10 之間酵素具有較好的穩定性，所以可知 Thermolysin 的最適作用環境為 60~70°C、pH7~10。



(Kusano *et al.*, 2006)

圖二、thermolysin 的活性區。
Figure 2. The active site of thermolysin.



(Trusek-Holownia, 2003)

圖三、於 Tris-HCl 緩衝液與醋酸乙酯-Tris-HCl 雙相緩衝液系統中溫度及酸鹼度對 thermolysin 活性與穩定性的影響。

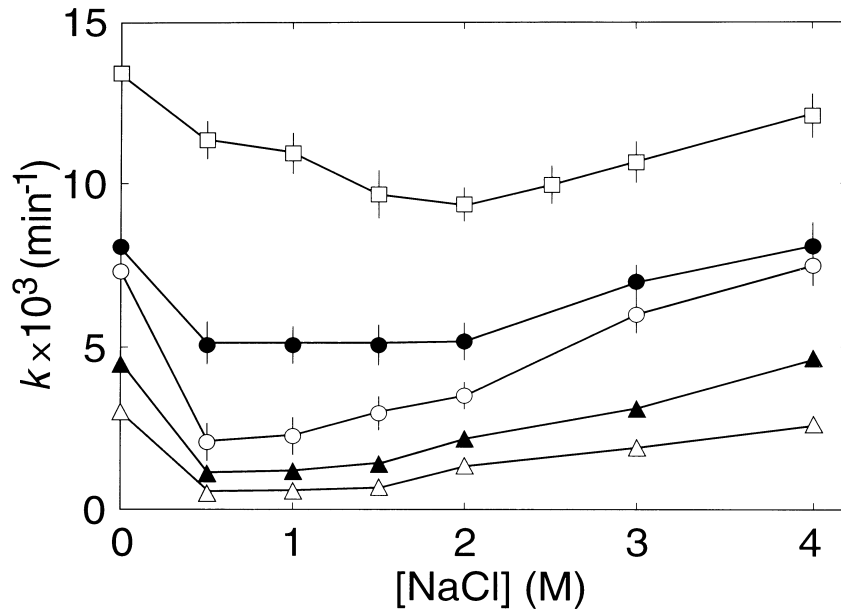
Figure 3. The effect of temperature and pH on thermolysin activity and stability in Tris-HCl buffer (○) and biphasic ethyl acetate-Tris-HCl buffer system (□).

3. 鹽類與醇類的影響

Inouye (1992)研究指出，在作用環境中含有天然鹽類會影響 Thermolysin 的作用活性，而其中又以氯化鈉與溴化鈉最為重要。作者在 1994 年以 thermolysin 混以氯離子與溴離子鹽類，探討酵素與鹽類交互作用，得知 Thermolysin 會與環境中的正一價陽離子互相影響，使結構中之 tyrosyl 和 tryptophyl 的側鏈離子化型態發生改變，並使水解最適溫度略為提升，而正一價陽離子對 thermolysin 的影響力為 $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$ 。

另外 Inouye 等人於 1998 年提出，作用環境中含低濃度(0.5M)的鹽類會使酵素活性略為下降，而高濃度(4M)的鹽類則可增加酵素對熱的穩定性(圖四)。又 Thermolysin 結構穩定，Miyoshi 等人(1991)以 Tris-HCl 緩衝液與去離子水水解 α -Zein protein，發現去離子水缺少離子干擾，水解效果反而較具 Tris buffer 來得好。

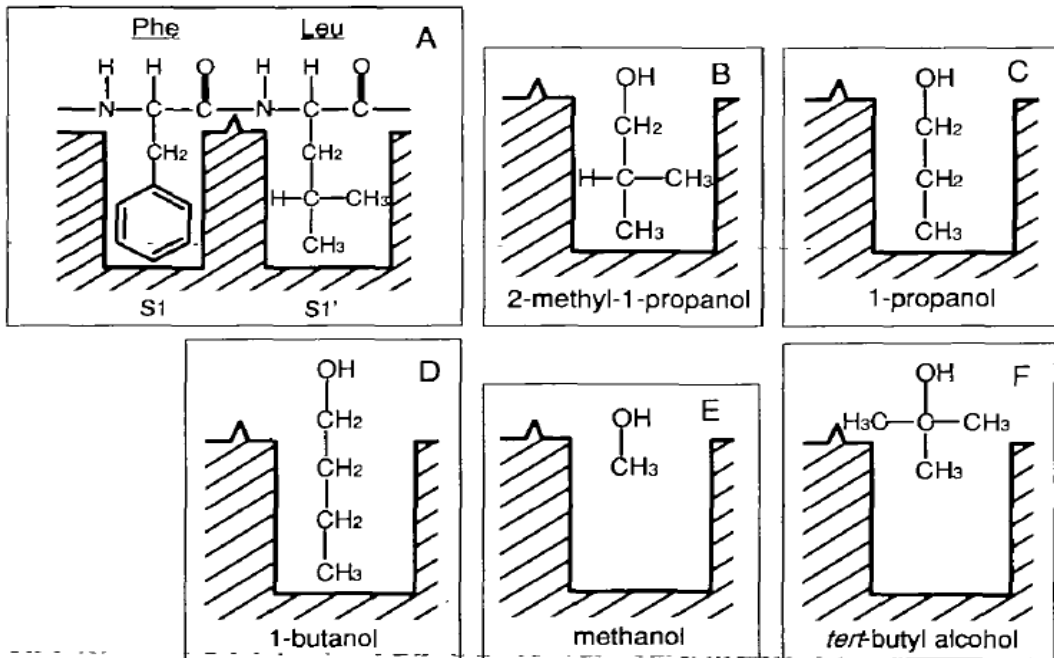
Thermolysin 水解環境中含有醇類，會造成 thermolysin 活性下降。原因在於醇類與疏水性胺基酸側鏈結構相似，會與基質發生競爭型抑制，如圖五 A 中 Phe-Leu 與 thermolysin 活性位鍵結，胜肽鍵自中間處斷裂，若如圖五 B~F 中作用位含有醇類，胜肽則難以鍵結。Thermolysin 對於醇類存在十分敏感，與 α -cymotrypsin 和 subtilisins 相比，其敏感度高達兩者的 4~5 倍。Muta 與 Inouye 分析十二種醇類對 Thermolysin 的影響，發現僅 35~430mM 的醇類即可抑制酵素作用，影響力 1-pentanol, 1-propanol, 2-butanol, 2-methyl-1-propanol > 1-butanol > 2-propanol > ethanol, tert-amyl alcohol » tert-butyl alcohol » methanol。但若加入鹽類後，可使醇類之抑制效果減弱，這與 Thermolysin 的結構活性(structure- activity)有很大的關連性。(Muta and Inouye, 2002)



(Inouye *et al.*, 1998)

圖四、氯化鈉濃度對 thermolysin 熱失活速率之關係。

Figure 4. Dependence of the rate of thermal inactivation of thermolysin on NaCl concentration. 60°C (Δ), 65°C (▲), 70°C (○), 75°C (●), and 80°C (□).



(Muta and Inouye, 2002)

圖五、醇類鍵結於 thermolysin 作用位之圖示。

Figure 5. Schematic view of the binding of alcohols to the subsites of thermolysin.

三、蛋白質水解胜肽之應用

1. 蛋白質水解的目的與益處

蛋白質進行水解的目的不外乎增加營養性、改善質地、增加或減少溶解度、降低黏度、增進起泡性或凝聚特性、增加風味等(Lahl and Braum, 1994)。

蛋白質經酵素催化等方法水解得到的產物稱為水解蛋白或蛋白水解物(protein hydrolysate)，又依來源性分為植物水解蛋白與動物水解蛋白兩種。植物水解蛋白，主要獲自於油廠副產品餅粕中，其中含 15~50%蛋白質，丟棄易造成浪費，若以酵素水解提高蛋白質水溶性，可作為食品添加劑添加於麵食、飲料等食品中，增加胺基酸與蛋白質含量。動物水解蛋白主要是豬血、骨及魚製成，它作為一種食品添加劑，至今仍有廣泛的應用。(劉，2004)

水解蛋白的特性有二，一是在酸性條件下有較高的溶解度，尤其是在等電點附近，且熱穩定性高，二是在高濃度範圍內，仍為低黏度溶液(Frokjaer, 1994)，此在液態食品上具有很好的應用性。

Grimble and Silk(1989)研究發現，人類攝食蛋白質經腸胃道消化作用後，並不完全以游離胺基酸型態吸收，而多以短鏈胜肽之形式吸收。且水解蛋白除了保留原本蛋白質之營養成分，提供營養性的吸收，也可消除部份蛋白質的抗原性，降低過敏的發生，亦可產生具功能性的特殊胜肽序列，如呈味肽、降血壓胜肽等。(郭，2001)

2. 胜肽應用

近來有許多不同功用之胜肽被分離出，其主要的用途分為以下

幾種(陳，1999)：

1) 生物活性胜肽

從化學結構與功能性來看，生物活性胜肽大概是最複雜且功能最廣的物質，且一條胜肽可同時具有不同生物活性。主要分為可調節神經訊號的神經活性胜肽，可抑制 ACE 之酵素調節胜肽，增加金屬離子吸收率之磷胜肽，還有可調節免疫反應，減緩過敏等不適徵狀的免疫活性胜肽等。此種胜肽以牛乳中蛋白質最廣為研究，如表二中的 α -Immunocasinin 即同時具有調節免疫反應與抑制 ACE 酵素活性的功能。

2) 呈味胜肽

此類胜肽主要是作為食品添加劑，增添食品風味使用。有名的有低熱量甜味劑 Aspartame(Asp-PheOMe)與 Alitame (L-Asp-D-AlaNH₂)，以木瓜酵素自牛肉中水解出之美味肽(Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala)，與具鮮味之短鏈麩胺酸多肽(Glu-Glu, Glu-Glu-Glu)。

3) 抗氧化胜肽

某些胜肽可以降低含油脂食品的自氧化速率與過氧化物的含量，其原理不外乎捕捉金屬離子或促進過氧化物分解，且該胜肽片段中多半含組胺酸，例如 carnosine (β -Ala-His)(Chan *et al.*, 1993)。這些胜肽因為具有天然的特性，所以十分適合取代化學合成的抗氧化劑添加到食品中。

4) 營養性胜

此類胜肽應用在配方食品上，由於胜肽與游離胺基酸相比，胜肽滲透壓較低，可避免腸胃不適及提高吸收率，作為食品補充物，加強必須氨基酸或提供特殊營養缺乏者使用。

表二、在牛乳蛋白中多功能生物活性胜肽之舉例

Table 2. Examples of multifunctional bioactive peptides encrypted in bovine milk proteins.

Peptide sequence	Fragment	Name	Preparation	Bioactivity
TTMPLW ³	α S1-CN (f194–199)	α - Immunocasokinin	Trypsin	immunomodulatory, ACEinhibitory (hypotensive in vivo)
QMEAEΣΙΣΣΣ EEIVPNΣVENK ³	α S1-CN (f59–79)5P	Caseinophospho- peptide	Trypsin	mineral binding, immunomodulatory
KNTMEHVΣΣΣΣ EESIIΣQETYK QEKNNMAINPSK ³	α S2-CN (f1–32)3P	Caseinophospho- peptide	Trypsin	mineral binding, immunomodulatory
RELEELNVPGEI VEΣLΣΣΣΣ EESETRINK ³	β -CN (f1–25)4P	Caseinophospho- peptide	Trypsin, Cheese ripening	mineral binding, immunomodulatory, cytomodulatory
YPFPGPIPNSL ³	β -CN(f60–70)	β -Casomorphin-11	intestinal digestion (jejunum), Fermentation+ Pepsin+Trypsin	opioid, ACE-inhibitory, immunomodulatory (f63–68)
YPFPGPI ³	β -CN(f60–66)	β -Casomorphin-7	Trypsin	opioid, ACE-inhibitory, immunomodulatory, cytomodulatory
AVPYPQR ³	β -CN (f177–183)	β -Casokinin	Trypsin, Fermentation	ACE-inhibitory, immunomodulatory, cytomodulatory
YQQPVL	β -CN (f193–198)	β - Immunocasokinin	Fermentation+ Pepsin+Trypsin	ACE-inhibitory, immunomodulatory
YPSYGLN	κ -CN(f35–41)	Casoxin A	Pepsin+Trypsin	opioid (antagonist), ACEinhibitory
YIPIQYVLSR	κ -CN(f25–34)	Casoxin C	Trypsin	opioid (antagonist), ACEinhibitory, smooth muscle (ileum, artery) contraction
YG	κ -CN(f38–39) α -LA(f50–51) (f18–19)	κ -Immunocasokinin α -Immunolactokinin	Synthesis	immunomodulatory, ACEinhibitory

(接續上頁)

Peptide sequence	Fragment	Name	Preparation	Bioactivity
YGLF3	α -LA(f50–53)	α -Lactorphin	Pepsin	opioid, ACE-inhibitory (hypotensive in vivo)
YLLF3	β -LG(f102–105)	β -Lactorphin	Pepsin + Trypsin	opioid, ACE-inhibitory, smooth muscle (ileum) contraction
FKCRRWQWRM KKLGAPSITCVR RAF ³	LF(f17–41)	Lactoferricin	Pepsin	antimicrobial, immunomodulatory
ALKAWSVAR	BSA(f208–216)	Albutensin A	Trypsin	ACE-inhibitory, smooth muscle (ileum) contraction, artery relaxation

1.The one-letter amino acid codes were used; Phosphoserine = Σ .

2.Sequence contains also smaller bioactive fragments.

(Meisel, 2004)

四、高血壓(Hypertension)

1. 高血壓簡介

血壓是由心臟的加壓、血管本身的彈性及血液在血管中流動時對血管壁所造成的壓力，此三者共同造成，而血壓的高低，由心臟搏出量及週邊血管阻力共同決定。一般血壓測量分為收縮壓及舒張壓兩種，根據世界衛生組織於 1959 年對高血壓之定義為「一般成年人，收縮壓低於 140 mmHg 及舒張壓低於 90 mmHg 為正常血壓。若收縮壓高於 160 mmHg 及舒張壓高於 95 mmHg 即稱為高血壓。」而聯合國委員會(Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure; JNC VI, 2003)修訂之標準為，理想性的血壓(Optimal blood pressure)收縮壓應在 120 mmHg、舒張壓在 80 mmHg 以下，一般血壓(Normal blood pressure)收縮壓應在 120~130 mmHg、舒張壓在 80~84 mmHg 超過則有罹患高血壓之潛在性，當收縮壓高於 140 mmHg 及舒張壓高於 90 mmHg 就是高血壓。

以 JNC VI 為標準，根據國民健康局 91 年台灣區三高調查資料顯示，我國在 15 歲以上的人中，高血壓盛行率 21.38%，男性為 24.9%，女性為 18.2%，65 歲以上的人，高血壓盛行率更高達 56.6%，96 年再以相同族群進行三高追蹤調查結果顯示，15 歲以上國人在五年內之三高發生率以高血壓(千分之 27.5)為最嚴重。行政院衛生署統計九十六年度我國主要死亡原因(表三)，高血壓性疾病位居第十，全國每十萬人中就有 8.6 人死於高血壓。

表三、民國九十六年我國主要死亡原因

順位	合計			男性			女性		
	死亡原因	每十萬人口死亡率	死亡百分比	死亡原因	每十萬男性人口死亡率	死亡百分比	死亡原因	每十萬女性人口死亡率	死亡百分比
	所有死亡原因	608.2	100.0	所有死亡原因	740.3	100.0	所有死亡原因	472.7	100.0
1	惡性腫瘤	175.9	28.9	惡性腫瘤	222.6	30.1	惡性腫瘤	128.0	27.1
2	心臟疾病	56.7	9.3	心臟疾病	66.0	8.9	心臟疾病	47.2	10.0
3	腦血管疾病	56.2	9.2	腦血管疾病	66.0	8.9	糖尿病	46.3	9.8
4	糖尿病	44.6	7.3	事故傷害	45.5	6.1	腦血管疾病	46.1	9.8
5	事故傷害	31.1	5.1	糖尿病	43.1	5.8	腎炎、腎徵候群及腎性病變	22.0	4.7
6	肺炎	25.7	4.2	肺炎	33.2	4.5	肺炎	18.0	3.8
7	慢性肝病及肝硬化	22.5	3.7	慢性肝病及肝硬化	32.1	4.3	事故傷害	16.4	3.5
8	腎炎、腎徵候群及腎性病變	22.2	3.7	自殺	22.8	3.1	慢性肝病及肝硬化	12.6	2.7
9	自殺	17.2	2.8	腎炎、腎徵候群及腎性病變	22.5	3.0	自殺	11.4	2.4
10	高血壓性疾病	8.6	1.4	高血壓性疾病	8.3	1.1	高血壓性疾病	8.9	1.9
	其他	147.3	24.2	其他	178.2	24.1	其他	115.7	24.5

附註：1.臺灣地區年中人口數計 22,917,444 人，男性 11,600,237 人，女性 11,317,206 人。

(資料來源：行政院衛生署)

2. 高血壓之成因

高血壓可依成因，分為續發性高血壓(Secondary Hypertension)與本態性高血壓(Primary Hypertension)兩種。續發性高血壓主要是由腎臟病所造成，但偶爾也出現因為主動脈狹窄、某些荷爾蒙分泌過多，以及與腦垂體、腎上腺、腎臟腫瘤或血流壓縮有關的病症所引起。本態性高血壓又稱原發性高血壓，發病原因不明，有可能是遺傳因子缺失、過多鹽類攝取、環境因素等互相影響所造成的。

