

壹、前言

鴨蛋是極具中華飲食特色的食材，亦是台灣主要的畜產品之一。然而，生鮮鴨蛋消費並不普遍，大多用於皮蛋、鹹蛋等傳統加工產品之製造，而鮮少有其他加工的利用。因此，一旦皮蛋、鹹蛋需求下降時將直接衝擊鴨蛋產業，故產品多樣化的利用將是調節產銷及提昇產值的主要手段之一，這也是此產業亟需努力的方向 (陳，2009)。

食品中的蛋白質不僅是胺基酸的提供者，蛋白質經過人體消化酵素消化或食品加工過程中酵素水解後，可產生具有抗高血壓、增強免疫、抗氧化、抗菌、降低膽固醇等生理活性肽 (Bioactive peptide) (Clare and Swaisgood, 2000)。其中抗氧化性因對目前諸多現代的文明病如心血管疾病、高血壓、癌症及老化均有影響，因此研發天然及安全的抗氧化劑亦對食品的保存及人體的健康有正面的幫助，而本研究將以生產抗氧化性肽為主要目標。已有研究指出雞蛋中蛋黃較全蛋及蛋白更具抗氧化性 (Yamamoto *et al.*, 1990)，並有研究進一步的指出雞蛋黃蛋白質水解物又較未水解的雞蛋黃蛋白質及其胺基酸混合液更具抗氧化性 (Sakanaka *et al.*, 2004)。所以利用雞蛋黃蛋白質為原料進行適當的水解所的水解物，應具有開發為天然抗氧化劑之潛力。

雞蛋水解物既已被證實可當天然抗氧化劑，推測其他種之蛋類如鴨蛋、鵝蛋等若經酵素水解亦可能具有抗氧化性，但因動物種類不同及水解

條件的不同，所得的胜肽片段大小及組成不同，其抗氧化性可能也不相同。因此本研究嘗試以酵素水解的方式及膜反應系統製備具抗氧化活性之鴨蛋黃產品，以期朝向健康食品的方向利用，以提升鴨蛋產品價值，促進鴨蛋產業之發展。

貳、文獻回顧

一、蛋白質來源的介紹

(一)蛋鴨品種、特性及鴨蛋產業概述

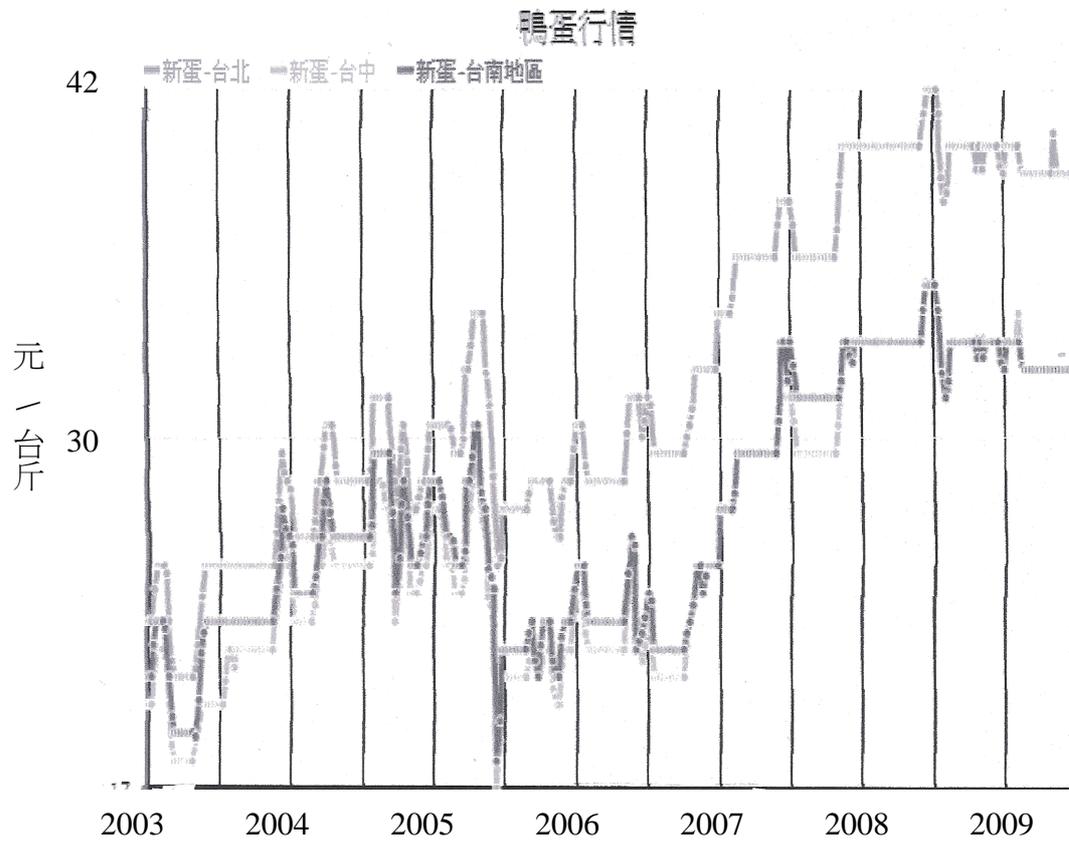
台灣目前主要生產鴨蛋的品種稱為菜鴨 (Tsai-ya Duck) 是先民自中國華南地區引進的，體型小而產蛋量多是世界上具有高產蛋性能的水禽之一。菜鴨羽毛顏色差異很大，可分為褐色菜鴨和白色菜鴨兩種。褐色菜鴨是主要的產蛋品種，又因產地不同又可區分為體型較大的宜蘭種，早熟；體型較小但產蛋數多的屏東種及介於兩者中間的大林種。褐色菜鴨在孵化 120 天後開始產蛋，公鴨飼養五個月後可配種，自然交配下，一隻公鴨約可配種 30-50 隻母鴨，成熟公鴨體重約 1.3 公斤；成熟母鴨體重約 1.3-1.5 公斤，每年產蛋數 300 個以上，蛋重約 65-68 公克 (游，1983；魏，2008)。近年來台灣地區年產量約為五億個 (表一)，由於鴨蛋供烹飪外，主要作為皮蛋與鹹蛋加工之原料，故其消費量不大。因此近十年來，鴨蛋產量維持一定，表一為台灣地區歷年來每人平均鴨蛋消費量，由此可知歷年來鴨蛋消費量呈近乎固定之趨勢。然而鴨蛋的消費有季節性，受到年節及假期影響甚大，以致偶有發生產銷失衡的現象 (圖一)，故能研發創新鴨蛋的加工技術，開發多元化鴨蛋的加工品，以促進鴨蛋之消費，則有助於鴨蛋之產銷調節及附加價值的提昇。

表一 台灣地區歷年鴨蛋之生產量及每人平均消費量

Table 1 Production volume and consumption of duck eggs over the years in Taiwan

民國	數量 (單位:千個)	每人每年消費量 (個)
89	478 452	21.48
90	481 789	21.50
91	472 326	20.97
92	477 041	21.10
93	417 126	18.38
94	487 549	21.41
95	466 232	20.38
96	507 328	22.10
97	483 878	21.00

資料來源：台灣農業統計年報 (2008) 及行政主計處人口統計計算



圖一、歷年鴨蛋蛋價波動情形 (資料來源:工商時報)。

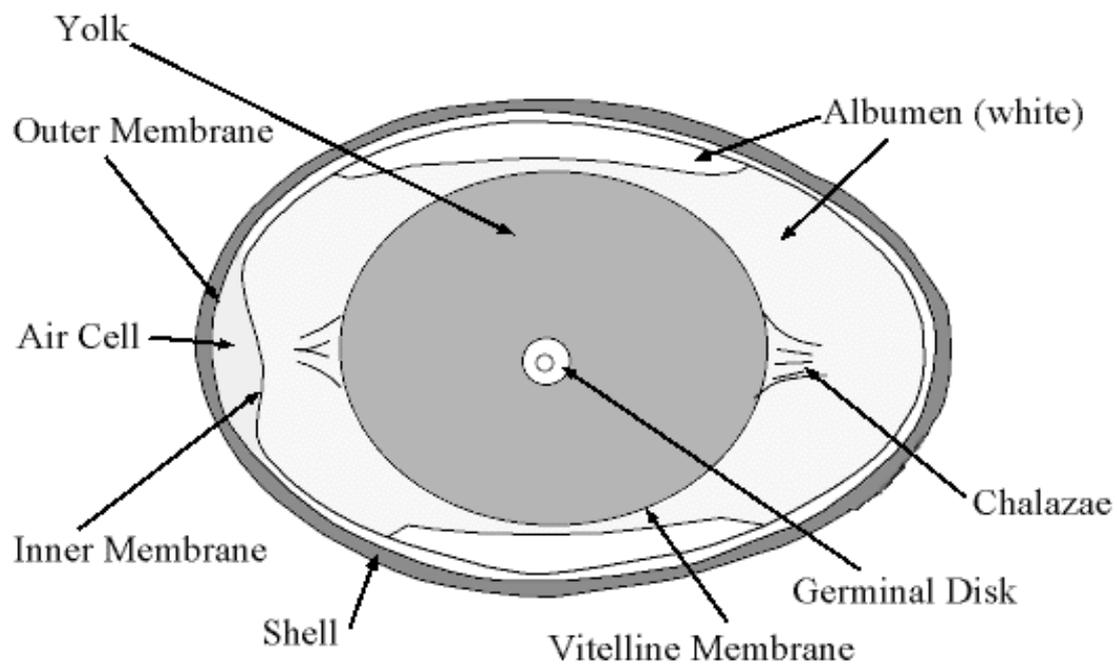
Fig. 1. Fluctuation of duck egg price over the years (Source: Business Times).

(二) 蛋的構造與組成

鴨蛋等禽蛋是營養成分複雜的食品之一，其具有獨特的功能 (functional property)，是重要的蛋白質食糧資源，與調理上為一種重要食品，對國民營養與健康之關係重要。在構造上，從外至內，一個蛋是由角皮層 (cuticle)、蛋殼 (shell)、蛋殼膜 (membrane)、蛋白 (albumen)、繫帶 (chalazae)、卵黃膜 (yolk membrane or vitelline membrane) 及蛋黃 (yolk) 所組成 (圖二)。鴨蛋之蛋殼 (0.41 mm) 較雞蛋 (0.36mm) 厚，蛋殼膜亦較厚，蛋黃所佔的比例亦較大；繫帶則反之。鴨蛋蛋殼為淡青色，雞蛋則為白色或褐色 (視品種而定)；鴨蛋之蛋白透明近白色，加熱後為純白色，雞蛋則為淡黃綠色。鴨蛋之粗脂肪較雞蛋多，而水分、粗蛋白質及灰分則相反 (張，1992)。

(三) 蛋黃的組成與應用

蛋白質與脂質為蛋黃主要成分，也有少量的醣和礦物質。其成分在食品工業上扮演著重要的角色亦為化妝品配方及製藥的主要成分 (Sakanaka & Tachibana, 2006)，在蛋黃的固形物中含量最豐富的為油脂成分，蛋黃中約含有 30-33 % 脂質，其中約 2/3 為三酸甘油酯，1/3 為磷脂質 (phospholipids)，其他則為少量之固醇類與微量之醣脂質。蛋黃所含約 10 % 磷脂質，大部分為卵磷脂 (lecithin and lysolecithin)，在雞蛋黃中約含有 7 %，而鴨蛋黃中約含 7.5 %。卵磷脂因具強乳化作用，故作冰淇淋、蛋黃醬等於食品加工時常利用到蛋黃 (張，1992)。在進行卵磷脂的萃取過程裡，



圖二、蛋的構造圖。
Fig. 2. Construction of eggs.

利用乙醇等有機溶劑萃取後，蛋黃中的蛋白質為生產過程的副產物 (Sakanaka & Tachibana, 2006；張與胡，2005)。因此，近年來有學者利用此廢棄物進行蛋白質水解之相關研究，Gutierrez 等人 (1998) 發現將脫脂後的蛋黃蛋白質進行水解，其水解物具溶解性及含有高度營養價值，並由於它不含乳糖，因此適合給乳糖不耐症及對乳品過敏的人食用。目前已由無卵磷脂的蛋黃蛋白水解物中，分離出一些具抗氧化之胜肽片段 (Park *et al.*, 2001)。故利用生產卵磷脂之廢棄物-蛋黃蛋白質來進行蛋白質水解修飾之應用，有助於開發多元化鴨蛋的加工技術及加工品。

二、酵素水解蛋白質

(一) 蛋白質水解的目的

以水解的方式來修飾食物蛋白質是一種古老的技術，人類以此法增進可利用的食物蛋白質資源之美味及使其利於儲存。百年來已發展出許多利用蛋白質水解的方式以獲得具高度傳統特色的食品，諸如法國的起士、日本的納豆、味噌、中國的豆腐乳等 (Adler-Nissen, 1986)。

現今常用的水解方法有酸水解、發酵及酵素法三種。其中酸水解雖然水解的效率較高且可將蛋白質完全水解成游離胺基酸，不會有苦味的問題且成本低，但其在水解過程中會伴隨一些不良甚至有毒性或不必要的副產物如 lysinoalanine 或破壞 L 型胺基酸而形成人體無法吸收利用的 D 型胺基酸 (Lahl & Braun, 1994)。而發酵法係利用原本就存在於食品原料中或是發

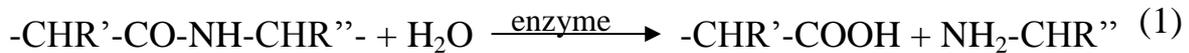
酵過程微生物中所釋出的蛋白質酶進行水解；酵素法則是以額外添加酵素的方式進行水解，其優點在於水解出的片段較具專一性、水解條件溫和、將大分子物質以不同程度水解成小分子物質、不易產生有害物質、可保留胺基酸營養價值。缺點為成本高、容易有苦味胜肽形成 (Clemente, 2000；Quist *et al.*, 2009)。

在過去的研究中水解蛋白質可以增進營養特性、改良質地 (Fox *et al.*,1982)，增加或減少溶解度、降低黏度 (Frokjaer, 1994)、增進起泡或凝聚性、增加風味 (Lahl & Braun,1994)。由於完整蛋白質之分子量過大，無法使人體有效地且快速的吸收，若經過水解修飾成為小分子胜肽或胺基酸，可以幫助人體提高其利用率 (Frokjaer,1994)。近年來文獻指出多種食品中的蛋白質利用酵素法水解所得之胜肽具有生理活性。此類的胜肽通常由 3-20 個胺基酸組成，而所具備的活性與其胺基酸的組成及序列有關 (Pihlanto-Leppala, 2001)。基於生理活性肽 (bioactive peptides) 之結構、組成及序列的性質而展現不同類型的功能諸如抗氧化性 (Jung *et al.*,2005；Kim *et al.*,2001；Rajapakse *et al.*,2005)、抑制高血壓 (Chiang *et al.*,2006；Suetsuna *et al.*,2005) 和免疫調節作用 (Chen *et al.*,1995；Tsuruki *et al.*,2003) 等。因此，研究天然蛋白質經酵素水解所得之活性胜肽，有助於提昇蛋白質-酵素水解物之價值以及未來有被用於作保健食品之可能性。

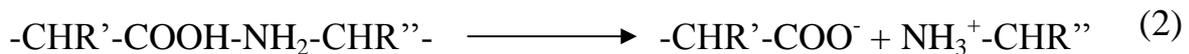
(二) 水解程度的表示

蛋白質酵素水解作用之反應式如下 (Márquez & Vázquez, 1999):

反應式(1) 胜肽鍵被切斷 (Opening of the peptide bond):



反應式(2) 質子的交換 (Proton exchange):



在水解的研究中作者為了表示酵素切斷蛋白質之胜肽鍵使其成為小分子所改變的程度，都需要以水解率 (degree of hydrolysis; DH) 的測定作為水解程度的表示 (Spellman et al., 2003)。DH 值愈高表示胜肽鍵被切斷的數目愈多，有許多低分子量的胜肽及游離胺基酸生成，亦就是完整之蛋白質 DH 為 0 %；完全水解之蛋白質 DH 為 100 %。

其水解率的定義為水解之胜肽斷裂數與蛋白質之總胜肽鍵數的百分比 (Adler-Nissen, 1986):

$$\text{DH} = h/h_{\text{tot}} \times 100 \% \quad (3)$$

h : 在水解的過程中被切的胜肽數量稱為水解當量 (hydrolysis equivalent), 單位為 miliequivalent /g protein (meqv/g), 即 1 克的蛋白質中有多少毫莫耳的胜肽鍵被切開。

h_{tot} : 1g 蛋白質中所含的各種胺基酸的毫莫耳數的總和即起始總胜肽鍵, 單位為 mmol/g protein。

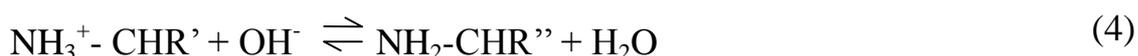
pH-stat 法、OPA (*o*-phthaldialdehyde) 法及 TNBS (picrylsulphonic acid

) 法 (Spellman et al., 2003), 目前最常被用來估計蛋白質經酵素水解後之水解率, 以下為這些方法的簡介:

1. pH-stat 法:

使用 pH-stat 之技術其蛋白質水解過程適於 pH 6.5 以上而最好為 pH 7.0 以上之水解環境。其測定之原理為在水解過程中當胜肽鍵斷裂時游離的氨基會釋放 H⁺, 使溶液的 pH 值下降, 此時以添加鹼液 NaOH 的方式來維持 pH 值的恆定。並由水解期間所測得的鹼消耗量即可直接推算出 DH 值。其

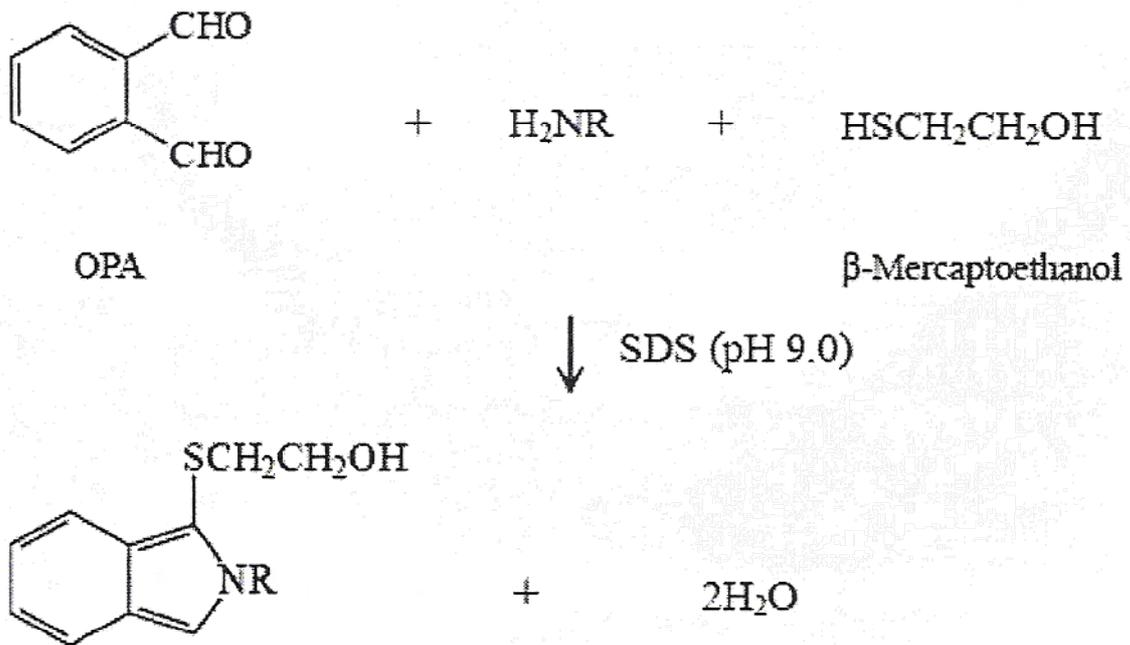
反應式 (Márquez & Vázquez, 1999) 為:



利用 pH-stat 法測定可快速且容易地測出水解物的 DH 值。且是水解當下即時測定的, 此時水解物未經過加熱使酵素失活的過程, 較可表現水解的即時狀態。但若水解酵素為外切型酵素其水解率會有低估的現象 (Spellman et al., 2003)。此外, 在 pH-stat 系統下之其最終的水解產物會含有高含量的鹽類 (Pommer, 1995)。

2. OPA (*o*-phthaldialdehyde)法:

以 *o*-phthaldialdehyde (OPA) 分光測定法 (Church et al., 1983) 測定水解當量 *h*。OPA 法是根據 OPA 試劑與一級胺基反應, 在硫醇 (thiol) 的存在下形成 1-alkylthio-2-alkyl-substituted isoindoles。此化合物可在 A340 nm 或螢光 A455 nm 下測定。(Medina H. et al. 1990a,b), 圖三為其反應式 (Spellman et al., 2003)。OPA 法亦為快速且容易測出水解物 DH 值之方法, 但需考慮



圖三、OPA 法反應式。

Fig. 3. Reaction of OPA method.

水解蛋白質的性質，蛋白質中 cysteine 的硫氫基會與 OPA 有微弱反應形成不穩定的化合物，因而影響 OPA 試劑與一級胺基反應形成 1-alkylthio-2-alkyl-substituted isoindoles，使其吸光值不穩定。因此，此法不適用於富含 cysteine 之蛋白質 (Spellman *et al.*, 2003)。

3. TNBS 法:

利用 TNBS 試劑與一級胺基反應形成發色基團 (chromophore)，在 A340 nm 下有最大吸光值。圖四為其反應式(Alder-Nissen, 1979)。TNBS 法可提供較為準確之 DH 值，但 TNBS 與水解物需要比較長的反應時間，不如上述二種方法可即時測得水解物之水解率(Spellman *et al.*, 2003)。

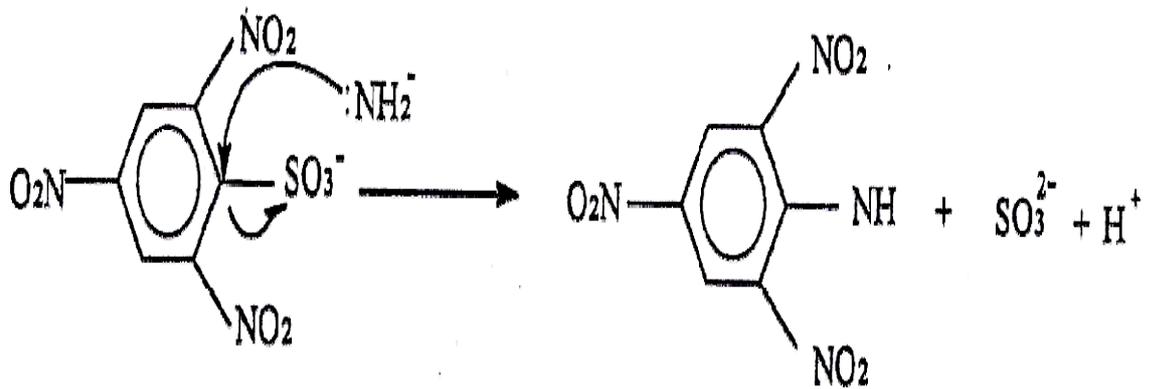
(三) 水解程序的建立

控制的水解過程是確保蛋白質水解物品質的關鍵。建立水解系統除了基質與酵素種類外，尚有四個水解參數 (hydrolysis parameter) 必須確立，即基質濃度、酵素濃度、pH 值與溫度 (Adler-Nissen, 1986；黃，2000)。

1、基質之種類

主要由營養價值、功能性質及經濟效益作為選擇的考量 (Lahl & Braun, 1994)。如魚蛋白、乳蛋白、卵蛋白、肉類&內臟、血液、膠原及骨頭等動物性蛋白質；穀類蛋白、黃豆蛋白質與其他植物蛋白質以及微生物蛋白質等 (Adler-Nissen, 1986)。

2、酵素之種類



圖四、TNBS 與一級胺之反應。
 Fig. 4. Reaction of TNBS and α -amino acid.

蛋白質水解酵素又名蛋白酶，即可催化蛋白質或胜肽水解的酵素總稱(林 等，1993)。其選擇的條件除了來源的安全性外，皆視其所要的水解效果而定 (Adler-Nissen, 1986)。蛋白酶依其來源可分為四種 (鄭，1997):

- (1) 動物性蛋白酶-價格較貴，如胃蛋白酶 (Pepsin)、胰蛋白酶 (Trypsin) 等。
- (2) 植物性蛋白酶-價格低廉，常被大量使用，但水解蛋白質時容易產生大量苦味胜肽。如木瓜酶 (Papain)、鳳梨酶 (Bromelain)等。
- (3) 細菌類蛋白酶-價格便宜，頗符合經濟效應，但也容易產生大量苦味胜肽，尤其是鹼性蛋白酶。市售之 Alcalase 及 Neutrase 都屬這類由桿菌製得之細菌蛋白酶。
- (4) 真菌類蛋白酶-較不會產生苦味，甚至還有具可去除水解物苦味的 carboxypeptidases 及 aminopeptidases，其價格較為昂貴。市售之 Promod 215 及 Flavourzyme 都屬於 *Aspergillus* 屬製得之真菌蛋白酶。

若依作用位置之不同可分為二種 (Pommer, 1995):

- (1) 內切蛋白酶 (endoproteases)-大部分蛋白質酶屬於此類，可切斷蛋白質或胜肽內部之胜肽鍵，其水解產物主要為小分子胜肽，因此並不會產生大量的游離胺基酸。
- (2) 外切蛋白酶 (exo-peptidases)-作用於蛋白質或胜肽分子上的末端胜肽鍵，而釋出游離胺基酸。依作用於具有游離之 α -胺基或 α -羧基之末端胜肽鍵，可分為 Amino-peptidases 及 Carboxyl-peptidases。

3、基質濃度

基質濃度指的是水解反應開始前，蛋白質佔全部反應混合物的比例 (protein weight/total weight) (Adler-Nissen, 1986；陳，1997)。其所代表意義雖不若酵素對基質大，但調整基質濃度仍會對水解率及整體生產力有所影響 (Benjaku & Morrissey, 1997)。在基質濃度與水解率之相關研究中指出增加水解溶液中水的比例，可提高水解的效果。其可能原因有 (1) 當增加水所佔的比例易使反應式趨向水解的方向。(2) 可使水解酵素更加均勻 (homogeneity) 散佈。(3) 有助於增加受質的組織膨脹而易於水解 (Surowka & Fik., 1992&1994)。然而，此說明並未在其他文獻的試驗中獲得完全的應證 (Benjaku & Morrissey, 1997；Park et al., 2000)。其中 Benjaku & Morrissey 指出在緩衝液系統下進行水解，其緩衝液所提供的緩衝能力使酵素散佈於適當的水解環境亦可能是影響水解的原因。此外，太高的基質濃度會阻礙酵素與基質接觸；而太低的基質濃度則會減少酵素與基質的碰撞機率 (陳，1997)。亦可能是影響水解之原因。

4. 酵素濃度

酵素對基質比並不僅僅是說明酵素濃度，其真正的涵義是在於整個水解反應速率上 (Adler-Nissen, 1986)。在早期的研究中指出蛋白質的水解隨著酵素濃度的增加會使可溶性的蛋白質增加而對整體的水解有正面的幫助 (Cheftel *et al.*, 1971)，之後更進一步的發現在水解太平洋鱈魚加工廢棄物

(Benjakul and Morrissey., 1997)、黃鰭鮪加工廢棄物 (Guérard *et al.*, 2001)、金帶細鯨 (Klompong *et al.*, 2007) 之研究中，其酵素濃度對數值 (\log_{10}) 與水解率間具有高度的正向線性關係。因此，在高酵素濃度下水解其水解速率快速，但亦會提高成本；而酵素濃度太低，則會降低水解反應的速率，因此找出適當酵素濃度既可減少成本的浪費並可達生產所需的目的 (江，2003)。

5. pH 值與溫度

這二項影響因子多半選擇在所使用酵素的最適範圍內，影響所及的是酵素活性所能表現的程度 (Adler-Nissen, 1986)。一般蛋白質酵素之最適溫度約為 30-50°C，最適 pH 值約為 7.0 左右。有些商業酵素因具多種酵素活性，其最適 pH 值也不同，因此水解時 pH 可以不需要控制 (江，2003)。

在 pH 值及溫度對 Alcalase 之酵素活性的試驗中，其結果顯示 Alcalase 在 pH 值 6.5-8.5 最適為 pH 值範圍。而水解溫度在約 60°C 左右具有最高的酵素活性。然而，在測定不同溫度下 Alcalase 之酵素活性安定性中，發現 Alcalase 經 1 hr 後水解後，其中溫度在 60°C 水解 1 hr 後之酵素活性僅存約 75%，而在 50°C 下酵素活性仍維持 >95% 的酵素活性 (Pommer, 1995)。顯示水解溫度 60°C 雖有最高的水解酵素活性，但亦須考慮水解過程酵素活性的安定；在 pH 值對 Flavourzyme 之酵素活性的試驗中，結果顯示 Flavourzyme 之酵素活性在廣泛的 pH 值水解環境下 5.0-7.0 皆具有高度的酵

素活性。由於 Flavourzyme 為具多種酵素混合之商業酵素其含有與內切二種類型之酵素，其中外切酵素之最適 pH 值範圍在 4.5-7.0；內切酵素之最適 pH 值範圍在 6.5-8.0，因此 Flavorzyme 具有廣泛的最適 pH 值。Flavorzyme 在水解溫度與水解率之試驗中，在 60°C 左右具有最高的酵素活性 (Pommer, 1995)。

(四) 水解過程調控

水解系統確立後，反應最終目的不外乎獲得預期的效果，水解過程的控制管理諸如水解前的加熱步驟、酵素添加時機、選擇控制水解的 pH 值的系統、適當的使酵素失活都對於最終之水解產物有所影響。

1、水解前處理

在蛋白酵素水解的研究中，有些研究會在進行水解前對水解對象進行加熱，其目的在於使內源性酵素的失活及避免微生物的生長。一般而言，當添加酵素進入水解系統之時即表示水解反應開始。然而，由於所水解的蛋白質來源的本身可能已具有內源性的酵素 (endogenous hydrolytic enzyme) 如蛋白酶、脂肪酶 (lipases) 等，其在適當的條件下可能會自行對組織進行分解作用 (Cao *et al.*, 2008)。對於此自家分解 (autolysis) 作用，在水解鯖魚蛋白質的研究中曾比較在相同水解條件下分別以內源性的酵素及 Protease N (EC 3.4.21.66) 進行水解作用。其結果顯示鯖魚蛋白質若僅以內源性的酵素的進行自家分解 (autolysis) 作用亦會造成胺基酸組成的改變及增加游離

胺基酸的含量 (Wu *et al.*, 2003)。顯示在水解來源中若含有內源性的酵素會影響最終水解產物組成及性質。雖內源性的酵素的的存在可能會幫助水解對象進行水解作用，但亦可能會成為研究酵素水解過程中的變因之一 (Klompong *et al.*, 2007)。因此，在有些水解的研究中會在添加酵素前先對蛋白質進行加熱失活的動作 (Sakanaka *et al.*, 2006)，其目的在於為使研究之處理組-添加特定酵素組之水解作用不受本身之內源性酵素之干擾而影響試驗之結果。並且進行加熱失活亦對水解對象有殺菌的功用，可避免在水解過程微生物的生長而有衛生安全之虞 (Lahl and Braum, 1994)。然而，加熱失活亦可能會造成蛋白質因受熱而變性及改變其結構，因此在水解的研究上不一定在添加酵素前都會進行加熱失活的步驟。

2、水解 pH 值之控制系統

目前用來控制水解過程的pH值方式大致可分為pH-stat、使用緩衝液為水溶液及僅控制起始pH值 (pH float) 等三種。pH-stat為在水解過程中以添加鹼或酸液準確地維持酵素所需最適pH值的環境 (Nielsen, 1995)；使用緩衝液為水溶液是利用緩衝液來控制水解過程的pH值變化。在使用中性及鹼性蛋白酶水解烏魚 (*mugil cephalus*)，分別以緩衝液控制pH值為7.5及9.5，經水解3 hr後，pH值分別下降至pH6.5及pH8.0，此時酵素活性也較最適pH值低15-30 % (Rebeca *et al.*,1991)；而使用僅控制起始pH值的方式為僅調整起始的pH值，而之後的水解環境會隨酵素切斷胜肽鍵的過程而改變pH值。關

於僅控制起始pH值的水解研究中，以中性或鹼性水解酵素Alcalase及Trypsin與酸性水解酵素Pepsin分別在起始pH值8.0、8.0及3.0下對雞腿骨進行水解，結果顯示，Alcalase 和Trypsin 兩處理組在水解2 hr後pH值由8.0下降至7.0左右，且兩組的酵素水解液無顯著差異，然而Pepsin 處理組則在水解2 hr後由pH 3.0 上升至pH 4.0 左右。水解2 hr內，三組水解液pH值變化較大，水解2 hr後，pH值的變化則趨緩（鄭， 2007）。水解過程中pH值的變化主要是胺基酸殘基產生所致，胺基酸的胺基(-NH₃⁺)與羧基(COO⁻)具有緩衝的功能，大部分的胺基酸pH值都屬弱酸性，因此會降低鹼性酵素水解(Alcalase、Trypsin) 的pH值，而增加酸性水解 (Pepsin) 的pH值 (Lisa., 1998)。

綜合上述，pH-stat、使用緩衝液為水溶液及僅控制起始pH值等三種控制水解pH值的系統。pH-stat法可準確的控制水解環境的pH值，可較可維持最佳的酵素活性。而以緩衝液及僅控制起始pH值的方式較無法精準的控制水解環境的pH值，但仍具有維持pH值的能力，此類較適於用於含有多種酵素混合的商業酵素如Flavourzyme (Nielsen, 1995)。此外，使用pH-stat及緩衝液其水解產物會產生鹽類的缺點。因此選擇控制水解pH值的系統端視所使用的酵素特性及最終水解產物的需求而決定。

3、酵素之添加時機

使用單一酵素時會於水解開始即添加入水解系統，而在使用二種以上

酵素進行水解反應時，則需視水解反應的目的來評量酵素添加的時機。其較常使用的方法為同時加入二種以上酵素至水解系統中，其水解效率往往有提升的作用。然而，必須考慮酵素之間不會互相作用，且最適反應 pH 值和溫度不可差距太大；另一種則先添加某種酵素進行一階段水解作用後，再加入其他的酵素進行下一階段的水解（陳，1997）。

