



裸胸鯢酵素水解物之抗氧化活性評估

林慧秋、廖紫熾、侯政宏、高雪卿、薛月娥、林金榮

水產試驗所澎湖海洋生物研究中心

前言

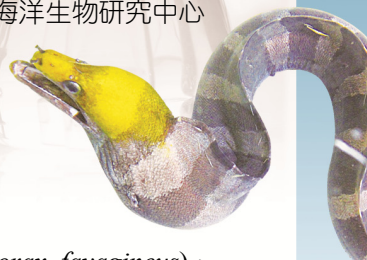
天然抗氧化劑可由植物、動物及微生物取得，其中以植物來源最多，其成分主要可分為類胡蘿蔔素、葉綠素衍生物、多醣類、多酚類化合物、類黃酮化合物、胺基酸及胺類化合物、鞣寧類化合物、生物鹼、維生素C、皂苷類化合物及礦物質等 (Larson, 1988)；動物來源則多為胺基酸和胜肽類。蛋白質之水解物具有抗氧化活性，水產方面以鯖、鮪及旗魚具有較強抗氧化力 (彭, 2004)。

胜肽具有多種生物活性，包括：消炎、抗氧化活性、降低膽固醇和降血壓等食物中的蛋白質胜肽與合成藥物相比，較為溫和、安全且容易吸收。因此，從食物中的蛋白質酵素水解釋放的胜肽具有不同的生物活性已被普遍認知。此外，胜肽和蛋白質由於成本低、安全性和其固有的營養和功能價值，在食品中作為抗氧化劑使用的需求也日益增加。

裸胸鯢俗稱薯鰻或錢鰻，為珊瑚礁區重要的肉食性魚類，也是近海經濟性食用魚種。因鰻魚有食補之效，本研究擬探討裸胸鯢經過不同酵素水解作用後之抗氧化活性和後續試驗抑制血管收縮素轉換酶 (Angiotensin converting enzyme, ACE) 之效果，希望提供作為保健新素材之參考。

材料與方法

一、材料



黑斑裸胸鯢 (*Gymnothorax favagineus*)、黃邊鰭裸胸鯢 (*G. flavimarginatus*)、疏斑裸胸鯢 (*G. undulates*)、寬帶裸胸鯢 (*G. ruppelliae*) 等四種裸胸鯢購自澎湖魚市場。將收集之新鮮鯢鰻樣品，以活魚袋包捆好帶回實驗室，冷凍隔夜後，分別將肉、皮與骨加入兩倍去離子水後以均質機均質 5 分鐘，再以 100°C 加熱 30 分鐘，冷卻後以 8,000 × g 離心 15 分鐘，收集上層液經 Toyo 2 號濾紙過濾，殘渣部分再加兩倍去離子水重複上述步驟，將混合濾液以正己烷去除脂肪並凍結後利用真空凍結乾燥機製成凍乾粉末，供酵素水解實驗用。

二、酵素水解

取 1 g 凍乾粉末樣品，加入 10 倍磷酸緩衝溶液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) 或鹽酸溶液均質後，分別加入 5% 之消化酵素鹼性蛋白酶 (Alcalase, A)、風味蛋白酶 (Flavourzyme, F) 及複合蛋白酶 (Protamax, P)，於 50°C 最適 pH 條件 (A pH 6–8、F pH 5–7 及 P pH 5.5–7.5) 下進行水解 6 小時。水解完後，將水解液置於 90°C 中加熱 15 分鐘使酵素失活，以 Toyo 2 號濾紙過濾後，將濾液凍結乾燥製成酵素水解物粉末，再配製成不同濃度酵素

水解液。

三、分析方法

(一) 一般成分分析

1. 水分

稱取 1 g 樣品置於已稱重且達恆重之坩鍋中，放入烘箱中以 105°C 乾燥 4 小時，烘乾完畢取出坩鍋於真空乾燥器中，待溫度降至室溫稱重。利用公式計算水分含量，水分(%)=(坩鍋與樣品的重量-坩鍋與乾燥後樣品的重量/坩鍋與樣品的重量-坩鍋的重量)×100