造成體內血壓升高的可能性有以下幾種學說(黃，2002)：

1) 自動調節說(Autoregulation)：

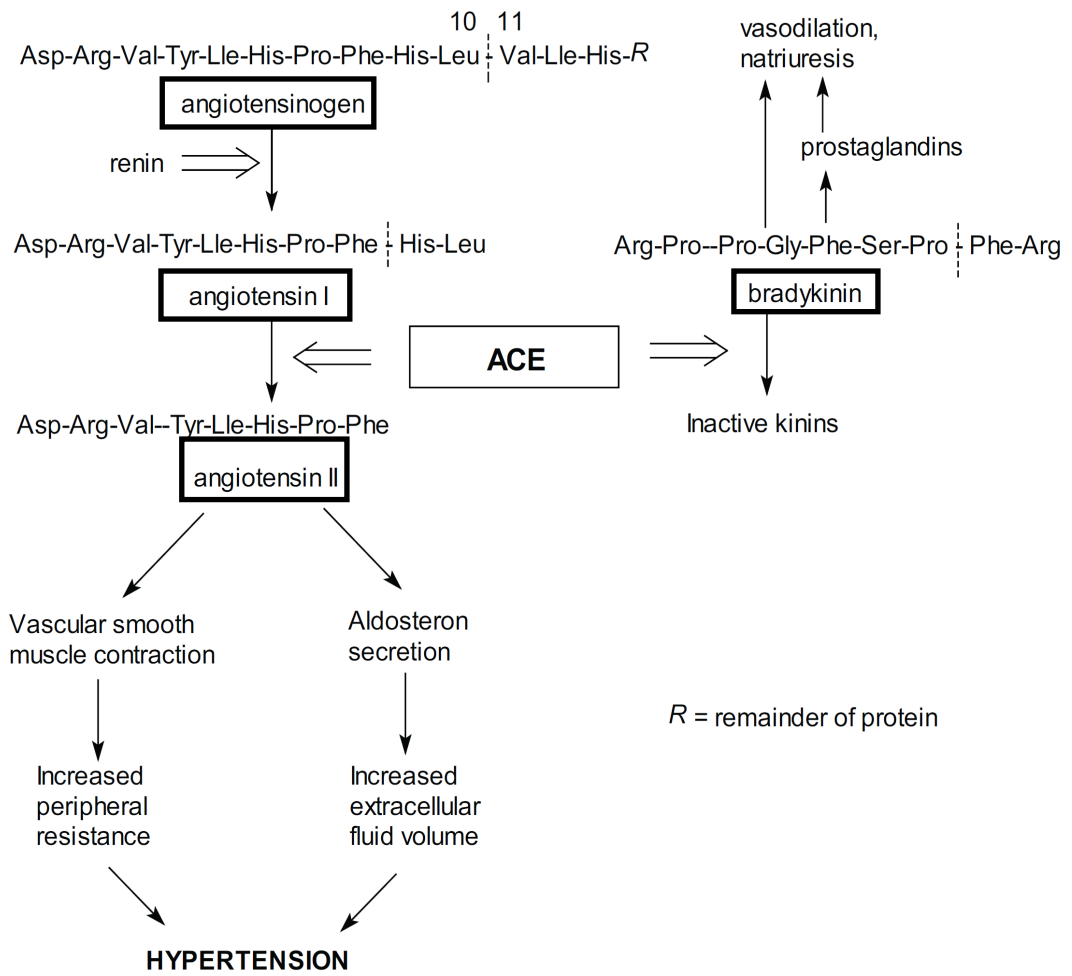
攝食鹽類增加，使心臟搏出量增加，為維持血壓調節血流量，末梢血管阻力上升以降低血流量，此時血壓升高，如此持續重複循環便會造成高血壓。

2) 鈉輸送障害說：

由 Dahl & Heine (1975)提出。由於基因上有 renal sodium excretion 的缺陷遺傳，使腎臟無法排除鹽類，導致血壓上升。

3) 腎素-血管收縮素-醛固酮系統(Renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)：

RAAS 在人體內負責血管張力、鹽分及水分的平衡。圖六為其造成血壓上升的途徑，主要是將血管收縮素原經腎素、血管收縮素轉化酵素轉換成第二型血管收縮素，影響血管收縮。



(Barbosa-Filho *et al.*, 2006)

圖六、血管收縮素對高血壓機制之影響。

Figure 6. The suggested hypertensive mechanism of angiotensin.

3. 治療方法

高血壓之藥物治療方法有以下幾種：

1) 利尿劑：

主要功用為降低體內液體含量，促使腎臟將更多的鈉排到尿裡，有效且便宜。但會導致頻尿及鉀離子流失或蓄積，使體內鉀離子失衡。

2) 乙型阻斷劑(Beta-blocker)：

主要功用，是藉著阻斷正腎上腺素的作用來降低血壓，適用於有高血壓合併有其他心臟血管疾病的患者。但使用後會感到疲勞，活動力下降。有氣喘或心臟傳導系統有毛病的人，不應該使用這類藥物。

3) 血管收縮素轉化酶抑制劑(ACEI)：

主要功用為抑制血管收縮素轉化酵素(ACE)在 RAAS 中之作用，但會產生乾咳、味覺改變、食慾減低等症狀(Atkinson and Robertson, 1979)。副作用不常見，但有些人服用後會引起暈眩、鼻塞、背部及腿疼痛、腹瀉、消化不良及失眠等副作用。

4) 血管收縮素 II 受器阻斷劑(ARB)：

主要作用，在阻止第二型血管收縮素(Angiotensin II)與 RAAS 途徑中的 AT₁ receptor (Angiotensin II receptor type 1)結合，但不會造成乾咳，屬於較新的降壓藥。

5) 鈣離子拮抗劑(Calcium channel blockers; CCB)：

主要功用，在抑制動脈的周邊肌肉裡的鈣離子通道，阻止鈣離子進入肌肉細胞，抑制血管收縮、減緩心跳的速率。但會造成便秘、頭痛、心悸、起紅疹、小腿及腳水腫、牙齦腫大等副作用。

五、血管收縮素轉化酵素抑制物(Angiotensin I-converting enzyme inhibitor ; ACEI)

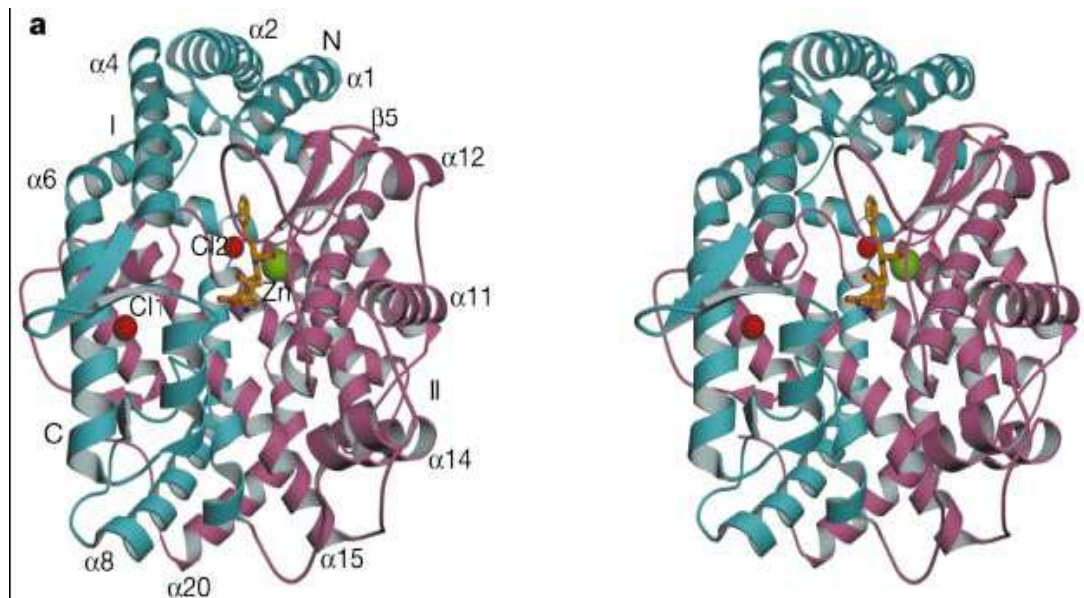
1. 血管收縮素轉化酵素(Angiotensin I- converting enzyme; ACE)與 ACEI 作用原理

血管收縮素轉化酵素(EC 3.4.15.1)是一種金屬性外切型雙胜肽碳端水解酵素，由圖七可看出為穩定構形，需要一個鋅離子與兩個氯離子維持活性結構。ACE 為 RAAS 途徑中的一個調控因子，目前研究已知此酵素在心血管及腎臟方面疾病之治療皆扮演重要角色(Natesh *et al.*, 2003)。在體內的功用主要是固定在細胞膜上(membrane- anchored)，把不具活性的第一型血管收縮素(Angiotensin I)，轉化為能影響下游的第二型血管收縮素(Angiotensin II)。

而 ACEI 即是可與第一型血管收縮素競爭 ACE 酵素的活性區域，抑制 ACE 製造第二型血管收縮素及水解 bradykinin，以降低血壓。

2. ACEI 種類

自從 1970 年代從巴西響尾蛇毒液中，分離出第一個血管收縮素轉化酵素抑制物，之後便陸續有許多 ACEI 合成藥物被開發用以治療高血壓。但藥物多有其副作用，故有學者提出自食品中尋找 ACEI。(陳，2009)



(Natesh *et al.*, 2003)

圖七、以立體帶狀圖表示血管收縮素轉化酵素之分子結構活性位。
 Figure 7. Stereo view of the ribbon representation of the molecule looking down on the active site of ACE.

1) 藥物

抗高血壓藥物，主要以化學性質分為含硫氫基(如：Captopril)、二羧基(如 Enalapril)和磷酸酯(如 Fosinpril)三種。所有 ACEI 藥物都是含氮化合物，其結構皆與胜肽類似。長期服用恐產生乾咳、味覺改變等副作用。

2) 食品

食品中具有 ACEI 效果的物質，主要是食物中的蛋白質經酵素水解後的短鏈胜肽，其鏈長多半在 2-14 個胺基酸，由於食品中蛋白質本具食用性，故遠較藥物有安全性。Cheung 等人(1980)歸納出當 ACEI 胜肽碳端為芳香族胺基酸、氮端為長鏈型或具分岔支鏈之胺基酸，皆有不錯的 ACE 抑制活性。Kobayashi 等人(2008)以合成胜肽探討三肽 ACEI 的抑制機制，發現若是疏水性胺基酸-正電胺基酸-芳香族胺基酸的組合，其 ACE 抑制效果最好，原因為帶正電胺基酸可在酵素活性區形成較強的鍵結，不易離開，而芳香族胺基酸體積較其他胺基酸龐大，則可阻止其他基質接近酵素活性位。

抗血壓胜肽來源多元，由表四至七可看出，之中有動物性的卵白蛋白、明膠、雞肉、鮪魚、鰹柴魚，植物性的大豆蛋白、玉米蛋白，另外現有發酵食品如醬油、味噌、發酵乳等也是來源之一，其中最廣為人知的是 Nakamura (1994)於可爾必思發酵乳中分離出之 VPP 與 LPP，這兩種胜肽以 HPLC 分析方法測定與餵食原發性高血壓大鼠皆有很好的結果。但有些水解胜肽以 HPLC 法測試 ACEI 活性，能得到很好的效果，但餵食原發性高血壓大鼠，卻無明顯降血壓效果。

表四、食品蛋白酵素水解物之血管收縮素轉化酵素抑制活性

Table 4. ACE inhibition by enzymatic digests of food proteins

Substrate	Protease	IC ₅₀ (µg/mL)
Chicken muscle	Thermolysin	45.0
Ovalbumin	Thermolysin	83.0
	Pepsin	45.3
	Trypsin	> 1000
	Chymotrypsin	> 1000

(Fujita *et al.*, 2000)

表五、自雞蛋蛋白質酵素水解物中獲得之降血壓活性胜肽

Table 5. Peptides with possible antihypertensive activity obtained by enzymatic treatment of egg proteins

Origin	Sequence	Enzyme	Activity demonstrated
Egg white	RADHPFL	Pepsin	ACEI/Antihypertensive
	YAEERYPIL	Pepsin	ACEI/Antihypertensive
	IVF	Pepsin	ACEI/Antihypertensive
	RADHP	Pepsin/ Corolase PP	ACEI/Antihypertensive
Ovalbumin	FRADHPFL	Pepsin	Vasorelaxing/Antihypertensive
	RADHPF	Chymotrypsin	Vasorelaxing/Antihypertensive
	FGRCVSP	Pepsin	ACEI
	ERKIKVYL	Pepsin	ACEI
	FFGRCVSP	Pepsin	ACEI
	LW	Pepsin	ACEI/Antihypertensive
	FCF	Pepsin	ACEI
	NIFYCP	Pepsin	ACEI
Egg yolk	Oligopeptides	Several enzymes	ACEI/Antihypertensive

(Miguel and Aleixandre, 2006)

表六、脊椎動物肌肉蛋白衍生ACE抑制胜肽。

Table 6. ACE Inhibitory Peptides Derived from Muscle Protein of Vertebrates.

Source	amino acid sequence	parent protein	enzyme	IC ₅₀ (μM)
Vertebrates				
Bonito	IKPLNY	muscle	thermolysin	43
	IVGRPRHQQ	actin	thermolysin	2.4
	IWHHT	actin	thermolysin	5.8
	ALPHA	actin	thermolysin	10
	FQP	actin	thermolysin	12
	LKPNM	muscle	thermolysin	2.4
	IY	actin	thermolysin	2.31
	DYGLYP	muscle	thermolysin	62
	LKP	muscle	thermolysin	0.32
	IWH	actin	thermolysin	3.5
	IKP	muscle	thermolysin	6.9
	IVGRPR	actin	thermolysin	300
	Salmon	WA	muscle	thermolysin
VW		muscle	thermolysin	2.5
WM		muscle	thermolysin	96.6
MW		muscle	thermolysin	9.9
IW		muscle	thermolysin	4.7
LW		muscle	thermolysin	17.4
Sardine	MF	muscle	alcalase	44.7
	RY	muscle	alcalase	51
	MY	muscle	alcalase	193
	LY	muscle	alcalase	38.5
	YL	muscle	alcalase	82
	IY	muscle	alcalase	10.5
	VF	muscle	alcalase	43.7
	GRP	muscle	alcalase	20.0
	RFH	muscle	alcalase	330
	AKK	muscle	alcalase	3.13
	RVY	muscle	alcalase	205.6
GWAP	muscle	alcalase	3.86	
KY	muscle	alcalase	1.63	

(接續上頁)

Source	Amino acid sequence	parent protein	enzyme	IC ₅₀ (μM)
Vertebrates				
	VY	muscle	alcalase	10
Tuna	PTHIKWGD	muscle	acid	-
Alaska Pollack	GPL	skin	alcalase+pronase+ collagenase	2.65
	GPM	skin	alcalase+pronase+ Collagenase	17.13
Pork	ITTNP	myosin	thermolysin	549.0
	MNPPK	myosin	thermolysin	945.5
	MNP	myosin	synthesized	66.6
	NPP	myosin	synthesized	290.5
	PPK	myosin	synthesized	>1000
Pork	ITT	myosin	synthesized	678.2
	TTN	myosin	synthesized	672.7
	TNP	myosin	synthesized	207.4
	RMLGQTPTK	troponin C	pepsin	34
	RMLGQTP	troponin C	pepsin	503
Chicken	LKA	creatine Kinase	thermolysin	8.5
	LKP	aldolase	thermolysin	0.32
	LAP	muscle	thermolysin	3.2
	FQKPKR	myosin	thermolysin	14
	IVGRPRHQG	actin	thermolysin	2.4
	FKGRYYP	creatine kinase	thermolysin	0.55
	IKW	muscle	thermolysin	0.21
Invertebrates				
Antartic krill	KLKfV	muscle	pepsin+ trypsin	30
Oyster	LF	muscle	denazyme AP	126
	FY	muscle	alcalase	-
	AW	muscle	alcalase	-
	VW	muscle	alcalase	-
	GW	muscle	alcalase	-

(Vercruyssen *et al.*, 2005)

表七、來自特定蛋白質的血管收縮素轉化酵素抑制物

Table 7. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors from Some Proteins.

