

酵素水解對可食用 *Gracilaria tenuistipitata*

蛋白質水解物抗氧化活性之探討

蘇宇臻* 廖宏儒** 楊景雍***

*國立嘉義大學食品科學系 博士生

**國立嘉義大學食品科學系 副教授

***國立高雄科技大學水產食品科學系 副教授

摘 要

蛋白質水解物存在許多具有生理活性的胜肽，尤其從食用海洋資源中分離出的生物活性肽已被用作營養食品和功能食品。本研究將海龍鬚菜 *Gracilaria tenuistipitata* (GT) 蛋白水解物進行抗氧化活性探討。首先將紅藻先以數種醱解酵素作用後，再分別使用以不同蛋白酵素 (Alcalase 2.4L FG、Neutrane 0.8L 和 Flavourzyme 500MG) 並在不同的水解時間 (2、4、6、8、10 h) 製備了 15 組 GT 蛋白水解物，然後用硫酸銨沉澱並脫鹽再進行質體 DNA 氧化傷害模式。結果表明，GTF2H 具有較高的質體 DNA 氧化傷害保護能力。GTF2H-A 區 (2531-1400 Da) 顯示出有最高的質體 DNA 氧化傷害保護能力。海龍鬚菜的蛋白水解物可用作抗氧化的潛在功能性食品成分。

關鍵詞：*Gracilaria tenuistipitata*、蛋白質水解物、活性胜肽、質體 DNA 氧化傷害

DIO：10.6425/JNHUST.202303_37(1).0002

*聯繫作者：國立高雄科技大學水產食品科學系，高雄市楠梓區海專路 142 號。

Tel: 07-3617141

E-mail: jiyang@nkust.edu.tw



Antioxidant activity of the Edible *Gracilaria tenuistipitata* protein hydrolysates after enzyme hydrolysis

Yu-Jhen Su^{*} Hung-Ju Liao^{} Jing-Iong Yang^{***}**

^{*}Department of Food Science, National Chiayi University, PhD student

^{**}Department of Food Science, National Chiayi University, Associate Professor

^{***}Department of Seafood Science, National Kaohsiung University of Science and Technology, Associate Professor

Abstract

Edible marine species are valuable sources of bioactive peptides. This study investigated the plasmid DNA oxidative damage of protein hydrolysates from the red algae *Gracilaria tenuistipitata*. Fifteen groups of protein hydrolysates were prepared by a two-step enzymatic hydrolysis of *Gracilaria tenuistipitata*: initial hydrolysis with several glycolytic enzymes, followed by three separate proteolytic reactions (Alcalase 2.4L FG, Neutrase 0.8L and Flavourzyme 500MG) for 2-10 h. Results showed that a hydrolysate GTF2H had the highest plasmid DNA oxidative damage *in vitro*. Fraction A (2531-1400 Da) derived from GTF2H displayed the highest plasmid DNA oxidative damage among fractions. Therefore, extracts of the red algae might be valuable antioxidative sources.

Keywords: *Gracilaria tenuistipitata*, protein hydrolysate, Bioactive peptides, plasmid DNA oxidative damage

DIO : 10.6425/JNHUST.202303_37(1).0002

*Corresponding Author : Department of Seafood Science, National Kaohsiung University of Science and Technology, Nanzih District, Kaohsiung 81157, Taiwan.

Tel: 07-3617141

E-mail: jiyang@nkust.edu.tw



壹、前言

預計到 2050 年，全球人口預計將增加三分之一以上（23 億人），到時對糧食需求會增加 70%。現今農業方法可能很快就不再是可用的選擇，因為環境造成嚴重後果。例如農業對土地的需求會威脅著自然棲息地和生物多樣性，而施肥造成的養分流失會破壞海洋、淡水和陸地生態系統[1]。

