

東海大學食品科學研究所  
Graduate Institute of Food Science  
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組碩士論文  
Master Thesis of Food Technology Section

指導教授：郭俊欽 博士  
江文德 博士

Advisor : Chun-Chin Kuo, Ph.D.

Wen-Dee Chiang, Ph.D.

鵝蛋黃蛋白質水解物抗氧化性之探討

Studies on Antioxidative Activities of Hydrolysates from Goose  
Egg Yolk Protein

研究生：吳麗娟 撰  
Graduate Student : Li-Jiuan Wu

中華民國九十九年一月  
January, 2010

## 目錄

目錄 .....	I
圖次 .....	V
表次 .....	VII
附錄次.....	VIII
中文摘要.....	IX
英文摘要.....	XI
壹、 前言.....	1
貳、 文獻回顧.....	3
一、 國內養鵝業之生產情形.....	3
(一) 白羅曼鵝之簡介.....	4
(二) 鵝蛋之特性與組成.....	5
(三) 蛋黃之組成及應用.....	5
二、 脂質氧化作用 .....	11
(一) 脂質自氧化作用 .....	11
(二) 脂質氧化與疾病 .....	15
三、 自由基與活性氧.....	17
(一) 自由基與活性氧的種類.....	17
(二) 自由基與活性氧的來源.....	18

(三) 自由基與活性氧對生物體的影響.....	20
四、 抗氧化機制與抗氧化物質.....	20
五、 影響胜肽抗氧化活性之因子.....	24
六、 蛋白質之水解作用.....	31
參、 材料與方法.....	41
一、 試驗材料.....	41
二、 實驗設計.....	41
三、 鵝蛋黃蛋白質水解物之製備.....	43
(一) 粗鵝蛋黃蛋白質之製備.....	43
(二) 實驗酵素.....	45
(三) 鵝蛋黃蛋白質酵素水解之條件篩選.....	45
(四) 鵝蛋黃蛋白質水解物之製備.....	46
(五) 基本成分分析.....	46
(六) GEYP 水解物之水解率測定.....	50
(七) 產率之測定.....	53
四、 抗氧化能力之測定.....	53
五、 磷含量之測定.....	58
六、 膜反應系統之區分作用.....	59
七、 分子量分佈分析.....	60

八、 胺基酸組成分析.....	63
九、 統計分析.....	67
肆、 結果與討論.....	68
一、 GEYP 基本成分分析.....	68
二、 GEYP 水解條件探討.....	70
(一) 較適基質濃度之探討.....	70
(二) 較適酵素濃度之探討.....	72
(三) 在相同水解條件下不同酵素對於水解率之影響及其 pH 值之 變化.....	75
三、 GEYP 抗氧化性水解物的製備條件及其特性之比較.....	78
(一) GEYP 水解物產率之比較.....	79
(二) GEYP 水解物抗氧化能力之比較.....	82
1. $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基清除能力之比較.....	82
2. 亞鐵離子螯合能力之比較.....	85
3. 還原力之比較.....	89
4. 清除氫氧自由基能力之比較.....	94
四、 探討 MH12h 經不同分子量限值區分所得之區分物對抗氧化力的 影響.....	97

(一) GEYP、MH12h 及其區分物之分子量分佈.....	97
(二) MH12h 區分物之還原力、金屬螯合力、氫氧自由基與 DPPH 自由基清除能力.....	99
(三) GEYP 最具抗氧化力區分物之胺基酸組成.....	102
伍、 結論.....	106
陸、 參考文獻.....	107
柒、 附錄.....	125

## 圖次

圖一、脂質自氧化的反應階段.....	12
圖二、不飽和脂肪酸自氧化反應中最初的氫過氧化物的形成.....	14
圖三、脂質氧化反應之最終產物.....	16
圖四、氧分子之氧化還原及激發狀態.....	19
圖五、電子捕捉劑所捕捉到的蛋白質之側鏈自由基之結構.....	28
圖六、甲硫胺酸側鏈還原脂質氫過氧化物的機制.....	30
圖七、試驗設計.....	42
圖八、粗鵝蛋黃蛋白質之製備流程.....	44
圖九、濾膜區分流程圖.....	61
圖十、不同酵素與 GEYP 濃度對其水解物水解率的影響.....	71
圖十一、Alcalase (a)與 Flavourzyme (b) 濃度與水解時間對 GEYP 水 解物之水解率之影響.....	73
圖十二、不同酵素與水解時間對 GEYP 水解物水解率之影響 (a) 及 其 pH 值之變化 (b).....	76
圖十三、酵素種類與水解時間對 GEYP 水解物產率之影響.....	80
圖十四、水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物之 DPPH 自由基清除 能力與 BHT 當量之影響.....	83
圖十五、水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物螯合亞鐵離子能力與	

EDTA 當量之影響.....	86
圖十六、GEYP 水解物之水解率對亞鐵離子螯合能力的關係.....	87
圖十七、水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物還原力和相對 BHT 當量之影響.....	92
圖十八、GEYP 水解物之水解率對還原力的關係.....	93
圖十九、水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物氫氧自由基清除能力之影響.....	95

## 表次

表一、各種禽蛋之重量、蛋白、蛋黃及蛋殼所占百分比.....	6
表二、禽類蛋黃蛋白質之組成.....	8
表三、鵝蛋黃及 GEYP 之基本組成分.....	69
表四、GEYP 水解物中總磷的含量.....	90
表五、GEYP、MH12h 及其膜區分物之分子量分佈.....	98
表六、MH12h 經不同分子量限制濾膜區分對其還原力、螯合力、 氫氧自由基和 DPPH 自由基清除能力之影響.....	100
表七、GEYP、MH12h、30kDa 與 1kDa 濃縮液的胺基酸組成...	103

## 附錄次

附錄一、L-Leucine 標準檢量線.....	125
附錄二、BHT 清除 DPPH 自由基清除能力之標準檢量線.....	125
附錄三、EDTA 螯合亞鐵離子之標準檢量線.....	126
附錄四、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 之標準檢量線.....	126
附錄五、還原力之標準檢量線.....	127
附錄六、MH12h 經不同分子量限值濾膜區分所得區分物之分子量 分佈.....	128
附錄七、標準品分子量與滯留時間檢量線.....	129
附錄八、分子量標準品之高效液相層析圖.....	130
附錄九、胺基酸標準品之高效液相層析圖.....	131

## 摘要

本研究以 7.5 % ( w/w of protein ) 之 Alcalase 、Flavourzyme 及二種混合 (1:1) 之酵素 (Mix) 分別對 8 % 鵝蛋黃蛋白質 (goose egg yolk protein; GEYP) 進行水解，並依水解時間製備 0、0.5、4、8、12h 水解物以探討水解時間 (hydrolysis time; HT) 與酵素種類對 GEYP 水解物之水解率 (degree of hydrolysis; DH)、產率及抗氧化特性之影響。結果顯示，三組酵素水解物之 DH 和產率皆隨 HT 增加而上升，其中以混合酵素水解 GEYP12h 所得之水解物 (MH12h) 其 DH 最高可達 56.7 %，其次為 Flavourzyme 的 36.7 %。就抗氧化性而言，MH12h 具最佳的  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基清除能力、氫氧自由基清除能力、還原力及亞鐵離子螯合力。將 MH12h 依序經 30、10、1 及 0.15 kDa 分子量限值濾膜進行區分，分別可得 30、10、1 與 0.15 kDa 濃縮液與 0.15 kDa 濾液，30 kDa 濃縮液具最佳的亞鐵離子螯合力與 DPPH 自由基清除能力，此區分物之 Tyr 與 Ser 含量顯著增加，這可能與其抗氧化力之提升有關。1 kDa 濃縮液具有最佳的還原力與清除氫氧自由基的能力，可能與胺基酸 Pro 含量增加有關。上述兩區分物之分子量主要小於 1,000 Da，推測此分子量之胜肽提供較佳的抗氧化力。由此可知 MH12h 有良好的抗氧化力，未來具開發為天然抗氧化物質應用於食品系統中之潛力。

關鍵字: 鵝蛋黃蛋白質(GEYP)、酵素、抗氧化力、超濾膜過濾、胺基酸組成。

## Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of hydrolysis time (HT) (0, 0.5, 4, 8, 12 h) and enzyme types (Alcalase, Flavourzyme, and Mixed enzyme Alcalase + Flavourzyme) on degree of hydrolysis (DH), yield, and antioxidant activities during hydrolysis of 8 % goose egg yolk protein (GEYP). Each enzymes concentration was 7.5% (w/w of protein). Both DH and yield of the hydrolysates increased with increase of HT. The hydrolysate obtained from hydrolysis of GEYP with mixed enzyme for 12h (MH12h) had the highest DH of 56.7 % than Flavourzyme's 36.7 %. For antioxidative activities of the hydrolysates, MH12h had the strongest  $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, reducing power, and ferrous ion chelating activity. MH12h were further fractionated by ultrafiltration membranes with 30, 10, 1, and 0.15 kDa molecular weight cut-off (MWCO) sequentially to obtained 30, 10, 1, 0.15 kDa concentrate and 0.15 kDa permeate, respectively. The result showed 30 kDa concentrate had higher ferrous ion chelating activity and DPPH radical scavenging activity than other fractions. For the amino acid composition, 30 kDa concentrate had higher Tyr and Ser. 1 kDa concentrate had higher reducing power and hydroxyl radical scavenging activity than others. It might be due to its higher Pro content. The molecular weight profile of 30 kDa and 1 kDa concentrate had mainly 1,000 Da. Therefore, MH12h had stronger antioxidative activity, and may serve as potential nature antioxidative materials for food system in the future.

Key words: Goose egg yolk protein, Enzyme, Antioxidative activities,

Ultrafiltration membrane, Amino acid composition.

## 壹、前言

食品中油脂的氧化產生不良風味、質地改變及潛在的毒性物質形成，因此極受到食品業者與消費者的關切 (Niki *et al.*, 1991)。此外，也有報導指出氧化作用或自由基的反應會引起人體產生癌症、心血管疾病與阿茲海默症 (Alzheimers) 等疾病 (Ferrari and Torres, 2003)。為了防止食品這類的敗壞作用以及預防上述疾病的生成，抑制體內與食物中的油脂氧化是非常重要的。一般而言，藉由添加抗氧化劑延緩氧化作用所產生色變與敗壞而保存食品。然而，有研究指出合成的抗氧化劑如 BHA 與 BHT 對於人體健康有負面的影響 (Branen, 1975)，因此近年來人們較傾向於尋求天然的抗氧化物質。

目前已有許多來自動植物性蛋白質水解物具有抗氧化活性，如酪蛋白 (Kim *et al.*, 2007)、大豆蛋白 (Chen *et al.*, 1996)、小麥穀蛋白 (Kong *et al.*, 2008)、豬血紅球蛋白 (Liu *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2007)、牡蠣蛋白 (Qian *et al.*, 2008 b) 等。Sakanaka *et al.* (2004) 將雞蛋黃萃取磷脂質後，所剩的蛋黃蛋白質副產物進行酵素水解，發現其水解物具有良好的抑制亞麻油酸自氧化的作用。Sakanaka and Tachibana (2006) 指出雞蛋黃蛋白質水解物具有清除活性氧自由基的活性及有效的抑制碎牛肉和鮭魚肉中 TBARs 生成。Park *et al.* (2000) 將無卵磷脂

的雞蛋黃蛋白質水解物，以超濾膜區分，發現分子量小於 5 KDa 的水解物有較強的抗氧化力。

台灣養鵝事業近年呈快速成長，據產業之估算，年屠宰數量已逾 1,000 萬隻，以民國 84 年台灣種鵝調查資料表示種鵝量為 807,137 隻 (王等, 1996)，而每隻種鵝每年平均產蛋量 30-40 顆 (王等, 2002)，鵝蛋受精失敗率佔三成 (葉, 1998) 來估算，每年約有未受精的鵝蛋 7,264,233 顆，然而鵝蛋的加工利用鮮少如雞蛋與鴨蛋。因此為增加鵝蛋的利用價值，本實驗使用未受精的鵝蛋黃蛋白質經 Alcalase、Flavourzyme 以及 Alcalase 與 Flavourzyme (1:1) 混合酵素進行水解，探討鵝蛋黃蛋白質的抗氧化特性，以期能應用在機能性保健食品的開發。

## 貳、文獻回顧

### 一、國內養鵝業之生產情形

台灣養鵝業界近年呈快速的成長，由民國 76 年飼養隻數 195.9 萬隻至民國 85 年已成長 1.54 倍，目前鵝隻年屠宰數量達 587 萬隻 (行政院農委會, 2007)，佔畜牧生產總值之 1.5%。台灣目前以飼養白羅曼鵝、褐色華鵝及白色華鵝為主，白羅曼鵝佔有絕大的市場空間，約 97%。白羅曼種鵝主要飼養於雲、嘉、南地區，中國鵝種鵝則以桃園地區居多。鵝之生長比大部分家禽類快約 1.7 倍 (Björnhag, 1979)。臺灣養鵝係以肉用為目的，鵝蛋除供孵化成肉用雛鵝或種用雛鵝，飼養為肉鵝或種鵝外，鮮少如雞蛋或鴨蛋有其他加工用途 (王, 2000)。因此，提升種鵝的產蛋性能是相當重要。

葉 (1998) 比較不同品種鵝隻繁殖性能，比較中國鵝、愛姆登鵝、白羅曼鵝與土魯斯鵝種之產蛋率、受精率與孵化率，發現中國鵝的繁殖性能仍不如外來種，其年平均產蛋數僅約 25 個，受精率與孵化率約在 72~74 %之間，歐美鵝種的白羅曼與愛姆登之年產蛋數相近約 40 個，受精率與孵化率都在 80 %以上 (邱等, 1989; Tai, 1989)。經過種鵝之選育計劃，進行生長及繁殖性能檢定，選拔高產蛋母系及大體型公系。白羅曼鵝之產蛋數目前已可提升年產蛋數約 50 個。鵝之生產有

其季節性，在臺灣正常的產蛋期是從 10 月至翌年 4 月，70%之雛鵝孵化集中於 1~4 月，致使雛鵝及肉鵝之價格有顯著的波動；季節內、外之價差，雛鵝高達 4~7 倍、肉鵝為 2~3 倍。因此，臺灣種鵝之經營效益反而著重於產期之調控，許多種鵝場以控制飼料營養供給之方法，使種鵝停產或及早開產，雖然受到營養、生理及日照等種種因素的影響。歐 (2003) 利用環控式鵝舍，並配合點燈光照計畫，對白羅曼種鵝產蛋性能及產期調控之影響。結果顯示，產蛋率與受精率亦隨光照時間延長而顯著增加，第一產期平均每隻母鵝產 66.5 枚蛋、種蛋的受精率在 80%以上，而孵化率在 85%以上，與傳統飼養之母鵝種蛋相比較，受精率與孵化率較高。即使如此，未受精率約占 20%，而這些未受精鵝蛋，即成為養鵝業者副產物。依八十四年度種鵝資訊調查結果指出，本省種鵝數量達 807,137 隻；其中白羅曼種鵝計 787,632 隻 (王等, 1996)。根據上述之數據估計每年約有 7,264,233 顆未受精的鵝蛋。國內鵝蛋鮮少如雞蛋或鴨蛋有其他加工用途 (王, 2000)。

### (一) 白羅曼鵝之簡介

本實驗之原料為白羅曼鵝之未受精蛋。白羅曼鵝 (White Roman Goose)，學名為 *Coscoroba coscoroba*，屬於鳥綱 (Avia)，雁形目 (Anseriformes)，雁鴨科 (Anatidae)。原產於歐洲，歐洲最古

老的品種，原在義大利育成，羽毛白色，喙、脛、趾為橘紅色。雄性成鵝體重 10-12kg，雌性 9-10kg。國內係於民國 62 年自丹麥引進選育之白羽商用品系，故稱白羅曼。白羅曼屬輕型體型之鵝種，全身羽毛白色，眼為藍色，喙、腳脛與趾均為橘紅色，生長迅速（賈與粘，2006），鵝之生長比大部分家禽快約 1.7 倍 (Björnhag ;1979)。飼養 3 個月可達成熟上市體重 5 公斤。白羅曼鵝的飼料效率比鴨好，飼料消耗約 17-18 公斤，換肉率 3.4：1。產蛋能力較一般鵝佳，具經濟價值 (李，2004)。台灣目前以飼養白羅曼鵝、褐色華鵝及白色華鵝為主，白羅曼鵝佔有絕大的市場空間，約 97%。白羅曼種鵝主要飼養於雲、嘉、南地區。

## (二) 鵝蛋之特性與組成

蛋的組成構造由外而內依次為蛋殼、外蛋殼膜、內蛋殼膜、蛋白、蛋黃膜與蛋黃 (Gilbert *et al.*, 1971)。鵝蛋重量 140-18.6 g (如表一)，較雞蛋與鴨蛋大，蛋殼比例約 10 %，蛋白與蛋黃各佔總蛋重的 58 %與 30.4 %。鵝蛋之基本組成為水分 89.2 %、蛋白質 9 %、脂肪 0.03 % 與灰分 0.69 %。

## (三) 蛋黃之組成及應用

表一、各種禽蛋之重量、蛋白、蛋黃及蛋殼所占百分比

Table 1. Egg weight and percent of egg white, yolk, and egg shell of different avian egg

Avian	Egg weight (g)	Percent of total egg weight (%)		
		Egg white	Yolk	Egg Shell
Chicken	50.1-68.5	57.0-63.4	28.0-30.6	8.1-2.4
Duck	65.1-6.9	56.3	34.0	9.4
Goose	143.2-18.6	58.7	30.4	10.8

(張，1992)

由於目前無文獻針對鵝蛋黃之蛋白質組成做分析探討，因此以一般家禽類之蛋黃組成做概述，以了解實驗原料鵝蛋黃的組成。母雞與其它禽類的蛋黃主要供胎生長發育的貯存營養之用。家禽的蛋黃含有 50% 固形物，而大部分的固形物以脂蛋白形式存在 (陳，2006)。一般而言蛋白質與脂肪是蛋黃中主要的成份，亦含有少量的醣類及礦物質。

## 1. 蛋白質

蛋黃中約含有 16% 的蛋白質，大部分為磷蛋白(phosphoprotein) 與脂蛋白 (lipoprotein)。蛋黃之蛋白質可分為 (表二) 脂蛋白、卵黃磷蛋白 (phosvitin)、卵黃球蛋白 (livetin) 及核黃素結核蛋白(riboflavin binding protein) 等。

### I. 脂蛋白質

(1) **低密度脂蛋白 (low density lipoprotein; LDL):**是蛋黃中含量最高之蛋白質，含有 80-90%脂肪，比重 0.89。LDL 易為磷脂酶及蛋白分解酶所分解，故其結構是以三酸甘油酯為中心，而包以磷脂質、蛋白質、膽固醇等極性成分者。

(2) **脂卵黃磷蛋白 (lipovitellin):**又稱為高密度脂蛋白，比重大於 1 (陳，2006)，相較於 LDL，含脂量較少，且脂質大部分存在於分子內部。脂卵黃磷蛋白存在於顆粒中而與卵黃磷蛋白形成複合體。含有

表二、禽類蛋黃蛋白質之組成

Table 2. The composition of egg yolk protein

蛋白質	重量	固形物	蛋白質	脂質	脂質磷	蛋白質磷
低密度脂蛋白	33.7	65	22.0	93	19.0	-
卵黃球蛋白	5.3	10	30.0	-	-	-
卵黃磷蛋白	2.1	4.0	12.0	-	-	69.0
脂卵黃磷蛋白	8.3	16.0	36.0	7.0		12.0
其它	2.6	5.0	-	-	-	-
核黃素結合蛋白	-	-	0.4	-	-	-

(Gilbert, 1971)

0.75%醣。

## II. 卵黃磷蛋白 (phosvotin)

Mechan and Olcott (1949) 由蛋黃分離出卵黃磷蛋白，含有 10 % 磷，此佔蛋黃全磷之 69 %; 而磷酸基以 *o*-phosphoserine 之形式存在。卵黃磷蛋白之胺基酸組成中，約含有 1 % serine，而此 serine 之 94-96 % 與磷酸結合存在。卵黃磷蛋白不含 cysteine。Lu and Baker (1986) 添加 phosvotin 至含有鐵和銅的蛋黃磷脂質乳化物中，發現 phosvotin 可以防止鐵催化的氧化作用。Lu and Baker (1987) 發現當添加蛋黃或 phosvotin 至火雞頸肉或腿肉製備的肉餅中，可顯著降低頸肉肉餅中氧化作用程度。Yamamoto *et al.* (1990) 發現全蛋黃對亞麻油酸乳化物具有抗氧化性，而 LDL 與 phosvotin 有較低的活性。而如添加脂蛋白至 phosvotin 能增進抗氧化效果。

## III. 卵黃球蛋白

卵黃球蛋白為蛋黃中唯一之單純蛋白質，為蛋黃加水稀釋時不沉澱而可以溶解之蛋白質 (張，1986)，可以分離為  $\alpha$ -、 $\beta$ -及  $\gamma$ -livetin 三部分; livetin 之 pI 為 4.8-5.0 (Martin *et al.*, 1957) ，磷含量為 0.05%，硫含量為 1.8 % (林，1983)。

#### IV. 核黃素結合蛋白

僅佔蛋黃蛋白質之 0.4 %。此蛋白質與核黃素成 1:1 結合，核黃素結合之部位為 tryptophane 殘基。在 pH3.8-8.5 均呈安定，含有 12 % 糖。

#### 2. 脂質

蛋黃約含有 30-33% 脂質包括三酸甘油酯、固醇類、類胡蘿蔔素及磷脂質，其它少量之固醇類與微量之醣脂質。蛋黃所含約 10 % 磷脂，其中大部分為卵磷脂，亦即蛋黃約含有 7 % 卵磷脂。天然食品中未含有如此多的卵磷脂者。卵磷脂因具有強乳化作用，故冰淇淋、蛋黃醬等食品加工常利用蛋黃 (張，1986)。此外，化粧品業利用卵磷脂分子帶有正電荷與磷酸酯基之負電荷的兩性界面活性劑，在酸性 pH 值時，主要帶正電，可吸附於毛髮上而使梳通良好 (陳，2006)。藥品工業已利用蛋黃脂之良好乳化安定性，可添加作為脂溶性藥物之載體 (parenteral fat emulsion intralipid ) (陳，2006)。Sugino *et al.* (1997) 以乙醇萃取的蛋黃脂對脂質 DHA (docosahexaenoic acid) 與 squalene 具有抗氧化效果，並表示磷脂質的脂醯鏈不飽和度和抗氧化具有密切的關係。不飽和度愈高，則抗氧化活性愈強。蛋黃脂質用途相當廣泛，蛋黃磷脂質常利用有機溶劑萃取，Sim (1994) 曾使用乙醇萃取鮮蛋和蛋黃中的磷脂質。食品工業界利用正己烷萃取大豆油已有數年的時間，Larsen and

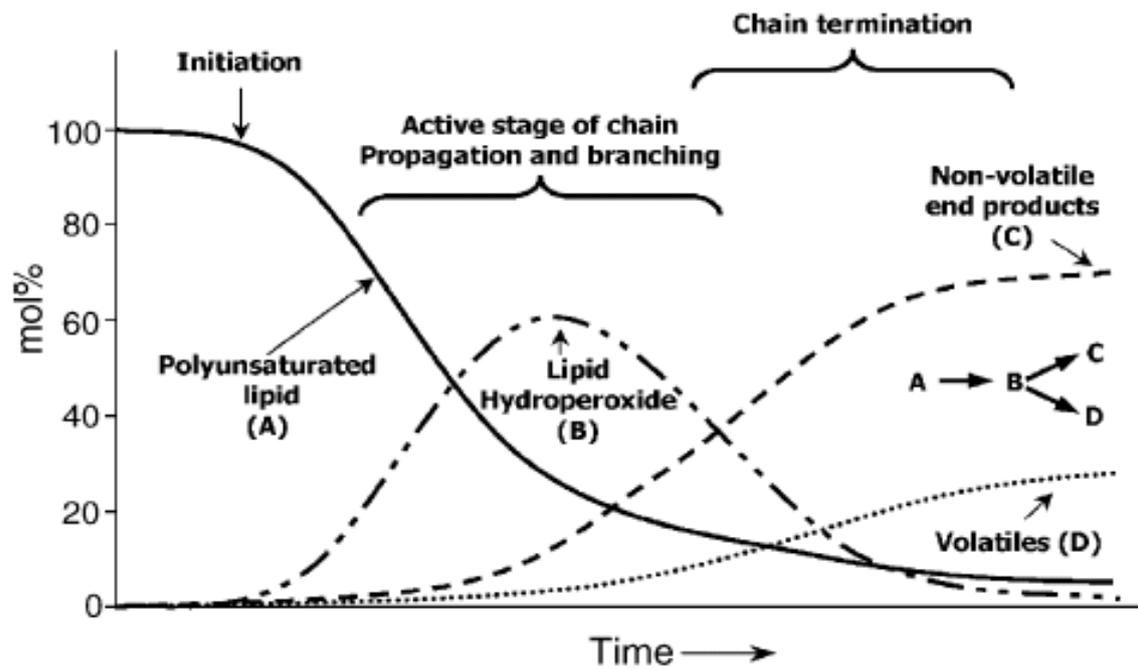
Froning (1981) 利用 hexane-isopropanol 萃取蛋黃油是可行的。Chung and Ferrier (1991) 利用 hexane、95% ethanol、isopropanol、chloroform : methanol (2:1)、hexane : isopropanol (77:23)及 hexane : ethanol (77:23) 將乾燥蛋黃粉脫脂，結果顯示以 hexane : isopropanol (77:23)為佳，可去除 50%以上的脂質。蛋黃磷脂質經有機溶劑萃取後，所剩的蛋白質成為生產蛋黃磷脂質的副產物，目前其在食品加工利用率較低，若能將此蛋白質副產物經酵素水解產生具有機能性之產品，將能提高其應用價值。

## 二、脂質氧化作用

油脂氧化酸敗 (rancidity) 會產生低分子揮發性物質使食品風味、質地及外觀顏色改變，是食品劣化的主要原因。油脂的氧化酸敗同時產生氧化產物，對生物體也有不良的影響 (Niki *et al.*, 1991)。已有文獻指出脂質氧化的過程與生物膜的結構和功能損傷有關，對於生物體可能造成各種生理失調與疾病的產生，如動脈硬化、糖尿病、老化等，此與食品或生物來源的氧化物或缺乏抗氧化物質有相關 (Ferrari and Torres, 2003)。

### (一) 脂質自氧化作用

因脂質中含有不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸或三酸甘油脂等因輻射、助氧化劑 (如金屬離子)、或酵素與氧的作用，不飽和脂肪酸減少，



圖一、脂質自氧化的反應階段。

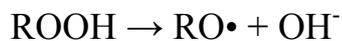
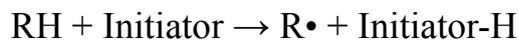
Fig. 1. The stages of lipid autoxidation.

(Gorkum and Bouwman, 2005)

產生氫過氧化物，再分解成揮發性或非揮發性之醛、酮及低級脂肪酸或形成聚合物的過程，此為油脂自氧化作用，其過程可分為三步驟 (圖一):

### 1. 起始期 (initiation stage)

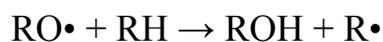
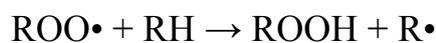
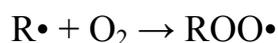
#### Initiation



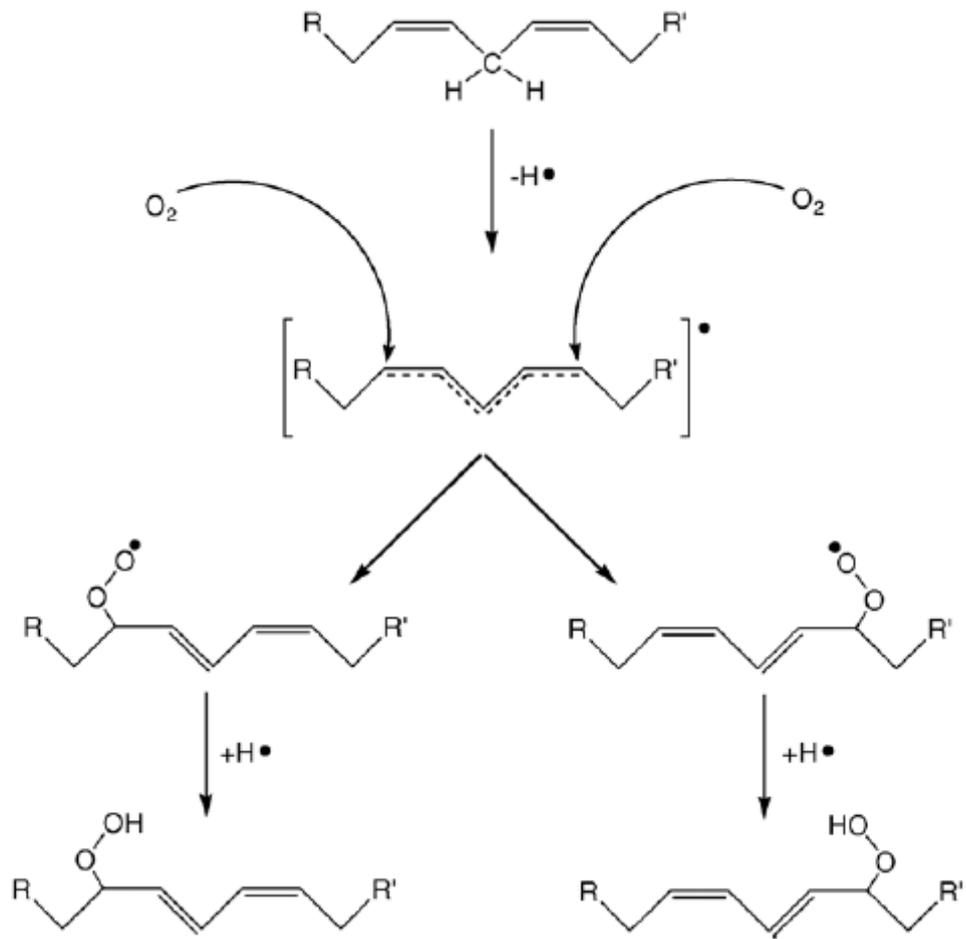
受到單旋態氧 (singlet oxygen;  $^1\text{O}_2$ )、過渡金屬、光熱或脂質氧化過程中所產生的脂質自由基等高能量物質引起反應，使不飽和脂肪酸的戊二烯雙鍵中間之甲烯基 ( $\alpha$ -methylene) 脫落一個質子，形成活性極高的脂質自由基，此階段反應較慢，卻是脂質自氧化速率的決定步驟。

### 2. 連鎖反應期 (propagation stage)

#### Propagation



此時期主要反應為脂質受到自由基的攻擊，繼而產生更多自由基，脂質自由基與氧反應過氧化自由基 (peroxide radical)，過氧化自由基 ( $\text{ROO}\cdot$ ) 再去攻擊其它不飽和脂肪酸，搶奪質子以產生新的脂質自由基與脂質氫過氧化物 (lipid hydroperoxides)，此步驟不斷進行脂質



圖二、不飽和脂肪酸自氧化反應中最初的氫過氧化物的形成。

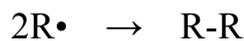
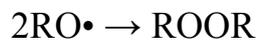
Fig. 2. Initial hydroperoxide formation in the autoxidation of the unsaturated fatty acid.