在大豆分離蛋白之酵素水解研究中，曾有利用 Alcalase 及 Flavourzyme 以個別添加及二種酵素同時加入的方式，探討使用 pH-stat 法與僅控制起始 pH 值之水解系統對水解率之影響，結果顯示混合酵素之水解在僅控制起始 pH 值之系統下會比 pH-stat 法系統下有較高的水解率，且其水解率皆較個別添加酵素之水解率高（Nielsen *et al.*, 1995）。因此，若以 Alcalase 及 Flavourzyme 之混合酵素的水解研究中，使用僅控制起始 pH 值之水解系統為較佳的水解控制系統。

4、終止反應步驟

在中止酵素水解反應的方法中較常使用的方式為加熱法及調整 pH 值。利用沸水加熱使酵素失活，此法可能會造成營養素的破壞而影響產品品質。利用調整 pH 值之酵素因變性而失活，此法的缺點為中和反應時會產生大量的鹽類，造成水解液在某些應用前需加一道脫鹽的步驟（翁，2004）。

三、脂質氧化作用

油脂及含油脂食品的氧化敗壞（rancidity），長久以來即為食品劣化的主

要原因。近年來對人體的影響亦逐漸受到重視，因為油脂酸敗除了產生低分子揮發性物質使食品產生不悅的油耗味、黏度變大及顏色加深等食品劣化現象，伴隨著油脂酸敗所裂解的產物，對生物體也有不良的影響 (Niki *et al.*, 1991)。

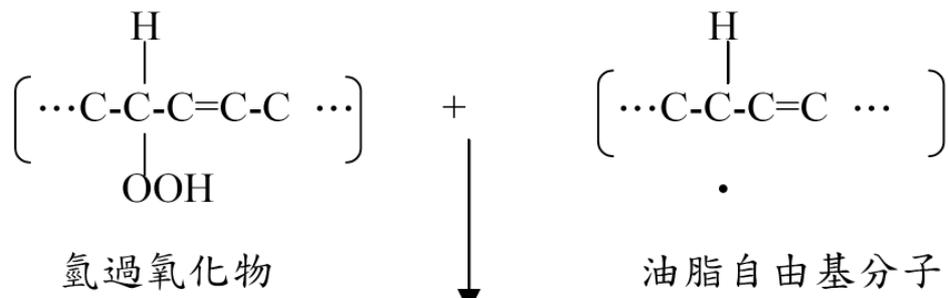
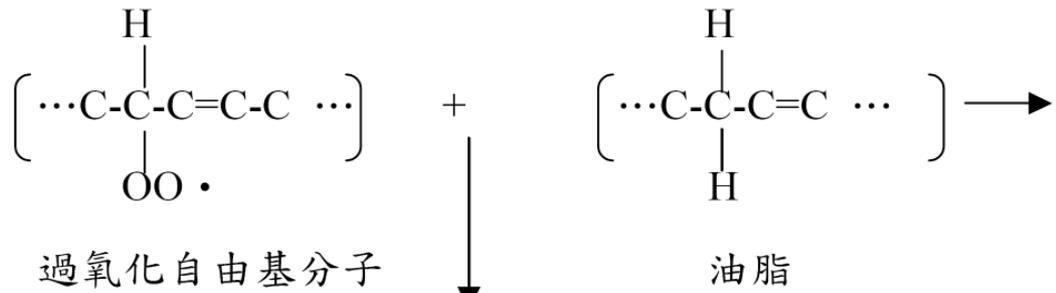
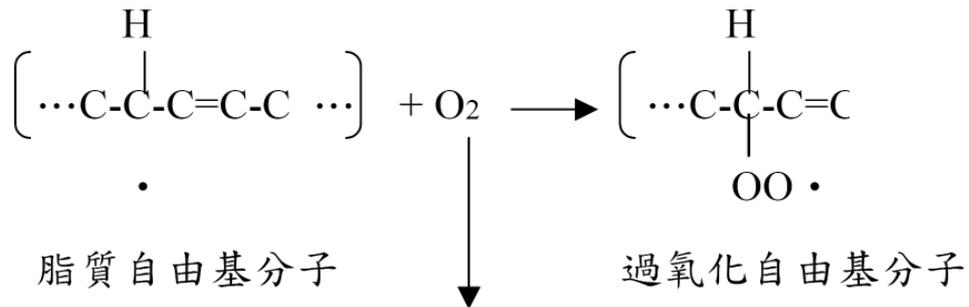
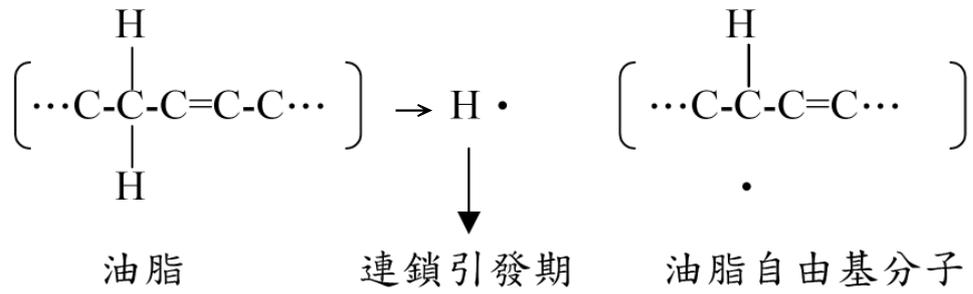
(一) 脂質自氧化作用

就食品而言，脂質的自氧化作用 (autoxidation) 是引起脂質酸敗最主要的原因。不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸及三酸甘油酯等因輻射、助氧化劑 (如：金屬離子) 或酵素的的存在，會促使其與氧分子結合後，依序進行一序列的化學反應。其中含生成氫過氧化物，或再由其分解成醛、酮及低級脂肪酸或形成聚合物的過程 (張 等，1995)。脂質自氧化作用是由油脂所含的戊二烯雙鍵中間之甲烯基 (α -methylene； $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) 因外在因素失去一個質子而形成活性極高的自由基，進而產生過氧化連鎖反應所引起。脂肪酸所含的雙鍵越多，形成過氧化自由基 (peroxy radical)，再經連鎖反應形成不安定的一級氧化產物-脂質氫過氧化物 (lipid hydroperoxide)。油脂氧化的作用可分為三個步驟 (圖五)：

1、起始期 (initiation stage):

受到單旋態氧 (singlet oxygen； $^1\text{O}_2$)、過渡金屬、光、熱或脂質氧化過程所產生的脂質自由基等高能量物質引發起始反應，使不飽和脂肪酸的戊二烯雙鍵中間之甲烯基脫落一個質子，形成活性極高的脂質自由基。此階

氧化誘導期



終止期

圖五、脂質自氧化連鎖反應。

Fig. 5. Autoxidation chain reaction of lipid (Nawar, 1985).

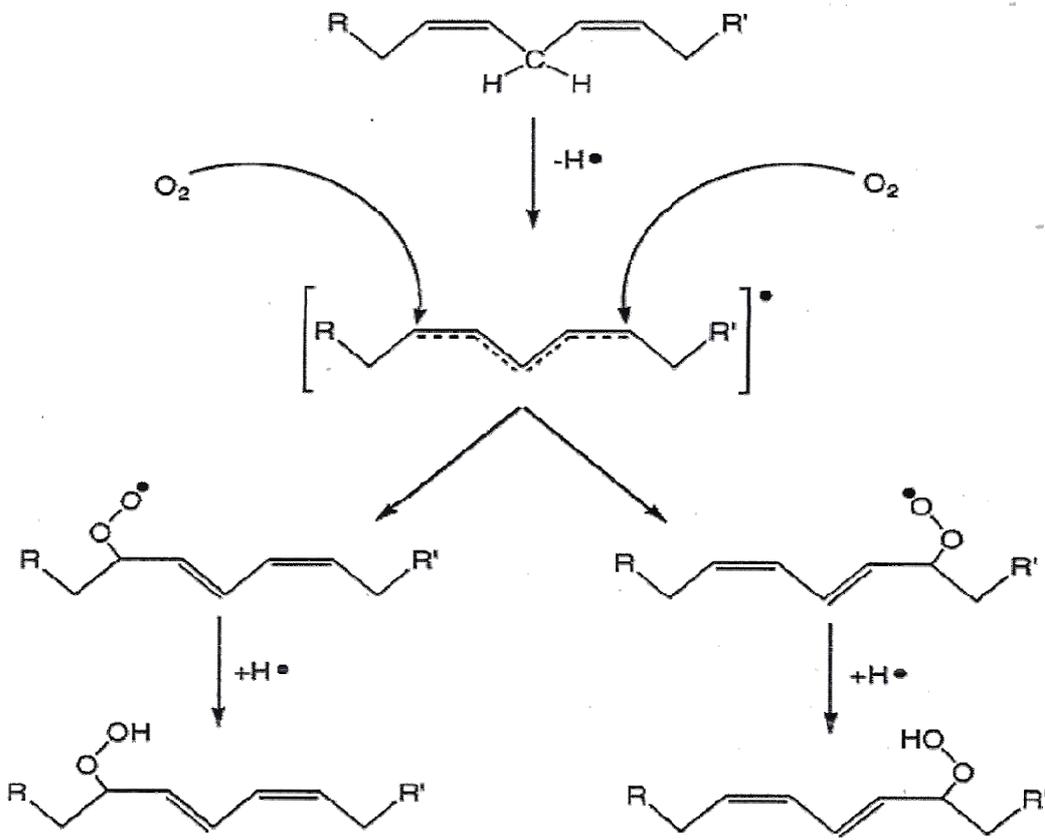
段反應較慢，卻是脂質自氧化速率的決定步驟。

2、連鎖反應期 (propagation stage)

此階段之主要反應為正常油脂因受到自由基的攻擊，繼而產生更多自由基。脂質自由基與氧反應形成氫過氧化自由基 (peroxide radical)，過氧化自由基再去攻擊其他不飽和脂肪酸，奪取其質子已產生新的脂質自由基與脂質氫過氧化產物，此步驟不斷進行直到系統內所有的不飽和脂肪酸全部變成自由基為止。圖六表示脂質自由基的形成，且與環境中的氧反應形成脂質過氧化產生新的脂質自由基與脂質氫過氧化產物，此步驟不斷進行直到系統內所有的不飽和脂肪酸全部變成自由基為止。圖六表示脂質自由基的形成，且與環境中的氧反應形成脂質過氧化物 (Gorkum and Bouwman, 2005)。氧化反應初期會先經過氧化誘導期 (induction period)，形成氫過氧化物，並在氫過氧化物達到最高量後開始分解。

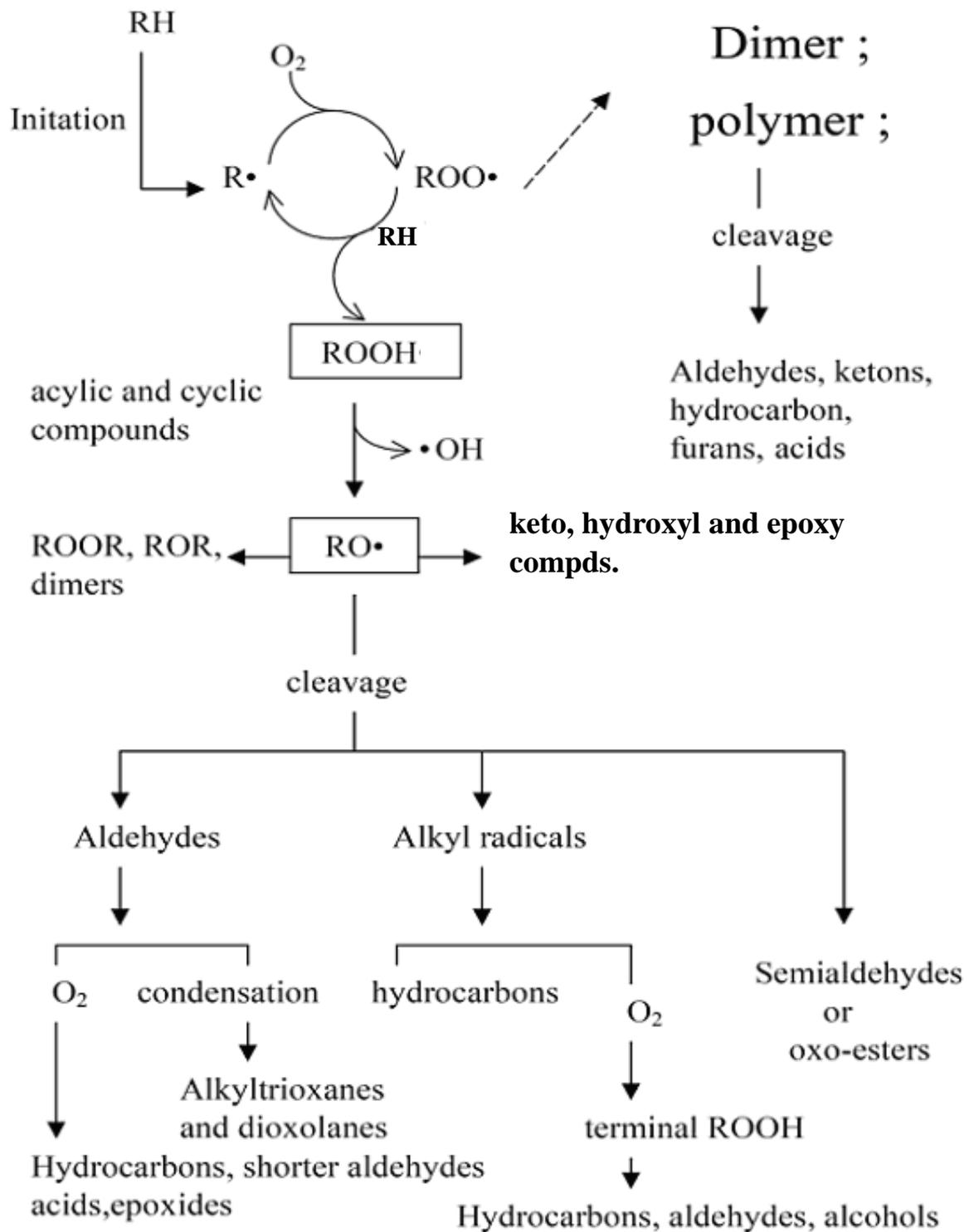
3、終止期 (termination stage)

自由基之間互相結合，形成相對穩定的產物。氫過氧化脂質非常不穩定，此時醛、酮、醇、酸及短鍵的碳氫化合物等低分子揮發物質或聚合成非揮發性的雙聚合物 (dimer)、聚合物 (trimer) 或多聚物 (polymer) 等高分子物質 (圖七) (Nawar, 1985)。圖八所示為油脂自氧化反應過程。含有不飽和脂肪酸之油脂會先經過一段氧化誘導期 (initiation period)，在此期間沒有可察覺的反應發生，接著開始產生氫過氧化物，在氫過氧化物產生達到最



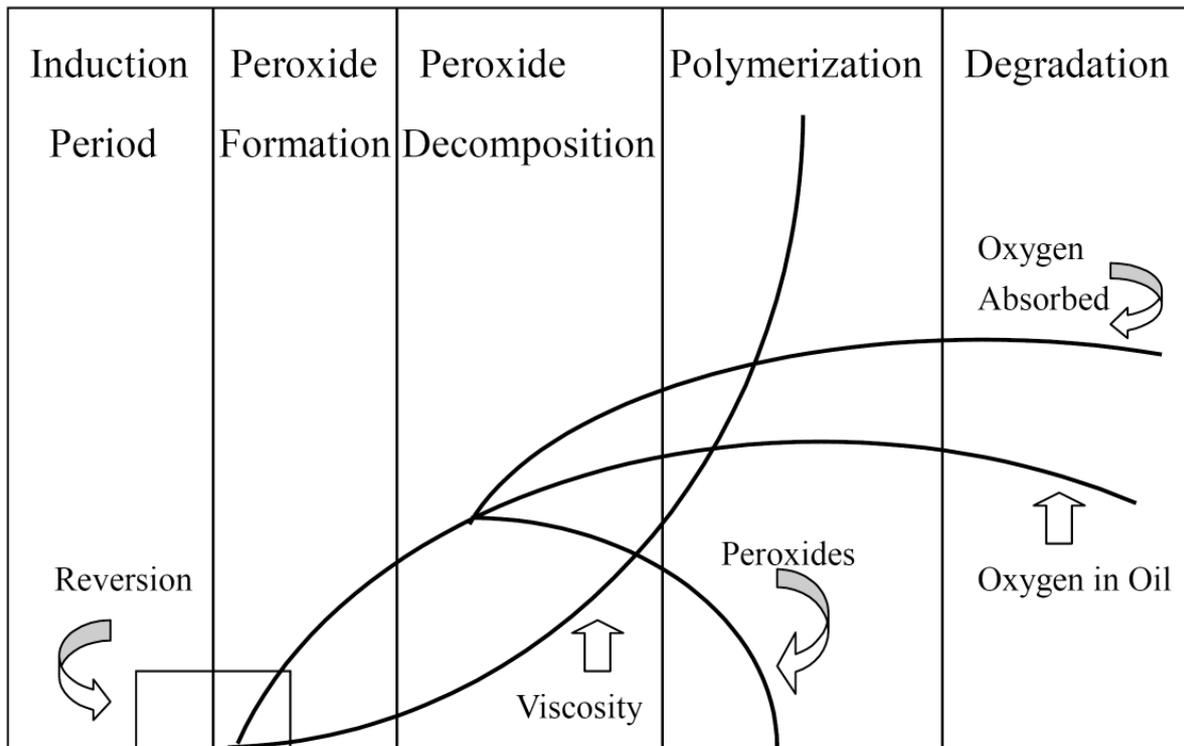
圖六、脂質自氧化反應中氫過氧化的形成。

Fig. 6. Initial hydroperoxide formation in the autoxidation of the fatty acid chain (Gorkum and Bouwman, 2005).



圖七、油脂的氧化反應及產物。

Fig. 7. Generalized scheme for autoxidation of lipids and its products (Nawar, 1985).



圖八、油脂自氧化反應階段。

Fig. 8. Autoridation stages of lipids (Perkins, 1967).

高點之後，開始分解。此時吸氧仍繼續緩慢的增加，在最後階段會發生聚合反應而相互結合，生成二聚物及多聚物而使油脂及食品的顏色開始變深，此時油脂的黏度也因聚合物之生成而突增，裂解反應也同時在最後階段，產生一些揮發性化合物 (Perkin, 1967)。此外，脂質自氧化過程中所產生之自由基、氫過氧化物或酮、醇和酸等物質亦會破壞食品中維生素或導致蛋白質變性等。

(二) 脂質氧化與疾病

脂質自氧化不僅會降低食品營養及商品價值，學者也指出體內脂質過氧化反應產生，或由膳食攝入之脂質氧化產物，包括脂肪酸氫過氧化物、丙二醛及其他二級裂解產物，對於人體也會有多種不良的影響，如血管毒性、細胞毒性、致癌性等 (Martinez-Cayuela, 1995)。如果體內的抗氧化物質供應不足，無法適時的清除這些氧化產物，可能導致細胞遭受氧化傷害，進而造成細胞中 DNA 複製差錯、結構性蛋白破壞及正常細胞死亡 (Fagan *et al.*, 1999)。生物體中的多元不飽和脂肪酸主要存在於粒線體小包體膜、紅血球膜及細胞膜等生物膜的磷脂質中，若此不飽和脂肪酸被氧化形成自由基，亦會誘發連鎖反應產生氫過氧化脂質。當體內囤積過量氫過氧化脂質時，會使生物體膜上選擇性通透及被動運輸等機能受損，直接或間接造成血栓、動脈硬化、肝臟病變及白內障等疾病 (Blair, 2001)。表二為氧所衍生的自由基對人體可能造成之傷害。

表二 氧所衍生的自由基對人體可能造成之傷害

Table 2 Conditions associated with oxidant damages in the human body

Cancer
Arthritis and inflammatory diseases
Atherosclerosis
Shock, trauma, ischemia, reperfusion injury
Cataracts and macular degeneration
Diabetes
Renal disease and hemodialysis
Multiple sclerosis
Pancreatitis
Neonatal lipoprotein oxidation
Pulmonary dysfunction
Drug reactions
Aging

(Jacob, 1994)

然而，生物體內的自然防禦機制可協助抑制自由基及脂質過氧化所帶來的傷害，例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) 等酵素均具有消除自由基活性的功能；細胞外的防禦機制則來自抗氧化功能之物質諸如 α -生育醇、維生素 C 及類胡蘿蔔素等，皆能抑制脂質過氧化連鎖反應 (五十嵐等，1986)。

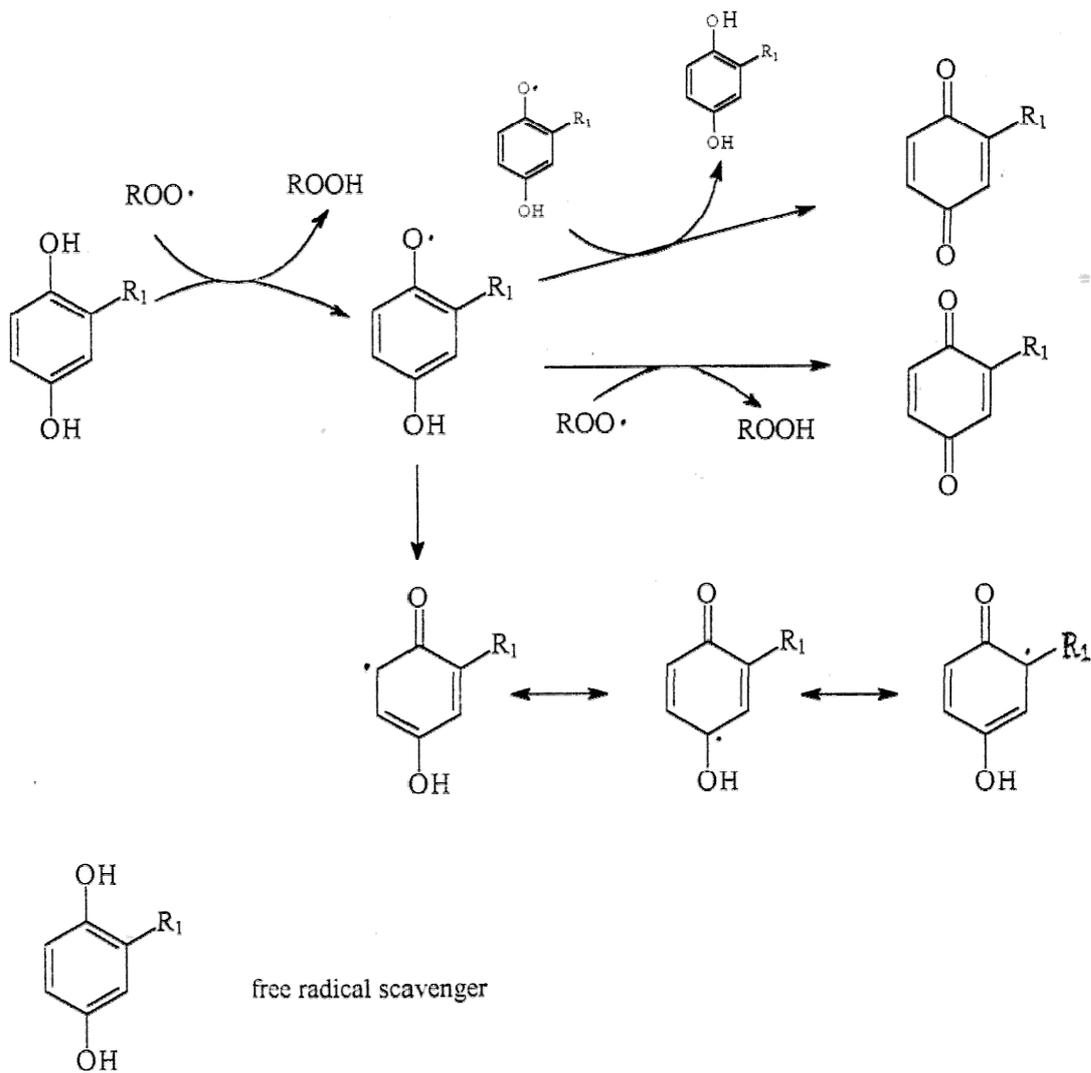
四、抗氧化劑

防止脂質氧化的方法很多，添加抗氧化劑於脂質或含脂質的食品中，是防止脂質氧化的最好方法 (Namiki, 1990)。抗氧化劑依美國食品藥物管理局 (FDA) 之定義為一種物質添加於油脂或含油食品中，能延緩食品的氧化作用，用以保存食品 (王，1993)。然而，抗氧化劑並不能使已經氧化酸敗的油脂回復到原來的狀態，必須預先在食品中添加才能達到抗氧化之效果。

(一) 抗氧化機制

1、自由基清除劑 (free radical terminator)

又稱為一級抗氧化劑，此類抗氧化劑可提供氫或接受自由基以打斷氧化反應的自由基連鎖反應，而其本身則形成穩定的自由基，不會有起始、連鎖生長期，不會進一步促進脂肪氧化，如圖九 (Sherwin, 1978)。此類抗氧化劑大多為酚類化合物，酚類化合物苯環上的氫氧基易釋出氫原子給自由基，而自身苯環結構上不成對電子轉移成穩定的共振結構而阻斷氧化反



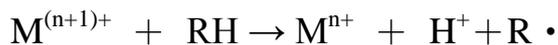
圖九、自由基清除之作用機制。

Fig. 9. Mechanism of antioxidation for free radical scavenger. (Sherwin, 1978).

應的進行。人工合成抗氧化劑的丁基羥基甲氧苯 (butyl hydroxyanisole ; BHA)、丁基羥基甲苯 (butyl hydroxyltoluene ; BHT) 及天然的 α -生育醇等皆屬此型。

2、金屬螯合劑 (chelating agent)

各類食品中自然存在微量的金屬離子，在食品加工過程中，加入的調味料也會滲入少量金屬離子，這些離子大部份具有二種以上的原子價，容易參與氧化還原反應。而其中又以鐵及銅離子促進脂質氧化作用最強 (Dziezak, 1986)。其相關反應式如下：



金屬螯合劑本身不具抗氧化性，故嚴格說來並不屬於抗氧化劑而是在食品系統中與促氧化金屬離子產生螯合，以達到減緩脂質氧化進行之目的。如檸檬酸 (citric acid)、乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA) 等。此外，有文獻指出蛋黃蛋白質中的卵黃磷蛋白 (phosvitin) 較檸檬酸具更佳之金屬螯合能力 (Taborsky, 1991)，使其亦具抗氧化能力 (Lee, Han, & Decker, 2002)。由於 phosvitin 多與磷酸根結合，故在溶液中常以酸

性多肽之型態以各種陰離子之型態與各種陽離子結合。會與 phosvitin 結合之陽離子包括 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等 (張, 1992)。圖十為 phosvitin-鐵離子複合物形成的模式 (Castellantani et al., 2004)。

3、還原劑或氧清除劑 (raducing agent or oxygen scavenger)

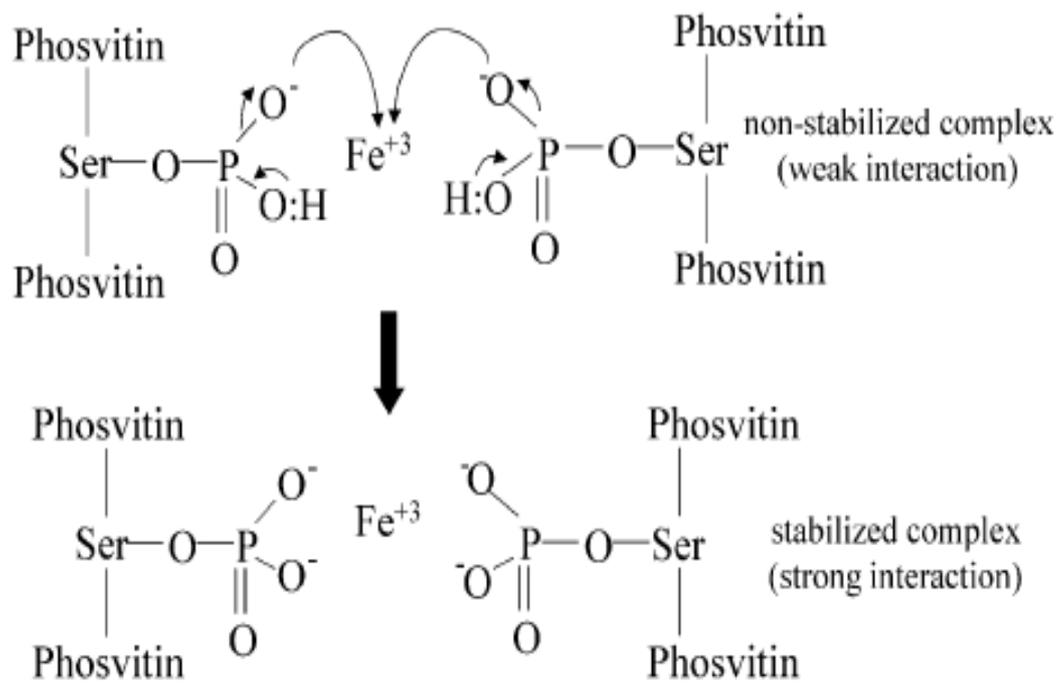
此類抗氧化劑之作用機制在於還原已氧化之過氧化物或捕捉氧分子。以抗壞血酸 (ascorbic acid) 為例，它可以還原失去的質子之酚型自由基，本身則氧化形成去氫抗壞血酸 (dehydroascorbic acid) 而達到增強抗氧化之目的。

4、單旋態氧的抑制劑 (singlet oxygen inhibitor)

空氣中的氧主要以安定的基態三旋態氧 (triplet oxygen; $^3\text{O}_2$) 存在，食品中常見一些光增敏劑如葉綠素、血紫質及核黃素等會吸收光能，使基態提升至激發態，當激發態返回基態時所釋放的能量便被三旋態氧吸收而提升至單旋態氧 ($^1\text{O}_2$)，此類單旋態氧易與食品中不飽和脂肪酸上的雙鍵反應，導致食品劣變。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。 β -胡蘿蔔素 (β -carotene)、三乙基胺 (triethylamine) 等，可吸收光增敏劑所釋放的過多能量，使單旋態氧恢復成穩定之三旋態氧 ($^3\text{O}_2$) 型態，而降低與不飽和脂肪酸反應的機率 (Bando et al., 2004)。

(二) 抗氧化劑之分類

1、人工合成抗氧化劑



圖十、卵黃磷蛋白-鐵離子複合物形成模式。

Fig. 10. Proposed models of phosvitin-ferric ion (Castellantani *et al.*, 2004).