活性氧和氮物質（RONS）包括兩類化學反應性含有氧（活性氧，ROS）和氮（活性氮，RNS）是在體內起重要作用的自由基。然而自由基生成與內源性抗氧化防禦之間的不平衡可能導致細胞氧化，對各種細胞成分（如 DNA、蛋白質和脂質）造成氧化損傷。而氧化損傷已牽涉和被認為是引起各種病理條件，如心臟疾病，中風，動脈硬化，糖尿病和癌症[2,3]。脂質過氧化形式的氧化是食品中易發生的有害過程，也是食物酸敗和食物上架期減少的主要原因[4]。控制食品成分氧化的有效方法是在食品加工過程中加入合成食品級抗氧化劑（如 2,6-二丁基羥基甲苯，丁基羥基茴香醚，第三丁基氫醌和沒食子酸丙酯）[5]。

根據聯合國糧食及農業組織（FAO）發布的 2019 年亞洲海藻產量占全世界產量的 97.4%，最大生產國為中國，其次是印度尼西亞和大韓民國[6]。而藻類又可以分成 3 類包括棕色藻類（藻科），紅色藻類（紅藻科）和綠色藻類（綠藻科）[7]。*Gracilaria tenuistipitata* 是屬於龍鬚菜屬（*Gracilaria*）是紅藻植物門，真紅藻亞綱（*Florideophycidae*）、龍鬚菜目（*Gracilariales*）、龍鬚菜科（*Gracilariaceae*），生長於潮間帶中、下部礁岩上，全年均可見[8]。目前，台灣是生產海龍鬚菜的少數幾個國家之一。由於台灣每年可生產 3 萬噸以上的海龍鬚菜，所以這種廉價的藻類是重要的水產養殖種類[8]。自台灣從 1961 年開始養殖了海龍鬚菜是為滿足日益增長的工業需求而過度開發的瓊脂植物[9]。前人研究指出紅藻 *Gracilaria tenuistipitata* 的水萃取物對氫氧自由基誘發導致的 DNA 氧化傷害下，有明顯保護效應[10]。

然而，即使能成功的將藻類蛋白質萃取，但也會因為其藻類高粘度和陰離子細胞壁多醣（例如褐藻中的藻酸鹽和紅藻中的角叉菜膠）而大大阻礙蛋白質萃取[11]。現在使用酵素輔助萃取（EAE）可以用作從海藻中萃取蛋白質的替代品[1]，因為它具有眾多優勢例如增加產量，高特異性和保留蛋白質特性，是一種快速，可擴展且環保的產品友好的方法[12]。利用最佳化程式可以大大地提高蛋白質萃取率，例如水解時間、pH 和溫度，並且選擇適當酵素或使用兩種以上的酵素混合物[13,14,15]。

目前尚未有研究是關於海龍鬚菜酵素水解蛋白之質體 DNA 氧化傷害保護試驗。本研究的目的是以海龍鬚菜作為原料，經酵素水解後再以不同濃度硫酸銨沉澱，所獲得的蛋白水解產物，來探討質體 DNA 氧化傷害保護模式和胺基酸成分組成。

貳、材料和方法



一、海龍鬚菜原料

本實驗原料購自於雲林縣口湖鄉，海龍鬚菜學名為 *Gracilaria tenuistipitata* (GT)，為口湖鄉之沿海海域養殖海藻，以冷凍宅配至實驗室，於-40°C 冰箱冷凍儲藏備用。本研究使用試劑是購自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)，包含 Celluclast、Termamyl 120L、Viscozyme L、Flavourzyme 500MG、Neutrased 0.8L 和 Alcalase 2.4L FG 以及 HPLC 等級 Acetonitrile (CAN) 和甲醇。其餘藥品皆為分析級藥品。DNA 質體 (pGEM-T) 取自國立高雄師範大學陳建成老師實驗室。

