

吳郭魚鱗膠原蛋白酵素水解液抗氧化活性之探討

賴志行¹·吳佩蒨¹·吳純衡¹·蕭泉源^{2*}

¹行政院農業委員會水產試驗所 水產加工組

²國立台灣海洋大學 食品科學系

摘 要

吳郭魚鱗膠原蛋白以三種商業酵素 (Alcalase、Protease Type XIV 及 Collagenase) 水解 0、1、2、3、4 及 5 hr 後，評估水解物清除 DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 自由基、還原力及螯合銅離子之能力。結果顯示，以 2% Alcalase 在 50 °C 下水解 4 hr 之抗氧化性較強。以超過濾法將水解液依分子量劃分，其中 5 ~ 10 kDa 及小於 5 kDa 之水解物，清除 DPPH 能力較強，還原力則有隨著分子量增加而增加的趨勢。分子量 5 ~ 10 kDa 及小於 5 kDa 之水解物的螯合銅離子能力較大於 10 kDa 者為高。顯示魚鱗膠原蛋白水解物具抗氧化能力，而其作用機制因其所含胜肽類分子量不同而異。

關鍵詞：魚鱗、水解物、抗氧化活性、膠原蛋白、吳郭魚

前 言

膠原蛋白 (collagen) 是脊椎動物體內含量最高的細胞外間質，具低免疫性、生物相容性、不具毒性且可調整其生物降解性等優點，不僅能對官能基進行修飾，又可加工成膜狀、片狀、管狀及海綿狀等予以利用，在人體中不會引起排斥性與毒性等不良反應，因此膠原蛋白在生醫材料如敷料與人工皮膚等之運用相當廣泛 (Itoh *et al.*, 2002; Kanbe *et al.*, 2002; 黃等, 2003; 黃, 2004; 呂, 2004; 陳, 2004)。由於膠原蛋白具有分散作用、乳化效果及膠質化功能，是一種優良的食品添加物，能改善食品的物性、化性、外觀、風味，並兼具保健之功能 (Morimura *et al.*, 2002; 江, 2002; 陳, 2004)。膠原蛋白於化妝品之使用主要功能為保濕劑與營養劑，具有保持皮膚水分的功效，並可促進膠原蛋白增生的成分，讓皮膚回復水合能力與張力，促進皮膚創傷癒合及表皮自然成長 (Morimura *et al.*, 2002; 洪, 2004; 陳, 2004)。

近年來膠原蛋白在生醫材料、食品加工及化粧品等應用廣泛需求及原料價格高漲，目前膠原蛋白的生產主要是以豬、牛、家禽等陸生動物的皮及其副產物為原料，由於近幾年陸生動物疫情的爆發如：狂牛症 (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE)、口蹄疫、禽流感及人畜共通疾病等的流行，使萃取自陸生動物之膠原蛋白的安全性受質疑，所以尋找新的原料成為當務之急。

漁獲物在加工處理過程中，約產生魚體總重 50% 的廢棄物，其中 4% 左右為鱗。以吳郭魚為例，2004 年吳郭魚年產量為 89,370 mt (<http://www.fa.gov.tw>)，約會產生 3,574 mt 之魚鱗廢棄物。魚鱗的主要成分可分為有機成分及無機成分，有機成分主要為膠原蛋白，而無機成分主要為氫氧基磷灰石 (Hydroxyapatite, HAp) [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] (Takenaka *et al.*, 2003; Takenaka *et al.*, 2004)，在台灣絕大部分的魚鱗是以廢棄物方式丟棄，若能作為抽取膠原蛋白之原料或進一步以酵素水解成具有抗氧化 (Suetsuna *et al.*, 2004) 或抗高血壓 (Fahmi *et al.*, 2004) 之機能性胜肽加以利用，則可提高其附加價值，同時可減少環境污染。本研究以不同酵素水解吳郭魚鱗膠原蛋白

*通訊作者 / 基隆市北寧路二號, TEL: (02) 2462-2192
轉 5111; FAX: (02) 2463-4203; E-mail: cyshiau@mail.ntou.edu.tw

並探討其抗氧化活性，以供開發具有保健機能的飲品、錠劑或美容保養品之參考。

材料與方法

一、材料

(一) 吳郭魚鱗

取自台南縣養殖場，魚體體長 25 ~ 30 cm，體重約 1000 g，經清洗乾燥後以 0.3 M HCl 去除魚鱗灰分，再以大量水清洗至中性後凍乾備用。

(二) 蛋白質分解酵素

Alcalase (2.4 L), Protease Type XIV (*Streptomyces griseus*) (4.6 units/mg solid), Collagenase (0.33 units/mg solid) 均購自 Sigma 化學公司 (St. Louis, MO, USA)。

(三) 化學藥品

赤血鹽 (potassium ferricyanide, $[K_3Fe(SCN)_6]$)、氯化鐵 (ferric chloride, $FeCl_3$) 均購自 Riedel-de Haen (Seelze, Germany)。 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH)、六甲基四胺 (hexamine)、TMM (tetramethyl murexide) 購自 Sigma 化學公司 (St. Louis, MO)。鹽酸 (hydrochloric acid, HCl)、三氯醋酸 (trichloroacetic acid, TCA)、氯化鉀 (potassium chloride)、硫酸銅 (copper sulfate) 購自默克化學公司 (E. Merck, Darmstadt, Germany)。