目前美國 FDA 核准使用的合成抗氧化劑有 BHT、BHA、沒食子酸丙酯 (propyl gallate, GC) 和第三丁基氫醌 (tertiary-butyl hydroquinone) 等，屬於自由基抑制劑類型的抗氧化劑。然而，由於人工合成抗氧化劑對人體具有潛在的危害性，故其利用僅限於作為食品的添加物 (Branen, 1975; Becker, 1993)。在過去 20 年的研究中著重於尋找及開發可藉由飲食的攝取，以增進體內抗氧化之防禦以及抑制油脂氧化之安全且天然的抗氧化劑 (Chow, 1988; Finkel & Holbrook, 2000)。

2、天然抗氧化劑

(1) 體內抗氧化防禦系統之抗氧化酶與抗氧化物

由體內抗氧化防禦系統製造的抗氧化酶與抗氧化物，如超氧歧化酶 (superoxide dismutase; SOD)、甲硫胺酸還原酶 (methionine reductase)、麩胱苷肽過氧化酶 (glutathione peroxidase; GSHPx)、觸酶 (catalase) 及輔酶 Q₁₀ (coenzyme Q₁₀)。

(2) 體外補充的抗氧化劑

由於近年來消費者逐漸意識到人工合成的抗氧化劑對人體的潛在危害。因此，天然抗氧化劑之研究也漸漸的受到重視，如來自於草本植物、種子、香辛料、穀物、水果、蔬菜、酵素、蛋白質及胜肽等眾多天然的食品。由於來源不同，它們具有的抗氧化成分及機制亦有所差異，包括 β-胡蘿蔔素、抗壞血酸、α-生育醇、類黃酮 (flavonoids)、兒茶素 (catechin)、麩

胱甘肽 (glutathione ; GSH)、肌肽 (carnosine)、甲基肽 (anserine) 、卵清蛋白 (ovalbumin) 及蛋白質水解物 (孫, 2009)。現階段而言, 以植物性之天然抗氧化劑之研究成果最為豐碩; 動物性來源之抗氧化成分機制則多處於推測階段, 有待多方面研究及實驗加以證實之。

五、蛋白質酵素水解物之抗氧化性

食品中的蛋白質不僅是胺基酸的提供者, 在經過人體消化道消化或食品加工過程中之酵素水解後, 可產生具有抗高血壓、增強免疫、抗氧化、抗菌、降低膽固醇等生理活性之胜肽片段 (Bioactive peptide) (Clare and Swaisgood, 2000)。而研究顯示此類的活性胜肽通常為 2-20 個胺基酸組成之胜肽片段, 可扮演生理調節之功能 (Pihlanto-Leppala, 2001)。在過去的研究中雙胜肽的肌肽 (carnosine) 已被證實其具有良好的抗氧化能力 (Decker and Faraji, 1990)。在雞蛋黃 (Sakanaka *et al.*, 2004; 2006)、菜籽 (Cumby *et al.*, 2008)、羅式圓鯪 (Thiansilakul *et al.*, 2007)、豬血漿 (Liu *et al.*, 2010)、金帶細鯪脫脂魚肉 (Klompong *et al.*, 2007)、銀鯉 (Dong *et al.*, 2008)、雞腿骨 (鄭, 2007) 及牡蠣 (邱, 2007) 等蛋白質來源之酵素水解物皆顯示具有抗氧化之功能。然而, 由於蛋白質與胜肽之抗氧化性取決於其分子量大小及化學性質如疏水性及序列中具有電子轉移能力之胺基酸殘基 (Qian *et al.*, 2008)。因此, 在不同蛋白質來源及水解條件下各水解物所具有的抗氧化能力會有所差異。這些水解物之抗氧化特性可歸因於其自身具數種特質之協

同作用，包括清除自由基能力、螯合金屬離子能力、清除氧或供氫能力及抑制脂質過氧化能力等 (Moure *et al.*, 2006)。蛋白質-酵素水解物中的抗氧化能力高低與其本身胜肽序列中胺基酸殘基特性有相當大的關聯 (蔡, 2009)。各影響因素分述如下:

(一) 分子量的變化

Sakanaka 等人 (2004) 研究蛋黃蛋白質在亞麻油酸氧化系統下的抗氧化活性。研究中分別添加蛋黃蛋白質水解物、蛋黃蛋白質和胺基酸混合液於含有亞麻油酸的餅乾中，在 40°C 下，培養 8 天以測其抗氧化性，試驗結果指出其抗氧化活性大小依序為蛋黃蛋白質水解物、蛋黃蛋白質和胺基酸混合液。由此可知，利用水解的方式可增進蛋白質原本的抗氧化能力。相反地，當過度的水解也會破壞其抗氧化能力。

有研究指出 5-16 個胺基酸殘基組成之胜肽片段具有抑制亞麻油酸自氧化之能力 (Chen *et al.*, 1995)；也有研究指出二或三胜肽片段具抗氧化能力 (Kawashima *et al.*, 1979；Saito *et al.*, 2003；Sakanaka *et al.*, 2004)。不論如何，水解物的抗氧化活性大多優於水解前之蛋白質，而小分子胜肽片段優於大分子的胜肽片段。

文獻指出美洲大赤魷魚皮明膠經五種酵素水解所得水解物中以利用 Trypsin 水解之水解物具有最高水解率及抗氧化性。作者指出較高的抗氧化能力歸因於在高水解率下所產生的短胜肽 (Mendis *et al.*, 2005)。以超濾膜

區分小麥麵筋水解物，其結果顯示以 5KDa 濾膜限值區分之濾液（小分子範圍之區分物）較濃縮液（大分子範圍之區分物）更具抗氧化力 (Wang *et al.*, 2007)。水解物中胜肽片段之結構及分子量等性質對水解物之抗氧化性具有高度的影響 (Jeon *et al.*, 1999)。在水解豬皮明膠 (porcine collagen) 之抗氧化相關研究中，利用三種酵素進行階段式的混合酵素水解，可有效的提升水解率，且隨著水解率的提升所得的水解物氫氧自由基清除能力與金屬螯合能力亦隨之上升，而進一步分離純化後發現分子量 430 Da 之 Gln-Gly-Ala-Arg 為主要抗氧化活性胜肽 (Li *et al.*, 2007)。水解豬血漿蛋白質中亦顯示隨著水解率的上升在 DPPH 自由基清除能力、金屬螯合能力、還原力及抑制 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 的生成皆隨之上升，而經分離純化後分子量 441 Da 之 His-Asn-Gly-Asn 為主要抗氧化活性胜肽 (Liu *et al.*, 2010)。由此可知小分子之胜肽具有較佳的抗氧化性。

(二) 小分子胜肽含量之影響

目前胜肽片段之分子量大小與其抗氧化機制之間的關係雖不明確，然而在相關的研究中大多指向小分子的胜肽片段較大分子的胜肽片段更具抗氧化能力。在水解鯖魚蛋白質的研究中分別以內源性的酵素及 Protease N (EC 3.4.21.66) 進行水解作用，其自由基清除能力及還原力皆隨著水解時間的增加而上升，其中高水解率的 Protease N 水解物較內源性的酵素水解物更具抗氧化力 (Wu *et al.*, 2003)。作者亦指出水解物中小分子胜肽總量與抗氧

化性之間有高度的相關性 ($r^2=0.98$)，而較多的胜肽含量可展現較高的抗氧化能力。此外，在豬血漿蛋白水解物之研究中指出水解率的上升會使更多胜肽鍵而斷裂，而使得自由的羧基 (-COOH) 與胺基 (-NH₃) 數目增加，進而增加了氫離子 (質子或電子)，因而提供電子使自由基形成安定的物質 (Liu *et al.*, 2010)。在雞蛋黃水解之研究中作者使用水解 6 hr 的水解物探討不同濃度的水解物對抗氧化之關係，其結果顯示水解物在抑制 β -胡蘿蔔素脫色、超氧自由基清除能力、清除 DPPH 自由基、清除氫氧自由基及抑制牛絞肉生成 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 等能力中皆有劑量依存的關係 (Sakanaka *et al.*, 2006)。顯示當小分子的胜肽含量愈高時，確實對於多種抗氧化機制皆具有貢獻。

(三) 疏水性胺基酸的增加

酵素對蛋白質之水解作用除了會使其分子量降低及離子性官能基數目增加外，亦具有使疏水性基暴露出來的特性 (鄭，1997；黃，2000)。對於抗氧化性具有正面的幫助。在美洲大赤魷魚皮明膠水解物的研究中具抑制亞麻油酸自氧化抑制能力之水解物，經分離純化後之胜肽片段富含疏水性的胺基酸 (>51 %)，作者指出此類的胺基酸因與亞麻油酸間有高度的親和力 (Mendis *et al.*, 2005)。因此作者指出當亞麻油酸的自氧化過程所產生的油溶性自由基，其胜肽片段因富含疏水性胺基酸可使其更容易提供質子給疏水性的過氧化自由基，而達到抗氧化的目的。亦有學者指出黃豆蛋白質水解

物中的胜肽片段雖含有 His 但缺少疏水性胺基酸而導致此胜肽片段不具抗氧化能力 (Chen *et al.*, 1998)。顯示疏水性胺基酸可能具有增加胜肽與油脂之間的親和性而使胜肽片段具抗氧化能力的胺基酸更容易與自由基作用。因此，胜肽片段的疏水性有助於抗氧化性的提升 (Murase *et al.*, 1993)。

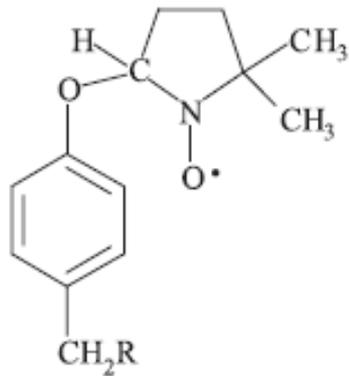
(四) 具有芳香族殘基之胺基酸

具有芳香族殘基之胺基酸諸如 Tyr、Trp 及 His 等，此類的胺基酸殘基上所帶有的芳香族殘基可經由電子的轉移而使活性氧 (reactive oxygen species; ROS) 穩定 (Qian *et al.*, 2008)。在 Tyr 與抗氧化之相關文獻中指出由於在芳香環上接有 OH 基團的 Tyr，它具有提供一個氫的能力，故可對自由基有清除的效果 (Cumby *et al.*, 2008)。亦有研究指出胜肽的抗氧化性與其組成有關，如一個三胜肽上的 C 端為 Tyr 或 Trp 可展現出強烈的自由基清除力 (Saito *et al.*, 2003)。在 His 的抗氧化相關研究中，肌肽可利用其 His 上的 imidazole ring 於 N-3 部位與銅、鈷離子進行螯合 (Brown, 1981; Brown and Antholine, 1979)，使其具有金屬螯合、減少超氧陰離子，進而延緩氧化之效果 (Kohen *et al.*, 1991)，在卵蛋白水解物所純化之抗氧化胜肽片段 Pro-His-His 中，作者指出其抗氧化性歸因於 His 上的 imidazole ring 具有提供質子之能力。且 Chen 等人 (1996) 以合成方式模擬胜肽序列與抗氧化的關係發現，若將此胜肽刪去終端的 His，此胜肽之脂質抑制能力也隨之下降。顯示 His 確實對於油脂的氧化反應具有抑制脂質自氧化之能力。圓小沙

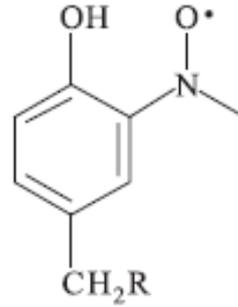
丁魚 (*Sardinella aurita*) 廢棄物蛋白質使用沙丁魚腸粗酵素進行水解，在進一步分離純化後之五個抗氧化胜肽中，以分子量 431.2 Da 之 Leu-His-Tyr 胜肽片段具有最高的清除 DPPH 自由基能力 (Bougatef *et al.*, 2010)。此結果亦顯示芳香族殘基之胺基酸 (His、Tyr) 確實具提升抗氧化之能力。此外，目前已有研究利用電子自旋共振儀及同位素 ^{13}C 與 ^{17}O 的標定，探討胺基酸側鏈捕捉自由基的位置進行試驗其試驗結果如圖十一，圖中顯示 Tyr、His 及 Trp 其捕捉 $\cdot\text{NO}$ 自由基的位置分別位於其 C-2、C-3 及 C-6，而 Tyr 亦對於羥自由基 DMPO \cdot (dimethylpyrroline-N-oxide) 具有捕捉能力，其自由基位於 Tyr 之苯環上的氫氧基 (Michael and Clare, 2003)。

(五) 含硫胺基酸

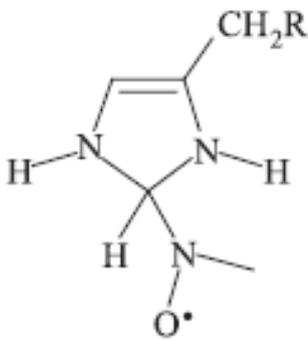
豬皮膠原蛋白質水解物經分離純化後，所產生的四個抗氧化胜肽片段中，第 2、3 及 4 號胜肽所含的 Met 和 Cys 對自由基的清除能力具重要的貢獻，由於 Met 可藉由氧化成 Met sulfoxide 提供電子，Cys 則藉由側鏈上的硫氫基提供一個氫 (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005) 或捕捉一個自由基，如圖十一 (Chen *et al.*, 1999)。另外，圖十二顯示 Met 的結構中 thioether 能與脂質氫過氧化物形成穩定的物質以抑制油脂氧化連鎖反應 (Panzenbock and Stocker, 2005)。



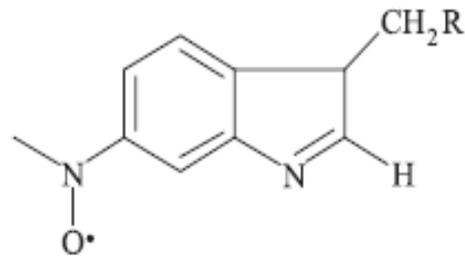
Tyrosine phenoxyl radical adduct



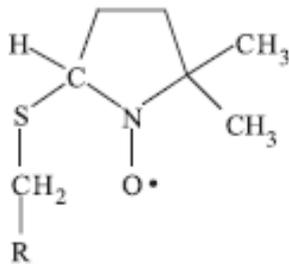
Tyrosine C-3 radical adduct



Histidine C-2 radical adduct



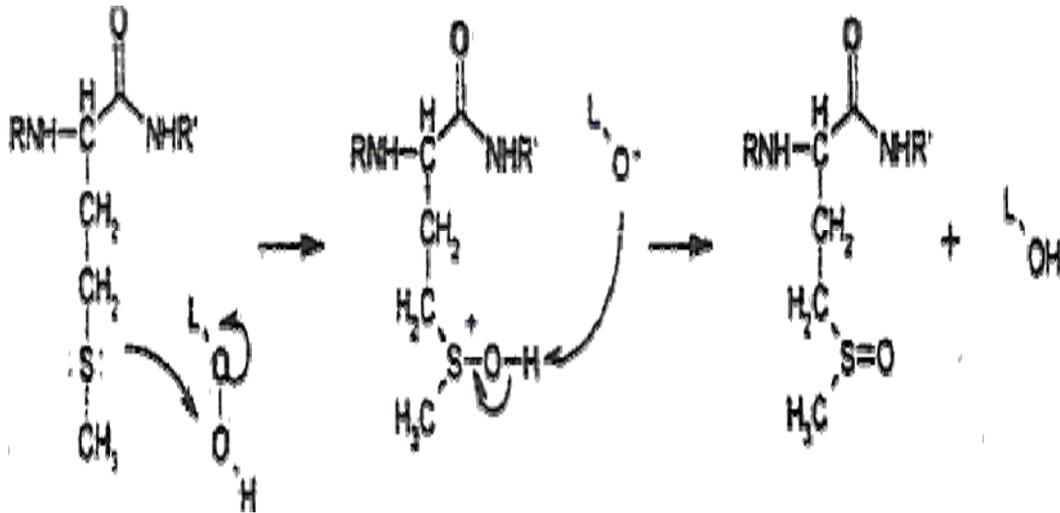
Tryptophan C-6 radical adduct



Cysteine S-centered radical adduct

圖十一、胺基酸之側鏈捕捉自由基的例子。

Fig. 11. Examples of amino acid side chain radical by spin traps (Michael and Clare, 2004).



圖十二 Met 之側鏈所含的 thioether 以一對電子還原油脂過氧化物之形成模式。

Fig. 12. Proposed two-electron reduction of lipid hydroperide (LOOH) by thioether-containing side chain of methionine (Panzenbick and Stocker, 2005).

參、材料與方法

一、實驗材料

本試驗所使用之鴨蛋種為褐色菜鴨 (*Brown Tsaiya Duck*) 之鴨蛋為購自好修牧場 (農畜牧字 01498 號, 彰化, 台灣) 並儲存於 4°C 冷藏櫃。鴨蛋去除蛋殼、蛋白及繫帶後, 將蛋黃隨機分成三組, 每組約 1 公斤 (約 60-70 枚鴨蛋), 參考並修飾 Sakanaka 等人 (2004) 所述之方法進行鴨蛋黃粗蛋白質之製備, 其步驟如圖十三所示。

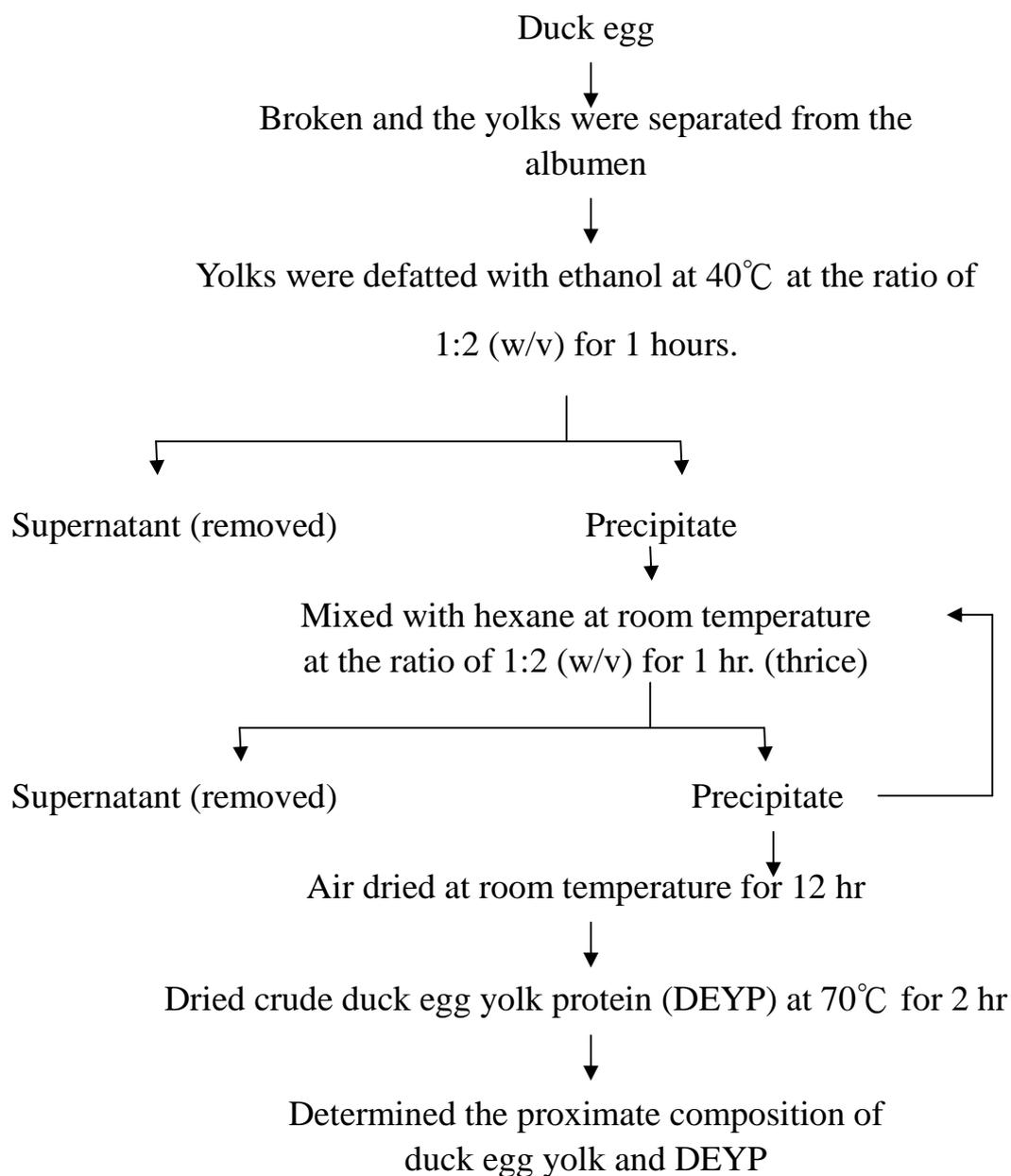
二、試驗設計

本試驗之試驗設計如圖十四、圖十五及圖十六所示。

三、實驗方法

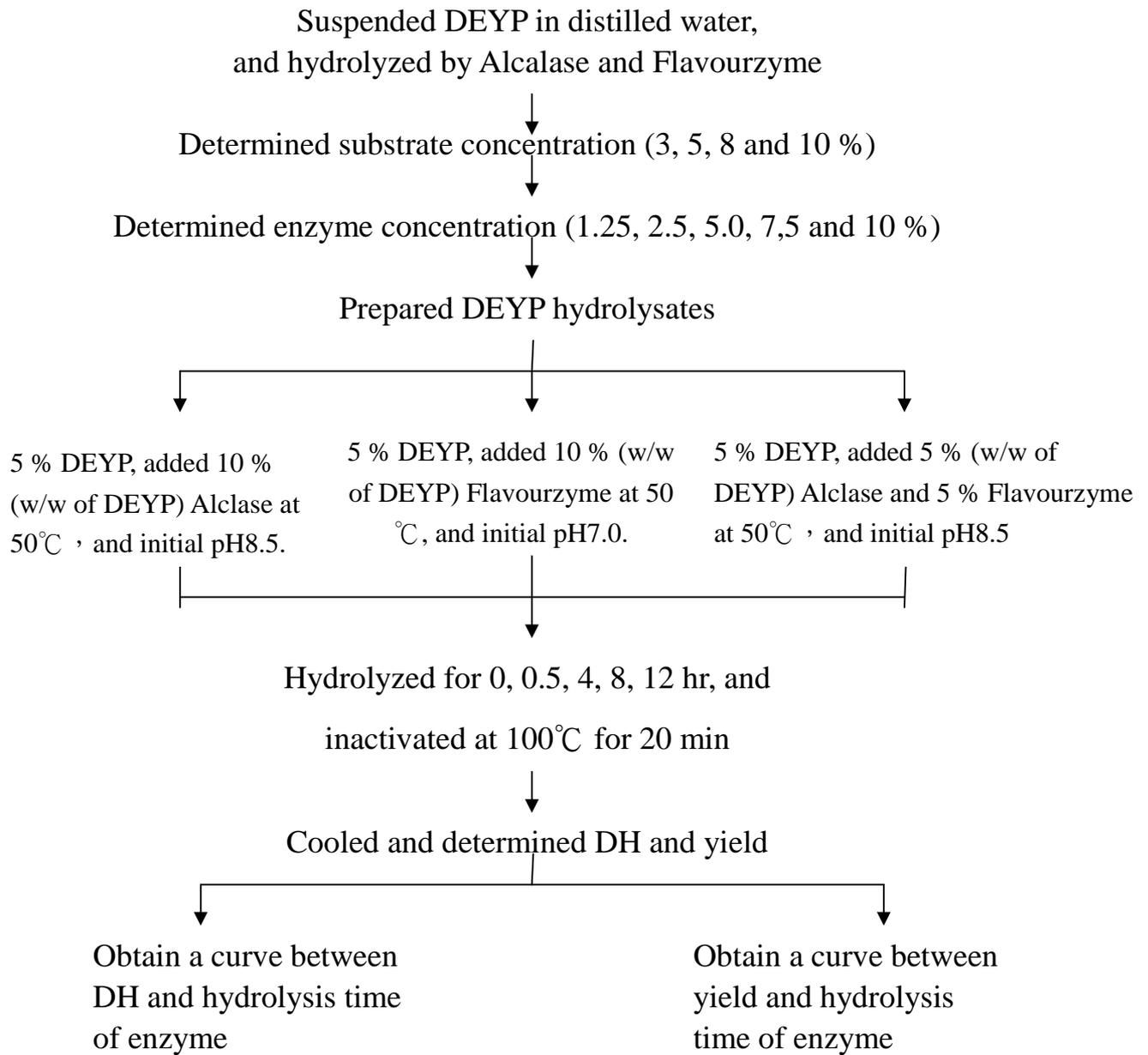
(一) 鴨蛋蛋白質水解物製備

配製 5% (w/w) 粗鴨蛋黃蛋白質水溶液, 再以 1N 的氫氧化鈉 (sodium hydroxide; NaOH; 聯工化學廠股份有限公司, 新竹, 台灣) 調整溶液的 pH 值至 8.5 (Alcalase 及混合酵素) 或 7.0 (Flavourzyme)。分別加入不同的酵素濃度 (w/w of protein) Alcalase (Novo Nordisk, Bagsvaerde, Denmark) 或 Flavourzyme (Novo Nordisk, Bagsvaerde, Denmark), 於 50°C 下反應, 達水解時間後立即取出並以 100°C 水浴 20 分鐘, 終止酵素水解反應。而後以流水方式冷卻至室溫, 取出 15 ml 作為測量水解率與產率用, 其餘以冷凍離心機 (refrigerated centrifuge; himac SCR 20B, Hitachi, Tokyo, Japan) 於 4°C 下以



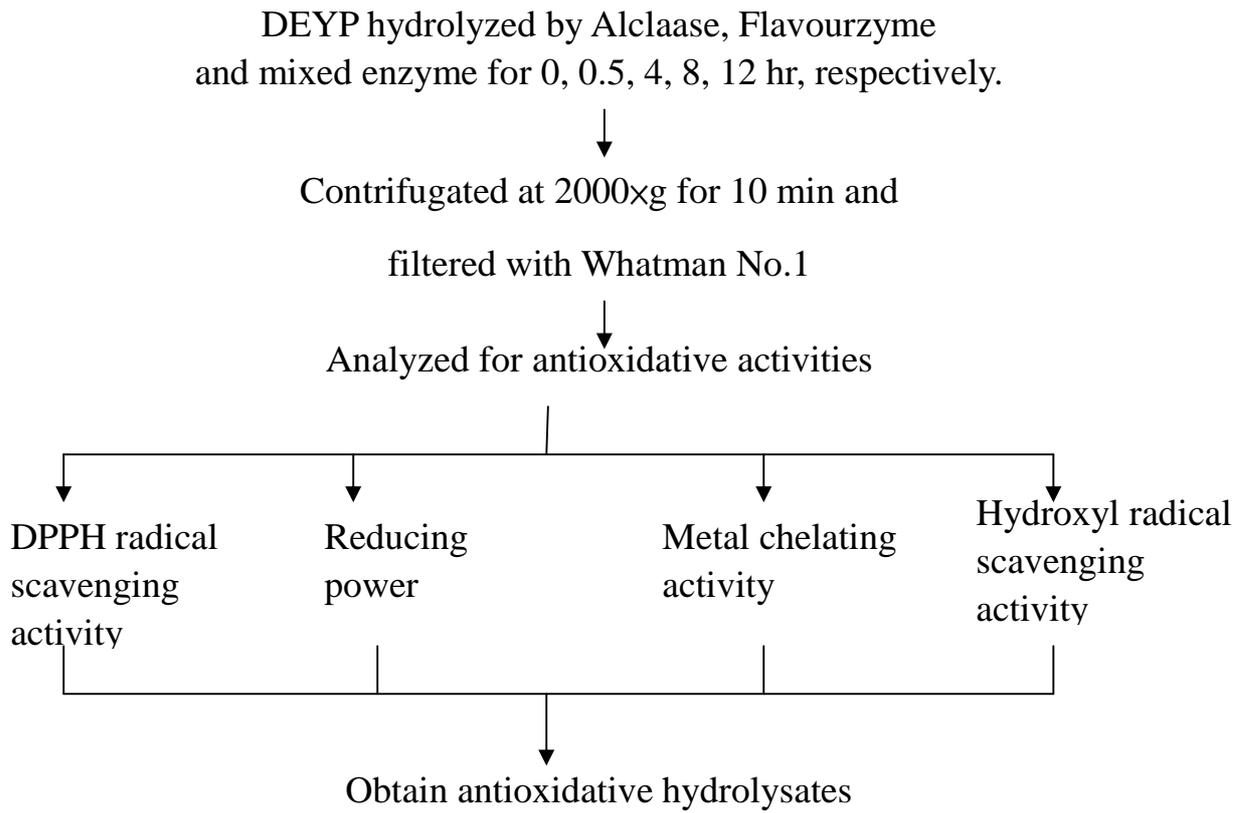
圖十三、製備粗鴨蛋黃蛋白質 (DEYP) 之流程圖。

Fig. 13. The flow chart of preparation for crude duck egg yolk protein (DEYP).

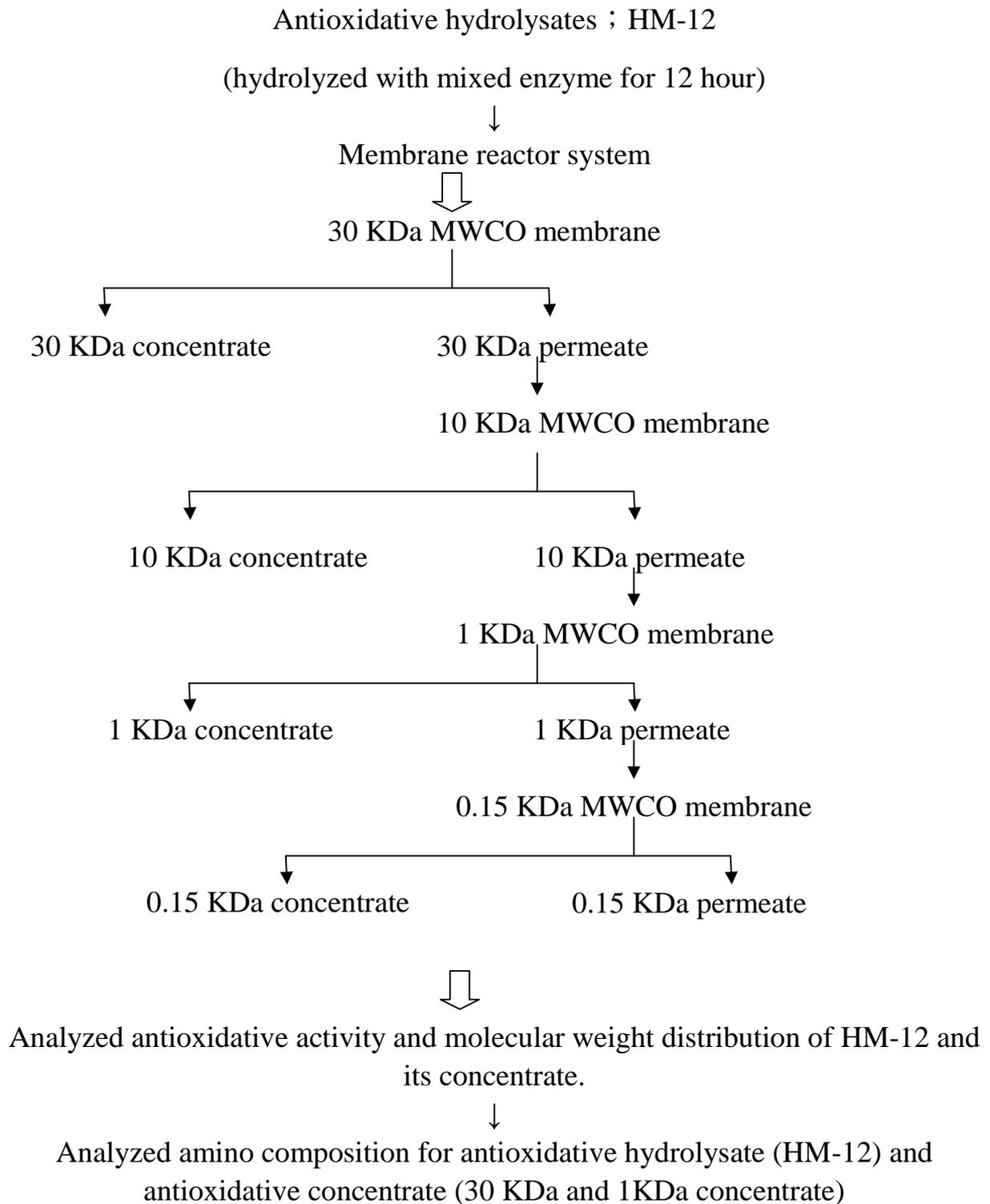


圖十四、試驗設計 (一)。

Fig. 14. Experimental design 1.



圖十五、試驗設計 (二)。
Fig. 15. Experimental design 2.



圖十六、試驗設計 (三)。
Fig. 16. Experimental design 3.

2000×g 離心 10 分鐘，經濾紙 (Whatman, NO. 1, Maidstone, England) 過濾後，將水解物裝於 PE 塑膠瓶中，並冷藏於 4°C 備用。

(二) 基本成分分析

1、水分 (moisture) 含量測定 (AOAC, 1995)

取約 10 克重的樣品置於已秤至恆重秤量皿中，鋪平並紀錄樣品重，以溫度 95-100°C 之真空烘箱 (Risen, Yingge, Taiwan) 內部壓力 <25 mmHg 後開始計時，進行 8 hr 的減壓乾燥，而後移至乾燥箱中冷卻至室溫後秤重達恆重為止。

【計算公式】

$$\text{水分含量(\%)} = \frac{(W_1 + W_2) - W_3}{W_2} \times 100\% \quad (4)$$

W_1 : 秤量皿之乾重 (g)。

W_2 : 樣品之重量 (g)。

W_3 : 經乾燥後達恆重的秤重皿加樣品之重量 (g)。

2、粗脂肪 (crude fat) 含量測定 (AOAC, 1995)

將 125 ml 之三角錐型瓶移至於烘箱 100°C 2-3 hr，冷卻後秤重，稱取均勻混合 2 g 蛋黃 (1g 蛋黃粉) 於 Mojonnier fat-extraction tube (Kontes, Vineland, USA) 中，緩慢地加入 10 ml HCl (聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣)，且用力地混合均勻，置於 70 °C 水浴中並加熱至沸騰 (bring to boiling) 並持續沸騰 30 分鐘 (在每 5 分鐘搖晃一次)，取出試管。加水充滿

下球部，並冷卻至室溫，加入 25 ml 之石油醚（島久藥品株式會社，大阪，日本）混合均勻，靜置，使溶劑分層，並將上層液到入預先秤重 125 ml 之三角錐型瓶中。再加入 15 ml 之石油醚，混合均勻，倒出上清液於三角錐形瓶中；再重複此步驟。將三角錐形瓶置於水浴使石油醚蒸散，待石油醚蒸散後於，烘箱 100°C 1 hr，冷卻，秤重。

【計算公式】

$$\text{粗脂肪 (\%)} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100 \% \quad (5)$$

W_1 : 樣品重量 (g)

W_2 : 三角錐型空瓶重量 (g)

W_3 : 三角錐型空瓶加樣品乾燥至恆重之總重量 (g)

3、蛋白質含量的測定 (AOAC, 1995)

依據微量凱氏氮定量 (Micro-Kjeldahl) 之測定，秤取混合 2-3 g 蛋黃或 1 g 蛋黃粉放入玻璃消化管 (digestion glass tube) 中，並與空白組分別依序加入 1 顆消化錠 (含 5 g K_2SO_4 及 5 mg Se; FOSS, Höganäs, Sweden)、3-5 顆沸石 (林純藥工株式會社，大阪，日本) 及 20 ml 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, Flawil, Switzerland) 上，以 400-450°C 加熱進行消化，使蛋白態氮 (protein nitrogen) 分解轉變成硫酸銨 (ammonium sulfate)，消化過程中以廢氣處理裝置 (Büchi, Digestion Unit B-414, Flawil, Switzerland) 接收並中和消化過程

所產生的廢氣，直到消化液從黑褐色消化分解至澄清透明，取出消化管冷卻後，加入 40 ml 蒸餾水，於凱氏氮蒸餾裝置 (Büchi, Digestion Unit B-314, Flawil, Switzerland) 上加入 70 ml 之 30 % 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，以裝有 60 ml 之 4 % 硼酸 (片山試藥株式會社，大阪，日本) 並添加 2-3 滴 BG-MR 指示劑之接收瓶接收蒸餾液之氨氣 (ammonia)，收集至總體積達 160 ml，最後以 0.1 N HCl 滴定至與空白組一致的之顏色，並計算出含氮量，在換算成粗蛋白質含量。

【計算公式】

$$\text{粗蛋白質 (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.0014 \times N.F}{W} \times 100 \quad (6)$$

V_1 : 樣品所消耗 HCl 的滴定量 (ml)

V_2 : 空白組所消耗 HCl 的滴定量 (ml)

N.F: 氮係數 6.25 (蛋白質含 16 % 氮，故 $100/16=6.25$)

0.0014: 1ml 0.1N HCl (0.0001 mol) * 氮之分子量 14，故滴定 1 ml

0.1N HCl 之相對氮量為 0.0014 g

W: 樣品重量 (g)

4、灰份 (ash) 含量之測定 (AOAC, 1995)

將坩鍋置於含有 10 % 稀鹽酸 (聯工化學廠股份有限公司，新竹，台灣) 溶液中，加熱 2 hr，冷卻以去離子水洗淨，置乾後，再將坩鍋置於灰化爐 (ash oven; Nabertherm, N5/RL, Lilienthal, Germany) 中 525°C 、8 hr，以鑷子夾取

於坩鍋置於乾燥器中冷卻，秤坩鍋之乾重。

秤樣品約 5 克置於烘箱 (Risen, RUD-903, Taipei, Taiwan) 中 100°C 下乾燥 8 hr 後，置於加熱器 (hot plate stirrer ; Corning, PC-351, New York, USA) 上直到完全燒焦且冒煙停止，再放於灰化爐 525°C、18 hr，以鑷子夾取於坩鍋置於乾燥器中冷卻並秤重紀錄之。