二、藥品

使用商業酵素製備水解產物，包括三種醣解酵素 (Termamyl 120L, Celluclast 1.5L FG 和 Viscozyme L) 和三種蛋白酵素 (Flavourzyme 500 MG, Neutrased 0.8 L 和 Alcalase 2.4L FG) 以及胃蛋白酶和胰蛋白酶由 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 提供。表 1 總結了這些酵素的最好水解條件，特徵和來源。所有其他試劑均為分析級。

三、樣品前處理

將購自雲林 (口湖龍鬚菜生產合作社) 的龍鬚菜以自來水清洗去除鹽分與砂土，並將附著雜藻類及生物剔除，分裝，於-40°C 冰箱冷凍儲藏備用。再以真空凍結乾燥機 (FD series, Panchurm scientific corp., Kaohsiung, Taiwan) 乾燥後，以傾倒式粉碎機粉碎成 1 mm 並密封保存於乾燥箱備用。

四、紅藻蛋白質水解物之製備

取 1 g 乾燥 GT 加入 100 倍 (w/v) 超純水均勻混合後，先在熱水浴 90°C 下 10 分鐘冷卻到室溫，以酵素對基質比為 1:100 (w/w)，調整酵素最適 pH 後，先加入第一階段兩種醣解酵素 Celluclast 和 Termamyl pH4.5 溫度 50°C 進行水解反應 4 h，反應完成再以 95°C 加熱 10 min 使酵素失活，然後添加第三種醣解酵素 Viscozyme pH6.0 溫度 60°C 進行水解反應 4 h，反應完成再以 95°C 加熱 10 min 使酵素失活。以上述為基底，再進行第二階段水解分別加入 Flavourzyme、Neutrased 和 Alcalase 三種蛋白酵素，依最好 pH 值在 50°C 下進行分別水解反應 2、4、6、8、10 h，隨後以 95°C 加熱 10 min 使酵素失活，接著以依照最適 pH 值在 37°C 下，以 Pepsin 水解反應 2 h 及 trypsin 水解反應 4 h，隨後 95°C 加熱 10 min 使酵素失活，接著冷卻後進行 10,000×g (CF 15RX, Hitachi, Tokyo, Japan) 離心 20 分後取上清液，以真空冷凍乾燥機乾燥，即為海龍鬚菜蛋白質粗水解物 Crude *Gracilaria tenuistipitata* Flavourzyme (CGTF)、Crude *Gracilaria tenuistipitata* Neutrased (CGTN) 和 Crude *Gracilaria tenuistipitata* Alcalase (CGTA)。

上述步驟為海龍鬚菜蛋白質粗水解物，取 1g 各組樣品溶於 100 mL 純水，計算硫酸銨添加量，操作方法在冰浴上緩緩加入硫酸銨，並不斷地進行攪拌，待硫酸銨完全溶解後平衡 30 分鐘，在 4 度離心下 8000g，30 分鐘，取得鹽析沉澱物。再次量測上清液體積，添加下一個硫酸銨飽和濃度的重量，繼續以硫酸銨沉澱。如此重複收集各分割，共收集 0-30%、30-60% 和 60-90% 三個硫酸銨濃度區間，並合併三區沉澱物。



將上述沉澱物溶於 100 mL 的蒸餾水過 5kDa 截切膜進行過濾，並且收集 5kDa 以下的區分物凍乾成粉末後，再使用(ÄKTA, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) 膠過濾層析 (C16/900 16×900 mm, GE Biotech Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) 純化分離。凍乾粉末溶於去離子水經 0.22µm 膜過濾，注射體積為 2 ml，流速為 0.5 mL/min，每隻管數收集體積為 5 mL，移動相為 0.02% NaN₃ 的去離子水。收集液真空冷凍乾燥，得到樣品粉末稱作 (GTF 組、GTN 組和 GTA 組)。