二、實驗方法

(一) 酵素水解液的製備

依據 Takenaka *et al.* (2003) 方法去除灰分，取已去灰分之吳郭魚鱗 5 g (吳郭魚鱗膠原蛋白)，分別加入 20 倍去離子水 (w/v)，以 NaOH 調整 pH 值為 8 後，個別加入 2% Alcalase 及 3% Protease Type XIV 於 50 °C 水浴中進行水解 (酵素添加量不一樣，pH、溫度條件一樣)，分別在 0、1、2、3、4 及 5hr 取樣 (0 hr 為加入酵素攪拌均勻後即失活)，之後將水解液於 100 °C 下加熱 10 min 使酵素失活終止反應，再以 6500 x g 離心 20 min，

上層液以濾紙 (Advantec Toyo No.2, Japan) 過濾，將水解濾液凍乾成粉末後，取凍乾粉末配製成濃度 50 mg/ml 之液體，使其固形物濃度一致，以供螯合銅離子、清除 DPPH 自由基能力及還原能力等分析用。經以抗氧化作用強弱決定各自較適水解時間後，再進行二次水解 (1% Collagenase、pH 7.5、溫度 37 °C)。Alcalase 與 Protease Type XIV 之水解條件同上所述。

(二) 水解液之分割

水解液以 Amicon 超過濾濃縮裝置進行分割，濾膜為 10 kDa、5 kDa，取大於 10kDa、5kDa ~ 10kDa 及小於 5 kDa 之濾液凍乾成粉末後，配製成濃度 50 mg/ml 之液體進行抗氧化測定。

(三) 水解液抽出物之調製

依照 Konosu *et al.* (1974) 方法，採用 7% TCA 進行抽出。取 10 ml 不同水解時間之水解物和 30 ml 預冷之 7% TCA，以均質機 (Polytron PT-300, Switzerland) 均質 2 min，再經 4000 x g、4 °C 離心 20 min，上層液經 (Advantec Toyo No.2, Japan) 濾紙過濾，殘渣部分再加入 7% TCA 重複以上操作兩次，過濾之混合液至分液漏斗，加入等體積之乙醚震盪處理去除 TCA，重複五次以上操作，水層部份減壓濃縮 (水浴溫度低於 40 °C) 至乾涸狀，以去離子水定容至 10 ml，即 TCA 抽出物，供游離胺基酸及複合胺基酸分析用。

(四) 游離胺基酸之分析

取前述 TCA 抽出物 1 ml，以 0.02 N HCl 適當稀釋並經 0.2 μ m 濾膜過濾後，使用 Hitachi L-8500 Amino Acid Analyzer (Hitachi, Japan) 分析游離胺基酸含量。

(五) 複合胺基酸之分析 (combined amino acid, CAA)

依照 Konosu *et al.* (1978) 方法，取前述 TCA 抽出物以 6 N HCl 在 110 °C 密封加熱 20 hr 後，再依前述之條件分析胺基酸，所得胺基酸量減上述游離胺基酸量即為複合胺基酸，亦即胜肽所含之胺基酸。

(六) 抗氧化活性之測定

1. 清除 DPPH 自由基能力之測定

依據 Shimada *et al.* (1992) 法測定之。取 1 ml 之水解物加入 1 ml 之 0.1 mM DPPH 溶液 (溶於 95% 酒精)，混合均勻置於室溫 (25 ~ 27 °C) 反應 30 min，控制組改用去離子水取代，測 OD 517 nm，吸光值愈低即表示抗氧化劑的供氫能力愈強。清除效應之百分率計算公式為 $[(\text{未加樣品之控制組吸光值} - \text{樣品吸光值}) / \text{未加樣品之控制組吸光值}] \times 100$ 。實驗中以維生素 C (L-ascorbic acid) 當做正對照組 (positive control)。

2. 還原力測定

依據 Oyaizu (1988) 法測定之。取 1 ml 樣品加 1 ml 200 mM 磷酸鹽緩衝溶液 (pH 6.6) 與 1 ml 1% potassium ferricyanide 混合均勻後於 50 °C 水浴反應 20 min，急速冷卻後，加入 1 ml 10% TCA 溶液，取上清液 1 ml 加 1 ml 蒸餾水及 0.2 ml 0.1% ferric chloride 溶液，混合均勻放置 10 min 後，於 700 nm 測吸光值，吸光值愈高，表示樣品還原力愈強。

3. 螯合銅離子能力

依據 Shimada *et al.* (1992) 法測定之。取 1 ml 水解液加入 10 mM hexamine，10 mM potassium chloride 及 3 mM 之 copper sulfate 混合液 1 ml，最後加入 0.1 ml 之 1 mM TMM，在室溫 (25 ~ 27 °C) 下反應 3 min，於 485 nm 測其吸光值，吸光值愈低表示螯合銅離子的效果愈強，以 $[1 - (\text{樣品吸光值} / \text{未加樣品之控制組吸光值})] \times 100\%$ 之公式計算，即可得到螯合能力百分率。

(七) 統計分析

實驗數據以 SAS (Statistical Analysis System) 套裝 GLM (General Linear Model Procedure) 軟體作單向變異數分析 (One-way analysis of variance)，並以鄧肯式多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 測定各處理組間之差異，顯著水準定為 0.05。