(Gorkum and Bouwman, 2005)

自由基的形成且與環境中的氧反應，為脂質誘導期 (induction period)，直到系統內所有不飽和脂肪酸全部變成自由基為止。圖二表示脂質自由基與氫過氧化物之形成 (Gorkum and Bouwman, 2005)，此類化合物累積量達到最高峰後開始分解。

### 3. 終止期 (termination stage)

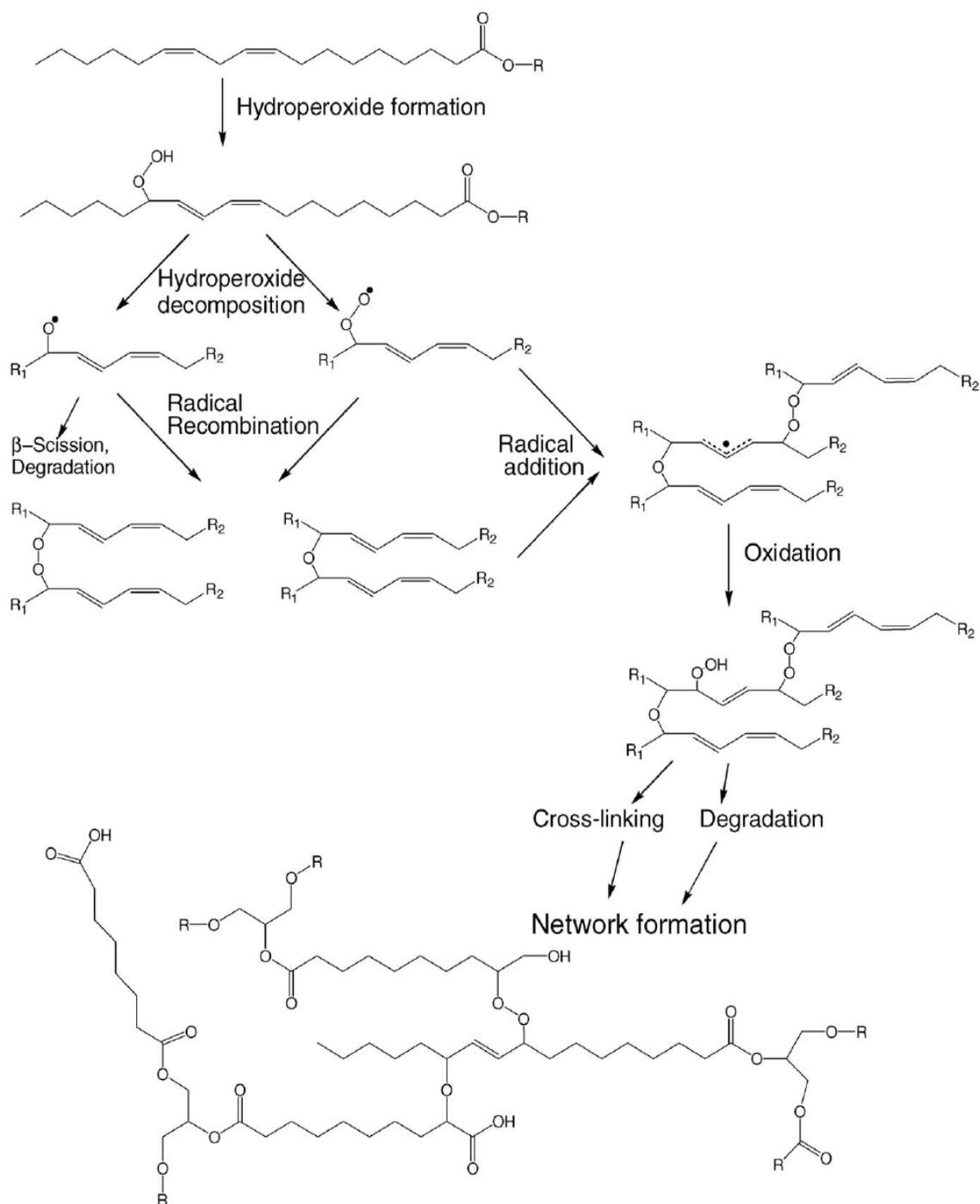
Termination



在反應的最後階段，自由基分子與另一個自由基分子結合形成相對穩定的產物，終止整個連鎖反應。氫過氧化脂質非常不安定，在此時期會形成醛、酮、酸及短鏈的碳氫化合物等低分子揮發性物質或聚合成非揮發性的雙聚物 (dimer)、三聚合物 (trimer) 或聚合物 (polymer) 等高分子物質。圖三表示氫過氧化物進一步氧化、斷裂或重組生成非揮發性聚合物 (Gorkum and Bouwman, 2005)。

### (二) 脂質氧化與疾病

脂質自氧化過程所產生的自由基、氫過氧化物、醛、酮與酸等會破壞食品中維生素或使蛋白質變性，不僅降低食品中的營養價值，也



圖三、脂質氧化反應之最終產物。

Fig 3. Terminal products by lipid oxidation.

(Gorkum and Bouwman, 2005)

會引起生物體老化，而罹患心血管疾病及癌症等。飲食中含有高量過氧化脂質不僅促進膽固醇氧化，同時間接地引起動脈硬化 (Yagi, 1987)。生物體內細胞膜中的磷脂含有豐富的多元不飽和脂肪酸，若這些多元不飽和脂肪酸受到自由基攻擊，也會引起脂質自氧化反應。若體內累積過多的氧化脂質，細胞膜上的選擇性及運輸等功能受損，直接或間接造成血栓、動脈硬化、白內障等疾病 (Blair, 2001)。生物體內的自然防禦機制可協助自由基及脂質過氧化作用所帶來的危害，如細胞內的超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 等酵素均有清除自由基的危害，細胞外的防禦機制主要來自於一些具有抗氧化作用的物質，如 vitamin E、vitamin C、carotenoids 等，皆能中止脂質過氧化的連鎖反應 (五十嵐等, 1986)。

### 三、自由基與活性氧

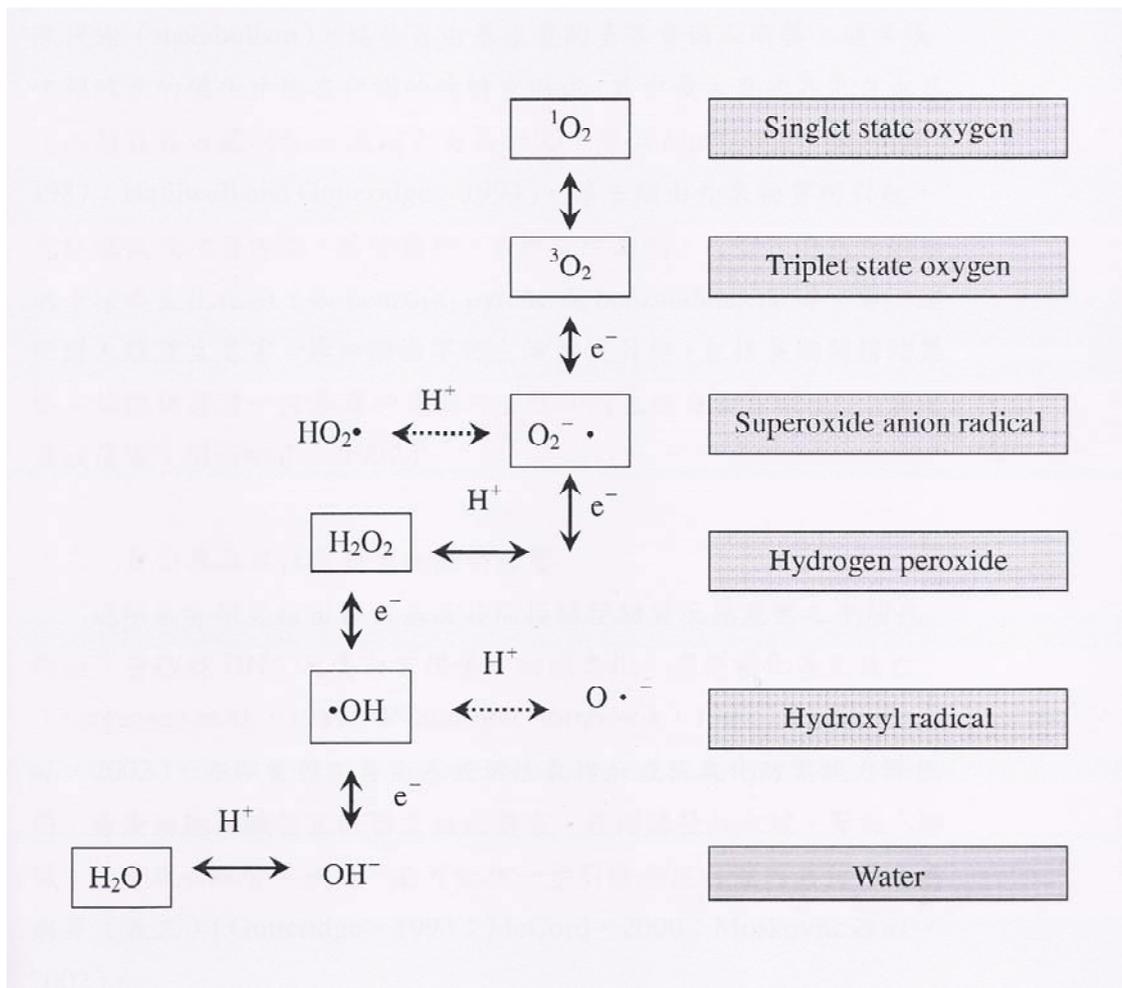
#### (一) 自由基與活性氧的種類

自由基是指任何在電子軌域上具有一個或多個不成對電子而孤立存在的原子或分子 (Halliwell, 1994)，依其成對電子所在位置而區分以碳、氧、氮或硫為中心之自由基 (Simic, 1988)。根據量子力學原理，這類的原子或分子處於極不穩定活性極高的狀態，易與其它分子發生

反應 (Karnovsky, 1994)，尤其是分子基團中具有雙鍵的位置，攫取其電子形成新的不穩定自由基，引發連鎖反應並造成其他分子化學性質、結構或功能上的改變，自身則成為穩定的配對狀態並釋放出能量。活性氧分子 (reactive oxygen species; ROS) 是指反應性較三旋態氧分子強的含氧分子。泛指以氧為中心的高反應性分子，狹義的活性氧是指需氧生物體，在生物體內代謝過程中產生的超氧自由基 ( superoxyl radical;  $O_2^-$ )、過氧化氫 ( $H_2O_2$ )、氫氧自由基 (hydroxyl radical;  $OH\cdot$ )、單旋態氧 (singlet oxygen;  $^1O_2$ )等。正常的代謝過程，兩個氧分子僅接收四個電子 (如圖四)，並和質子結合形成兩分子的水。若一個氧分子僅接收一個電子，則形成超氧陰離子; 接收兩個電子和質子，則形成過氧化氫; 接收三個電子則形成氫氧自由基 (遠藤和淺田，1992)。

## (二) 自由基與活性氧的來源

生物體內自由基與活性氧的來源，一般可分為外在及內在兩方面。外在來源包括環境污染物、香菸、離子輻射及化學藥劑如農藥等所誘發體內產生的自由基; 細胞進行氧化作用所產生的自由基為主要內在來源。一般生物體進行呼吸作用或某些藥物在體內的代謝過程會產生自由基。



圖四、氧分子之氧化還原及激發狀態。(遠藤和淺田，1992)  
 Fig. 4. Oxygen and reactive oxygen species.

### (三) 自由基與活性氧對生物體的影響

近年來許多研究指出自由基及其間接誘發脂質反應產生之中間代謝產物，造成 DNA 及蛋白質損傷、細胞老化、突變癌化甚至死亡 (Shigenaga *et al.*, 1989; Rikans and Hornbrook, 1997; Moskovitz *et al.*, 2002)。當體內自由基或活性氧增加或抗氧化防禦能力降低時，易使細胞組織甚至於器官造成傷害，包括誘發紅血球、腎臟、肺臟、皮膚及心血管等疾病，而且可能進一步引發癌症及體內其他系統疾病等 (Gutteridge, 1993; McCord, 2000; Moskovitz *et al.*, 2002)。

### 四、抗氧化機制與抗氧化物質

儘管動物體內具有抗氧化防禦系統可以產生抗氧化物來降低體內自由基對組織器官的傷害，但卻無法防禦所有的氧化損傷。因此，可藉由保健食品來額外補充體內的抗氧化物質以減輕體內的氧化壓力。為延緩或阻止食品氧化酸敗，添加抗氧化劑至食品中是直接且快速的方法 (Namiki, 1990)。其實膳食中的抗氧化物質亦可以消除人體代謝過程中所產生的氧自由基，降低細胞的氧化傷害。抗氧化劑定義為在低濃度下，具有抑制或延緩基質氧化的物質，而氧化基質包括食品及生物體組織中的脂質、醣類及 DNA 等分子 (Halliwell, 1993)。

## (一) 抗氧化劑的作用機制

不同抗氧化劑展現的抗氧化特性皆有不同，大致可分為下列四種：

### 1. 自由基清除劑

又稱為一級抗氧化劑，主要是干擾起始期自由基的形成或延滯連鎖反應中的增殖步驟 (progradation)。此類抗氧化劑大多為酚類化合物，因酚類化合物易釋出氫氧基上的質子，直接提供一個電子或一個質子與自由基作用，而自身的苯環結構上的不成對電子會轉移而穩定的共振結構 (resonating structure)。食品中的自由基清除劑以維生素 E 及人工合成抗氧化劑如 butylated hydroxyanisole (BHA)、butylated hydroxytoluene (BHT) 等為最常見。

### 2. 還原劑或氧清除劑

此類抗氧化劑之作用在於捕捉氧分子或還原已氧化之過氧化物。以抗壞血酸 (ascorbic acid) 為代表，它可以還原失去質子之酚型自由基，本身則氧化形成去氫抗壞血酸 (dehydroascorbic acid) 而達到增強抗氧化之目的。

### 3. 金屬螯合劑 (chelating agent)

食品中大多含有過渡金屬離子，微量 (<0.1 ppm) 的過渡金屬離子

存在即具有促進脂質氧化速率的能力，其中又以鐵及銅離子促進脂質氧化作用最強 (Dziezak, 1986)。可能機制包括生理系理及一般促進氫過氧化物斷裂而促使油脂加速進行自氧化反應如下列反應式。



金屬螯合劑本身不具抗氧化性，但在食品系統中能與促氧化之金屬離子產生螯合作用，達到減緩脂質氧化的目的，如檸檬酸 (citric acid)、乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA)、磷酸 (phosphoric acid) 等 (張等, 1995)。

#### 4. 單旋態氧的消除劑

此類抗氧化劑藉由自由基提供以破壞單旋態氧 ( $^1\text{O}_2$ )，達到抑制光氧化的進行。 $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene)、三乙基胺 (triethylamine) 等，可吸收光增感劑所釋放的過多能量，使單旋態氧恢復成穩定之三旋態氧型態，降低與不飽和脂肪酸反應的機率 (Bando *et al.*, 2004)。

#### (二) 人工合成抗氧化劑

目前美國 FDA 核准使用的人工合成抗氧化劑有 BHA、BHT、沒食子酸丙酯 (propyl gallate, PG) 和第三丁基氫醌 (tertiary-butyl

hydroquinone, TBHQ) 等。已應用在食品的保存與抗氧化上，它們皆屬於自由基終止劑之抗氧化劑。然而有文獻指出長期使用 BHA 或 BHT 可能會造成突變或致突變性 (Branen, 1975)。同時會抑制培養的肝細胞間分子的交換作用 (Williams *et al.*, 1990)，危害人體之細胞或器官 (Fujisawa *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005)。因此目前已有許多研究傾向於開發天然的抗氧化物質。

### (三) 天然抗氧化劑

有鑑於合成抗氧化劑可能對人體健康產生負面的影響，因此消費者傾向於使用天然性的抗氧化劑，因此天然性抗氧化物質的研究逐漸受到重視，來自植物性的種子、藻類、草本植物、蔬菜、水果、茶、香辛料及蛋白質水解物等來源，具有抗氧化成分物質，包括多酚類 (polyphenols)、類黃酮 (flavonoids)、兒茶素 (catechin)、肌肽 (carnosine)、甲肌肽 (anserine)  $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -carotene)、 $\alpha$ -生育醇 ( $\alpha$ -tocopherol) 等，其抗氧化機制已有許多相關研究證實之 (Cook and Samman, 1996; Cantrell *et al.*, 2003; Larson, 1988; Papas, 1999)。目前亦有許多研究顯示，動物性蛋白質水解後能產生具有抗氧化能力的胜肽，如藍圓鯊 (Thiansilakul *et al.* 2007)、乳清蛋白 (Peng *et al.* 2009)、豬血紅蛋白 (Chang *et al.* 2007)、鷹嘴豆蛋白質 (Li *et al.*, 2008)、牡蠣

蛋白質 (Qian *et al.*, 2008b)、酪蛋白 (Kim *et al.*, 2007)、豬膠原蛋白 (Baumy and Brule, 1988)、鱈魚 (Aspmo *et al.*, 2005)、雞蛋白 (Suetsuna *et al.*, 2000) 與雞蛋黃蛋白質 (Sakanaka and Tachibana, 2006; Park *et al.*, 2001) 等。Sakanaka *et al.* (2004) 指出雞蛋黃蛋白質水解物、蛋黃蛋白質與胺基酸混合液各別添加入含有亞麻油酸的肉餅中，結果顯示蛋黃蛋白質水解物的抗氧化性最強。影響胜肽抗氧化活性之因子包括濃度、pH 值、胜肽大小、胺基酸組成與排列等影響整個胜肽的抗氧化能力。

## 五、影響胜肽抗氧化活性之因子

### (一) 濃度

一般來說，蛋白質水解物之濃度愈高，抗氧化性愈佳 (Bougatef *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008; Cumby *et al.*, 2008; Giménez *et al.*, 2009)。Sakanaka and Tachibana (2006) 以 Alcalase 水解雞蛋黃蛋白質，不同濃度水解物添加於牛絞肉與鮭魚絞肉中探討脂質氧化情形，結果顯示隨著水解物添加濃度愈高 (0.0625-2%) 抑制肉中 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) 形成的能力也隨之提升。

### (二) pH 值

Kim *et al.* (2007) 利用酪蛋白磷胜肽 (caseinphosphopeptides) 在不同的 pH3-8 範圍下的還原力與金屬螯合能力，結果顯示在 pH 值由 3 至 6 時，還原力是逐漸遞減的現象，pH 值大於 6 時，並無顯著差異。表示酪蛋白磷胜肽在酸性環境下有較佳的還原力。然而金屬螯合能力是隨著 pH 增加而漸增，表示酪蛋白磷胜肽在鹼性環境下有較強的金屬螯合能力。大豆蛋白質水解物在磷酸緩衝溶液之 pH 值 8.0，對於亞麻油酸自氧化反應具有延緩的效果，而水解液本身的 pH 值介於 6.7-6.9 時具有更佳的延緩效果，顯示 pH 對於抗氧化活性是有影響的 (Chen *et al.*, 1996)。

### (三) 胜肽大小

Wang *et al.* (2007) 利用木瓜酵素水解小麥穀蛋白，其水解物以超濾膜過濾，發現以 5 KDa 分子量限值 (molecular weight cut-off; MWCO) 濾膜處理所得濾液具有較佳抗氧化力；亦有文獻以雞蛋黃蛋白質之水解物經 5KDa MWCO 濾膜過濾所得濾液有較強的抑制亞麻油酸自氧化作用的能力 (Park *et al.*, 2000); Kong *et al.* (2008) 利用 pepsin 水解小麥穀蛋白所產生的水解物，再經過不同 MWCO 濾膜區分，以 <3 KDa MWCO 之區分物具有較強的 DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基與氫氧自由基清除能力。Li *et al.* (2008) 發現鷹嘴豆 (chickpea) 蛋

白質水解物，以 200-3,000 Da 範圍的小分子具有較強的清除氫氧自由基能力與還原力。Dong *et al.* (2008) 水解竹葉鱧魚蛋白質，具有最高亞麻油酸自氧化抑制作用與氫氧自由基清除能力之水解物分子量分佈主要為小於 1,000 Da。綜合上述之結果顯示，小胜肽具有較強的抗氧化能力。

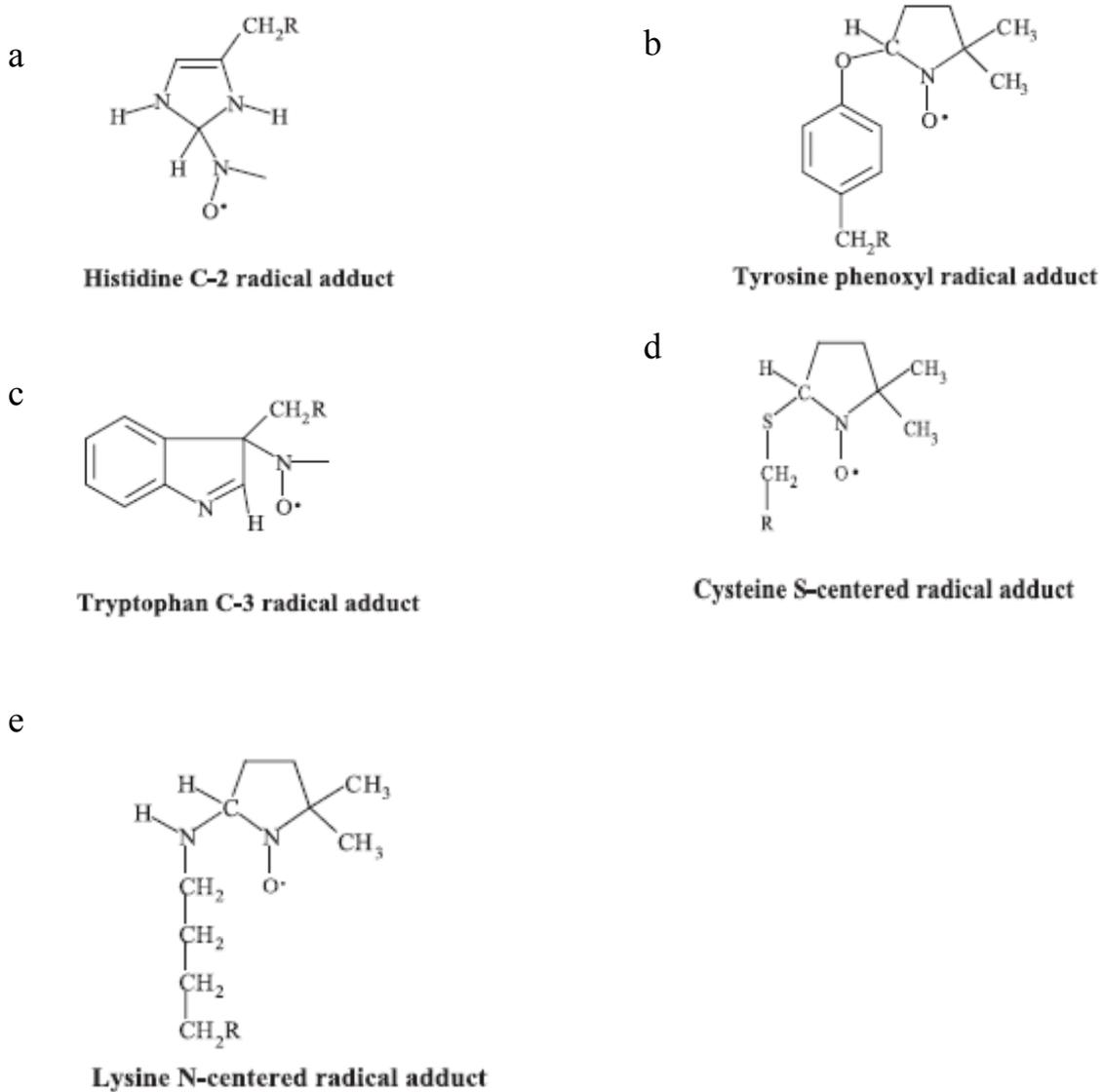
然而在螯合金屬離子方面，Chang *et al.* (2007) 指出豬紅血球蛋白質水解物，以 Sephadex G50 膠體過濾層析法分離出的大分子比小分子有較高的金屬螯合能力。Tong *et al.* (2000) 證實高分子量 > 3,500 Da 的乳清蛋白區分物的抗氧化機制為螯合亞鐵離子與清除自由基。大分子可能比小分子可更完整包覆金屬離子，避免金屬離子暴露於環境中催化自由基的形成。蛋白質、胜肽及胺基酸皆具有抗氧化性，然而胜肽的抗氧化力比胺基酸與蛋白質高，主要是因為原本摺疊之蛋白質分子展開及疏水性基的暴露，增加胺基酸與自由基反應 (Elias *et al.*, 2008)。

#### (四) 胺基酸組成與排列

已有文獻指出含有 His 的抗氧化性胜肽，其 imidazole ring 能夠螯合與捕捉脂質自由基 (Murase *et al.*, 1993)。Gunther *et al.* (2002) 利用超氧歧化酶 (superoxide dismutase; SOD) 與過氧化氫反應，在 MNP

(2-methyl-2-nitrosopropane) 自由基捕捉劑的存在下，以電子自旋共振 (electron paramagnetic resonance ;ESR) 測定結果發現，由 SOD 衍生的蛋白質自由基是在其內的 His 殘基上形成不成對的電子，再經由  $^{13}\text{C}$  標定 His，其 imidazole ring 上的 C-2 與自由基結合，推測是捕捉自由基的位置 (如圖五 a)。

疏水性胺基酸如含有苯環的胺基酸 Tyr、Phe 及 Trp，可將由自由基轉移至苯環上的共振結構上讓自身穩定。Bougatef *et al.* (2009) 指出南極星鯊 (smooth hound) 蛋白質水解物中，純化清除 DPPH 自由基能力最佳的區分物也富含 Tyr (23.27%)。Menezes *et al.* (2001) 以  $\text{ONOO}^-$  與 macrophage-like J774 作用產生 Tyr-衍生自由基，以 ESR 測定在未知的細胞蛋白質觀察到酚氧化自由基產物 (phenoxyl radical adducts) 的形成。表示 Tyr 上的 OH 是與自由基反應的位置 (圖五 b)，同樣的原理變性肌紅蛋白 (metmyoglobin) / $\text{H}_2\text{O}_2$  系統下形成 Trp-衍生自由基 (Trp-derived radicals) 產物，間接地證實自由基作用的位置為 Trp 上的 C-3 (圖五 c)，而含硫胺基酸如甲硫胺酸 (Met) 與 Cys，在硫的位置上與自由基形成 thiyl radicals 產物 (圖五 d) (Kelman *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1999)。因此含硫胺基酸可藉由提供硫上的電子或質子，與自由基結合而安定之。圖六為 Met 清除氧過氧化物的機制，此作用從 Met 中的硫

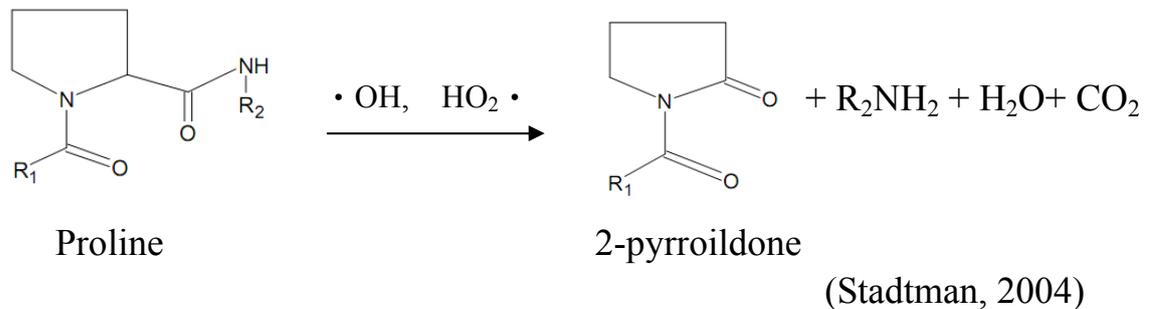


圖五、電子捕捉劑所捕捉到的蛋白質之側鏈自由基之結構。

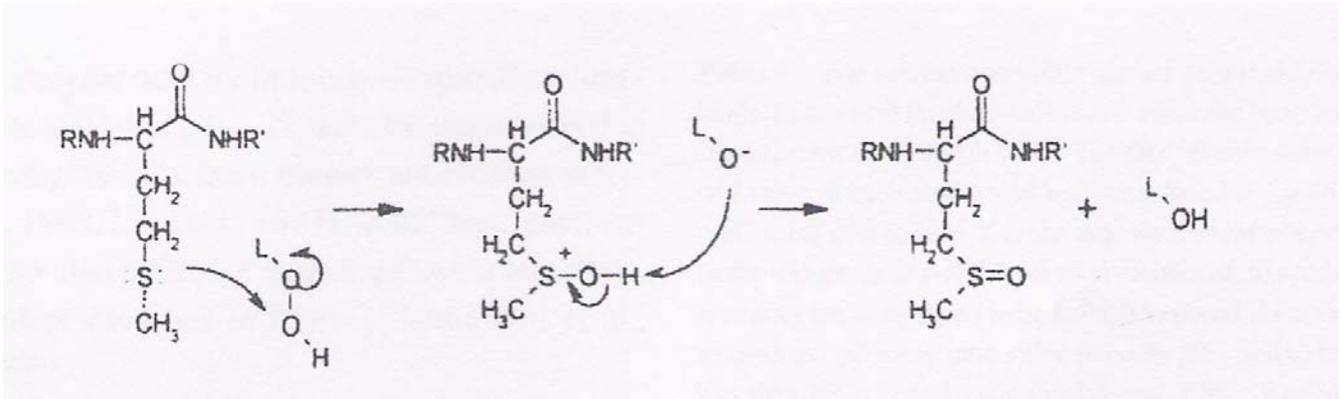
Fig. 5. Structures of protein side chain radicals trapped by spin traps.