五、質體 DNA 氧化傷害保護試驗

參考 Cao et al. [18] 方法加以修改，如依序分別加入 50 mM PBS、DNA、樣品液反應 10min，再與等比例混合之 H₂O₂ 加 FeSO₄ 溶液，總體積為 10 µL。於 37 °C 加熱反應 30 min，之後加入 2 µL dye 並注入含 Ethidium Bromide 之 1.0% 洋菜膠進行電泳，條件設定為 50 V、100 mV 與 60 min，最後使用膠片電泳影像分析儀 (Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) 觀察膠片，並以 Gel-Pro analyzer 軟體 (Media Cybernetics, USA) 進行分析，將試樣超螺旋 (supercoiled, SC) 的 DNA 亮度 (Brightness) 當分子，其整體 DNA 亮度當分母，所得計算之比率，作為樣品對質體 DNA 保護率 (%)。

公式計算如下：

$$\text{DNA保護率(\%)} = \frac{\text{超螺旋(SC)DNA亮度}}{\text{整體DNA亮度}} \times 100\%$$

	pH 7.0 PBS (µL)	DNA (µL)	Sample (µL)	H ₂ O ₂ +FeSO ₄ (1:1) (µL)
正控制組 (C)	9	1	-	-
負控制組 (NC)	7	1	-	2
對照組	4	1	3	2

六、胜肽純化分析

(一) 膠體過濾層析

首先將過濾管柱 (C16/900 16×900mm, AmershamPharmacia Biotech AB Sweden) 內部填充 Sephadex G-25 膠體，藉由快速蛋白質液體層析 (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) 進行純化分離。將凍乾樣品以 100 mg/mL 濃度，以 0.22 µm 膜過濾後，取 2 mL 進行注射，分析條件如下：移動相：Distilled water containing 0.02% NaN₃。流速：0.5 mL/min，每一管體積為 5 mL。偵測器波長：280nm。

(二) 逆向HPLC管柱分析

將 Sephadex G-25 膠體過濾收集區分物以 Discovery®BIO Wide Pore C18 column (10mm×250mm; particle size, 5 µm; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)



層析管柱，利用 reversed-phase HPLC (RP-HPLC)以移動相 A 作為沖提液，在 20 min 到 80 min 內將移動相 B 濃度由 0%提高至 60%進行濃度梯度分離。樣品以 2 mg/mL 濃度，經 0.22 μ m 膜過濾後，取 500 μ L 進行注射，其分析條件如下：移動相 A：水含 0.1%三氟醋酸 (v/v)。移動相 B：乙腈含 0.1%三氟醋酸。流速：1 mL/min，偵測器波長：215nm。

七、胺基酸組成分析

將 Sephadex G-25 膠體過濾收集區分物委託清華大學以 PICO · TAG Amino Acid Analysis System (Waters Corporation, Milford, MA, USA) 進行胺基酸組成分析，其分析條件如下：

Buffer A：(19 g sodium acetate trihydrate+0.5 mL triethylamine/1L) pH6.4

取Buffer A 940 mL + 60 mL acetonitrile (CAN)

Buffer B：60%乙腈

流速：1mL/min，梯度：0~10 min (Buffer B: 0~46%)，10~10.5 min (Buffer B: 46~100%)

管柱溫度：38°C

管柱型號：WAT088131 (60Å, 4 μ m particle size, 3.9 mm \times 150 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA)

偵測器波長：254 nm

八、統計分析

本實驗數據以 SPSS (Statistical Product and Service Solutions)統計套裝軟體進行單向變異數分析 (one-way analysis model procedure)，並以鄧肯測定法 (Duncan's) 計算各樣品之間的差異，顯著水準 $p < 0.05$ 。