結果與討論

一、吳郭魚鱗膠原蛋白酵素水解液之抗氧化特性

(一) 不同酵素水解液抗氧化性之比較

α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 為一含有奇數電子之穩定自由基，在 517 nm 下有強的吸光值，當被具抗氧化能力之樣品還原即有提供質子的能力時，吸收波峰即會消失，藉此判定樣品是否具有清除 DPPH 自由基之能力 (Brand-Williams *et al.*, 1995)，又由於本方法於低濃度之樣品下仍有良好的靈敏度，並且可在短時間之內測定大量的樣品，因此許多研究會藉由此方法篩選樣品對自由基的清除能力。而還原力之測定是分析樣品對 potassium ferricyanide 中 Fe^{3+} 還原成 Fe^{2+} 之亞氰錯離子，而此亞氰錯離子再與 Fe^{3+} 生成亞鐵氰化鐵即普魯士藍 (Prussian blue)，在 700 nm 下有較強之吸光值，吸光值愈高即還原力愈強 (Oyaizu, 1988)。含油脂的食品中，金屬離子特別是銅、鐵離子存在容易加速油脂氧化的發生，故若能將金屬離子螯合去除，便能使脂質的氧化速率減慢。

吳郭魚鱗膠原蛋白經不同酵素與水解時間水解後，對清除 DPPH 自由基、還原力及螯合銅離子能力如 Table 1 所示。結果顯示，以 2% Alcalase、3% Protease XIV 及混合酵素 (2% Alcalase + 3% Protease XIV) 水解 0、1、2、3、4 及 5 hr，在三組酵素水解液中，水解 4 hr 者，其清除 DPPH 自由基能力皆在達到最高之後趨於平緩或減少，其中以混合酵素組清除能力最佳，其清除百分率為 86%，Alcalase 組及 Protease XIV 組分別為 85% 及 83%，惟皆低於維生素 C 1000 ppm 之 96%，推測吳郭魚鱗膠原蛋白酵素水解液中可能含有提供質子的物質存在。在還原力方面也是以混合酵素組最強，且在 5 hr 之水解時間內，均隨著水解時間的增長而增加至 1.9；其次為 Protease XIV 組為 1.58，當水解至 3 hr，其還原力則趨於平緩；Alcalase 組則在水解 4 hr 達最高為 1.24，之後則降低。在螯合銅離子方面，以 Alcalase 組之能力最強，當水解 1 小時即增為 54%，之後則趨於平緩。Protease XIV 組及混合酵素組則隨水解時間的增

Table 1 The scavenging effect on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) radical, reducing power and chelating Cu^{2+} ability of tilapia scale collagen hydrolysates with 2% Alcalase and 3% Protease Type XIV

Enzyme Combination	Control ¹	Hydrolysis time (hr)					
		0	1	2	3	4	5
		Scavenging activity of DPPH (%)					
Alcalase	95.70±0.00 ²	54.27±0.32 ^e	61.62±3.67 ^d	67.71±4.86 ^c	80.60±1.57 ^a	85.22±1.99 ^a	73.66±1.68 ^b
Protease	95.70±0.00	66.59±0.05 ^c	73.52±2.94 ^b	79.90±1.98 ^a	81.44±1.15 ^a	82.98±1.16 ^a	82.07±1.68 ^a
Alcalase+Protease	95.71±0.00	63.30±1.47 ^e	72.26±0.00 ^d	78.36±1.47 ^c	81.93±1.26 ^b	86.06±0.73 ^a	84.17±0.73 ^a
		Reducing power (700 nm)					
Alcalase	2.41±0.00	0.59±0.00 ^f	0.77±0.01 ^e	0.87±0.01 ^d	1.08±0.00 ^b	1.24±0.00 ^a	1.03±0.01 ^c
Protease	2.42±0.00	0.84±0.05 ^c	0.99±0.04 ^{bc}	1.14±0.10 ^b	1.42±0.14 ^a	1.50±0.17 ^a	1.58±0.10 ^a
Alcalase+Protease	2.41±0.00	0.86±0.00 ^f	0.99±0.04 ^e	1.20±0.01 ^d	1.52±0.02 ^c	1.64±0.07 ^b	1.90±0.01 ^a
		Chelating Cu ²⁺ ability (%)					
Alcalase	61.78±0.00	50.65±3.27 ^b	53.68±0.37 ^a	53.89±0.78 ^a	52.27±1.42 ^{ab}	54.12±0.72 ^a	53.92±0.56 ^a
Protease	61.78±0.00	42.99±2.05 ^a	41.68±0.28 ^a	40.59±1.59 ^{ab}	38.19±1.07 ^{bc}	37.38±1.40 ^c	34.48±1.49 ^d
Alcalase+Protease	61.77±0.00	42.99±1.12 ^a	41.18±0.05 ^b	39.96±0.14 ^c	37.38±0.09 ^d	36.07±0.37 ^e	32.11±0.23 ^f

¹Control: DPPH (Vit C 1000 ppm); Reducing power (Vit C 1000 ppm); Chelating Cu^{2+} (EDTA 1000 ppm)²Values are mean ± SD (n=3). Different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$) between different samples.**Table 2** The scavenging effect on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radical, reducing power and chelating Cu^{2+} ability of tilapia scale collagen hydrolysates with combined treatments of 2% Alcalase and 3% Protease Type XIV

