

豬血漿蛋白質之酵素水解及抗氧化活性研究

林姿儀、張基郁

E-mail: 9318493@mail.dyu.edu.tw

摘要

中文摘要 本研究在探討豬血漿蛋白經由酵素水解前後之抗氧化活性及其熱安定性，以作為豬血充分利用之參考。本研究共分為三部分，第一部分是豬血漿蛋白為材料，分析其基本組成成分與抗氧化活性。結果顯示，冷凍乾燥後的豬血漿蛋白粉末之蛋白質含量為73.82%，水分含量為7.10%，粗脂肪含量為0.74%，灰分含量為9.61%。蛋白質組成則以分子量在50-75 kDa之蛋白質含量較多。未經酵素水解之豬血漿蛋白之抗氧化活性，亞鐵離子的螯合能力表現較佳，還原力與DPPH自由基清除能力表現較差。在濃度為20 mg/mL時，其還原力僅為BHA與 α -tocopherol之0.32倍，DPPH自由基清除能力為BHA與 α -tocopherol之0.25倍，而亞鐵離子螯合能力則達90%。第二部分是採用單一酵素Alcalase或 Flavourzyme，以及合併兩者進行二階段酵素水解，以探討豬血漿蛋白最適水解條件與分析水解物之抗氧化活性。以2% Alcalase及2% Flavourzyme水解14小時，Alcalase之水解率為6.29%，Flavourzyme之水解率為12.68%。二階段酵素水解豬血漿蛋白，以2% Alcalase水解4小時再經2% Flavourzyme水解10小時之水解率最高，其值為14.86%。在水解物之抗氧化活性方面，當水解物的濃度為20 mg/mL時，在還原力方面，以2% Alcalase水解4小時再經1% Flavourzyme水解10小時所得水解物之還原力最高；在亞鐵離子螯合能力方面，以2% Alcalase水解1小時所得水解物之螯合能力最高；在DPPH自由基清除能力方面，以2% Alcalase水解10小時所得水解物之清除能力最高。整體而言，經由酵素水解豬血漿蛋白能夠提高水解物的還原力與DPPH自由基清除能力；對於亞鐵離子的螯合能力，使用Alcalase水解豬血漿蛋白優於Flavourzyme。第三部分比較未經酵素水解之豬血漿蛋白與其二階段酵素水解物(2% Alcalase水解4小時再經1% Flavourzyme水解10小時)之抗氧化熱安定性。在還原力方面，未經酵素水解之豬血漿蛋白及二階段酵素水解物之熱安定性均相當高，甚至以80°C加熱時還具有提高還原力的效果。在亞鐵離子螯合能力方面，以未經水解之豬血漿蛋白具有良好之熱安定性；二階段酵素水解物在80°C加熱時，會降低亞鐵離子的螯合能力。在DPPH自由基清除能力方面，在50°C加熱過程中，豬血漿蛋白及酵素水解物具有良好的熱安定性，在80°C加熱過程中，豬血漿蛋白及其酵素水解物可維持或提高自由基的清除能力。關鍵字：豬血漿蛋白、酵素水解、抗氧化活性、還原力、亞鐵離子螯合能力、DPPH自由基清除能力、熱安定性。

關鍵詞：豬血漿蛋白；酵素水解；抗氧化活性；還原力；亞鐵離子螯合能力；DPPH自由基清除能力；熱安定性

目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii
中文摘要.....	iii
iv 英文摘要.....	vi
ix 目錄.....	ix
x 圖目錄.....	xii
xv 壹、緒論.....	1
1 貳、文獻整理.....	1
3 一、豬血液之簡介.....	6
6 二、蛋白質之酵素水解.....	8
8 (一)化學水解方法.....	8
9 (二)酵素水解方法.....	9
9 三、蛋白質變性.....	9
13 四、蛋白質水解物之功能特性.....	16
16 五、脂質之氧化作用.....	16
19 (一)自氧化作用.....	20
20 六、人體與氧化壓力.....	20
27 (一)自由基的生成.....	27
27 (二)活性氧對人體的影響.....	27
28 七、抗氧化機制.....	32
32 八、抗氧化活性之測定.....	34
34 (一)還原力之測定.....	34
34 (二)亞鐵離子螯合能力之測定.....	34
34 (三)1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)自由基清除能力之測定.....	35
35 參、研究架構.....	36
36 肆、實驗材料與分析方法.....	37
37 一、實驗材料.....	37
37 (一)豬血漿之製備.....	37
37 (二)水解酵素.....	37
37 (三)試藥.....	37
37 二、實驗儀器.....	37
39 三、試驗方法.....	39
39 (一)豬血漿一般組成分析.....	39
39 (二)豬血漿蛋白SDS-PAGE之電泳分析.....	41
41 (三)豬血漿蛋白抗氧化活性分析.....	42
42 (四)豬血漿蛋白水解條件探討.....	43
43 (五)溫度對豬血漿蛋白之	