2. 灰分

稱取 1 g 樣品置於已稱重且達恆重之坩鍋中，放入灰化爐中以 600°C 灰化 8 小時，灰化完畢取出坩鍋於真空乾燥器中，待溫度降至室溫稱重。總灰分含量(%)=(灰化後坩鍋與灰分的重量-坩鍋重量/樣品重量)×100

3. 粗蛋白測定

粗蛋白依 micro-kjeldahl (A.O.A.C., 1984) 的方法取樣品約 2 g 左右，加催化劑 5 g，加 18 ml 濃硫酸於分解管中，置於蛋白質分解爐 (BUCHI Speed Digester K-439) 中加熱 (480°C，150 分鐘) 分解至澄清狀，取出冷卻後加入 70 ml 蒸餾水，再以全氮蒸餾器 (BUCHI Kjeldahl unit K-350) 蒸餾出氮，蒸餾期間加入 40 ml 濃度為 40% 氫氧化鈉 (NaOH)，用濃度為 4% 硼酸 (H₃BO₃) 加入 3 滴指示劑收集 5 分鐘後，以 0.1 NHCl 滴定至淡粉紅色。計算公式：粗蛋白(%)=[14.01×(S-B)×N/W×1000]×100 (S：樣品之 HCl 之滴定毫升數；B：空白之 HCl 滴定毫升數；N：HCl 之當量數；W：樣品重量 g)。

4. 粗脂肪測定

稱取魚肉 2 g 置研鉢中，加入 2 g 無水硫

酸鈉 (Na₂SO₄) 研磨均勻後，以藥匙刮入圓筒濾紙中，上面塞入棉花，套上套環後吸附於套環轉接器 (VELP ser148)。接收杯稱重後倒入乙醚 (C₂H₅OC₂H₅)，置於接收架上拉下拉桿，進行迴流萃取，加熱器設定 110°C，打開水流及冷凝管使乙醚順利迴流，分萃取、沖提及回收等步驟，待萃取完成將圓筒濾紙取出，取出接收杯置烘箱以 105°C 烘乾→冷卻→稱重至恆量。粗脂肪含量(%)=(萃取乾燥後接收杯重量-空接收杯重量/樣品重量)×100

(二) 抗氧化活性分析

1. DPPH 自由基清除試驗

參考 Blois (1958) 等的方法，取 2 ml 裸胸鯨酵素水解液，加入新鮮配置 0.1 mM DPPH (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 之乙醇溶液 2 ml，混合均勻後以 3,000 rpm 離心 5 分鐘，避光靜置 30 分鐘後，以分光光度計 (UV/VIS Spectrophotometer SP8001) 測其在 517 nm 波長下之吸光值。以[空白組之吸光值-(樣品溶於水吸光值-樣品溶於酒精吸光值)/空白組之吸光值]×100%，得到清除效應百分率。

2. ABTS 自由基清除試驗

ABTS 與過硫酸鉀 (potassium persulfate) 氧化反應生成藍綠色的水溶性 ABTS + 陽離子，在波長為 415 nm、645 nm、734 nm 及 815 nm 有強吸光。當 ABTS + 自由基被抗氧化劑還原或與另一自由基結合時，吸光值會降低，藉此特性用以評估樣品對於自由基的清除能力，當吸光值越低，表示樣品清除 ABTS + 自由基的能力越強。

取 300 μ l 的純水加 H₂O₂、過氧化酶及

ABTS 溶液各 50 μl ，混合均勻反應 1 小時，加入 50 μl 裸胸鯨酵素水解液樣品反應 10 分鐘 (空白組以去離子水替代)，於 655 nm 測定其吸光值。