Enzyme ² Combination	Hydrolysis time (hr)						
	Control ¹	0	1	2	3	4	5
Scavenging activity of DPPH (%)							
Alcalase 4→Protease	95.70±0.00 ³	60.95±0.43 ^c	64.09±2.56 ^b	66.09±1.15 ^{ab}	67.04±0.91 ^a	67.14±1.24 ^a	64.38±0.87 ^a
Protease 3→Alcalase	95.72±0.02	58.28±2.15 ^{bc}	58.00±1.24 ^{bc}	56.00±1.71 ^c	59.80±0.59 ^{ab}	61.04±0.87 ^a	60.95±1.08 ^a
Reducing power (700 nm)							
Alcalase 4→Protease	2.41±0.01	0.78±0.01 ^e	0.98±0.06 ^d	0.96±0.02 ^d	1.08±0.07 ^c	1.33±0.02 ^b	2.02±0.04 ^a
Protease 3→Alcalase	2.40±0.00	0.85±0.01 ^d	0.91±0.01 ^d	0.94±0.01 ^d	1.11±0.03 ^c	1.36±0.10 ^b	1.86±0.09 ^a
Chelating Cu^{2+} ability (%)							
Alcalase 4→Protease	61.77±0.00	53.21±0.18 ^a	52.82±0.85 ^a	51.98±0.10 ^a	49.97±0.24 ^b	47.76±1.03 ^c	41.79±1.55 ^d
Protease 3→Alcalase	61.78±0.00	53.12±0.43 ^a	52.49±0.38 ^a	51.28±0.14 ^b	49.30±0.24 ^c	47.94±0.42 ^d	43.21±.33 ^e

¹Control: DPPH (Vit C 1000 ppm); Reducing power (Vit C 1000 ppm); Chelating Cu^{2+} (EDTA 1000 ppm)²Enzyme combination: Alcalase 4 → Protease, The collagen was hydrolyzed with Alcalase for 4 hr previously and then with Protease Type XIV for 1~5 hr. Protease 3 → Alcalase, The collagen was hydrolyzed with Protease for 3 hr previously and then with Alcalase for 1~5 hr.³Values are mean ± SD (n=3). Different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$) between different samples.

長而有降低的趨勢。整體而言，以 Alcalase 組水解 4 hr，Protease XIV 組水解 3 hr 及混合酵素組水解 4 hr，即可得到較強的清除 DPPH 自由基、還原力及螯合銅離子能力。因此，以 Alcalase 組水解 4 hr 及 Protease XIV 組水解 3 hr 之條件，進一步探討經該兩種酵素二次水解對抗氧化性之影響。

(二) 二次酵素水解液抗氧化性之比較

以上述兩種酵素之較佳水解時間，將 2% Alcalase 水解 4 hr 失活後，再以 Protease XIV 進行二次水解，水解 0、1、2、3、4 及 5 hr (Alcalase 4 → Protease) 組，另以 3% Protease XIV 水解 3 hr

Table 3 The scavenging effect on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) radical, reducing power and chelating Cu^{2+} ability of tilapia scale collagen hydrolysates with combined treatments of 2% Alcalase, 3% Protease Type XIV and 1% Collagenase

Enzyme ² Combination	Hydrolysis time (hr)						
	Control ¹	0	1	2	3	4	5
Scavenging activity of DPPH (%)							
Alcalase 4→ Collagenase	95.70±0.00 ³	50.07±2.23 ^b	55.37±2.32 ^a	56.74±3.13 ^a	54.24±3.41 ^{ab}	52.80±3.99 ^{ab}	44.77±2.39 ^c
(Alcalase + Protease 4) → Collagenase	95.71±0.00	61.43±2.86 ^{ab}	58.22±2.33 ^b	58.22±2.65 ^b	59.11±1.52 ^b	63.82±1.81 ^a	64.05±2.92 ^a
Reducing power (700nm)							
Alcalase 4→ Collagenase	2.42±0.00	0.77±0.04 ^b	0.97±0.04 ^{ab}	0.80±0.03 ^{ab}	0.80±0.03 ^{ab}	0.83±0.04 ^{ab}	0.85±0.04 ^b
(Alcalase + Protease 4) → Collagenase	2.41±0.00	0.88±0.01 ^b	0.94±0.01 ^a	0.93±0.01 ^a	0.93±0.01 ^a	0.96±0.02 ^a	0.95±0.01 ^a
Chelating Cu^{2+} ability (%)							
Alcalase 4→ Collagenase	61.78±0.00	54.19±0.43 ^a	54.47±1.19 ^a	54.44±0.04 ^a	54.23±0.12 ^a	54.05±0.37 ^a	53.68±0.27 ^a
(Alcalase + Protease 4) → Collagenase	61.77±0.00	42.46±0.94 ^a	40.83±2.35 ^a	42.33±0.43 ^a	41.78±0.07 ^a	41.73±0.38 ^a	41.52±0.27 ^a

¹Control: DPPH (Vit C 1000 ppm); Reducing power (Vit C 1000 ppm); Chelating Cu^{2+} (EDTA 1000 ppm)²Enzyme combination: Alcalase 4 → Collagenase, The collagen was hydrolyzed with Alcalase for 4 hr previously and then with Collagenase for 1~5 hr. Alcalase + Protease 4 → Collagenase, The collagen was hydrolyzed with (Alcalase + Protease 4) for 4 hr previously and then with Collagenase for 1~5 hr.³Values are mean ± SD (n=3). Different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$) between different samples.