抗氧化活性影響.....	46	伍、結果與討論.....	47
陸、結論與展望.....	84	參考文獻.....	84
86 圖目錄		圖2.1肉豬屠宰流程.....	5
圖2.2 蛋白質變性.....	15	圖2.3 脂質氧化酸敗機制.....	21
圖2.4金屬離子促進過氧化物之斷裂.....	23	圖2.5活性氧對生物體的傷害及其防禦系統.....	29
圖5.1豬血漿蛋白之SDS-PAGE電泳圖.....	50	圖5.2不同濃度豬血漿蛋白(PL)、BHA及-生育醇之還原力比較.....	52
圖5.3不同濃度豬血漿蛋白(PL)、BHA及EDTA之亞鐵離子螯合能力比較.....	53	圖5.4不同濃度豬血漿蛋白(PL)、BHA及-生育醇之DPPH自由基清除能力比較.....	54
圖5.5使用Alcalase及Flavourzyme水解豬血漿蛋白不同時間之水解率比較.....	56	圖5.6 使用Alcalase及Flavourzyme進行豬血漿蛋白二階段水解之水解率.....	58
圖5.7以Alcalase進行不同時間水解豬血漿蛋白所得之水解物、BHA及-生育醇之還原力比較.....	60	圖5.8以Flavourzyme進行不同時間水解豬血漿蛋白所得之水解物、BHA及-生育醇之還原力比較.....	61
圖5.9以2% Alcalase與不同濃度(0.5, 1, 2%)之Flavourzyme進行二階段酵素水解所得之豬血漿蛋白水解物、BHA及-生育醇之還原力比較.....	62	圖5.10以Alcalase進行不同時間水解豬血漿蛋白所得之水解物、BHA及EDTA之亞鐵離子螯合能力比較.....	64
圖5.11以Flavourzyme進行不同時間水解豬血漿蛋白所得之水解物、BHA及EDTA之亞鐵離子螯合能力比較.....	65	圖5.12以2% Alcalase與不同濃度(0.5, 1, 2%)之Flavourzyme 進行二階段酵素水解所得之豬血漿蛋白水解物、BHA及EDTA之亞鐵離子螯合能力比較.....	67
圖5.13以Alcalase進行不同時間水解豬血漿蛋白所得之水解物、BHA及-生育醇之DPPH自由基清除能力比較.....	68	圖5.14以Flavourzyme進行不同時間水解豬血漿蛋白所得之水解物、BHA及-生育醇之DPPH自由基清除能力比較.....	69
圖5.15以2% Alcalase與不同濃度(0.5,1,2%)之Flavourzyme進行二階段酵素水解所得之豬血漿蛋白水解物、BHA及-生育醇之DPPH自由基清除能力比較.....	71	圖5.16未經水解處理之豬血漿蛋白在50與80 加熱1小時期間之還原力變化.....	76
圖5.17以Alcalase與Flavourzyme 二階段酵素水解處理所得之豬血漿蛋白水解物在50與80 加熱1小時期間之還原力變化.....	77	圖5.18未經水解處理之豬血漿蛋白在50與80 加熱1小時期間之亞鐵離子螯合能力變化.....	79
圖5.19以Alcalase與Flavourzyme 二階段酵素水解處理所得之豬血漿蛋白水解物在50與80 加熱1小時期間之亞鐵離子螯合能力變化.....	80	圖5.20 未經水解處理之豬血漿蛋白在50與80 加熱1小時期間之DPPH自由基清除能力變化.....	81
圖5.21以Alcalase與Flavourzyme 二階段酵素水解處理所得之豬血漿蛋白水解物在50與80 加熱1小時期間之DPPH自由基清除能力變化.....	83	表目錄	
表2.1 豬血液必需胺基酸組成份.....	7	表2.2 商業用蛋白?之特性.....	11
表5.1 豬血漿蛋白樣品之一般組成分析.....	48	表5.2 豬血漿蛋白經不同酵素水解處理前後之抗氧化活性比較.....	73