Davies and Hawkins (2004)

轉移兩個電子至脂質氫過氧化物，Met 自身氧化成氧硫化甲硫胺酸 (methionine sulfoxide; MetO); 亦即 Met 將脂質氫過氧化物還原為安定的物質 (Garner *et al.*, 1998; Panzenbock and Stocker, 2005)。有些胺基酸則藉由被自由基氧化，形成較安定物質，以達到清除自由基之目的。有學者根據大豆蛋白質水解之抗氧化性胜肽片段，設計出具有抗氧化性的合成胜肽，其片段為 His-Pro-Pro，當 Pro 被其它的胺基酸取代時，其片段的抗氧化力減弱 (Chen *et al.*, 1996)。Pro 抗氧化之原理已有學者提出胜肽中的 Pro 受到氫氧自由基及過氧化氫自由基的攻擊時，會氧化成 2-pyrroildone 較安定的產物，達到清除氫氧自由基的目的 (Stadtman, 2004)，反應式為：



Kim *et al.* (2001) 由阿拉斯加鱈魚 (Alaska pollack) 皮中萃取明膠，再將其水解並純化得到二個抗氧化能力較佳的胜肽，共同序列為 Gly-Pro-Hyp，推測可能因序列中所含之 Pro 使其有較佳的抗氧化能力。Hawkins *et al.* (1998) 以 HOCl 分別與人類的血清白蛋白、牛血清



圖六、甲硫胺酸側鏈還原脂質氫過氧化物的機制。

Fig. 6. Proposed two-electron reduction of lipid hydroperoxide (LOOH) by thioether-containing side chain of methionine. (Garner *et al.*, 1998, Panzenbock and Stocker, 2005)

蛋白、肌紅蛋白、核苷酸酶 A、histone 等蛋白質反應產生氯化胺，氮結合的位置在 Lys 中側鏈上的胺基，得知蛋白質中 Lys 殘基上的氮容易與自由基反應 (圖五 e)。其它胺基酸如 Leu、Val，可能增加胜肽與脂肪酸之交互作用有關。Park *et al.* (2001) 從雞蛋黃蛋白質純化分離出具有抑制亞麻油酸自氧化作用最強的兩個胜肽片段分別為 Leu-Met-Ser-Tyr-Met-Trp-Ser-Thr-Ser-Met 與 Leu-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Arg-Ser-Ser-His-Trp-Phe-Ser-Arg-Arg，發現兩片段之 N-端位置皆為 Leu。Qian *et al.* (2008 b) 從牡蠣蛋白質純化出具有較佳的氫氧自由基清除能力的胜肽，亦發現其胜肽片段含有高量的 Leu。

綜合上述之影響因子，酵素水解蛋白質所產生的水解物中的胜肽組成與量皆會受到所使用的酵素類型、水解條件 (時間、溫度、pH 值) 與水解率之影響。

## 六、蛋白質之水解作用

蛋白質的水解可運用化學或酵素的方法進行，經由不同的水解過程可形成不同的胜肽片段。化學水解方式是以酸或鹼進行水解，此方法簡單、成本低且水解作用完全，但製程不易控制、某些特定的胺基酸會受到破壞，如 L-型胺基酸轉為 D-型胺基酸，因而形成 lysinoalanine，且在酸水解過程中會產生 monochloropropanol (MCP) 與

Dichloropropanol (DCP) 等毒素物質(Lahl and Braun, 1994;Manley and Ahmedi, 1995)。由於化學水解作用不具有專一性，無法產生特定大小或序列的蛋白質片段，一般具有抗氧化活性的蛋白質片段或胜肽大多含有特定的胺基酸組成 (蔡，2009)。

因此，使用酵素水解蛋白質是循天然的方式較安全。胺基酸之間以胜肽鍵 (peptide bond) 彼此共價結合，蛋白酶 (protease) 或蛋白質分解酵素 (proteolytic enzyme) 會將此胜肽鍵切斷，產生許多不同大小分子量的胜肽或胺基酸，同時游離的羧基與胺基形成、胜肽中胺基酸的側鏈離子性官能基 (ion group) 的數目增加、疏水性官能基 (hydrophobic group) 曝露、分子量降低及結構產生變化等 (Sörensen, 1908;Mahmoud, 1994)。

#### (一) 酵素水解蛋白質的影響因子

蛋白質水解作用的量化一般是以在反應期間切斷胜肽的數目表示，即水解率 (degree of hydrolysis; DH) 反應酵素 (蛋白酶) 催化作用；水解率愈高則表示酵素切斷胜肽鍵數愈多，產生許多低分子量的胜肽或胺基酸。當酵素水解蛋白質時，酵素的種類、基質本身之特性酵素濃度以及水解過程中 pH 值、溫度、時間等都會影響水解率及水解產物的功能性 (Adler-Nissen, 1986)。

## 1. 酵素種類

由於酵素的專一性，酵素對於基質作用的位置具有選擇性，不同酵素之來源、種類以及作用位置，所製備出來的產物會有差異，酵素的種類是決定水解產物特性及水解率的重要因子。酵素依其來源、催化作用與催化位置化學性質的特性分類。

### I. 依酵素催化位置的化學特性可分為四種

#### (1) 絲胺酸蛋白酶 (serine proteases)

在鹼性 pH 值下有最大活性，其催化位置之官能基為 serine，如 Trypsin、Chymotrypsin 與 Alcalase (Ward, 1983)。

#### (2) 半胱胺酸蛋白酶 (cysteine proteases)

此類酵素以-SH 為中心，在中性 pH 值下有最大活性，對氧敏感。主要存在於植物，也可由微生物產生，如 Papain 與 Bromelain (Ward, 1983)。

#### (3) 天門冬胺酸蛋白酶 (aspartic proteases)

此類酵素活性最適 pH 值範圍為 1-5 之間，如 Pepsin 與 Rennin (Fruton, 1976 a)。

#### (4) 金屬蛋白酶 (metalloproteases)

包含一個必要的金屬離子，一般為鋅，其最適活性為中性 pH

值，如 Thermolysin (Aunstrup,1980)。

II. 依酵素催化作用分為內切酶 (endopeptidase) 與外切酶 (exo-peptidase)。

(1) 內切酶

大部分的蛋白酶皆屬於內切酶，其作用方式是從蛋白質內部的肽鍵開始進行水解，通常可得到較大分子量的肽產物。如 Alcalase、Neutrane、papain。

(2) 外切酶

此類酵素又可分為兩種，一種作用於 N 端  $\alpha$ -胺基 ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub>) 的胺基酶 (amino-peptidase)，另一種則是作用於 C 端  $\alpha$ -羧基 ( $\alpha$ -COOH) 的羧基酶 (carboxypeptidase)。

除了以單一酵素之水解外，亦有文獻以兩種以上之酵素混合或先以內切酶再添加外切酶分階段繼續進行水解，以提高水解物的水解率及產率。Cumby *et al.* (2008) 使用 Alcalase 與 Flavourzyme 兩種混合酵素將芥菜籽蛋白質進行水解，製備抗氧化物，其好處是節省操作時間及成本。Cheng *et al.* (2007) 使用 Alcalase 及 Flavourzyme 對豬的血紅蛋白進行兩段式水解，以製備具抗氧化活性的肽，第一階段蛋白質經酵素水解後，經加熱失活終止第一階

段反應，接著調整第二階段的酵素水解條件添加酵素進行水解，再以加熱失活終止反應，此方式可避免酵素間發生相互抑制的情形。本實驗將使用 Alcalase 與 Flavourzyme 兩種混合酵素對鵝蛋黃蛋白質進行水解。此兩種酵素之特性分述如下：

(a) Alcalase

枯草桿菌素，又名 Subtilisin Carlsberg、Maxatase 與 Optimase，屬於絲胺酸型蛋白酶，內切酶，由 *Bacillus licheniformis* 分離而來，在 pH6-10 範圍有較高的活性，pH 8 時有最大活性。適當的溫度 50-60°C，酵素專一性低，主要是水解 C 端的疏水性胺基酸 (Adler-Nissen, 1986)。此酵素具有 274 個胺基酸殘基。

此酵素已被商業化，其價格不高，許多研究常使用 Alcalase 水解蛋白質製備抗氧化活性胜肽。如 Park *et al.*(2000) 使用 Alcalase、Neutrase、Pronase E、Pepsin、Trypsin 與  $\alpha$ -Chymotrypsin 分別對雞蛋黃蛋白質進行水解，其水解物以 Alcalase 之水解物在抑制亞麻油酸自由氧化作用具有良好的能力。此外以 Alcalase 進行水解的蛋白質包括阿拉斯加雪魚 (Kim *et al.*, 2001)、芥菜籽蛋白質 (Cumby *et al.*, 2008)、豬膠原蛋白 (Li *et al.*, 2007)、藍圓鯪 (Thiansilakul, 2007)、酪蛋白 (Kim *et al.*, 2007)、豬血紅蛋白 (Chang *et al.*, 2007) 等。

## (b) Flavourzyme

由 *Aspergillus oryzae* 分離而來的複合蛋白酶，屬於天門冬胺酸、金屬蛋白酶、絲胺酸蛋白酶與羧胺酶之混合型蛋白酶，具有內切與外切酶之活性，最佳水解條件為 pH5.5-7，50°C。已有文獻利用 Flavourzyme 或 Alcalase 分別水解竹葉鱧魚發現 Flavourzyme 水解物比 Alcalase 具有較佳的氫氧自由基清除能力(Dong *et al.*, 2008)、鷹嘴豆(chickpea) (Li *et al.*, 2008)、藍圓鱈 (Thiansilakul, 2007) 等。含有內、外切酶的 Flavourzyme 比只含有內切酶的 Alcalase 更能較完全地將蛋白質分子中的肽鍵水解 (Chang *et al.*, 2007)，因此其水解率會比 Alcalase 高。

Alcalase 專一性低，但其主要作用為切疏水性胺基酸的C-端，其水解產物疏水性胺基酸會暴露出來，因而增加水解物之苦味。然而若有外切酶的作用會將此苦味肽去除，便能降低水解物之苦味及改善產品的風味。因此本實驗擬將Alcalase與Flavourzyme混合後進行蛋白質水解，可藉由Flavourzyme外切酶之作用，可改善Alcalase所產生的苦味。Kawabata *et al.* (1996) 也曾使用從烏賊肝臟純化出來的外切酶絲胺酸羧胺酶，以去除大豆蛋白與玉米麩質經胃蛋白酶與胰蛋白酶水解生成的苦味肽。

## 2. 基質之特性與濃度

蛋白質的構形會影響酵素的水解，一般認為球形蛋白質二級結構會遮蔽部分的胜肽鍵，因此將球形蛋白質變性 (denaturation) 後其水解速率較原來的球形蛋白質快，這是因為變性後的球形蛋白質結構改變，使原來被遮蔽之胜肽鍵暴露，讓蛋白酶較容易與之作用，進而增進蛋白酶水解反應 (Linderstrøm-Lang, 1939; Linderstrøm-Lang, 1952)。

然而，纖維狀蛋白質如膠原蛋白 (collagen)、肌凝蛋白(myosin) 的變性對於蛋白酶的水解作用並無差異 (Haurowitz *et al.*, 1945; Traub and Piez, 1971; Anfinsen and Scheraga, 1975)，因纖維狀蛋白質對於蛋白酶的攻擊並無立體結構之障礙。不同來源的蛋白質對於酵素作用亦有所差異，Giménez *et al.* (2009) 利用 Alcalase 分別水解比目魚與烏賊的皮膚，其水解率是以烏賊之水解物高於比目魚，推測兩種蛋白質的大小與結構不同所造成。

此外，Alder-Nissen (1986) 以 Alcalase 水解非可溶性玉蜀黍蛋白質與血紅球蛋白，發現起始反應速率相當低，由於這兩種蛋白質之胺基酸組成具有較高的疏水性胺基酸，其溶解度較其它蛋白質差，因此蛋白質水解的起始反應速率會受到蛋白質溶解度之影響。他也以 Alcalase 水解不同濃度的大豆蛋白，探討基質濃度與水解率的影響，

結果發現 Alcalase 在大於 2 % 大豆蛋白之水解率無顯著的變化。Tucker and Woods (1995) 指出當所有的酵素分子之活性部位被基質占據即達飽和，水解反應速率會受到限制；當基質濃度達飽和時，即使加入更多的基質，反應速率並不會隨之增加。生產成本的考量，篩選最適酵素的基質濃度是必要的。

### 3. 酵素濃度

Adler-Nissen (1986) 指出水解率的增加與酵素濃度呈正相關，若酵素與基質濃度達到飽和狀態，便可強迫每個可用之酵素分子與受質作用，使兩者之間碰撞機率達到最大；若酵素濃度太低，降低基質與酵素間的碰撞，則會降低水解率；但酵素濃度太高，也未必可提高水解速率，反而增加生產成本。Li *et al.* (2010) 分析不同濃度 Alcalase 對於酪蛋白水解率之影響，探討不同酵素濃度與水解時間對酪蛋白水解率的影響，其結果指出在相同水解時間下，隨著酵素濃度愈高其水解率也隨之增高，但酵素添加濃度若超過水解所需而反應達飽和，其水解率並不會顯著提升。

### 4. pH 值與溫度

酵素的活性會受到 pH 值與溫度的影響。進行蛋白質水解一般都會

選擇蛋白酶最適反應pH，一般蛋白酶最適作用之pH約為7.0 (Lahl and Braun, 1994)，商業用的酵素同時具有多種酵素的活性，最適反應pH均不相同。溫度方面，最適溫度大多在30-50°C，超過50°C後，大部分內生性酵素開始失活，只有少數可在高溫下作用。已有文獻指出Alcalase水解紅血球蛋白，探討不同pH值與溫度對於水解率之影響，結果顯示pH6.8-8.5時水解率逐漸上升，至pH8.5水解率為最高，當pH值超過8.5時，水解率反而下降。在35-50°C時水解率明顯地上升，而超過50°C其水解率也會開始下降 (Bhaskar *et al.*, 2008)。因此進行蛋白質酵素水解時將溫度及pH值的條件控制在酵素的最適範圍內，以避免影響酵素活性。

## 5. 水解時間

根據酵素動力學，以酵素之水解率與水解時間之關係所作出來的水解曲線 (hydrolysis curve) 是呈拋物線，水解初期水解率隨著水解時間增加而快速上升，此時期為快速水解期 (initial rapid phase)，大量的胜肽物質於此時期產生，而之後水解率上升的速度較前一時期緩慢，酵素活性降低、基質耗竭或產物的抑制作用等會減緩反應速率 (Guérard *et al.*, 2001)，水解率隨著時間增加而逐漸地趨於平緩，此階段為平穩期 (stationary) (Shahidi *et al.*, 1995)。因此不同的水解時間下產生

的胜肽會有所差異。

## 6. 其它

食鹽的濃度高低對於酵素之活性會影響，Nakadai *et al.* (1972) 在 4 % 食鹽濃度下可促進 *Aspergillus oryzae* 及 *Aspergillus sojae* 之中性蛋白酶活性；當濃度高於 5 % 以上可抑制內源性蛋白酶活性，以胃蛋白酶最為明顯 (Gildberd *et al.*, 1984)。

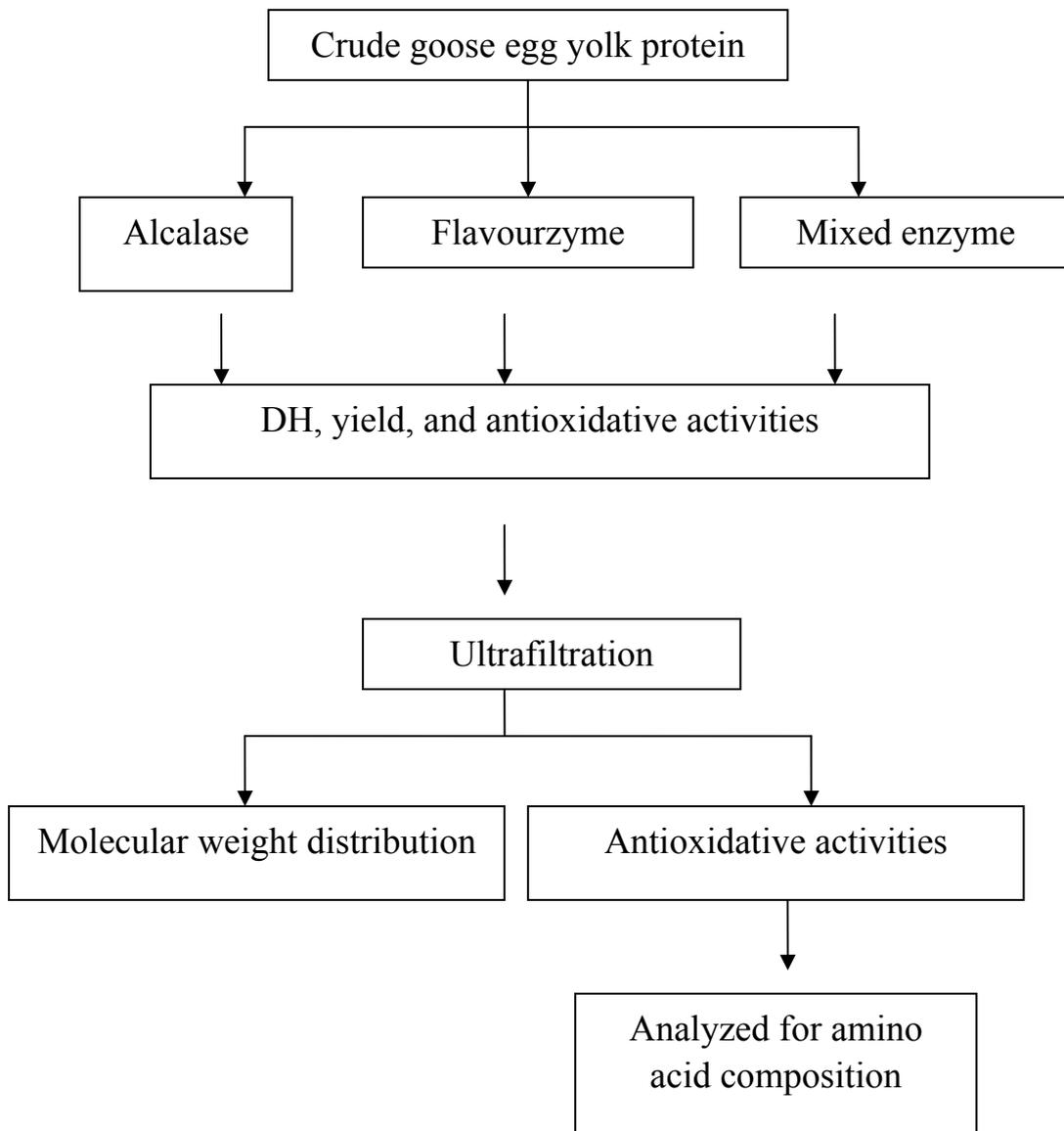
## 參、材料與方法

### 一、試驗材料

本試驗使用白羅曼鵝 (*Coscoroba coscoroba*) 之未受精鵝蛋 (10 天-17 天) 購自於芳源畜牧場 (雲林, 台灣)。將新鮮的鵝蛋洗淨後, 去除蛋殼, 將蛋黃、蛋白分開, 蛋黃根據 Sakanaka *et al.* (2004) 所述之方法稍加修改進行脫脂,

### 二、實驗設計

圖七表示本研究之實驗設計, 鵝蛋黃脫脂作用萃取所得粗鵝蛋黃蛋白質(Goose egg yolk protein; GEYP), 作為蛋白酶水作用的基質, 酵素分別為 Alcalase、Flavourzyme 與 Alcalase+Flavourzyme (1:1) 之混合酵素進行水解作用, 如圖七之試驗設計之流程簡圖所示, 首先 Alcalase 在起始 pH8.5 與 Flavourzyme 在起始 pH7.0, 反應溫度皆為 50 °C 之條件下篩選出較適合酵素的蛋白質基質濃度與酵素濃度, 再以此條件分別進行水解作用, 其在不同的水解時間下所產生的水解物分別進行水解率、產率以及抗氧化力之分析, 其抗氧化力分析包括 DPPH 自由基清除能力、亞鐵離子螯合能力、還原力以及氫氧自由基清除能力等。以上述之分析結果選出最具抗氧化力的水解物進行連續式超過濾反應, 依序地使用 30、10、1、0.15 kDa 之膜限值濾膜進行過濾,



圖七、試驗設計。

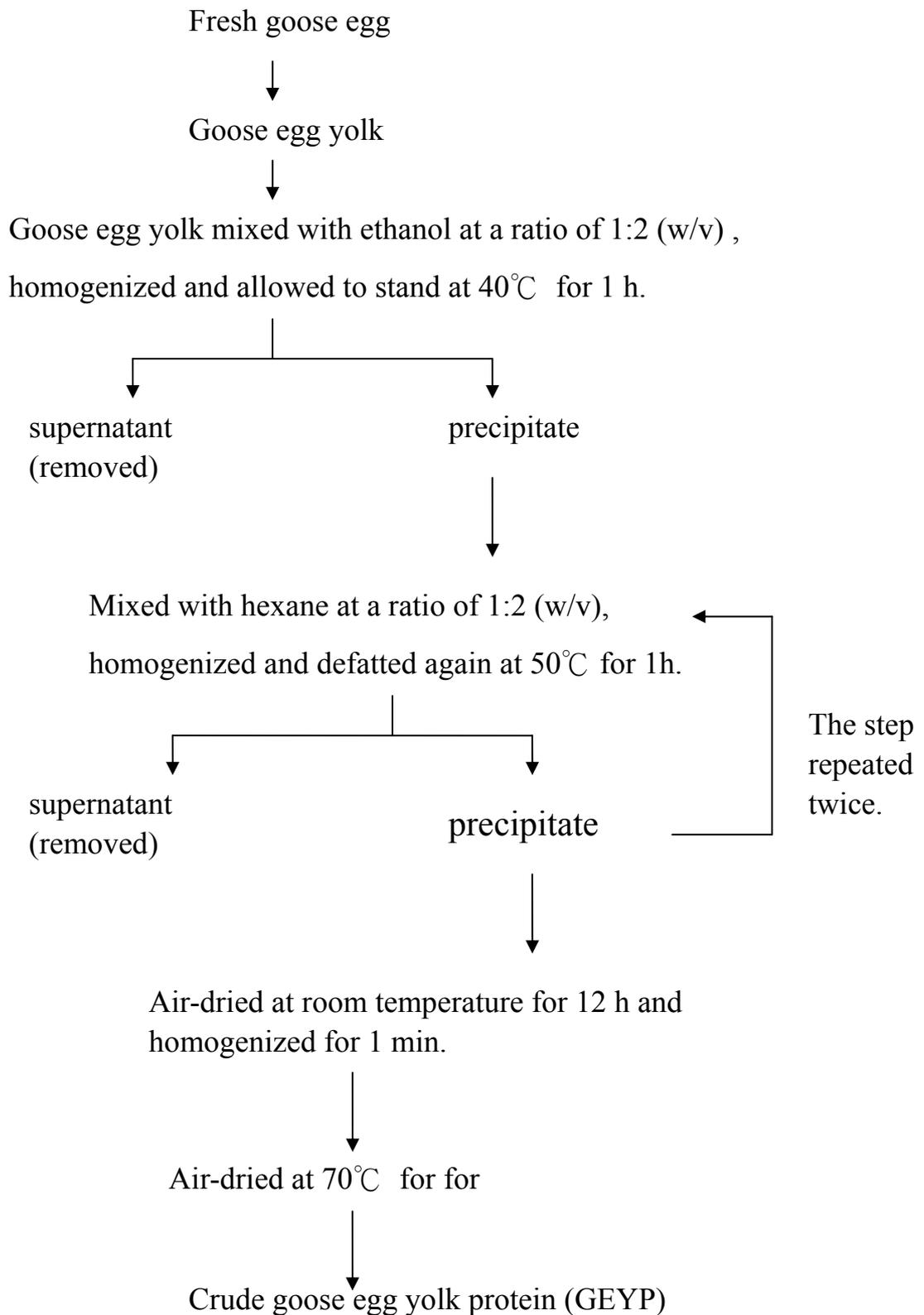
Fig.7. Experimental design.

得到五個區分物，分別為 30、10、1、0.15 kDa 濃縮液與 0.15 kDa 濾液，將這些區分物再分別進行上述四種抗氧化力之測試以及分子量分佈之分析。最後選擇最具抗氧化力之區分物進行胺基酸組成之分析。

### 三、鵝蛋黃蛋白質水解物之製備

#### (一) 粗鵝蛋黃蛋白質製備

鵝蛋黃經脫脂步驟 (如圖八所示)，蛋黃:乙醇 (光泰化工企業行，台中，台灣) 以 1:2 (w/v) 比例混合置於燒杯中，利用攪拌器攪拌均勻並於 40°C 隔水加熱 1 小時，之後靜置 30 分鐘，使乙醇與蛋白質分層，倒出上層液。沉澱物則以蛋黃:正己烷 (光泰化工企業行，台中，台灣) 以 1:2 (w/v) 比例混合，於常溫下攪拌均勻反應 1 小時後，靜置 10 分鐘，倒出上層液，取沉澱物的部分，再以蛋黃:正己烷 (光泰化工企業行，台中，台灣) 以 1:2 (w/v) 上述步驟再重複二次。最後以 Mesh no.170 篩網過濾後，將固形物鋪於平盤上，置於抽風櫃中風乾 12 小時。將風乾的樣品以刀口瓶絞成粉末狀，於乾燥烘箱內 (RHD-903, Risen, Yingge, Taiwan) 以 70°C 以熱風乾燥 1 h，冷卻後，以真空包裝袋包裝 (Nylon 15  $\mu$ m/cast polypropylene 70  $\mu$ m，三櫻企業股份有限公司，19 cm  $\times$  25 cm，台中，台灣) 中以真空包裝機 (Gastrovac; Multivac, A300/42, Wolferschwenden, Germany) 真空包裝並保存於 -20°C 冰箱中，以備取



圖八、粗鵝蛋黃蛋白質之製備流程。

Fig. 8. The flowsheet for preparation of crude goose egg yolk protein.

用，並分析鵝蛋黃及粗鵝蛋黃蛋白質之基本組成。

## (二) 實驗酵素

本試驗使用酵素為來自 *Bacillus licheniformis* 的 Alcalase 2.4 L<sup>®</sup> (Novo Nordisk, Bagsvaerde, Denmark)，以及來自於 *Aspergillus oryzae* 的 Flavourzyme 500 L<sup>®</sup> (Novo Nordisk, Bagsvaerde, Denmark)。

## (三) GEYP 酵素水解之條件篩選

### 1. 篩選最適酵素的基質濃度

參考 Park *et al.* (2000) 方法。配製 5、8 與 10 % (w/w) GEYP 之水溶液於水解反應瓶中，以 1 N 氫氧化鈉溶液 (聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 或 1 N 鹽酸溶液 (聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 調整水解反應之 pH 值至 8.5 (Alcalase) 或 7.0 (Flavourzyme) 並維持在 50°C，在加入酵素前進行 0 h 之取樣，加入 7.5% 酵素 (w/w of protein) 進行水解 8 h，取出水解液在沸水中加熱 20 分鐘使酵素失活，終止反應，再以水浴冷卻後，測量水解液之水解率。

### 2. 篩選最適酵素濃度

採用基質濃度篩選之較適濃度，以 1 N 氫氧化鈉或 1N 鹽酸溶液調整 pH 值至 8.5 (Alcalase) 或 7.0 (Flavourzyme)，並將溫度維持在 50°C，在加入酵素前進行 0 h 之取樣，加入 1.25、5、7.5 及 10 % (w/w

of protein) 酵素進行水解反應，分別於 0.5、1、2、4、6、8、10、11 與 12 h 取樣並在沸水中加熱 20 分鐘使酵素失活，終止酵素反應，水浴冷卻後，測量水解液的水解率。

#### (四) GEYP 水解物之製備

根據上述篩選出較適合酵素的基質濃度與與酵素濃度之條件，使用的酵素分別為 Alcalase、Flavourzyme 與 Alcalase 和 Flavourzyme 以 1:1 比例混合 (Mix)，分別以 1 N 氫氧化鈉或 1N 鹽酸溶液調整起始反應 pH 值至 8.5 (Alcalase)、8.5 (Mix) 與 7.0 (Flavourzyme)，且溫度控制在 50°C，加入酵素前先取 0 h 樣品，接著分別加入 7.5 % 酵素進行水解，於 0.5、4、8 與 12 h 進行取樣。取樣置於沸水中加熱 20 分鐘，使酵素失活，終止酵素反應，待水浴冷卻後，以高速離心機 (Hitachi, SCR 20B, Tokyo, Japan) 於 4°C 下 2000g 離心 10 分鐘，取上層液以濾紙過濾 (Whatman No.1, Whatman international Co., Ltd., Maidstone, England) 過濾，所得水解液進行各項分析。

#### (五) 基本成分分析

##### 1. 水分含量測定

根據 AOAC (1995) 方法分析。將鋁盤置於 100°C 熱風循環乾燥箱

(Risen, RHD-903, Taipei, Taiwan) 乾燥達恆重，取 2 g GEYP 或 5 g 新鮮鵝蛋黃，均勻放置於鋁盤中，置於 100°C 減壓乾燥箱 (PID, Risen, Yinge, Taiwan)，以 -76 mmHg 壓力下乾燥 5 h，鋁盤取出放置於玻璃乾燥器中冷卻 30 分鐘後稱重。再將鋁盤置於 100°C 減壓乾燥機，以 -76 mmHg 壓力下乾燥 1 h，鋁盤取出於乾燥器中冷卻 30 分鐘後稱重，重複此步驟使樣品達恆重為止。

計算公式：

$$\text{水分 (\%)} = \frac{[(W1+W2)-W3]}{W1} \times 100\% \quad (1)$$

W1: 樣品重量 (g)

W2: 鋁盤恆重 (g)

W3: 鋁盤及樣品乾燥至恆重之重量 (g)

## 2. 粗灰分含量之測定

根據 AOAC (1995) 方法分析。將坩鍋置於含有 10 % 稀鹽酸溶液 (聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 中，加熱 2 小時，冷卻後以去離子水沖乾淨，置於 100°C 熱風循環乾燥箱 (Risen, RHD-903, Taipei, Taiwan) 烘乾，將坩鍋置於高溫灰化爐 (ELF 11/14, Carbolite, Castleton, England) 中以 525°C，灰化 8 小時。將坩鍋置於乾燥器中冷卻 30 分鐘後稱重。秤 2 g 樣品於坩鍋中，置於 100°C 中熱風循環乾燥箱下乾燥 8

h, 再置於加熱器 (Corning, PC351, Lowell, MA, USA) 上加熱直到樣品不再冒燒為止, 即可放入高溫灰化爐中以 525°C, 灰化 24 小時, 取坩鍋置於乾燥器中冷卻 30 分鐘, 稱重並紀錄之。

計算公式:

$$\text{灰分 (\%)} = \frac{(W_2 - W_1)}{W} \times 100\% \quad (2)$$

$W$ : 樣品重量 (g)

$W_1$ : 坩鍋重量 (g)

$W_2$ : 樣品及樣品灰化後之總重量 (g)

### 3. 粗脂肪含量之測定

根據 AOAC (1995) 方法分析。稱取 1 g GEYP 或 2 g 蛋黃於 Mojonnier 脂肪萃取管內, 加入 10 ml HCl (聯工化學廠股份有限公司, 新竹, 台灣) 緩慢且充分振盪。將 Mojonnier 脂肪萃取管置於 70°C 水浴鍋內且加熱至沸騰。連續煮沸 30 分鐘且每 5 分鐘搖晃 Mojonnier 脂肪萃取管。將萃取管移出, 加入 H<sub>2</sub>O 填滿球形部位, 冷卻至室溫。加入 50 ml 石油醚均勻混合, 靜置使溶液分層。倒出醚層於乾燥且已稱重過的錐形瓶中, 剩下的溶液再利用 15ml 石油醚 (島久藥品株式會社, 大阪, 日本) 萃取兩次, 分別將醚層收集於上述的錐形瓶中。將錐形瓶在蒸氣水浴的環境下緩慢地將乙醚蒸發掉, 最後再以 100°C 熱風循環乾燥

箱 (Risen, RHD-903, Taipei, Taiwan) 乾燥 (約 90 分鐘)，取錐形瓶於玻璃乾燥器中冷卻 30 分鐘，稱重並紀錄之。

$$\text{脂肪含量 (\%)} = \frac{(W_2 - W_1)}{W} \times 100\% \quad (3)$$

W: 樣品重量 (g)

$W_1$ : 錐形瓶空重 (g)

$W_2$ : 樣品及錐形瓶重 (g)