失活後，再以 2% Alcalase 進行二次水解，水解 0、1、2、3、4 及 5 hr (Protease 3 → Alcalase) 組，評估兩組二次水解物對清除 DPPH 自由基、還原力及螯合銅離子能力如 Table 2 所示。結果顯示，在這兩組中，除了在還原力方面經二次水解至 5 hr，高於一次水解物外，其餘清除 DPPH 自由基及螯合銅離子能力均低於一次水解物。整體而言，經二次水解後，對清除 DPPH 自由基、還原力及螯合銅離子能力，並無提昇效果，反而有減少的趨勢。因此選擇一次水解 Alcalase 組及混合酵素組再以 Collagenase 進行二次水解，結果如 Table 3 所示，經 Collagenase 進行二次水解也未提高清除 DPPH 自由基、還原力及螯合銅離子能力之效果。考量抗氧化能力及經濟效益下，以添加 2% Alcalase 水解 4 hr 為較適水解條件。Kim *et al.* (2001) 以 Alcalase、Pronase E 及 Collagenase 構成三層連續式膜反應器，水解阿拉斯加鱈魚皮明膠，結果顯示經過第二層後之水解物具有很強的抗氧化能力，但經第三層 Collagenase 水解後，並不具提高其抗氧化能力之效果，此結果與本研究相似。

(三) 游離胺基酸與 CAA 在水解期間之變化與抗氧化性之關係

吳郭魚鱗膠原蛋白以 2% Alcalase 水解期間，游離胺基酸與 CAA 在水解期間之變化如 Tables 4 & 5 所示。水解初期 (0 hr) 之總游離胺基酸含量明顯偏低，推測可能是因為 0 hr 的處理方式是加入酵素攪拌均勻後即失活，酵素尚未作用而導致總游離胺基酸含量明顯偏低；而 0~1 hr 後，由於酵素作用，使得總游離胺基酸含量急遽增加，且隨著水解時間的增長而有增加的趨勢，但水解至 5 hr 時，抗氧化性並沒有隨游離胺基酸含量增加而增強，其中 Hyp、Glu、Pro 及 Val 等胺基酸，也沒有因為水解而增加，推測可能與酵素切位有關。複合胺基酸代表組成小分子胜肽中之各種胺基酸，由 Table 5 結果顯示，吳郭魚鱗膠原蛋白在水解初期即含有 CAA，之後則隨水解時間增長而有增加的趨勢，於 3 hr 內含量達到最高點，爾後隨水解時間增長反而有減少的趨勢，推測可能是因為酵素分解蛋白質為胜肽達一程度之後，進而再將胜肽分解為游離胺基酸，故各組水解液總游

Table 4 Changes in free amino acid of tilapia scale collagen hydrolysates during hydrolysis with 2 % Alcalase at 50°C for 5 hr (TCA-soluble)

Unit: mg/100 g

Amino acid	Hydrolysis time (hr)					
	0	1	2	3	4	5
Hydroxyproline	— ¹	—	—	—	—	—
Aspartic acid	—	15	—	—	—	—
Threonine	—	2	2	—	—	—
Serine	—	3	4	8	9	12
Glutamic acid	—	—	—	—	—	—
Proline	—	—	—	—	—	—
Glycine	6	22	24	24	41	57
Alanine	10	28	53	44	59	67
Cystine	—	—	—	—	—	—
Valine	—	—	—	—	—	—
Methionine	33	233	325	331	404	478
Isoleucine	52	112	125	126	126	126
Leucine	—	—	—	—	373	375
Tyrosine	50	102	198	224	277	298
Phenylalanine	69	224	245	244	267	281
Lysine	—	—	—	—	51	82
Histidine	17	37	35	37	55	108
Arginine	12	112	63	63	103	157
Total	249	890	1074	1106	1765	2041

¹Not detectable.**Table 5** Changes in combined amino acid of tilapia scale collagen hydrolysates during hydrolysis with 2 % Alcalase at 50°C for 5 hr (TCA-soluble peptides)

Unit: mg/100 g

Amino acid	Hydrolysis time (hr)					
	0	1	2	3	4	5
Hydroxyproline	3730	8680	8525	9305	7610	7845
Aspartic acid	2185	4215	4890	4850	3935	4250
Threonine	880	2125	2390	2430	1975	2185
Serine	1342	2841	3270	3270	2725	2990
Glutamic acid	3870	8606	9325	9190	7400	8075
Proline	4844	9354	11044	11818	9202	9872
Glycine	9897	18708	22335	21690	18110	19740
Alanine	4140	7555	9055	8760	7340	7855
Cystine	— ¹	—	—	—	—	—
Valine	715	2009	2095	1895	1550	1600
Methionine	75	1365	1520	1540	1020	1080
Isoleucine	460	1142	1350	1295	990	1025
Leucine	1110	2244	2710	2590	2120	2225
Tyrosine	—	665	810	770	600	705
Phenylalanine	817	1570	1960	1990	1590	1670
Lysine	1300	2267	2712	2640	2225	2320
Histidine	312	905	1105	1040	880	990
Arginine	3307	5930	7270	7330	5655	6545
Total	38986	80183	92367	92403	74927	80972

¹Not detectable.