參、結果與討論

一、紅藻酵素水解物之蛋白質含量

乾燥的海龍鬚菜樣品含有大約 $16.58 \pm 0.47\%$ (data not shown) 的粗蛋白。海藻中蛋白質含量高，尤其是紅藻含量為 8-47 g /100 g 乾基[11]，與本研究結果一致。此外，蛋白質產量為水解產物乾重的 $41.22 \pm 0.56\%$ (data not shown)。利用多醣降解酵素處理可以降解海藻中細胞壁以提高蛋白質產量，因為 Celluclast、Viscozyme L 和 Termamyl 多被用來分解細胞多醣以釋放蛋白質。海藻蛋白的萃取常因為本身的結構複雜程度和剛性，以及細胞壁多醣造成的物理屏障限制而有萃取困難[12]。前人研究指出多種萃取方法的組合也可能有助於改善海藻蛋白的萃取。將酵素水解與鹼法萃取相結合，與單獨在紅藻中進行鹼法萃取相比，將蛋白質的產量提高了 1.63 倍[19]。在前人對各種棕色海藻的進行的研究中，發現產量變化的來源是海藻種類以及萃取所用的酵素，海藻酵素萃取物的產率為 $30.3\% \pm 1.3\%$ 至 $92.9\% \pm 2.2\%$ ，而水萃取物的產率為 $18.7\% \pm 0.3\%$ 至 $50.8\% \pm 1.3\%$ [20]。

二、紅藻蛋白質水解物對自由基誘發之 DNA 傷害的保護活性



為了研究蛋白水解物對氫氧自由基誘發導致的 DNA 氧化傷害，是否具有保護效果，所以使用 DNA 質體(pGEM-T)進行此保護試驗。原理為 FeSO₄ 和 H₂O₂ 混和產生氫氧自由基，對 DNA 質體造成氧化傷害，而 DNA 質體在未受自由基攻擊前構形是以超螺旋 (supercoiled, SC) 雙股為主，若單股斷裂就會形成開環結構 (open circular, OC)，或者是雙股斷裂則產生線型 (linear, L) 結構[21]，DNA 質體會因自由基的攻擊，而斷裂產生兩開環型及線性結構的亮帶，且破壞越嚴重，線性結構的亮帶越明顯。

將 15 種 GT 之粗水解物如表二，先利用硫酸銨沉澱法將沉澱物溶於蒸餾水後再利用超過濾以 5kDa 截切膜進行過濾，並且收集 5kDa 以下的區分物凍乾成粉末後，再利用 FPLC 膠過濾層析純化分離，而所使用的膠過濾管柱內部填物為 Sephadex G-25。圖一、二和三為不同 *G. tenuistipitata* 蛋白水解物配置成 10 mg/mL，破壞劑為 H₂O₂ 與 FeSO₄，分析其質體 DNA 氧化傷害保護之效果。先分別加入欲保護的質體 DNA，再利用 Fenton reaction 中的 H₂O₂ 與 Fe²⁺ 作用所產生氫氧自由基，以提供自由基的氧化傷害，其作用後的 DNA 經膠體電泳分析軟體 (Gel Pro v 4.0) 後即可得知樣品對自由基氧化傷害的保護程度。其結果如圖所示，GTF 組、GTN 組與 GTA 組的蛋白質水解物保護能力以軟體分析計算，其 DNA 保護率分別為 14.3~67.2%、13.8~54.3% 與 11.1~61.4%，發現以 GTF2H 水解物具有較佳的保護能力，保護效果達 67.2%，隨後將 GTF2H 蛋白質水解物分別配置成不同劑量 (0.5~10 mg/mL) 測定其質體 DNA 氧化傷害保護之電泳圖。圖四為利用軟體 (Gel Pro v 4.0) 計算出 GTF2H 的不同濃度 (0.5~10 mg/mL) 對質體 DNA 保護能力。可發現 GTF2H 隨著水解物的濃度提高，對於質體 DNA 的保護能力也隨之增加的濃度，當濃度為 2 mg/mL 時，DNA 保護能力即可達 62.5%；當濃度為 10 mg/mL 時，DNA 保護能力可達 69.0%。從數據得知，GTF2H 含有更有效的抗氧化胜肽，可以選擇用於後續分離。