#### 4. 粗蛋白質含量之測定

依據微量凱氏氮定量法 (Micro-Kjeldahl method) 分析。以稱量紙稱取 1 g 樣品置入玻璃消化管中，空白組放入稱量紙，每支消化管中分別加入 1 顆消化錠 (FOSS, Höganäs, Sweden)、3-5 顆沸石 (boiling stone) (林純藥工株式會社，大阪，日本) 及加入 20ml 的濃硫酸 (聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣)，置於凱氏氮分解裝置 (BÜCHI, Digestion Unit K-435, Switzerland) 上，約 400-450°C 加熱進行消化，使蛋白質態氮分解轉變為硫酸銨 (ammonium sulfate)，消化過程中以廢氣淨化處理裝置 (BÜCHI, Digestion Unit B-414, Switzerland) 接收與中和消化過程中產生的廢氣，直至消化液皆為透明澄清狀，取出冷卻 20 分鐘，每支消化管分別加入 40 ml 蒸餾水，將消化管置於凱氏氮蒸餾機 (BÜCHI, Digestion Unit B-314, Switzerland) 上加入 70 ml 之 40 % 氫氧

化鈉 (聯工化學廠股份有限公司, 新竹, 台灣) 溶液後進行蒸餾, 同時以 60 ml 之 4 % 硼酸 (片山試藥株式會社, 大阪, 日本) 含有 2-3 滴的 BG-MR 指示劑之接收瓶接收蒸餾中氨氣, 收集蒸餾液達 160 ml, 最後以 0.1 N HCl (聯工化學廠股份有限公司, 新竹, 台灣) 利用數位滴定器 (BRAND, Bürette Digital III, Nertheim, Germany) 滴定, 根據酸消耗量測得接收瓶中氨氣之含量, 計算出粗蛋白含量。

計算公式:

$$\text{粗蛋白 (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.0014 \times NF}{W} \times 100\% \quad (4)$$

$V_1$ : 樣品所消耗 HCl 的滴定量 (ml)。

$V_2$ : 空白試驗所消耗 HCl 的滴定量 (ml)。

NF: 氮係數 6.25 (蛋白質之平均氮含量為 16%, 故  $100/16 = 6.25$ )。

W: 樣品重量 (g)。

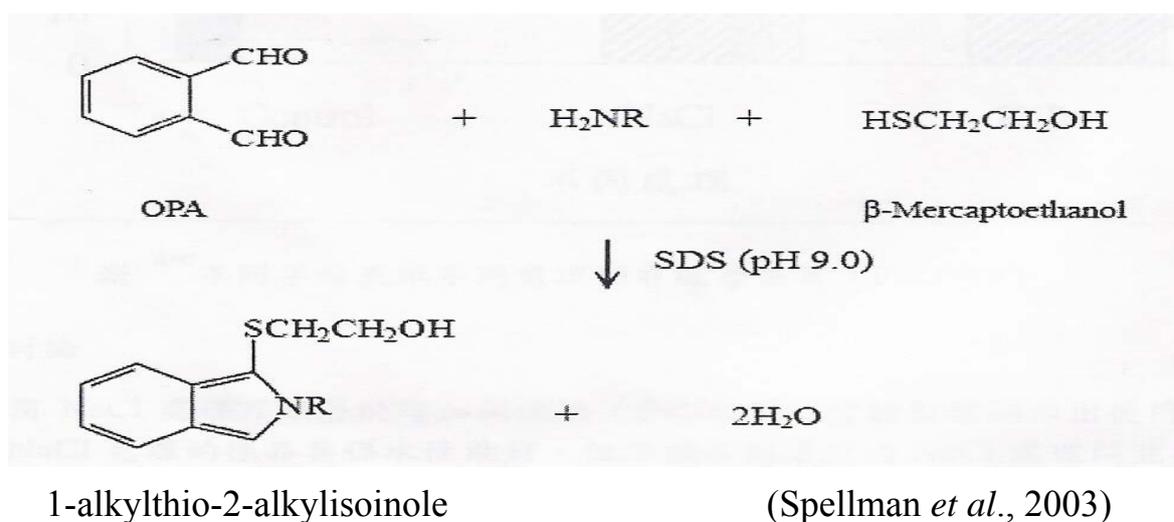
0.0014: 相當於 1 ml 之 0.1 N HCl 的氮量。

#### (六) GEYP 水解物之水解率測定

根據 Church *et al.* (1983) 所述之 *o*-phthaldialdehyde (OPA) 分光光度法測定。由於水解過程中蛋白質之  $\alpha$ -胺基 ( $\alpha$ - amino groups) 不斷地釋出, 此方法原理為 OPA 及  $\beta$ -mercaptoethanol 與水解反應所產生的一級胺 (primary amines) 反應, 生成 1-alkylthio-2-alkylisoindole, 此化合

物在波長 340 nm 下有強烈吸光值。藉由測定  $\alpha$ -胺基的數量，對照標準品之檢量線，換算出水解液中暴露出之  $\alpha$ -胺基，進一步的得知斷裂之胜肽鍵數，以評估酵素對於蛋白質水解程度。

反應式如下：



### 1. OPA 混合試劑配製 (需避光並於二小時內測定完畢)

取 25 ml 之 0.1 M 四硼酸二鈉 (disodium tetraborate decahydrate, Merck, Darmstadt, Germany)、2.5 ml 之 20 % 十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate; SDS) (USB corporation Cleveland, OH, USA)、1 ml 之 0.4% 鄰苯二甲醛 (*o*-phthaldialdehyde; OPA) (Merck, Darmstadt, Germany) 和 100  $\mu$ l 2- 氫硫乙醇 (2-mercaptoethanol, Merck, Hohenbrunn, Germany) 於棕色定量瓶中，以去離子水定量至 50 ml。

### 2. L-Leucine 標準檢量線之製作

秤取 10 mg L-Leucine，以蒸餾水定量至 10 ml，此為 7.63 mM L-Leucine 原液。再以蒸餾水稀釋，配製成 0.12、0.23、0.50、0.69、0.92、1.15、1.37 與 1.60 mM 之 L-Leucine 稀釋液。以 OPA 分光光度法測量 L-leucine 稀釋液之  $\alpha$ -胺基濃度，繪製 L-Leucine 標準檢量線 (附錄一)。

### 3. 分析方法

將樣品以去離水稀釋，使樣品與 OPA 混合試劑反應後在波長 340 nm 下的吸光值介於 0.1-1.0 之間。取 200  $\mu$ l 稀釋樣品與 2 ml OPA 混合試劑均勻混合後，於室溫下反應二分鐘，使用可見光/紫外光分光光度計 (Spectrophotometer) (Thermo Electron Co., Ltd., Genesys 10, Waltham, MA, USA) 測定稀釋水解液於波長 340 nm 之吸光值，由 L-Leucine 標準檢量曲線換算水解液中  $\alpha$ -胺基濃度，再依下列公式計算樣品之水解率，公式如下：

$$\text{DH (\%)} = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% \quad (5)$$

$h$ : 為水解物中胜肽斷鍵數；即 GEYP 酵素水解作用後之  $\alpha$ -胺基出量，為比對 L-leucine 標準曲線所得之濃度 (mM)。

$h_{tot}$ : 為等量未水解時蛋白質中胜肽鍵數；即起始 GEYP 含量 (g) 乘以轉換係數 8.0 (meqv  $\alpha$ -amino group/ g egg) (Novo Industri A/S, 1980c)。

蛋的轉換係數之計算原理為蛋白質由胺基酸組成，每一個胺基酸具有一個胜肽鍵，因此計算蛋白質之胺基酸濃度，即可得知蛋白質的總胜肽鍵數。蛋類每 100 g 蛋白質中，含有約 80.0 g，而每一分子的胺基酸平均分子量為 100，因此計算出每克蛋白質中所含有的胺基酸莫耳濃度如下：

100 g 蛋白質中的總胺基酸量:  $80.0/100 = 0.8 \text{ mole} = 800 \text{ mmole}$

1 g 蛋白質中的胺基酸量:  $800 \text{ mmole} / 100 \text{ g protein} = 8.0 \text{ (mmole amino acid/ g protein)} = 8.0 \text{ meqv (} \alpha \text{-amino group/ protein)}$

#### (七) 產率之測定

將 500 ml 水解液以減壓乾燥 24 h，乾燥後稱重。計算公式如下：

$$\text{產率 (\%)} = \frac{W_1}{W} \times 100\% \quad (6)$$

W : GEYP 重量 (g)。

$W_1$  : 500 ml 水解液乾燥後之重量 (g)。

#### 四、 抗氧化能力之測定

##### 1. 清除 DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 自由基能力

參考 Shimada *et al.* (1992) 之方法。

DPPH 為帶有一未配位電子的自由基，在結構上可以產生穩定的共

振，不易衰竭，其安定性較其它的自由基高。DPPH 甲醇溶液為紫色，在波長 517nm 下有強吸光值，若樣品具有供質子或電子的能力時，將 DPPH 還原為 DPPH<sub>2</sub>，此吸光值會降低，吸光值愈低，表示樣品清除 DPPH 自由基的能力愈強。此法已廣泛的被作為測試樣品清除自由基的能力或供質子或電子的能力，評估其抗氧化力 (Jao and Ko, 2002)。

分析方法：

取 0.8 ml 水解液，加入新鮮配製的 0.2 ml 之 1 mM DPPH (Sigma, St. Louis, MO, USA) 乙醇溶液，均勻混合靜置 30 分鐘後，517 nm 之吸光值。吸光值愈低表示樣品清除 DPPH 自由基能力愈強。空白組以溶劑 (乙醇) 取代試劑 (DPPH 乙醇溶液)，對照組以水取代樣品。計算公式如下：

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100\% \quad (7)$$

A: 樣品組的吸光值

B: 空白組的吸光值

C: 對照組的吸光值

## 2. 金屬亞鐵離子螯合能力

參考 Decker *et al.* (1990) 之方法。

金屬離子，如 Fe<sup>2+</sup> 或 Cu<sup>2+</sup> 存在時，容易加速脂質氧化，結果導致自

由基生成 (Gordon, 2001; Stohs and Bagchi, 1995), 因此若能將此類金屬離子螯合去除, 便能減緩脂質氧化以達到抗氧化的目的 (Sherwin, 1990)。利用 $\text{Fe}^{+2}$ 與Ferrozine反應生成 Ferrozine- $\text{Fe}^{+2}$ 之複合物, 此複合物呈藍紫色在波長562 nm下有最大吸光值。



當樣品具有螯合鐵離子時, 則此複合物生成量降低, 吸光值降低, 即表示樣品螯合亞鐵離子能力愈強。其方法為取0.2 ml 的水解液和0.74 ml的蒸餾水混合, 加入20  $\mu\text{l}$  的2 mM  $\text{FeCl}_2$  (林純藥工業株式會社, 大阪, 日本) 和40  $\mu\text{l}$ 的5mM ferrozine (Sigma, St, Louis, MO, USA), 對照組以0.2 ml 去離子水取代水解液, 空白組以去離子水取代試劑, 在室溫靜置20分鐘, 使用可見光/紫外光分光光度計在波長562 nm下測其吸光值。依下列公式計算金屬亞鐵離子螯合力。

$$\text{金屬亞鐵離子螯合力 (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100\% \quad (8)$$

A: 樣品組的吸光值

B: 空白組的吸光值

C: 對照組的吸光值

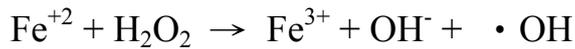
### 3. 還原力

參考 Wu *et al.* (2003) 之方法且稍做修飾。此方法原理為還原劑

(抗氧化劑) 將 $\text{Fe}^{3+}$ /ferricyanide化合物還原成亞鐵形式 (ferrous form)。樣品將赤血鹽中的 $\text{Fe}^{+3}$ 還原為 $\text{Fe}^{+2}$ 之亞鐵氰錯離子的能力，此亞鐵氰錯離子再與 $\text{Fe}^{+3}$ 反應生成普魯士藍 (prussian blue)，普魯士藍在波長700 nm下測量以檢測 $\text{Fe}^{2+}$ 濃度 (Ferreira *et al.*, 2007)，吸光值愈高表示，此樣品的還原力愈強。還原力在抗氧化力之表現是還原過氧化物 (peroxide) 之能力，而達到抗氧化作用。其分析方法為1 ml水解液與1 ml的0.2 M磷酸緩衝溶液 (pH6.6) 混合，磷酸緩衝溶液為0.2M 磷酸二氫鈉 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 與0.2M 磷酸氫二鈉 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (林純藥工業株式會社，大阪，日本) 配製而成。再加入1 ml的1 %鐵氰化鉀 ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) (片山試藥株式會社，日本) 混合均勻後於50 °C下反應20分鐘，接著加入1 ml的10 % TCA (Trichoroacetic acid)(Merck, Darmstadt, Germany)。取0.5 ml上述的反應混合溶液與0.5 ml去離子水混合，加入0.1 ml的0.1 %三氯化鐵 ( $\text{FeCl}_3$ )(島久藥品株式會社，大阪，日本)，使用可見光/紫外光分光光度計在波長700 nm下測量其吸光值。空白組以去離子水取代三氯化鐵。

#### 4. 氫氧自由基清除活性測定

參考 Sakanaka *et al.* (2006) 之方法。此方法之原理為二價鐵離子與過氧化氫在 pH7.4 反應生成氫氧自由基，為芬頓反應 (Fenton reaction):



活潑的氫氧自由基會攻擊去氧核糖，使之氧化成丙二醛 (malondialdehyde; MDA):



最後以 TCA 終止反應，再利用 MDA 與硫巴比妥酸試劑反應生成 TBARS 之紅色物質，此產物在波長 520 nm 下具有最大吸光值，若樣品中具有清除氫氧自由基之能力，吸光值降低。其方法為 0.45 ml 之 0.2 M 磷酸鈉緩衝溶液 (pH7.4) 與 0.15 ml 10 mM 2-脫氧核糖 (ICN Biomedicals Inc, Ohio, U.S.A) 混合，再加入 0.15 ml 的 10 mM FeSO<sub>4</sub>-EDTA 混合液、0.525 ml 去離子水與 0.075 ml 水解液混合均勻 (對照組以 0.75 ml 去離子水取代水解液)。加入 0.15 ml 10 mM 過氧化氫 (昭和化學株式會社，日本)，混合均勻 (即反應正式開始)，在 37°C 水浴下反應 4 小時，加入 0.75 ml 的 2.8 % TCA 終止反應，加入 0.75 ml 的 1.0 % 之 2-硫代巴比妥酸 (2-thiobarbituric acid; TBA) (Steinheim, Germany, Sigma)，此混合液加熱 10 分鐘後，以水浴冷卻 10 分鐘。接著以分光光度計在波長 520 nm 測量其吸光值並代入公式計算如下:

$$\text{氫氧自由基清除能力 (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C}\right) \times 100\% \quad (9)$$

A: 樣品組的吸光值

B: 空白組的吸光值

C: 對照組的吸光值

## 五、磷含量之測定 (Chen *et al.*, 1956)

### 1. 試藥配製

呈色劑-以 6 倍 A 液加 1 倍 B 液混合均勻後即為呈色劑，必須新鮮配製。A 液組成為 0.42 % ammonium molybdate (Riedel-dehaën, sigma-aldrich, GmbH) 溶於 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (J.T. Baker, USA)，而 B 液組成為 10 % ascorbic acid (Sigma, St, Louis, MO, USA)。其原理為利用 ammonium molybdate 與磷形成 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>·6Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·2H<sub>2</sub>O，再以 ascorbic acid 還原成藍色，在波長 820 nm 處測其吸光值。

### 2. 製備標準品之檢量線

以 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (島久藥品株式會社，大阪，日本) 為標準品，取 8.7874 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 於 105°C 烘 2 小時，以去離子水配製 1-4 ppm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液。分別取上述標準品溶液 300 μl 加入 700 μl 呈色劑混合均勻，於 45°C 水浴下反應 20 分鐘，取出立即以波長 820 nm 測吸光值。將吸光值與濃度做圖，得到標準品的檢量線，如附錄四所示。

### 3. 分析方法

取 1 g 水解物於坩鍋中，置於 600°C 灰化爐中灰化，灰化後置於乾燥器中冷卻。加入 5 ml 的 6 N HCl (J. T. Backer, USA) 與幾滴硝酸 (J.

T. Backer, USA), 並在加熱器上加熱使灰分完全溶解, 並以 Whatman no.1 濾紙過濾至定量瓶中並冷卻後以去離子水定量至 100 ml, 稀釋灰化之樣品 (稀釋 5,000 倍), 使磷含量落在 1-4 ppm 範圍。取 300  $\mu$ l 已灰化的稀釋樣品溶液加入 700  $\mu$ l 呈色劑 (避光), 於 45°C 水浴下反應 20 分鐘, 取出立即以波長 820 nm 測量吸光值, 對照標準曲線計算出磷的濃度。

## 六、膜反應系統之區分作用

### (一) 膜反應系統操作原理

本實驗採用的膜反應系統 (邁先生物技術股份有限公司, 台北, 台灣), 利用不同的分子量限值 (molecular weight cut-off) 捲式膜 (polyethersulfone spiral-wound membrane; Osmonics Inc., Minnesota USA) 區分, 以循環幫浦將水解液維持在系統內, 其水解液行進的方向與膜面呈平行, 當水解液以適當的速度流經濾膜表面時, 可穿透膜的小分子及水分通過濾膜形成濾液, 而無法通過的大分子及部分未通過膜的小分子則留在循環液, 為濃縮液。同時循環的液體不斷地流動形成掃流會將堵塞在膜表面上的物質帶出, 避免濾膜堵塞降低過濾效果。隨著操作的進行, 循環液濃縮至某種程度時, 逐漸變得黏稠而降低過濾效果, 此時可能仍有部分的小分子未被濾出, 因此加入一定的

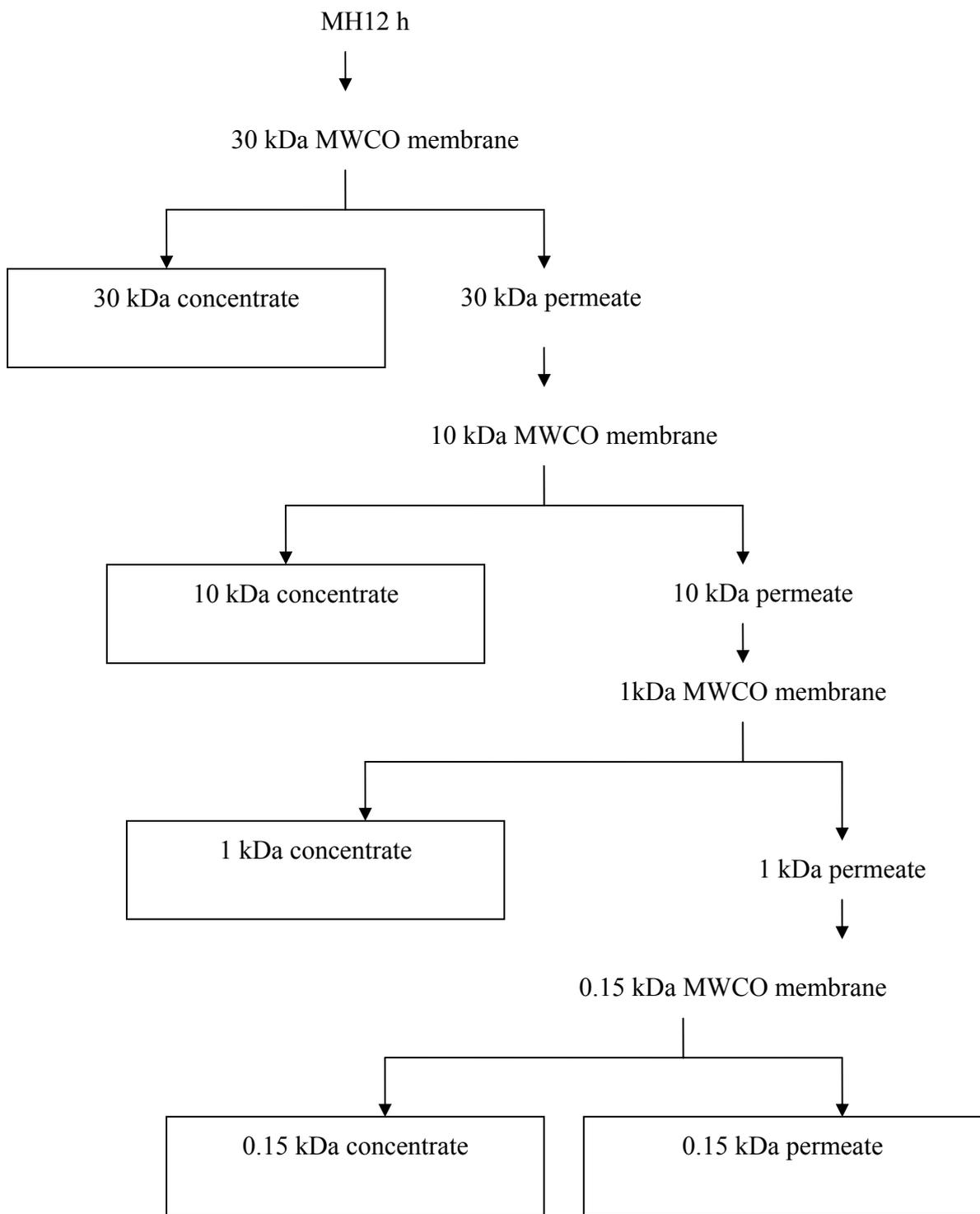
體積的水進行濾析作用，將小分子趕出。本試驗使用最終濃縮液 2 倍體積的水 (200 ml) 進行濾析。

## (二) 區分步驟

本試驗參考 Chiang *et al.* (1999) 之方法並做修飾，將 MH12h 依序連續使用四種不同分子量限值 30 k、10 k、1k 與 0.15 kDa 的濾膜進行區分 (如圖九)。首先將 MH12h 經 30 kDa MWCO 濾膜過濾，收集 30 kDa 之濃縮液，而 30 kDa 之濾液接著以 10 kDa MWCO 濾膜處理，收集 10 kDa 之濃縮液，再將 10 kDa 之濾液以 1 kDa MWCO 濾膜過濾得到濃縮液與濾液，收集 1 kDa 濃縮液，而其濾液再以 0.15 kDa MWCO 濾膜分離得到濃縮液與濾液並收集之。

## 七、分子量分佈分析

本實驗使用高效能粒度排除層析法 (high-performance size-exclusion chromatography)，此方法原理為根據胜肽分子的大小分離出不同分子量之分子。由於管柱內的固定相是由具有網狀篩孔的凝膠所組成，利用此球狀凝膠內的篩孔，使分子流過填充凝膠的管柱時，大分子無法進入凝膠篩孔，而只流經凝膠及管柱間的孔隙，很快就可以流出管柱，較小的分子因為進入凝膠內的篩孔，故在管柱內的停留時間較長，由此區分大小不同的分子，可與已知大小的分子作比較而



圖九、濾膜區分流程圖。

Fig. 9. The flowsheet of membranes separation.

定出該分子的分子量。參考 Chiang *et al.* (1999) 之方法，利用高效液相層析儀進行分析。

### 1. 標準品與樣品製備

將 GEYP、MH12h 與膜區分物濃度調整至 40 mg/ml hydrolysates，用去離子稀釋 20 倍後，以 0.22  $\mu$ m 針頭過濾器 (Testhigh syringe filter SFNY013022, diameter: 13 mm, Testhigh Tresding Crop.) 過濾後備用。標準品為 cytochrome c、Vitamin B<sub>12</sub>、aprotinin、(Glycine)<sub>3</sub> 與 Glycine 皆購自於 Sigma, Missouri, USA。其分子量分別為 12,588、6,512、1,355、189 與 75 Da，將上述五種標準品以水溶液配製後，以 0.22  $\mu$ m 針頭過濾器過濾備用。

### 2. 分析步驟

取 20  $\mu$ l 樣品或標準品注入高效液相層析儀 (HP 1100 Series HPLC, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany)，配備 QuatPump (G1311A, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) 與紫外光檢測器 (G1314A, Hewlett Packard, Tokyo, Japan)。HPLC 分析條件如下所述：  
移動相：20 mM phosphate buffer (0.15 M NaCl, pH 7.2)。  
管柱類型：Superdex TM peptide 10/200 GL (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)。

管柱規格 (column size): 300 mm × 10 mm。

樣品注入量: 20 µl。

流速: 0.5 ml/min。

偵測波長: 214 nm。

將樣品之滯留時間與標準品之滯留時間比對，定義樣品的分子量分佈。

## 八、胺基酸組成分析

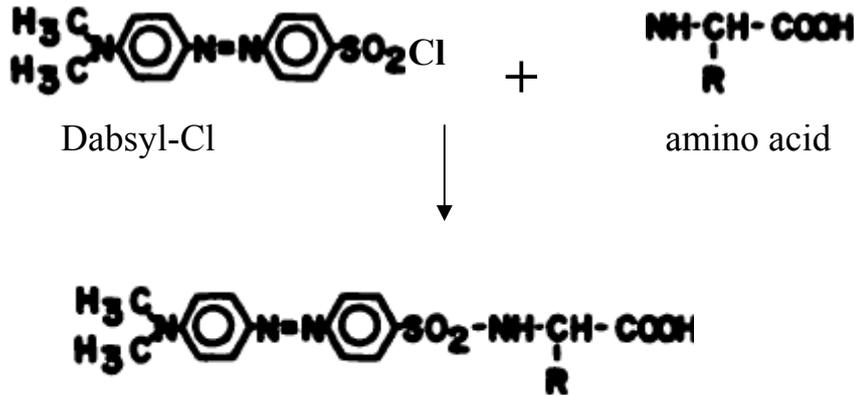
### 1. 胺基酸分析之樣品前處理

利用酸水解法，取 20 mg 水解物於分解管中，加入 1.5 ml 去離子水，加 1.5 ml 濃鹽酸，抽真空，封閉分解管（在乾冰與丙酮冰浴下抽真空，直到無氣泡產生為止），置於加熱反應器內 110°C，24 小時，冷卻之後打開分解管，用約 30ml 去離子水洗出管中之物，用 Sintered glass filter 過濾去除，並用去離子水清洗，以減壓濃縮機蒸乾 (45°C)，加 1 ml 去離子水兩次，蒸乾（目的是去除鹽酸），再用 pH2.2 磷酸溶液定量至 10 ml，最後以去離子水稀釋 10 倍，此稀釋之樣品進行胺基酸的衍生化作用。

### 2. Dabsyl-Cl 衍生化分析法

本試驗參考 Knecht and Chang (1986) 與吳等人，2002 所述之方法。此衍生化方法之原理為 Dabsyl-Cl 在 pH8.5-9.0，72°C 的環境下會

與游離胺基酸上的  $\alpha$  胺基反應生成 Dabsyl amino acid，此衍生物在波長 436 nm 下有最大的吸光值，藉由偵測此衍生物推估胺基酸的含量。



Lin and Wang (1980)

### I. 試藥配製

#### (1) Dabsyl-Cl 衍生劑製備 (4 mM Dabsyl-Cl)

取 0.0065 g Dabsyl-Cl (4- dimethylaminoazobenzene- 4'-sulfonyl chloride, Merck, Darmstadt, Germany) 溶於 5 ml 氰甲烷 (acetonitrile)。

#### (2) 碳酸氫鈉緩衝溶液 (100 NaHCO<sub>3</sub> buffer, pH8.3)

取 4.2 g NaHCO<sub>3</sub>，溶於去離子水並定量至 500 ml，以 1 N HCl 及 1 N NaOH 調整至 pH 8.3。

#### (3) 磷酸緩衝液 (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer, pH7.0)

取 3.55 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶於去離子水並定量至 500 ml，以 1 N HCl 及 1 N NaOH 調整至 pH 7.0，取 100 ml 磷酸鹽緩衝液並加入 100 ml 無水酒精 (99.5%) 稀釋。

(4) 含 4% N, N-dimethyl formamide 之醋酸鈉緩衝液 ( 25 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  buffer , pH 6.5 )

取 2.0508 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  並加入 40 ml N, N-dimethyl formamide , 取去離子水定量至 1L , 並以 1 N HCl 及 1 N NaOH 調整至 pH 6.5 , 以 0.45  $\mu\text{m}$  過濾膜過濾。

## II. 胺基酸衍生化步驟

(1) 取 25  $\mu\text{l}$  稀釋樣品或胺基酸標準溶液 (Sigma, St. Louis, USA) , 加入 25  $\mu\text{l}$  去離子水、50 $\mu\text{l}$  的 100 mM  $\text{NaHCO}_3$  緩衝溶液及 200 $\mu\text{l}$  的 4 mM Dabsyl-Cl (Merck, Darmstadt, Germany) 試劑 , 均勻混合後於 72 $^\circ\text{C}$  下水浴 15 min 。

(2) 水浴後 , 加入 700 的  $\text{NaHPO}_4$  溶液混合均勻 , 並以 0.22 $\mu\text{l}$  針頭過濾器 (Testhigh syringe filter SFNY013022, diameter: 13 mm, Testhigh Tresding Crop.) 過濾。

(3) 取 20 $\mu\text{l}$  上述過濾後的樣品溶液注入 HPLC (HP 1100 Series HPLC, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) 系統分析。

## 3. 分析條件

管柱型號 (column type): LiChrospher® 100 RP-18e (5  $\mu\text{m}$ ) (Merck, Darmstadt, Germany)

管柱規格 (column size): 250 mm × 4 mm

移動相 (mobile phase):

A: 含 4% N, N-dimethyl formamide 之醋酸鈉緩衝液 (25 mM

CH<sub>3</sub>COONa buffer, pH 6.5)。

B: 氰甲烷 (acetonitrile; CH<sub>3</sub>CN)。

梯度 (gradient):

Time (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
20	60	40
32	30	70
34	30	70
36	85	15

移動相流速: 1 ml/min。

偵測波長: 436 nm。

樣品注入量: 20 µl。

樣品中蛋白質完全被酸分別成游離態的胺基酸，其游離胺基酸上的  $\alpha$ -胺基與一分子的 Dabsyl-Cl 試劑衍生化後產生在波長 436 nm 有最大吸光值之產物，故游離胺基酸愈多則吸光值愈高，此衍生化的胺基酸利用逆相管析層析，分離出各種胺基酸，各胺基酸的滯留時間不同，根據樣品中胺基酸的滯留時間與標準品胺基酸做對照，定義出各胺基酸的位置，接著再以各胺基酸之波峰高度除以總胺基酸波峰高

度，計算各胺基酸的組成百分比，如下所示：

$$\text{胺基酸含量 (\%)} = \frac{A}{B} \times 100\% \quad (10)$$

A: 樣品中游離胺基酸的波峰高度。

B: 樣品中總胺基酸的波峰高度。

## 九、統計分析

本研究分析所得之實驗數據利用 SAS (statistical analysis system, Version 9.0) 統計套裝軟體以完全逢機設計 (completely randomized design; CRD) 進行分析，並用鄧肯氏多變域測驗法 (Duncan's New Multiple Range Test, MRT ) 比較各處理組平均值之間的差異顯著性。

## 肆、結果與討論

### 一、GEYP 基本成分分析

本研究進行酵素水解的原料為 GEYP，其製備是使用乙醇與正己烷對生鮮的鵝蛋黃進行兩階段之脫脂作用，結果如表三，鵝蛋黃成分主要為水分與脂肪，各占總成分的 49 %與 32 %，蛋白質含量較低為 17.41 %，灰分含量 1.7%。經由溶劑脫脂後所製備的 GEYP 之脂肪與水分含量百分比顯著降低 ( $p<0.05$ )，分別降低 28.9 %與 34.02 %，然而蛋白質含量明顯增加為 78.83 % ( $p<0.05$ )，灰分增加 2.28 %。

鵝蛋黃與雞蛋黃之基本組成分 (蛋白質:16 %，脂肪:31 %，水分:49 %，灰分:1.7 與醣類:0.6 %) (Standelman, 1973) 比較，並無太大差異。由上述結果顯示使用乙醇與正己烷兩階段脫脂所製備的 GEYP 脂肪含量顯著降低，由於蛋黃是一種相當穩定的水包油型乳狀液，其中乳化劑是磷脂與蛋白質結合的脂蛋白複合物，要充分地把磷脂抽提出來，所用溶劑必須能破壞這種複合物，從而破壞蛋黃乳狀液，並且要對脂質有良好的溶解能力。乙醇是屬於極性溶劑對脂質的溶解能力較差，但可有效的破壞卵磷脂與蛋白質或糖的結合；正己烷為非極性溶劑對卵磷脂的溶解性強 (陳，2006)，因此使用乙醇與正己烷兩階段的脫脂作用使鵝蛋黃中的脂肪降低。在脫脂過程中水分降低的原因可能為蛋

表三、鵝蛋黃與 GEYP 之基本組成分

Table 3. The proximate composition of goose egg yolk and crude goose egg yolk protein

Composition	Goose egg yolk <sup>1</sup>	Goose egg yolk protein <sup>1,2</sup>
Protein (%)	17.41±0.09 <sup>b</sup>	78.83±0.00 <sup>a</sup>
Moisture (%)	49.37±0.12 <sup>a</sup>	15.35±0.04 <sup>b</sup>
Fat (%)	32.71±2.46 <sup>a</sup>	3.81±0.04 <sup>b</sup>
Ash (%)	1.70±0.02 <sup>b</sup>	3.98±0.01 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Data are the mean ± SD of three replicates. <sup>a-b</sup> Means with different letters in the same row are significantly different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

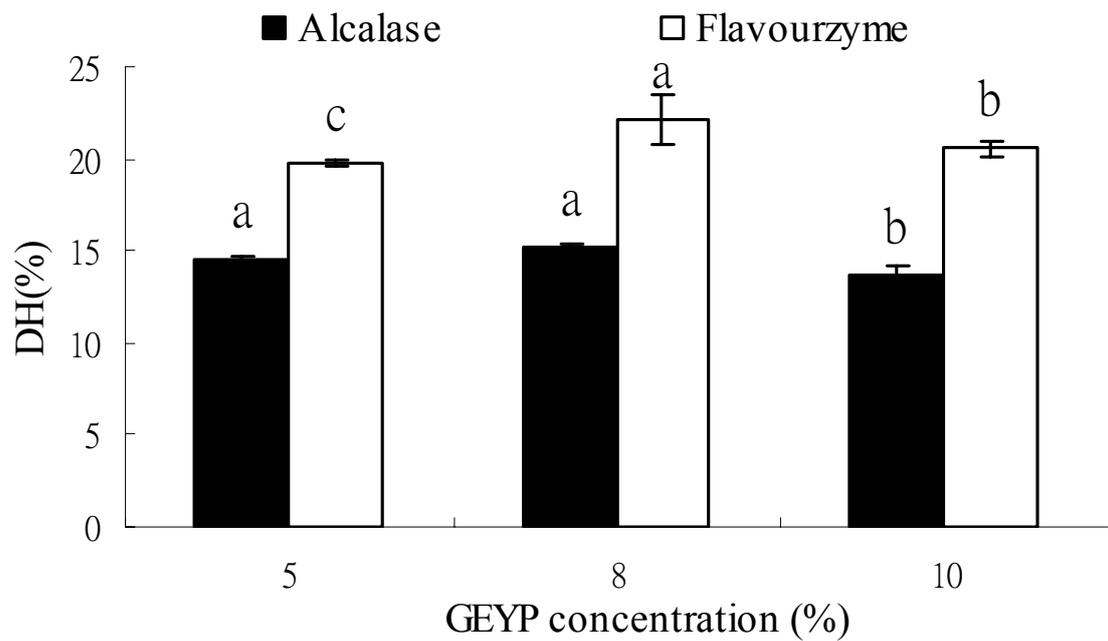
<sup>2</sup>Goose egg yolk protein (GEYP) were prepared from goose egg yolk defatted by ethanol and hexane.