Source	Peptide	Preparation	IC ₅₀ (μM)
Snake venom	Pyr-WPRPTPNIPP	Extraction	2
	Pyr-WPRPNIPP	Extraction	3
	Pyr-NWPRPNIPP	Extraction	3
	Pyr-NWPHPNIPP	Extraction	9
	Pyr-SWPGPNIPP	Extraction	39
	Pyr-GGWPRPGPEIPP	Extraction	13
	Pyr-NWPHPNIPP	Extraction	13
α ₁ -Casein	FFVAPFPEVFGK	Trypsin	77
	FFVAP	Peptidase	6
	TTMPLW	Trypsin	16
	PLW	Synthesis	36
	LW	Synthesis	50
	VAP	Synthesis	2
	FVAP	Synthesis	10
—	FAP	Synthesis	3.8
β-Casein	AVPYQR	Trypsin	15
h-β-Casein	IYPFVEPI	Synthesis	8
	IYPFVEPIP	Synthesis	12
	LIYPFVEPIP	Synthesis	9
	IYPFVEPIPY	Synthesis	20
	YPFVEPIPY	Synthesis	20
	PFVEPIPY	Synthesis	25
	FVEPIPY	Synthesis	55
	PIPY	Synthesis	30
	γ-Zein	VHLPPP	Thermolysin
VHLPP		Synthesis	18
LPP		Synthesis	9.6
—		VHIPP	Synthesis
—	VHLAP	Synthesis	4.5
α-Zein	LRP	Thermolysin	0.27
	LSP	Thermolysin	1.7
	LQP	Thermolysin	1.9
Tuna muscle	PTHIKWGD	Synthesis	0.9
	PTHIKWG	Synthesis	7.6
	PTHIKW	Synthesis	1.8
	THIKWGD	Synthesis	50
	HIKWGD	Synthesis	50
	PTHIKWD	Synthesis	38

(接續上頁)

Source	Peptide	Preparation	IC ₅₀ (μM)	
Tuna muscle	IKPLNY	Thermolysin	43	
	IVGRPRHQG	Thermolysin	6.2	
	VGRPRHQG	Synthesis	5.4	
	GRPRHQG	Synthesis	34	
	RPRHQG	Synthesis	22	
	IW	Synthesis	2	
	IWHHTF	Synthesis	2.5	
	IWHHT	Thermolysin	5.1	
	WHHTF	Synthesis	46	
	HHTF	Synthesis	84	
	ALPHA	Thermolysin	10	
	LKPNM	Thermolysin	17	
	IY	Thermolysin	3.7	
	FQP	Thermolysin	12	
	DYGLYP	Thermolysin	62	
	DMIPAQK	Thermolysin	45	
	IKP	Synthesis	1.7	
	LNY	Synthesis	81	
	—	PTHIDW	Synthesis	13
	—	PTHIAW	Synthesis	0.39
—	PTHVAW	Synthesis	1.5	
—	LYP	Synthesis	6.6	
Bonito	VRP	Autolysis	2.2	
	IKP	Autolysis	2.5	
	LRP	Autolysis	1	
	IRP	Autolysis	1.8	
	SVAKLEK	Autolysis	82	
	ALPHA	Autolysis	79	
	GVYPHK	Autolysis	1.6	
	IRPVN	Autolysis	1.4	
	GVYPHK	Autolysis	1.6	
	VYPHK	Autolysis	7.6	
IRP	Autolysis	1.8		
IRPV	Autolysis	31		

(Yamamoto , 1997)

貳、材料與方法

一、實驗藥品與儀器

1. 藥品:

(1) Protein hydrolysis

Chicken egg albumin (Sigma; USA)

Thermolysin EC 3.4.24.27(Sigma; USA)

Sodium hydroxide (Riedel- de Haën; UK)

(2) Protein content

β - mercaptoethanol (Merck; Germany)

L-Leucine (Sigma; USA)

Methyl alcohol LC grade (Mallinckrodt Chemicals; USA)

o- Phthalaldehyde (MP Biomedicals, Inc.; USA)

Sodium dodecyl sulfate (USB; Spain)

Sodium tetraborate decahydrate (Riedel- de Haën; UK)

Sulfuric acid (Union Chemical Works; Taiwan)

(3) High performance liquid chromatography

Acetonitrile LC grade (J.T. Baker; USA)

Angiotensin I-Converting Enzyme from rabbit lung EC 3.4.15.1
(Sigma; USA)

Boric acid (Hayashi Pure Chemical; Japan)

Cytochrome C (Sigma; USA)
Gastrin (MP Biomedicals, Inc.; USA)
Glycine (Sigma; USA)
Gly-Gly-Gly (Sigma; USA)
Hexaglycine (Sigma; USA)
Hippuryl-histidyl-leucine (Sigma; USA)
ortho- Phosphoric acid (Merck; Germany)
Sodium chloride (Riedel- de Haën; UK)
Substance P (MP Biomedicals, Inc.; USA)
Trifluoroacetic acid (Riedel- de Haën; UK)

2. 儀器:

(1) Protein hydrolysis

Amicon stirred ultrafiltration cell 8200 (Millipore; USA)
Econo-Column Pump (Bio-Rad; USA)
Hitachi himac high-speed refrigerated centrifuges CR22G II
(Hitachi; Japan)
Micro high-speed centrifuges (Hettich zentrifugen; Germany)
PHM82 standard pH meter (Radiometer Copenhagen; Denmark)
pH/ ORP Controller PC-310 (Suntex(上泰); Taiwan)
BM CIRCULATING WATER BATH (YIH DER(裕德);
Taiwan)

(2) Protein content

Foss tecator Digestor (Foss; USA)

Kjeldahl system Kjeltac™ 2100 (Foss; USA)

Unicon UV-2100 spectrophotometer (Unicon; USA)

(3) Sample Concentrating:

Aswil evaporator RE111 (BÜCHI; Switzerland)

Heidolph VV2000-LIFT (Heidolph; Germany)

(4) High performance liquid chromatography

HPLC pump:

Agilent 1100 series (Agilent Technologies; Germany)

Shimadzu LC-10 AT *vp* (Shimadzu; Japan)

Columns:

1) Size exclusion: Superdex Peptide HR10/30_10×300 mm
(Amersham Bioscience; UK)

2) ACE inhibition: Agilent LiChroscher® 100 RP-18e_
5×250 mm, 5µm (Agilent Technologies; Germany)

3) Peptides purring:

Synergi 4u Fusion-RP 80A_10×250mm, 4µm
(Phenomenex; USA)

Jupiter 4u Proteo 90 Å_4.6×250mm, 4µm (Phenomenex;
USA)

Jupiter 4u Proteo 90 Å_10×250mm, 4µm (Phenomenex;
USA)

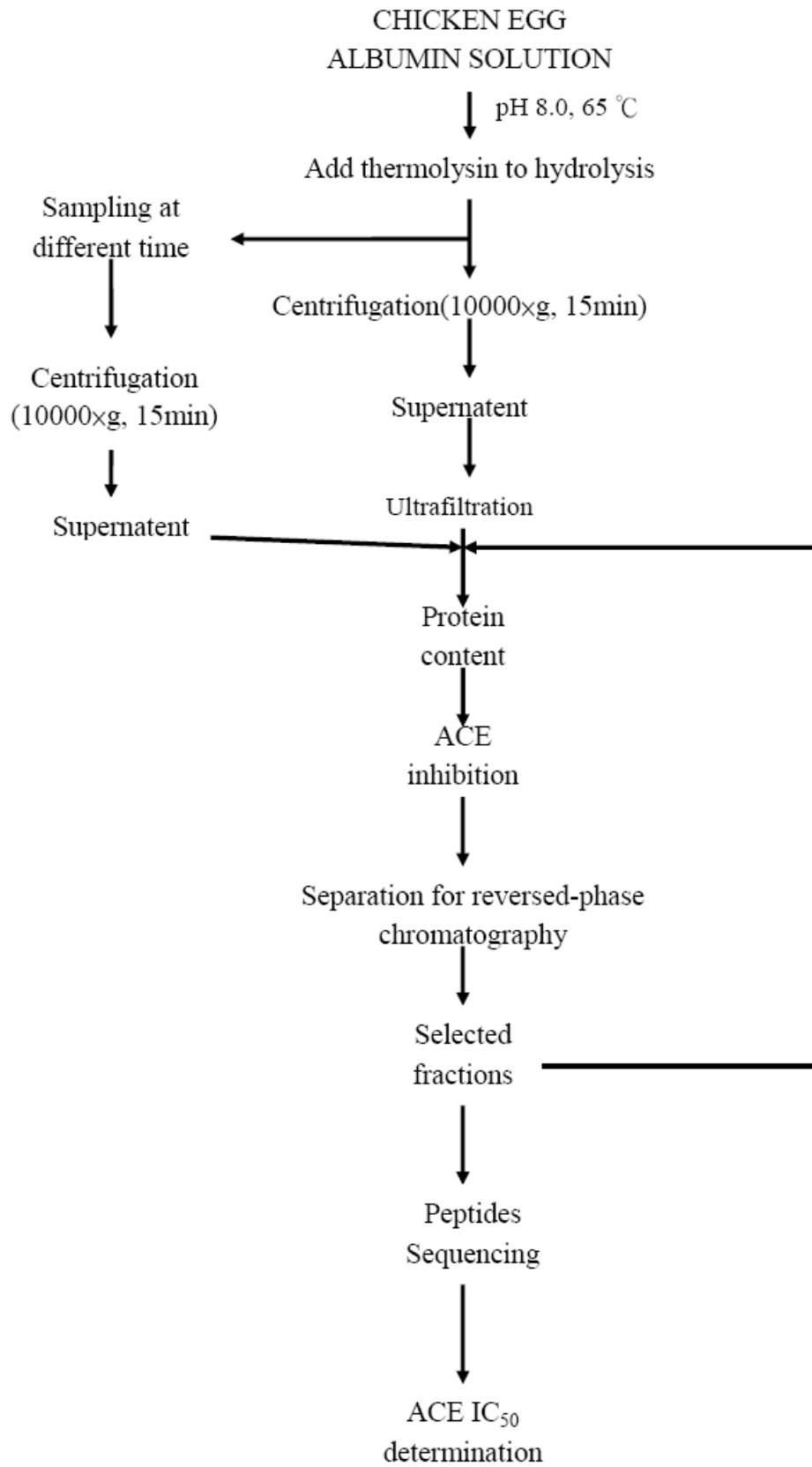
Detector:

Soma UV/VIS Detector S-3702 (Soma; Japan)

Integrator:

Chromatocroder 21 (Sci; USA)

二、實驗流程圖

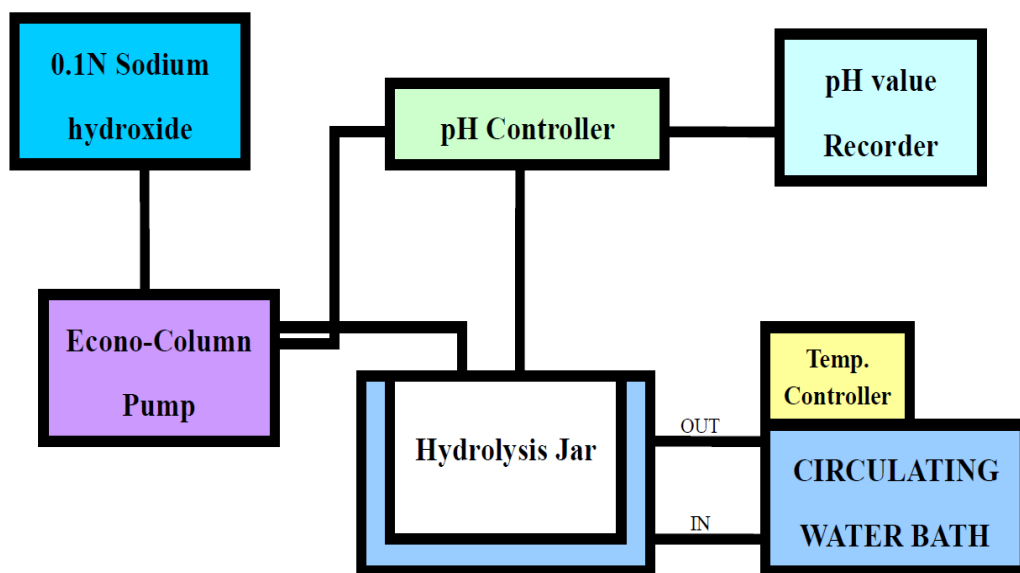


三、實驗方法

1. 製備雞蛋蛋白水解物

參考 Miyoshi *et al.*(1991)與翁(2004)之水解方法。以購自 SIGMA 之粗雞蛋蛋白粉末，配製 1% 的雞蛋蛋白水溶液，以 1N 氫氧化鈉將 pH 調整到 8.0。紗布過濾，加熱至 65°C，加入蛋白質水解酵素--Thermolysin (0.02mg/ mL)進行水解反應。分別於反應時間 0、10、20、30、60、120、180 和 240 分鐘取樣，其中 0 分鐘為未加入酵素之取樣。取樣後立即冰入-20°C 冰箱中，使酵素失活。

pH stat 之雞蛋蛋白水解物，以相同方式製備，但在其 pH 值下降時以蠕動幫浦打入 0.1N 氫氧化鈉，維持 pH 值在 8.0 上下。亦在反應時間 0、10、20、30、60、120、180 和 240 分鐘取樣。



圖八、蛋白質水解之酸鹼值穩定系統。

Figure 8. pH stat system of protein hydrolysis.

2. 超膜過濾(Ultrafiltration)

將水解 4 小時雞蛋蛋白水解物，經 1000×g 離心 15 分鐘後，以二號濾紙過濾取得水解蛋白澄清液。澄清液使用攪拌過濾裝置 (Amicon stirred ultrafiltration 8200) 過濾，依不同濾膜限值大小進行序列性過濾區分，分為未過膜水解液、10KDa(濾膜)濾液、3KDa(濾膜)濾液與 1KDa(濾膜)濾液，四種不同分子量區分性之蛋白水解物。

3. 超膜過濾水解物平均分子量分布測定

將超膜過濾後區分出的水解物以 0.45 μ m 濾膜過濾，以 Superdex Peptide HR10/30 膠體管柱進行胜肽分子量分析。

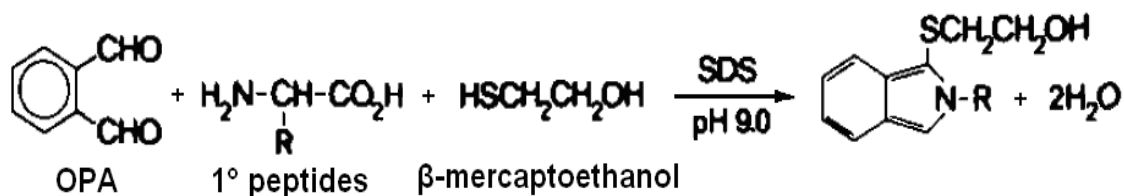
胜肽平均分子量分析條件，移動相為 0.02M 磷酸緩衝液(含 0.25M NaCl, pH 7.2)，以高效能液相層析系統(Shimadzu LC-10 AT *vp*)，流速為 0.4mL/ min 進行分析，偵測波長為 214 nm。以六種不同分子量胜肽標準品作為測定標準，六種胜肽分別為 Cytochrome C (12,588Da)、Gastrin (2,126.2Da)、Substance P (1,329.8Da)、Hexaglycine (360.3Da)、Gly-Gly-Gly (189.2Da)與 Glycine (75.07Da)。

4. 總氮含量之測定

參考 AOAC(1980)之凱氏氮分析方法。取 5mL 水解澄清液加入 10mL 濃硫酸與 10g 硫酸鉀，以高溫分解爐(400 $^{\circ}$ C)進行分解。待分解完成後冷卻，加入 100mL 蒸餾水與 40mL NaOH 以快速蒸餾裝置進行蒸餾。蒸餾液以 0.1N 氯化氫滴定，以氯化氫體積推算水解澄清液之含氮量。

5. 胜肽含量之測定

依據 Church *et al.*(1983)及 Frister *et al.* (1988)的方法，利用 *O*-Phthaldialdehyde (OPA)測定水解物中之胺基酸氮端濃度。其測定原理如下：

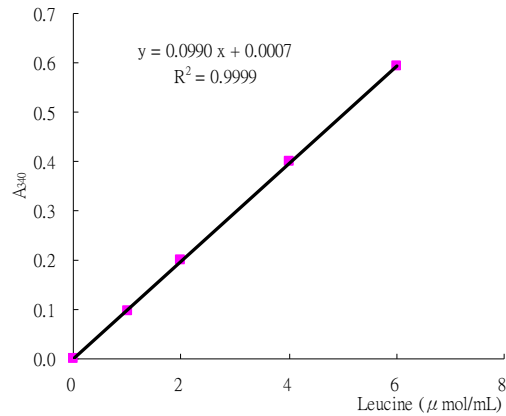


OPA 在鹼性環境下，會與 β -mercaptoethanol 及一級胺之氮端 (NH_2)反應，形成 1-alkylthio-2-alkylisoindole，其雙環結構在波長 340nm 下具有最大的吸光值，是以當吸光值越高，則表示樣品所含的胜肽數越多。

OPA 試劑配製：

12.5mL 100mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、1.25mL 20% SDS、20mg OPA 溶於 0.5mL MeOH、50 μL β -mercaptoethanol，將上述四種溶液混合後，加入去離子水以棕色定量瓶定量至 25mL。

將 20 μL 適當稀釋過之樣品溶液加入 1mL OPA 試劑中，於室溫下反應兩分鐘，接著以分光光度計測定樣品在波長 340nm 下的吸光值。以 L-Leucine 標準品製作一次標準檢量曲線(圖九)，做為胜肽含量換算標準。



圖九、以 OPA 法測定之白胺酸標準曲線。

Figure 9. The standard curve of Leucine by OPA method.