三、GTF2H 水解物經膠體過濾層析純化分離之 DNA 傷害的保護活性

凝膠過濾色譜法是一種基於分子大小的有效分離技術並廣泛應用於混合物中的單獨成分[21]。將 GTF2H 配置成 100 mg/mL，再以 Sephadex G-25 進行膠體過濾分離，所得之區分物以 A 至 D 命名，如圖五所示，圖中紅線部分為不同標準品作為區隔，可從結果得知 GTF2H 有明顯被分離，將 FPLC 膠過濾層析圖劃分為 GTF2H-A (15-24 管)、GTF2H-B (25-29 管)、GTF2H-C (30-34 管) 和 GTF2H-D (35-44 管) 四區 (圖五) 線性方程式 ($\text{Log MW} = y = -154.67x + 4881.4$ $R^2 = 0.9961$)，而 A 區區分物管數 15-24 管，分子量分布在 2531-1400 Da，並分別收集凍乾後，加以探討各區分物之質體 DNA 氧化傷害保護電泳圖。所使用濃度為 10mg/mL，發現經過純化後膠過濾層析 GTF2H-A、GTF2H-B、GTF2H-C 和 GTF2H-D (圖六) 對質體 DNA 保護能力為 69.7、49.3、18.6 和 62.8%。結果發現經過膠過濾後 GTF2H-A 區對質體 DNA 保護能力 (69.7%) 較高。圖七為利用軟體 (Gel Pro v 4.0) 計算出 GTF2H-A 的不同濃度 (0.5~10 mg/mL) 對 DNA 保



護效應。發現 GTF2H-A 的濃度為 1 mg/mL 時 DNA 保護力即可達 42.2%，當濃度為 10 mg/mL 時 DNA 保護力可達 68.9%。

四、RP-HPLC C18 管柱純化

將 GTF2H-A 區配置成 1 mg/ml，再以 Discovery®BIO Wide Pore C18 (250×10 mm) 半製備型管柱進行濃度梯度分離，移動相為含 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) 去離子水溶液 (前 20 分鐘) 與含 0.1% TFA 之 acetonitrile 溶液梯度 (梯度 0-60%) (20~80 分鐘)，並將分離出濃度較高 peak 區分物以 1 至 5 命名，如圖八從結果可得知顯示尖峰集中於含有乙腈的沖提液的部分，顯示所含胺基酸可能偏向疏水性。

五、GTF2H A 區和 GTF2H A5 區胺基酸組成分析

後續將 GTF2H A 區和 GTF2H A5 區進行胺基酸組成，從表三結果所示 GTF2H A 區胺基酸組成以 Glycine (Gly)、Leucine (Leu)、Aspartic acid (Asp) 和 Glutamic acid (Glu) 的比例較顯著，GTF2H A5 區胺基酸組成以 Glycine (Gly)、Cystine (Cys)、Serine (Ser) 和 Leucine (Leu) 的比例較顯著，GTF2H A 區和 GTF2H A5 區的必需胺基酸 (Essential amino acid, EAA) 含量分別為 38.23% 和 37.34%。

蛋白質水解物和胜肽的生物活性直接受到胺基酸組成的影響。據前人研究指出，胜肽序列中疏水性胺基酸的存在，包括 Ala、Leu、Val 和 Met 在內的疏水性胺基酸殘基在清除自由基方面起著重要作用，因為較大的疏水基團可以幫助它們與疏水自由基種類接觸[22]。另外有研究指出 Gly 殘基可能顯著促進抗氧化活性，因為 Gly 側鏈中的單個氫原子充當質子供體並中和活性自由基[23]。此外，帶有咪唑基團的芳香族胺基酸 (例如 Phe、Trp、His 和 Tyr) 也被證明具有通過直接電子轉移來清除自由基的能力[24]，以及酸和鹼性胺基酸殘基，包括 Glu、Asp 和 Lys 具有螯合金屬離子和清除 HO• 的強大能力。因此，GTF2H A 區富含具有抗氧化活性的胺基酸，這應該是其高抗氧化活性的重要因素之一。