參考文獻

- 參考文獻 1.行政院農委會 (2002) 毛豬交易行情統計。 2.行政院農委會畜產試驗所 (2002) 台灣畜產種原資訊網。 <http://www.tlri.gov.tw>。 3.王正仁、陳孟伶、林畢修平、陳啟祥 (1999) 水解酵素在工業上的利用。生物產業, 10(1): 1-11。 4.王建龍 (2002) 阿根廷魷及赤魷眼窩組織酵素水解物之抗氧化活性。海洋大學食品科學系碩士論文。 5.阮進惠、張為憲 (1984) 豬血漿與血球蛋白質之分離回收及其功能性質。食品科學, 11(3,4): 178-188。 6.江美昭 (2003) 酵素水解豬血漿中白蛋白以製備高血壓抑制劑。東海大學食品科學系碩士論文。 7.林彥均 (2001) 以脫脂花生粉之酵素水解液製備花生香料。大葉大學食品工程學系碩士論文。 8.林玫欣 (1999) 鯖魚肉與內臟水解物之抗氧化性研究。海洋大學食品科學系碩士論文。 9.余碧、許振忠、邱文石 (1996) 蛋白質水解酵素力價估測之研究。中國畜牧學會會誌, 25(2): 149-159。 10.李宜娟 (2003) 洛神花多酚酸及花青素萃取物對含有突變粒體DNA之人類腫瘤細胞。中山醫學大學生物化學系碩士論文。 11.吳春惠 (2003) 可果美市販蕃茄製品抗氧化抑變異能力之評比。台北醫學大學醫學系碩士論文。 12.林慶文 (1991) 豬血之利用。現代肉品, pp.14-16。 13.胡韻笙 (2002) 發酵乳製品生理活性之研究。中山醫學大學食品營養學系碩士論文。 14.晏文潔 (2002) 類黃酮抗氧化力與其結構之關係。台灣農業化學與食品科學, 38 (1): 80-88。 15.陳正宗 (1992) 胺基酸與蛋白質。生物化學指引, pp.86-87。 16.陳明造、劉登城 (1988) 血液的利用。屠宰場副產物之加工利用研討會論文集。行政院農委會, pp.32-40。 17.陳明造 (1999) 素食食品-營養、特性與加工。藝軒圖書出版社, pp.67-68。 18.陳怡宏 (1997) 蛋白質酵素水解液之生產技術。食品工業月刊, 29 (11): 34-40。 19.陳螢龍 (2002) 啤酒廢棄酵母有用成分回收方法之探討。大同大學生物工程系碩士論文。 20.郭悅雄 (1995) 自由基、活性氧及抗氧化劑。台灣科學, 48(2): 164-177。 21.郭淑綾 (2004) 不同甘藷品種皮、葉及藤之抗氧化功能評估。實踐大學食品營養系碩士論文。 22.許嘉慧 (2002) 應用酵素水解豬血漿蛋白以製備調味料之研究。東海大學食品科學系碩士論文。 23.許雅芳 (2003) 鯖柴魚水解物對血管升壓素轉換?之抑制與其純化。海洋大學食品科學系碩士論文。 24.張為憲 (1995) 食品化學。國立編譯館, pp.90-96。 25.張鈺驊 (1993) 基礎食品化學。藝軒圖書出版社, pp.104-105。 26.張嘉倫 (1994) 屠宰場廢棄豬血之利用。大葉大學食品工程學系碩士論文。 27.張玉琴 (2000) 以豬肉酵素水解液製備豬肉香料。大葉大學食品工程學系碩士論文。 28.葉震浩 (1998) 雞蛋白之水解與應用之研究。台灣大學農業化學系碩士論文。 29.彭明月 (1992) 紡絲法之豬血組織化食品製造。食品科學, 19(1): 46-56。 30.曾吉偉 (2001) 酵素水解魚肉生產產?及其抗氧化特性之研