，造成蛋白質的構形展開 (unfolding) 暴露疏水基，使有機溶劑和蛋白質競爭與水結合 (Hoyle and Merritt, 1994)，除此之外 GEYP 經由風乾與加熱乾燥成粉末的過程中去除掉有機溶劑，水分同時也會從中散失。因為脫脂後水分含量大幅降低，相對地蛋白質和灰分含量百分比提高。

## 二、GEYP 水解條件探討

### (一) 較適基質濃度之探討

圖十為不同酵素與 GEYP 濃度對水解物水解率的影響，使用 Alcalase 與 Flavourzyme 酵素濃度皆為 5%，在不同濃度的 GEYP (5、8 與 10% w/w protein)，起始反應 pH 值分別為 8.5 與 7.0，於 50°C 水解 8 h，選擇較適合酵素進行水解反應的基質濃度，以在相同時間內能達到較高水解率者，表示此基質濃度較適合該酵素的水解反應。結果表示，Alcalase 在 5% 與 8% GEYP 比 10% GEYP 之水解率高，而在 5% 與 8% GEYP 時其水解率無顯著差異 ( $p>0.05$ )。Flavourzyme 在 5% 與 8% GEYP 濃度下，水解率有顯著增加，由 19.75% 增至 22%，然而在較高濃度的 10% GEYP 時水解率則明顯降至 20.53% ( $p<0.05$ )，表示 Flavourzyme 在 8% GEYP 能夠達到較高的水解率，此濃度較適合 Flavourzyme 進行水解反應。



圖十、不同酵素與 GEYP 濃度對其水解物水解率的影響。

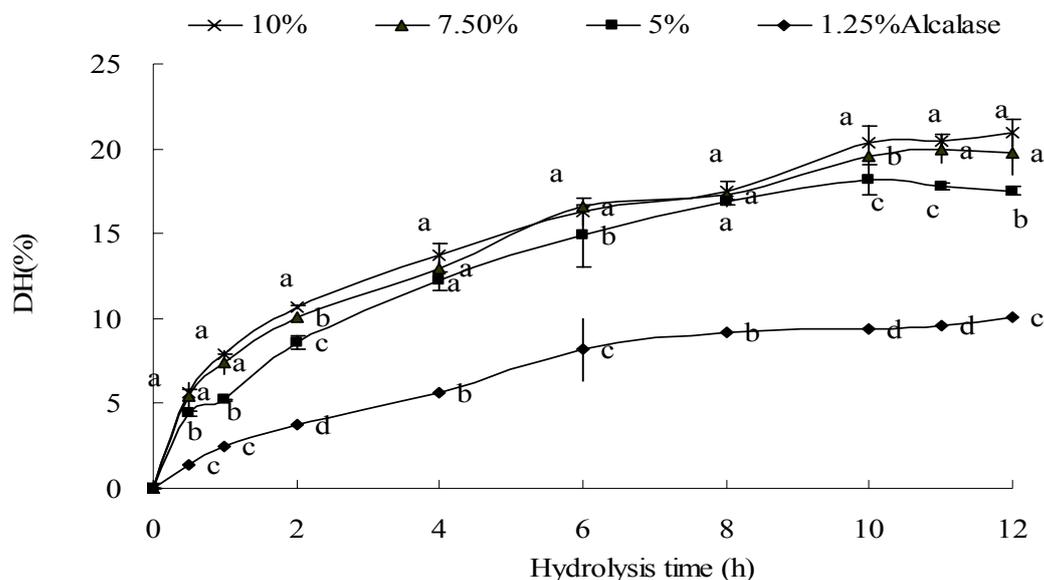
Fig. 10. Effect of different enzymes and goose egg yolk protein (GEYP) concentration on degree of hydrolysis (DH) of hydrolysates. The hydrolysis of GEYP by 5% enzyme for 8 h. Data are the mean  $\pm$  SD of three replicates. <sup>a-c</sup> Means with different letters in the same enzyme are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

Alder-Nissen (1986) 以 Alcalase 水解不同濃度的大豆蛋白 (基質)，探討基質濃度與水解率的影響，結果發現 Alcalase 在大於 2% 大豆蛋白之水解率無顯著的變化。Tucker and Woods (1995) 指出當所有的酵素分子之活性部位被基質占據即達飽和，水解反應速率會受到限制。當基質濃度達飽和時，即使加入更多的基質，反應速率並不會隨之增加。Vaithanomsat and Punysawon (2008) 以 Alcalase 水解 Eri silk pupae 使用不同濃度的 Pupae 蛋白質，當蛋白質基質濃度 0-4.6 % 時，水解率隨著蛋白質濃度增加而增加，當蛋白質基質濃度為 4.6-11.4 %，水解率反而降低。上述結果與本試驗使用 Flavourzyme，其水解率隨著基質濃度的提昇，有先增後減的趨勢相同，而 Alcalase 在 5 % 與 8 % GEYP 時，其水解率並無顯著差異，在 10 % GEYP 水解率降低。根據上述結果兩酵素的基質濃度皆訂為 8 % (in w/w protein)，作為之後酵素水解反應的基質濃度，進而探討較適當的酵素濃度。

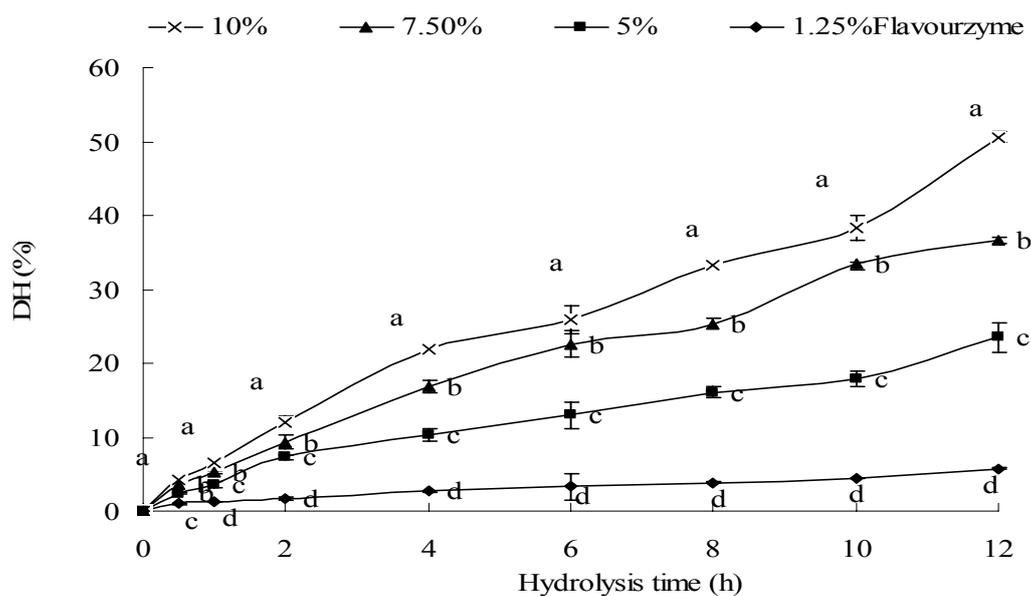
## (二) 較適酵素濃度之探討

圖十一為 Alcalase (a) 與 Flavourzyme (b) 濃度與水解時間對 GEYP 水解率之影響。結果顯示 Alcalase 與 Flavourzyme 對 GEYP 的水解率皆隨著酵素濃度與水解時間增加而上升。其中(圖十一 a) Alcalase，在水解 GEYP 初期 0-1 h，其水解率快速上升，而在 10 h 後，

a



b



圖十一、Alcalase (a)與 Flavourzyme (b) 濃度與水解時間對 GEYP 水解物之水解率之影響。

Fig. 11. Effect of (a) Alcalase and (b) Flavourzyme concentration and hydrolysis time on degree of hydrolysis of goose egg yolk protein (GEYP) hydrolysates. Data are the mean $\pm$ SD of three replicates. <sup>a-d</sup> Means with different letters in the same hydrolysis time are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

其水解率漸趨向於平緩。整體而言，在相同水解時間下，水解率亦隨著酵素添加愈多而愈高，而 10% 與 7.5% Alcalase 之水解曲線相似，無顯著差異 ( $p>0.05$ )。為節省成本，爾後試驗選擇 7.5% Alcalase。Flavourzyme (如圖十一 b) 相較於 Alcalase 的水解曲線，Flavourzyme 的水解率隨著水解時間較緩慢地增加，然而水解 GEYP 12 h 後，其水解率仍持續上升，並無趨緩之現象。為與 Alcalase 的水解液相比較，故爾後 Flavourzyme 酵素濃度選擇與 Alcalase 相同的 GEYP 濃度 7.5%。水解時間愈長，酵素能夠將蛋白質的胜肽鏈切斷的數目愈多，水解率也就隨之上升。然而，Alcalase 水解 GEYP 10 h 後，水解率並無顯著改變，表示水解反應可能達到平衡。Mutilangi *et al.* (1995) 指出酵素活性降低、基質耗竭或產物的抑制作用會減緩反應速率。Adler-Nissen (1986) 指出，水解率的增加與酵素濃度呈正相關，若酵素與基質濃度達到飽和狀態，便可強迫每個可用之酵素分子與受質作用，使兩者之間碰撞機率達到最大；若酵素濃度太低，降低基質與酵素間的碰撞，則會降低水解效率；但酵素濃度太高，也未必可提高水解速率，反而增加生產成本。Li *et al.* (2010) 分析不同濃度 Alcalase 對於酪蛋白水解率之影響，探討不同酵素濃度對水解時間酪蛋白之水解率的影響，其結果表示在相同水解時間下，隨著酵素濃度愈高水解率隨之增高，但酵素

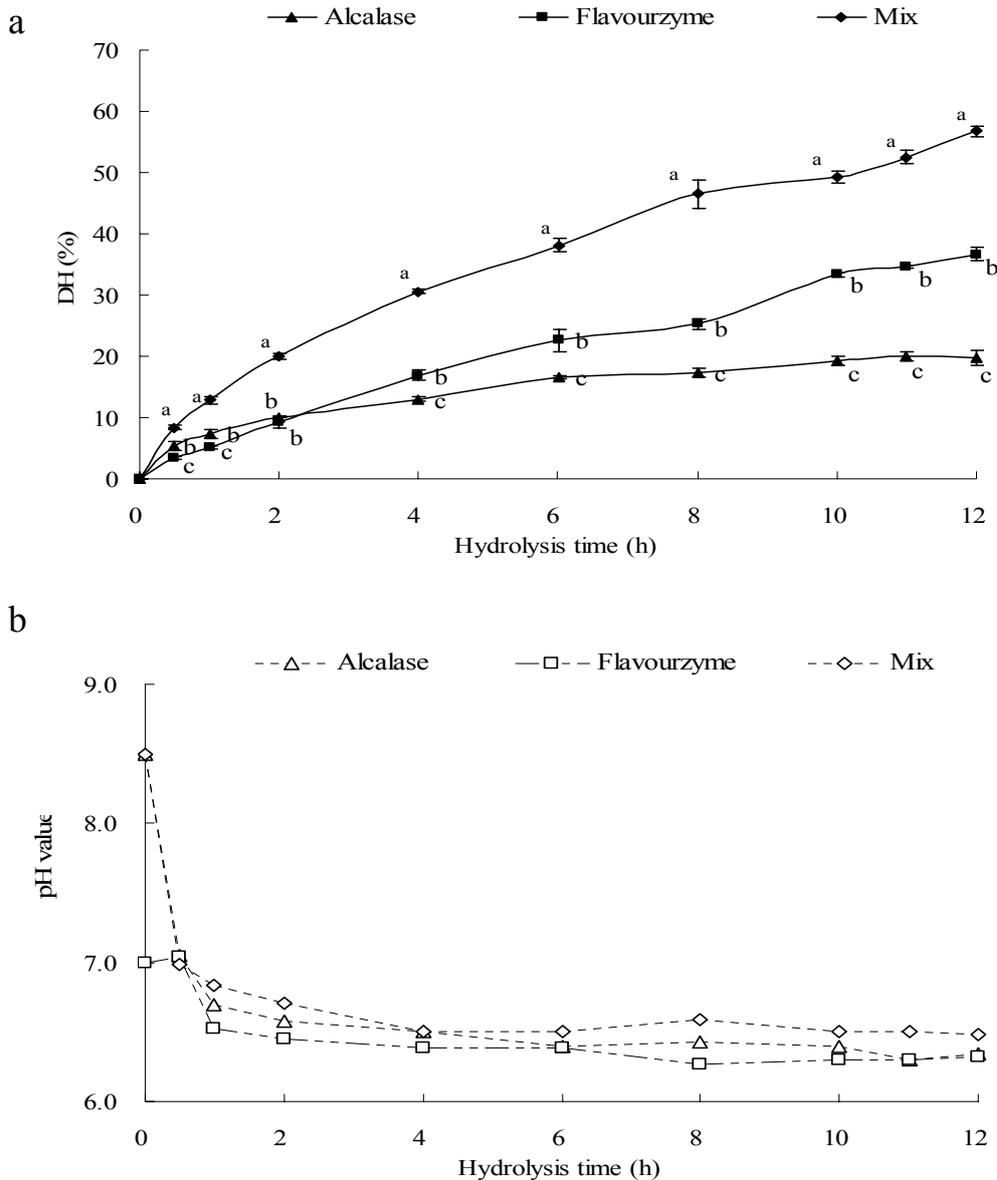
濃度若添加超過水解反應達飽和時的量，其水解率並不會顯著提升。

### (三) 在相同水解條件下不同酵素對於水解率之影響及其 pH 值之變化情形

#### 1. 水解率

圖十二為不同酵素與水解時間對水解率之影響及其 pH 值之變化。混合酵素 (Mix) 是 Alcalase 與 Flavourzyme 以 1:1 比例混合，三組酵素皆以 7.5% 分別對 8% GEYP 水解 12 h。圖十二 (a) 結果發現以 Mix 組之水解率比酵素單獨進行水解反應的水解率高。三組酵素水解所得水解物之水解率皆隨著水解時間愈長而增加，除了 Alcalase 組在水解 10 h 之後水解率趨近於平緩之外。在相同的水解時間下，Flavourzyme 組水解 4 h 之後，其水解率才高於 Alcalase。圖十二 (b) 表示三組酵素在水解 0-4 h 期間 pH，快速降低至約 6.4，之後 pH 值皆維持在 6.2-6.4 之間。

Chang *et al.*, 2007 以 Alcalase 與 Flavourzyme 將豬血紅蛋白進行水解所得之水解曲線，結果表示 Flavourzyme 之水解率高於 Alcalase。此因 Alcalase 屬於內切胜肽酶 (endopeptidase)，而 Flavourzyme 是一種



圖十二、不同酵素與水解時間對 GEYP 水解物水解率之影響(a) 及其 pH 值之變化 (b)。

Fig. 12. Effect of different enzyme and hydrolysis time on degree of hydrolysis (a) and pH value (b) of GEYP hydrolysates. The hydrolysis of 8 %GEYP with 7.5 % enzyme [Alcalase, Flavourzyme, and Mix (Alcalase:Flavourzyme=1:1)] for 12 h at 50°C. The initial pH of Alcalase, Flavourzyme, and Mix respectively are 8.5, 7.0, and 8.5. Data are the mean  $\pm$  SD of triplicates. <sup>a-c</sup> Means with different letters in the same hydrolysis time are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

含有內切 (endo-) 與外切胜肽酶 (exo-peptidase) 的複合性酵素。內切與外切胜肽酶複合物比內切酶能較完全地將蛋白質分子中的胜肽鍵水解。至於混合酵素在水解初期 pH8.5 偏鹼性環境下，適合 Alcalase 作用將大分子的蛋白質分解為中型分子，而當 pH 下降至 7.0 左右，適合 Flavourzyme 作用，可將中型分子分解為更小的胜肽或胺基酸，因此混合酵素較個別酵素之水解率更高率。

## 2. pH 值之變化

本實驗水解反應是在水溶液中進行，只調整蛋白質溶液的起始 pH，水解期間並未用酸或鹼液調整 pH。Aspmo *et al.* (2005) 分析不同蛋白酶包括腸內蛋白酶、Alcalase、Neutrase、Papain 與 Protamex、supermix 與 Actinidin 等水解鱈魚 (cod) 內臟，其水解反應是在蛋白質水溶液中進行，只調整起始 pH，結果顯示所有酵素進行水解反應 24 h 期間，pH 維持皆在 6.5-6.9 之間。蛋白質的水解作用伴隨著質子 ( $H^+$ ) 的釋出與獲得 (Sørensen *et al.*, 1908)。水解反應期間 pH 會改變，除了在 pH 5-6 範圍，質子的釋出與獲得實際上是相互抵消的。pH 低於 3.1-3.6 時，小於二分之一的羧基解離且胺基完全質子化。若水解作用不斷的進行下，切斷每一個當量的胜肽鍵淨獲得 0.5-1 個當量的質子，因此 pH 快速增加。相反的，若水解作用不斷地進行下，pH 高於 7.5-7.8

( 25°C ) 時，小於一半以上的胺基被質子化而羧基完全解離，每切斷一個當量的胜肽鍵淨釋出 0.5-1 個當量的質子，造成 pH 降低 (Alder-Nissen, 1986)。本試驗使用三種酵素進行水解反應期間，Alcalase、Flavourzyme 與 Mix 之起始 pH 分別為 8.5、7.0 與 8.5，在水解初期所暴露出的羧基完全解離出質子，僅少部分的胺基被質子化，即水解液中質子量增加，因此 pH 快速下降，而當水解環境 pH 降至 6 左右，質子的釋出與獲得實際上是相互抵消的，因此 pH 值維持衡定。

由於 Flavourzyme 與 Mix 水解 GEYP 12 h，其水解率仍未有趨緩之現象，因此將以等距時間與水解初期 (0.5 h)，決定即 0、0.5、4、8、12 h 分別取得水解液進行爾後實驗的分析和比較。

### 三、GEYP 抗氧化性水解物的製備條件及其特性之比較

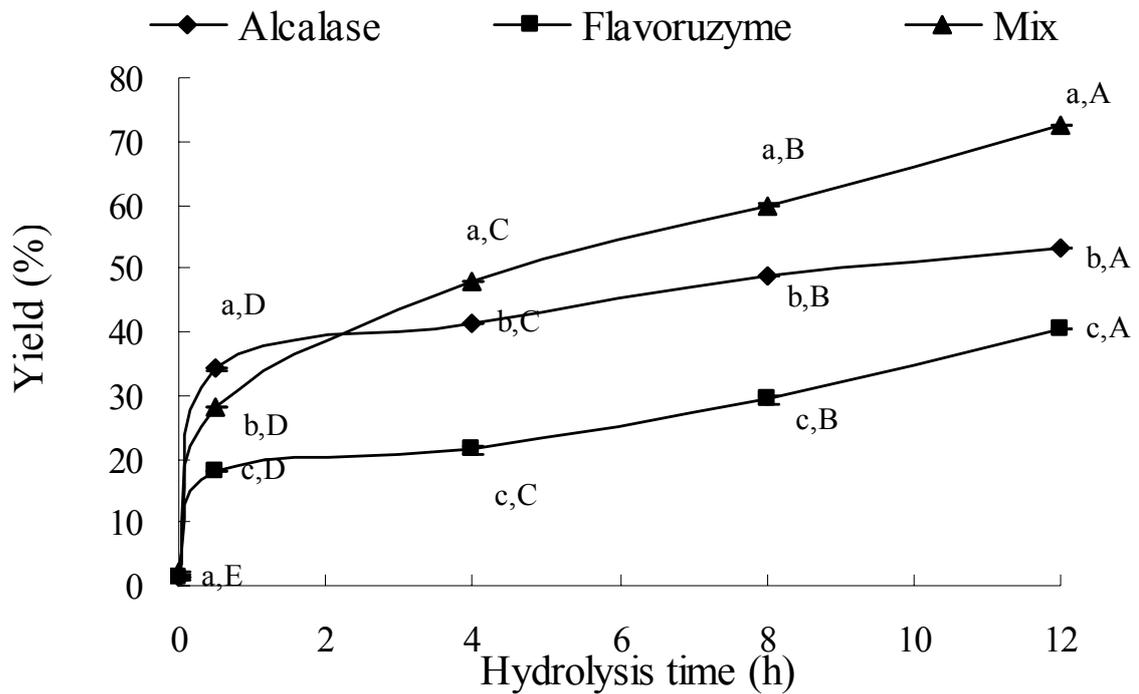
根據前述 GEYP 水解條件之探討，以 7.5 % Alcalase、7.5 % Mix (Alcalase:Flavourzyme =1:1) 於 50°C，pH8.5 水解 8 %GEYP (w/w of protein) 並於五個時間點 (0、0.5、4、8 與 12 h) 進行取樣，得到 GEYP 水解物，Alcalase 水解 0-12 h 分別得到 AH0h、AH0.5h、AH4h、AH8h 與 AH12h; Mix 水解 0-12h 分別得到 MH0h、MH0.5h、MH4h、MH8h 與 MH12h; Flavourzyme 水解 0-12h 分別得到 FH0h、FH0.5h、MH4h、MH8h 與 MH12h 之水解物，分別進行產率和抗氧化性之分析，其結果

分述如下：

### (一) GEYP 水解物產率之比較

GEYP 水解物產率的定義為每克的 GEYP 經過酵素水解、加熱失活、離心及過濾作用後所得水解物粉末之乾重，以重量百分比表示。圖十三表示酵素種類與水解時間對 GEYP 水解物產率的影響。結果顯示水解初期 0-0.5 h，Alcalase 與 Mix 組之水解物產率快速增加，以 Alcalase 組最快約 34 %，而之後 Alcalase 組的產率增加的速率比 Mix 慢，隨著水解時間增加 Alcalase 與 Mix 組的產率隨著水解時間增加而上升，Mix 水解 GEYP 0-12 h，與外切胜肽酶 (exopeptidase) 的複合性酵素。內切與外切胜肽酶複合物比內切酶能較完全地將蛋白質分子中的胜肽鍵水產率由 1 % 增至 72 %，其產率為最高。Flavourzyme 組的產率隨著水解時間增加有緩慢增加的趨勢，由 1 % 增加 30 %，但產率低於 Alcalase 組與 Flavourzyme 組。整體而言，三組酵素的產率隨著水解時間愈長而增加。

產率與水解率是呈正相關的，水解率愈大產率會愈高。當水解時間愈長，酵素不斷地將蛋白質水解為較小的胜肽或胺基酸，由於這些小分子較易溶於水中，因此溶解在水中的分子增加。經由離心與過濾作用，移除大分子，如蛋白質或胜肽，隨著水解時間愈長，小分子的



圖十三、 酵素種類與水解時間對 GEYP 水解物產率之影響。

Fig. 13. Effect of enzymes and hydrolysis time on yield of various hydrolysates prepared from GEYP. The hydrolysis of 8 %GEYP with 7.5 % enzyme [Alcalase, Flavourzyme, and Mix (Alcalase:Flavourzyme=1:1)] for 12 h at 50°C. The initial pH of Alcalase, Flavourzyme, and Mix respectively are 8.5, 7.0, and 8.5. Data are the mean  $\pm$  SD of triplicates. <sup>a-c</sup> Means with different letters in the same hydrolysis time are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. <sup>A-E</sup> Means with different letters in the same enzyme are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

胺基酸或胜肽愈多，相對的產率則隨著水解時間愈久而上升。因此三組酵素之產率隨著水解時間增加而提升。與圖十二 (a) 不同酵素與水解時間對水解率之影響做對照，Alcalase 與 Mix 在水解初期 0—1 h 的水解率快速上升，表示水解反應快速，小分子快速增加，因此 Alcalase 與 Mix 組在水解 0-0.5 h 之產率快速增加。Aspmo *et al.* (2005) 分析不同蛋白酶包括腸內蛋白酶、Alcalase、Neutrase、Papain、Protamex、Supermix 與 Actinidin 水解鱈魚，其水解物產率亦隨著水解時間增加而上升之結果趨勢相符。

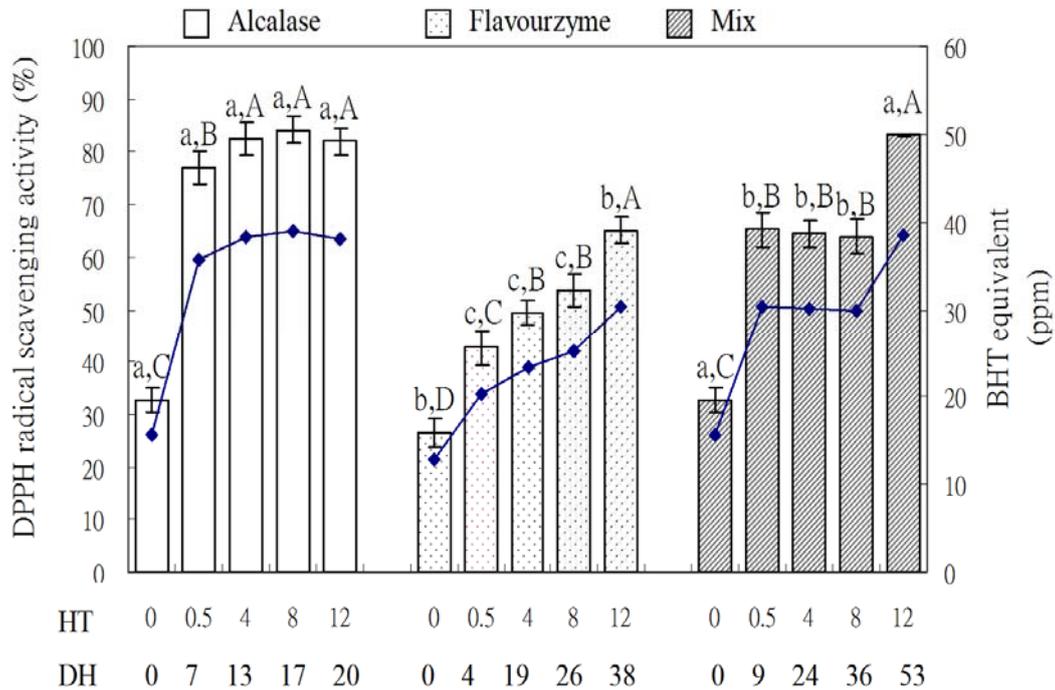
雖然 Flavourzyme 的水解率高於 Alcalase (圖十三 a)，但實際上 Flavourzyme 的產率較 Alcalase 低，可能為 Flavourzyme 屬於內、外切酶比 Alcalase 的內切酶更能將蛋白質分子中的胜肽鍵較完全地水解 (Chang *et al.*, 2007)，當 Flavourzyme 進行外切作用時，由蛋白質端點開始作用，將胜肽鍵一個個逐步地水解，而同時也會進行內切作用，因此其水解率較高，賴 (2009) 曾以 Alcalase 與 Flavourzyme 分別水解明膠蛋白質 8 h，發現 Flavourzyme 水解物之分子量分佈相當廣泛，不像 Alcalase 水解物主要集中在特定大小範圍的胜肽片段。由此推測 Flavourzyme 所產生分子片段含蓋大分子與小分子的胜肽，水解物經相同的離心過濾條件會濾除掉大分子，留在上清液的分子可能是較