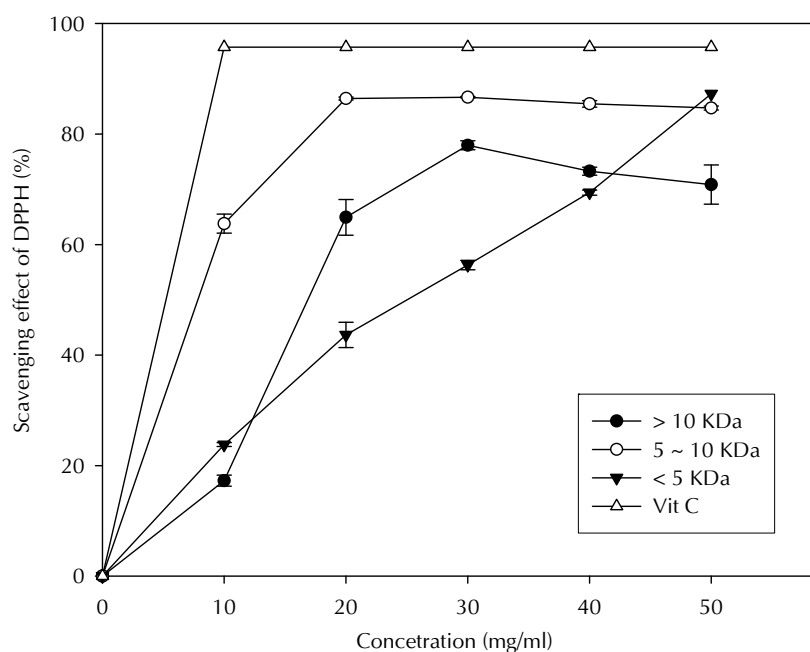


Fig. 1 Change in the scavenging effect of DPPH radical of different molecular weight fraction of tilapia scale collagen hydrolysates with 2% Alcalase at 50°C for 4 hr.

離胺基酸含量持續增加，而總 CAA 含量則呈減少的情況，而水解 5 hr 之總 CAA 含量比水解 4 hr 的高，推測可能是部分膠原蛋白水解到 5 hr 才陸續被水解成胜肽，而使 CAA 含量有增加的趨勢，由上述結果顯示，隨游離胺基酸與 CAA 含量的增加對抗氧化性沒有絕對的增強效果，此外酵素水解所產生之胜肽種類才是決定抗氧化性強弱的主要因子。

Suetsuna *et al.* (2004) 由秋刀魚鱗膠原胜肽，分離純化出具有抗氧化活性之胜肽 Leu-His-Gln-Pro-Val-Pro-Glu 及 Val-Ser-Gln-Pro-Ile-Gln-Gln-Glu；鱈魚魚皮明膠水解物中，被分離純化出具有抗氧化活性之胜肽 Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly (Kim *et al.*, 2001)，Mendis *et al.* (2005) 也由加網魚 (*Johnius belengerii*) 魚皮明膠中分離純化出 His-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Leu 之抗氧化胜肽，以上報告顯示在這些抗氧化胜肽序列中均含有 Pro，因此推測吳郭魚鱗膠原蛋白水解液之抗氧化性可能與胜肽序列中之 Pro 有關。

二、吳郭魚鱗膠原蛋白酵素水解物分子量劃分及其抗氧化性

(一) 清除 DPPH 自由基之能力

以添加 2% Alcalase 水解 4 hr 之水解液，以超過過濾濃縮裝置，劃分為分子量大於 10 kDa、5 ~ 10 kDa 及小於 5 kDa 等三個部分，冷凍乾燥後進行清除 DPPH 自由基能力測定，結果如 Fig. 1 所示。在 50 mg/ml 濃度下，大於 10 kDa、5 ~ 10 kDa 及小於 5 kDa 之水解物，其清除 DPPH 自由基能力分別為 71%、85% 及 87%，以分子量 5 ~ 10 kDa 之水解固形物濃度在 20 mg/ml，其清除 DPPH 能力達到最強之後而趨於平緩，而在小於 5 kDa 則是隨著固形物濃度的增加而有增加的趨勢。

(二) 還原力

利用普魯士藍之生成量來作為樣品還原過氧化物的能力，在波長 700 nm 下，吸光值越高代表還原力越高。以超過過濾濃縮裝置進行分子量劃分 10 kDa 以上、5 ~ 10 kDa 及小於 5 kDa 等三個部分之水解液，冷凍乾燥後進行還原力測定，結果如 Fig. 2 所示。在 50 mg/ml 濃度下，10 kDa 以上、5 ~ 10 kDa 及小於 5 kDa 等三個部分之水解液之還原力分別為 1.36、1.00 及 0.47，顯示在此水解條

Fig. 2 Change in the reducing power of different molecular weight fraction of tilapia scale collagen hydrolysates with 2% Alcalase at 50°C for 4 hr.