究。海洋大學食品科學系碩士論文。31.楊正護、林慶文(1994)凍乾豬血粉之特性。中國農業化學會誌, 32(4): 355-360。32.楊海明、段盛秀(1995)食品化學實驗。藝軒圖書出版社。33.劉益忠(1995)不同集血方式豬血液於貯藏期間品質之變化。台灣大學畜產學研究所碩士論文。34.劉伯康、陳惠英、顏國欽(1999)數種傳統食用植物甲醇萃取物抗氧化力之研究。中國農業化學會誌, 37(1):105-116。35.鄭靜桂(1997)蛋白質之水解與水解液之利用。食品工業月刊, 29(5): 10-17。36.蔡明芳(1997)屠宰場豬血之回收與利用。大葉大學食品工程學系碩士論文。37.蔡采芳(1997)雞蛋蛋白水解物之製備及其性質之研究。台灣大學農業化學系碩士論文。38.魏耀輝(1986)生物化學原理。國立編譯館, pp.124~125。39.魏韶宏(2003)利用酵素水解雞頭與黑豆生產含生物活性胜?-之機能性產品。台灣大學食品科技系碩士論文。40.饒家麟(2001)鮪魚蒸煮液蛋白質水解物之抗氧化特性。台灣農業化學與食品科學, 39(5): 363-369。41.Adler-Nissen, J. (1977) Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochemistry* 12:18-23。42.Astawan, M., Wahyuni, M.T., Yasuhara, K., Yamada, T. and Maekawa, A. (1995) Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried- salted fish on blood pressure of rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 425-429。43.AOAC. (1986) Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC。44.Bishov, S. J. and Henick, A. S. (1975) Antioxidants effect of protein hydrolysates in freeze-dried model system. *Food Science* 40: 345-348。45.Blenford, D. E. (1994) Protein hydrolysates functionalities and uses in nutritional products. *Neurochemical Research*. 3: 45-49。46.Blosi, M. S. (1958) Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200。47.Clemente, A., Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Pedroche, J. and Millan, F. (1999) Production of extensive chick-pea (*Cicer arietinum* L.) protein, hydrolysates with reduced antigenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3776-3781。48.Chen, H. M., Murumoto, K. and Yamauchi, F.(1995)Structural analysis of antioxidative peptides from soy bean conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 74-578。49.Chen, X. and Ahn, D. U. (1998) Antioxidant activities of six natural phenolics against lipid oxidation induced by Fe²⁺ or ultraviolet light. *Journal of American and Oil Chemistry Society* 75: 717-1712。50.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。51.Denison, E. T. and Emanuel, N. M. (1956) Kinetic characteristics of cyclohexane oxidation in the presence of cobalt stearate. *Zhurnal. Fiz. Khim.* 30: 2327-2336。 *Chemistry Abstrate* 51: 9274d。52.Djenane, D., Martinez, L., Sanchez-Escalante, A., Beltran, J. A., and Roncales, P. (2004) Antioxidant effect of carnosine and carnitine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere. *Food Chemistry* 85 : 453-459。53.Farmer, E. H., Koch, H. P. and Sutton, D. A. (1943) The course of autoxidation reaction in polyisoprenes and allied compounds. Part VII. Rearrangement of double bonds during autoxidation. *Journal of American Chemistry* pp.541-547。54.Fereidoon, S., Jozef, S. and Jerzy, B. (1994) Proteolytic hydrolysis of muscle proteins of harp seal (*Phocagroen landica*).*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2634- 2638。55.Giese, B. (1996) Antioxidant: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology* 50(11): 73-81。56.Giovanni, M. (1983) Response surface methodology and product optimization. *Food Technology* 37(11): 41-45。57.Godfrey, T. (1986) Comparison of key characteristics of industrial enzyme by type and source. *Industrial Enzymology* pp.466-557。58.Halliwel, B., Gutteridge, J. M. C. and Cross, C. E. (1992) Free radical, antioxidants and human disease; Where are we now? *Journal of Clinical Laboratory Medicine* 119: 598-620。59.Halliwel, B. and Gutteridge, K. (1989) Free radical in biology and medicine. *Journal of Medicinal Chemistry* 8: 484- 487。60.In, M. J., Chae, H. J. and Oh, N. S. (2002) Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin *Bioresource Technology* 84: 63-68。61.Kanner, J., German, J. B. and Kinsella, J. E. (1987) Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science Nutrition* 25(4): 317-363。62.Labuza, T. P.