6. 水解率(Degree of hydrolysis, DH)計算

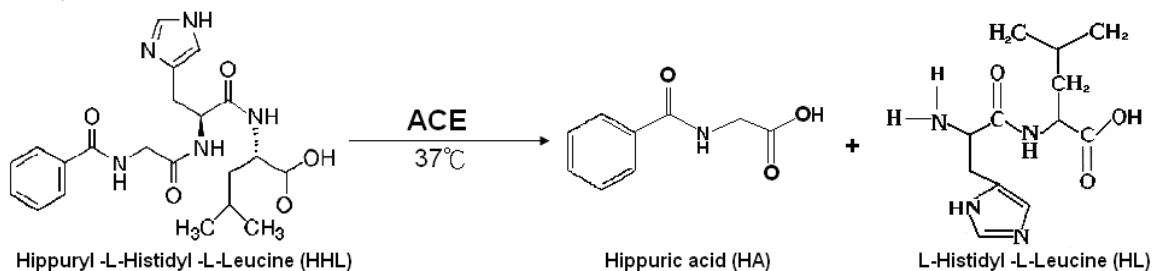
參考 Frister *et al.* (1988)與 Chiang *et al.* (2006)之計算方法。以凱氏氮方法測出之總氮含量為雞蛋蛋白中全部的胺基酸氮端含量 (N_T)，以 OPA 法測出未水解之游離胺基酸氮端含量(N_0)，與經酵素水解後之游離胺基酸氮端含量(N_H)，水解計算公式如下：

$$DH(\%) = \frac{N_H - N_0}{N_T - N_0} \times 100\%$$

7. 血管收縮素轉化酵素抑制物(ACEI)之抑制活性測定

參考 Cushman & Cheung (1971)和 Wu *et al.*(2002)之測定方法。

其原理如下：



以 Hippuryl-histidyl-leucine(HHL) 作為測試 ACE 酵素活性之基

質。HHL 在 ACE 作用下會水解產生 Hippuric acid (HA)與 Histidyl-Leucine (HL)，而其中 HA 在紫外光波長 228 nm 下具有最大吸光值。當 HA 的生成量越高時，表示 ACE 水解活性越好，反之則越差。

硼酸緩衝溶液配製：

0.1M 硼酸鈉水溶液以 0.1M 硼酸滴定至 pH 8.3 後，加入 0.4M 氯化鈉。ACE 與 HHL 皆溶於此緩衝系統中。

ACEI 活性測定：

取 45 μ L 5mM HHL 硼酸緩衝液，加入 5 μ L 樣品，於 37 $^{\circ}$ C 水浴預熱五分鐘。接著加入 15 μ L 60mU/ mL ACE 硼酸緩衝液，於 37 $^{\circ}$ C 水浴反應三十分鐘後，加入 65 μ L 0.1% 三氟醋酸(trifluoroacetic acid, TFA)水溶液終止反應，以 10000 \times g 離心 2 分鐘，取上清液以 RP-HPLC 分析 ACE 水解液中 HA 含量。

ACEI 抑制活性 RP-HPLC 測定條件，移動相為 50% 甲醇水溶液 (含 0.1% TFA)，以高效能液相層析系統 (Agilent 1100 series)，樣品注射量 20 μ L，流速為 0.7mL/ min 進行分析，偵測波長為 228 nm。

ACEI 抑制率計算：

ACEI 之抑制活性判斷方式，是以加入 ACEI 的 ACE 水解液所含之 HA，與未加入 ACEI 的 ACE 水解液(空白對照組)中之 HA 比較，若兩者 HA 的含量差距越大，表示 ACEI 的抑制效果越好。ACEI 抑制活性百分比計算公式如下：

$$ACE_Inhibition(\%) = \frac{[HA_Peak_area]_{Blank} - [HA_Peak_area]_{Inhibitor}}{[HA_Peak_area]_{Blank}} \times 100\%$$

ACE 活性半抑制濃度(Inhibitory Concentration for Angiotensin I-converting enzyme 50% activity; IC₅₀ for ACE)之測定為，先樣品序列稀釋，測各稀釋倍率之 ACE 抑制率做線性回歸，以一次回歸曲線推算樣品對 ACE 活性抑制率達 50%時，所需樣品濃度即 IC₅₀。

8. 雞蛋蛋白水解物初步純化

將雞蛋蛋白水解物 ACE 抑制活性較佳的部份，以 Synergi 4u Fusion-RP 80A 半製備型層析管柱進行分離純化，以每十分鐘為一區間，共分為六個區間進行收集。

胜肽 HPLC 分離條件，以高效能液相層析系統 (Shimadzu LC-10 AT *vp*)，樣品注射量 20 μ L，流速為 2.0mL/ min 進行分離，偵測波長為 214 nm。移動相為 0.012% TFA 水溶液與乙氰(含 0.01% TFA)，其中乙氰於滯留時間 0~60 min 自 0% 升至 30%，進行梯度沖提。

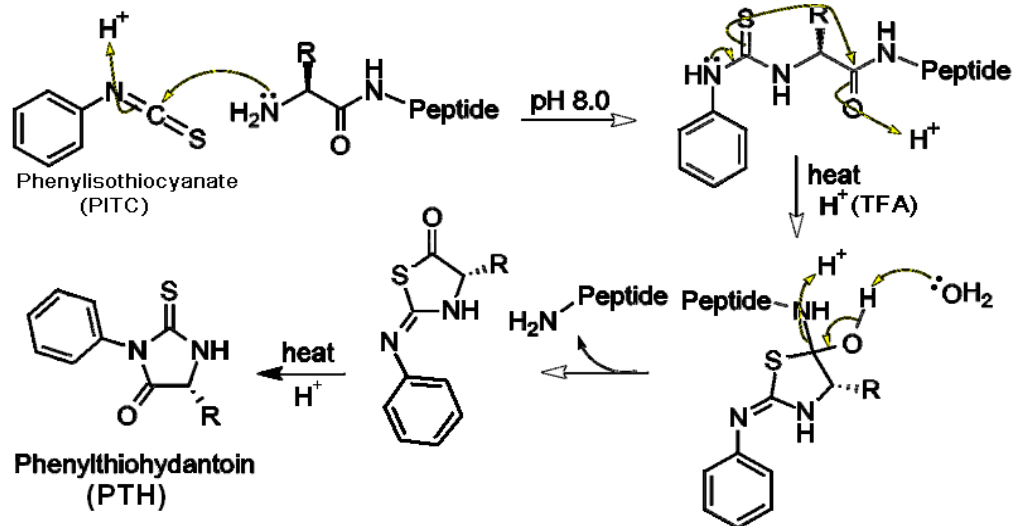
9. 胜肽片段再純化

將生理活性較佳的胜肽部分，以 Jupiter 4u Proteo 90 Å 分析型及半製備型管柱進行分離，並收集含量較多之胜肽片段，減壓濃縮重複分離至更換條件仍為單一波峰。

胜肽 HPLC 分離條件，以高效能液相層析系統 (Shimadzu LC-10 AT *vp*)，樣品注射量 100 μ L，流速為 1.0mL/ min 進行分離，偵測波長為 214 nm。移動相為 0.012% TFA 水溶液乙氰(含 0.01% TFA)與甲醇，各胜肽片段以不同分離條件進行梯度沖提。

10. 胜肽片段定序

將純化後之胜肽片段加以收集至一定量，冷凍乾燥成粉末，送請國立台灣大學生命科學院，利用 N 端定序儀(ABI precise 494)，以 Edman 切割法(Edman degradation)鑑定胜肽序列。原理如下：



在 pH 8 的環境下，以異硫氰酸苯酯(Phenylisothiocyanate, PITC)與胜肽的氮端鍵結，使末端胺基酸轉變為硫胺基碳酸苯衍生物(Phenylthiocarbonyl derivative, PTC-amino acid)，之後以無水三氟醋酸(TFA)將接有 PITC 的胺基酸環化切下，形成 Anilinothialinone (ATZ-amino acid)，並以有機溶劑萃取出，再溶於含 25% TFA 的蒸餾水中，使 ATZ-amino acid 在酸性環境下，轉換為穩定性較高的 Phenylthiohydantoin (PTH-amino acid)。最後以 RP-HPLC 分離，以波長 280nm 進行偵測比對。(王與阮，1977)

經定序後之胜肽片段，送請曜鴻生技(台北縣新莊市)合成增量至 10mg，以進行胜肽之 ACE 抑制率鑑定。

參、結果與討論

一、製備雞蛋蛋白水解物

實驗中製備雞蛋蛋白水解物條件，參考 Trusek-Holownia (2003) 與翁(2004)建立之最適水解條件，翁之結果中提到，水解四小時與水解八小時之水解物 ACE 抑制率並無明顯差異，故水解時間採四小時。

1. 水解率與 pH 值變化

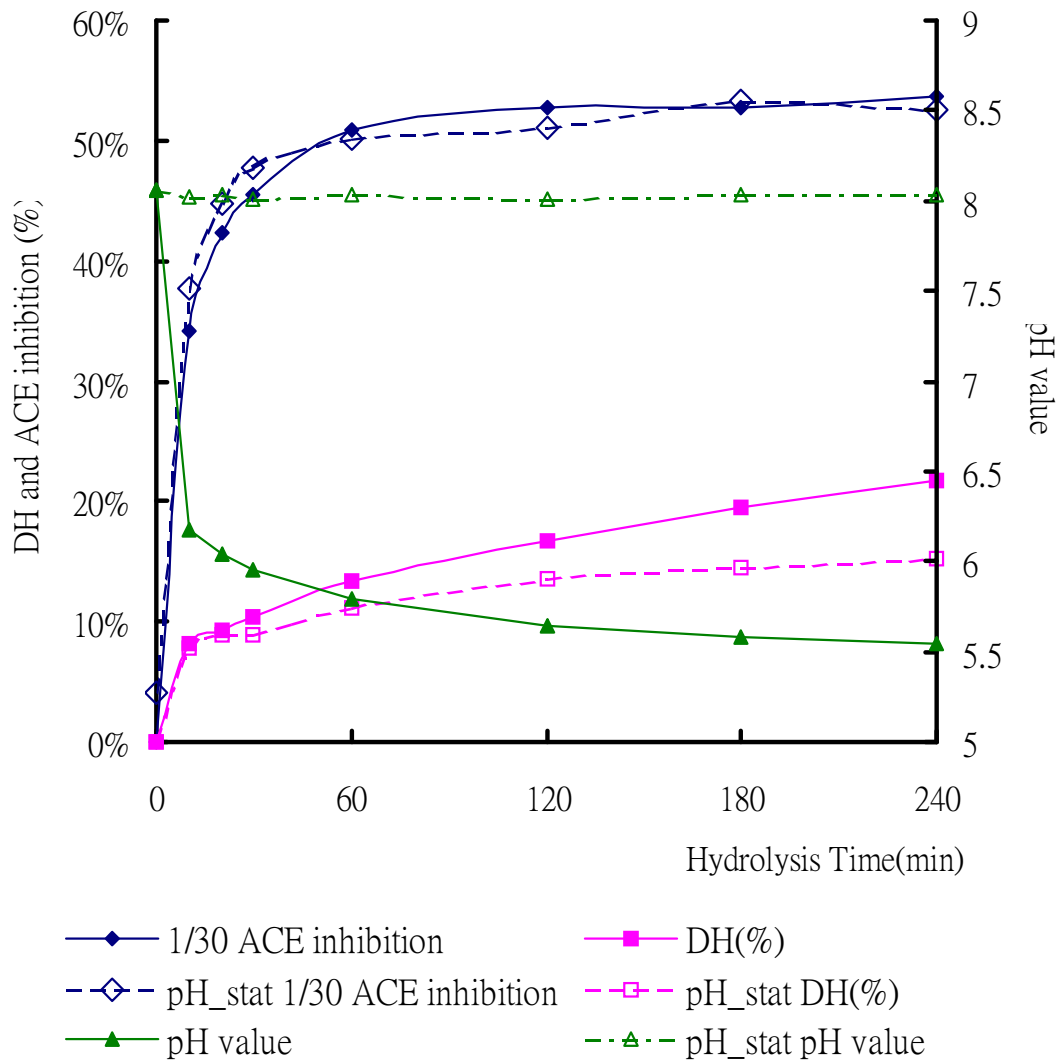
圖十為不同水解時間取樣之雞蛋蛋白水解物其水解率、pH 值以及 30 倍稀釋水解物 ACE 抑制率變化曲線。雞蛋蛋白溶液經 thermolysin 酵素水解，於水解開始的三十分鐘內，水解率迅速攀升至 10.45%，之後水解速率逐漸趨緩，至四小時之雞蛋蛋白水解物水解率為 21.78%。隨著水解度升高，水解物 pH 值隨之降低，水解前三十分鐘 pH 值由 8.06 降至 5.95，而後 pH 值隨水解度趨緩而趨於穩定，水解四小時之雞蛋蛋白水解物 pH 值為 5.54，其原因為實驗中以蒸餾水進行水解，並無緩衝能力，而水解後所暴露出之 C-terminal 增加，造成 pH 下降，當水解速率趨緩時，C-terminal 增加速率減緩，pH 值下降速度亦緩慢。

若在水解過程中以 0.1N 氫氧化鈉滴定，維持水解時 pH 值穩定，發現 pH 值在 8.01-8.06 間遊走，可知此方法確實有穩定 pH 值之功效。但以氫氧化鈉滴定，會造成水溶液中的鈉離子增加，thermolysin 活性些許減弱，導致水解率略為下降至 15.14%。但水解曲線仍與未滴定氫氧化鈉時具有相同趨勢。

2. 血管收縮素轉化酵素抑制能力

水解物經 30 倍稀釋之後，ACE 抑制率仍由未水解時之 0%，於三十分鐘時升至 45.49%，但在水解一小時後 ACE 抑制能力有趨緩的跡象，四小時水解後之水解物，其三十倍稀釋之 ACE 抑制率僅 53.67%，與水解速率趨緩互相呼應。由此可知，雞蛋蛋白水解物之水解率愈高，水解物的 ACE 抑制能力亦愈好。當水解曲線趨平緩後，ACE 抑制活性亦隨之減緩。此與翁(2004)測定結果相符，可見水解過三十分鐘，已釋放出許多具有 ACE 抑制活性的胜肽片段，再延長水解時間對 ACE 抑制能力之提升幫助有限。

當以氫氧化鈉穩定水解 pH 值，此三十倍稀釋水解物之 ACE 抑制率與未滴定氫氧化鈉之抑制率並無明顯差異。可知水解六十分鐘後，雞蛋蛋白水解確實已經接近完成，所以即使延長水解時間至四小時，或以氫氧化鈉維持 pH 值穩定，都不會對水解率與 ACE 抑制率造成很大的影響。



圖十、不同水解時間之雞蛋蛋白水解物其水解率、pH 值以及 30 倍稀釋水解物 ACE 抑制率。

Figure 10. The degree of hydrolysis, pH value and 30x diluted ACE inhibition of egg albumin hydrolysate at different hydrolysis time.

表八、不同水解時間對去離子水水解之雞蛋蛋白水解物其水解率、pH 值以及三十倍稀釋水解物血管收縮素轉化酵素抑制率之影響。

Table 8. The effect on degree of hydrolysis, pH value and 30x diluted ACE inhibition for egg albumin hydrolysate hydrolyzed in deioned water at different hydrolysis time.

Hydrolysis Time (min)	DH (%)	pH value	ACE inhibition (%)
0	0.0	8.06	0.00
10	8.09	6.18	34.18
20	9.28	6.04	42.44
30	10.45	5.95	45.49
60	13.44	5.79	50.91
120	16.75	5.64	52.72
180	19.48	5.58	52.80
240	21.78	5.54	53.67

表九、不同水解時間對以氫氧化鈉穩定 pH 值之雞蛋蛋白水解物其水解率、pH 值以及三十倍稀釋水解物血管收縮素轉化酵素抑制率之影響。

Table 9. The effect on degree of hydrolysis, pH value and 30x diluted ACE inhibition for pH stat egg albumin hydrolysate titrated by NaOH at different hydrolysis time.

Hydrolysis Time (min)	DH (%)	pH value	ACE inhibition (%)
0	0.0	8.06	4.10
10	7.88	8.02	37.69
20	8.91	8.03	44.68
30	8.93	8.01	47.71
60	11.22	8.04	50.07
120	13.50	8.01	51.09
180	14.46	8.03	53.23
240	15.14	8.03	52.60

二、水解物區分純化

1. 超膜過濾區分

圖十一為雞蛋蛋白水解胜肽超膜過濾後以分子篩分離之胜肽分子量分布圖。經離心後的水解液(Suspension)，分子量主要是集中在 360Da 左右，表示雞蛋蛋白經水解處理後，大部份的蛋白已形成僅 2 到 5 個胺基酸左右之較小的胜肽片段，溶解性良好，所以即使離心後仍有 90.49% 的回收率，在經過序列性超膜過濾後的 1KDa 濾液，其回收率也仍有 28.77%。

超膜過濾後的 10KDa 濾液、3KDa 濾液以及 1KDa 濾液與標準品 Gastrin (2,126Da) 對照比較後，發現進行 1KDa 超膜過濾之水解物其胜肽片段皆小於 2KD，且大多數胜肽都比標準品 Substance P (1,330Da) 還要小，可見超膜過濾確實可有效的去除較大分子量的胜肽片段。

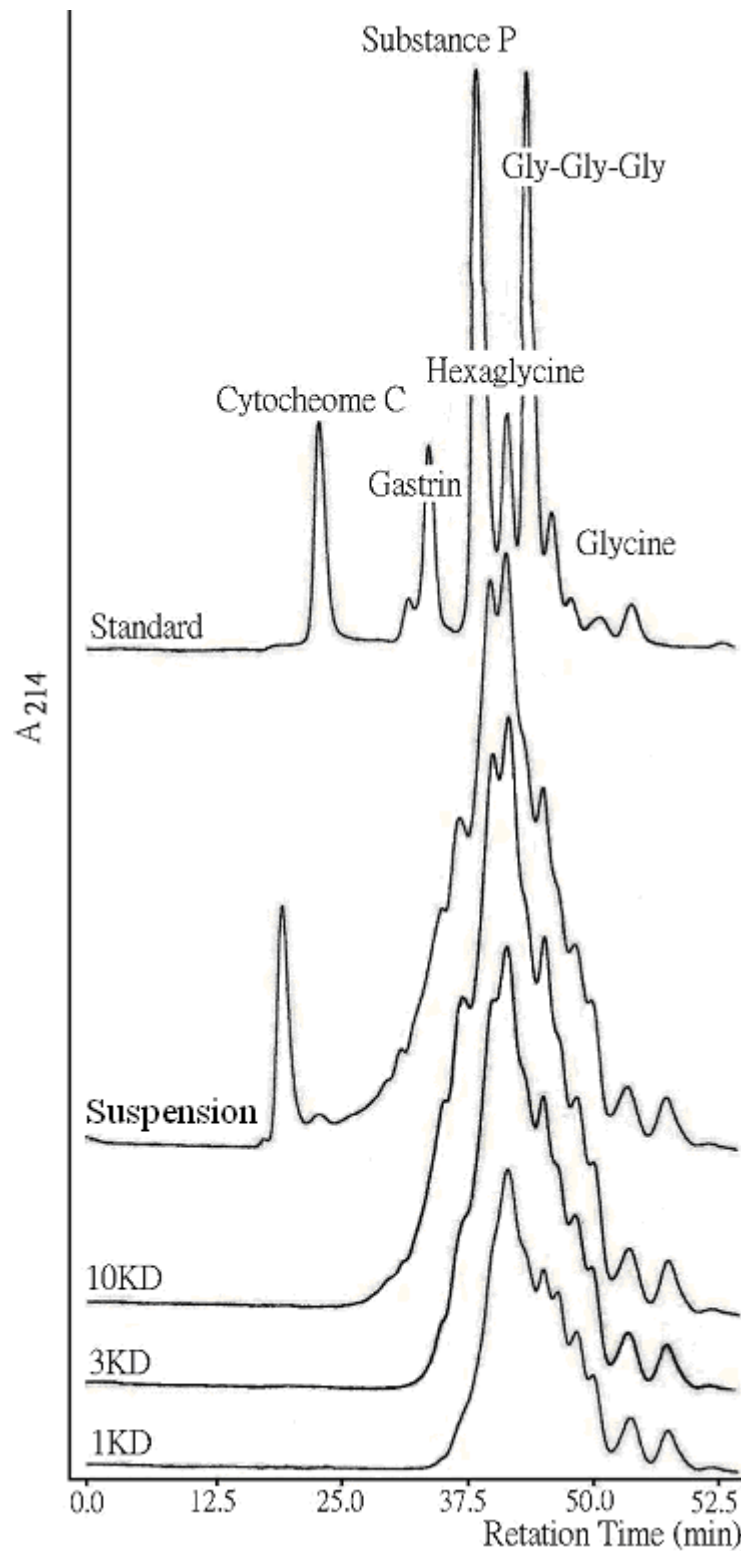
將四種分子量區分性的蛋白水解濾液，分別做 ACE 抑制活性測試，結果為表十。得 Suspension 之 IC_{50} 為 14.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，1KD 濾液僅 9.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胜肽濃度，即可抑制 ACE 酵素 50% 活性。並可發現隨分子量下降，ACE 抑制活性有逐漸提高的趨勢。