3. 螯合亞鐵離子能力

參考 Qi et al. (2006) 的方法，取 1 ml 裸胸鯨酵素水解液，加入 0.1 ml，2 mM FeCl_2 及 3.7 ml 去離子水，震盪均勻反應 3 分鐘後再加入 0.2 ml，5 mM 螯合亞鐵 ferrozine，混合後反應 10 分鐘，立即以分光光度計 (UV/VIS Spectrophotometer SP8001) 測定其 562 nm 的吸光值。吸光值越低表示螯合亞鐵離子之能力越強。以 $[(\text{空白組的吸光值}-\text{樣品的吸光值})/\text{空白的吸光值}] \times 100\%$ 表示螯合亞鐵離子能力。

結果與討論

一、裸胸鯨一般成分分析

四種裸胸鯨之水分含量，肉為 75.63—76.83%，皮為 54.71—62.80%，骨為 67.84—75.52%。整體以肉的水分含量較高，皮較低。四種裸胸鯨之灰分含量，肉為 1.97—2.81%，皮為 1.33—2.49%，骨為 3.56—6.65%，整體以骨的灰分含量較高，皮較低。四種裸胸鯨之粗蛋白含量，肉為 20.11—23.96%，皮為 20.36—26.28%，骨為 20.60—23.96%，整體以皮的粗蛋白含量較高，其中黑斑裸胸鯨皮的粗蛋白含量為最高。四種裸胸鯨之粗脂肪含量差距較大，以肉 1.30—4.21% 含量最低，其次為骨 4.56—9.74%，皮的粗脂肪含量最高為 9.10—35.25%，其中黃邊鰭裸胸鯨皮的粗脂肪含量為最高 (如表所示)。

二、抗氧化活性分析

(一) DPPH 自由基清除試驗

DPPH 為提供自由基者，廣泛使用於評估天然抗氧化劑之自由基清除能力 (Matsukawa et al., 1997)，DPPH 為一相當安定的自由基，其甲醇溶液在 517 nm 下有強吸光，當 DPPH 與抗氧化劑反應時其吸光值會消失，因此在 517 nm 的吸光值越低即表示抗氧化劑的供氫能力越強。

黑斑、黃邊鰭、疏斑及寬帶裸胸鯨之肉、皮及骨分別以 A、F 及 P 三種酵素水解抗氧化活性分析結果，濃度為 1、5、10、15、20 及 25 mg/ml，結果 DPPH 自由基清除活性，隨著濃度的增加，活性也隨之提高。四種裸胸鯨以 F 酵素水解，除了疏斑裸胸鯨肉在濃度 25 mg/ml 清除效果較佳外 (圖 1)，其他無論肉、皮或骨，皆以黑斑裸胸鯨最佳。黑斑裸胸鯨皮的 F 酵素水解液在濃度 15 mg/ml 時，有 $99.15 \pm 2.59\%$ 清除活性 (圖 2)，黑斑裸胸鯨骨的 F 酵素水解液在濃度 5 mg/ml 時，有 $90.58 \pm 1.2\%$ 清除活性 (圖 3)。

(二) ABTS 自由基清除試驗

Peroxidase 催化 H_2O_2 反應後會使得 ABTS 轉變為藍綠色的 ABTS + 陽離子自由基，於波長 734 nm 下具有最大吸光值。而 Roberta Re (1999) 等發表的文獻中指出，ABTS 陽離子自由基在 645 nm、734 nm 和 815 nm 波長下皆有明顯的吸收值，本實驗選擇較為接近之 655 nm 波長來偵測。

黑斑、黃邊鰭、疏斑及寬帶裸胸鯨肉、皮及骨分別以 A、F、P 三種酵素水解抗氧化活性分析，濃度為 0.1、0.5、1、3、5 及 10 mg/ml，ABTS 自由基清除活性隨濃度增加而

增加，且低濃度即有高抗氧化活性，以寬帶裸胸鯔清除活性較佳。裸胸鯔肉在濃度 3 mg/ml 時，清除活性 90% 以上 (圖 4)。裸胸鯔皮在濃度 10 mg/ml 時，有 $91.28 \pm 0.09\%$ 以上清除活性 (圖 5)。裸胸鯔骨在濃度 3 mg/ml 時，有 $91.38 \pm 0.18\%$ 以上清除活性 (圖 6)。