【計算公式】

$$\text{灰份 (\%)} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100 \quad \% \quad (7)$$

W_1 : 坩鍋之乾重 (g)

W_2 : 樣品之重量 (g)

W_3 : 經灰化後坩鍋加樣品之重量 (g)

(三) 蛋白質水解率測定

依據 Church *et al.* (1983) 所述之 *o*-phthaldialdehyde (OPA) 分光光度法測定鴨蛋黃蛋白質水解物之水解率。

1. OPA 試劑配製 (需當天現配，而且要避光):

25ml 0.1M 四硼酸二鈉 (disodium tetraborate decahydrate ; Merck, Darmstadt, Germany)、2.5ml 20 % 十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate ; SDS ; Usb corporation, Cleveland, Missouri, USA)、1ml OPA (40mg OPA (Merck, Darmstadt, Germany) /1ml 甲醇溶液) 及 100 μ l 2-mercaptoethanol (Merck, Hohenbrunn, Germany) 於棕色瓶中 (避光) 定量至 50 ml。

2. L-Leucine 標準檢量曲線之製作

秤取 10 mg L-Leucine (Sigma, St. Louis, MO, USA)，以蒸餾水定量至 10 ml，此為 1000 µg/ml L-Leucine 原液。再以蒸餾水稀釋配置下列不同濃度之 L-Leucine 稀釋液，並依 L-Leucine 之分子量 131.71 Da 換算稀釋液之毫莫耳濃度 (mM) 作為表示。

µg/ml	0	15	30	60	90	120	150	180	210
mM	0.000	0.115	0.229	0.458	0.687	0.916	1.145	1.374	1.603

測定時取稀釋後的 L-Leucine 稀釋液 100µl，直接加入 1 ml 現配 OPA 試劑均勻混合，於室溫下反應 2 分鐘後，以分光光度計 (Thermo, Wisconsin, USA) 測定波長 340 nm 下吸光值。繪製 L-Leucine 標準檢量曲線，如附錄一所示。

3. 分析步驟

先將鴨蛋黃蛋白質水解物以蒸餾水稀釋，取稀釋液 100µl 與 1 ml 現配 OPA 試劑均勻混合，於室溫下反應 2 分鐘後，測定稀釋水解液在波長 340 nm 下之吸光值 (以 0 分鐘之鴨蛋黃蛋白質均質液為空白組)。並注意稀釋水解液之吸光值需介於 L-Leucine 標準檢量曲線之性範圍 0-1 間。

【計算公式】

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% \quad (8)$$

h: 在水解的過程中被切的胜肽數量稱為水解當量，利用 L-Leucine 標準檢

量曲線之關係方程式可得胜肽鍵數 (mmol)。

例如：測得 50 倍稀釋樣品在 OD₃₄₀ nm 下吸光值為 0.22 = y，帶入

L-Leucine 檢量曲線 (附錄一) 線性回歸的公式 $y = 0.5566x + 0.0422$ 得

$x = 0.319$ (mM) α -NH₂， $h = 0.319 \times 50$ (稀釋倍數) = 15.95 (mM) α -NH₂。

h_{tot} : 蛋白質溶液所含的各種胺基酸的毫莫耳數的總和。

例如：蛋白質溶液為 5%， $h_{tot} = 5\% \text{ (g/ml)} \times 8.0 \text{ (mmol/g)}$ (轉換係數) = 0.4

mmol/ml = 0.4 M = 400 mM。

轉換係數: 8.0 轉換係數為參考 Adler-Nissen (1986) 及 Pommer, K (1995)

之計算方式及結果。

因此，DH % = $15.95 \text{ mM} / 400 \text{ mM} \times 100\% = 3.99\%$ 。

(四) 產率測定 (Chiang *et al*, 1999)

使用微量凱氏氮分析法測定 DEYP 水解物的總氮 (total nitrogen; TN) 及 TCA 可溶性氮 (NPNp)，並扣除未水解的 DEYP 中起始非蛋白態氮 (nonprotein nitrogen; NPNi) 加以校正 (AOCS, 1989) 後換算 DEYP 水解物的產率 (yield)。

取 2 ml DEYP 水解物與 4 ml 15 % 三氯醋酸 (trichloroacetic acid; TCA; Sigma, Steinheim, Germany) 溶液混合過濾 (Whatman, NO.1, Maidstone, England) 後，放入玻璃消化管 (digestion glass tube) 中，並與空白組分別依序加入 1 顆消化錠 (含 5 g K₂SO₄ 及 5 mg Se; FOSS, Höganäs, Sweden)、3-5

顆沸石 (林純藥工株式會社, 大阪, 日本) 及 20 ml 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, Flawil, Switzerland) 上, 以 400-450°C 加熱進行消化, 使蛋白態氮 (protein nitrogen) 分解轉變成硫酸銨 (ammonium sulfate), 消化過程中以廢棄處理裝置 (Büchi, Digestion Unit B-414, Flawil, Switzerland) 接收並中和消化過程所產生的廢氣, 直到消化液從黑褐色消化分解至澄清透明, 取出消化管冷卻後, 加入 40 ml 蒸餾水, 於凱氏氮蒸餾裝置 (Büchi, Digestion Unit B-314, Flawil, Switzerland) 上加入 70 ml 之 30 % 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, 以裝有 60 ml 之 4 % 硼酸 (片山試藥株式會社, 大阪, 日本) 並添加 2-3 滴 BG-MR 指示劑之接收瓶接收蒸餾液之氨氣 (ammonia), 收集至總體積達 160 ml, 最後以 0.1 N HCl 滴定, 根據 HCl 滴定量計算出 DEYP 水解物之 TCA 可溶性氮 (TCA-souble nitrogen)。

【計算公式】

$$X \% = \frac{NPN_p - NPN_i}{TN - NPN_i} \times 100\% \quad (9)$$

NPN_p (Non-protein nitrogen of product): DEYP 水解物之 TCA 可溶性氮 (N mg); $NPN_p = (V_p - V_b) \times 0.0014$ 。

NPN_i (initial non-protein nitrogen of product): 未水解的 DEYP 均質液之起始 TCA 可溶性氮 (N mg); $NPN_i = (V_i - V_b) \times 0.0014$ 。

TN (total nitrogen): DEYP 水解物之總氮含量 (N mg) ; $TN=(V_{tot}-V_b) \times 0.0014$ 。

V_p =DEYP 水解物之 TCA 可溶性氮的相對 HCl 滴定量 (ml)

V_b =空白組之相對 HCl 滴定量 (ml)

V_i = 未水解的 DEYP 均質液之 TCA 可溶性氮的相對 HCl 滴定量 (ml)

V_{tot} = DEYP 水解物之總氮的相對 HCl 滴定量 (ml)

(五) 抗氧化能力測定

1. DPPH 自由基清除能力 (Nagai et al., 2003)

取 0.3 ml 1.0 mM DPPH (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)、2.4 ml 乙醇 (台灣菸酒公賣局, 台灣) 及 0.3 ml 水解液混合均勻 (控制組:以 0.3 ml 蒸餾水取代水解液; 空白組:0.3 ml 水解液加上 2.7 ml 蒸餾水)。靜置反應 30 分鐘後, 在測定波長 517 nm 下之吸光值 (以蒸餾水歸零)。DPPH 的乙醇溶液在波長 517 nm 下有強烈吸光值。當其被抗氧化劑清除時, 吸光值會消失下降。

【計算公式】

DPPH radical-scavenging activity (%) =

$$\left(1 - \frac{A_{517} \text{ of sample} - A_{517} \text{ of sampleblank}}{A_{517} \text{ of control}}\right) \times 100\% \quad (10)$$

並以 α -生育醇 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 為正對照組; 製作 α -生育醇標準曲線 (附錄二), 利用此標準曲線可求得水解物之相對抗氧化能力

之當量，以相對於多少 ppm 之 α -tocopherol 為表示。

2. 還原力 (Wu *et al.*, 2003 ; Thiansilakul *et al.*, 2007)

取 1 ml 水解物、1 ml 0.2 M pH6.6 磷酸鹽 (林純藥工業株式會社，大阪，日本) 緩衝液及 1 ml 1 % 鐵氰化鉀 (Potassium ferricyanide; 片山試藥株式會社，大阪，日本) 混合 (control 組以蒸餾水取代水解液) 置於 50°C 下反應 20 分鐘，再加入 1 ml 10 % 三氯醋酸 (Sigma, Steinheim, Germany)。取 1 ml 上述混合液加入 1 ml 蒸餾水及 200 μ l 0.1 % 的氯化鐵 (ferric chloride; 島久藥品株式會社，大阪，日本) 混合，於測定波長 700 nm 下之吸光值，吸光值越高，表示還原能力越強。

並以 α -生育醇 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 作為正對照組，以求得水解物之還原能力之當量，附錄三為 α -生育醇之還原力的標準曲線。

3. 金屬螯合能力 (Decker and Welch, 1990)

1 ml 的水解物和 3.7 ml 的蒸餾水混合 (Control 組：以 1 ml 蒸餾水取代水解液；空白組：1 ml 水解液及 4 ml 蒸餾水且不加下述其他試劑)。將上述混合液加入 0.1 ml 溶於甲醇的 2 mM 氯化亞鐵 (林純藥工業株式會社，大阪，日本) 和 0.2 ml 的 5 mM 3-(2-pyridyl)-5,6-bis (4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)，在室溫靜置 20 分鐘。在波長 562 nm 下測吸光值。吸光值越低，表示對亞鐵離子之螯合能力越強。

【計算公式】

$$\text{Chelating activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{562} \text{ of sample} - A_{562} \text{ of sample blank}}{A_{562} \text{ of control}}\right) \times 100 \% \quad (11)$$

以 EDTA (Merck, Darmstadt, germany) 為標準品，並製作標準曲線 (附錄四)，水解物中之金屬螯合能力可由此標準曲線求得相對 EDTA 的當量 (ppm)。

4. 氫氧自由基清除活性測定 (Chung *et al.*, 1997)

0.45 ml 0.2M 磷酸鈉 (林純藥工業株式會社，大阪，日本) 緩衝溶液 (pH7.4)、0.15 ml 10mM 2-脫氧核糖 (2-deoxyribose; ICN Biomedicals inc, Ohio, U.S.A)、0.15 ml 10mM FeSO₄-EDTA (FeSO₄; iron II sulfate; 和光純藥工業株式會社，大阪，日本，EDTA ; Merck, Darmstadt, germany)、0.525 ml 蒸餾水和 0.075 ml 的水解液以放入試管，混合均勻 (Control 組:蒸餾水取代水解液)，加入 0.15 ml 10mM 過氧化氫，混合均勻 (加入過氧化氫，反應正式開始)，在 37°C 下，培養 4 hr 後，加入 0.75 ml 2.8% 三氯醋酸 (Sigma, Steinheim, Germany) 和 0.75 ml 的 1.0 % 2-硫代巴比妥酸 (2-thiobarbituric ; TBA ; Steinheim, Germany, Sigma) 以終止反應，將其混合液加熱 10 分鐘後，流水冷卻，於 520 nm 下測定吸光值。以下列方程式計算水解物之氫氧自由基清除能力百分比:

$$\text{Hydroxyl radical-scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{562} \text{ of sample}}{A_{562} \text{ of control}}\right) \times 100 \% \quad (12)$$

5. 抑制亞麻油酸過氧化能力 (滿田等, 1967; 蘇等, 1991; Sakanaka *et al.*, 2004)

將欲測定之水解物或標準品各取 0.2 ml (控制組以去離子水取代水解物) 加入具磨砂蓋子的 50 ml 三角錐形瓶中, 在分別加入 0.13 % 亞麻油酸 (Sigma, Steinheim, Germany) 甲醇溶液及 10 ml 1/30M pH 7.0 之磷酸緩衝溶液, 最後在以去離子水定量至 25 ml。將三角錐形瓶密封, 置入 40°C 循環式恆溫烘箱內, 每隔 24 hr 定時取出進行顯色反應及比色分析。

顯色反應:取上述反應基質 0.2 ml 至含有 9.4 ml 75 % 甲醇水溶液, 在依次加入 0.2 ml 20 mM 氯化亞鐵 (林純藥工業株式會社, 大阪, 日本) 及 0.2 ml 30 % 硫氰酸銨 (Ammonium thiocyanate; 關東化學株式會社, 東京, 日本) 溶液。混合均勻後反應三分鐘, 在檢測 500 nm 下之吸光值。

(六) 膜分離系統對水解物進行區分 (Chiang, 1999)

其原理為使用不同分子量限值 (molecular weight cut-off; MWCO) 之超濾膜進行水解物的區分, 本試驗使用 30KDa、10KDa、1KDa 及 0.15KDa MWCO 之超濾膜對水解物進行區分, 其流程可參考圖十六試驗設計三。將水解物之上清離心液經由實驗型分離膜系統 (邁先生生物技術顧問股份有限公司, 台北, 台灣) 通過 30KDa MWCO 濾膜, 收集大於 30KDa MWCO 的區分物稱為 30 KDa 濃縮液。而後將小於 30KDa MWCO 之濾液再通過 10KDa MWCO 濾膜, 收集到大於 10KDa MWCO 的區分物稱為 10KDa 濃縮液; 接著將小於 10KDa MWCO 之濾液通過 1KDa MWCO 濾膜, 收集到

大於 1KDa MWCO 的區分物稱為 1KDa 濃縮液；將小於 1KDa MWCO 之濾液通過 0.15 KDa MWCO 濾膜，收集到大於 0.15 KDa MWCO 的區分物稱為 0.15 KDa 濃縮液。

(七) 分子量分布分析 (Chiang, 1999)

依據高效能粒度排阻層析法 (high-performance size-exclusion chromatography ; HPSEC) 分析不同 MWCO 濾膜區分物之分子量分布情形。使用管柱 SuperdexTM peptide 10/300GL column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)，移動相為 pH 7.2 之 0.02 M 磷酸二氫鈉 (Tedia, Ohio, USA) 緩衝溶液含 0.15M 氯化鈉 (島久藥品株式會社，大阪，日本)，流速為 0.5 ml/min，檢測波長為 214 nm。並以標準品 cytochrome C (Sigma, Missouri, USA)、aprotin (Sigma, Missouri, USA)、vitamin B₁₂ (Sigma, Missouri, USA)、(glycine)₃ (Sigma, Missouri, USA) 和 glycine (Sigma, Missouri, USA)；其分子量分別為 12588、6512、1355、189 和 75 Da。將標準品與各區分之濃縮液水做適當稀釋 (本試驗皆為稀釋 20 倍稀釋)，再以 0.22 μ m 針頭過濾器過濾後，取 20 μ l 樣品注入高效能液相層析儀 (HP 1100 Series HPLC system ; Hewlett Packard, Waldbronn, Germany)，以其滯留時間定義其分子量範圍。

(八) 胺基酸組成分析

1. 酸水解蛋白質水解物

取 10-20 mg 樣品於分解管 (Rotaflo, Bedfordshire, England) 中，加入

1.5 ml 去離子水及 1.5 ml 濃鹽酸 (35.5-38 % ; J.T.Baker, New Jersey, USA) , 將分解管抽真空，過程中以乾冰冷卻以減少鹽酸的揮發，封閉分解管。置於 110°C 烘箱 (Risen, Yingge, Taiwan) 中 24 hr, 冷卻。打開分解管以約 30 ml 之去離子水清洗管中物，將其洗出物以燒結玻璃過濾器 (sintered glass filter ; Hario, Tokyo, Japan) 過濾去除沉澱物，並以去離子水清洗。將此過濾液在 45°C 下進行濃縮至蒸乾而後反覆加入 1 ml 去離子水，再次蒸乾以確認將其中的鹽酸的蒸發乾淨。以 pH 2.2 磷酸緩衝液定量至 1ml，而後以去離子水稀釋至適當稀釋倍數 (本試驗之樣品最終濃度約為 10-15 μ g/ml)，以進行衍生化。

2. 胺基酸之衍生化反應 (Knecht and Chang, 1986)

取 25 μ l 標準品 (1-10 μ g/ml) 溶液或酸水解後之樣品加入 25 μ l 去離子水、50 μ l pH 8.3, 100 mM 的碳酸氫鈉 (林純藥工業株式會社, 大阪, 日本) 緩衝液及 200 μ l 溶於氫甲烷 (acetonitrile ; Merck, Darmstadt, Germany) 之 4-dimethylaminoazobenzene (Dabsyl-Cl ; Merck, Darmstadt, Germany) 溶液 (1.3mg/ ml), 均勻混合後於 72°C 下水浴 10-15 分鐘。水浴後再加入 700 μ l pH 7.0 磷酸氫鈉 (林純藥工業株式會社, 大阪, 日本) 緩衝溶液, 混合均勻後, 以 0.22 μ m 過濾膜 (Lida, USA) 過濾並待分析之。

3. 分析型管柱分析

取 20 μ l 上述衍生化後之混合液注入高效能液相層析儀分析 (HP 1100

Series HPLC system ; Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) 。其分析條件如下:

下:

(1) 管柱 (Column):Lichrospher, RP-18e (Merck, Darmstadt, Germany)

(2) 管柱規格:4.0×250 mm, 5 μm

(3) 移動相 (mobile phase):

A:含 4 % N,N-dimethyl formamide (Riedel-de Haën, Seelze,

Germany) 之 25 mM pH 6.5 醋酸鈉 (林純藥工業株式會社, 大阪,

日本) 緩衝液

B:氯甲烷 (acetonitrile ; Merck, Darmstadt, Germany)

(4) 梯度 (gradient):

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

(5) 移動相流速:1 ml/min

(6) 偵測波長 (detector): 波長為 436 nm

(7) 標準品:

L-Alanine (A), L-Arginine (R), L-Aspartic acid (D), L-Aspartic acid (D), L-Cystine (C), L-Glutamic acid (E), L-Glutamine (Q), Glycine (G), L-Histidine (H), L-Isoleucine (I), L-Leucine (L), L-Lysine (K), L-Methionine (M), L-Proline

(P), L-Phenylalanine (F), L-Serine (S), L-Threonine (T), L-Tyrosine (Y), L-Tryptophan (W)及 L-Valine (V) (Sigma, Louis, USA)。依據各個胺基酸標準品之滯留時間，如附錄五所示。以對照水解物所含的胺基酸的相對位置並假設 20 種胺基酸之每單位重量所對應之面積為相同的前提下，換算各樣品中各胺基酸之百分比 %。

【計算公式】

胺基酸百分比=個別胺基酸波峰面積/總胺基酸之波峰面積和×100 % (13)

四、統計分析

測定項目所得之數據利用統計分析系統 (SAS version 9.0, 2002, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 統計套裝軟體進行分析，採用完全隨機設計 (completely randomized design; CRD)。以一般線性模式程式 (GLM procedure) 進行不同處理之間差異性及相關測定，並以鄧氏多變域測驗法 (Duncan's multiple range test) 比較各處理組平均值之間差異顯著性。

肆、結果與討論

一、鴨蛋粗蛋白質的樣品製備

表三為鴨蛋黃 (duck yolk) 及粗鴨蛋黃蛋白質 (crude duck egg yolk protein ; DEYP) 之基本成分分析結果，鴨蛋黃經脫脂作用後所得的脫脂的產物稱為 DEYP 其粗脂肪含量由 33.25 % 顯著下降至 2.99 % ($p < 0.05$)，結果顯示利用乙醇及正己烷能有效的移除鴨蛋黃中的脂肪，達到脫脂的效果；水分含量則由 46.35 % 顯著下降至 12.5 % ($p < 0.05$)，此結果與文獻所述情況相似，在脫脂的過程中蛋白質與有機溶劑作用如受熱 (Mutilangi, Panyam, & Kilara, 1996)，異丙醇及其他醇類會與蛋白質競爭，造成蛋白質中水份大量逸失現象 (Hoyle and Merritt, 1994)。因此，脫脂過程可明顯去除蛋黃中脂肪及水分，也因而相對地提高了蛋白質含量，由 17.92 % 上升至 82.04 % ($p < 0.05$)。Klompong 等人 (2007) 利用異丙醇對金帶細鱗 (yellow stripe trevally) 魚肉在水解前進行脫脂，其脫脂前後之脂質乾基百分比 (dry weight basis) 分別為 3.2 % 和 0.7 %，蛋白質含量為 84 % 和 97 %，本實驗結果與文獻之趨勢相符。

Bhaskar 等人 (2005) 將綿羊內臟分別經過加熱 (121°C , 15 min) 或脫脂 (6000g 離心，15min， 4°C) 處理，比較兩者之 protease P 水解物中胜肽與胺基酸組成及黏度；結果顯示脫脂組於 60 分鐘之水解過程中，水解物中胜肽與胺基酸物質明顯增加，且含量高於加熱組，脫脂組的脂肪含量及黏

表三 鴨蛋黃及粗鴨蛋黃蛋白質之基本組成分

Table 3 Proximate composition of duck egg yolk and crude duck egg yolk protein (DEYP)

Composition (%)	duck egg yolk ¹		duck egg yolk crude protein ^{1,2}
Protein	17.92 ± 0.14 ^b	————→	82.04 ± 1.46 ^a
Fat	33.25 ± 0.03 ^a	————→	2.99 ± 0.024 ^b
Ash	1.76 ± 0.01 ^b	————→	3.58 ± 0.4 ^a
Moisture	46.35 ± 0.06 ^a	————→	12.5 ± 0.00 ^b

¹ Data are mean ± SD of three replicates. Mean with different letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

² Crude duck egg yolk crude protein (DEYP) were prepared as following: duck egg yolks were defatted with ethanol and hexane respectively. Then the yolk protein fraction was filtered and air-dried at room temperature.

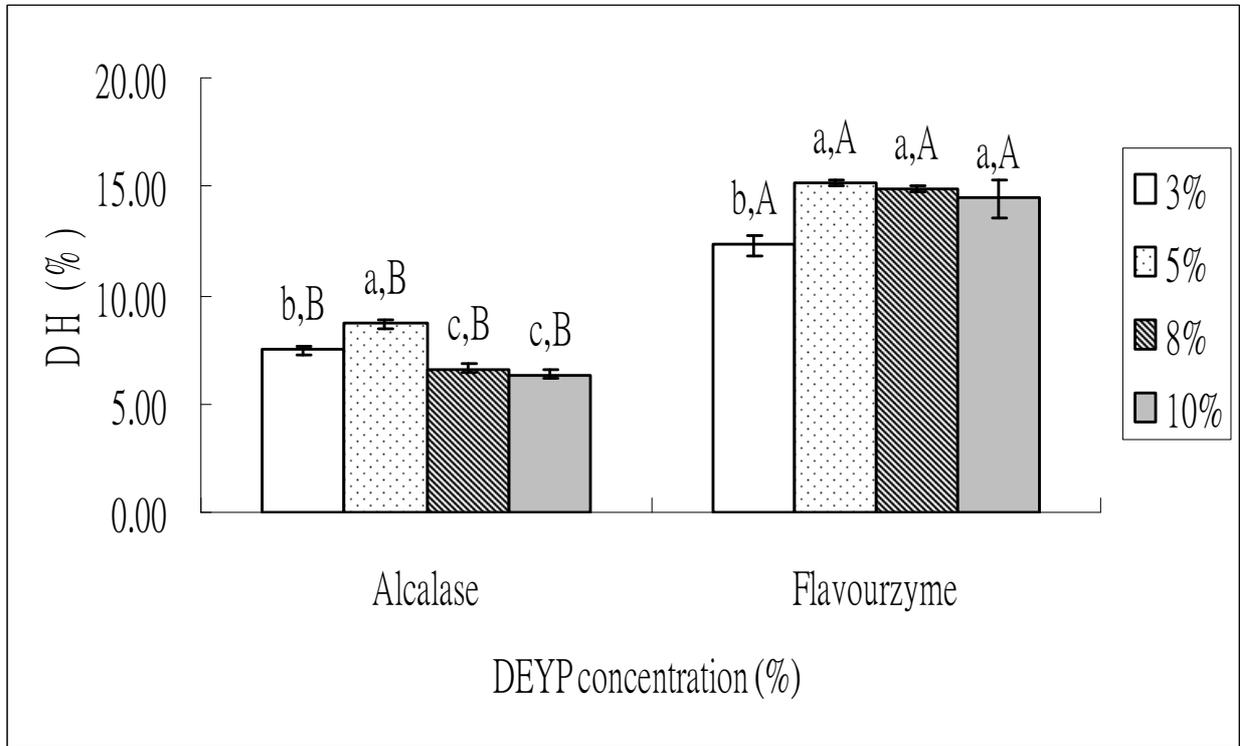
度亦較低，因此基質中脂肪的移除有助於酵素水解作用的進行。Thiansilakul 等人 (2007) 比較脫脂前後的羅式圓鰲 (Round scad) 魚肉水解物之抗氧化性，發現經脫脂後的魚肉水解物具有較佳的抗氧化性。脫脂過程中由於蛋白質受到有機溶劑的作用會導致二級及三級結構展開 (unfolding)，造成疏水性基暴露 (Sikorski and Naczka, 1981)。許多由蛋白質取得的胜肽隨著疏水性的增加與其抗氧化具有相關性 (Chen *et al.* 1995)，且由於脫脂後之鴨蛋黃具較低的脂肪及較高含量的蛋白質，可減少水解過程中的干擾因子，因此爾後將鴨蛋黃脫脂後所製備的粗鴨蛋黃蛋白質，進行後續的水解試驗。

二、DEYP 水解之條件探討

(一) 基質濃度

圖十七為以 DEYP 做為水解基質，探討 DEYP 之不同濃度 (3 %、5 %、8 % 和 10 %) 在 Alcalase 及 Flavourzyme 水解下對水解率之影響。基質濃度是指水解反應開始前，蛋白質於水溶液中所佔的比例 (in % w/w of protein)。在 Alcalase 水解 DEYP 下，5 % 的 DEYP 相較於其他濃度展現出最佳的水解率 ($p < 0.05$)，顯示 5 % 為較適的水解條件；在 Flavourzyme 水解下，DEYP 濃度由 3 % 上升至 5 % 其水解率顯著的上升 ($p < 0.05$)，然而與 8 % 及 10 % 之 DEYP 其水解率之間並無顯著差異 ($p < 0.05$)。

由胜肽鍵的組成是由兩個胺基酸之胺基酸前一個的羧基與後一個胺基



圖十七、不同 DEYP 濃度與不同酵素對水解物水解率之影響。

Fig. 17. Effect of different DEYP concentration and enzyme on degree of hydrolysis (DH). DEYP was hydrolyzed at 50°C and initial pH 8.5 using Alcalase (E/S=5 %), initial pH 7 for 8 hr using Flavourzyme (E/S=5 %) for 8 hr, respectively. ^{a-c}Different letters within the same enzyme indicate significant differences ($p<0.05$), and ^{A-B}different capital letters within the same DEYP concentration indicate significant differences ($p<0.05$).

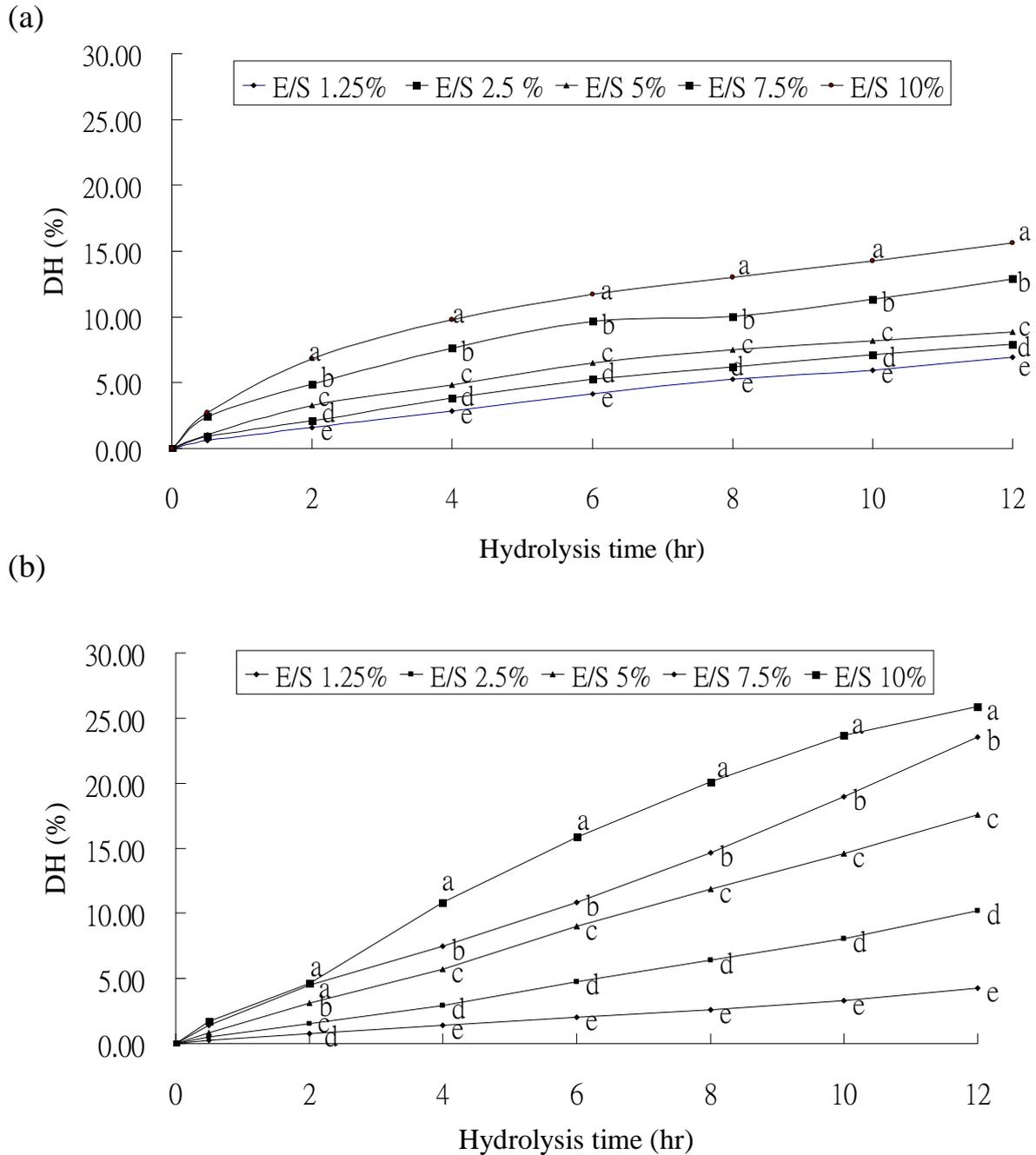
酸的胺基，經脫水反應所形成，而其逆反應式即為水解。因此，當水所佔的比例越高其反應式易趨向水解。Surowka 及 Fik (1994) 以 pepsin 及 neutrase 對雞肉加工廠之蛋白質性廢棄物進行水解，發現增加水解溶液中水的比例，可增加水解後之非蛋白態氮 (nonprotein nitrogen)，並指出增加水於水解反應中可使水解酵素更加均勻 (homogeneity) 散佈，增加受質的組織膨脹，而提高水解的效果。然而，由於太低的基質濃度亦會減少酵素與基質的碰撞機率 (陳，1997)。因此，水佔水溶液的比例過高時亦可能降低水解的效果，Benjaku 及 Morrissey (1997) 以及 Park 等人 (2000) 分別利用 Alcalase 對不同來源的蛋白質進行水解，探討基質濃度對水解的影響。其結果並非如 Surowka 及 Fik (1994) 所提的愈低的基質濃度及具有較佳的水解效果。故有必要對水解之對象進行最適水解基質濃度之試驗。而在本次試驗中以 Alcalase 水解不同濃度的 DEYP，亦也發現低濃度的 DEYP (3 %、5 %) 確實較高濃度之水解率佳。然而，可能由於 3 % DEYP 亦減少酵素與基質的碰撞機率，而導致其水解率較 5 % DEYP 低 ($p < 0.05$)。故以 Alcalase 水解時 5 % 為較適之水解之基質濃度。亦由於 Flavourzyme 的水解也在 5 % 之 DEYP 下展現最佳的水解率，因此，以下試驗均以 5 % DEYP 進行酵素水解。

(二) 酵素濃度

本試驗使用兩種酵素 (Alcalase 和 Flavourzyme) 以及五種酵素濃度

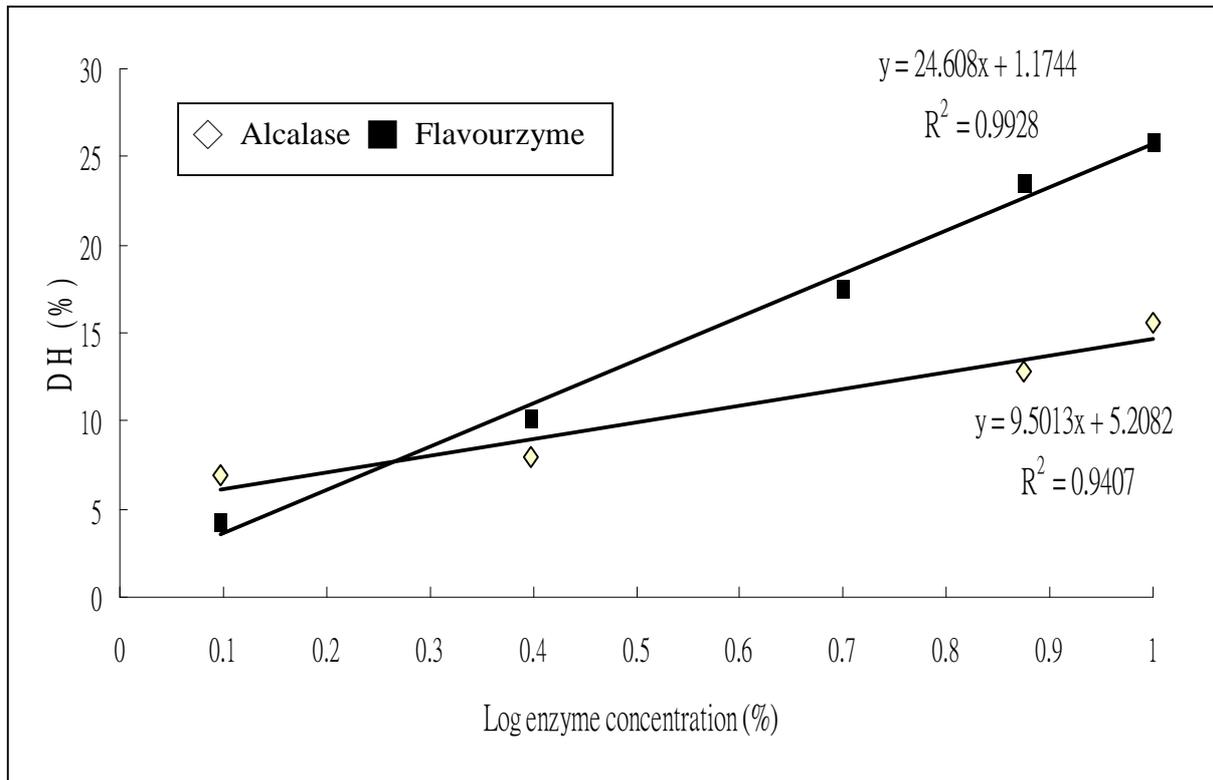
(1.25 %、2.5 %、5 %、7.5 % 和 10 % w/w protein) 水解 DEYP 0-12 hr 並探討其水解率與酵素濃度之間的關係。圖十八 (a) 及(b) 為探討不同濃度之 Alcalase 及 Flavourzyme 對 DEYP 水解率的影響。結果顯示兩種酵素的水解率均隨酵素濃度增加而顯著上升 ($p < 0.05$)。水解率的測定是利用 *o*-phthaldialdehyde (OPA) 分光光度法測定水解物中 α -胺基的釋出量，水解率愈高表示水解物中一級胺 (primary amine) 數量愈多，亦表示蛋白質經水解作用產生之胨肽及胺基酸物質愈多。結果顯示出水解 DEYP 時，隨著 Alcalase 及 Flavourzyme 濃度的上升切斷蛋白質中胨肽鍵能力愈強。此試驗結果與文獻結果相符 (Guérard *et al.*, 2001 ; Klompong *et al.*, 2007)。

Adler-Nissen (1986) 指出水解率的增加與酵素濃度呈正相關，若受質濃度太低，會降低受質與酵素間的碰撞，降低水解的效果。早期 Cheftel 等人 (1971) 利用魚肉蛋白質進行酵素水解亦指出增加酵素濃度可伴隨著增加蛋白質的溶解度而對整體的蛋白質分解過程具正向的影響。圖十九分別為 Alcalase 及 Flavourzyme 之酵素濃度對數值 (\log_{10}) 對水解率作圖，可發現二者間呈現正向的線性關係。Alcalase 及 Flavourzyme 之相關係數 R^2 分別為 0.94 及 0.99。顯示酵素濃度與水解率之間具有高度的正相關性。Benjakul and Morrissey (1997) 亦提出水解旗魚加工廢棄物之酵素濃度對數值 (\log_{10}) 與水解率具有線性關係。然而，相較於其他文獻之水解來源魚肉蛋白質 (Klompong *et al.*, 2007)、禽肉蛋白質 (王，2009；孫，2009)、羊骨蛋白質



圖十八、Alcalase (a) 和 Flavourzyme (b) 濃度 (E/S) 與水解時間對 DEYP 水解物水解率之影響。

Fig. 18. Effect of Alcalase (a) and Flavourzyme (b) concentration (E/S) and hydrolysis time on degree of hydrolysis of DEYP hydrolysates. 5 % DEYP was hydrolyzed at 50°C and initial pH 8.5 using Alcalase, initial pH 7 using Flavourzyme, respectively. Data are mean \pm SD of three replicates.^{a-e}Means with different letters at the same hydrolysis time are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖十九、酵素濃度對數值對水解率的影響。

Fig. 19. Effect of log enzyme concentration and degree of hydrolysis.