Udenigwe 等人(2009)，以包含 thermolysin 在內六種不同種類酵素，水解亞麻仁籽蛋白(flaxseed protein)生產抗高血壓胜肽，經 1KDa 分子量區分過濾回收率為 5.4~18.5%，水解物對 ACE 之 IC_{50} 則介於 27.5~151 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Miyoshi 等人以 thermolysin 水解 α -玉米蛋白(α -zein protein)，離心後水解物 ACE 之 IC_{50} 為 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Marczak 等人(2003)以九種酵素水解芥花籽蛋白(rapeseed)，離心後水解物對 ACE 之 IC_{50} 為 0.16~1.3 mg/mL 。蔡(2004)以 alcalase 水解分離大豆蛋白，經六小時水解之大豆蛋白水解物， IC_{50} 為 610 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Kim 等人(2001)

則以 Alcalase、Pronase E 與 collagenase 進行多次水解牛皮膚膠原蛋白(Bovine Skin Gelatin)，結果先以 Alcalase 再以 Pronase E 水解 Gelatin，會有最佳 ACE 抑制活性， IC_{50} 為 $593\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Wu 與 Ding (2002)利用鹼水解大豆蛋白(soy-protein)，水解物經膜過濾後之產率 14.42%，對 ACE 之 IC_{50} 為 $65\mu\text{g}/\text{mL}$ 。上述文獻水解物，有些雖具不錯的 ACE 抑制效果，但大都需經過 12 至 24 小時的水解過程，僅分離大豆蛋白為六小時，且酵素與基質比例高，更甚者如 Gelatin 需重覆用 2~3 種酵素水解，與本實驗之酵素基質比(0.2%)及離心後蛋白質回收率(90.49%)相比之下，上述文獻中提及的蛋白質水解物，製程不僅耗時，回收率也不甚理想。

2. 活性胜肽初步區分

由於四種分子量區分性的蛋白水解濾液中，以 1KD 濾液之 ACE 抑制活性為最好，故以該溶液進行初步純化，圖十二是 1KD 濾液經 RP-HPLC 分析後之胜肽片段組成。由圖可知，雖已經過超膜過濾，但 1KD 濾液所含的胜肽組成仍極為複雜，故先以每十分鐘為一單位進行胜肽片段收集，並測定每一單位之 ACE 抑制活性後，擇取抑制效果較好的部分進行再純化。而第六部份(50-60 分鐘)胜肽含量太少，無法以 HPLC 大量分離，所以僅測試前面五十分鐘。表十一為 ACE 抑制活性測試結果，由表中可見第三部份(20-30 分鐘)收集的胜肽片段，對 ACE 抑制效果最好，僅 $10\mu\text{M}$ 濃度就可有 73.75% 的 ACE 抑制率，其餘部分之抑制效果僅達 20~40% 左右，故選擇第三部份胜肽進行再純化。

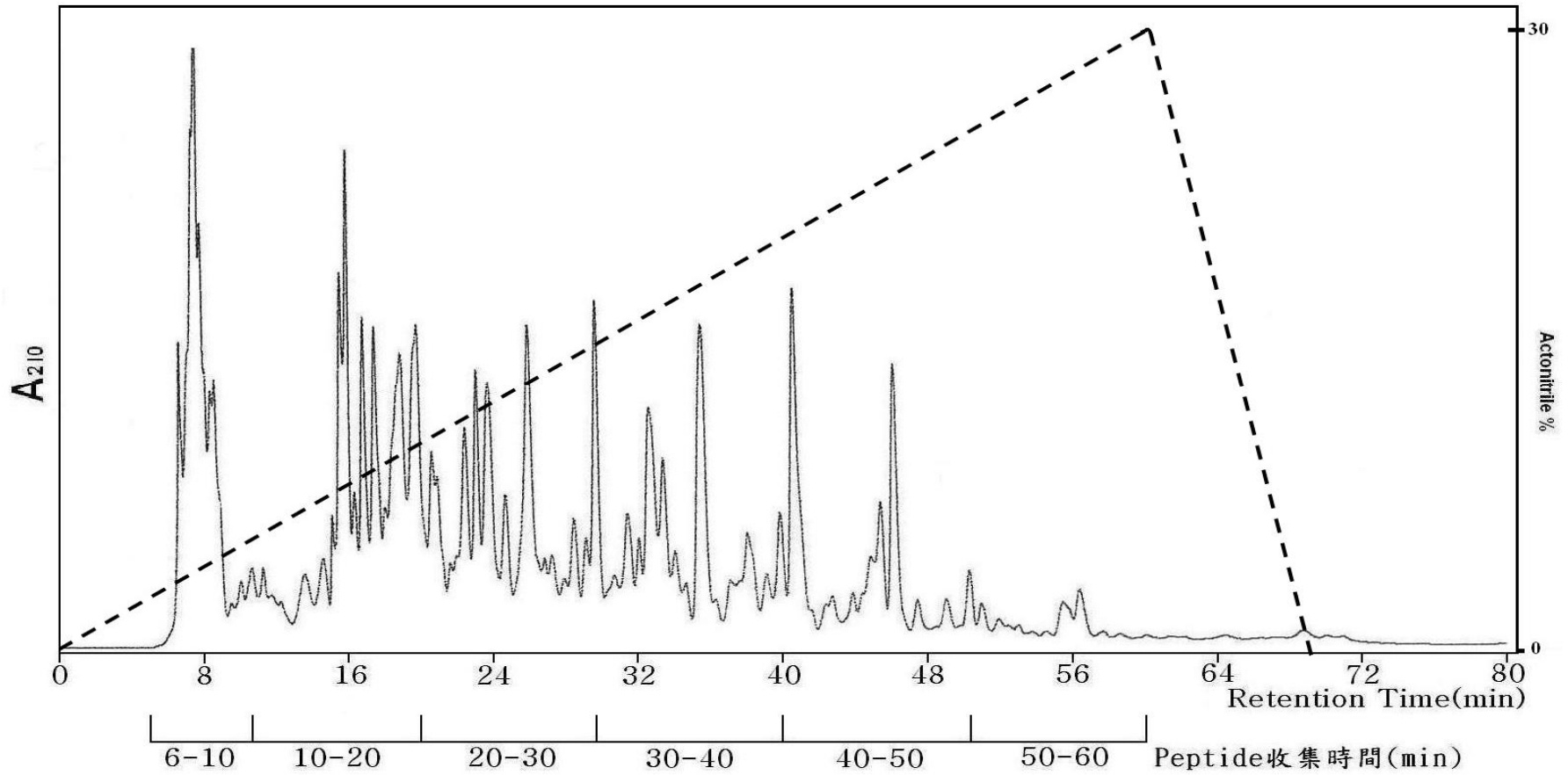


圖十一、雞蛋蛋白水解物經超膜過濾區分後之分子量分布。
 Figure 11. The molecular weight distribution of egg albumin hydrolysate permeates obtained from ultrafiltration.

表十、雞蛋蛋白水解物經超膜過濾後區分物之蛋白質含量、回收率與 ACE 半抑制濃度。

Table 10. The protein content, protein recovery and IC₅₀ for ACE of egg albumin hydrolysate permeates obtained from ultrafiltration.

Fraction	Protein content	Protein recovery	Inhibition 30X dilution	IC ₅₀ (Protein conc.)
	mg/ mL	%	%	µg/mL
Supernatant	8.178	90.49	55.70	14.15
<10KD	6.681	73.93	52.71	13.70
< 3KD	4.706	52.07	51.95	11.62
< 1KD	2.6	28.77	42.34	9.37



圖十二、雞蛋蛋白水解物 1KDa 濾液以 HPLC-C18 半製備型管柱層析圖譜。

Figure 12. The HPLC-C18 semi-column chromatogram of egg albumin hydrolysate 1KDa permeates obtained from ultrafiltration.

表十一、1KDa 濾液於各時間收集液之胜肽含量與 ACE 之抑制活性。

Table 11. The peptide concentration and ACE inhibition of 1KDa eluted permeates collected in different retention time fraction.

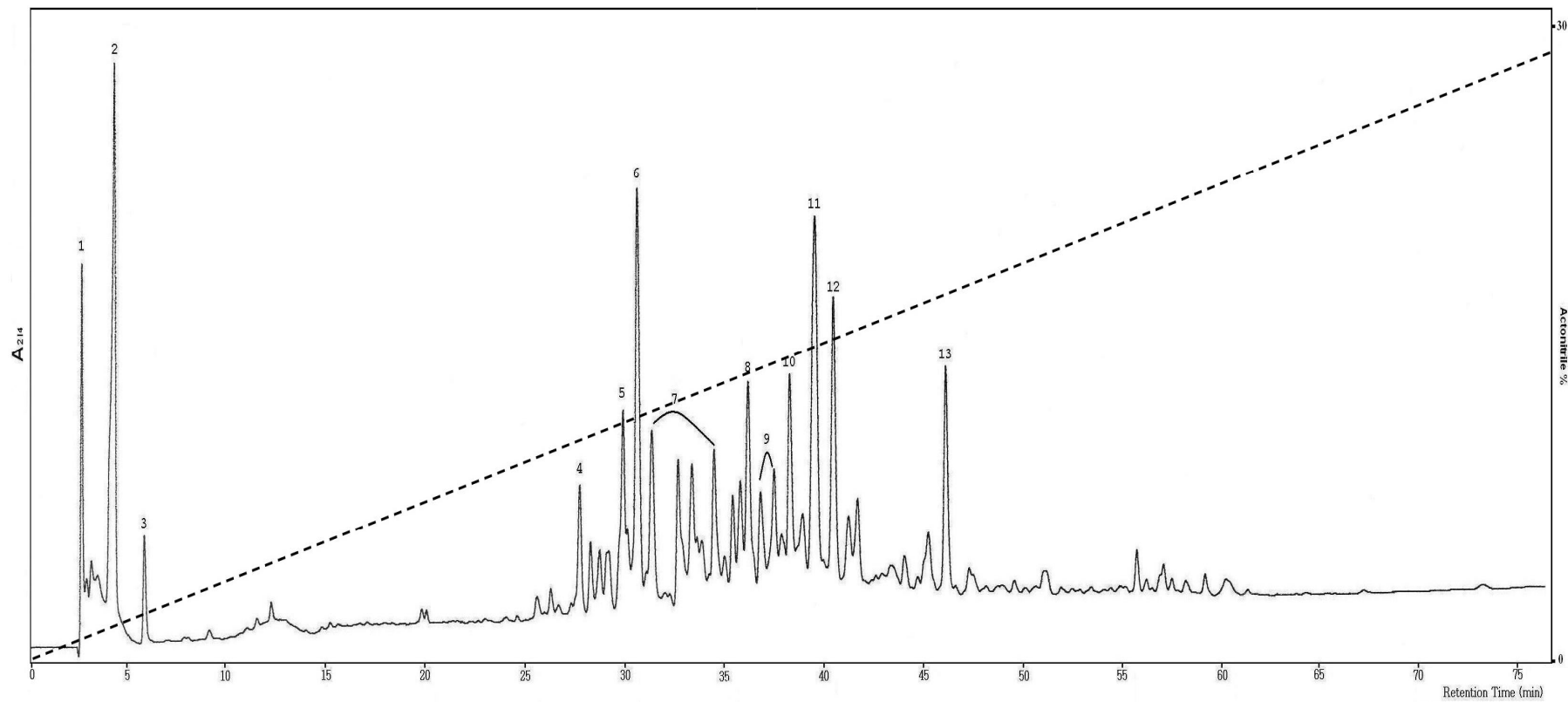
Minute of collected peptides (min)	peptide concentration of elution (mM)	ACE inhibition / 10 μ M peptide (%)
6-10	0.094	21.63
10-20	0.054	30.29
20-30	0.037	73.75
30-40	0.029	38.60
40-50	0.032	42.14

3. 胜肽片段純化

以 RP-HPLC 分析第三區間之胜肽片段(圖十三)，並收集胜肽含量較多的部分重複分離至更換條件後仍為單一波峰，收集定序。定序得九個胜肽片段如下：Ile-Leu-Asn-Gln、Trp-Ser、Leu-Glu-Pro、Ala-Phe、Val-Phe-Lys-Glu、Leu-Tyr、Leu-Trp-Glu-Lys、Val-Tyr 和 Phe-Gly。將這些胜肽分別做 ACE 活性半抑制濃度測試，得表十二。

其中 Ile-Leu-Asn-Gln 經測試後，並無明顯的 ACE 抑制活性，而三胜肽 Leu-Glu-Pro 之 ACE 抑制活性最為顯著，只需 39.79 μM 即能達到 ACE 半抑制活性(IC_{50})，次佳的胜肽為 Trp-Ser 與 Leu-Trp-Glu-Lys，ACE 半抑制活性(IC_{50})分別為 63.85 μM 與 52.72 μM 。其餘的胜肽濃度皆需超過 100 μM 才具有 ACE 之半抑制活性。

本實驗純化定序出的七種 ACE 抑制胜肽，其胺基酸側鏈基團多為長鏈或具支鏈的疏水性基團，以及芳香族基團。根據 Cheung 等人(1980)與 Kobayashi 等人(2008)提出之 ACEI 胜肽特性，可推測此為胜肽具有 ACE 抑制活性的主要原因。



圖十三、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間(20~30 分鐘)之雞蛋蛋白水解胜肽。

Figure 13. The HPLC-C18 analytic-column chromatogram of peptide collection of egg albumin eluted at 20~30 min.

表十二、雞蛋蛋白水解物純化分離條件、胜肽序列與 ACE 半抑制濃度。

Table 12. Purified methods, peptide sequence and IC₅₀ for ACE of egg albumin peptide.

Peptide sequences	Gradient of elution*	Site of Egg Albumn	IC ₅₀ (μM Peptide)
Phe-Gly	A	65-66 379-380	407.76
Trp-Ser	A	147-148	52.72
Leu-Glu-Pro	B	129-131	39.79
Ala-Phe	A	187-189	121.17
Val-Phe-Lys-Glu	B	14-17	489.21
Leu-Tyr	A	105-106	107.77
Leu-Trp-Glu-Lys	A	183-186	63.85

* Gradient of elution:

A: 0 min (CH₃CN: 0%) → 20 min (CH₃CN: 30%)

B: CH₃CN: Isocratic gradient at 15%

肆、結論

雞蛋蛋白本身極具有易消化吸收與高優質低熱量的優點，雞蛋蛋白經 thermolysin 水解後之胜肽水解物，與許多植物性蛋白水解物相比，本身不需經繁雜的純化即具有很好的溶解性與 ACE 抑制效果($IC_{50} = 14.15 \mu\text{g}/\text{mL}$)。經超膜區分之後，其 ACE 抑制活性更有明顯的提高($IC_{50} = 9.37 \mu\text{g}/\text{mL}$)，且其回收率(28.77%)與其他水解物相比(亞麻籽水解物 18.5%、大豆蛋白水解物 14.42%)，明顯高出許多，有利於工業化大量製造。

以 HPLC 半製備型管柱分離之胜肽片段，濃度僅 $10 \mu\text{M}$ 即有很好的 ACE 抑制效果，但經過重複純化出的九個胜肽片段，活性最好的 Leu-Glu-Pro($IC_{50} = 39.79 \mu\text{M}$)與表六及表七的活性片段相比較，並未有較突出的抑制活性，推測此水解物可能含有其他抑制率更好的生理活性胜肽。

由上述結果可見，此水解物容易大量製造，具有發展為保健食品之潛力。定序出的胜肽序列中，側鏈基團多為疏水性或具環狀結構之胺基酸，可推測此為胜肽具有 ACE 抑制活性之原因。目前定序出之胜肽片段僅七種具有 ACE 抑制活性，Wu 等人(2008)發表論文結語中提及不同的純化方式，可能純化出不同且亦具有 ACE 抑制活性之胜肽序列，故雞蛋蛋白胜肽之純化在學術研究方面仍具有非常好的發展空間。

參考文獻

- 王立禾與阮立昂，(1977)。蛋白質的構造與功能，復漢出版社，107-123 頁。
- 李時珍，文淵閣四庫全書_子部醫家類_七七四卷 本草綱目。369-371 頁。
- 吳安邦與程盟夫，(2004)。腎素-血管張力素系統的雙重阻斷，腎臟與透析，16(4)：187-190。
- 翁千惠，(2004)。利用酵素水解明膠及卵白蛋白製備抗高血壓胜肽。台灣私立東海大學碩士學位論文。
- 郭智宏，(2001)。腸道吸收-胺基酸與胜肽。食品工業，33(5)：15-23。
- 張建棣，(1999)。胜肽於腸胃到傳輸之探討。食品工業，31(1)：40-50。
- 張勝善，(1986)。蛋品加工學，華湘園出版社，79-85 頁。
- 莊少鈞，(2009)。抑制血管收縮素的助益。食品工業，41(1)：29-33。
- 陳明造，(2006)。蛋品加工理論與應用，藝軒圖書出版社，28-44 頁。
- 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。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。
- 陳怡宏，(1999)。生物活性胜肽及其合成。食品工業，31(1)：1-8。
- 陳怡宏，(2009)。腎素-血管收縮素-醛固酮系統與糖尿病。食品工業，41(1)：7-20。
- 黃耀星，(2002)。本態性高血壓之診斷與治療。藝軒圖書出版社，19-34 頁。
- 楊詠翔，(1999)。食品中抗高血壓胜肽的發展。食品工業，31(1)：9-18。
- 劉毓蕙，(2004)。水解蛋白的特性及應用。食品工業，36(2)：19-24。
- 蔡宗堯，(2004)。酵素水解分離大豆蛋白以製備高血壓抑制胜肽。台灣私立東海大學碩士學位論文。
- AOAC, (1980). Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemists.
- Atkinson, A. B. and Robertson, J. I. S., (1979). Captopril in the

treatment of clinical hypertensive and cardiac. *The Lancet*, 2: 836-839.