(三) 螯合亞鐵離子能力

脂質氧化可以在有金屬離子存在的情形下，催化產生自由基，加速對人體之傷害，而其中尤以 Fe^{2+} 為最具影響力之促氧化劑，促進脂質氧化反應進行，而具有螯合金屬離子能力之化合物則可延緩降低金屬離子

所誘導之氧化作用 ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$)。

黑斑、黃邊鰭、疏斑及寬帶裸胸鯔肉、皮及骨分別以 A、F 及 P 三種酵素水解抗氧化活性分析，濃度為 0.1、0.5、1、3、5 及 10 mg/ml，螯合亞鐵離子能力隨著濃度的增加而增加。結果裸胸鯔肉及骨皆以黃邊鰭裸胸鯔最佳，皮在各組則無顯著差異。裸胸鯔肉在濃度 10 mg/ml 時，有 91% 以上清除活性 (圖 7)。裸胸鯔皮在濃度 10 mg/ml 時，有 90% 以上清除活性 (圖 8)。裸胸鯔骨在濃度 10 mg/ml 時，有 92% 以上清除活性 (圖 9)。

生鮮裸胸鯔一般成分

	水分 (%)	灰分 (%)	粗蛋白 (%)	粗脂肪 (%)
黑斑裸胸鯔				
肉	75.80 ± 0.39^g	2.81 ± 0.26^{bc}	23.96 ± 1.03^{cd}	1.46 ± 0.47^a
皮	60.53 ± 0.36^b	1.69 ± 0.32^{ab}	28.18 ± 0.79^f	24.28 ± 0.90^f
骨	72.55 ± 0.28^f	3.56 ± 0.74^{cd}	23.96 ± 0.52^{cd}	9.74 ± 0.83^d
黃邊鰭裸胸鯔				
肉	76.83 ± 0.13^h	1.97 ± 0.13^{ab}	20.36 ± 0.07^a	1.70 ± 0.03^a
皮	55.02 ± 1.38^a	1.84 ± 0.01^{ab}	24.43 ± 0.20^{cd}	35.25 ± 0.88^g
骨	69.36 ± 0.14^e	5.30 ± 1.91^f	20.74 ± 0.58^{ab}	8.82 ± 0.59^d
疏斑裸胸鯔				
肉	75.63 ± 0.03^g	2.29 ± 0.08^{abc}	22.33 ± 0.70^{bc}	4.21 ± 0.148^b
皮	54.71 ± 0.09^a	2.49 ± 0.47^{abc}	24.38 ± 0.92^d	20.66 ± 1.20^e
骨	67.84 ± 0.67^d	6.65 ± 0.35^d	21.26 ± 0.60^{ab}	6.49 ± 0.02^c
寬帶裸胸鯔				
肉	76.10 ± 0.38^g	2.44 ± 0.10^{abc}	20.11 ± 0.16^a	1.30 ± 0.14^a
皮	62.80 ± 0.32^c	1.33 ± 0.07^a	26.28 ± 0.91^e	9.10 ± 0.44^d
骨	75.52 ± 0.73^g	4.64 ± 0.12^{de}	20.60 ± 2.03^{ab}	4.56 ± 0.07^b

a, b, c, d, e, f, g: 同列間不同字母者，表示顯著差異 ($p < 0.05$)

結語

水解蛋白預防高血壓功能性食品與血管收縮素轉換酶抑制活性的發展大有潛力。隨著國人對本身健康意識的重視，愈來愈多人關心如何減少罹患相關疾病的機率，其中又以抗氧化與降血壓之題目最受到注意 (鄭，2008)。因此，近年來食品中所含之生理活性

物質逐漸受到重視。

本試驗由三種消化酵素 A、P 及 F 水解四種裸胸鯨之肉、皮及骨，測定其抗氧化活性。抗氧化活性整體以 F 酵素水解較佳。後續會以抗氧化效果較好的裸胸鯨酵素水解液，進行血管收縮素轉換酶抑制活性試驗，以提供做為國人保健新素材之參考。