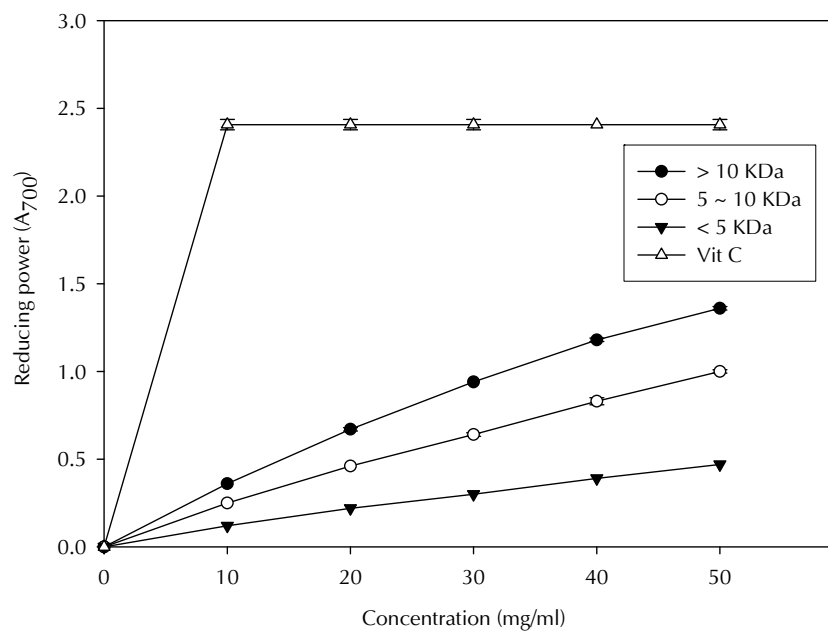
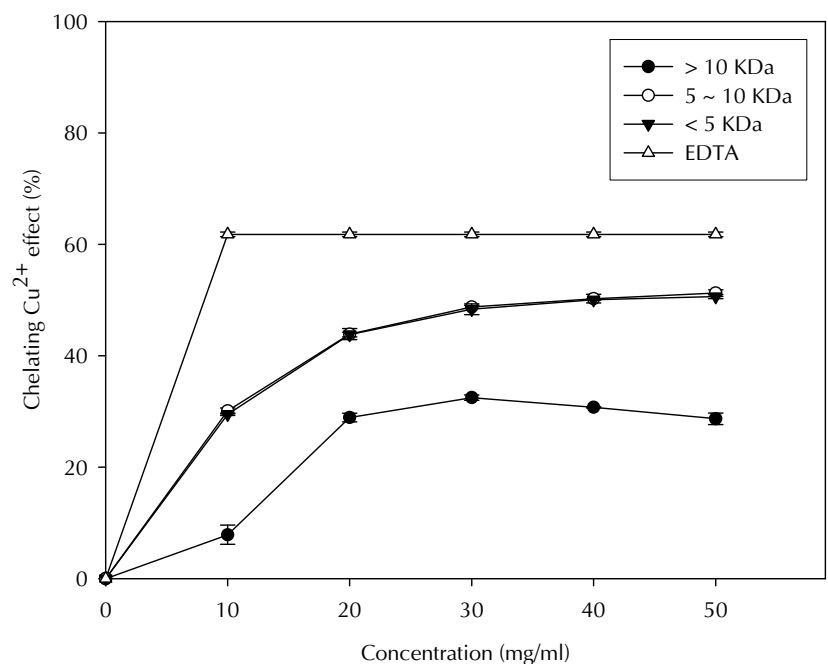


Fig. 3 Change in the chelating Cu^{2+} ability of different molecular weight fraction of tilapia scale collagen hydrolysates with 2% Alcalase at 50°C for 4 hr.



件下，其水解物隨著分子量與濃度的增加其還原力有增加的趨勢。

(三) 螯合銅離子能力

利用 TMM 與銅離子結合形成 TMM- Cu^{2+} 複合物，此複合物在 485 nm 下有強的吸收值，若反應中有強的螯合物質存在，則複合物生成的量會減少，485 nm 下吸光值則會下降，利用此方法可做為水解物螯合金屬能力的指標 (Shimada *et al.*,

1992)。在分子量劃分大於 10 kDa、5 ~ 10 kDa 及小於 5 kDa 水解物，在 50 mg/ml 濃度下，螯合銅離子能力分別為 29%、51%及 51% (Fig. 3)，以 5 ~ 10 kDa 及小於 5 kDa 之水解物螯合銅離子能力較強。

Kim *et al.* (2001) 水解阿拉斯加鱈魚魚皮明膠，結果顯示分子量在 1.5 ~ 4.5 kDa 之水解物其抗氧化能力最強。Suetsuna *et al.* (2004) 以胃蛋白分解酶水解秋刀魚魚鱗膠原蛋白，結果顯示分子量在小於 3.5 kDa 水解物具有較強之抗氧化能力。

Jeon *et al.* (1999) 以粗蛋白酵素水解鱈魚骨架，結果顯示分子量在 5 ~ 10 kDa 水解物其抗氧化能力最強，上述報告具抗氧化性勝肽之分子量分佈與本研究結果相似。