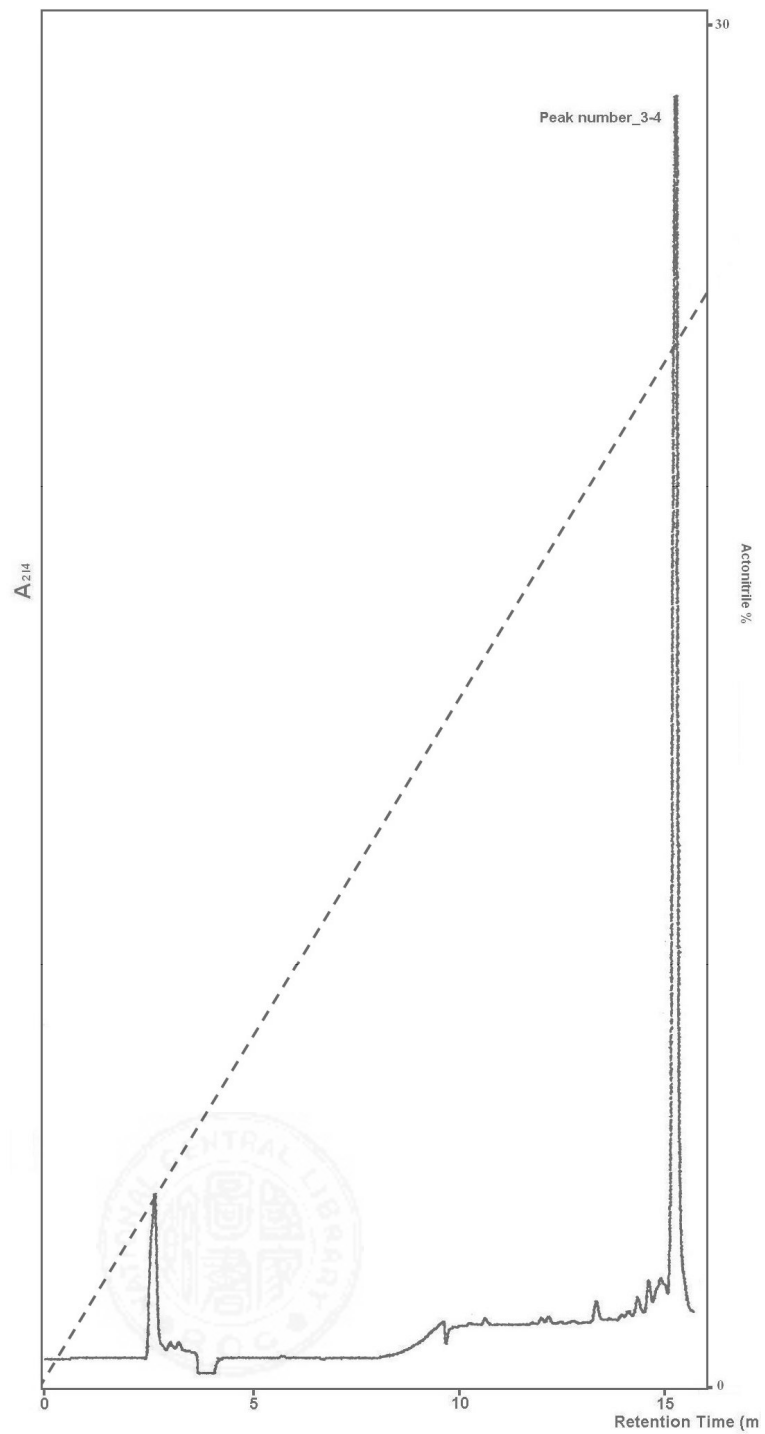
- Barbosa-Filho, J. M., Martins, V. K. M., Rabelo, L.A., Moura, M.D., Silva, M. S., Cunha, E. V.L., Souza, M. F.V., Almeida, R. N. and Medeiros, I. A., (2006). Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16: 421-446.
- Chan, K. M., Decker, E. A. and Means, W. J., (1993). Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. *J. Food Sci.*, 58: 1-4.
- Cheung, S. H., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. and Cushman, D. W., (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 225: 401-407.
- Chiang, W. D.; Lee, M. J.; Guo, W. S. & Tsai, T. C., (2006). Protein hydrolysate batch production with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from egg whites. *J. Food Drug Anal.*, 14: 385-390.
- 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.
- Cushman, D. W. and Cheung, S. H., (1971). Spectrophotometric assay and properties of angiotensin- converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* , 20: 1637-1645.
- Frister, H., Meisel, H. and Schlimme, E., (1988). OPA method modified by use of N, N-dimethyl-2-mercaptoethylammonium chlorides as thiol component. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 330: 631-633.
- Frokjaer, S., (1994). Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food technol.*, 48(10): 86-88.
- Fujita, H., Sasaki, R. and Yoshikawa, M., (1995). Potentiation of antihypertensive activity of orally administered ovokin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(12): 2344-2345.

- Fujita, H., Usui, H., Kurahashi, K and Yoshikawa, M., (1995). Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B₁ Agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides*, 16(5): 785-790.
- Fujita, H., Yokoyama, K., and Yoshikawa, M., (2000). Classification and antihyper-tensive activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J. Food Sci.*, 65(4): 564-569
- Grimble, G. K. and Silk, D., (1989). Peptides in human nutrition. *Nutr. Research Rev.*, 2: 87-108.
- Inouye, K., (1992). Effects of salts on thermolysin: activation of hydrolysis and synthesis of N-carbobenzoxy-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester, and a unique change in the absorption spectrum of thermolysin. *J. Biochem.*, 112:335-340.
- Inouye, K., Kuzuya, K. and Tonomura, B., (1994). A spectrophotometric study on the interaction of thermolysin with chloride and bromide ions, and the state of tryptophyl residue 115. *J. Biochem.*, 116: 530-535.
- Inouye, K., Lee, S.-B. and Tonomura, B., (1996). Effect of amino acid residues at the cleavable site of substrates on the remarkable activation of thermolysin by salts. *J. Biochem.*, 315:133-138.
- Inouye, K., Kuzuya, K., and Tonomura, B., (1998). Sodium chloride enhances markedly the thermal stability of thermolysin as well as its catalytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1388: 209-214.
- Kim, S.-K., Byun, H.-G., Park, P.-J. and Shahidi, F., (2001). Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Purified from Bovine Skin Gelatin Hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2992-2997.
- Kobayashi, Y., Yamauchi, T., Katsuda, T., Yamaji, H., and Katoh, S. (2008). Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory mechanism of tripeptides containing aromatic residues. *J. Biosci. Bioeng.*, 106(3): 310-312.
- Kosano, M., Yasukawa, K., Hashida Y. and Inouye, K., (2006). Engineering of the pH-Dependence of Thermolysin Activity as

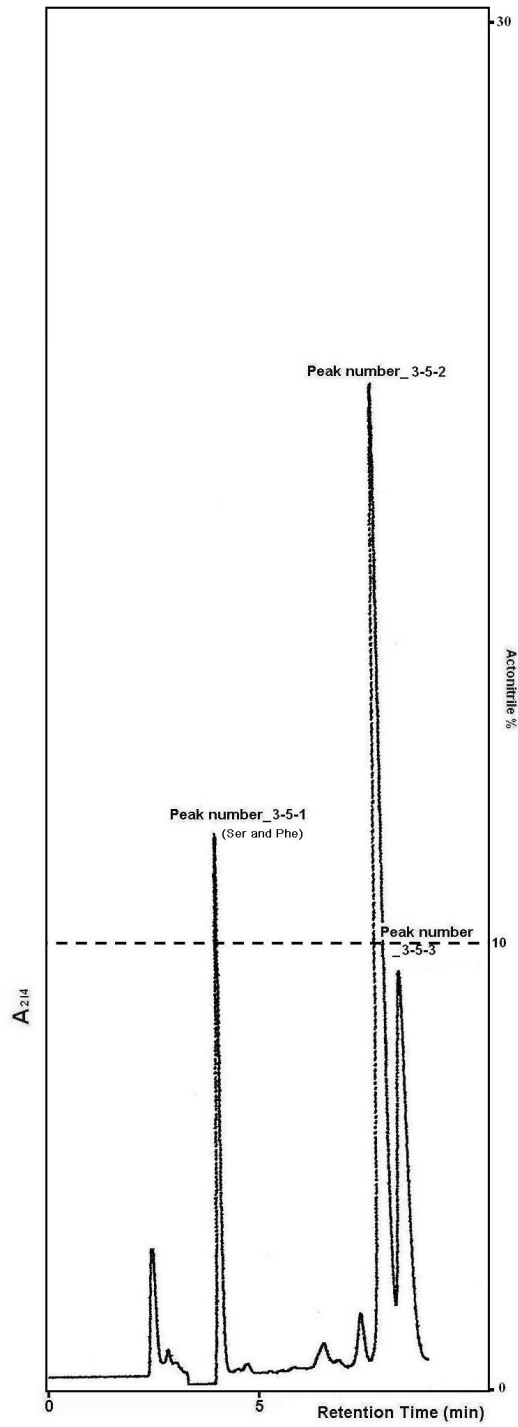
- Examined by Site-Directed Mutagenesis of Asn112 Located at the Active Site of Thermolysin. *J. Biochem.*, 139: 1017–1023.
- Lahl, W. J. and Braum, S. D., (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, 48(10): 68-71.
- Li, G.-H., Wan, J.-Z., Le, G.-W. and Shi, Y.-H.,(2006). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Alcalase hydrolysate of mung bean protein. *J. Pept. Sci.*, 12: 509–51.
- Ligne, T., Pauthe, E., Monti, J.P., Gracel, G. and Larte Garde, V., (1997). *Biochim. Biophys. Acta*, 1337:143–148.
- Marczak, E. D., Usui, H., Fujita, H., Yang, Y., Yokoo, M., Lipkowski, A. W. and Yoshikawa, M., (2003). New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides*, 24:791–798
- Meisel, H., (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*, 21:55-61.
- Miguel, M. and Aleixandre, A., (2006). Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *J. Nutr*, 136: 1457-1460.
- Miyoshi, S.; Kaneko, T.; Yoshizawa, Y.; Fukui, F.; Tanaka, H. & Maruyama, S. (1991). Hypotensive activity of enzymatic α -zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 1407–1408.
- Muta, Y. and Inouye, K., (2002). Inhibitory Effects of Alcohols on Thermolysin Activity as Examined Using a Fluorescent Substrate. *J. Biochem.*, 132: 945-951.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., SAKAI, K., OKUBO, A., YAMAZAKI, S. and TAKANO, T., (1994). Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk. *J Dairy Sci*, 78: 777-783.
- Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D. and Acharya K. R., (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme–lisinopril complex. *Nature*, 421: 551-554.
- Nisbet, A. D., Saundry, R. H, Moir, A. J G, Fothergill, L. A and Fothergill, J. E, (1981). The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J. Biochem.*, 115: 335-345.

- Pauthe, E., Dauchez, M., Mejríd, M., Berjotc, M., Mathlouthi, M., Larreta-Garde, V. and Alix, A.J.P.,(1999). Structural studies of a small (linear, cyclic) peptide as a synthetic substrate for thermolysin. *J. Mol. Struct.*, 480-481:423-426.
- Trusek-Holownia, A., (2003). Synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin. *J. Biotech.*, 102: 153-163.
- Udenigwe, C. C., Lin, Y. S., Hou, W. C. and Aluko, R. E., (2009) Kinetics of the inhibition of rennin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *Journal of functional food*, 1: 199-207.
- Vercruyssen, L., Camp, J. V. and Smagghe, G., (2005). ACE Inhibitory Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysates of Animal Muscle Protein: A Review. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8106-8115.
- Wu, A. J., Aluko, R. E. and Muir, A. D., (2002). An improved method for direct injection HPLC assay of angiotensin converting enzyme-catalyzed reactions. *J. Chromatogr. A*, 950, 125–130.
- Wu, A. J., Aluko, R. E. and Muir, A. D., (2008). Purification of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from the enzymatic hydrolysate of defatted canola meal. *Food Chem.*, 111, 942-950.
- Wu, J. P. and Ding, X. L., (2001) Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res Int.*, 35:367-375.
- Yamamoto, N., (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopoly.*, 43: 129-134.