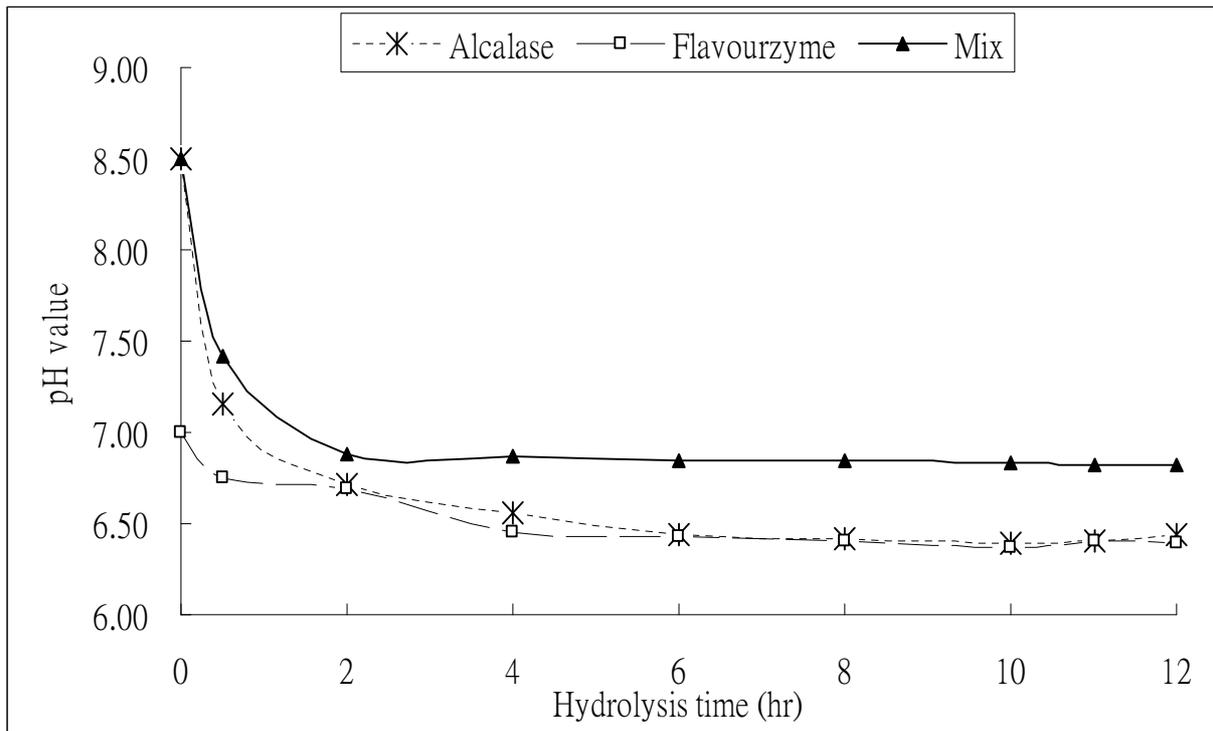
(Linder *et al.*,1995)，水解 DEYP 使用了較多的酵素用及水解時間其水解曲線才漸趨平緩。水解反應速率會受到不同水解受質之蛋白質結構影響 (Adler-Nissen, 1986)。文獻指出水解雞蛋黃蛋白質 (Park *et al.*, 2001; 鄭, 1994) 之條件是在高酵素濃度 (7.5 及 5 %) 及長時間 (18 及 24 hr) 下進行製備水解物。此外，陳 (2009) 使用鴨蛋白進行酵素水解試驗，結果指出 Alcalase 及 Flavourzyme 在低濃度 (< 3 %) 下水解無法使水解液中胜肽含量提高，需要較高的酵素濃度，才能有效的進行水解反應。因此鴨蛋蛋白質可能是受其結構之影響而造成水解反應速率較緩慢。

三、水解過程中的變化

依據前述 DEYP 之水解物製備條件之結果，選擇最有助於水解之條件 (附錄) 進行反應。此外，並以 Alcalase+Flavourzyme 之混合酵素 (1:1) 進行 DEYP 水解。利用此三組酵素 (Alcalase、Flavourzyme 及混合酵素) 水解物，探討不同酵素水解過程對 pH 值、水解率及產率的變化。

(一) pH 值的變化

圖二十為以 Alcalase、Flavourzyme 及 Alcalase+Flavourzyme 混合酵素 (1:1; weight:weight) 水解 DEYP 水解過程中，不同酵素處理對水解液 pH 值的影響。結果顯示，在水解 0-2 hr，三組酵素水解液 pH 值皆明顯的下降，在 Alcalase 及混合酵素組兩處理組在水解 2 hr 後 pH 值由 8.5 下降至 6.8 左右，而 Flavourzyme 組 pH 值亦在 2 hr 後由 7.0 下降至 6.7 左右。而至水解 2



圖二十、不同酵素與水解時間對 DEYP 水解物 pH 值之影響。

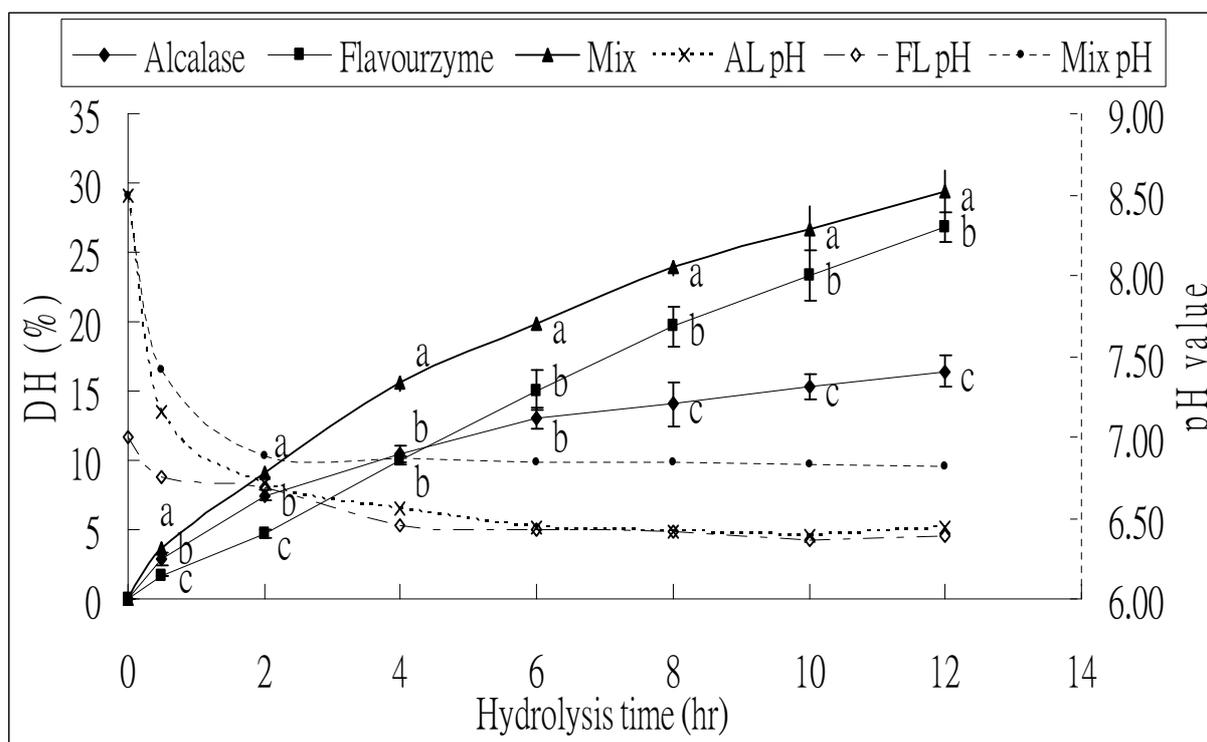
Fig. 20. Effect of different enzyme and hydrolysis time on pH value of DEYP hydrolysates. DEYP was hydrolyzed at 50°C and initial pH 8.5 using Alcalase (E/S=10 %), initial pH 7 using Flavourzyme (E/S=10 %) and initial pH 8.5 using Mix (5 % Alcalase + 5 % Flavourzyme), respectively.

hr 後，pH 值的變化漸趨平緩。當胜肽鍵受到水解的作用所形成自由的羧基 (-COOH) 與胺基 (-NH₃)，會依水解環境之 pH 值而增加或減少其離子化 (Adler-Nissen, 1986)。在 25°C 下多胜肽之羧基 (-COOH) 與胺基 (-NH₃) 之 pK 值分別為 3.1-3.6 及 7.5-7.8 (Steinhardt and Beychok, 1964)。在本試驗之水解環境其 pH 值介於 6.0-8.5，胜肽及胺基酸之羧基為完全解離狀態，而胺基 (-NH₃⁺) 則呈部分質子化 (partially protonated)。DEYP 在水解 0-2 hr 的過程中 pH 值的急遽的下降，可能是由於隨著水解作用切斷胜肽鍵，使羧基與胺基數量增加，而在羧基完全的解離狀態下，氫質子雖有部分由胺基接收而帶正電，但亦提供氫質子使 pH 值下降。Adler-Nissen (1986) 指出水解環境在 25°C、pH 值在 7.5-7.8 胺基酸上的胺基有一半以下未被質子化，羧基則呈完全的解離狀態下，故一個胜肽鍵被切斷其淨反應有 0.5-1 個氫質子被釋出。由於本試驗在中性及鹼性環境下水解，且僅調整起始 pH 值，所以隨著胜肽鍵的水解使羧基與胺基數量的增加，造成 pH 值有下降的情形。而在水解 2 hr 後，三組酵素水解液皆維持在 pH 6.4-6.8，其原因可能由於羧基所解離的氫質子與胺基可接收的氫質子的能力達到平衡，而使 pH 值維持恆定。

(二) 水解率的變化

水解率採用 *o*-phthaldialdehyde 法，OPA 試劑極易與小分子之胜肽類物質 (M.W. < 6 kDa) 及游離胺基酸之胺基反應。水解過程中水解液之

水解率變化的情形如圖二十一，隨著水解時間之增長，各酵素處理組之水解率有顯著增加的趨勢 ($p < 0.05$)。這是因為隨著水解時間之進行，胺基態氮含量上升且在總氮含量不變的情形下，水解率亦隨之上升。而在各個酵素處理組之間則具有顯著差異。在水解初期 0-2 hr，Alcalase 與混合酵素組具較高的水解速率，在水解 4 hr 後 Alcalase 組之水解率漸趨平緩，而 Flavourzyme 及混合酵素則持續有水解作用，其中以混合酵素組在水解相同時間下具最高水解率，於 12 hr 達最高水解率 29.4 %。結果顯示，Alcalase 組水解率於前 2 hr 急遽增加，此時期稱為水解反應的起始快速期 (initial rapid phase)，其反應期間有大量的胜肽鍵受到水解，而在 4 hr 後進入增加速度較為緩慢的平穩期 (stationary phase) (Shahidi *et al.*, 1995)。相較 Flavourzyme 組及混合酵素組其水解率則隨著水解時間呈現穩定的增加現象。Moreno 及 Cuadrado (1993) 於 pH 8 及 50°C 下水解鷹嘴豆 (chick pea) 蛋白質指出出現水解曲線平穩期可歸因於 (a) 可水解的胜肽鍵濃度下降 (b) 水解酵素活性的降低 (c) 水解產物具抑制作用。在此試驗中 Alcalase 組所呈現的水解平穩期，推測可能由上述 (a) 之原因而造成。由於相較於 Alcalase 及 Flavourzyme 對蛋白質催化位置，Alcalase 為內切酶且主要切於疏水性及芳香族胺基酸鄰近的胜肽鍵。因此，當 Alcalase 所可以水解之胜肽鍵濃度下降時，與酵素與胜肽鍵的反應的機率降低，其水解率亦隨之進入平穩期。而 Flavourzyme 則具有內外切酶且具非常廣泛專一性 (very



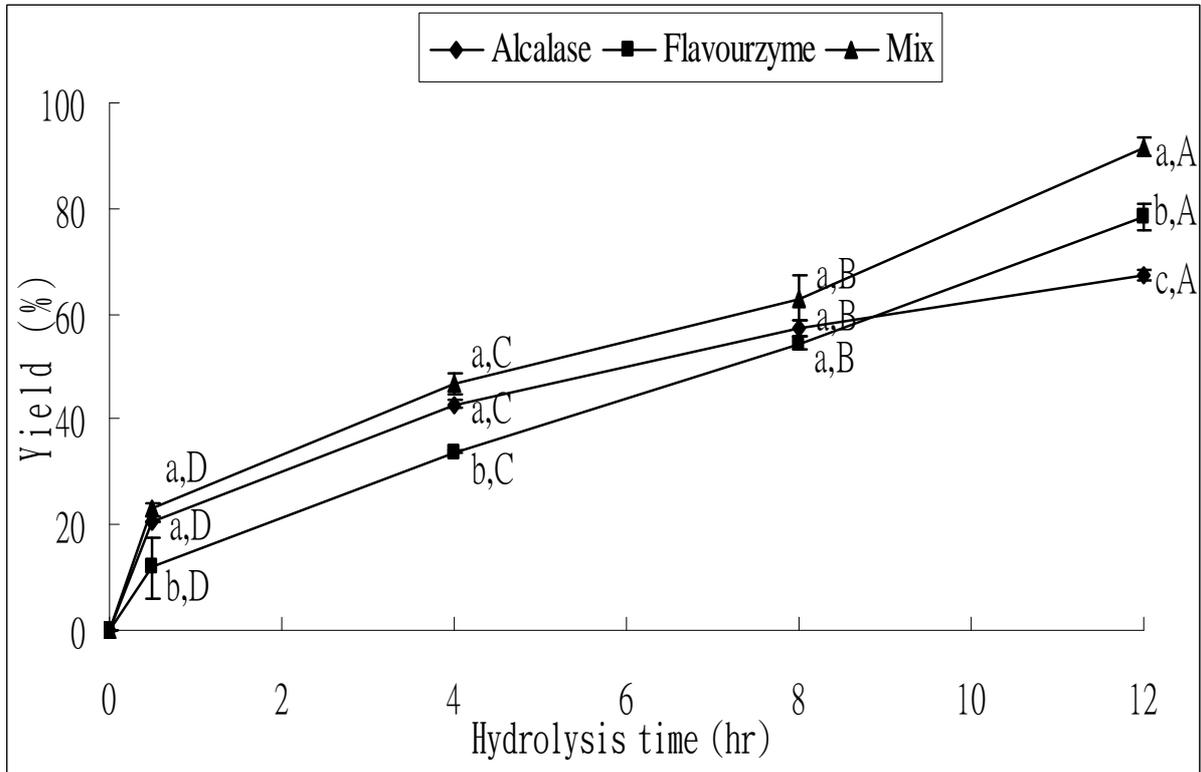
圖二十一、不同酵素與水解時間對 DEYP 水解物之水解率與 pH 值之影響。
 Fig. 21. Effects of difference enzyme and hydrolysis time on degree of hydrolysis and pH value of DEYP hydrolysates. Data are mean \pm SD of three replicates. ^{a-c}Different letters within the same hydrolysis time (HT) indicate significant differences ($p < 0.05$). DEYP was hydrolyzed at 50°C and initial pH 8.5 using Alcalase (E/S=10 %), initial pH 7 using Flavourzyme (E/S=10 %) and initial pH 8.5 using Mix (5 % Alcalase + 5 % Flavourzyme), respectively.

broad specificity) (Adler-Nissen, 1986 ; Nielsen, 1995), 所以內切之胜肽鍵類型多, 且兼具外切胜肽之功能, 故水解率雖呈現緩慢上升的趨勢, 但水解率在長時間水解下仍維持上升的趨勢。在混合酵素的部份, 由於是以 Alcalase 及 Flavourzyme 之 1:1 比例混合, 故在水解初期 (0-2 hr) 其混合酵素水解液之 pH 值介於鹼性範圍 7.0-8.5 左右, 在此範圍對 Alcalase 具有較高的酵素活性, 故其水解率隨水解時間快速上升, 在 2 hr 後水解液之 pH 值則穩定維持在 6.7-6.8 之間, 此時 pH 值對 Flavourzyme 中的內外切酶皆為最適之 pH 範圍, 故混合酵素仍可持續的對蛋白質進行水解作用。且由於混合酵素組在相同水解時間下皆具較高水解率 ($p < 0.05$)。此結果與利用混合此二種酵素水解大豆分離蛋白之結果一致, 試驗中比較以 pH stat 法與僅控制起始 pH 之二種系統中, Alcalase 與 Flavourzyme 在單一添加及混和酵素水解下對其水解率之影響。其結果顯示, 在 pH stat 法下以單一添加 Flavorzyme 之水解率較高; 在僅控制起始 pH 之系統中以混合酵素水解具有最高的水解率。且其水解率後者又高於前者。作者指出混合酵素在僅控制起始 pH 之系統中會有最高的水解率, 與此二者酵素活性之最適 pH 範圍有密切關係 (Nielsen, 1995)。由此可發現混合酵素並未造成彼此互相水解而降低其酵素作用的能力, 反藉由彼此對蛋白質作用的催化位置 (內切及內外切) 及最適之 pH 範圍的不同, 而可提升水解之效果。

(三) 產率的變化

產率的測定是以水解液之% TCA 可溶性氮 (w/w of total nitrogen) 做為表示。% TCA 可溶性氮主要是用於描繪蛋白質水解物之分子之分布之特性 (Adler-Nissen, 1986)，TCA 會使所有的蛋白質及大部分的大分子胜肽沉澱 (Greenberg and Shipe, 1979)，而小分子胜肽及氨基酸會溶解於 TCA 溶液中。當蛋白質經水解後使小分子胜肽及氨基酸的總量增加其% TCA 可溶性氮也會上升，因此以表示水解生產小分子胜肽之產率。

圖二十二為水解過程水解液中產率變化情形。DEYP 經不同酵素濃度水解後，在三組酵素的水解下產率皆隨著水解時間增加顯著地上升 ($p < 0.05$)，顯示 DEYP 受到酵素水解後生產小分子的胜肽而提高產率。比較三種酵素對產率的影響，發現 Alcalase 與 Flavourzyme 則在水解 0-4 hr 間，Alcalase 組顯著大於 Flavourzyme 組 ($p < 0.05$)，8 hr 二者之產率無顯著差異 ($p > 0.05$)，水解達 12 hr，Flavourzyme 水解液之產率高於 Alcalase 組 ($p < 0.05$)，其中以混合酵素組在 0-12 小內皆具最高之產率。因此，以混合酵素水解 DEYP 12 hr 之水解液具最高產率。Benjakul 等人 (1997) 利用太平洋牙鱈廢棄物進行水解，發現其水解液之水解率與可溶性氮的回收率呈正相關性 ($R^2=0.978$)。因此，水解率與產率具有一定的正相關性。相較於水解液產率與水解率變化，可發現其趨勢一致。隨著水解時間增加，水解率與產率皆隨之上升，結果與文獻所述相符 (Benjakul and Morrissey, 1997)，並且以混合酵素水解有最高的水解率與產率。然而，比較 Alcalase 與



圖二十二、不同酵素與水解時間對 DEYP 水解物產率之影響。

Fig. 22. Effect of different enzyme and hydrolysis time on yield of DEYP hydrolysates. Data are mean \pm SD of three replicates. DEYP was hydrolyzed at 50°C and initial pH 8.5 using Alcalase (E/S=10 %), initial pH 7 using Flavourzyme (E/S=10 %) and initial pH 8.5 using Mix (5 % Alcalase + 5 % Flavourzyme), respectively. ^{a-c}Different letters within the same hydrolysis time indicate significant differences ($p < 0.05$), and ^{A-D}different capital letters within the same enzyme indicate significant differences ($p < 0.05$).

Flavourzyme 水解 DEYP 對產率與水解率的影響。發現在水解 4 hr Alcalase 組與 Flavourzyme 組之水解率無顯著差異 ($p > 0.05$)，但在產率上 Alcalase 組顯著大於 Flavourzyme 組。由於水解率為水解液中被切之胜肽數量的指標，產率則是反映水解後水解液可溶性氮的總量。因此，在水解 4 hr Alcalase 與 Flavourzyme 所水解切出的胜肽片段數量無顯著差異下，Alcalase 組的產率顯著大於 Flavourzyme 組。表示 Alcalase 胜肽片段長於 Flavourzyme，使其產率高於 Flavourzyme 組。由於 Alcalase 為內切酶而 Flavourzyme 含為內切及外切酶 (Nielsen, 1995)，因此 Flavourzyme 較 Alcalase 更易切成小的胜肽片段，使得在相同水解率下，Flavourzyme 組的產率較 Alcalase 組低。而隨著水解時間的增加，Alcalase 之水解率漸趨平緩而 Flavourzyme 組水解率持續上升，使 Flavourzyme 組的可溶性氮持續上升，以致產率逐漸地高於 Alcalase 組。

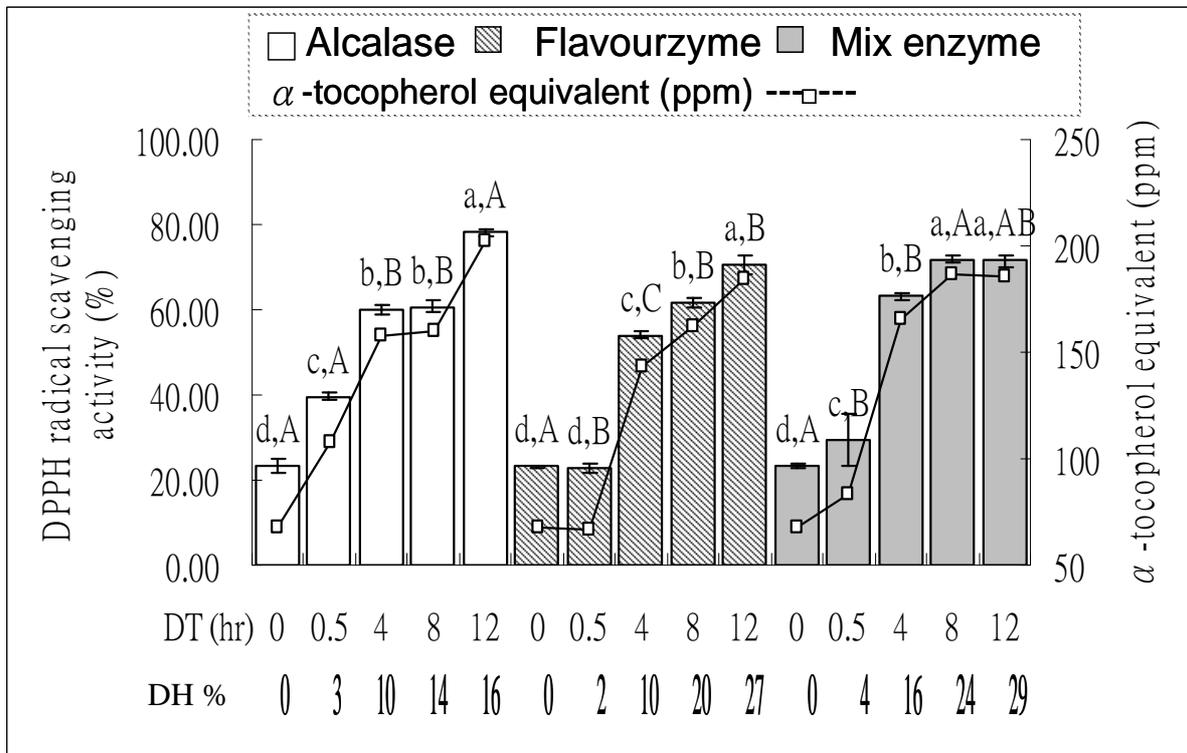
四、抗氧化能力分析

依據前述所探討的條件進行 DEYP 水解物之製備所得水解物進行抗氧化能力之比較，以 10 % Alcalase 於 50°C、起始 pH8.5 水解 DEYP 並於 0、0.5、4、8 及 12 hr 進行取樣，得到 DEYP 水解物分別為 HA-0、HA-0.5、HA-4、HA-8 及 HA-12；以 10 % Flavourzyme 於 50°C、起始 pH7.0 水解 DEYP 並於 0、0.5、4、8 及 12 hr 進行取樣，所得到 DEYP 水解物分別為 HF-0、HF-0.5、HF-4、HF-8 及 HF-12；5 % Alcalase 與 5 % Flavourzyme 之混合酵

素於 50°C、起始 pH8.5 下水解 DEYP 並於 0、0.5、4、8 及 12 下進行取樣，所得到 DEYP 水解物分別為 HM-0、HM-0.5、HM-4、HM-8 及 HM-12。每一水解物均進行清除 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力、還原力、金屬螯合力、氫氧自由基清除能力及抑制亞麻油酸過氧化能力之分析與比較。

(一) 清除 DPPH 自由基能力

油脂在自氧化的過程中會產生自由基而產生油脂酸敗，常見的抗氧化物為藉由提供氫 (hydrogen donor) 來清除過氧化物自由基 (peroxyl radical) 以達到抑制脂質氧化鏈鎖反應之進行。由於 DPPH 自由基較其他自由基安定，故對 DPPH 自由基具清除能力之樣品，亦對其他自由基具清除能力。因此抗氧化的研究上通常使用 DPPH 來評估樣品抗氧化之供氫能力。圖二十三為酵素種類與水解時間對 DEYP 水解物之 DPPH 自由基清除能力與相對 α -生育醇當量之影響。DPPH 自由基清除能力之表示方法，係以蒸餾水取代樣品做對照組，計算樣品相對之清除百分比的比率。此外，並以 α -生育醇之 DPPH 自由基清除能力的相對當量作為比較。結果顯示，DEYP 經水解作用下水解物之 DPPH 自由基清除能力除 HF-0.5 外皆高於未水解之 DEYP，且在各組酵素水解下水解物的 DPPH 自由基清除能力皆隨著水解時間(hydrolysis time ; DT) 的增加而顯著的增加 ($p<0.05$)。其中 HA-12 具最高的 DPPH 自由基清除能力 78.09 %；而 Flavourzyme 組與混合酵素組也分



圖二十三、酵素種類與水解時間對 DEYP 水解物 DPPH 自由基清除能力與相對 α -生育醇當量之影響。

Fig. 23. Effect of enzymes and hydrolysis time on DPPH radical scavenging activity and α -tocopherol equivalent of DEYP hydrolysates. DEYP was hydrolyzed at 50°C and initial pH 8.5 using Alcalase (E/S=10 %), initial pH 7 using Flavourzyme (E/S=10 %) and initial pH 8.5 using Mix (5 % Alcalase + 5 % Flavourzyme), respectively. Data are mean \pm SD of three replicates. ^{a-d}Different letters within the same proteinase used indicate significant differences ($p < 0.05$), and ^{A-C}different capital letters within the same hydrolysis time indicate significant differences ($p < 0.05$).