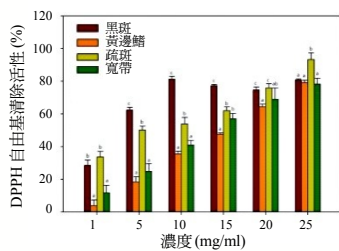


圖 1 裸胸鯨的肉以不同濃度之 Flavourzyme 水解後水解物之 DPPH 自由基清除活性

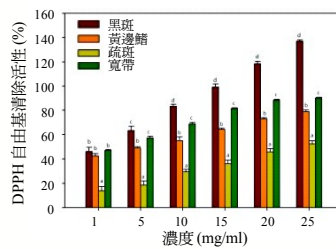


圖 2 裸胸鯨的皮以不同濃度之 Flavourzyme 水解後水解物之 DPPH 自由基清除活性

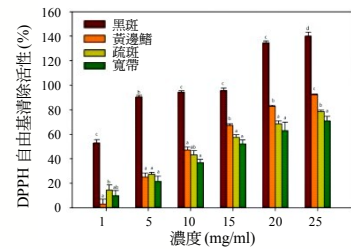


圖 3 裸胸鯨的骨以不同濃度之 Flavourzyme 水解後水解物之 DPPH 自由基清除活性

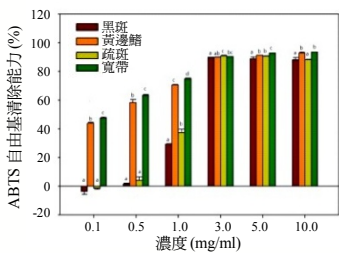


圖 4 裸胸鯨的肉以不同濃度之 Flavourzyme 水解後水解物之 ABTS 自由基清除活性

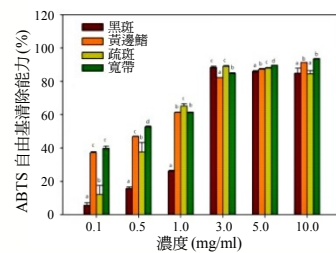


圖 5 裸胸鯨的皮以不同濃度之 Flavourzyme 水解後水解物之 ABTS 自由基清除活性

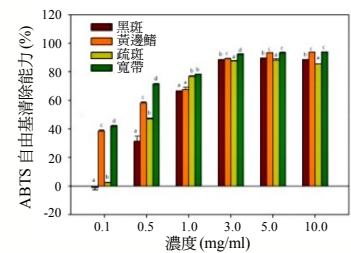


圖 6 裸胸鯨的骨以不同濃度之 Flavourzyme 水解後水解物之 ABTS 自由基清除活性

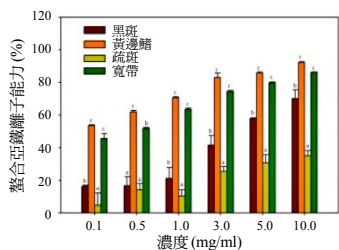


圖 7 裸胸鯨的肉以不同濃度之 Flavourzyme 水解後水解物之螯合亞鐵離子能力

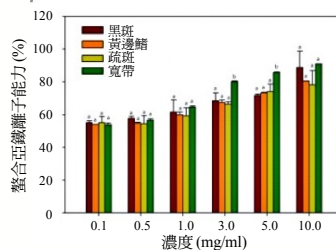


圖 8 裸胸鯨的皮以不同濃度之 Flavourzyme 水解後水解物之螯合亞鐵離子能力

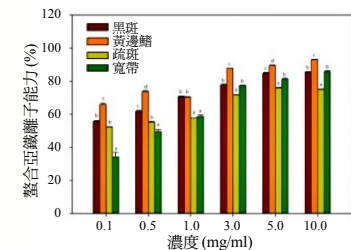


圖 9 裸胸鯨的骨以不同濃度之 Flavourzyme 水解後水解物之螯合亞鐵離子能力