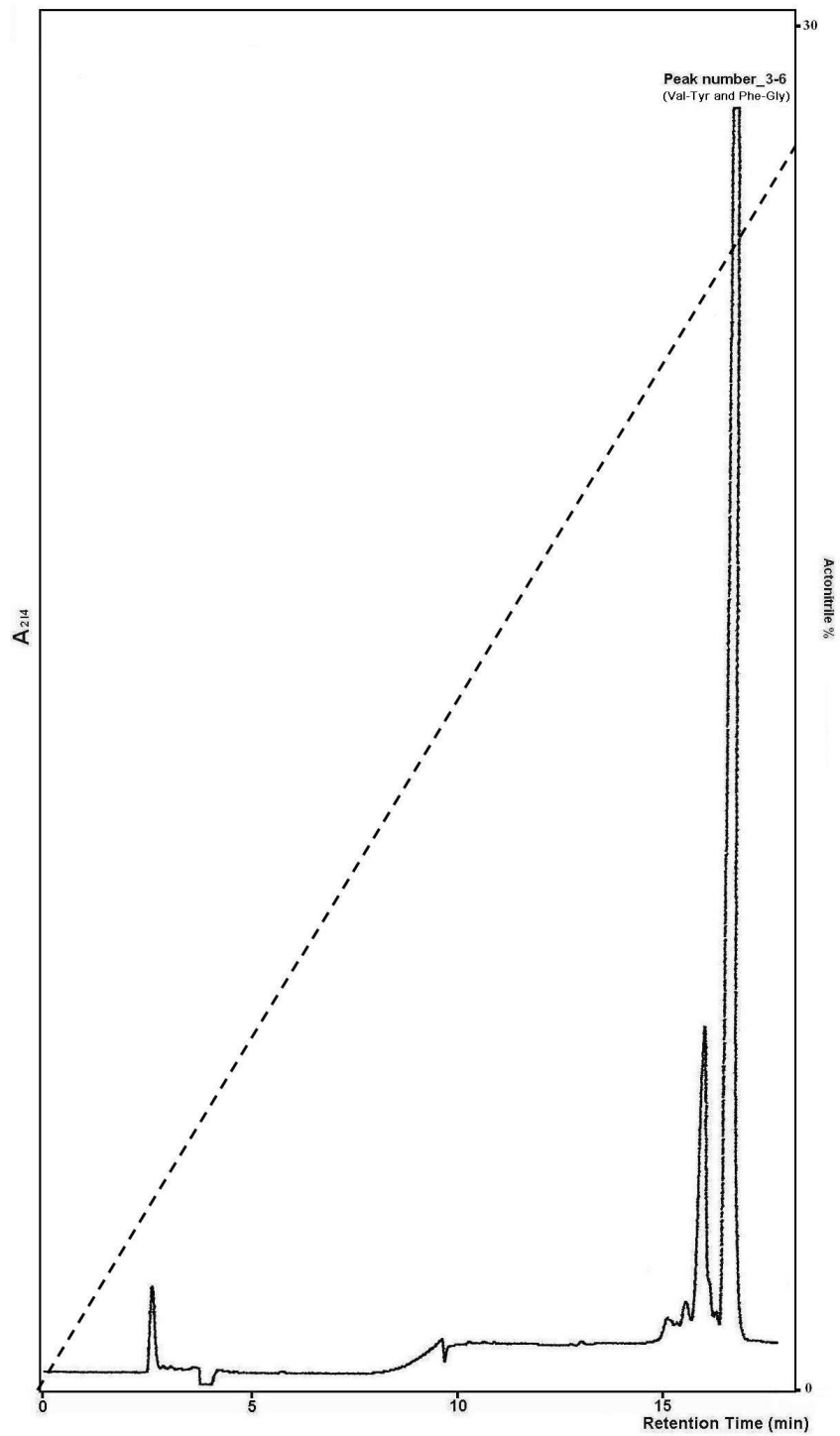
附錄



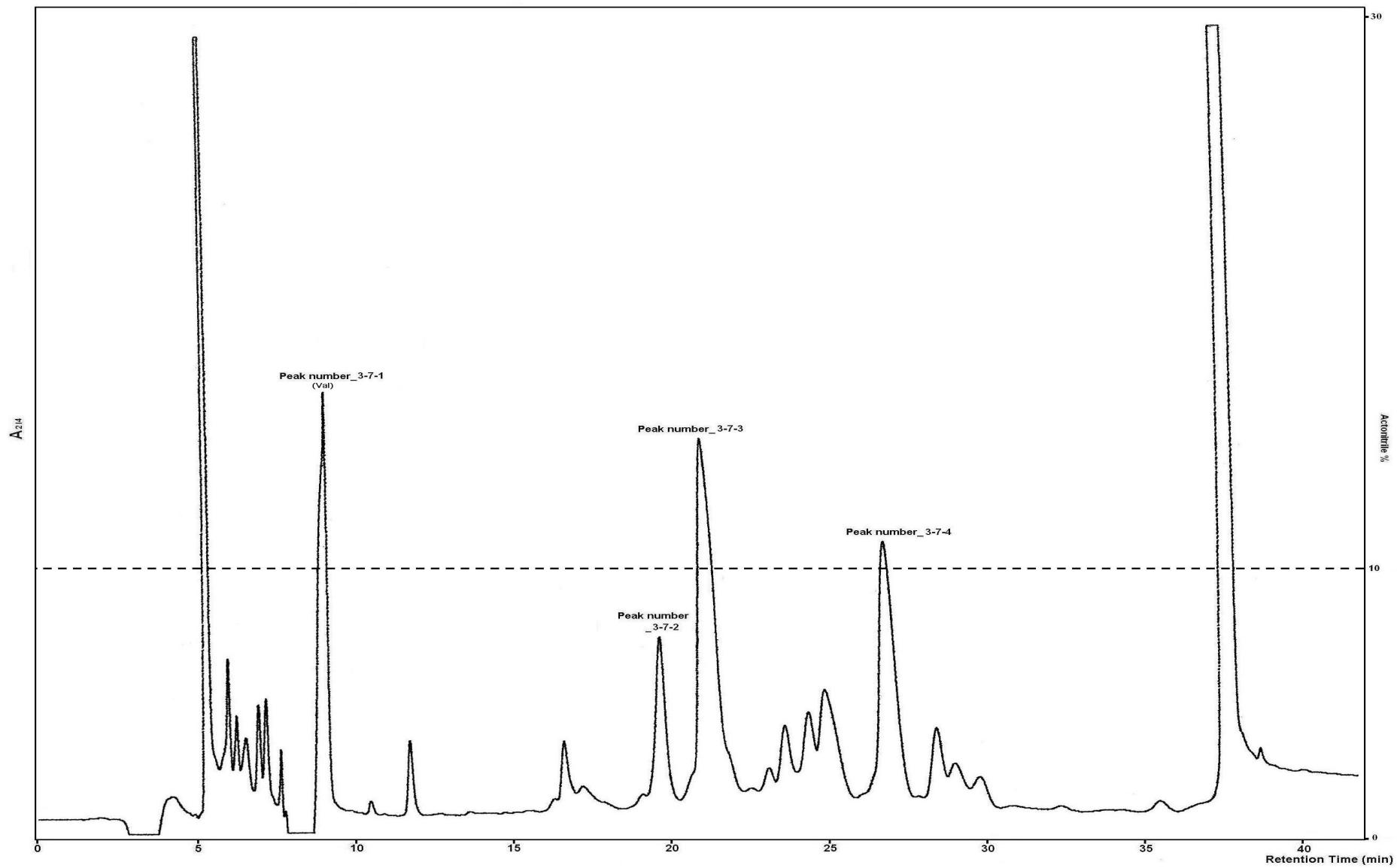
附圖一、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第四波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



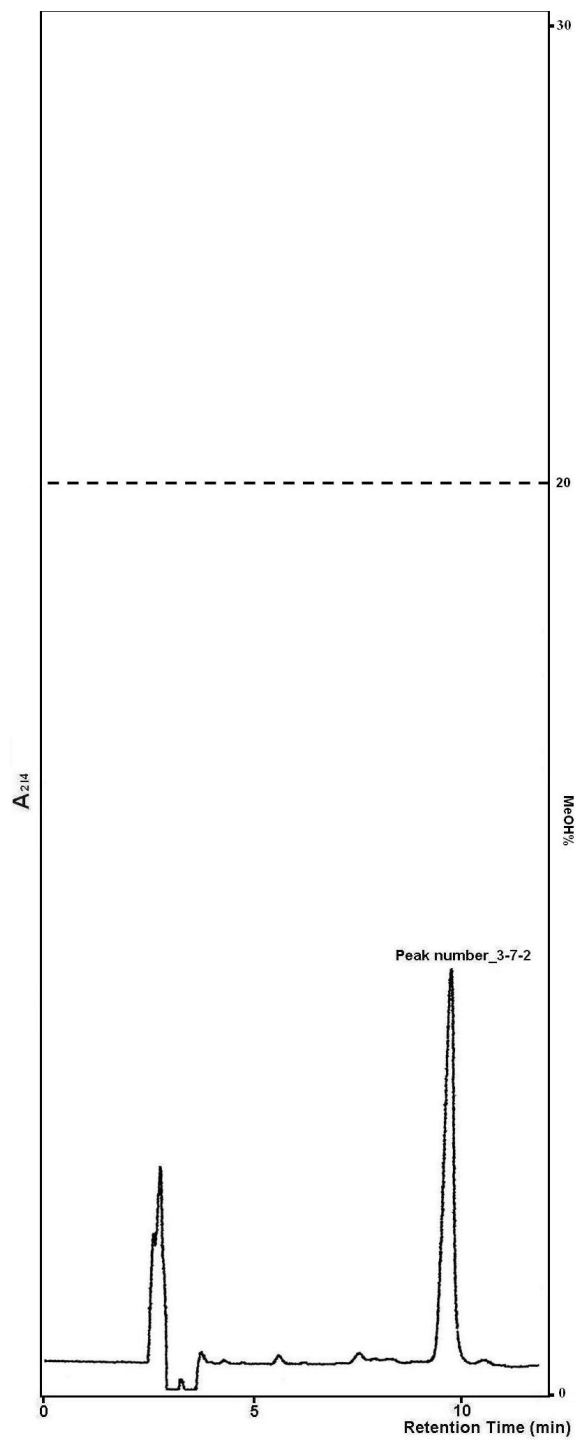
附圖二、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第五波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



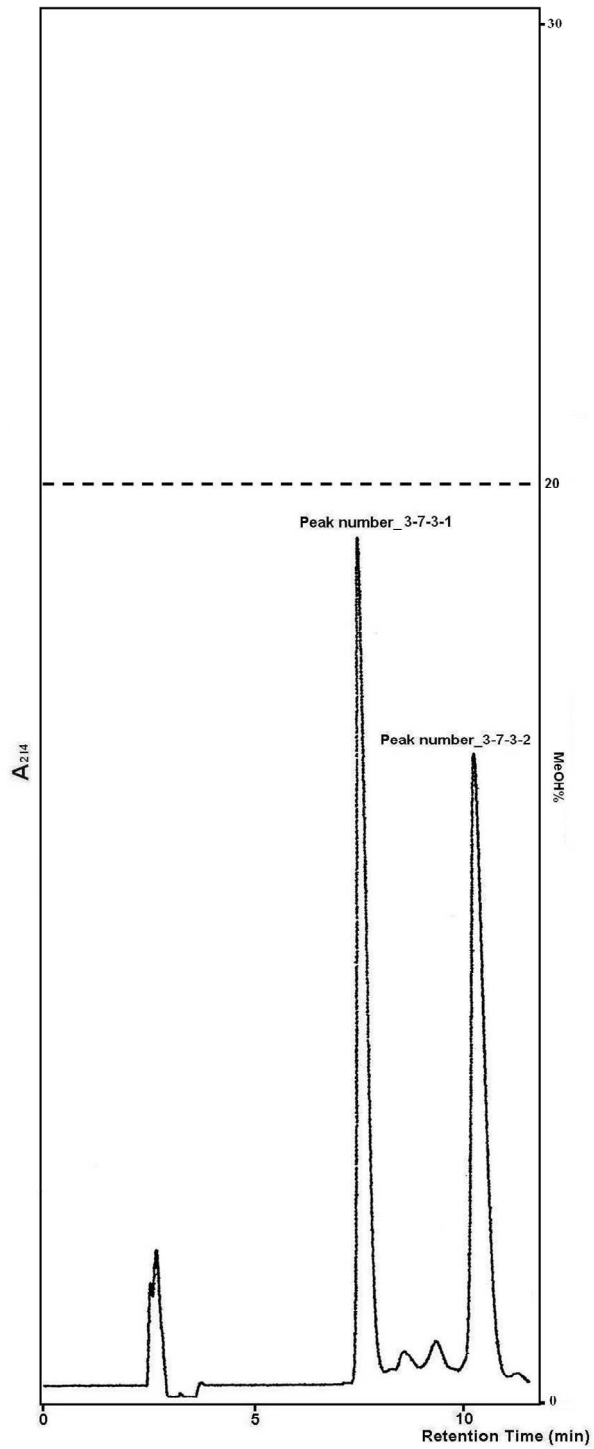
附圖三、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第六波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



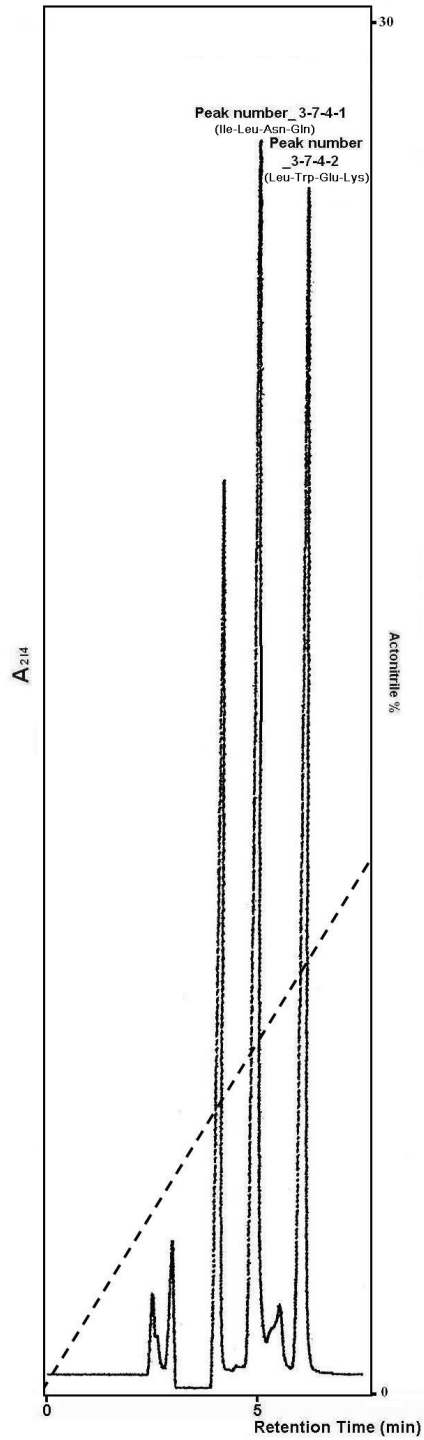
附圖四、以 HPLC-C18 半製備型管柱層析第三區間第七波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



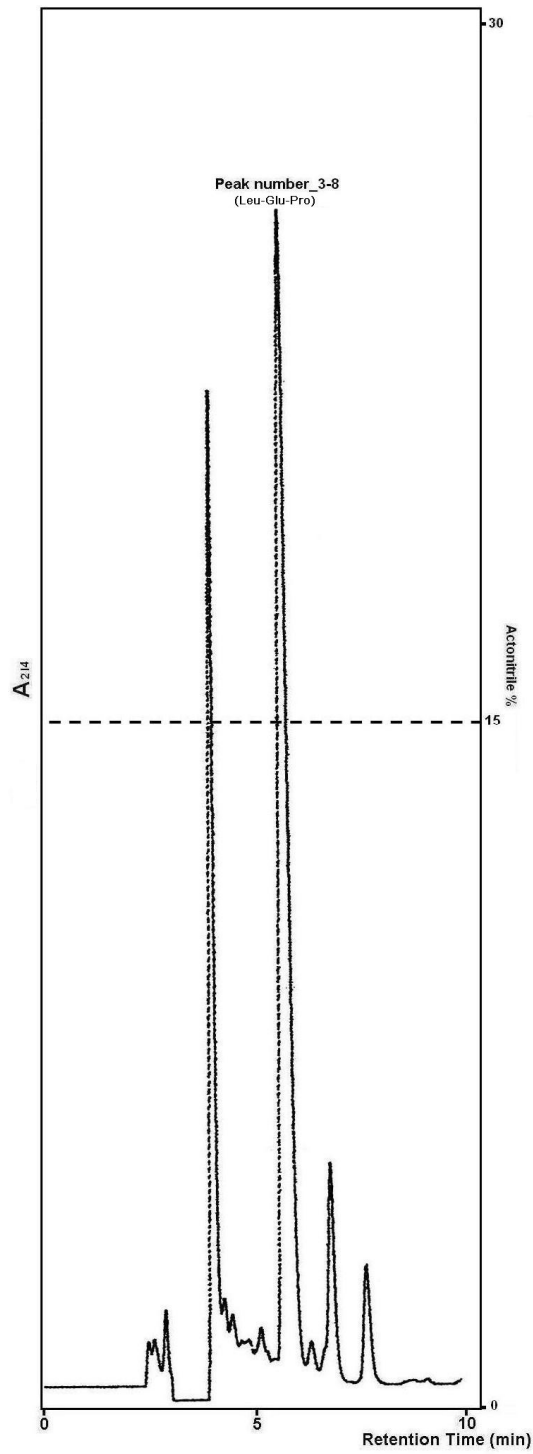
附圖五、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第 7-2 波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



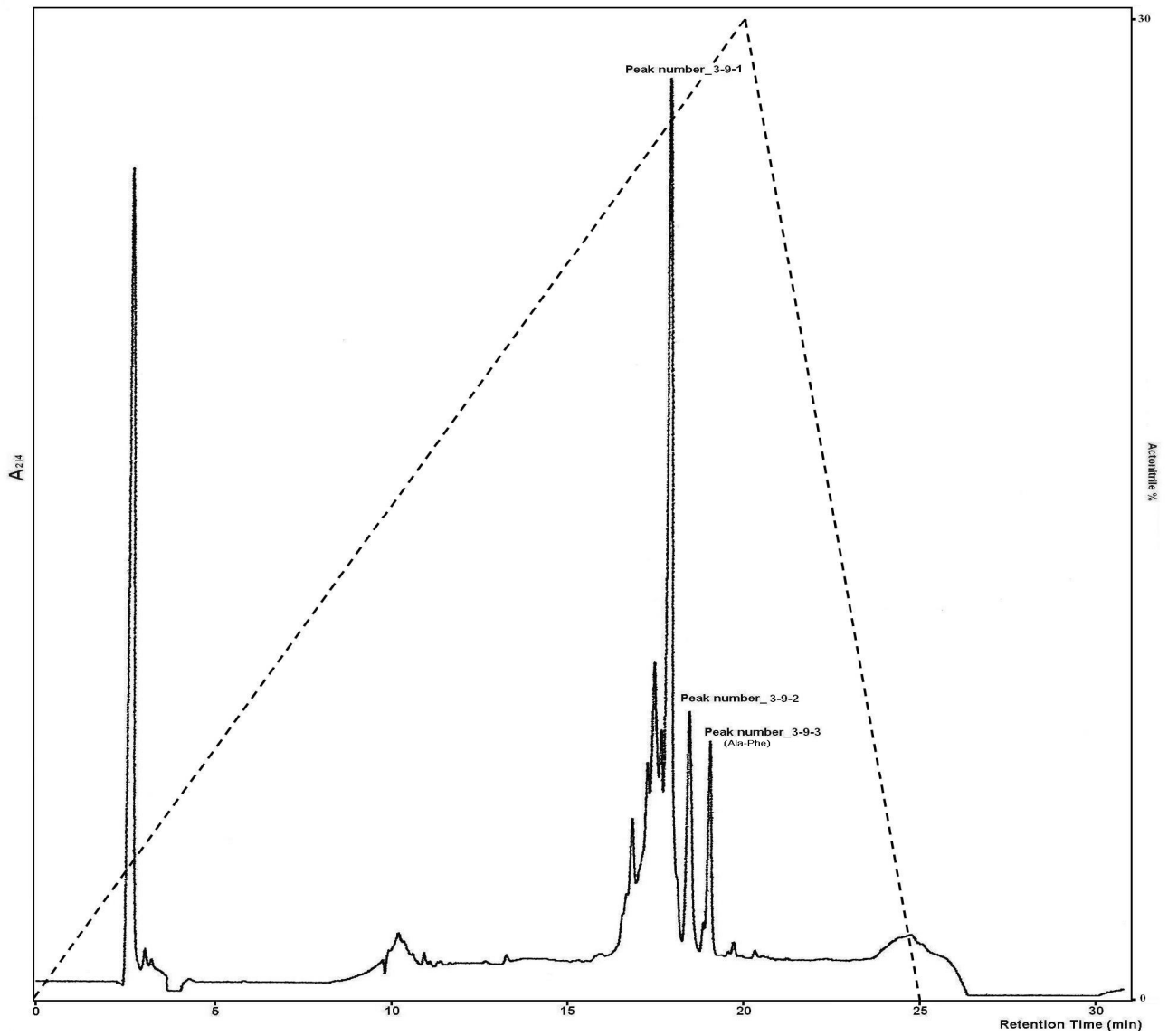
附圖六、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第 7-3 波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