別在 HF-12 及 HM-12 達到最高 DPPH 自由基清除能力 70.66 % 及 71.39 % 比較三者間發現以 HA12 與 HM12 具有較高的 DPPH 自由基清除能力。整體而言，在水解 DEYP 後可有效的提高 DPPH 自由基清除能力由 23.31 % (未水解) 上升至 78.19 %；對照於 α -生育醇之 DPPH 自由基清除能力的相對當量，DEYP 水解後由 68 ppm 上升至 202 ppm 的 α -生育醇當量，可有效的增加約 3 倍。

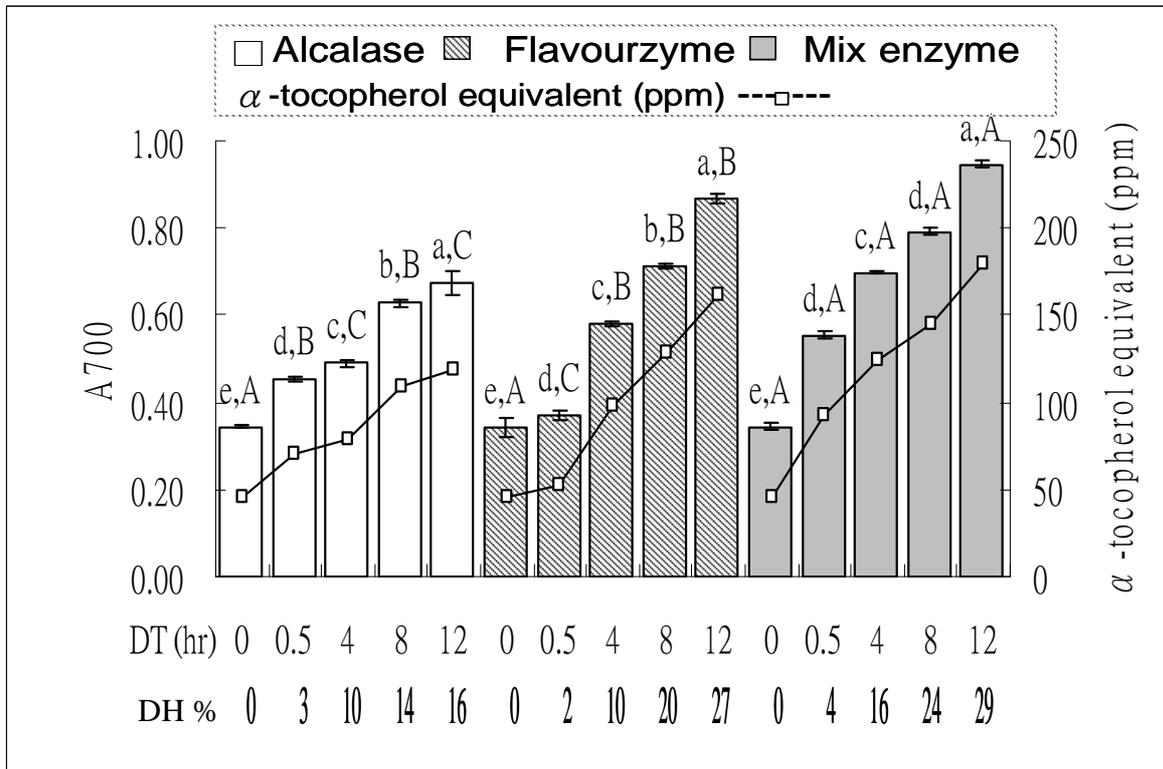
Liu *et al.* (2010) 以豬血漿進行水解並探討水解物之抗氧化性，指出水解物具化學性的抑制油脂氧化作用的原因可能歸因於蛋白質結構的改變。未水解的蛋白質其結構緊縮因而僅具微弱的抗氧化能力，而受到酵素水解後的蛋白質結構因水解而展開及暴露出具有抗氧化性的胺基酸殘基並進而與氧化物反應。因此，未水解的蛋白質抗氧化能力會較水解物低，本試驗之結果與文獻相符。亦有研究使用 Alcalase 及 Flavourzyme 水解羅式圓鯪並測定其水解物的抗氧化性，結果顯示 Alcalase 及 Flavourzyme 水解物皆隨著水解率 (0-60 %) 的增加，DPPH 自由基清除能力會隨之上升，但當 Alcalase 水解物水解率大於 40 % 時，DPPH 自由基清除能力則顯著下降 (Thiansilakul *et al.*, 2007)。由此推論，蛋白質水解物水解率的上升確實可增加 DPPH 自由基清除能力，但過度的水解亦可能會造成 DPPH 自由基清除能力的下降。此外，蛋白質水解物的抗氧化能力與蛋白質的種類及水解的條件有關 (Jun *et al.*, 2004)，且與水解酵素之特異性，作用於蛋白質胜肽鍵

之位置與方式不同有關，因此於水解過程中所產生的游離胺基酸與小分子胜肽及其組成可能有極大的差異 (Wu *et al.*, 2003)，這可能是造成不同酵素種類之水解物對 DPPH 自由基清除能力有所差異之原因。亦有研究結果顯示低分子量 (1000-3000 Da) 的蛋白質水解物比高分子量的蛋白質水解物有較高的自由基清除能力 (Chang *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2003)。因此，隨著 DEYP 水解物水解率的增加而其使小分子的胜肽增加，因而使 DEYP 水解物的 DPPH 自由基清除能力隨之上升。

(二) 還原力

還原力是藉由測定赤血鹽 (potassium ferricyanide) 中 Fe^{3+} 被還原成 Fe^{2+} 之亞氰錯離子，此亞氰錯離子在與後加入的 Fe^{3+} 生成亞鐵氰化鐵，即普魯士藍 (Prussian blue) 之生成量來作為樣品還原過氧化物能力的評估。在波長 700 nm 下普魯士藍有強烈吸光值，故吸光值越高代表還原力越好 (Oyaizu, 1988)。

圖二十四為酵素種類與水解時間對 DEYP 水解物還原力與其相對 α -生育醇之當量。所有 DEYP 水解物之還原力皆顯著高於未水解之 DEYP ($p < 0.05$)，且隨著水解時間及水解率的增加，三組酵素水解物之還原力皆隨之上升 ($p < 0.05$)。顯示 DEYP 水解物較未水水解之 DEYP 更具有提供電子使氧化物還原之能力。而在相同水解時間下，受到酵素種類的影響其水解物之還原力則有所不同，其中以混合酵素組在各水解時間點皆顯示出最高的

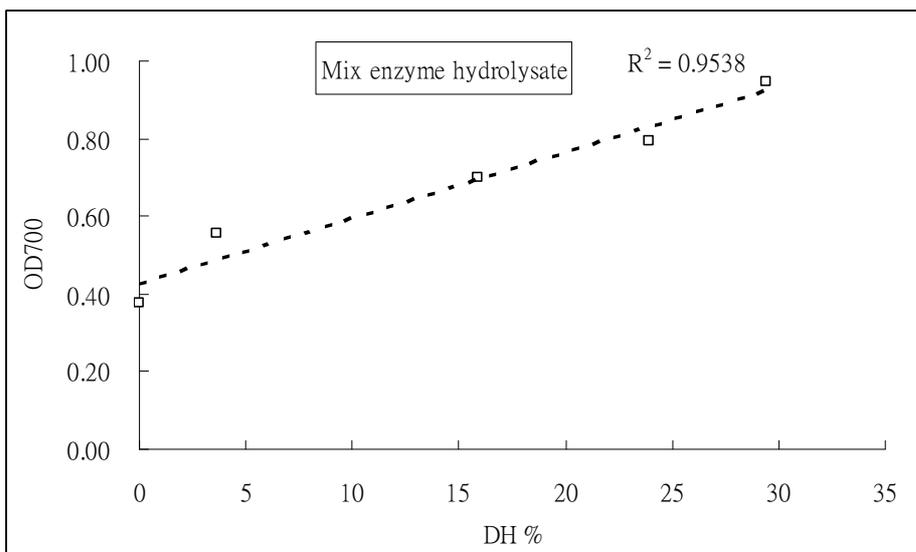
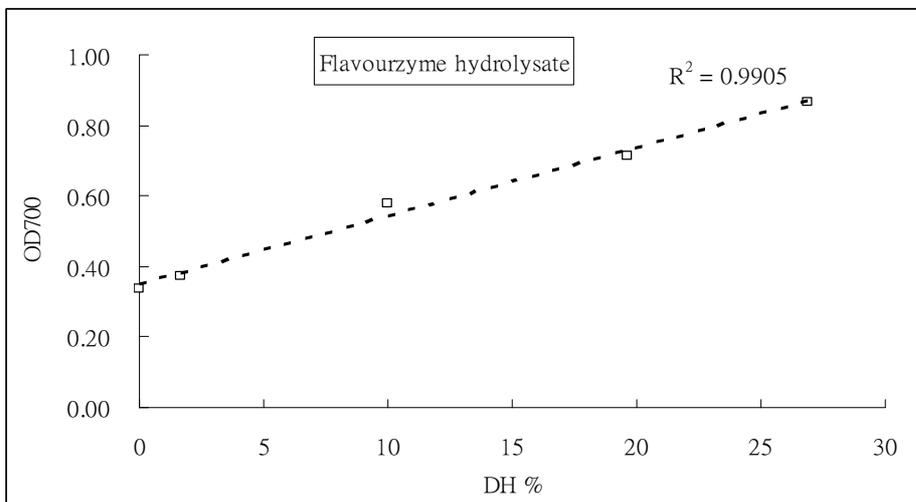
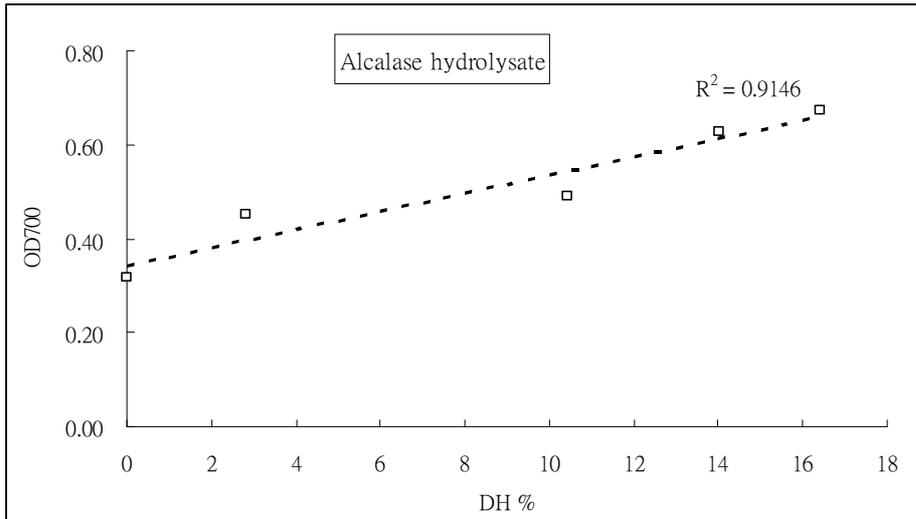


圖二十四、酵素種類與水解時間對DEYP水解物還原力與其相對 α -生育醇之當量之影響。

Fig. 24. Effect of enzymes and hydrolysis time on reducing power and α -tocopherol equivalent of DEYP hydrolysates. DEYP was hydrolyzed at 50°C and initial pH 8.5 using Alcalase (E/S=10 %), initial pH 7 using Flavourzyme (E/S=10 %) and initial pH 8.5 using Mix (5 % Alcalase + 5 % Flavourzyme), respectively. Data are mean \pm SD of three replicates. ^{a-d}Different letters within the same proteinase used indicate significant differences ($p < 0.05$), and ^{A-C}different capital letters within the same hydrolysis time indicate significant differences ($p < 0.05$).

還原力 ($p < 0.05$)。混合酵素組水解物隨著水解時間 0、0.5、4、8、12 hr 其相對 α -生育醇還原力之當量，由 46、92、124、145 上升至 180 ppm。因此，HM12 為最具有提供電子使氧化物還原之 DEYP 水解物。就整體而言，受到水解後的 DEYP 水解物，其 α -生育醇還原力當量可由 46 ppm 上升至 70-180 ppm，可有效增加 3 倍左右。另一方面將 DEYP 水解物之水解率與還原力對數值之關係作圖，在圖二十五中可發現 DEYP 水解物在 Alcalase、Flavourzyme 及混合酵素的水解下其水解率與還原力之 R^2 分別為 0.91、0.95 及 0.91。此結果顯示，不受水解酵素種類之影響，水解物的水解率與還原力皆具有高度的相關性，且水解率愈高其還原力愈強。

許多研究指出使用菜籽 (Cumby *et al.*, 2008)、羅式圓鱈 (Thiansilakul *et al.*, 2007)、豬血漿 (Liu *et al.*, 2010) 及雞腿骨 (鄭, 2007) 等不同蛋白質來源進行水解，其水解物之還原力皆因水解率增加而提升，本試驗結果與上述文獻相符。至於水解物水解率的上升會使水解物具強烈還原力的原因是由於胜肽鍵受到水解的作用所形成自由的羧基 (-COOH) 與胺基 (-NH₃) 的數目增加，進而增加了氫離子 (質子或電子) (Liu *et al.*, 2010)，因而可提供電子使自由基形成安定的物質，阻止氧化繼續發生。此外，在 DEYP 水解物中皆以混合酵素組具最佳的還原力，顯示混合 Alcalase 和 Flavourzyme 二者酵素比僅使用一種酵素更有效增加還原能力，其原因可能是混合酵素組之水解率較高，而水解率又與還原力有高度的正相關性 (圖二十五)，因



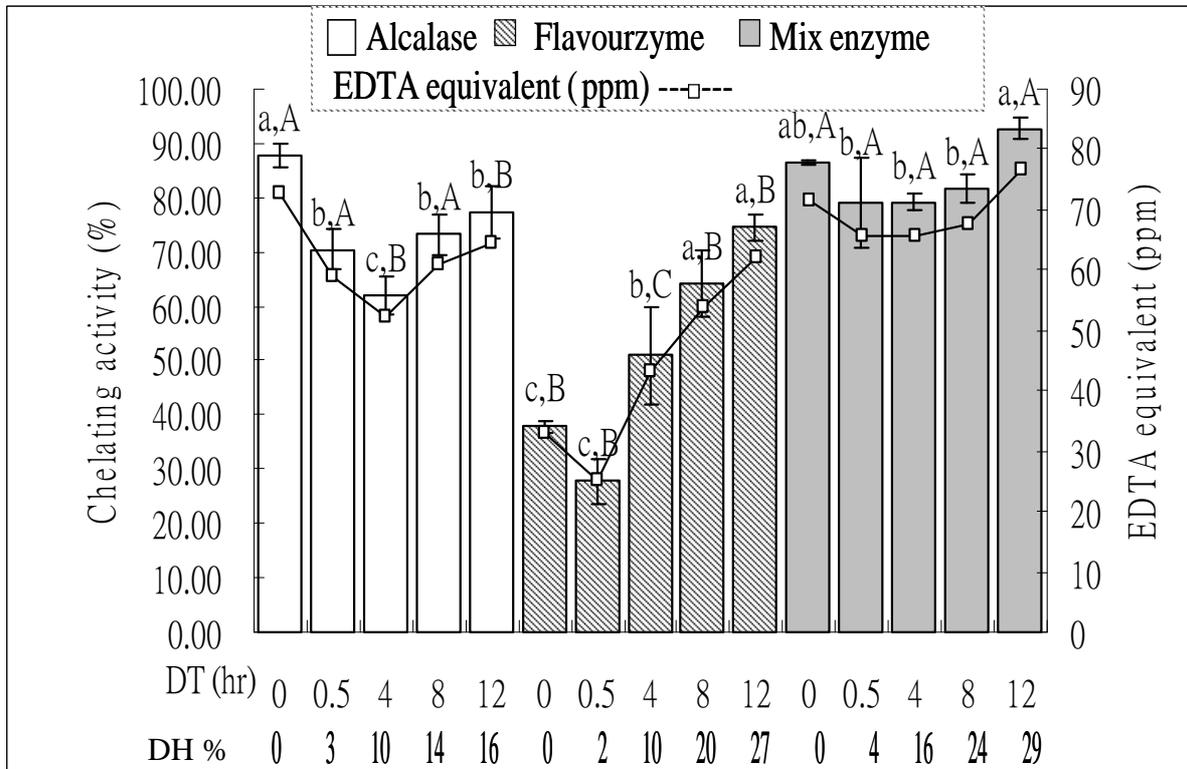
圖二十五、DEYP 水解物之水解率與還原力之關係。
 Fig. 25. Relationship between DH and reducing power of DEYP hydrolysate.

此混合酵素組之水解物還原力皆較高。因此混合酵素組之水解物還原力皆較高。研究指出將鮪魚肝臟以 Alcalase 進行 8 hr 水解後再以 Flavourzyme 進行第二次水解，其結果發現經二階段水解之水解物比僅受一次水解之水解物更具自由基清除能力 (Je *et al.*, 2009)。顯示利用混合酵素水解物確實較單一酵素水解物更具還原能力。

(三)、螯合亞鐵離子能力

食品中的金屬離子，特別是少量的 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 存在時，便能加速脂質自氧化速率，結果導致自由基的產生，並且使氫過氧化物斷裂生成揮發性成分物質，影響食品之品質。因此若能將此類金屬離子螯合，降低其促氧化反應，便能達到減緩脂質氧化而達到抗氧化的目的。利用 Fe^{2+} 與 ferrozine 的複合物在 562 nm 下有強烈吸光值，當樣品在螯合反應系統中的 Fe^{2+} 離子時，則吸光值降低，吸光值愈低即表示試樣的抗氧化能力愈強。

圖二十六為酵素種類與水解時間對DEYP水解物金屬螯合能力與EDTA之影響。結果顯示，DEYP在未水解前即有螯合能力，其中未經Alcalase及混合酵素水解的DEYP均質液 (HA-0及HM-0) 之金屬螯合能力顯著高於未經Flavourzyme水解的DEYP均質液 (HF-0) ($p<0.05$)，而DEYP經三組酵素水解後，其金屬螯合能力皆在水解後有下降的趨勢 ($p<0.05$)，且在水解初期水解物金屬螯合能力隨著水解時間增加而降低，顯示水解作用可能會對DEYP原本的金屬螯合能力造成破壞。然而，在Alcalase、Flavourzyme及混



圖二十六、酵素種類與水解時間對DEYP水解物金屬螯合能力與EDTA當量之影響。

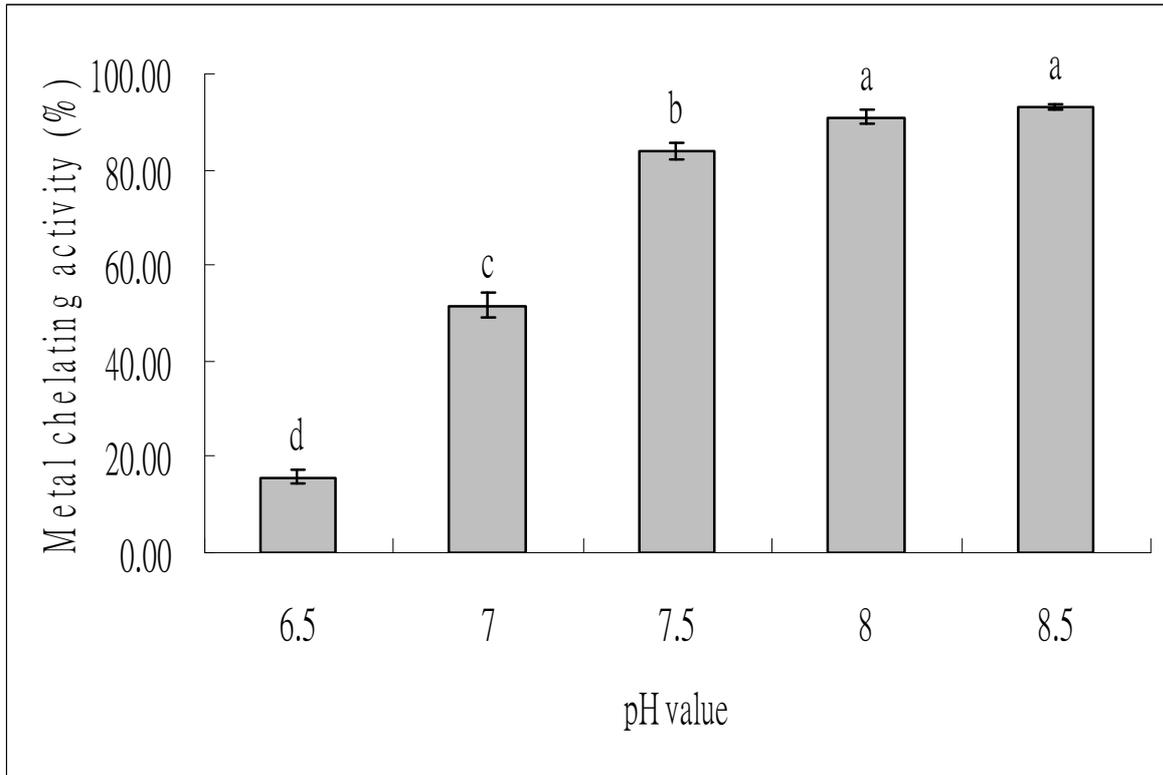
Fig. 26. Effect of enzymes and hydrolysis time on chelating activity and EDTA equivalent of DEYP hydrolysates. DEYP was hydrolyzed at 50°C and initial pH 8.5 using Alcalase (E/S=10 %), initial pH 7 using Flavourzyme (E/S=10 %) and initial pH 8.5 using Mix (5 % Alcalase + 5 % Flavourzyme), respectively. Data are mean ± SD of three replicates. ^{a-c}Different letters within the same proteinase used indicate significant differences ($p < 0.05$), and ^{A-C}different capital letters within the same hydrolysis time indicate significant differences ($p < 0.05$).

合酵素的水解下水解物分別在水解4、0.5、8 hr後其金屬螯合能力隨著水解時間又呈上升之趨勢 ($p < 0.05$)。經水解後之DEYP水解物則皆以水解12 hr之水解物有最高的金屬螯合力，HA-12、HF-12及HM-12之金屬螯合能力分別為77.47、74.48及92.72 %。其中以HM-12最具金屬螯合能力 ($p < 0.05$)，約等於76 ppm 之EDTA當量。然而，HM-0與HM-12之間的金屬螯合能力並沒有顯著差異 ($p > 0.05$)。顯示水解DEYP對於金屬螯合能力並未有提升的作用。

對於水解物之金屬螯合能力之相關研究發現在金帶細鯪脫脂魚肉 (Klompong *et al.*, 2007)、銀鯉 (Dong *et al.*, 2008)、羅式圓鯪 (Thiansilakul *et al.*, 2007)、雞腿骨 (鄭, 2007) 及牡蠣 (邱, 2007) 之蛋白質水解物其金屬螯合能力在特定的酵素水解下皆呈現隨著水解率上升而提升的趨勢。其中Dong (2008) 以Alcalase及Flavourzyme對銀鯉魚肉蛋白質進行水解，提及Alcalase及Flavourzyme水解物的水解率與金屬螯合能力之相關係數的平方值 (r^2) 分別為0.92及0.95。結果顯示水解率與金屬螯合能力應呈現高度的正相關性。然而在本試驗之測定結果中，DEYP水解物之金屬螯合能力隨著水解時間呈現先下降而後又漸趨增加的趨勢。推測可能原因為水解物之金屬螯合受到pH值及水解率之交互影響下而產生變化。

由於HA-0、HF-0及HM-0皆為未添加酵素前之DEYP均質液，其水解之基質濃度、溫度皆相同，唯一的不同在於三者的水解起始之pH值不同，其

中HA-0及HM-0之pH值為8.5；HF-0為pH7.0，顯示相同的DEYP均質液(HA-0、HF-0及HM-0)其金屬螯合能可能會受到pH的變化而有所影響。文獻指出蛋黃中的phosvitin其一級結構具有強烈的金屬螯合能力(Grizzuti & Perlman, 1973, 1975；Hegenauer, Salman,& Nace, 1975)，而在卵黃磷醣蛋白(phosvitin)之金屬螯合能力與pH值之相關研究指出卵黃磷醣蛋白在pH值3.0-7.0及低離子強度0-0.2M下其金屬螯合能力隨著pH值而上升(Castellani *et al.*, 2004)，因此，推測可能造成HA-12、HM-12與HF-12有不同的金屬螯合能力及在水解初期其水解物金屬螯合能力的下降是由於水解過程造成pH下降而使其金屬螯合能力隨之下降。為證實此推測的可能性，利用未水解的DEYP均質液調整其pH值用並測定其金屬螯合能力。圖二十七為pH值對DEYP之金屬螯合能力之影響，結果顯示，DEYP在pH值6.5-8.5之間，其金屬螯合能力會隨著pH的下降而使金屬螯合能力下降。故pH值的改變確實會對DEYP之金屬螯合能力造成影響。因此，由於HA-0、HM-0之起始pH值8.5高於HF-0之起始pH值7.0，使得HA-0、HM-0在未水解前金屬螯合能力已高於HF-0。並且隨著DEYP水解初期其pH值隨之下降(圖二十)，使得金屬螯合能力在水解初期有逐漸下降的趨勢。然而，由於各組酵素水解2 hr後其pH值逐漸平穩，DEYP水解後所產生之金屬螯合胜肽片段之功能逐漸展現出來，使得Alcalase、Flavourzyme及混合酵素的水解物分別在水解4、0.5、8 hr後其金屬螯合能力皆隨著水解時間增加而上升。研究指出胜肽鍵的斷裂會



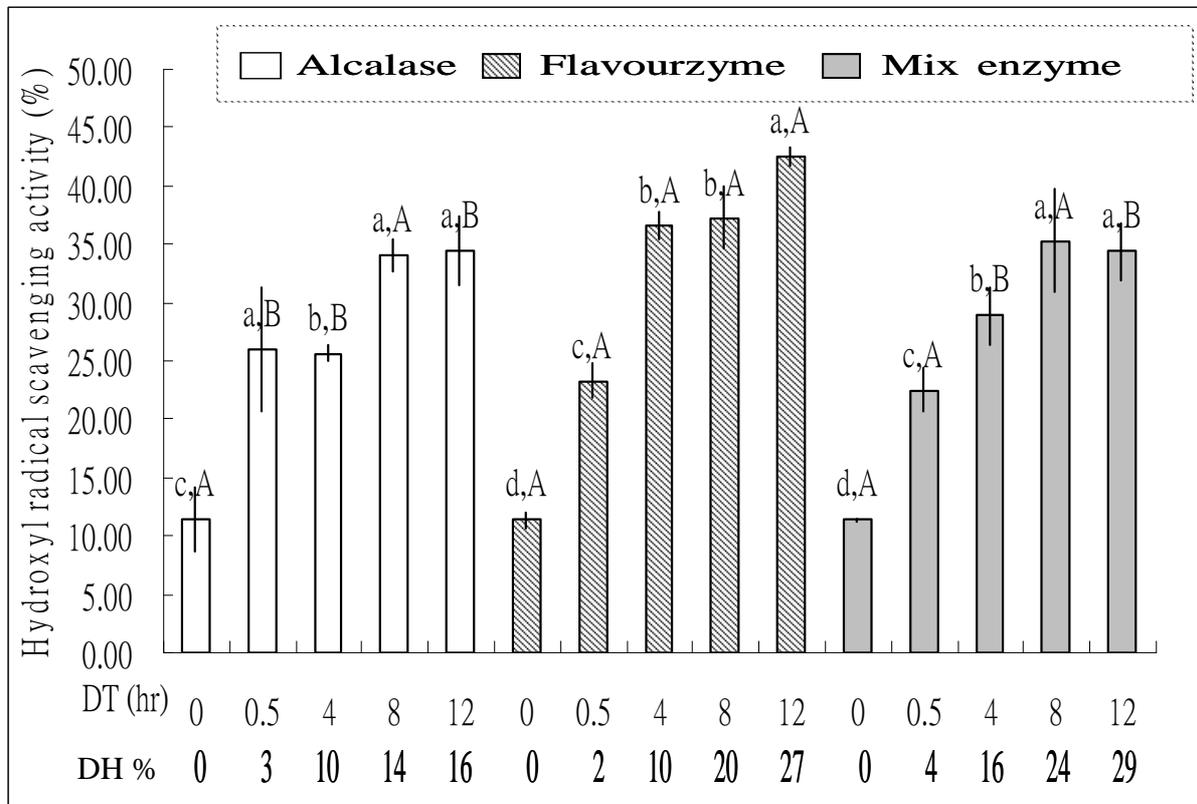
圖二十七、 pH 值對 DEYP 之金屬螯合能力之影響。
Fig. 27. Effect of pH value on chelating activity of DEYP.

增進對亞鐵離子的鍵結能力其歸因於酸性或鹼性胺基酸支鏈上的羧基 (-COO⁻) 與胺基 (-NH₃⁺) 的數目增加，此類的胺基酸可將促進氧化之游離金屬從氫氧自由基系統移除，以達到抗氧化的功能 (Dong *et al.*, 2008)。此外，研究指出可溶性的蛋白質及胜肽濃度的提升也會增加螯合能力 (Saiga *et al.*, 2003)，而對照於DEYP在不同酵素與水解時間下其水解物產率 (% TCA可溶性氮) 之結果中 (圖二十二)，HM-12的產率為最高，即表示HM-12具有最高可溶性的蛋白質及胜肽濃度比例，此因素亦可能是HM-12具有最高金屬螯合能力的原因。

(四)、氫氧自由基清除能力

自由基當中大部分屬活性氧 (reactive oxygen species ; ROS) 之活性氧自由基是不安定的，且易與體內的其他基團及物質產生反應使得細胞受損及增進疾病的產生 (Halliwell & Gutteridge, 1989)。在活性氧中又以氫氧自由基最為活潑，並極易與胺基酸、蛋白質及 DNA 等分子反應 (Cacciuttolo *et al.*, 1993)，因此清除氫氧自由基可能為最具幫助體內預防各種疾病的方法之一 (Je *et al.*, 2005)。清除氫氧自由基能力的測定是藉由芬頓反應 (fenton reaction) 中 Fe²⁺與 H₂O₂反應下會生成氫氧自由基，所生成氫氧自由基會攻擊試劑中的脫氧核糖，最終產生丙二醛，若水解物能清除氫氧自由基，則可抑制脫氧核糖的氧化。

圖二十八為酵素種類與水解時間對 DEYP 水解物氫氧自由基清除能力



圖二十八、酵素種類與水解時間對DEYP水解物氫氧自由基清除能力之影響。

Fig. 28. Effect of enzymes and hydrolysis time on hydroxyl radical scavenging activity of DEYP hydrolysates. DEYP was hydrolyzed at 50°C and initial pH 8.5 using Alcalase (E/S=10 %), initial pH 7 using Flavourzyme (E/S=10 %) and initial pH 8.5 using Mix (5 % Alcalase + 5 % Flavourzyme), respectively. Different letters within the same enzyme indicate significant differences ($p<0.05$), and different capital letters within the same hydrolysis time indicate significant differences ($p<0.05$).

之影響。各組酵素水解物之清除氫氧自由基能力皆顯著較未水解前之 DEYP 高 ($p < 0.05$)，且其清除氫氧自由基之能力隨著水解時間增加有上升的趨勢。在不同的酵素水解下，相同水解時間的水解物中以 Flavourzyme 水解之水解物最具有清除氫氧自由基之能力，隨著 Flavourzyme 水解 0、0.5、4、8 及 12 hr 清除氫氧自由基之能力由 11、23、36、37 上升至 42 %；Alcalase 與混合酵素組之清除能力則在水解 8 hr 後則呈現平緩的趨勢。

Dong 等人 (2008) 以 Alcalase 與 Flavourzyme 對分別對銀鯉魚肉蛋白質進行 0-6 hr 的水解並測定其清除氫氧自由基能力之變化。結果顯示，在 0-2 hr 水解物的清除能力隨水解時間增加而上升，2 hr 後其清除能力則漸趨平緩。作者提及其水解物之氫氧自由基清除能力上升與水解物的水解率有關。由於銀鯉魚肉水解物在水解 2 hr 後水解率已逐漸平緩，使得氫氧清除能力也呈漸趨平緩。對照於本次試驗之結果，發現 DEYP 水解物之氫氧清除能力可能亦與水解率的變化有關。DEYP 水解物在 8-12 hr 之水解率的變化中，Alcalase 與混合酵素組之水解率的變化不若 Flavourzyme 組大。這可能是 Alcalase 與混合酵素組之氫氧自由基清除能力在 8 hr 後無持續上升的原因。研究指出將水解 6 hr 後雞蛋黃水解物進行清除氫氧自由基能力之測定，發現雞蛋黃水解物濃度的上升其清除氫氧自由基能力也隨之升高 (Sakanaka *et al.*, 2004)。顯示胜肽等類的小分子片段的增加對氫氧自由基能力有正向幫助。因此，DEYP 水解物的氫氧自由基清除能力可能是在高水解

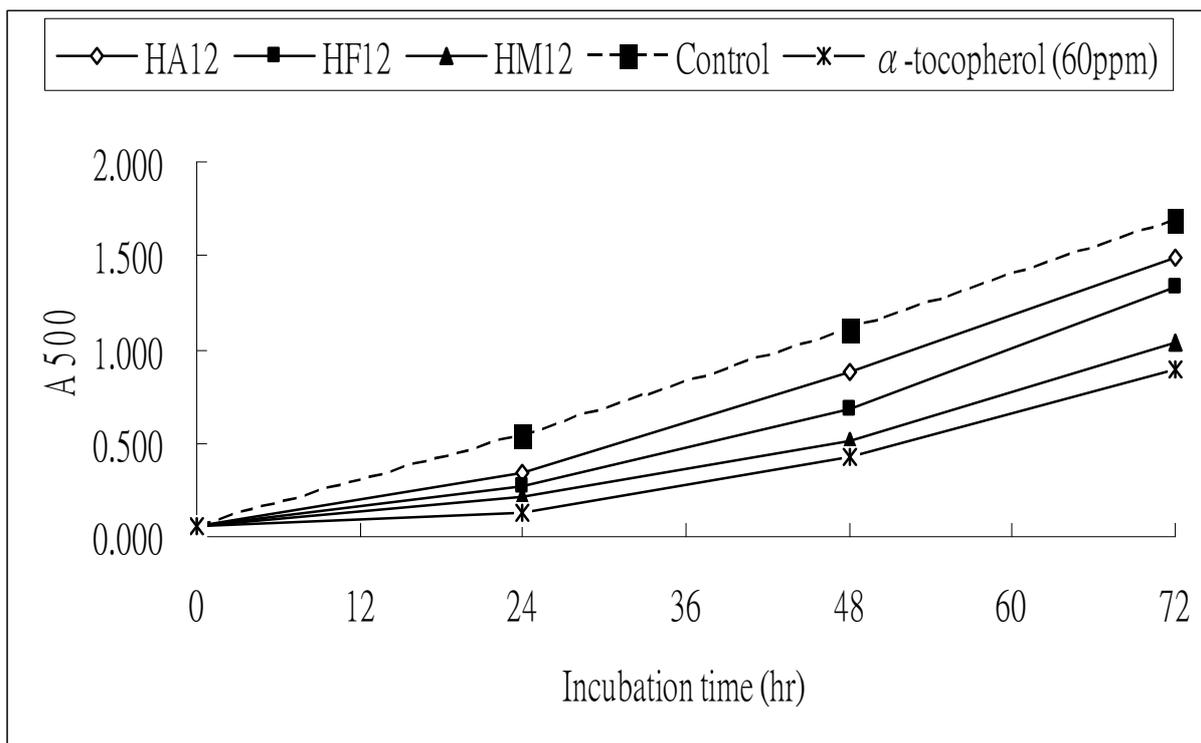
率中小分子的胜肽片段比例增加而對清除能力所提升。此外，亦有研究指出水解物具有清除能力與胜肽本身的胺基酸組成及序列有關 (Rajapakse *et al.*, 2005 ; Pihlanto-Leppälä, 2001)，而水解物之胺基酸組成及序列取決於酵素的切位及蛋白質的種類。在 DEYP 水解物氫氧自由基清除能力的測定中，是以 Flavourzyme 水解物為最強；在清除 DPPH 自由基能力是以 Alcalase 水解物及混合酵素水解物為最強；還原力、金屬螯合力則是以混合酵素水解物最具抗氧化性。顯示蛋白質水解物的抗氧化性確實會因不同酵素種類水解而對抗氧化機制有不同的表現。

(五) 抑制亞麻油酸過氧化能力

亞麻油酸為一不飽和脂肪酸，在抗氧化的測定上通常可用來作為評估樣品在亞麻油酸乳化系統中是否具有延緩及對抗油脂氧化之能力。在油脂自氧化過程中羰自由基 ($R\cdot$)、過氧化自由基 ($RO_2\cdot$; $RO\cdot$) 及油脂氫過氧化物 ($ROOH$) 皆會在氧化過程裡產生 (Burton and Ingold 1986; Zhu *et al.* 2006)。因此，水解物中若對自由基、活性氧及過渡金屬等會促進的氧化之因素有清除或螯合能力，則會對於油脂有抑制氧化之效果。

由於在先前所測定的清除 DPPH 自由基能力、還原力、金屬螯合力及氫氧自由基清除能力的結果顯示，DEYP 之水解物皆以水解 12 hr 之水解物最具抗氧化能力。但受到不同酵素種類對水解之影響其抗氧化結果有所差異。因此，以各組酵素水解物中最具抗氧化能力之水解物 HA-12、HF-12 及 HM-12 在亞麻油酸乳化系統中進行測試，以作為水解物整體抗氧化能力

評估之指標。圖二十九為 DEYP 水解物對抑制亞麻油酸過氧化能力之影響。結果顯示，HA-12、HF-12 及 HM-12 的抑制油脂氧化能力皆較 control 高，且其抑制能力為 $HM-12 > HF-12 > HA-12$ 。顯示受到 Alcalase、Flavourzyme 及混合酵素水解之 DEYP 水解物皆具有抑制油脂自氧化之功能。綜合以上結果顯示 HM-12 在 DEYP 水解物中具最佳的抗氧化能力，因此爾後選擇 HM-12 進行膜反應系統之區分以及胺基酸組成之分析，以探討抗氧化水解物中的片段大小及胺基酸組成是否對於其抗氧化性有所影響。



圖二十九、DEYP水解物以硫氰酸鐵法在40 °C、三天後之抑制亞麻油酸過氧化能力。

Fig. 29. The inhibition on linoleic acid peroxidation of DEYP hydrolysates by the ferric thiocyanate method at 40°C for 3 days. HA-12=Hydrolysates prepared by DEYP hydrolysis with Alcalase for 12 hours. HF-12=Hydrolysates prepared by DEYP hydrolysis with Flavourzyme for 12 hours. HM-12=Hydrolysates prepared by DEYP hydrolysis with mix enzyme.