(1984). Application of chemical kinetics to deterioration of foods. *Journal of Chemical Editor* 61:348。63.Lahl, W. J. and Braun, S. D. (1994) Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology* 48(10): 68-71。64.Ledward, D. A. and Lawire, R. A. (1984) Recovery and utilization of by-product protein of the meat industry. *Journal of Chemical and Biotechnology* 34B: 223-228。65.Lee, S. and Song K. B. (2003) Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of porcine and bovine blood plasma proteins. *Food Chemistry* 82: 521-526。66.Loukas, S., Varoucha, D. C., Zioudrou, R., Streaty, A. and Klee, W. A. (1983) Opioid activities and structures of β -casein-derived exorphins. *Biochemistry* 22 : 4567-4573。67.Lu, L. C., Chen, Y. W. and Chou, C. C. (2003) Anti-bacterial and DPPH radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis* 11(4): 277-282。68.Ockerman, H. W. and Hansen, C. L. (1988) *Animal by-Product Processing*. VCH Publishers, chichester, VK pp.58-88。69.Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315。70.Pares, D., Sagner, E., Toldra, M. and Carretero, C. (2000) Effect of high pressure processing at different temperatures on protein functionality of porcine blood plasma. *Journal of Food Science* 65 (3): 486-490。71.Park, E., Lee, H. and Song, K. B. (1996) Characterization of plasma proteins from bloods of slaughtered cow and pig and utilization of the proteins as adhesives. *Agricultural and Biological Chemistry* 39(2): 123-126。72.Park, K. J. and Hyun, C. K. (2002) Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. *Enzyme and Microbial Technology* pp.633-638。73.Pokorny, J. (1991) Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology* pp.223。74.Raeker, M. O. and Johnson, L. A. (1995). Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg white proteins. *Journal of Food Science* 60: 685-690。75.Ranken, M. D. (1980) Applications of blood proteins. In " *Applied protein Chemistry* ", Ed. Grant, R. A., pp.169-180. Applied Science. Publishers, LTD. London。76.Sela, M., White, F. H., Jr. and Anfinsen, C.B. (1957) Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease. *Science* 125: 691-692。77.Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. (1992) Antioxidative properties of xanthane on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:945。78.Simic, M. G. (1998) Mechanisms of inhibition of free- radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* 202: 377-386。79.Tappel, A. L. (1962) Hematin compounds and lipo-xidase as biocatalysts. In *Symposium on Foods: Lipids and their oxidation*. H. W. Schultz, E. A. Day, and R. O. Sinnhuber (Editors). AVI Publishing Co., Inc. Westport, CT。80.Tecator Co. (1983) *Instruction manual: Soxtec*

System HT6. Sweden. 81. Williams, W. B., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. Technology* 28(1): 25-30. 82. Wu, H. C., Chen, H. M. and Shiau, C.Y. (2003) Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International* 36: 949-957. 83. Yagi, K. (1987) Lipid peroxides and human disease. *Chemistry of Physiology Lipids* 45: 337-341. 84. Yamaguchi, N., Yokoo, Y. and Fujimaki, M. (1979) Antioxidative activities of protein hydrolysates. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 26: 65-70. 85. Yashiro, A., Oda, S. and Sugano, M. (1985) Hypocholester-olemic effect of soybean protein in rats and mice after peptic digestion. *Journal of Nutritional* 115: 1325-1336. 86. Yee, J. J., Shipe, W. F. and Kinsella, J. E. (1980) Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copercatalyzed methyl linoleate oxidation. *Journal of Food Science* 45:1082-1083. 87. Zioudrou, C., Streaty, R. A. and Klee, W. A. (1979) Opioid peptides derived from food proteins. *Journal of Biological Chemistry* 254:2446-2449.