結 論

以清除 DPPH 自由基、還原力及螯合銅離子能力之測定方法，評估吳郭魚鱗膠原蛋白水解物之抗氧化性，發現以 2% Alcalase 在 50 °C 下水解 4 hr 之抗氧化性較強。水解液經超過濃縮法進行分子量分割，顯示 5 ~ 10 kDa 及小於 5 kDa 之水解物，清除 DPPH 自由基及螯合銅離子能力較強，還原力則以大於 10 kDa 之水解物較強，除了具有抗氧化活性外，魚鱗膠原蛋白水解物還富含 Gly、Pro 及 Hyp 等胺基酸，可供作開發具有保健機能飲品之參考。

參考文獻

- 江晃榮 (2002) 膠原蛋白的驚人療效. 世茂出版社, 台北.
- 呂博文 (2004) 低免疫性的生醫材料膠原蛋白. 科學發展, 380: 6-11.
- 洪雅萍 (2004) 膠原蛋白產品的功效. 科學發展, 380: 30-35.
- 陳世輝 (2004) 膠原蛋白讓你水噹噹. 科學發展, 380: 12-17.
- 黃富彥, 湯正明, 徐善慧 (2003) 揭開膠原蛋白的神秘面紗. 科學發展, 362: 44-47.
- 黃穎斐 (2004) 生醫敷料及人工皮膚. 科學發展, 380: 24-29.
- 漁業資訊服務網 <http://www.fa.gov.tw>
- Brand-Williams, W., M. E. Cuatrecasas and C. Berest (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 28: 25-30.
- Fahmi, A., S. Morimura, H. C. Guo, T. Shigematsu, K. Kida and Y. Uemura (2004) Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Proc. Biochem.*, 39: 1195-1200.
- Itoh, S., M. Kikuchi, Y. Koyama, K. Takakuda, K. Shinomiya and J. Tanaka (2002) Development of an artificial vertebral body using a novel biomaterials hydroxyapatite / collagen composite. *Biomaterials*, 23: 3919-3926.
- Jeon, Y. J., H. G. Byun and S. K. Kim (1999) Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Proc. Biochem.*, 35: 471-478.
- Kanbe, C., F. Klar, R. Fitzner, R. J. Radlanski and U. Gross (2002) In vitro investigation of titanium and hydroxyapatite dental implant surface using a rat bone marrowstromal cell culture system. *Biomaterials*, 23: 3235-3245.
- Kim, S. K., Y. T. Kim, H. G. Byun, K. S. Nam, D. S. Joo and F. Shahidi (2001) Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollock skin. *J. Agricul. Food Chem.*, 49: 1984-1989.
- Konosu, S., K. Watanabe and T. Shimizu (1974) Distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts of eight species of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 40(9):909-915.
- Konosu, S., Yamaguchi, K. and Hayashi, T. (1978) Studies on flavor components in boiled crabs-I. Amino acids and related compounds in the extracts. *Bull. Ja. Soc. Sci. Fish.*, 41(5): 505-510.
- Mendis, E., N. Rajapakse and S. K. Kim (2005) Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agricul. Food Chem.*, 53: 581-587.
- Morimura, S., H. Nagata, A. Fahmi, T. Shigematsu, K. Kida and Y. Uemura (2002) Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Proc. Biochem.*, 37: 1403-1412.
- Oyaizu, M. (1988) Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35(11): 771-775.
- Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agricul. Food Chem.*, 40: 945-948.
- Suetsuna, K., K. Maekawa, J. R. Chen, K. Harada, M. Hamada and S. U. Shin (2004) Separation and Identification of antioxidative peptides from peptic digest of fish scale collagen. *J. Nat. Fish. Univ.*, 52(2): 57-62.
- Takenaka, S., A. Okada, K. Iwai and Y. Ayaki (2003) Separation of collagen from fish scales by treatment of dilute hydrochloric acid aqueous solution. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 50(2): 67-71.
- Takenaka, A., A. Kawakami, M. Adachi, N. Morita and Y. Ayaki (2004) Separation of collagen by decalcification of red sea-bream scales. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 51(11): 572-576.

Studies on Antioxidative Activities of Hydrolysates from Fish Scales Collagen of Tilapia

Chih-Hsing Lai¹, Pei-Chien Wu¹, Chun-Heng Wu¹ and Chyuan-Yuan Shiau^{2*}

¹Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

²Department of Food Science, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

Collagen from tilapia fish scales was hydrolyzed by three kinds of commercial enzymes (Alcalase, Protease type XIV and Collagenase) for 0, 1, 2, 3, 4 and 5 hours. The antioxidative activities of the hydrolysates were measured by the scavenging effect on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radical, reducing power and chelating abilities of metal ion Cu^{2+} . Results showed that the highest antioxidative activity was found in 2% Alcalase hydrolysates at 50°C for 4 hours. Three fractions of the hydrolysate with different molecular weight were separated by using ultrafiltration. Fractions with 5 ~ 10 kDa and < 5 kDa had a higher effect on DPPH scavenging. Reducing power increased with the molecular weight of the fraction; fraction with 5 ~ 10 kDa and <5 kDa also had a higher chelating ability of Cu^{2+} . The hydrolysates of scales collagen possessed antioxidant activity, and the mechanism of antioxidation seemed dependent on the molecular weight of the peptides.

Key words: fish scales, hydrolysate, antioxidative activity, collagen, tilapia

*Correspondence: Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan. TEL: (02) 2462-2192 ext. 5111; FAX: (02) 2463-4203; E-mail: cyshiau@mail.ntou.edu.tw