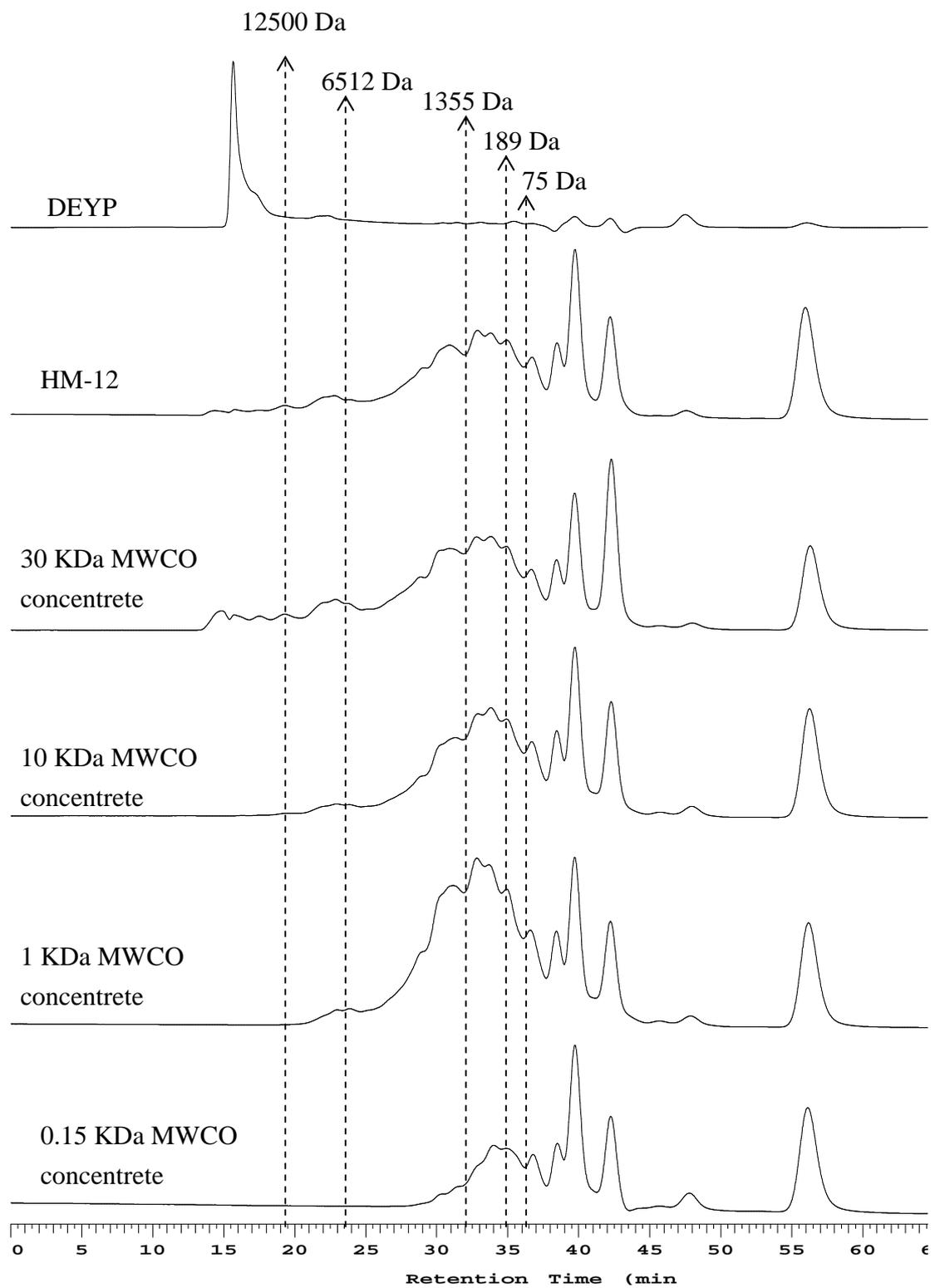
五、HM-12 及其區分物之分子量分布與抗氧化能力比較

蛋白質經酵素水解作用後，水解物中含有不同分子大小之胜肽片段與游離胺基酸，使用超過濾膜反應系統依序以 30 KDa、10 KDa、1 KDa 及 0.15 KDa MWCO (molecular weight cutoff; MWCO) 之超濾膜，將 HM-12 劃分為四個區分物，分別為 30 KDa 濃縮液、10 KDa 濃縮液、1 KDa 濃縮液及 0.15 KDa 濃縮液，檢測 HM-12 及四段區分物之分子量分布，並比較其抗氧化能力。

(一) 分子量分布

圖三十為 DEYP、HM-12 及經不同分子量限值區分後所得濃縮液的分子量分布圖，其標準品分子量大小包括 12588、6512、1355、189 及 75 Da。而藉由標準品與滯留時間 (retention time) 的比對 (附錄六)，可得到分子量與滯留時間之關係圖 (附錄七)，表四藉由此相對關係方程式換算 DEYP、HM-12 及區分後濃縮液各自在 >10000、5000-1000、500-1000、100-500 及 <100 Da 等分子大小範圍下之波峰面積佔波峰總面積之百分比。

表四中未水解的 DEYP 均質液主要分子量為大於 10,000 Da 及小於 500 Da 的胜肽為主，分別佔總胜肽量的 73.2 % 及 26 %；HM-12 主要波峰為 1000-5000 Da 及小於 1000 Da 的胜肽片段，分別佔總胜肽的 16.0 % 及 82.5 %。結果顯示，DEYP 受到混合酵素水解 12 hr 後會使 DEYP 中原本大於 10,000 Da 的大分子水解而斷裂，取而代之的則是 1000-5000 Da 及小於



圖三十、HM-12 水解物經不同分子量限值區分後所得區分物分子量分布。

Fig. 30. The molecule weight distribution of HM-12 with different molecular cut-off membranes.

表四 HM-12 水解物經不同分子量限值區分後所得濃縮液之分子量分布

Table 4 The molecule weight distribution of concentrates from fractionation of HM-12 with different molecular cut-off membranes

Sample ¹	Molecular weight distribution ² (%)					
	<10000 Da	5000-10000 Da	1000-5000 Da	500-1000 Da	100-500 Da	<100 Da
DEYP	73.2	0.2	0.0	0.7	9.1	16.9
HM-12	2.8	5.1	9.6	12.6	28.6	41.3
30KDa concentrate	5.8	6.7	9.8	13.3	27.8	36.6
10KDa concentrate	0.1	0.5	0.0	8.7	36.3	54.4
1KDa concentrate	0.0	2.3	0.0	0.0	65.1	32.6
0.15KDa concentrate	0.0	0.0	0.0	0.0	35.6	64.4

¹ DETP hydrolyzing with mix enzyme for 12 hour produced HM-12. HM-12 filtered by a membrane molecule with 30kDa, 10kDa, 1kDa and 0.15kDa MWCO denoted as 30KDa, 10KDa, 1KDa and 0.15KDa concentrate, respectively.

² The chromatogram indicated that major peaks of the concentrate was located at >10000, 5000–10000, 1000–5000, 500-1000, 100-500 and <100 Da, respectively.

1,000 Da 的胜肽片段或游離胺基酸。Sakanak 等人 (2004) 以 Orientase 及 protease (EC 3.4.11.12) 對雞蛋黃蛋白質進行 6 hr 水解，並探討其水解物之抗氧化與分子量分布情形。作者指出雞卵黃抗氧化水解物其分子量主要為小於 1000 KDa 之胜肽片段。在本次試驗的 HM-12 之主要分子量分佈亦為小於 1000 KDa 之胜肽片段，顯示在蛋黃蛋白質水解物中小於 1000 KDa 之胜肽片段是主要具抗氧化能力的分子量範圍。

HM-12 經不同分子量限值 30 KDa、10 KDa、1 KDa 及 0.15 KDa MWCO 區分後。隨著濾膜分子量限值的減少，各濃縮液之分子量分布有逐漸向右移動的趨勢。對照於表四，可發現 HM-12 經 30 KDa 濾膜區分後其 5000-10,000 及 <10,000 Da 片段的百分比有明顯的上升。而利用經 30KDa 濾膜區分後之濾液接續進行 10 KDa、1 KDa 及 0.15 KDa 濾膜的區分，其所得的 10 KDa、1 KDa 及 0.15 KDa 濃縮液分子量之主要分布分別由 < 1000 Da、< 500 Da 下降至以 <100 Da 為主。結果顯示，隨著不同分子量限值濾膜增加可移除較高分子量的胜肽片段及增加小分子片段之百分比。在鱈魚骨蛋白質水解物以超過濾膜進行不同分子量限值 30 KDa、10 KDa、5 KDa 及 1 KDa MWCO 區分的研究中，其結果顯示區分後區分物之波峰分布位置大致相似，而隨著濾膜的分子量限值減少，大分子的波峰有逐漸減少及消失的趨勢

(Jeon *et al.*, 1998)。本試驗與其結果相近。近年來已有多篇文獻 (Chiang *et al.*, 1999 & 2006 ; Samuelsson and Poulsen, 1992) 利用超過濾膜反應系統對具機能性的蛋白質水解物進行區分。利用此技術可使水解物中未水解的高分子量蛋白質及胜肽去除，並將特定的胜肽區分並增量 (Pihlanto-Leppälä, 2001)。故利用以上具不同分子量分布之濃縮液，進一步地探討分子量大小對抗氧化之影響。

(二) 區分物之抗氧化能力比較

表五為 HM-12 經不同分子量限值區分後 30KDa、10KDa、1KDa 及 0.15 KDa 濃縮液之抗氧化能力。區分物在相同的濃度 (50 mg/ml) 下其 DPPH 清除自由基能力及還原力以 1KDa 濃縮液具有最高的抗氧化能力 82.47 % 及吸光值 1.34 ($p < 0.05$)；氫氧自由基清除能力在 10KDa、1KDa 及 0.15 KDa 濃縮液皆展現較高的清除能力 60.29 - 64.96 % ；在金屬螯合能力方面，區分物則在相同濃度 (10 mg/ml) 下以 30KDa 濃縮液有最高的金屬螯合能力 99.47 % ($p < 0.05$)。依據上述之結果顯示，會因區分物本身分子量分布的不同而對其抗氧化能力有所影響。故以下將分別對區分物之不同抗氧化機制與分子量分布之關係進行探討。

(1) 區分物之自由基終止效應

表五 HM-12 水解物經不同分子量限值區分後所得濃縮液之抗氧化能力

Table 5 Antioxidant activity of concentrates from fractionation of HM-12 with different molecular cut-off membranes

Sample ¹	DPPH ² (%)	Reducing power ² (A ₇₀₀)	Matal Chelating ² (%)	• OH ² (%)
HM12	76.95±3.84 ^{ab}	1.20±0.02 ^b	98.58±0.12 ^{ab}	50.84±4.08 ^b
30KDa concentrate	69.01±3.28 ^b	0.87±0.04 ^d	99.47±0.52 ^a	49.78±2.92 ^b
10KDa concentrate	56.77±4.8 ^c	1.08±0.04 ^c	97.17±0.32 ^b	63.36±0.46 ^a
1KDa concentrate	82.47±5.4 ^a	1.34±0.01 ^a	55.76±1.27 ^c	64.69±2.70 ^a
0.15KDa concentrate	13.26±6.6 ^d	0.79±0.01 ^d	34.00±1.03 ^d	60.29±1.03 ^a

¹ DETP hydrolyzing with mix enzyme for 12 hour produced HM-12. HM-12 filtered by a membrane molecule with 30kDa, 10kDa, 1kDa and 0.15kDa MWCO denoted as 30KDa, 10KDa, 1KDa and 0.15KDa concentrate, respectively.

² The DPPH radical scavenging activity (DPPH), Reducing power, Metal chelating activity and Hydroxyl radical scavenging activity (• OH) of the HM-12 and its concentration, respectively, filtered by different molecular weight cut-off membranes in a membrane reactor system. Means with different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

高的抗氧化能力，而對照於表四不同分子量限值區分後所得濃縮液之分子量分布，發現 1KDa 濃縮液之主要分子量分布為 100-500 Da 及 <100 Da，分別為 65.1 % 及 32.6%，故具提供氫或電子的胜肽片段可能是來自於此範圍中。然而，由於在 0.15KDa 濃縮液之主要分子量分布亦為 100-500 Da 及 <100 Da，其百分比分別為 35.6 % 及 64.4 %，但 0.15KDa 濃縮液之 DPPH 清除自由基能力及還原力分別為 13.26 % 及吸光值 0.79，顯著的低於 1KDa 濃縮液 ($p < 0.05$)。故推測 1KDa 濃縮液之主要波峰 100-500 Da 才具有提供氫質子或電子使氧化物還原之能力。

早期的研究指出某些含有芳香族殘基 (aromatic amino acid residue) 之胺基酸 Tyr、Pro 及 His 的雙胜肽及三胜肽具有強烈的抗氧化能力 (Kawashima *et al.*, 1979)。其具抗氧化之雙胜肽如由 β -Ala 及 His 所組成肌肽及甲基化後的甲肌肽，目前已有多篇研究指出此類的胜肽具有多種抗氧化機制 (Rubtsov *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1994; Huang and Kuo, 2000)。在抗氧化水解物之研究方面，將圓小沙丁魚 (*Sardinella aurita*) 廢棄物蛋白質使用沙丁魚腸粗酵素進行水解，進一步分離純化後發現分子量 431.2 Da 之 Leu-His-Tyr 胜肽片段具有最高的清除 DPPH 自由基能力 (Bougatef *et al.*, 2010)。豬皮明膠 (porcine collagen) 使用混合酵素進行水解，結果顯示，其水解物具有好的清

除 DPPH 自由基及金屬螯合能力，進一步分離純化後發現分子量 430.91Da 之 Gln-Gly-Ala-Arg 胜肽片段為主要抗氧化活性胜肽(Li *et al.*, 2007)。因此，在 DEYP 水解物中推測提供氫質子或電子使氧化物還原之能力之胜肽片段大小可能亦如上述之二至四個胺基酸所組成的胜肽片段。

(2) 區分物之金屬螯合能力

在表五 HM-12 區分物之金屬螯合能力測定之結果，30KDa 濃縮液展現出最高的金屬螯合能力 99.47 % ($p < 0.05$)，而 HM-12 及 10 KDa 濃縮液亦具有高度的金屬螯合能力分別為 98.58 及 97.17 %。結果顯示提供水解物的金屬螯合能力可能是來自於較大的分子量範圍。對照於表四之區分物分子量分布，發現 HM-12 及 30KDa 濃縮液相較其它區分物在 >10000 、 $5000-10000$ 及 $1000-5000$ Da 的分子量範圍中佔有較高的百分比。因此，金屬螯合能力可能是來自於 >1000 Da 的胜肽片段。然而由於 10 KDa 濃縮液之在 >10000 、 $5000-10000$ 及 $1000-5000$ Da 等分子量範圍之波峰面積僅分別佔之總波峰面積的 0.1、0.5 及 0 %，而其金屬螯合能力卻高達 97.17 %。顯示主要提供金屬螯合能力之胜肽片段並非來自於 >1000 Da 的分子量範圍；而在 $500-1000$ Da 範圍中其 HM-12、30KDa、10 KDa、1KDa 及 0.15KDa 濃縮液分子量分布之百分比分別為 12.6、13.3、8.7、0 及 0 %，而其金屬螯合能力分

別為 98.58、99.47、97.17、55.76 及 34.00 %。此結果顯示 500-1000 Da 可能為提供金屬螯合能力之主要範圍。在 100-500 Da 及 <100 Da 之範圍下其區分物之分子量分布之百分比以 1KDa 及 0.15KDa 濃縮液為最高，但金屬螯合能力卻是較低。故可由上述推論 500-1000 Da 的胜肽片段可能是主要提供 HM-12 水解物金屬螯合能力之分子量範圍。

目前已有研究將紫殼菜蛤 (*Mytilus edulis*) 利用發酵過程中由微生物所釋出的蛋白酶進行 6 個月的水解，其發酵液經分離純化後分子量為 962 Da 之 His-Phe-Gly-Asp-Pro-Phe-His 胜肽片段。此胜肽片段之展現出高於正對照組 citrate 之 >95 % 的金屬螯合能力 (Rajapakse *et al.* 2005)。然而在美洲大赤魷 (*Dosidicus gigas*) 魚肉中明膠水解物經純化後之 Phe-Asp-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Val-Leu (分子量 880.18 Da) 胜肽片段雖具有很強的清除氫氧自由基及羰自由基能力但並未具有強烈的金屬螯合能力。其中作者指出具有 His 之胜肽片段通常可扮演金屬螯合劑的角色。而在此胜肽中並無 His 之胺基酸，故其並未具強烈的金屬螯合能力 (Mendis *et al.* 2005)。因此，500-1000 Da 的胜肽片段雖可能是主要提供金屬螯合能力之分子量範圍，但其胜肽片段的胺基酸組成應比分子量之大小對金屬螯合能力更具影響力。亦或胜肽片段需在適當分子量之大小及胺基酸組成下才可展現出金屬螯合能力。

(3) 區分物之氫氧自由基清除能力

表五中氫氧自由基清除能力在 10KDa、1KDa 及 0.15 KDa 濃縮液等區分液皆具有較高的清除能力分別為 63.36、64.96 及 60.29 %，且三者間並無顯著差異 ($p>0.05$)。對照於表四，其濃縮液之主要分子量分布在 1000-500、100-500 及 <100 Da 的範圍。然而，雖然 10KDa、1KDa 及 0.15 KDa 濃縮液各自在上述分子量範圍的百分比並不相同，但皆具有相近的氫氧自由基清除能力，因此可推測 <1000 Da 之胜肽片段即可具清除活性氧中氫氧自由基之能力。

在先前對 DEYP 水解物之氫氧自由基清除能力的探討中，結果顯示水解率的提升使小分子胜肽片段的增加對氫氧自由基能力有正向幫助 (見 p99)。此結果亦可支持 <1000 Da 的小分子胜肽片段為主要提供清除活性氧中氫氧自由基之能力之論點。在使用脫脂雞肉及鴨肉水解物進行超過濾膜區分之抗氧化相關研究中，作者亦指出主要提供氫氧自由基清除能力之分子量範圍為 <1355 Da 之胜肽片段 (王，2009；孫，2009)。本試驗與其結果相似。Je *et al.* (2005) 以鯖魚腸道之粗酵素水解阿拉斯加鱈魚 (Alaska pollack) 魚骨，水解物經超過濾膜區分及分離純化後分子量 672 Da 之 Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr 為最具清除氫氧自由基活性之胜肽片段。Mendis *et al.* (2005) 以 trypsin 水解美洲大赤魷 (*Dosidicus gigas*) 魚皮中的明膠，其水解物經超過濾膜區分及分離純化出分子量為 880.18 Da Phe-Asp-Ser-Gly- Pro-Ala-

Gly-Val-Leu 之胜肽片段。此胜肽皆具有很強的清除氫氧自由基活性及羰自由基清除能力。文中提及鮭魚皮的明膠水解物具有較高的抗氧化能力歸因於 trypsin 的水解相較於其他酵素水解具有最高的水解率而可產生較短的胜肽。此外，上述二篇文獻皆指出胜肽片段上胺基酸種類的不同也是影響其胜肽片段抗氧化能力的主因之一。

六、抗氧化水解物及其區分物之胺基酸組成

綜合以上試驗的結果，發現利用 Alcalase、Flavourzyme 及混合酵素水解 DEYP 之水解物中以 HM-12 為最具抗氧化性；而利用 HM-12 經超過濾膜區分之濃縮液中以 30KDa 濃縮液最具金屬螯合能力，1KDa 濃縮液則兼具最高的自由基終止效應及活性氧清除能力。由於胜肽或蛋白質之抗氧化性除了分子大小量有關外，亦與其序列上之胺基酸的化學性有關如疏水性及轉移電子之能力等 (Mendis *et al.*, 2005)。因此，除了探討 DEYP 水解物分子量對抗氧化之影響外亦期望了解其水解級區分的過程中是否也對於胜肽片段的胺基酸組成有所影響。表六為 DEYP、HM-12、30KDa 濃縮液及 1KDa 濃縮液之胺基酸組成，並將 DEYP 與 HM-12 之胺基酸組成進行比較，以探討水解前後之胺基酸組成與水解物抗氧化之關係；及比較 HM-12、30KDa 濃縮液及 1KDa 濃縮液之胺基酸組成，以探討經超過濾膜區分前後之胺基酸組成與區分物抗氧化之關係。

在比較 DEYP 與 HM-12 胺基酸組成中大部分的胺基酸並未有太大的改變，僅在 Asp+Asn、Val、Ile 及 Lys 等胺基酸在 DEYP 經混合酵素水解 12 hr 後有較顯著的變化 ($p < 0.05$)。經水解後 Val、Ile、Lys 之胺基酸百分比分別由 6.4、3.01 及 9.88 % 上升至 8.82、4.06 及 11.22 %。目前對於水解物胺基酸組成與抗氧化之研究中，有研究指出富含疏水性的胺基酸 (>51 %) 的鮭魚明膠水解物在亞麻油酸乳化系統下具有抑制油脂氧化之作用。由於在亞麻油酸乳化系統中溶於油脂的自由基會去攻擊亞麻油酸而導致脂質自氧化，而富含疏水性胜肽片段與油脂間有較高的親和性，可更容易提供質子以保護脂質不被氧化 (Mendis *et al.* 2005)。亦有學者指出由黃豆蛋白質水解物其胜肽片段雖含有 His 但缺少疏水性胺基酸而導致此胜肽片段不具抗氧化能力 (Chen *et al.*, 1998)。顯示疏水性胺基酸可能具有增加胜肽與油脂之間的親和性而使胜肽片段上具抗氧化能力的胺基酸更容易與自由基作用。因此，HM-12 中 Val 及 Ile 的增加可能有助於水解物具抗氧化性。此外，在水解過程中酸性或鹼性胺基酸之側鏈基團上的羧基 (-COO⁻) 與胺基 (-NH₂) 的數目增加可增進對 Fe²⁺ 的螯合能力，且亦可減少因 Fe²⁺ 催化氫過氧化物 (H₂O₂) 所產生氫氧自由基數目。因此鹼性的胺基酸如 Lys 含量的增加，可能對金屬螯合能力及清除氫氧自由基有所貢獻。然而，Lys 側鏈上胺基之 pKa 值為 10.53，而水解 DEYP 的

表六 DEYP、HM-12、30KDa 濃縮液及 1KDa 濃縮液之胺基酸組成
 Table 6 Amino acid composition of DEYP, HM-12, 30KDa concentrate
 and 1KDa concentrate

Amino acid ¹	DEYP	HM-12	30 KDa concentrate	1KDa concentrate
Asp+Asn	9.43 ± 1.02 ^a	7.86 ± 0.22 ^b	6.66 ± 0.23 ^b	7.60 ± 1.00 ^b
Glu+Gln	9.08 ± 0.03 ^{bc}	8.60 ± 0.5 ^c	9.60 ± 0.41 ^b	11.86 ± 0.07 ^a
Ser	11.50 ± 0.23 ^a	10.16 ± 1.23 ^a	7.30 ± 0.02 ^b	6.74 ± 0.16 ^b
Thr	5.21 ± 0.54 ^b	5.85 ± 0.31 ^a	6.25 ± 0.04 ^a	5.77 ± 0.05 ^a
Gly	6.05 ± 0.32 ^a	5.89 ± 0.22 ^a	6.73 ± 0.04 ^a	5.41 ± 0.3 ^a
Arg	4.34 ± 0.28 ^a	2.42 ± 0.22 ^b	1.80 ± 0.04 ^c	0.95 ± 0.05 ^d
Ala	9.50 ± 0.41 ^b	9.74 ± 0.38 ^b	10.43 ± 0.00 ^{ab}	12.09 ± 0.05 ^a
Pro	6.05 ± 0.27 ^c	5.44 ± 0.22 ^d	7.54 ± 0.06 ^a	6.85 ± 0.29 ^b
Val	6.40 ± 0.22 ^b	8.82 ± 1.44 ^a	7.09 ± 0.12 ^{ab}	8.71 ± 0.1 ^{ab}
Met	2.03 ± 0.21 ^a	2.10 ± 0.15 ^a	1.90 ± 0.1 ^a	1.79 ± 0.18 ^a
Ile	3.01 ± 0.88 ^b	4.06 ± 0.1 ^a	3.82 ± 0.02 ^{ab}	3.32 ± 0.6 ^{ab}
Leu	7.02 ± 0.22 ^a	7.41 ± 0.34 ^a	6.88 ± 0.00 ^a	6.21 ± 0.65 ^a
Phe	3.18 ± 0.11 ^b	3.35 ± 0.1 ^{ab}	3.52 ± 0.16 ^a	3.17 ± 0.03 ^b
Cys	0.82 ± 0.21 ^b	0.95 ± 0.37 ^b	1.54 ± 0.03 ^a	0.98 ± 0.02 ^b
Lys	9.88 ± 0.34 ^b	11.22 ± 0.14 ^a	11.46 ± 0.22 ^a	11.25 ± 1.12 ^a
His	3.81 ± 0.1 ^{ab}	3.08 ± 0.32 ^c	3.86 ± 0.06 ^a	3.08 ± 0.20 ^b
Tyr	2.65 ± 0.32 ^b	3.04 ± 0.45 ^b	3.60 ± 0.37 ^{ab}	4.23 ± 0.39 ^a

¹Data are mean ± SD of three replicates. Mean with different letters in the same row are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

pH 值範圍則是介於 6.5-8.5，因此側鏈上胺基在此 pH 值範圍下十分不易解離成 -NH_2 之形式。由於胺基需以 -NH_2 之形式存在才具有一對未共用的電子，以提供金屬離子一個配位鍵，而具有螯合之功能。故 Lys 側鏈上胺基雖具有提供金屬螯合能力及清除氫氧自由基的功用，但需在鹼性的環境中才會顯現出來。因此，HM-12 經水解後所增加的 Lys 含量可能無法提供螯合能力。

比較經濾膜區分前後 HM-12 與 30KDa 濃縮液及 1KDa 濃縮液之胺基酸組成的差異，發現 HM-12 以 Ser 有最高的百分比；30KDa 濃縮液以 Pro、Cys 及 His 有最高的百分比；1KDa 濃縮液以 Glu+Gln、Ala 及 Tyr 有最高的百分比 ($p < 0.05$)。而其他胺基酸則在此三種樣品差異不大 ($p > 0.05$)。

在先前探討區分物之抗氧化性中，30KDa 濃縮液為最具金屬螯合能力之區分物。目前已研究指出含有 His 之胜肽片段具有抗氧化性 (Uchida *et al.*, 1992；Murase *et al.*, 1993)。而其抗氧化性是來自於 His 上的 imidazole ring 可對金屬離子進行螯合以及終止脂質自由基的能力。然而亦有研究指出若胜肽片段雖含有 His 但缺少疏水性胺基酸可能會影響胜肽與油脂間的親和性導致此胜肽片段不具抗氧化能力 (Chen *et al.*, 1998)。將去除卵磷脂之雞卵黃蛋白質水解物進行分離純化後的胜肽片段中 Leu-Glu-Leu-His-Lys-Arg- Ser-Ser-His-Trp-

Phe-Ser-Arg-Arg 具有兩個 His (Park *et al.*, 2001)。由卵白蛋白所分離純化之抗氧化胜肽中也皆含有 His (Tsuge *et al.*, 1991)。

對於 1KDa 濃縮液具最高的自由基終止效應及活性氧清除能力，除了先前所述分子量大小對抗氧化力之影響外，區分後 Ala 及 Tyr 之百分比增加亦可能是使 1KDa 濃縮液具備抗氧化力之原因。由於 Ala 亦為疏水性胺基酸，故其百分比的增加亦可能可提供 1KDa 濃縮液抗氧化力。在 Tyr 與抗氧化之相關文獻中有研究指出胜肽的抗氧化性與其組成有關，如若一個三胜肽上的 C 端為 Tyr 或 Trp 可展現出強烈的自由基清除力 (Saito *et al.*, 2003)。由於在 1KDa 濃縮液之分子量分布以 100-500 Da 佔總波峰面積的 65.1 %，顯示其胺基酸組成主要皆以 2-4 個胜肽為主。故若在此分子量範圍中有較高的比例之 Tyr，對自由基清除力應有相輔相成的效果。由於在芳香環上接有 OH 基團的 Tyr，它具有提供一個氫的能力，故可對自由基有清除的效果 (Cumby *et al.*, 2008)。此機制可能如酚類化合物 (如 BHT、BHA 及 α -生育醇) 之抗氧化機制，此類的物質會釋放出氫氧基上的氫原子，而提供電子或是直接提供一個質子與脂質氧化生成之自由基作用，可形成穩定的共振形式而阻斷氧化反應的進行。

伍、結論

本試驗以 Alcalase、Flavourzyme 及混合酵素對 DEYP 進行水解。結果發現以 5 % 之 DEYP 及 10 % 酵素濃度為較適的水解條件。隨著水解時間的增加其水解率及產率隨之上升 ($p < 0.05$)。在三組酵素中則以混合酵素展現出最佳的水解率，顯示利用二種酵素混合水解之方式較單一酵素水解具有更好的水解效果。比較 0-12 hr 水解時間下 HA、HF 及 HM 之抗氧化性，結果發現 DPPH 自由基清除能力、還原力及氫氧自由基清除能力均隨水解時間增加而顯著增加。而金屬螯合能力則因受到 pH 值及水解率二個因子的交互影響下，隨著水解時間的增加金屬螯合能力呈現先下降而後漸趨上升的趨勢。整體而言，HM-12 為最具抗氧化潛力之 DEYP 水解物，可有效增加 DPPH 自由基清除能力及還原力約 3 倍之抗氧化能力，並具有高度的金屬螯合能力及氫氧自由基清除能力。

進一步將 HM-12 的進行分子量分布分析及以 0.15-30KDa MWCO 濾膜區分，發現 HM-12 之分子量主要分布在 < 1000 Da。而在各區分物中以 1KDa 濃縮液具有最高的 DPPH 自由基清除能力、還原力及氫氧自由基清除能力；30KDa 濃縮液具有最高的金屬螯合能力。對照其濃縮液之分子量分布圖，發現 100-500 Da 之胜肽片段可能是 DPPH 自由基清除能力及還原力之最主要貢獻者； < 1000 Da 之胜肽片

段則均具有氫氧自由基清除能力；而金屬螯合能力則可能是由 500-1000 Da 之胜肽片段所提供。在分析 DEYP、HM-12、30KDa 濃縮液及 1KDa 濃縮液之胺基酸組成之結果中，顯示胜肽鍵上的 His、Tyr 及疏水性胺基酸如 Val、Ile 的增加有助於提升鴨蛋黃水解物或其區分物之抗氧化性。

整體而言，利用 DEYP 進行酵素水解及膜系統反應之區分有助於提升其抗氧化性，顯示鴨蛋黃水解物具有發展成天然抗氧化劑及保健食品之潛力。而在試驗中已對於抗氧化胜肽之分子量大小及胺基酸組成有初步的了解。若進一步將此水解物進行純化及定序，則可更明確的說明其抗氧化之機制，如對 DEYP 水解物進行體外消化道試驗及細胞抗氧化能力之測定則可更肯定其開發為保健食品之潛力。

陸、參考文獻

五十嵐脩、金田尚志、福場博保、真濃真，1986。過氧化脂質與營養。

光生館，東京。

王有忠，1993。食品添加物。香華園出版社。台北。

王曉捷，2009。脫脂淘汰雞胸肉與鵝胸肉水解物抗氧化之探討。東海

大學食品科學研究所碩士論文。

江美昭，2003。酵素水解豬血漿中白蛋白以製備高血壓抑制胜肽。東海

大學食品科學研究所碩士論文。

林敬二、楊美惠、楊寶旺、楊寶旺、廖德章、薛敬和，1993。化學大

辭典。高立圖書公司。台北。

邱斯魁、於伯伸、孫寶年，2007。牡蠣蛋白質水解物中抗氧化成分之

分布與特性。台灣農業化學與食品科學，45，182-190。

翁千惠，2004。利用酵素水解明膠及卵白蛋白製備抗高血壓胜肽。東

海大學食品科學系研究所碩士論文。

孫慧吟，2009。酵素種類、水解率及胜肽分子量對脫脂淘汰鴨胸肉水

解物特性及抗氧化之影響。東海大學食品科學研究所碩士論文。

陳怡宏，1997。蛋白質酵素水解液之生產技術。食品工業，29(11)，

34-40。

陳怡兆，2009。以鴨蛋白開發具抗氧化性產品之研究。中興大學動物

科學研究所博士論文。

黃慧婷，2000。以固定化蛋白質酵素進行黃豆蛋白水解試驗。東海大

學化學工程研究所碩士論文。

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。香華園出版社。

81-82；91-92。台北。

張勝善，1992。蛋品加工學。香華園出版社。台北。116-117。

張勝善、沈華山，1994。雞蛋酵素水解物之研究。行政院農業委員會

研究計畫。83科技-2.8-糧-46 (10)。

張德權、胡曉丹，2005。食品超臨界 CO₂ 流體加工技術。103-105。

北京。

滿田久輝、安本教傳、岩見公和，1967。吡啉化合物對亞麻油酸自氧

化之抗氧化作用。營養與食糧，19，210-214。

蔡佩潔，2009。烏骨雞物爪酵素水解物in vitro 抗氧化及細胞光保護

特性之探討。中興大學動物科學研究所碩士論文。

游忠雄，1983。養鴨人家談養鴨。台北。

鄭靜桂，1997。蛋白質之水解與水解液之利用。食品工業，29 (5)，

10-17。

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, 84-90。
- 魏良原, 2008。繽紛的鴨世界。科學發展, 432, 12-15。
- 蘇正德、蔡文騰、彭基煌、蘇女淳, 1999。茶湯與茶渣兒酚含量及抗氧化性之調查研究。食品科學, 23, 594-607。
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256–1262.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*; Elsevier Applied Science Publishers: New York.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Denmark.
- AOAC (1995). Official Methods of Analysis (16th ed). *Association of Analytical Chemist.*, Washington, USA.
- AOCS (1989). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society* (4th ed.). Champaign, IL: AOCS.
- Bando, N., Hayashi, H., Wakamatus, S., Unakuma, T., Miyoshi, M., Nagao, A., Yamauchi, R. and Terao, J. (2004). Participation of singlet oxygen in ultraviolet-a-induced lipid peroxidation in mouse skin and its inhibition by dietary β -carotene: an vivo study. *Free Radical Biology & Medicine*, 37, 1854-1863.
- Becker, G. L. (1993). Preserving food and health: antioxidants make functional, nutritious preservatives. *Food Process*, 12, 54-56.
- Benjakul, S., Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from pacific

- whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3423–3430.
- Bhaskar, N., Modi, V. K., Govindaraju, K., Radha, C. and Lalitha, R. G. (2007). Utilization of meat industry by products: Protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioreource Technology*, 98,388-394.
- Blair, I. A. (2001). Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Experimental Gerontology*. 36, 1473-1481.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkoia, A., Guillchon, D. and Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymetic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein.. *Food Chemistry*, 118, 559-565.
- Branen, A. C. (1975). Toxicologes and biochemistry of butylated hydroxyl anisole and butylated hydroxyl toluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 53, 59.
- Brown, C. E. and Antholine, W. E. (1979). Multiple forms of the cobalt (II)-carnosine complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 88, 529-526.
- Brown, C. E. (1981). Unteraction among carnosine, anserine, ophideine and copper in biochemical adaptation. *Journal of Theoretical Biology*. 88, 245-256.
- Burton, G. W. and Ingold, K. U. (1986). Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*, 19, 194–201.