Alcalase 之水解物還要小的胜肽分子，因此經乾燥後重量較 Alcalase 之水解物輕，因此產率較低。故產率會受到所使用的酵素種類及離心作用的影響。

## (二) GEYP 水解物抗氧化能力之比較

### 1. $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基清除能力之比較

圖十四水解時間及酵素種類對GEYP水解物之DPPH自由基清除能力與BHT當量之影響。為使測量數值落在合理的範圍內，所有的水解液皆稀釋2倍。結果顯示，未經酵素水解的GEYP (0 h) 即具有清除DPPH 自由基的能力達32.51 %，相當於15.27 ppm BHT，Alcalase水解至4 h，即達到最高的DPPH自由基清除力82.5 %，相當於35 ppm BHT，約增加2.3倍，之後繼續水解其清除DPPH自由基的能力無顯著的變化 ( $p > 0.05$ )，表示Alcalase水解超過4 h，並未能再提升DPPH自由基的清除能力。Flavourzyme組之清除能力，隨著水解時間增加而緩慢提升，由0-12 h從26.51%增加至65.15%，然而，Flavourzyme在任何的水解時間下，其水解液的清除能力皆顯著較其它二組低 ( $p < 0.05$ )。至於Mix組，MH12h的自由基清除能力與AH4h相當，其能力相當於約38.52 ppm BHT，表示Mix必須水解較長的時間，才能達到與AH4h相當的DPPH自由基清除能力。整體而言三組酵素之水解液清除DPPH自由基能力均隨



圖十四、水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物之 DPPH 自由基清除能力與 BHT 當量之影響。實線表示 BHT 當量。

Fig. 14. Effect of hydrolysis time and enzymes on DPPH radical scavenging activity and BHT (butylated hydroxytoluene) equivalent of the hydrolysates prepared from GEYP. Solid lines were BHT equivalents. Data are the mean  $\pm$  SD of triplicates. The hydrolysis of 8 %GEYP with 7.5 % enzyme [Alcalase, Flavourzyme, and Mix (Alcalase:Flavourzyme=1:1)] for 12 h at 50°C. The initial pH of Alcalase, Flavourzyme, and Mix respectively are 8.5, 7.0, and 8.5. <sup>a-c</sup> Means with different letters in the same time are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. <sup>A-D</sup> Means with different letters in the same enzyme are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

著水解時間增加而提升。

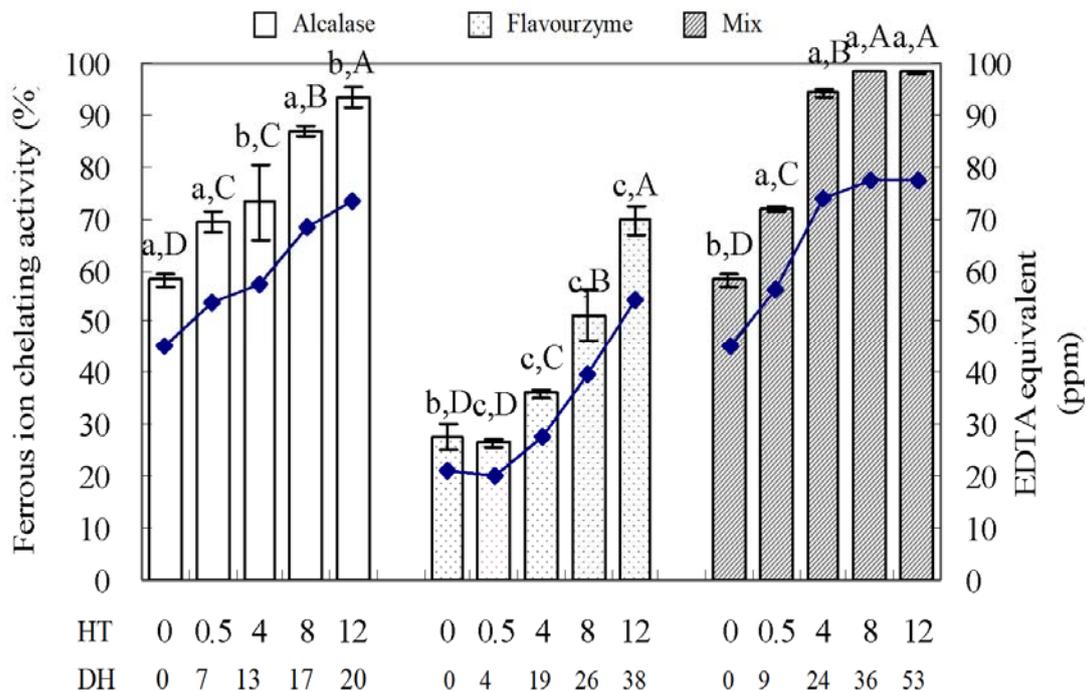
Li *et al.* (2007) 指出豬膠原蛋白水解物之水解物，其清除 DPPH 自由基能力隨著水解率增加而提高。Thiansilakul (2007) 使用 Alcalase 與 Flavourzyme 水解藍圓鯊並測其抗氧化性，結果指出 Alcalase 與 Flavourzyme 水解物皆隨著水解率的增加 (0-60%) 其 DPPH 自由基清除能力顯著增加，但水解率大於 40% 時，Alcalase 水解物清除能力並無提升。由於所使用蛋白質不同，本試驗使用 Alcalase 水解 GEYP 之水解率最高為 20%，而水解率在大於 15% 時，其 DPPH 自由基清除能力即無顯著的變化。整體而言，水解率愈高 DPPH 自由基清除能力有增加之趨勢。一般來說，具有提供質子能力者，即能有效的清除自由基，如 His 上的 imidazole group 具有提供質子的能力 (Chen *et al.*, 1995; Tsuge *et al.*, 1991)、含硫胺基酸 (Cys、Met) 提供硫氫 (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005)，此外疏水性胺基酸 (Trp、Tyr、Phe) 的胜肽具有較佳的抗氧化能力 (Da'valos, *et al.* 2004)。當水解率愈高時，產生愈多較小胜肽，暴露出具有抗氧化性之胺基酸也隨之增加。因此隨著水解率增加水解物清除 DPPH 自由基的能力隨之上升。然而酵素作用的專一性會影響水解物之 DPPH 自由基清除能力，由於 Alcalase 酵素作用位置是疏水基，其水解物所暴露出較多的疏水端，

因此相較於 Flavourzyme 有較佳的 DPPH 自由基清除能力。故 Alcalase 水解 4 h 與 Mix 水解 12 h 之水解物具有較佳的供質子或電子的能力，以終止自由基反應。

## 2. 亞鐵離子螯合能力之比較

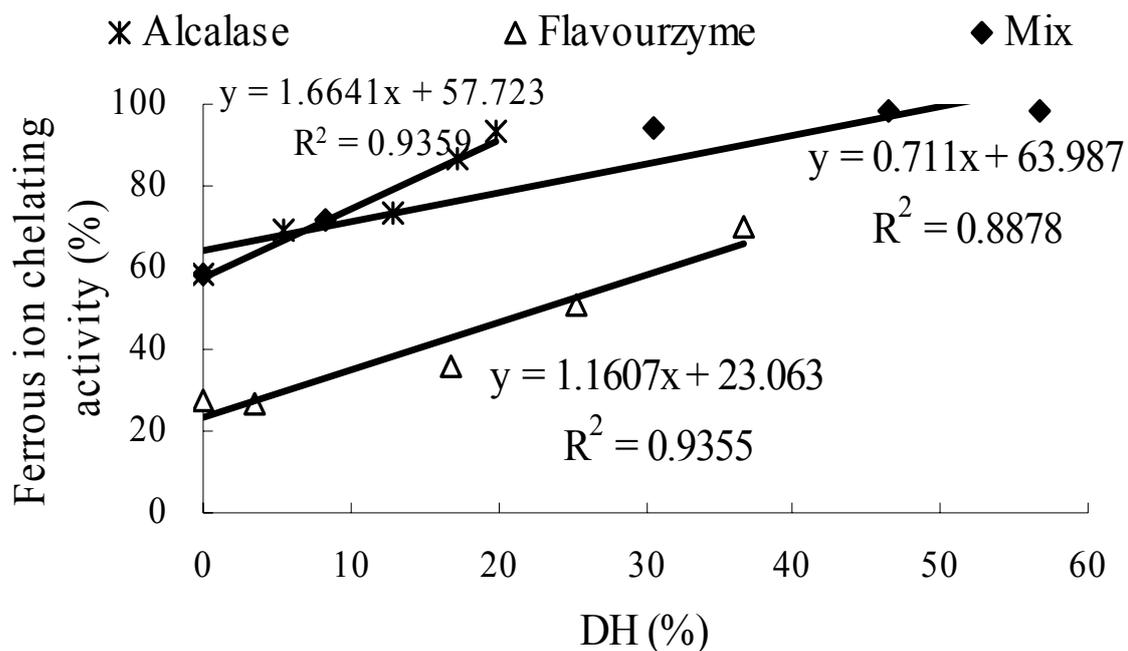
過渡金屬離子，如 $\text{Fe}^{2+}$ 或 $\text{Cu}^{2+}$ 存在時，容易加速脂質氧化，因而導致自由基生成 (Gordon, 2001; Stohs and Bagchi, 1995)，因此若能將此類金屬離子螯合去除，便能減緩脂質氧化以達到抗氧化的目的 (Sherwin, 1990)。

圖十五為水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物螯合亞鐵離子能力與 EDTA 當量之影響。結果顯示，三組酵素之螯合金屬離子能力皆隨著水解時間增加而上升，其中 Mix 組 (0-12h) 由 58% 增至 98%，約增加 32 ppm EDTA 當量。以 AH12h 與 MH12h 有最高的亞鐵離子螯合能力 (98.35%)，約 77 ppm EDTA 當量。在相同的水解時間下，亞鐵離子螯合能力以 Mix 組 > Alcalase 組 > Flavourzyme 組。已有許多文獻指出蛋白質水解物的金屬螯合力與水解率有關 (Klompong *et al.* 2007; Li *et al.*, 2007)，隨著水解率增加螯合能力也隨之提升，我們將水解物之亞鐵離子螯合力與水解率作圖 (如圖十六所示)，發現在相同酵素三組皆呈線性關係，Alcalase 與 Flavourzyme 組之  $R^2 > 0.9$ ，Mix 組  $R^2$



圖十五、水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物螯合亞鐵離子能力與 EDTA 當量之影響。實線表示 EDTA 當量。

Fig. 15. Effect of Hydrolysis time and enzymes on ferrous ion chelating activity and EDTA (ethylenedinitrilo tetraacetic acid) equivalents of the hydrolysates prepared from goose egg yolk protein. Solid lines were EDTA equivalents. The hydrolysis of 8 %GEYP with 7.5 % enzyme [Alcalase, Flavourzyme, and Mix (Alcalase:Flavourzyme=1:1)] for 12 h at 50°C. The initial pH of Alcalase, Flavourzyme, and Mix respectively are 8.5, 7.0, and 8.5. Data are the mean  $\pm$  SD of triplicates. <sup>a-c</sup> Means with different letters in the same hydrolysis time are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. <sup>A-E</sup> Means with different letters in the same enzyme are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖十六、 GEYP 水解物之水解率對亞鐵離子螯合能力的關係。  
 Fig. 16. Relationship between ferrous ion chelating activity and DH of the hydrolysates prepared from goose egg yolk protein.

為0.88具有高度的相關性。可能原因為蛋白酶進行水解過程中，將蛋白質中的胜肽鍵水解，暴露出愈多的羧基（ $\text{COO}^-$ ），由於正負電荷的吸引，胺基酸或胜肽的羧基（ $\text{COO}^-$ ）與 $\text{Fe}^{2+}$ 結合，而去除掉促氧化的金屬離子 (Dong *et al.*, 2008)。因此水解率愈高，水解物的亞鐵離子螯合力隨之增加。Saiga *et al.* (2003) 指出利用陰離子與陽離子交換管柱層析法，將具有抗氧化性豬肌纖維蛋白質水解物區分為酸性、中性與鹼性區分物，發現酸性區分物之抗氧化性比中性或鹼性區分物強，歸因於酸性區分物含有Glu、Asp與Lys等。這類胺基酸側鏈上的胺基與羧基帶電性與金屬離子交互作用，避免金屬離子加速脂質的氧化作用。Murase *et al.* (1993) 認為His上之imidazole group 具有金屬離子的螯合作用，故胜肽中胺基酸的組成以及其帶電荷與金屬螯合能力有關。三組酵素水解液的螯合能力的差異，可能與酵素的切位有關 (鄭等，2007)。

已有相關文獻指出磷酸鹽添加於亞麻油酸氧化系統中，具有抑制亞麻油酸的氧化作用 (Marcuse, 1962)，由於磷酸鹽在食品系統中，為一種良好的螯合劑，藉由螯合金屬離子，達到抗氧化的作用 (張，1995)。在酪蛋白及其衍生化胜肽中，磷酸根與Glu藉由分子間鐵架橋 (intermolecular iron bridging) 的形成將鐵離子螯合 (Baumy and Brule,

1988; Kim *et al.*, 2007)。由於蛋黃蛋白質中含有豐富的磷蛋白 (張, 1986), 可能在酵素的水解過程中暴露磷酸根, 此磷酸根有助於金屬的螯合作用。本試驗根據水解物中總磷含量, 推測水解液中磷酸鹽的含量, 探討磷酸鹽含量對於亞鐵離子螯合力的影響, 結果顯示三組酵素水解液之總磷含量皆隨著水解時間愈長而增加 (如表四), 以混合酵素的磷含量增加最多可達39 mg/ml, 然而Flavourzyme在未水解時蛋白質中的磷含量較高, 但其螯合亞鐵離子的能力較低, 可能原因為呈蛋白質狀態時無法釋出磷酸根與金屬離子作用, 蛋白質經由酵素水解成胜肽時磷酸根釋出與金屬螯合, 除此之外鹽酸根隨著水解時間增加而增加, 以MH12h之磷含量最高 (52.7 mg/ml), 這有助於磷酸根將金屬離子螯合作用。因此磷酸根含量可能與GEYP水解物螯合亞鐵離子能力的提升有關。

### 3. 還原力之比較

圖十七為水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物還原力和 BHT 當量之影響。結果表示未水解的蛋白質已具有些微的還原能力, 其吸光值為 0.2-0.3, 相當於 10-19 ppm BHT, 水解後所有的水解物之還原力皆有提升, 以 MH12h 最高吸光值達 0.6, 相當於 55 ppm BHT 當量。三組酵素的還原力均隨著水解時間而上升; 其中 Alcalase 組水解

表四、GEYP 水解物中總磷的含量

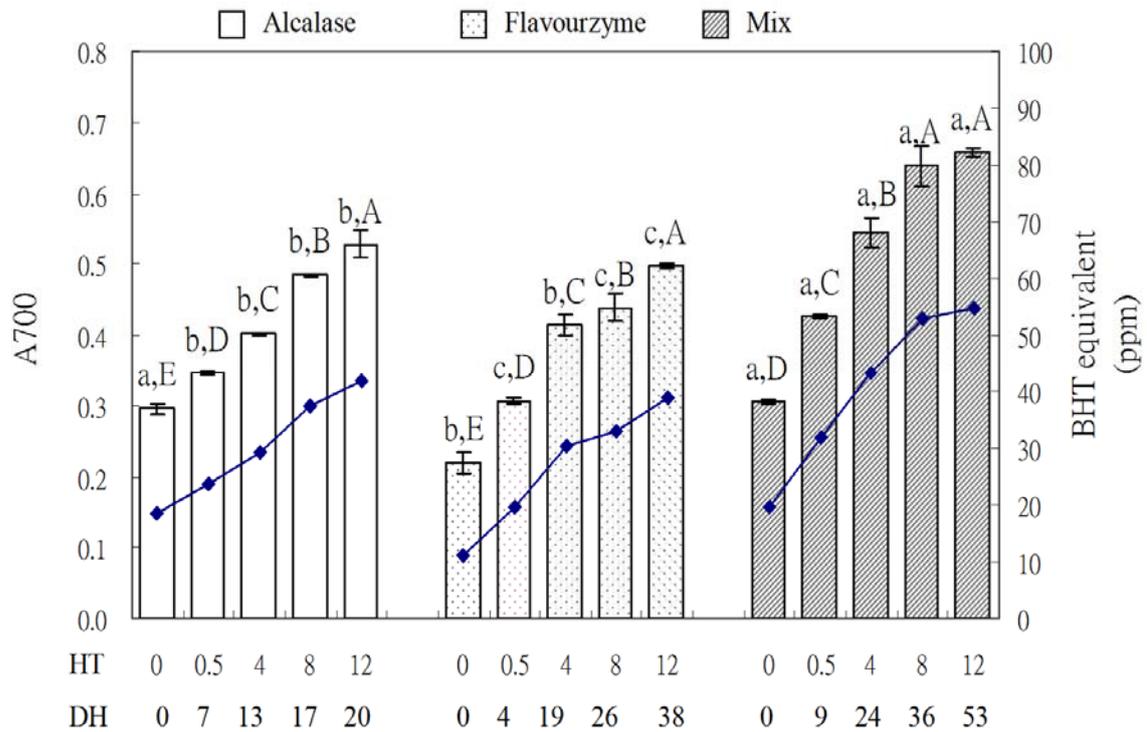
Table 4. Total phosphorus content of GEYP hydrolysates using different enzymes

Hydrolysis time (h)	Phosphorus ( mg/ml ) <sup>1</sup>		
	Alcalase	Flavourzyme	Mix
0	14.37±0.46 <sup>a,C</sup>	15.06±0.32 <sup>a,B</sup>	14.37±0.46 <sup>a,C</sup>
0.5	14.88±1.35 <sup>a,C</sup>	11.35±0.53 <sup>b,D</sup>	16.31±0.65 <sup>a,C</sup>
4	17.50±0.87 <sup>b,B</sup>	12.37±0.13 <sup>c,C</sup>	21.03±0.61 <sup>a,C</sup>
8	20.23±0.00 <sup>b,A</sup>	14.78±1.47 <sup>c,B</sup>	37.30±2.34 <sup>a,B</sup>
12	21.50±0.95 <sup>b,A</sup>	19.57±0.63 <sup>b,A</sup>	52.70±6.19 <sup>a,A</sup>

<sup>1</sup>The hydrolysis of 8 %GEYP with 7.5 % enzyme [Alcalase, Flavourzyme, and Mix (Alcalase:Flavourzyme=1:1)] for 12 h at 50°C. The initial pH of Alcalase, Flavourzyme, and Mix respectively are 8.5, 7.0, and 8.5. Data are the mean ± SD of Duplicates. <sup>a-c</sup> Means with different letters in the same time are significantly different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test. <sup>A-D</sup> Means with different letters in the same enzyme are significantly different ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

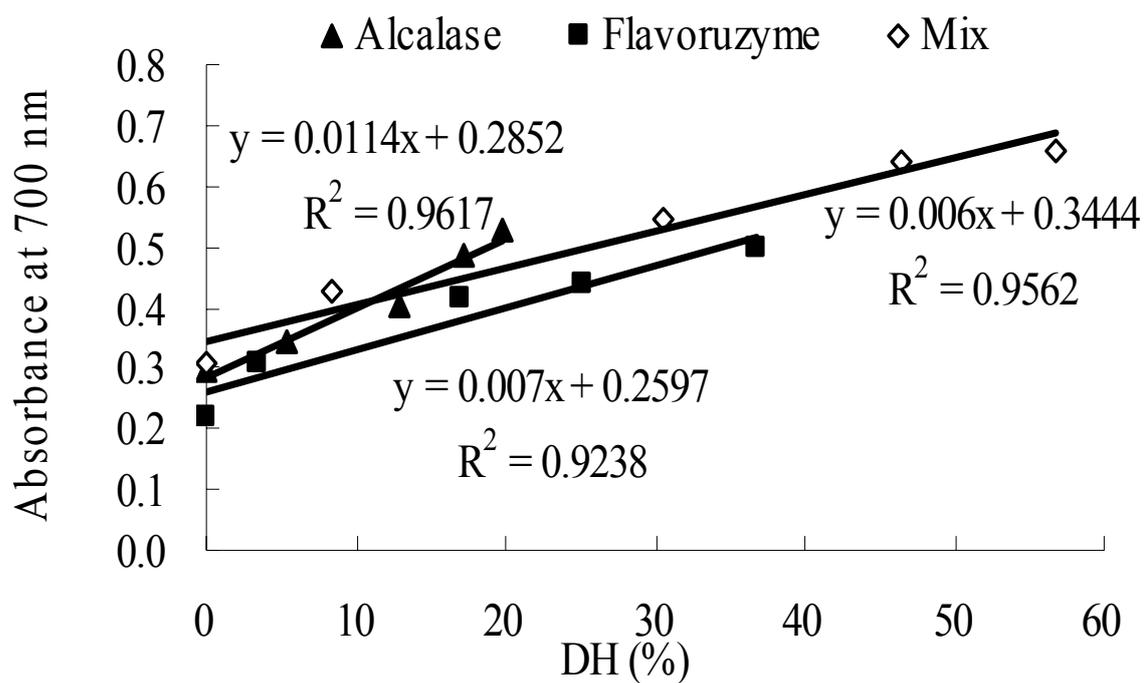
0-12h 由18增至41 ppm BHT 當量，Flavourzyme由11增至38 ppm BHT 當量，而Mix組由20 ppm增至55 ppm BHT，Mix 組水解0-8 h時隨著水解時間增加還原力有顯著地上升，而之後並無顯著的差異 ( $p > 0.05$ )，其還原力最高為約0.6，相當於54.87 ppm BHT。在相同水解時間下，還原力以Mix組大於Alcalase和Flavourzyme組。

蛋白質、胜肽及胺基酸皆具有抗氧化性，然而胜肽的抗氧化力高於蛋白質與胺基酸，主要是因為原本摺疊之蛋白質分子展開及疏水性基的暴露，增加胺基酸與自由基反應 (Elias *et al.*, 2008)，Sakanaka *et al.* (2004) 指出雞蛋黃蛋白質水解物、蛋黃蛋白質與胺基酸混合液各別添加入含有亞麻油酸的肉餅中，結果顯示蛋黃蛋白質水解物的抗氧化性最強。因此 GEYP 經酵素水解後還原力增加。Thiansilakul *et al.* (2007) 指出藍圓鯪以 Alcalase 與 Flavourzyme 進行水解，其水解物之還原力與水解率 (DH) 具有相關性，水解率愈高，還原力愈強。Peng *et al.* (2009) 指出乳清蛋白質水解物隨著水率增加而提升。因此我們將 GEYP 水解物之水解率對還原力之關係圖，結果顯示 (圖十八) 三組酵素水解液之水解率與還原力皆呈線性關係， $R^2$  值  $> 0.9$  具有高度相關性。水解時間愈久，水解率增加，還原力愈強，可能是由於胜肽斷裂釋出愈多的氫 (質子與電子) (Liu *et al.*, 2010) 以及較多的小胜肽。



圖十七、水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物還原力和相對 BHT 當量之影響。實線表示相對 BHT 當量。

Fig. 17. Effect of Hydrolysis time and enzymes on reducing power and BHT equivalents of the hydrolysates prepared from GEYP. Solid lines were BHT equivalents. The hydrolysis of 8 %GEYP with 7.5 % enzyme [Alcalase, Flavourzyme, and Mix (Alcalase:Flavourzyme=1:1)] for 12 h at 50°C. The initial pH of Alcalase, Flavourzyme, and Mix respectively are 8.5, 7.0, and 8.5. Data are the mean  $\pm$  SD of triplicates. <sup>a-c</sup> Means with different letters in the same time are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. <sup>A-D</sup> Means with different letters in the same enzyme are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖十八、 GEYP 水解物之水解率對還原力的關係。

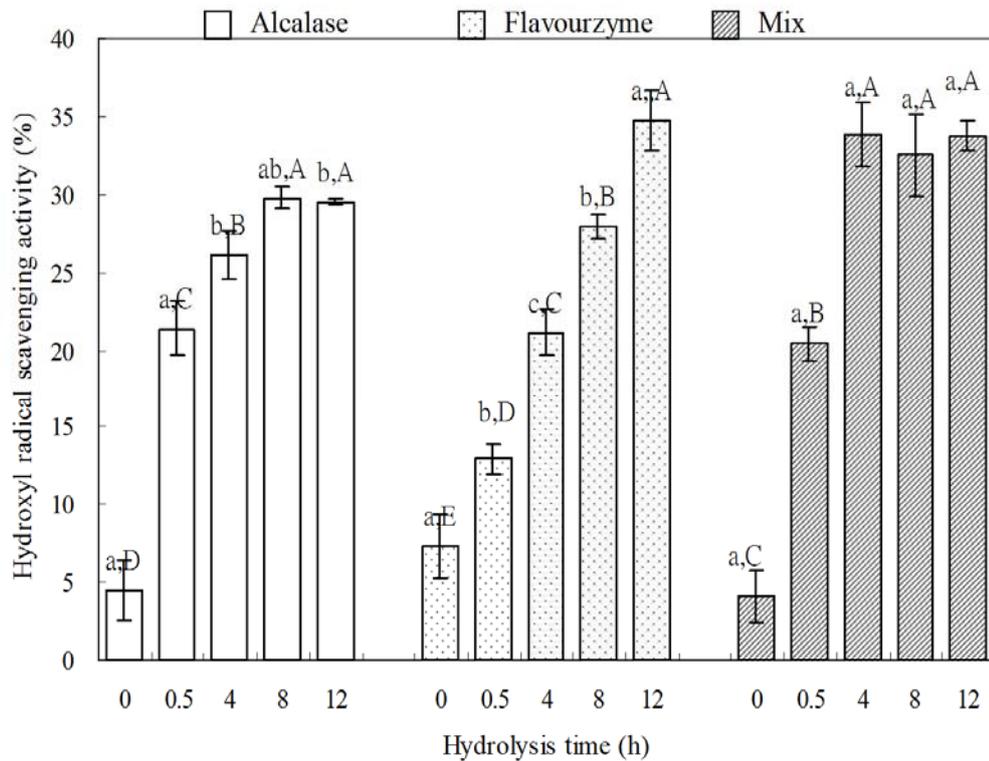
Fig. 18. Relationship between reducing power and DH of the hydrolysates prepared from GEYP.

Moure *et al.* (2006) 證實胜肽之大小及含量影響還原力，小胜肽能提供較強的還原力。

然而 Alcalase 的還原力比 Flavourzyme 高，此可能的原因為 Alcalase 切出較多能夠供質子或電子的胜肽，故 Alcalase 較 Flavourzyme 高的還原力。而 Mix 之水解物兼具有兩種酵素之特性，Chang *et al.* (2007) 利用 Alcalase、Flavourzyme 以及兩種酵素兩階段水解豬血紅蛋白，發現兩種酵素比單一酵素水解所得水解物之還原力要來得高。因此使用的酵素種類不同，其還原力之表現有所差異。

#### 4. 清除氫氧自由基能力之比較

圖十九為水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物氫氧自由基清除能力之影響，結果顯示 Alcalase 水解 0 至 8 h 所得水解液之清除氫氧自由基的能力逐漸上升，由 4.51% 增加至 29.76%，而 8 h 之後無明顯的變化。Flavourzyme 隨著水解時間增加 (0 至 12 h) 其水解物清除氫氧自由基的能力顯著地由 7.33 % 上升至 34.74 %。至於 Mix 在 0 至 4 h 所得水解物之清除氫氧自由基的能力顯著地增加 30 %，4 h 之後繼續水解其清除能力則無顯著差異 ( $p>0.05$ )。整體而言，GEYP 經三組酵素水解後，皆有提升氫氧自由基清除能力，而以 MH12h 與 Flavourzyme 水解 12 h 有最佳的清除能力達 35%。已有文獻指出由牡蠣蛋白質水解



圖十九、水解時間及酵素種類對 GEYP 水解物氫氧自由基清除能力之影響。

Fig. 19. Effect of Hydrolysis time and enzymes on hydroxyl radical scavenging activity of the hydrolysates prepared from goose egg yolk protein. The hydrolysis of 8 %GEYP with 7.5 % enzyme [Alcalase, Flavourzyme, and Mix (Alcalase:Flavourzyme=1:1)] for 12 h at 50°C. The initial pH of Alcalase, Flavourzyme, and Mix respectively are 8.5, 7.0, and 8.5. Data are mean values  $\pm$  SD of triplicates. <sup>A-E</sup> Means with different letters in the same enzyme are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. <sup>a-c</sup> Means with different letters in the same time are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

物中分離出較佳的清除氫氧自由基的胜肽片段，其推測原因為 Leu 可增進胜肽與脂肪酸之間的交互作用 (Qian *et al.*, 2008 b)。除了 Leucine 的含量之外，胜肽序列非常重要，Leu 在 C-端的胜肽片段，具有較強的自由基清除能力 (Suetsuna *et al.*, 2000)，因此各酵素水解 GEYP 之水解液清除氫氧自由基的能力有所差異，可能與胺基酸的組成有關。

此外已有報告指出蛋白質水解物清除氫氧自由基的作用可藉由水解液中胜肽螯合亞鐵離子，使 fenton reaction 無法進行，進而抑制氫氧自由基生成 (Peng *et al.*, 2009; Kong & Xiong, 2006)，由圖十五可知 GEYP 水解物的亞鐵離子螯合能力，隨著水解時間愈長而提高；自由基清除能力的趨勢與之相近。GEYP 水解液可能是藉由螯合亞鐵離子達到抑制氫氧自由基的形成的原因之一。

綜合上述四種抗氧化力分析結果，MH12h 有最佳的 DPPH 自由基清除能力、亞鐵離子螯合能力、還原力與氫氧自由基清除能力，因此選擇 MH12h 進行不同 MWCO 濾膜的區分，依序使用 30 k、10 k、1k 與 0.15 kDa MWCO 濾膜過濾，分為 30 kDa concentrate、10 kDa concentrate、1 kDa concentrate、0.15 kDa concentrate 和 0.15 kDa permeate 五個區分物，之後再調整各區分物於相同的濃度，探討不同分子量區分物對抗氧化力的影響。

#### 四、探討 MH12h 經不同分子量限值區分所得之區分物對抗氧化力的影響

##### (一) GEYP、MH12h 及其區分物之分子量分佈

表五為 GEYP、MH12h 及其膜區分物之分子量分佈。分子量分佈測定是在 HPLC 系統下以分子篩管柱進行分析，樣品的濃度為 2 mg / ml 水解物。以 Cytochrome C (12,500 Da)、Aprotonin (6,512 Da)、Vitamin B<sub>12</sub> (1,355 Da)、(Gly)<sub>3</sub> (189 Da)與 Gly (75 Da) 五種標準品的分子量與滯留時間做線性回歸，將分子量分為 >6,000 Da、1,000-6,000、500-1,000 與 <500 Da 之區間，結果顯示 GEYP 主要的分子量為 >6,000 Da，占總胜肽的 86.88%，以混合酵素水解 12 h 後，由於大分子的蛋白質或胜肽被酵素分解為小胜肽或胺基酸，因此 >6,000 Da 的蛋白質或胜肽之百分比減少至 2.42%，其主要分子量分佈為 500-1,000 Da 與 <500 Da 小胜肽或胺基酸百分比增加，分別占總胜肽百分比為 51.74 %和 44.61 %。MH12h 以連續式超濾膜過濾系統區分，依序連續使用四種不同分子量限值濾膜過濾，結果顯示 30 kDa 濃縮液主要分子量分佈於 500-1,000 Da 與 <500 Da，占總胜肽的百分比分別各約占 40%。10 kDa 濃縮液主要分子量分佈為 < 1,000 Da，占總胜肽之百分比分別為 39.99 %與 38.33 %。1 kDa 濃縮液分子量主要以 500-1,000 Da 為主，約佔

表五、 GEYP、MH12h 及其膜區分物之分子量分佈

Table 5. Molecular weight distribution of the GEYP、MH12h and fractions of MH12h separated with different MWCO membranes

Sample <sup>1</sup>	Molecular weight distribution (%)			
	<500 Da	500-1,000 Da	1,000-6,000 Da	>6,000 Da
GEYP	9.66	2.65	0.80	86.88
MH12h	44.61	51.74	1.24	2.42
30 kDa concentrate	41.31	40.00	4.52	14.17
10 kDa concentrate	38.33	39.99	13.13	8.55
1 kDa concentrate	23.98	52.17	19.67	4.18
0.15 kDa concentrate	60.53	39.44	0.03	0.00
0.15 kDa permeate	63.68	36.24	0.01	0.07

<sup>1</sup> The concentration of sample was 2 mg /ml dry sample.