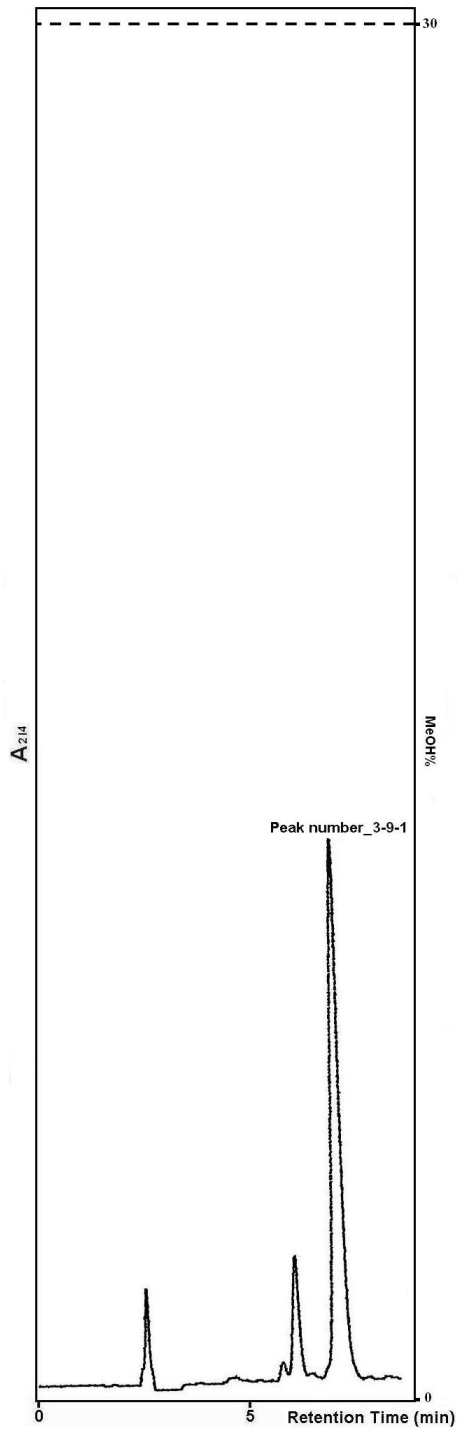
附圖七、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第 7-4 波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



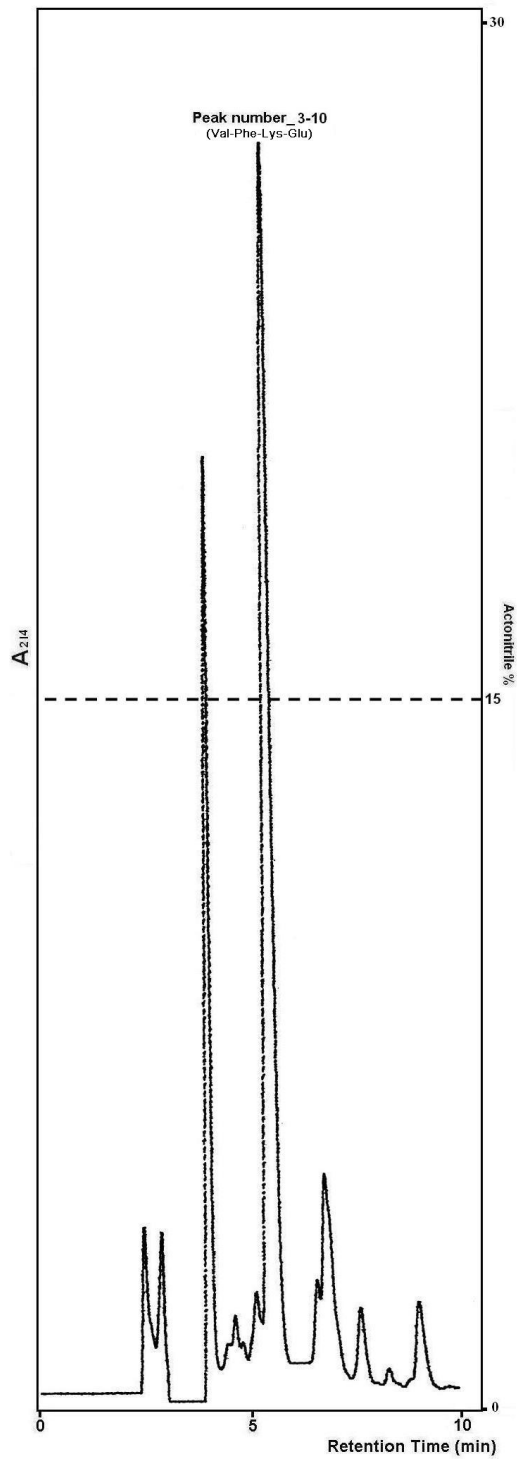
附圖八、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第八波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



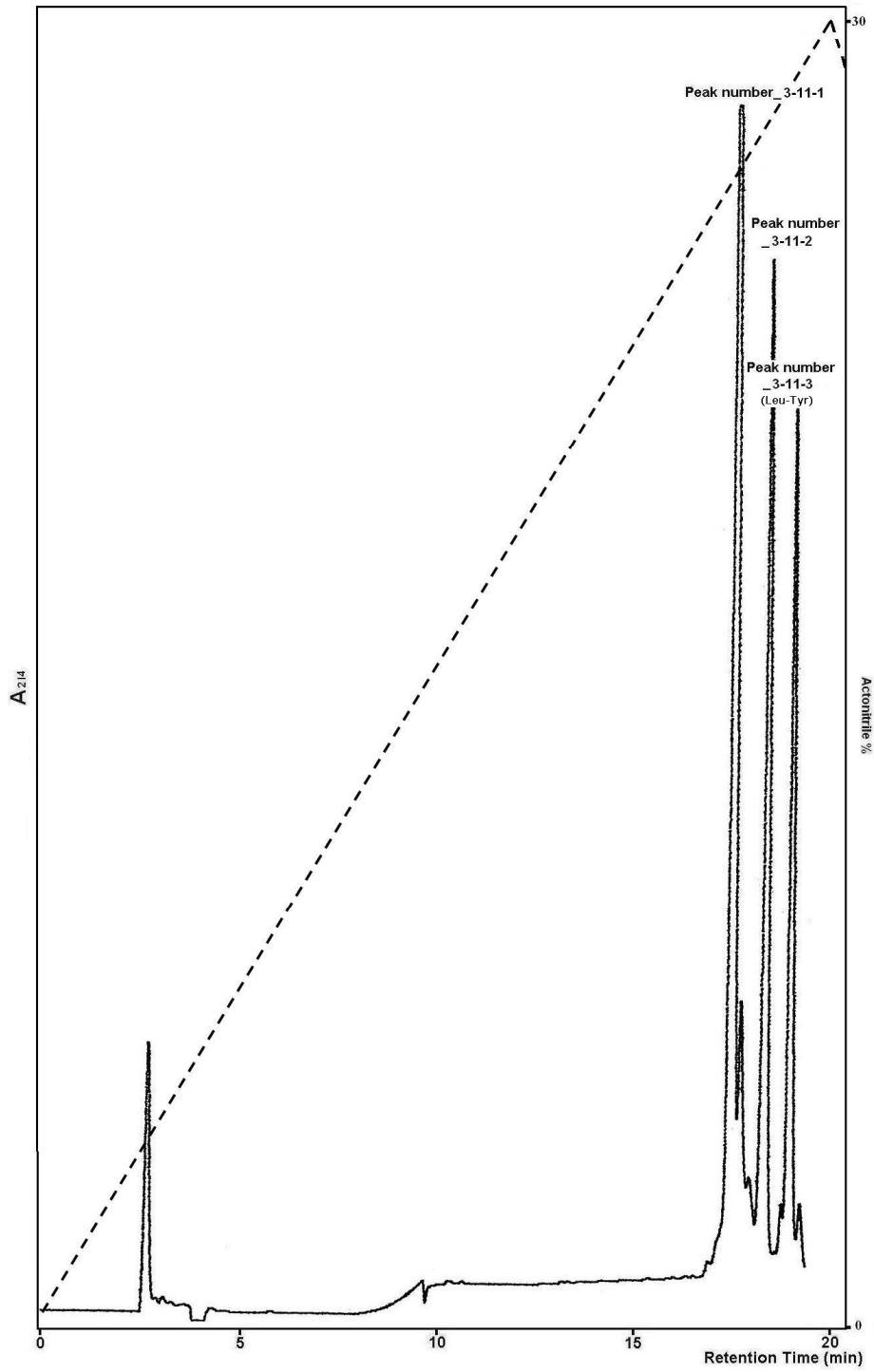
附圖九、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第九波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



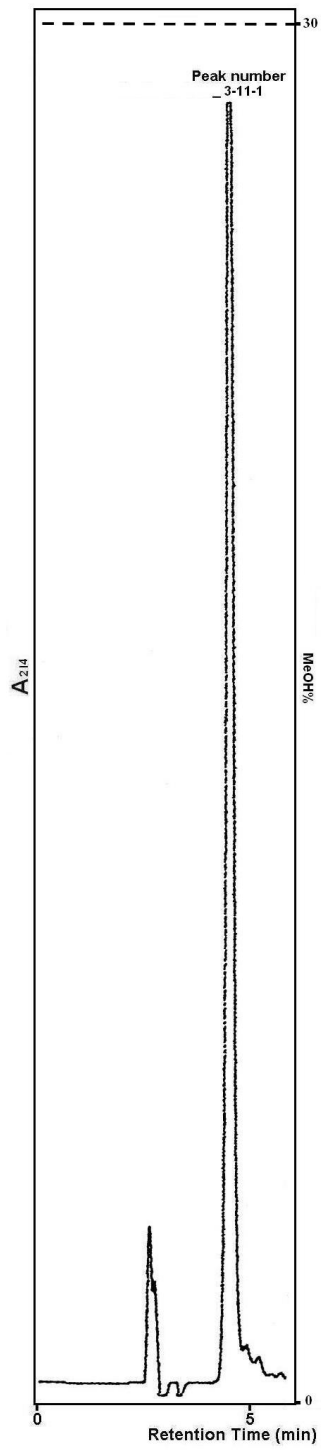
附圖十、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第 9-1 波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



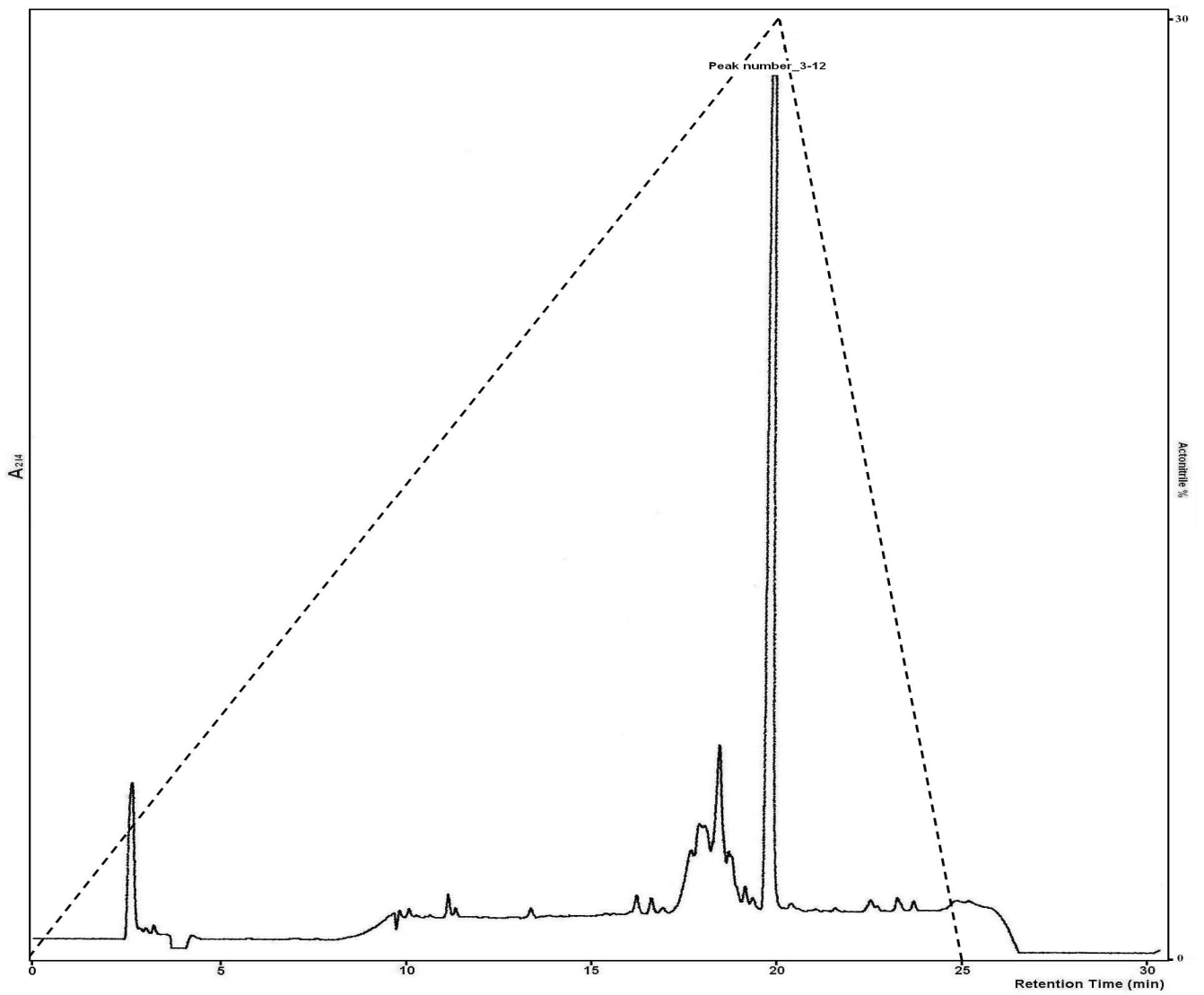
附圖十一、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第十波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



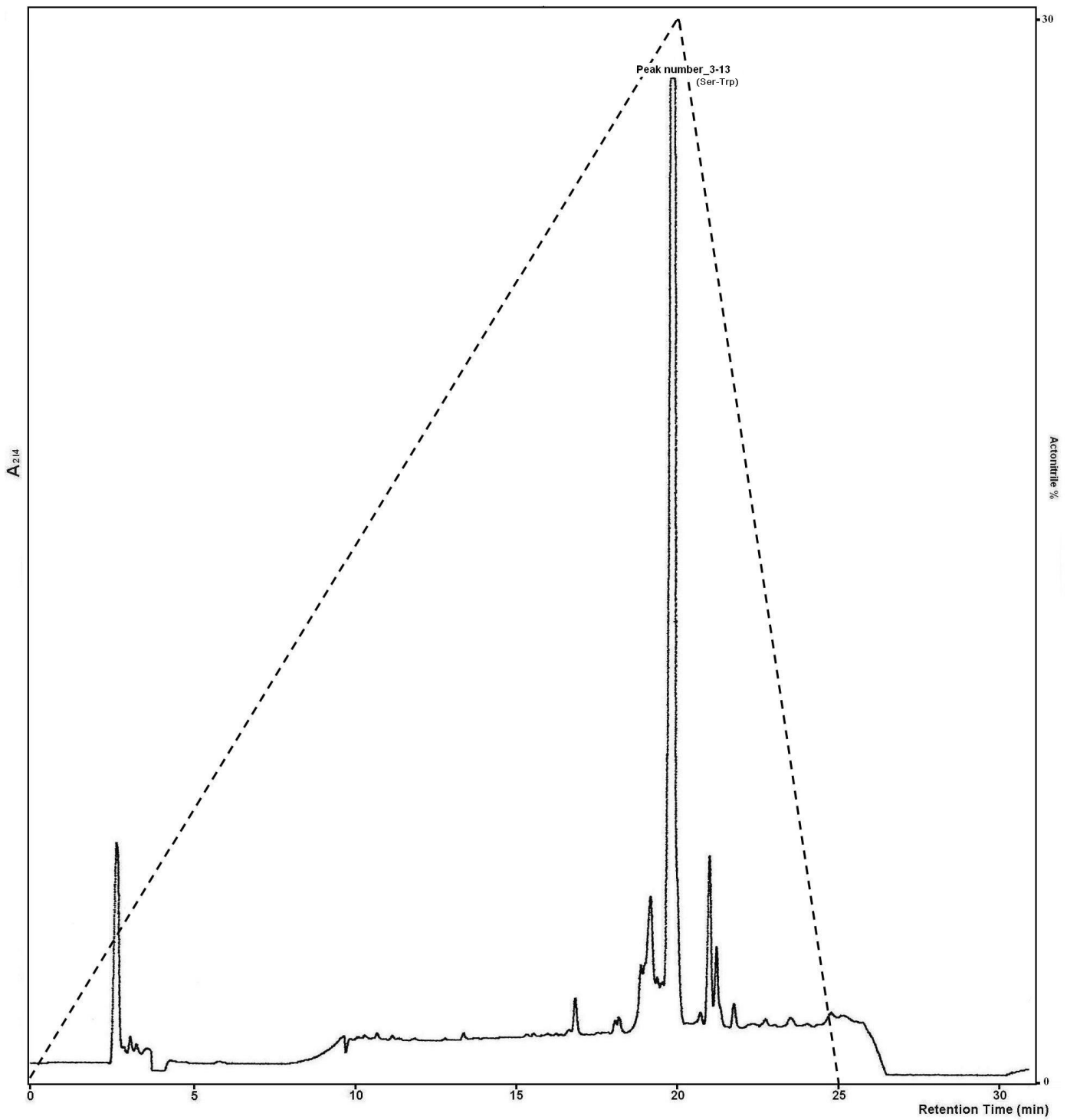
附圖十二、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第十一波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



附圖十三、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第 11-1 波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



附圖十四、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第十二波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。



附圖十五、以 HPLC-C18 分析型管柱層析第三區間第十三波峰之雞蛋蛋白水解胜肽片段。