- Cacciuttolo, M. A., Trinh, L., Lumpkin, J. A. and Rao, G. (1993). Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 14, 267–276.
- Cao. W., Zhang. C., Hong, P. and Ji. H. (2008). Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Food Chemistry*, 109, 176–183.
- Castellani, O., Guérin-Dubiard, C., David-Briand, E. and Anton, M. (2004). Influence of physicochemical conditions and technological treatments on the iron binding capacity of egg yolk phosphovitin. *Food Chemistry*. 85, 569-577.
- Chan, W. K., Decker, E. A., Chow, C. K. and Boissonneault, G. A. (1994). Effect of dietary carnosine on plasma and tissue antioxidant concentrations and on lipid oxidation in rat skeletal muscle. *Lipids*, 29, 461-466.
- Chang, C. Y., Wu, K. C., & Chiang, S. H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine hemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100, 1537 – 1543.
- Cheftel, C. C., Ahern, M., Wang, D. I. C., Tannenbaum, S. R.(1971). Enzymatic solubilization of fish protein concentrate: Batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 19, 155-161.
- Chen, J., Suetsuna, K., Yamauchi, F. (1995). Isolation and characterization of immunostimulative peptides from soybean. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 6, 310–313.

- Chen, H. M., Muramoto, K. and Yamauchi, F. (1998). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 49-53.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antiodative peptide peptide isolatede from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 2619–2623.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 49–53.
- Chen, Y. R., Gunther, M. R. and Mason, R. P. (1999). An electron spin resonance spin-trapping investigation of the free radicals formed by the reaction of mitochondrial cytochrome c oxidase with H₂O₂. *The Journal of Biological Chemistry*. 274, 3308–3314.
- Chiang, W. D., Tsou, M. J., Tsai Z.Y. and Tsai, T. C. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chemistry*, 98, 725–732.
- Chiang, W. D., Chih, C. J., and Chu, Y. W. (1999). Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chemistry*, 65, 189–194.
- Chow, C. K. (1988). *Interrelationships of cellular antioxidant defense systems*. In C. K. Chow (Ed.). 217–237.
- Chung, S. K., Osawa, T., and Kawakishi, S. (1997). Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from brown mustard

- (*Brassica nigra*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 118–123.
- Chung, C. Y., Wu, K. C., and Chiang, S. H. (2007). Antioxidant properties and protein composition of porcine hemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*. 100, 1537-1543.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. and Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of dairy science*, 66, 1219-1227.
- Clare, D. A. and Swaisgood, H. A. (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-1195.
- Clement, A. (2000). Effect of enzymatic hydrolysis in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*. 11, 254-262.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., and Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry* 109, 144–148.
- Decker, E.A. and Crum, A.D. (1993). Inhibition of oxidative rancidity in salted ground pock by carnosine. *Journal of Food Science*, 56, 1179-1181.
- Decker, E. A. and Faraji, H. (1990). Inhibition of lipid oxidation by carnosine. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 67, 650-652.
- Decker, E. A. and Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 674-677.

- Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Lin, Z., Zhao, Y., and Yang, H. (2008) Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107, 1485-1493.
- Dziezak, J. D. (1986). Preservatives: Antioxidants. *Food Technology*, 40, 94-102.
- Fagan, J. M., Sleczonek, B. G. and Sohar, I. (1999). Quantitation of oxidative damage to tissue protein. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31, 751-757.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidant, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*, 408, 239–247.
- Fox, P. F. and Mulvihill, D. M. (1983). Developments in milk protein processing. *Food Science and Technology Today*, 7, 152-161.
- Frokjaer, S. (1994). Use of hydrolysates for protein Supplementation. *Food Technology*, 48 (10), 86-88.
- Gorkum, R. V. and Bouwman, E. (2005). The oxidative drying of alkyd paint catalysed by metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews.*, 249, 1709-1728.
- Greenberg, N. A., Shipe, W. F. (1979). Comparison of abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolyzates and proteins. *Journal of Food Science*, 44, 735-737.
- Grizzuti, K., and Perlmann, G. E. (1973). Binding of magnesium and calcium ions to the phosphoglycoprotein phosvitin. *Biochemistry*, 12(22), 4399-4403.
- Grizzuti, K. and Perlmann, G. E. (1975). Further studies on the binding

- of divalent cations to the phosphoglycoprotein phosvitin. *Biochemistry*, *14* (10), 2171-2175.
- Guérard, F., Dufossé, L., Broise, D. D. L. and Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *11*, 1051–1059.
- Gutierrez, M. A., Mitsuya, T., Hatta, H., Koketsu, M., Kobayashi, R., Juneja, L. R. and Kim, M. (1998). Comparison of egg-yolk protein hydrolysate and soyabean protein hydrolysate in terms of nitrogen utilization. *British Journal of Nutrition* *80*, 477-484.
- Huang, S. C. and Kuo, C. C. (2000). Concentrations and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. Proceedings of the National Science Council, Part B: *Life Science*, *24* (4): 193-201.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1–20.
- Hegenauer, J., Saltman, P., and Nace, G. (1979). Iron (III)-phosphoprotein chelates: stoichiometric equilibrium constant for interaction of iron (III) and phosphorylserine residues of phosvitin and casein. *Biochemistry*, *66*(18), 3865-3879.
- Hernández-Ledesma, B., A. Dávalos, B. Bartolomé, and Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 588–593.
- Hoyle, N., and Merritt, J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates

- from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59, 76–79.
- Jacob, R. A. (1994). *Nutrition, health and antioxidants*. INFORM, 5, 1271-1275.
- Je, J. Y., Park, P. J., and Kim, S. K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 38, 45–50.
- Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H. and Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42, 1266-1272.
- Jeon, Y. J., Byun, H. G. and Kim, S. K. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35, 471–478.
- Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K. and Kim, S. K. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzyme hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219, 20-26.
- Jung, W. K., Rajapakse, N., Kim, S. K. (2005). Antioxidative activity of low molecular peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *European Food Research and Technology*, 220, 535–539.
- Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M., & Chibata, I. (1979). Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives. *Chemical Pharmacological Bulletin*, 27, 1912 – 1916.
- Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Park, P. J and Ito, H., (2001).

- Purification and characterization of antioxidative peptides from bovine skin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 34, 214–219
- 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 Chemistry*, 102, 1317-1327.
- Knecht, R. and Chang, J. Y. (1986). Liquid chromatographic determination of amino acids after gas-phase hydrolysis and derivation with (dimethylamino) azobenzenesulfonyl chloride. *American Chemical Society*, 58, 2375-2379.
- Kohen, R., Misgav, R. and Ginsburg, I. (1991). The SOD like activity of copper: carnosine, copper: anserine and copper: homocarnosine complexes. *Free Radical Research Communications*, 12-13, 179-185.
- Kristinsson, K., Itoh, H., Miyoshi, M., and Chibata, I. (1979). Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives. *Chemical Pharmacological Bulletin*, 27, 1912-1916.
- Lahl, W. J. and Braun, S. D. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology*, 48 (10), 68-71.
- Lee, S. K., Han, J. H. and Decker, E. A. (2002). Antioxidant activity of phosphatidylcholine liposomes and meat model systems. *Food Chemistry and Toxicology*, 67 (1), 30-41.
- Li, B., Chen, F., Wang X., Ji, B. and Wu, Y. (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen

- hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 102, 1135–1143.
- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., Sergent, M. and Phan, T. L. R. (1995). Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 60 (5), 949-952.
- Lisa, K., Catherine, K., and William, F. (1998). Mechanism of action and the substrate-dependent pH maximum shift of the α -amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research*. 309, 311-318.
- Liu, Q., Baohua, K., 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 Chemistry*. 118, 403-410.
- Márquez, M. C. and Vázquez M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35, 111–117.
- Medina Hernandez, M. J., Villanueva Camanas, R. M., Monfort Cuenca, E., and Garcia Alvarez-Coque, M. C. (1990a). Determination of the protein and free amino acid content in a sample using o-phthalaldehyde and N-acetyl-l-cysteine. *Analyst*, 115, 1125–1128.
- Medina Hernandez, M. J., Bonet Domingo, E., Villanueva Camanas, R. M., and Garcia Alvarez-Coque, M. C. (1990b). Evaluation of the proteolysis degree with the o-phthaldialdehyde/N-acetyl-l-cysteine reagent. *Frenesius Journal of Analytical Chemistry*, 338, 62–65.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G. and Kim, S. K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77, 2166-2178.
- Michael, J. D. and Clare, L. H. (2003). Protein radical in biological

- systems-ESR Spin Trapping and Immuno Spin Trapping Approaches. *Free Radical Biology and Medicine*. 36, 1072-1086.
- Moreno, M. C. M. and Cuadrado, V. F. (1993). Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*. 28, 481-490.
- Moure, A., Dominguez, H. and Parajo, J. C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fraction from industrial effluent and their hydrolysates. *Process Biochemistry*. 41, 447-456.
- Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochemie*, 77, 147-161.
- Murase, H., Nagao, A. and Terao, A. (1993). Antioxidant and emulsifying activity of *N*-(long-chain-acyl) Histidine and *N*-(long-chainacyl) carnosine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 1601–1604.
- Mutilangi, W. A. M., Panyam, D. and Kilara, A. (1996). Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 61, 270–274.
- Nagai, R., Inoue, H. and Suzuki, N. (2003). Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, 80, 29-23.
- Namiki, M. (1990). Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 29, 281-300.
- Nawar, W. W. (1985). *Lipid in "Food Chemistry"*, Fennema, O. R. Ed., Marcel Dekker, INC., New York. 139-244.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., and Sato, K. (1991). Membrane damage due to lipid oxidation. *American Journal of Clinical*

- Nutrition.*, 53, 201-205.
- Nielsen, P. M. (1995). *Enzyme technology for production of protein-based flavours*. Novo Industri A/S.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of nutrition*, 44, 307-315.
- Park, P. J., Jung, W. K., Nam, K. S., Shahidi, F. and Kim S. K. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. (2001). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 651-655.
- Park, P. J., Song, B. K., Nam, K. S and Kim, S. K. (2000). Effect of enzymatic hydrolysate from egg yolk protein on activity of antioxidative enzyme in cultured hepatocytes (chang). *Korean Journal of Life Science*, 10 (5), 475-483.
- Panzenbock, U. and Stocker, R. (2005). Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms oxidized high-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1703, 171-181.
- Perkins, E. G. (1967). Formation of nonvolatile decomposition products in heated fats and oils. *Food Technology*, 21, 125-134.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001) Bioactive peptides derived from bovine whey protein: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 347-356.
- Pommer, K. and BFA protein. (1995). *Short introduction to enzyme application in the protein industry*. Enzyme Protein Division. EM-9514346.

- Qian, Z. I., Jung, W. K. and Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 1690-1698.
- Quist, E. E., Phillips, R. D. and Saalia, F. K. (2009). The effect of enzyme systems and processing on the hydrolysis of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein. *LWT- Food Science and Technology*, 42, 1712-1717.
- Rajapaksea, N., Mendisa, E., Jung, W. K., Je, J. Y. and Kim, K. S. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38, 175–182.
- Rebeca, B. D., Pena-Vera, M. T. and Diaz-Castaneda, M. (1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial protease, yield and nutritional value. *Journal of Food Science*, 56, 309-314.
- Rubtsov, A. M., Schara, M., Sentiurc, M. and Boldyrev, A. A. (1991). Hydroxyl radical-scavenging activity of carnosine: a spin trapping study. *Acta pharmaceutica Jugoslavica*, 41, 401-406.
- Saiga, A., Tanabe, S., and Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 3661–3667.
- Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T. and Nokihara, K. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 3668–3674.

- 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 Chemistry*, 86, 99–103.
- Saknaka, S. and Tachibana. Y. (2006). Active oxygen scavenging activity off egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chemistry*, 95, 243–249.
- Samuelsson, E. G. and Poulsen, O. M. (1992). Peptide preparation, a process for producing it and use of the peptide preparation. *United States Patent*, 5, 112,812.
- Shahidi, F., Syniowiecki, J., Balejko. J. (1994). Proteolytic hydrolysis of muscle protein of harp seal (*Phoca groenlandica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2634-2638.
- Shahidi, F., Han, X. Q., Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285-293.
- Sherwin, E. R. (1978). Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55, 809-814.
- Sikorski, Z. E., and Naczki, M. (1981). Modification of technological properties of fish protein concentrate. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 14, 201–230.
- Soares, J. R., Rustad, T. C. P., Cunha, A. P., and Ameida, L. M. (1997). Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zymus*. *Free Radical Research*, 26, 469-478.
- Spellmana, D., McEvoya, E., Cuinnb, G. O'. and FitzGerald R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein:

- Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*. 13, 447–453.
- Steinhardt, J. and Beychok, S. (1964). *Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules*. In: The proteins (neurath, H., ed), Academic Press, New York. Vol. II, 992-994.
- Suetsuna, K., Maekawa, K., Chen, J. (2004). Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 15, 267–272.
- Suetsuna, K., Ukeda, H. and Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry* 11, 128–131.
- Surowka, K. and Fik, M. (1992). Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads: I - An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology*. 27, 9-20.
- Surowka, K. and Fik, M. (1994). Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads: II-Application of neutrase to the production of protein hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 65, 289-296.
- Taborsky, G. (1991). On the interaction of phosvitin with ferric ion: solubility of the Fe (III)-phosphoprotein complex under acidic conditions is a function of the iron/phosphate ratio and the degree of

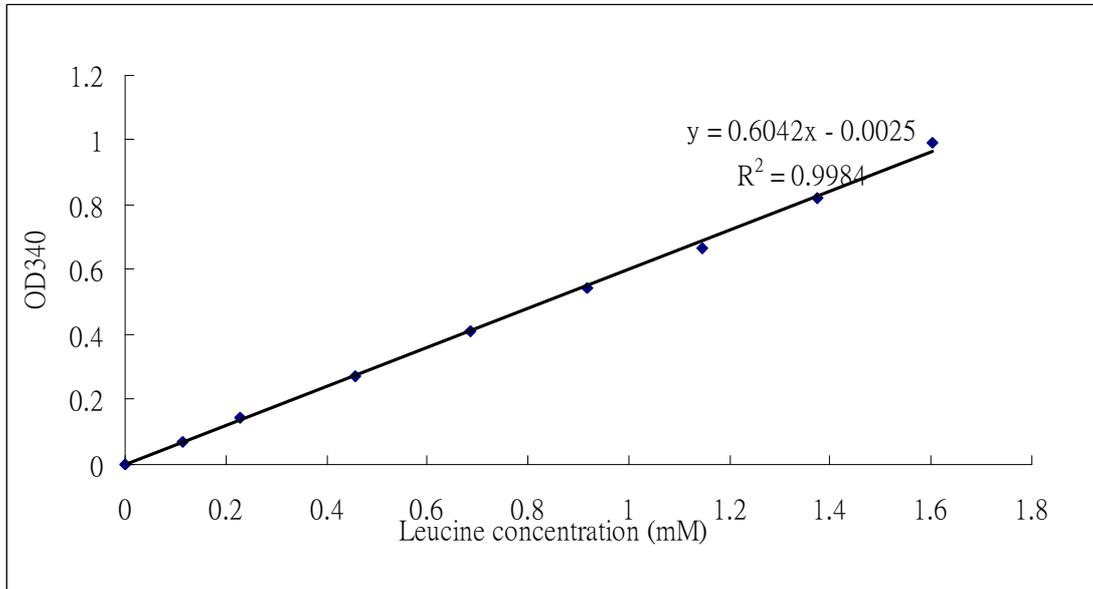
- phosvitin phosphorylation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *44*, 65–77.
- Thiansilakul, Y., Senjkul, S., and Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and Flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*, *31*, 266-287.
- Tsuge, N., Eikawa, Y., Nomura, Y., Yamamoto, M. and Sugisawa, K. (1991). Antioxidative activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg white albumin. *Nippon Nogeikagaku Kaisi*, *65*,1635–1641.
- Tsuruki, T., Kishi, K., Takahashi, M., Tanaka, M., Matsukawa, T., Yoshikawa, M. (2003). Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean β -conglycinin, is an Fmlp agonist. *FEBS Letters*. *540*, 206–210.
- Uchida, K. and Kawakishi, S. Sequence-dependent deactivity of Histidine-containing peptides with Copper (II)/Ascorbate. (1992). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *40*, 13–16.
- 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 Chemistry*, *101*, 1658–1663.
- Wu, H. C., Chen, H.M., and Shiau, C.Y. (2003). Free amino acid peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*. *36*. 949-957.
- Wu, H. C., Shiau, C. Y., Chen, H. M. and Chiou, T. K. (2003). Antioxidant activities of carnosine, anserine and some free amion

acids and their synergistic effects in combination. *Journal of Food and Drug Analysis*, *11*, 148-153.

Yamamoto, Y., Sogo, N., Iwao, R. and Miyamoto, T. (1998). Antioxidant effect of egg yolk on linoleate in emulsion. *Agricultural and Biological Chemistry*, *54*, 3099-3104.

Zhu, K., Zhou, H. and Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates WGPH prepared with Alcalase. *Process Biochemistry*, *41*, 1296–1302.

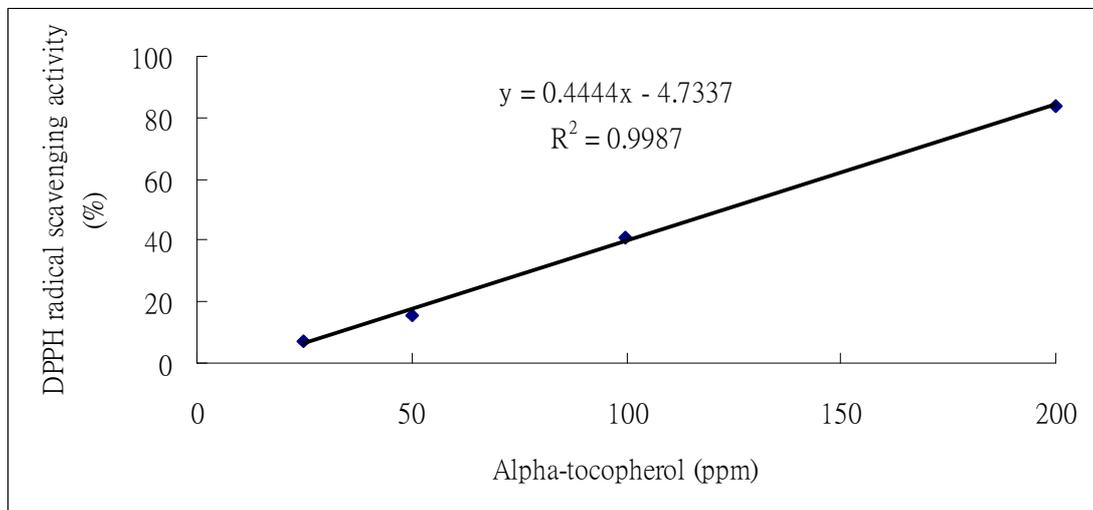
柒、附錄



附錄一、L-Leucine 標準檢量曲線。

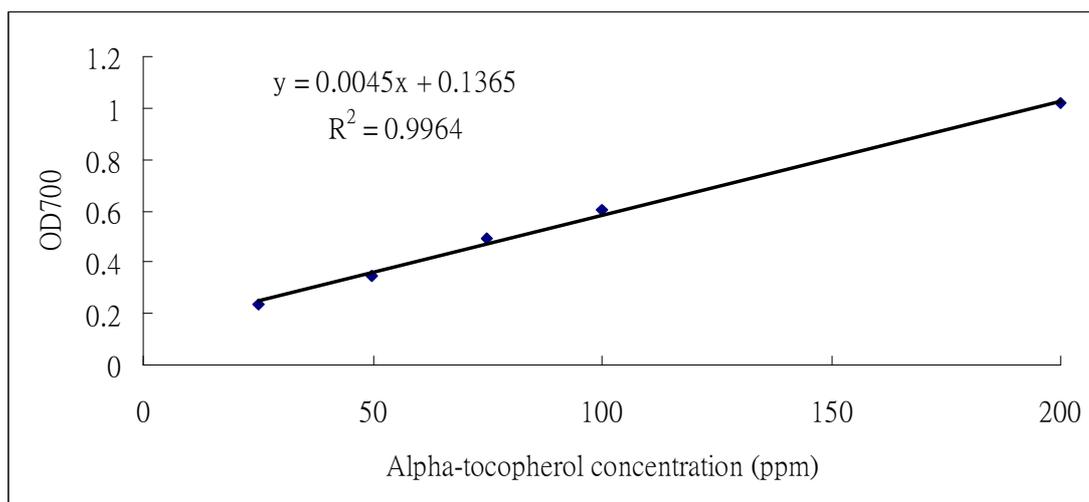
Appendix 1. Standard curve for L-Leucine。

.



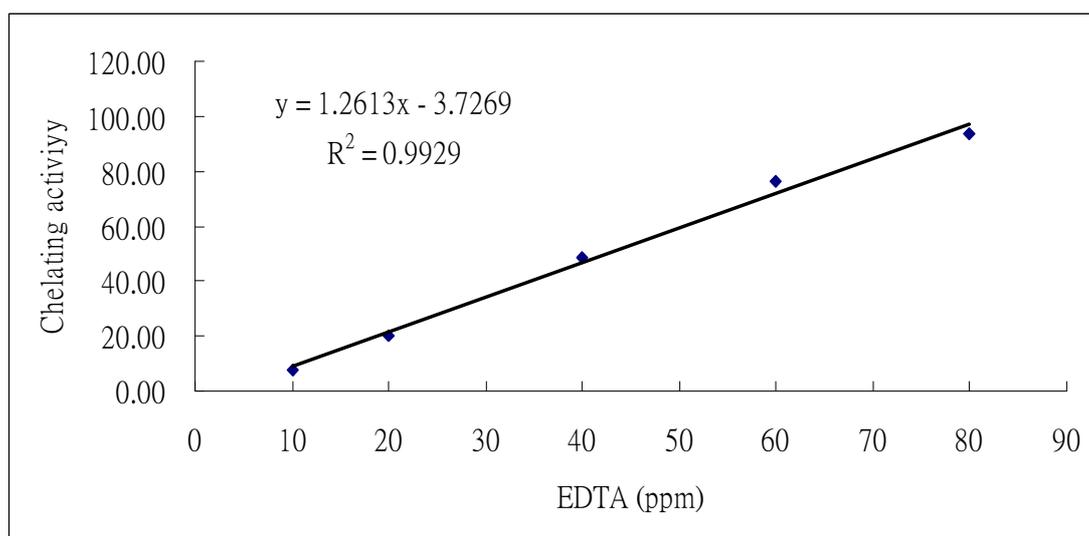
附錄二、 α -生育醇之標準曲線。

Appendix 2. Standard curve for α -tocopherol.



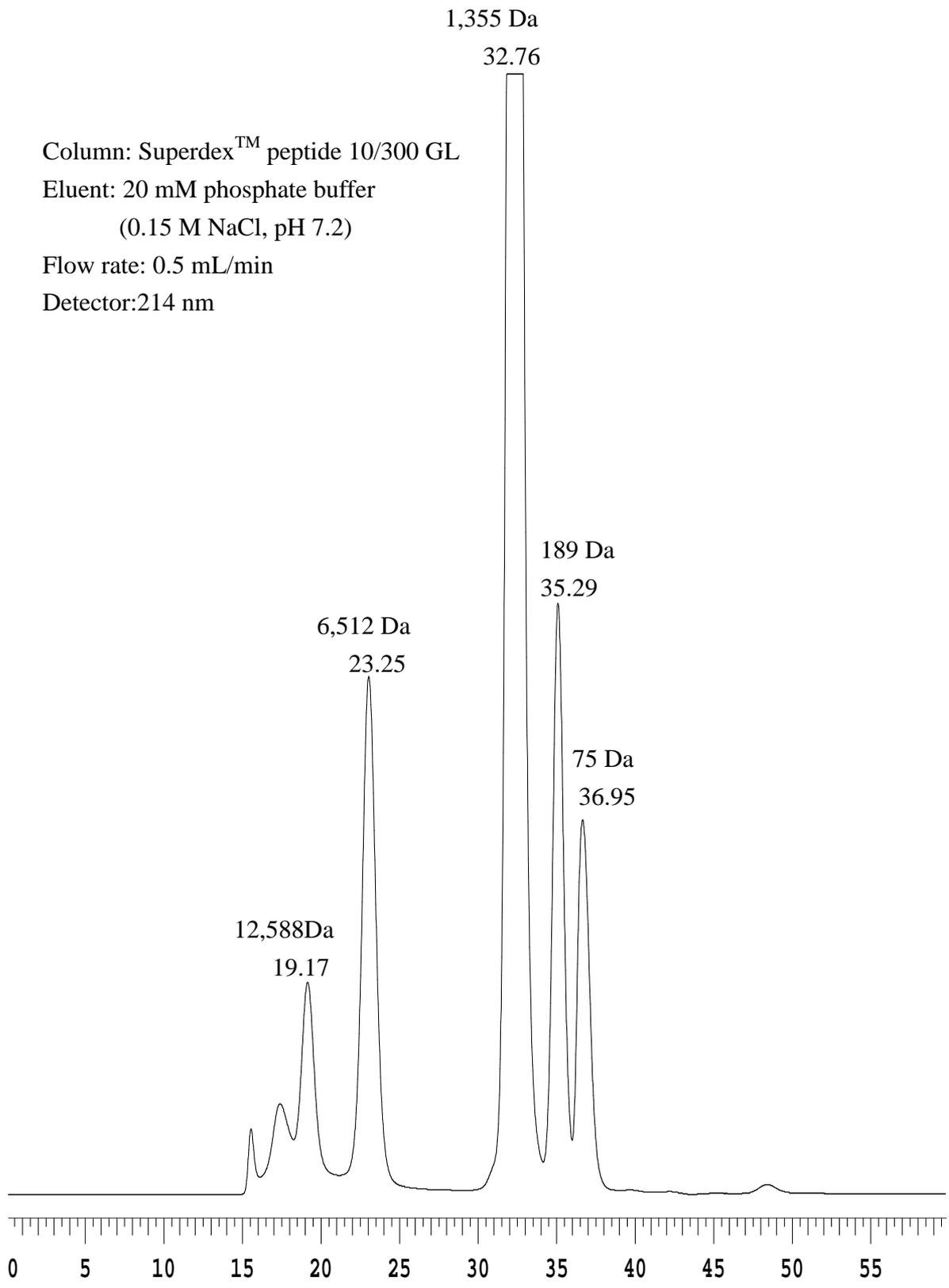
附錄三、 α -生育醇之標準曲線。

Appendix 3. Standard curve for α -tocopherol.

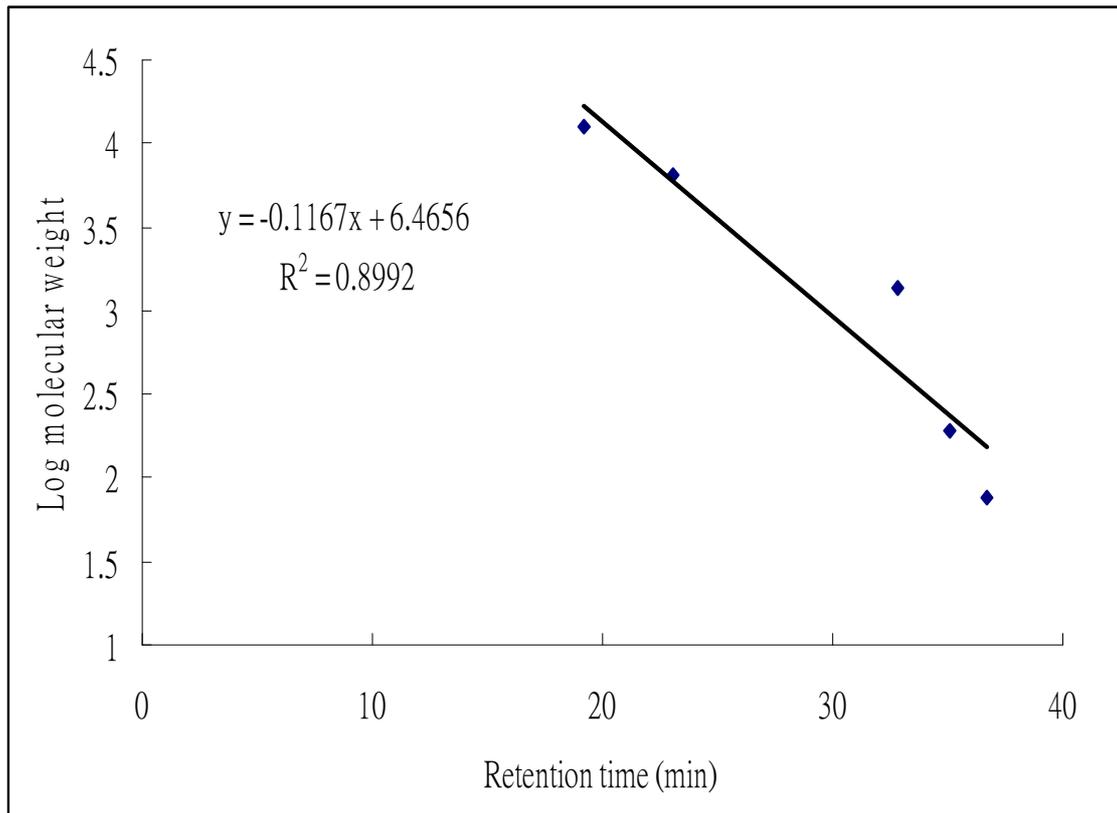


附錄四、EDTA 之標準曲線。

Appendix 4. Standard curve for EDTA.

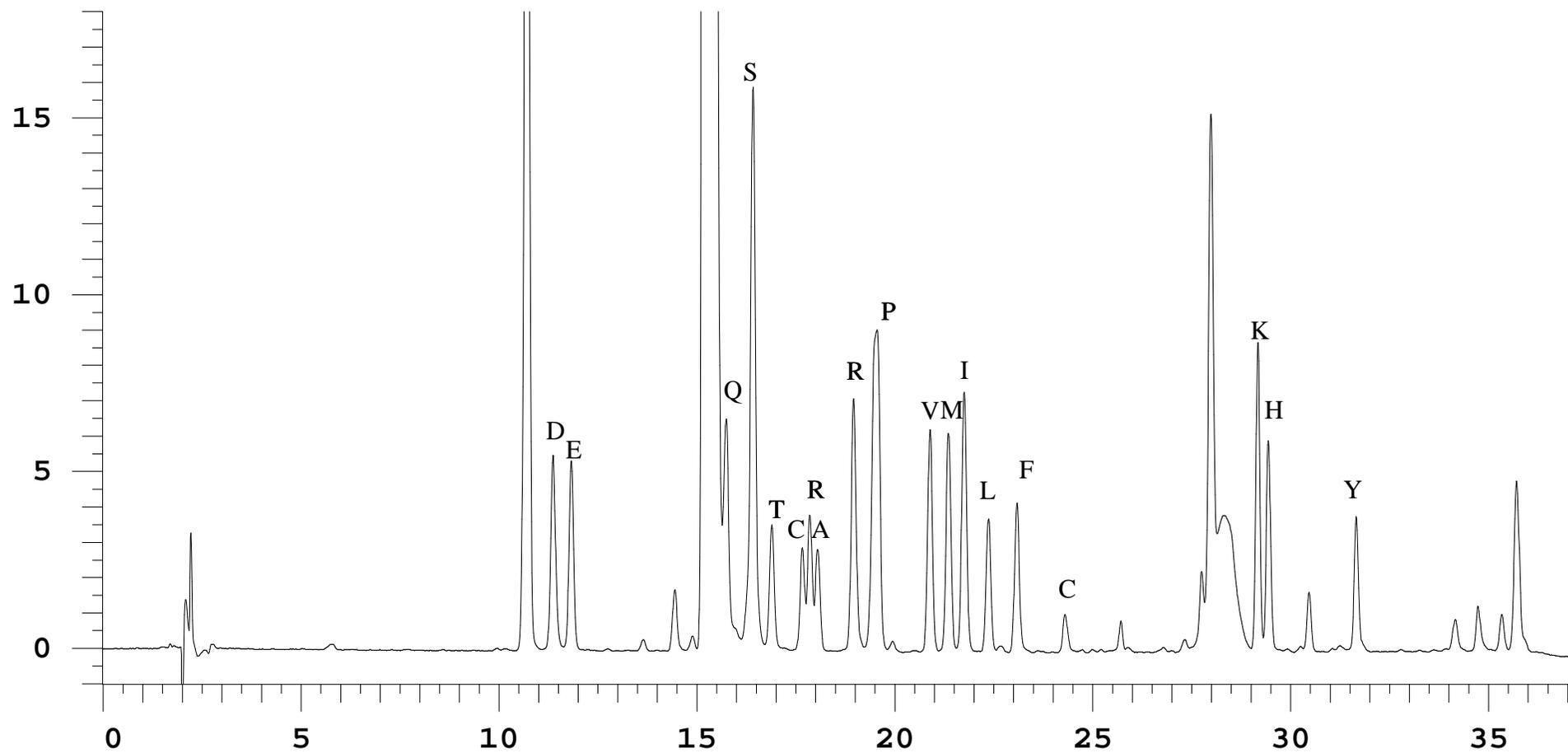


附錄五、分子量標準品之高效能液相層析圖。
 Appendix 5. HPLC chromatograms of standard.



附錄六、滯留時間與分子量之對數之關係。

Appendix 6. Relationship between retention time and log molecular weight of in DEYP hydrolysate.



附錄七、胺基酸標準品之高效能液相層析圖。

Appendix 7. HPLC chromatograms of standards.