52.17%。而 0.15 kDa 濃縮液與濾液皆以 < 500 Da 之小分子為主，約占 60% 以上。由上述結果可知隨著濾膜 MWCO 愈小，<1000 Da 之小分子占的比例隨之增加其小胜肽也隨之增加。因此隨著超濾膜限值愈小 <1,000Da 之分子分佈占的比例愈高。0.15 kDa 之濃縮液與濾液之分子量分佈相似，表示 1 kDa 濾液之分子皆可通過 0.15 kDa MWCO 濾膜，其所收集的濾液與濃縮液之分子量分佈並無差異。

## (二) MH12h 區分物之還原力、金屬螯合力、氫氧自由基與 DPPH 自由基清除能力

表六為 MH12h 經不同分子量限制濾膜區分對其還原力、螯合力、氫氧自由基和 DPPH 自由基清除能力之影響。除了測定亞鐵離子螯合力水解物濃度為 2.5 mg/ml 之外，其餘三種測定方法其所有水解物之濃度皆為 40 mg/ml。結果顯示 30 kDa 濃縮液具有最高的 DPPH 自由基清除能力，由 MH12h 的 65.15% 提升為 98.01%，此外 30 kDa 濃縮液亦具有最佳的亞鐵離子螯合力為 98%。1 kDa 濃縮液之氫氧自由基清除能力與還原力比 MH12h 分別增加約 1.2 倍與 1.6 倍，因此 MH12h 經超濾膜系統區分後，確實可提升抗氧化力。

30 kDa 濃縮液具有最高的 DPPH 自由基清除能力與亞鐵離子螯合力，對照表五之區分物的分子量分佈，其主要的分子量分佈為 <1,000

表六、MH12h 經不同分子量限制濾膜區分對其還原力、螯合力、氫氧自由基和 DPPH 自由基清除能力之影響

Table 6. Reducing power, chelating activity, hydroxyl and DPPH radical scavenging activity of different fractions of MH12h with different molecular weight cut-off membranes

Sample	Reducing power <sup>1,2</sup>	Chelating activity (%) <sup>1,3</sup>	OH-scavenging activity (%) <sup>1,2</sup>	DPPH radical scavenging activity (%) <sup>1,2</sup>
MH12h	0.47±0.01 <sup>c</sup>	70.50±2.95 <sup>c</sup>	46.4±0.09 <sup>d</sup>	65.15±2.86 <sup>b</sup>
30 kDa concentrate	0.17±0.03 <sup>d</sup>	98.49±0.30 <sup>a</sup>	33.67±0.37 <sup>e</sup>	98.93±0.18 <sup>a</sup>
10 kDa concentrate	0.62±0.01 <sup>b</sup>	86.74±0.60 <sup>b</sup>	51.1±0.68 <sup>b</sup>	11.75±1.45 <sup>c</sup>
1 kDa concentrate	0.79±0.02 <sup>a</sup>	39.98±6.55 <sup>d</sup>	54.04±1.57 <sup>a</sup>	12.23±1.04 <sup>c</sup>
0.15 kDa concentrate	0.62±0.02 <sup>b</sup>	8.57±1.08 <sup>e</sup>	49.3±0.69 <sup>bc</sup>	14.85±0.67 <sup>c</sup>
0.15 kDa permeate	0.64±0.01 <sup>b</sup>	5.61±3.17 <sup>e</sup>	48.75±1.29 <sup>c</sup>	14.22±0.04 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Data are the mean ± SD of triplicates. <sup>a-c</sup> Means in the same row with different superscript letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

<sup>2</sup>The concentration of each fraction was 40 mg/ml dry sample in the same column.

<sup>3</sup>The concentration of each fraction was 2.5 mg/ml dry sample in the same column.

Da，約占 81%，推測此分子量之胜肽能夠提供 30 kDa 濃縮液最佳的 DPPH 自由基清除能力與亞鐵離子螯合力。Dong *et al.* (2008) 指出以 Alcalase 與 Flavourzyme 分別水解竹葉鱧魚，其分別所得水解物之分子量主要以 <1,000 Da 具有良好的亞鐵離子螯合力。

在具有最高的氫氧自由基與還原力的 1 kDa 濃縮液，其分子量分佈主要為 500-1,000 Da (52.17%) 與 <500 Da (23.98%)，而與主要分子量為 <500 Da 的其它區分物比較，其並未表現出最佳的氫氧自由基清除能力與還原力，因此推測 500-1,000 Da 之混合胜肽主要提供最佳的清除氫氧自由基能力與還原力。具已報告指出鷹嘴豆 (chickpea) 蛋白質水解物，以 200-3,000Da 範圍的小分子具有較強的清除氫氧自由基能力與還原力，此結果與本試驗之結果相符 (Li *et al.*, 2008)。

Chen *et al.* (1998) 根據大豆蛋白之水解物設計出不同的胜肽大小及胺基酸組成的 His 胜肽片段，含有 His 的胜肽具有清除 DPPH 自由基能力、金屬螯合力與氫氧自由基清除能力，然而其抗氧化力會受到胜肽的大小與組成的影響，。本實驗之結果發現在 30 kDa 濃縮液、1 kDa 濃縮液之分子量分佈主要皆小於 1,000 Da，但其抗氧化力之表現有所差異。此差異可能與其區分物之胺基酸組成有關。因此將 30 kDa 與 1 kDa 之濃縮液進行胺基酸之組成分析，探討胺基酸之組成對於金

屬螯合力、還原力、DPPH 自由基及氫氧自由基清除能力之影響。

### (三) GEYP 最具抗氧化力區分物之胺基酸組成

表七為 GEYP、MH12h 及其濾膜 30 kDa 濃縮液和 1 kDa 濃縮液之胺基酸組成。由於使用酸水解法來測定胺基酸組成，Trp 會被濃鹽酸破壞，而無法被偵測，Gln 與 Asn 在酸水解下分別轉變為 Glu 與 Asp 的形式，無法單獨測出 Glu 或 Asp 的相對百分比，因此不探討這些胺基酸。結果顯示未水解的 GEYP 與 MH12h，大部分胺基酸組成百分比並無太大差異 ( $p > 0.05$ )，除了 Arg、Ala、Met、Ile、Leu 和 Phe 等胺基酸於水解後可顯著增加 ( $p < 0.05$ )，尤以 Leu 增加最多為 2.57%。30 kDa 濃縮液的胺基酸組成百分比比較 MH12h 與 1 kDa 濃縮液具有較高的 Ser 與 Tyr，各占 11.71% 與 4.38%。1 kDa 濃縮液中 Pro 含量顯著高於其它三者。

蛋白質水解物的抗氧化性受到胺基酸的序列及組成的影響很大 (Chen *et al.*, 1998)。未水解的 GEYP 經 Mix 水解 12h 所得 MH12h 之胺基酸組成以 Arg、Ala、Met、Ile、Leu 和 Phe 等胺基酸顯著比未水解的 GEYP 高，已知具有清除自由基之能力的胜肽中含有 Ile、Ala、Met

表七、GEYP、MH12h、30 kDa 與 1 kDa 濃縮液的胺基酸組成  
 Table 7. Amino acid composition of GEYP, MH12h, 30 kDa and 1 kDa concentrate

	Amino acid composition (%)			
	GEYP <sup>1,4</sup>	MH12h <sup>1,5</sup>	30 kDa concentrate <sup>1,6</sup>	1 kDa concentrate <sup>1,7</sup>
Asp <sup>2</sup>	9.35±1.16 <sup>a</sup>	8.44±0.02 <sup>a</sup>	7.55±1.99 <sup>a</sup>	9.91±0.05 <sup>a</sup>
Glu <sup>3</sup>	9.60±0.77 <sup>b</sup>	9.46±0.45 <sup>b</sup>	8.89±0.33 <sup>b</sup>	11.65±0.02 <sup>a</sup>
Ser	9.04±0.97 <sup>b</sup>	9.04±0.23 <sup>b</sup>	11.71±0.33 <sup>a</sup>	7.71±0.06 <sup>b</sup>
Thr	5.5±0.23 <sup>a</sup>	6.81±1.43 <sup>a</sup>	5.64±0.02 <sup>a</sup>	5.53±0.17 <sup>a</sup>
Gly	6.74±1.07 <sup>a</sup>	6.12±0.08 <sup>a</sup>	6.34±0.04 <sup>a</sup>	6.19±0.05 <sup>a</sup>
Arg	3.18±0.19 <sup>c</sup>	4.49±0.07 <sup>b</sup>	4.88±0.10 <sup>a</sup>	4.75±0.06 <sup>ab</sup>
Ala	8.12±0.79 <sup>b</sup>	9.41±0.04 <sup>a</sup>	9.09±0.33 <sup>ab</sup>	9.29±0.11 <sup>ab</sup>
Pro	5.33±0.73 <sup>b</sup>	5.58±0.06 <sup>b</sup>	5.97±0.11 <sup>b</sup>	7.1±0.30 <sup>a</sup>
Val	11.93±5.34 <sup>a</sup>	6.10±1.41 <sup>a</sup>	4.66±0.13 <sup>a</sup>	5.55±1.34 <sup>a</sup>
Met	1.35±0.15 <sup>b</sup>	2.05±0.17 <sup>a</sup>	1.78±0.12 <sup>a</sup>	1.7±0.05 <sup>ab</sup>
Ile	2.04±0.35 <sup>c</sup>	3.82±0.15 <sup>a</sup>	3.05±0.21 <sup>b</sup>	3.09±0.17 <sup>b</sup>
Leu	4.49±0.12 <sup>d</sup>	7.06±0.15 <sup>a</sup>	6.13±0.01 <sup>b</sup>	5.77±0.08 <sup>c</sup>
Phe	2.46±0.13 <sup>c</sup>	3.25±0.10 <sup>a</sup>	3.34±0.07 <sup>a</sup>	2.77±0.08 <sup>b</sup>
Cys	1.84±0.29 <sup>a</sup>	1.15±0.01 <sup>b</sup>	1.05±0.17 <sup>b</sup>	1.47±0.13 <sup>ab</sup>
Lys	12.96±0.47 <sup>a</sup>	12.44±0.74 <sup>a</sup>	11.89±0.84 <sup>a</sup>	12.95±0.04 <sup>a</sup>
His	4.05±0.13 <sup>a</sup>	3.47±0.26 <sup>bc</sup>	3.65±0.10 <sup>ab</sup>	3.04±0.13 <sup>c</sup>
Tyr	2.00±0.27 <sup>b</sup>	1.32±0.19 <sup>b</sup>	4.38±0.88 <sup>a</sup>	1.49±0.15 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Data are the mean ± SD of triplicates. a-d Means in the same row with different superscript letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

<sup>2</sup> Asp content included asparagine.

<sup>3</sup> Glu content included glutamine.

<sup>4</sup> The supernant of goose egg yolk protein solution .

<sup>5</sup> Hydrolysates obtained from goose egg yolk protein by mix enzyme for 12h (MH12h).

<sup>6</sup> 30 kDa concentrate of MH12h.

<sup>7</sup> 1 kDa concentrate of MH12h.

(Chen *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001; Mendis *et al.*, 2005); 含硫胺基酸 Met 容易受自由基的攻擊，藉由自我氧化達到清除自由基的目的 (Elias *et al.*, 2008; Nakao *et al.*, 2003)。Qian *et al.* (2008 b) 指出牡蠣蛋白水解物中，最具清除氫氧自由基能力的胜肽含有高量的 Leu，推測 Leu 可增加胜肽與脂肪酸之間的交互作用。此外 Leu 在胜肽序列上的 N 端位置被認為對於抗氧化性是重要的 (Chen *et al.*, 1995; Ranathung *et al.*, 2006)。雞蛋黃蛋白質水解物所純化出具有較佳抗氧化性的兩個胜肽片段，其 N-端均為 Leu (Park *et al.*, 2001)。含苯環的胺基酸 (Phe) 藉由將電子轉移至苯環上共振結構維持抗氧化的安定性 (Bougatef *et al.*, 2009)，因此這些胺基酸含量的增加，提供 MH12h 較 GEYP 有較強的抗氧化力。

Bougatef *et al.* (2009) 指出南極星鯊 (smooth hound) 蛋白質水解物中，純化清除 DPPH 自由基能力最佳的區分物也富含 Tyr (23.27%)，含苯環的胺基酸 Tyr 藉由提供氫或電子給不成對電子的 DPPH 自由基，使 DPPH 自由基穩定，而胺基酸上苯環的共振結構可維持抗氧化的安定性，Elias *et al.* (2008) 指出 Tyr 受到氫氧自由基攻擊或單一電子的氧化，產生 3, 4-dihydroxy-phenylalanine 安定的產物，30 kDa 濃縮液中 Tyr 含量增加可能提供較高的 DPPH 自由基清除能力。30 kDa

濃縮液中，Ser 含量有顯著增加，已有文獻指出磷酸絲胺酸 (Phosphoserine)、Glu、His 和 Cys 均與提供金屬螯合能力有關 (Baumy and Brule, 1988; Bennet *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2000)。Kim *et al.* (2007) 指出將酪蛋白經酵素水解後，可釋放出較多的酪蛋白磷胜肽具有較強的金屬螯合能力，是以 phosphoserine 的形式進行螯合作用。由於蛋黃中磷與 Ser 形成酯鍵存在於蛋白質中形成所謂的磷蛋白 (張，1986)，經由蛋白酶水解作用後，磷酸根可能以 phosphoserine 存在於胜肽中，而直接將亞鐵離子螯合，使得 30 kDa 濃縮液有最高的金屬螯合力。

至於氫氧自由基清除能力與還原力最佳的 1 kDa 濃縮液，可能因其 Pro 含量比其它三者高。有學者根據大豆蛋白質水解之抗氧化性胜肽片段，設計出具有抗氧化性的合成胜肽，其片段為 His-Pro-Pro，當 Pro 被其它的胺基酸取代時，其片段的抗氧化力減弱 (Chen *et al.*, 1996)。Pro 抗氧化之原理已有學者提出胜肽中的 Pro 受到氫氧自由基的攻擊時，會氧化成 2-pyrroildone 較安定的產物，達到清除氫氧自由基的目的 (Stadtman, 2004)。因此推測 1 kDa 濃縮液具有較強的氫氧自由基與還原力主要與 Pro 含量有關。

## 伍、結論

本試驗利用 Alcalase、Flavourzyme 以及 Alcalase 與 Flavourzyme 以 1:1 比例混合之酵素 (Mix)，分別對 GEYP 進行水解，在 50°C，pH 值分別為 8.5 和 7.0 篩選水解較適合的條件，以 Alcalase 及 Flavourzyme 在基質濃度為 8 %，酵素濃度為 7.5 % 時較適合兩種酵素進行水解反應。因此三種酵素以上述之條件進行反應，探討酵素種類和水解時間對 GEYP 水解物之水解率、產率與抗氧化功能之影響。

在產率與水解率方面，三組酵素隨著水解時間增加，其水解物之產率與水解率均提升，其中以 Mix 水解 12 h 之水解物 (MH12h) 皆為最高。在抗氧化性方面，又以 MH12h 有最佳的 DPPH 自由基清除、亞鐵離子螯合能力、還原力與氫氧自由基清除能力。因此將 MH12h 進行超濾膜過濾，區分後分子量主要以 <1,000Da 混合胜肽之抗氧化力具有提升，此外，Tyr、Pro 與磷酸化 Ser 之胺基酸組成含量有顯著增加，推測這些胺基酸含量增加與抗氧化力之提升有關。

具有良好的抗氧化力 MH12h，未來具有開發成為天然抗氧化物質應用於食品系統中之潛力，進而提升未受精鵝蛋的利用價值。然而為避免 MH12h 添加於食品系統中影響食品的外觀與質地組成，其功能特性仍需待進一步的探討。

## 陸、參考文獻

- 五十嵐脩、金田尚志、福場博保、美濃真，1986。過氧化脂質與營養。光生館。東京。
- 王錦盟、王勝德、邱作相、吳國欽、葉力子、陳立人，2002。籠飼白羅曼鵝之產蛋模式。中國畜牧學會會誌，31 (1): 13-18。
- 王勝德，2000。利用光照調節種母鵝產蛋期。畜產專訊第三十一期。行政院農業委員會畜產試驗所編印。
- 王勝德、吳國欽、邱作相、陳振台、葉力子，1996。八十四年度種鵝資訊調查。臺灣農業 32：(5)82~88。
- 李舜榮、吳國欽，2004。鵝品種介紹。鵝飼養管理手冊。p.4-9。台南縣。
- 吳珊儀、郭俊欽、蔡正宗，2002。利用改進高效液相層析法分析生鮮及加熱豬肉及禽肉肌肽與甲肌肽之含量。台灣農業化學與食品科學，40，470-479。
- 林慶文，1983。蛋之化學與利用。華香園出版社，台北市。p.1-6, 16-48, 273-274, 355-359。
- 邱作相、洪典戊、戴謙，1989。鵝隻各品種產蛋性能之選育。畜產評議會試驗研究工作報告。

- 孫慧吟，2009。酵素種類、水解時間及胜肽分子量大小對脫脂鴨胸肉水解物抗氧化性之影響。東海大學食品科學系碩士論文。p.109-111。
- 陳明造，2006。蛋品加工理論與應用第二版。p.77-96;323-331;472-491。藝軒圖書出版社。
- 葉力子，1998。種母鵝產蛋性能改良。台灣省畜產試驗所四十年所慶家禽遺傳育種研討會論文集。
- 張為憲，1995。食品化學。p.338-339。華香園出版社印行。
- 張為憲、李敏雄、呂政義、張永和、陳昭雄、孫璐西、陳怡宏、張基郁、顏國欽、林志城、林慶文，1995。食品化學。p.89-91。國立編譯館主編。華香園出版社印行。
- 張勝善，1986。蛋品加工學。國立編譯館。p.79-138; 105-128。華香園出版社。
- 張勝善，1992。蛋品加工學 (第二版)。p.80-102; 153-155。國立編譯館。華香園出版社。
- 遠藤 剛，淺田浩二，1992。活性酸素在生物中之生存、消去、作用。食品工業。5月30日，20-25。
- 賈玉祥、粘碧珠，2006。鵝產業新思維：1.牧草養鵝。畜產專訊第五十

八期。行政院農業委員會畜產試驗所編印。

蔡佩潔，2009。烏骨雞爪酵素水解物 in vitro 抗氧化及細胞光保護特性之探討。中興大學動物科學系碩士論文。p.22-23。

鄭富元、柳育澤、萬添春、陳志銘、林亮全，2007。酵素水解雞腿骨蛋白製備活性胜肽之研究II：抗氧化性分析。台灣農業化學與食品科學，45 (2) :84-90。

賴育玫，2008。利用膜反應系統連續生產小分子明膠水解物之研究碩士論文。p.36-38。

賴銘癸、胡見龍、葉力子。1996。光照週期對母鵝產蛋之影響。畜產研究。29(2)：129-135。

歐修汶，2003。白羅曼種鵝繁殖期調節應用之研究。屏東科技大學畜產系碩士論文。

Adler-Nissen, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, New York. pp.171-173.

Anfinsen, C.B., and Scheraga, H.A. (1975). Experimental and theoretical aspects of aspects of protein folding. *Adv. Prot. Chem.*, 29, 205-300.

A.O.A.C. (1995). Official methods of analysis (16<sup>th</sup> ed). Association of Analytical Chemist., Washington, USA.

Aspmo, S. I., Horn, S. J., and Eijsink, V. G. H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) viscera. *Process*

*Biochem.*, 40, 1957-1966.

Aunstrup, K. (1980). Proteinases. In: Microbial enzymes and bioconversions (Ros, A.H., ed.), Academic Press, London, pp. 49-114.

Bando, N., hayashi, H., Wakamatsu, S., Inakuma, T., Miyoshi, M., Nagao, A., Yamauchi, R., Terao, J. (2004). Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a- induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary  $\beta$ -carotene: an ex vivo study. *Free Radic. Biol. Med.*, 37, 1854-1863.

Baomy, J.J., and Brule, G. (1988). Effect of pH and ionic strength on the binding of bivalent cations to b-casein. *Lait.*, 68, 409-418.

Bennet, T., Desmond, A., Harrington, M., McDonagh, D., FitzGerald, R., and Flynn, A. (2000). The effect of high intakes of casein and casein phosphopeptide on calcium absorption in the rat. *British J. Nutr.*, 83, 673-680.

Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., and Lalitha, R.G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresour. Technol.*, 99, 335–343.

Björnhag, G. (1979). Growth in newly hatched birds. Swedish Journal of Agricultural Research, 9, 121-125.

Blair, I.A. (2001). Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Exp. Gero.* 36, 1473-1481.

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoud, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M.

- (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.*, 114, 1198-1205.
- Branen, A.C. (1975). Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59-63.
- Cacciuttolo, M.A., Trinh, L., Lumpkin, J.A., Rao, G., 1993. Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 267-276.
- Cantrell, A., McGravey, D.J., Truscott, T.G., Rancan, F., Böhm, F. (2003). Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Arch. Biochem. Biophys.*, 412, 47-54.
- Chang, C.Y., Wu, K.C., and Chiang, S.H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chem.*, 100, 1537-1543.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., and Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agri. Food Chem.*, 44, 2619-2623.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., and Nokihara, K and Nokihara, K. (1998). Antioxidant properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agri. Food Chem.*, 46, 49-53.
- Chen, P.S., Toribara, Jr.T.Y., and Warner, H. (1956). Assay of inorganic

- phosphate, total phosphate and phosphatase. *Anal. Chem.*, 28, 1756.
- Chen, Y.R., Gunther, M.R., Mason, R.P. (1999). Ant electron spin resonance spin-trapping investigation of the free radicals formed by the reaction of mitochondrial cytochrome c oxidase with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, 274, 3308-3314.
- Chiang, W.D., Tsou, M.J. and Chu, Y.H. (1999). Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chem.*, 65, 189-194.
- Chung, S. L., and Ferrier, L. K. (1991). Partial lipid extraction of egg yolk powder: effects on emulsifying properties and soluble protein fraction. *J. Food Sci.*, 56, 5 1255-1258.
- Cook, N.C., and Samman, S. (1996). Flavonoid: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7, 66-76.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., and Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem.*, 109, 144-148.
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., and López-Fandiño R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J. Food Prot.*, 67(9), 1939-44.
- Davies, M.J. and Hawkins C. L. (2004). Serial Review: Protein Radicals in Biological Systems—ESR Spin Trapping and Immuno Spin Trapping Approaches. *Free Radic. Biol. Med.*, 36, 9, 1072 – 1086.
- Decker, E.A., and Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation

- catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 674-677.
- Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem.*, 107, 1485-1493.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., and Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 48, 430-441.
- Ferrari, C.K. and Torres, E.A. (2003). Biochemical pharmacology of functional food and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed. Pharmacother.*, 57, 251-260.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., and Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem.* 100, 1511-1516.
- Fruton, J.S. (1976a). The mechanism of the catalytic action of pepsin and related acid proteinase. *Adv. Enzymol.*, 44,1-36.
- Fujisawa, S., Kadoma, Y., and Yokoe, I. (2004). Radical-scavenging activity of butylated hydroxytoluene (BHT) and its metabolites. *Chem. Phys. Lipids*, 130, 189-195.
- Garner, B., Waldeck, A.R., Witting, P.K., Rey, K.A., and Stocker, R. (1998). Oxidation of high density liproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins A I and A II. *J. Biol. Chem.*, 273, 6088-6095.
- Gilbert, A.B., Ed Bell, D.J., and Freeman, B.M. (1971). in Physiology and

- Biochemistry of Domestic fowl, *Academic press*, p.1291.
- Gildberd, A., Hermes, J.E., and Orejana, F.M. (1984). Acceleration of autolysis during fish source fermentation by adding acid and reducing the salt content. *J. food sci. and agric.*, 35, 1363-1369.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., and Gómez-Guillén, M.C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chem.*, 114, 976-983.
- Gordon, M. (2001). Antioxidants and food stability. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. Gordone (Eds), *Antioxidant in Food*. pp. 7-21. New York, USA: CRC press.
- Gorkum, R.V. and Bouwman, E. (2005). The oxidative drying of alkyd paint catalysed by metal complexes. *Coord. Chem. Rev.*, 249, 1709-1728.
- Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., and Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *J. Mol. Catal. B., Enzym.*, 11, 1051–1059.
- Gunther, M.R., Peter, J.A., and Sivaneri, M.K. (2002). Histidinyl radical formation in the self-peroxidation reaction of bovine copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 277, 9160-9166.
- Gutteridge, J. M. (1993). Anthracycline toxicity, iron and oxygen radicals, and chelation therapy. *J. Lab Clin. Med.*, 122, 228-229.
- Halliwell, B. (1993). The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, 23, 118.

- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet*, 344, 721-723.
- Haurowitz, F., Tunca, M., Scherin, P., and Göksu, V. (1945). The action of trypsin on native and denatured proteins. *J. Biol. Chem.*, 157, 621-625.
- Hawkins, C.L. and Davies, M.J. (1998). Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.*, 332, 617-625.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., and Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 588-593.
- Hoyle, N., and Merritt, J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.*, 59 (1), 76-79.
- Jao, C.L. and Ko, W.C., (2002). 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from Tuna cooking juice. *Fish. Sci.*, 68, 430-435.
- Karnovsky, M.J. (1994). Cytochemistry and related oxygen species: a retrospective. *Histochemie*, 102, 15-27.
- Kang, H. G., Jeong, S.H., Cho, J.K., Kim, D.G., Park, J.M., and Cho, M.H. (2005). Evaluation of estrogenic activity of butylated hydroxyanisole in immature females and castrated rats. *Toxicology*, 213, 147-156.
- Kawabata C, Komai T, Gocho S. Elimination of bitterness of bitter peptides by squid liver carboxypeptidase. (1996). *Biotechnology for*

- improved foods and flavors. ACS Symp Ser 637. Washington (DC): American Chemical Society, pp. 167–72.
- Kelman, D.J., Degray, J.A., and Mason, R.P. (1994). Reaction of myoglobin with hydrogen peroxide forms a peroxy radical which oxidizes substrates. *J. Biol. Chem.*, 269, 7458-7463.
- Kim, G.N., Jang, H.D., and Kim, C.I. (2007). Antioxidant capacity of caseinophosphopeptides prepared from sodium caseinate using Alcalase. *Food Chem.*, 104, 1359-1365.
- Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, H.G., Nam, K.S., Joo, D.S., and Shahidi, F. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska Pollack skin. *J. Agric. and Food Chem.*, 49, 1984-1989.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., and Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.*, 107, 1317-1327.
- Knecht, R. and Chang, J.Y. (1986). Liquid chromatographic determination of amino acids after gas-phase hydrolysis and derivatization with (dimethylamino) azobenzenesulfonyl chloride. *Anal. Chem.*, 58, 2375-2379.
- Kong, B.H., and Xiong, Y.L. (2003). Antioxidant activity of zein hydrolysates in liposome system and the possible mode of actions. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6059-6068.
- Kong, X., Zhou, H., and Hua, Y. (2008). Preparation and antioxidant

- activity of wheat gluten hydrolysates (WGHs) using ultrafiltration membranes. *J. Sci. Food Agric.*, 88, 920-926.
- Lahl, W.J. and Brum, S.D. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.*, 48, 68-71.
- Larsen, J. E., and Froning, G. W. (1981). Extraction and processing of various components from egg yolk. *Poultry Sci.*, 60, 160–164.
- Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochem.*, 27, 969-978.
- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., and Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chem.*, 106, 444-450.
- Li, Z. Y., Youravong, W., and H-Kittikun, A. (2010). Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: A comparative study with commercial proteases. *Food Sci. Technol.* 43, 166-172.
- Lin, J.-K. and Wang, C.-H. (1980). Determination of Urinary Amino Acids by Liquid Chromatography with Dabsyl Chloride. *Clin. Chem.* 26, 579-583.
- Linderstrøm-Lang, K. (1939). Proteolytic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 8, 37-58.
- Linderstrøm-Lang, K. (1952). Proteins and enzymes. III. The initial stages in the breakdown of proteins by enzymes. Lane medical lectures, Stanford University Press, California. Vol. VI, pp. 52-53.

- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L. and Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chem.* 118, 403-410.
- Lu, C.L., and Baker, R.C. (1986). Characteristic of egg yolk phosvitin as an antioxidant for inhibiting metal-catalyzed phospholipids oxidations. *Poult. Sci.*, 65, 2065-2070.
- Lu, C.L., and Baker, R.C. (1987). Effect of pH and food ingredients on the stability egg yolk phospholipids and the metal-chelator antioxidant activity of phosvitin. *J. Food Sci.*, 52, 613-616.
- Mahmoud, M.I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.*, 48, 89-95.
- Manley, C.H. and Ahmedi, S. (1995). The development of process flavors *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 46-51.
- Mecham, D.K. and Olcott, H.S. (1949). *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 3670.
- Martin, W.G., Vandegaer, J.E. and Cook, W.H. (1957). Fractionation of livetin and the molecular weights of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -components. *Can. J. Biochem. Physiol.* 35, 241-250.
- Marcuse, R. (1962). The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 39, 2, 97-103.
- McCord, J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 108, 652-659.

- Mendis, E., Rajapakse, N., Bun, H.G., and Kim, S.K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus giga*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effect. *Life Sciences.*, 77, 2166-2178.
- Menezes, S.L.D., and Augusto, O. (2001). EPR detection of glutathionyl and protein-tyrosyl radicals during the interaction of peroxynitrite with macrophages (J774). *J. Biol. Chem.*, 276, 39879-39884.
- Moskovitz, J., Yim, M.B., and Chock, P.B. (2002) Free radicals and disease. *Arch. Biochem. Biophys.*, 397(2), 354-359.
- Moure, A., Dominguez, H., and Parajo, J.C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochem.*, 41, 447-456.
- Murase, H., Nagao, A., and Terao, J. (1993). Antioxidant and mulsifying activity of N-(long-chain-acyl) histidine and N-(long-chain-acyl) arnosine. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1601-1604.
- Mutilangi, W.A.M., Panyam, D., and Kirara A. (1995). Hydrolysates from Proteolysis of Heat-denatured Whey Proteins. 60, 5, 1104-1109.
- Nakadai, T., Nansuno, S. and Iguchi, N. (1972). The action of peptidase from *Aspergillus oryzae* in digestion of soybean protein. *Agric. Boil. Chem.*, 36, 261.
- Nakao, L. S., Iwai, L.K., Kalil, J. and Augusto, O. (2003). Radical production from free and peptide-bond methionine sulfoxide oxidation by peroxynitrite and hydrogen peroxide/iron (II). *FEBS letters.* 547, 87-91.

- Namiki, M. (1990). Antioxidants/antimutagens in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 29, 281-300.
- Niki, E., Yhmamoto, Y., Komuro, E., and Sato, K. (1991). Membrane damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 201-205.
- Novo Industri A/C (1980c). Alcalase 0.6L. B-207, Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Denmark.
- Papas, A.M. (1999). Diet and antioxidant status. *Food Chem. Toxic.*, 37, 999-1007.
- Park, P.J., Jung, W.K., Choi, Y.R., and Kim, S.K. (2000). Antioxidative Effect of Enzymatic protein hydrolysate from lecithin free egg yolk. *J. Life Sci.*, 10 (2), 131-139.
- Park, P.J., Jung, W.K., Nam, K.D., Shahidi, F., Kim, S.K. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin free egg yolk. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 651-656.
- Panzenbock, U. and Stocker, R. (2005). Formation of methionine sulfoxide containg specific forms of oxidized high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1703, 171-181.
- Peng, X., Xiong, Y.L., and Kong, B. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chem.* 113, 196-201.
- Qian, Z.J., Jung, W.k., Byun, H.G., Kim, S.K. (2008b). Free radical scavenging activity of novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catebeiana* Shaw. *Bioresour. Technol.* 99, 1690-1698.

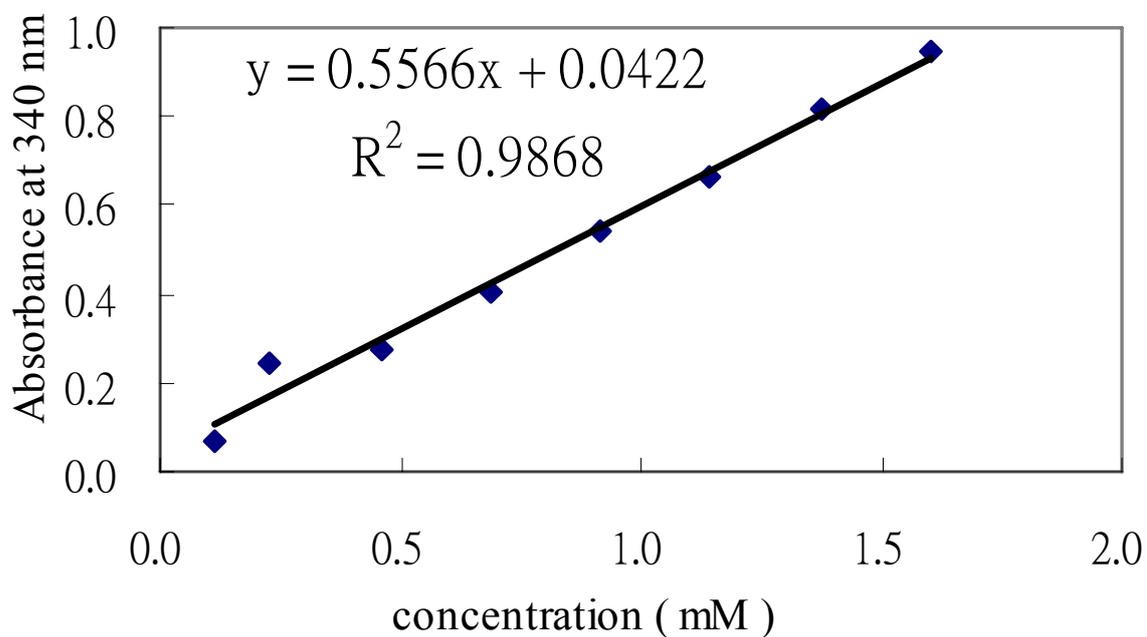
- Ranathung, S., Rajapakse, N., Kim, S.K. (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of congereel (*Conger myriaster*). *Eur. Food Res. Technol.* 222, 310-315.
- Rikans, L.E. and Hornbrook, K.R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1362, 116-127.
- Saiga, A., Tanabe, S., and Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3661-3667.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., and Juneja, L.R. (2004). Antioxidant activity of egg yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chem.*, 86, 99-103.
- Sakanaka, S. and Tachibana, Y. (2006). Active oxygen scavenging activity of egg yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chem.*, 95, 243-249.
- Shahidi, F., Han, X.Q. and Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.*, 53, 285-293.
- Sherwin, E.R. (1990). Antioxidant. In A.L.Branen, P.M. Davidson, and S. Salminen (Eds.), *Food additives* (pp. 139-193). New York, USA: Marcel Dekker.
- Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J., Ames, B.N. (1989). Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo

- oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 9697-9701.
- Sim, J.S. (1994). New extraction and fractionation method for lecithin and neutral oil from egg yolk. In J. S. Sim, and S. Nakai (Eds.), *Egg uses and processing technologies*. Wallingford, UK: CAB International. pp. 128–138.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 945-948.
- Simic, M.G. (1988). Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202, 377-386.
- Sörensen, S.P.L. (1908). Enzymstudien. I. Über die quantitative messung proteolytischer Spaltungen. ‘ Die Formoltitrierung’. *Biochem. Z.* 7, 45-101.
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., and FitzGerald, R.J. (2003). Protease and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int. Dairy J.*, 13, 447-453.
- Stadtman, E.R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1105-1112.
- Stadelman W. J. (1973). *Egg science and technology*. 豪華書局有限公司。 p. 96-97.
- Stohs, S. J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 321-336.

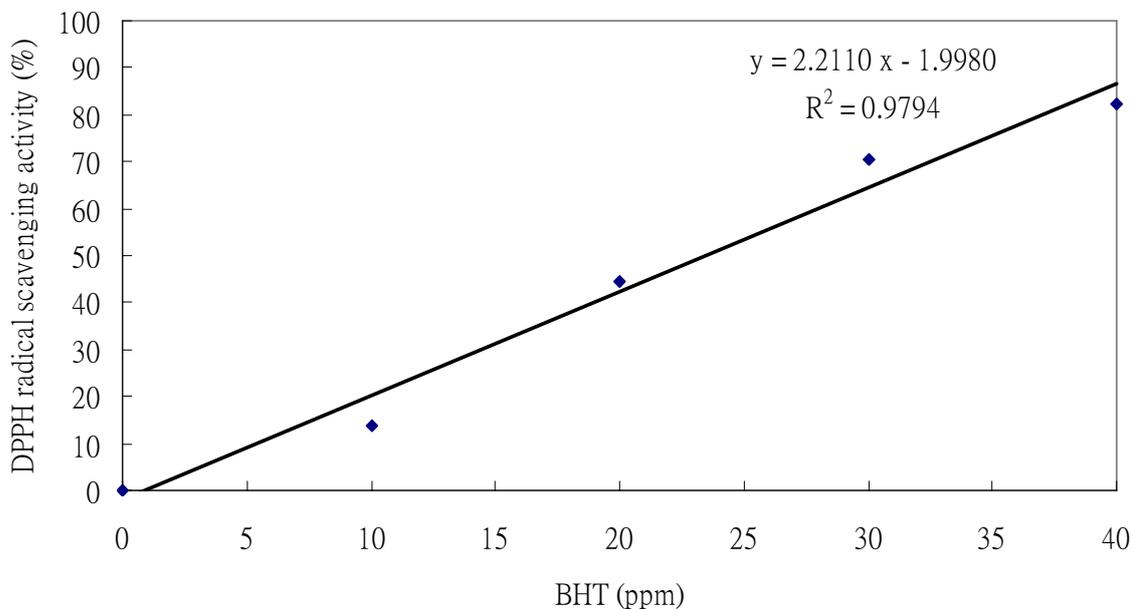
- Suetsuna, K., Ukeda, H., and Ochi H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.* 11, 128-131.
- Sugino, H., Ishikawa, M., Nitoda, T., Koketsu, M., Juneja, L.R., and Kim, M. (1997). Antioxidative activity of egg yolk phospholipids. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 551-554.
- Tai, C. (1989). Utilization and Performance of Waterfowl in the Republic of China on Taiwan, Food & Fertilizer, Technology Center Extension Bulletin No. 291. ASPAC.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., and Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *J. Food Biochem.* 31, 266-287.
- Tong, L.M., Sasaki, S., McClements, D.J., and Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 1473-1478.
- Traub, W., Piez, K.A. (1971). The chemistry and structure of collagen. *Adv. Protein Chem.*, 25, 243-352.
- Tsuge, N., Eikawa, Y., Nomura, Y., Yamamoto, M., and sugisawa, K. (1991). Antioxidative activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg-white albumin. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 65, 1635-1641.
- Tucker G. A. and Woods L.F.J. (1995). Enzymes in Food processing. 2<sup>nd</sup> p12-17. Blackie academic and professional, and imprint of Chapman and Hall, Wester Cleddens Road, Bishobriggs, Glasgow G64 2NZ.

- Vaithanomsat, P. and Punyasawon C. (2008). Process optimization for the production of *Philosamia ricini* (eri silk) papae hydrolysate. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 42, 341-352.
- Wang, J.S., Zhao, M.M., Zhao, Q.Z., and Jiang, Y.M. (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chem.*, 101, 4, 1658-1663.
- Ward, O.P. (1983). Proteinase. In: Microbial enzymes and biotechnology (Fogarty, W.M., ed.), Elsevier Applied Science Publ., London. Pp.251-317.
- Williams, G.M., McQueen, C.A., and Tong, C. (1990). Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. I. Genetic and cellular effects. *Food Chem. Toxic.*, 28, 12, 793-798.
- Wu, H.C., Chen, H.M., and Shiau, C.Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.*, 36, 949-957.
- Yagi, K. (1987). Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phy. Lipids.* 45, 337-341.
- Yamamoto, Y., Sogo, N., Iwao, R., and Miyamoto, T. (1990). Antioxidant effect of egg yolk on linoleate in emulsion. *Agric. Biol. Chem.*, 54,3099-3104.
- Yang, J.-I., Ho, H.-Y., Chu, Y.-J., and Chow, C.-J. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chem.*, 110, 128-136.

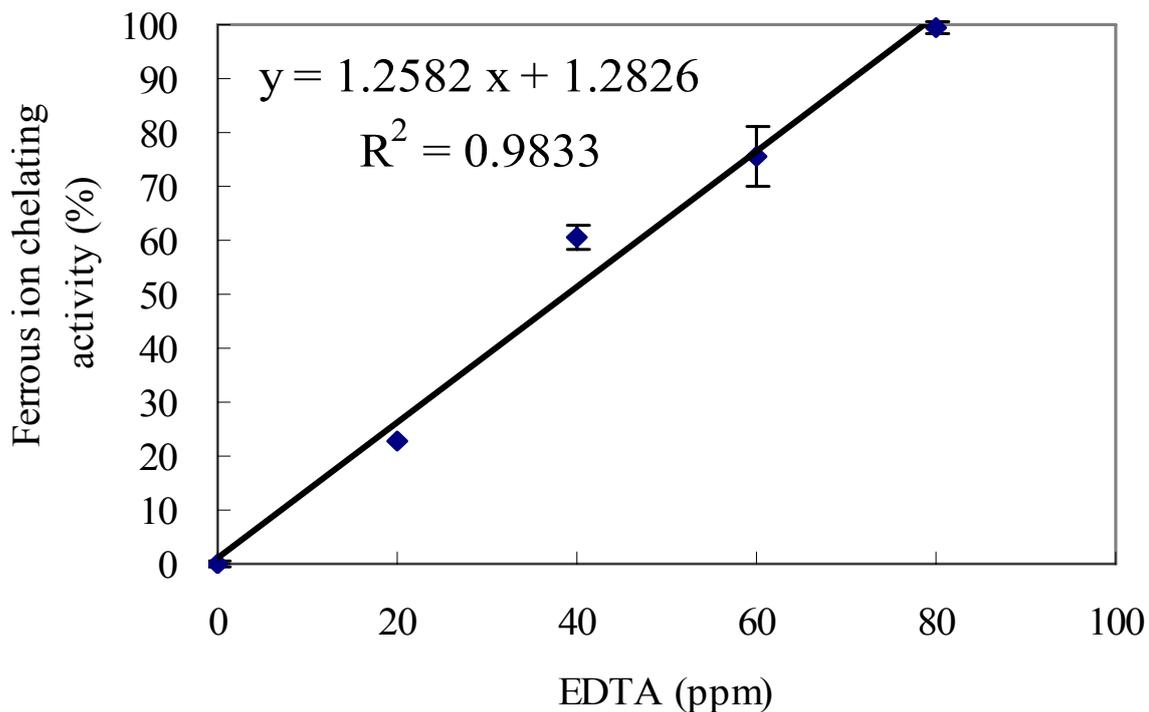
柒、附錄



附錄一、L-Leucine 標準檢量線。  
Appendix 1. Standard curve for L-Leucine.

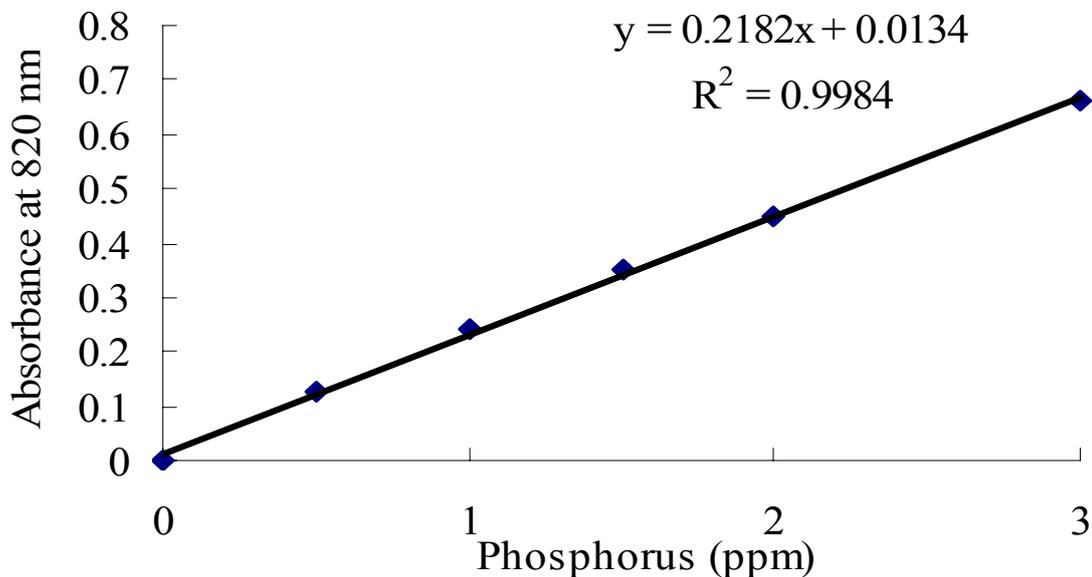


附錄二、 BHT 清除 DPPH 自由基清除能力之標準檢量線。  
Appendix 2. Standard curve of DPPH radical scavenging of BHT.



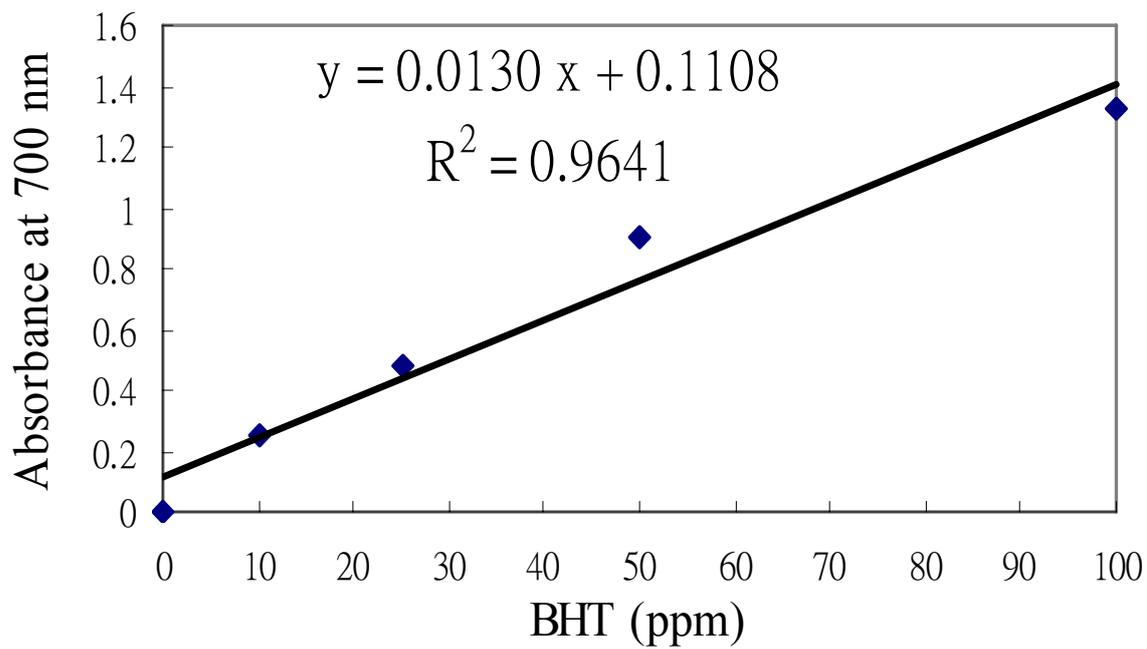
附錄三、EDTA 螯合亞鐵離子之標準檢量線。

Appendix 3. Standard curve of ferrous ion chelating activity of EDTA.



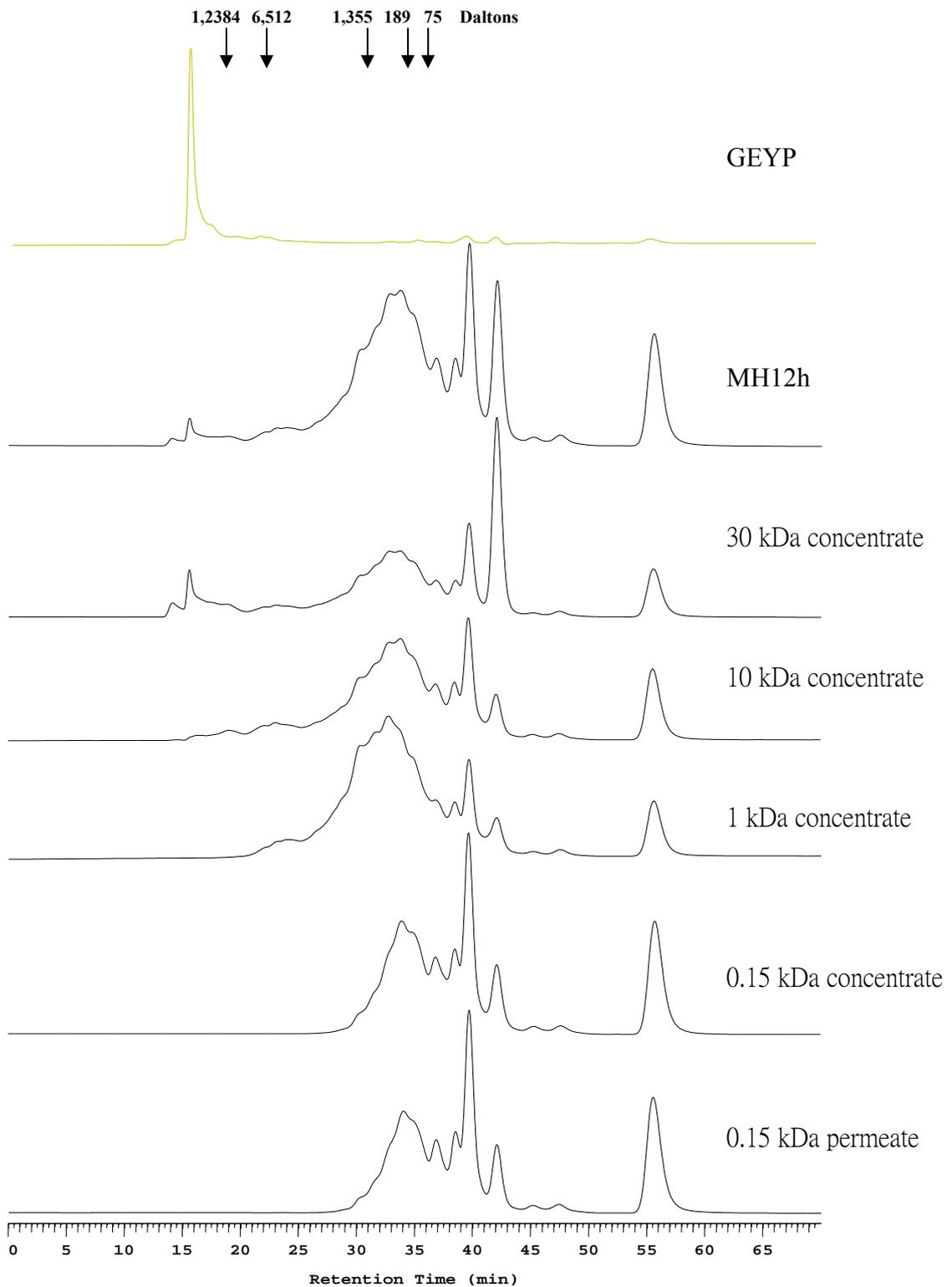
附錄四、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  之標準檢量線。

Appendix 4. Standard curve of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



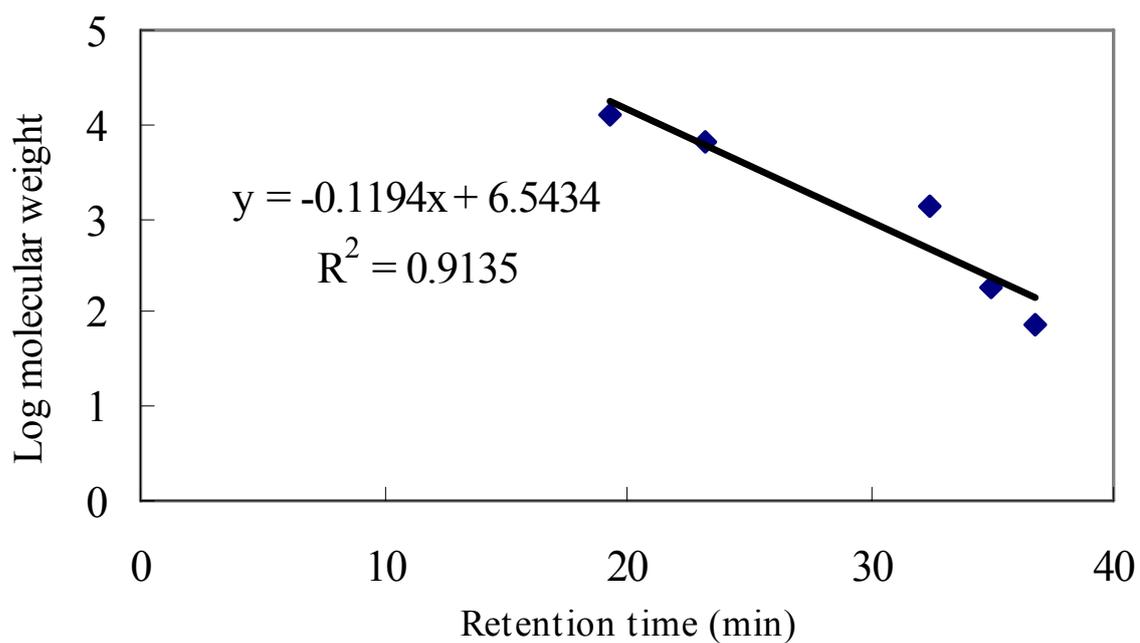
附錄五、還原力之標準檢量線。

Appendix 5. Standard curve of reducing power of BHT.



附錄六、MH12h 經不同分子量限值濾膜區分所得區分物之分子量分佈。

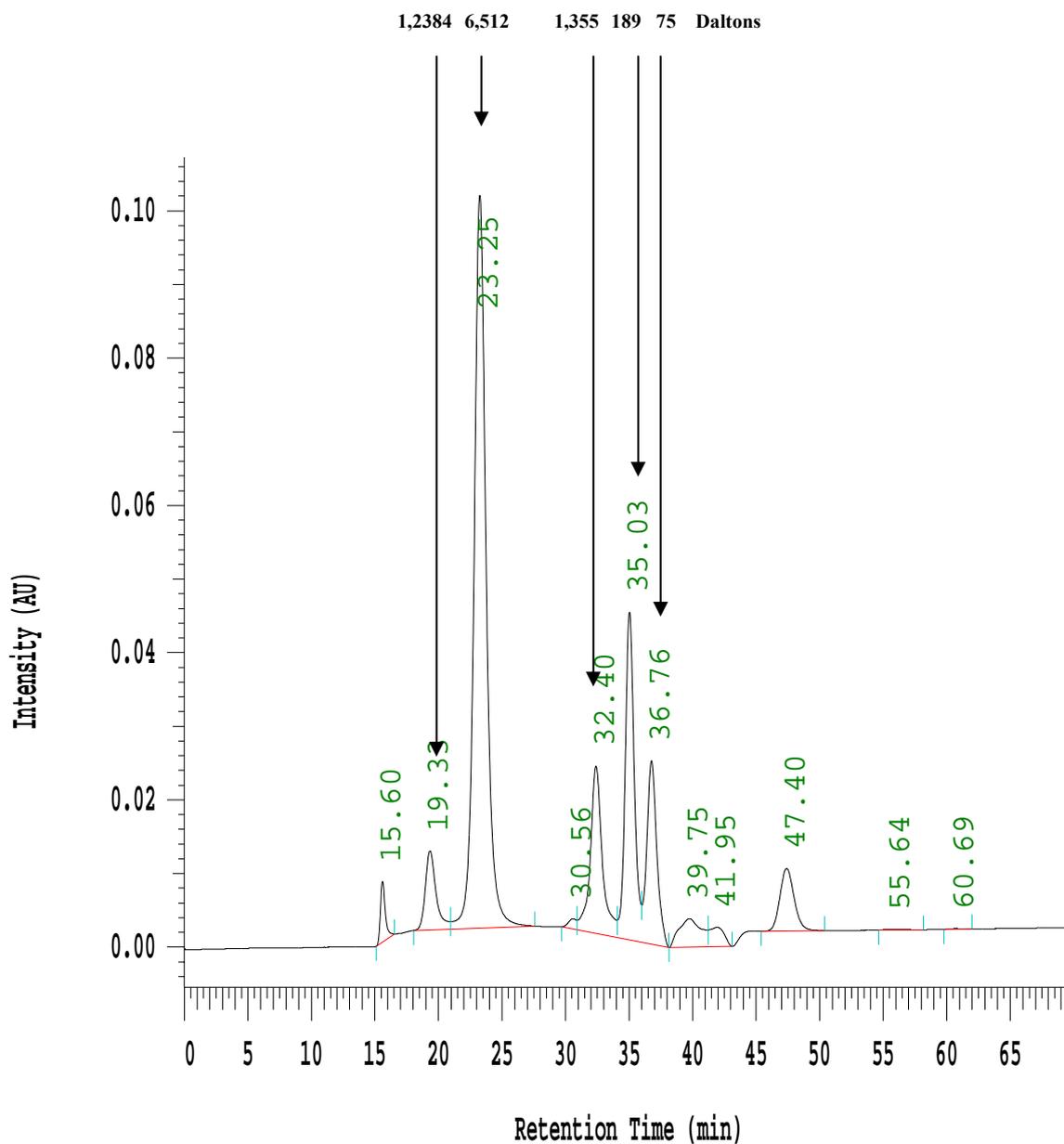
Appendix 6. The molecular weight distribution of MH12h with different molecular weight cut-off membranes.



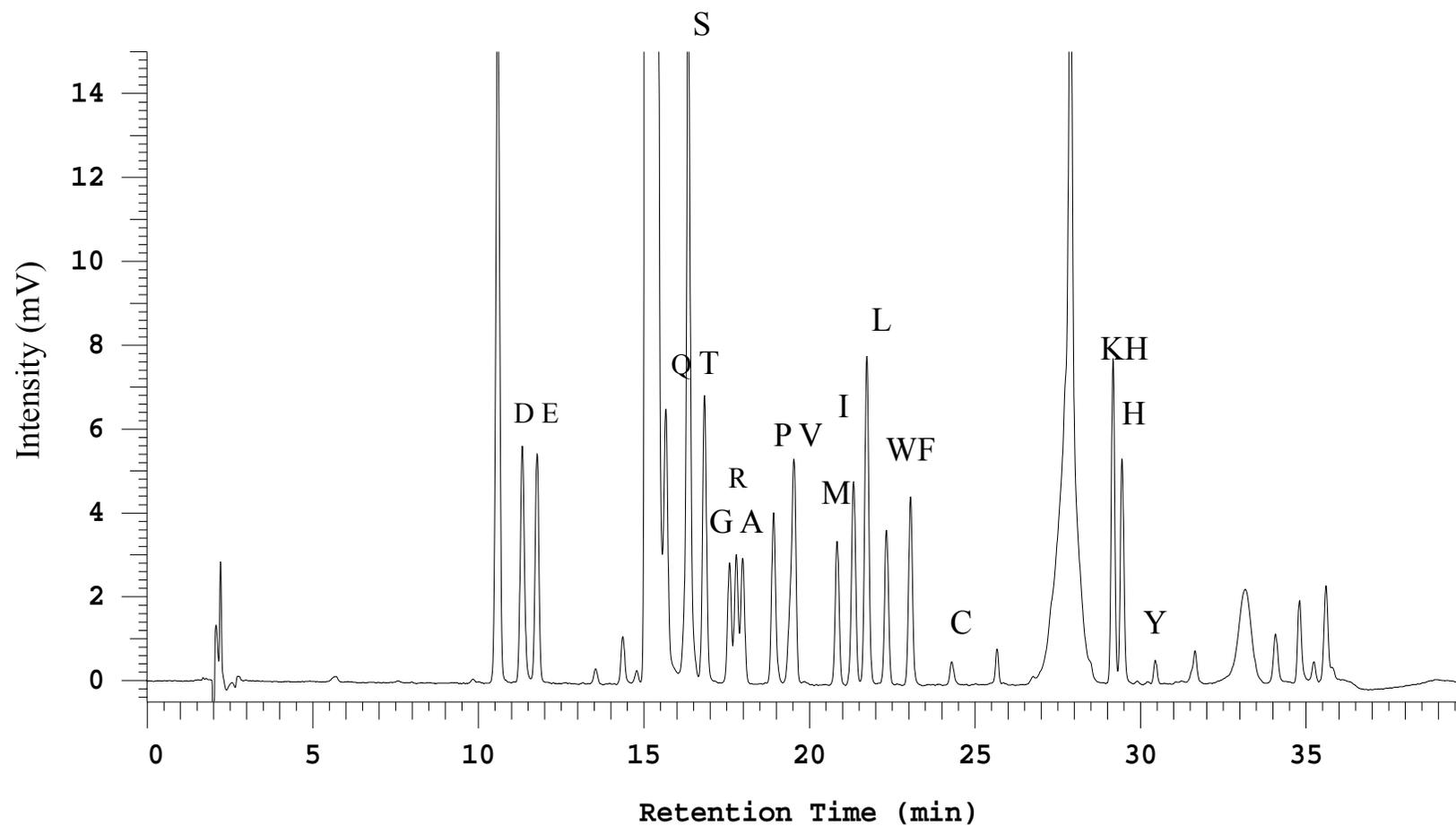
附錄七、標準品分子量與滯留時間檢量線。

Appendix 7. Standard curve of molecular weight at different retention time.

Column : Superdex™ peptide 10/300 GL  
Eluent: 20 mM phosphate buffer (0.15 M NaCl, pH7.2)  
Flow rate: 0.5 mL/min  
Detector: 214 nm



附錄八、分子量標準品之高效液相層析圖。  
Appendix 8. HPLC chromatogram of standards.



附錄九、 胺基酸標準品之高效液相層析圖。  
Appendix 9. HPLC chromatogram of standards.