蛋白質的水解可以產生生物活性胜肽，這些胜肽可以帶來有益於健康的方面並調節疾病的結果。具有生物活性的植物胜肽具有 3 至 20 個胺基酸，並顯示出諸如抗氧化劑，抗癌劑，抗炎劑和免疫調節劑等生物學特性。例如，從純化的胜肽小球藻可以防止細胞損傷，並且可以作為有效的抗癌劑[25.26]。大藻和微藻中的蛋白質含量包括所有必需胺基酸，可以防止細胞損傷。紅藻 *Palmaria palmata* 富含 Leu、Val 和 Met，其平均水平類似於白蛋白。同樣，Ile 和 Thr 濃度與豆類蛋白質中的濃度相當。綠藻石蓴杜松含有 Leu、Phe 和 Val 作為主要必需胺基酸 [27.28]。

肆、結論

總之，海藻提供了多種具有潛在健康益處的生物活性分子。蛋白質水解物由游離胺基酸和短鏈胜肽組成，它們具有作為營養保健品，功能性食品或藥品具有許多優勢。酵素水解是簡單而且容易控制消化條件，本研究中 GT 經過酵素水解



後 GTF2H 蛋白質含量比乾燥海藻較高。在抗氧化部分，GTF2H 對質體 DNA 氧化傷害保護為 67.2%。經膠體過濾管柱純化後，所獲得的 A 區分物有較好的質體 DNA 氧化傷害保護，應進行進一步的研究和純化鑑定，未來期望可將海藻水解物應用在保健食品的開發上。

表一、研究中使用的最佳水解條件，特徵和特定酵素的來源的摘要

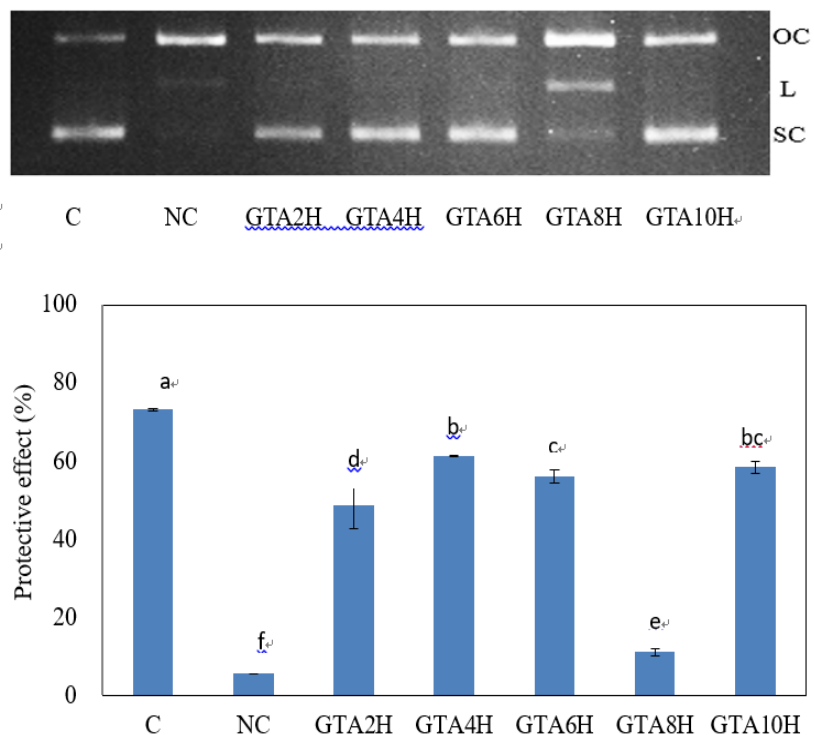
Enzyme	Optimum conditions ^a		Characteristics	Source
	pH	Temperature (°C)		
Alcalase 2.4L FG	8.0	50	Endo-peptidase	<i>Bacillus licheniformis</i>
Neutrase 0.8L	6.0	50	Metallo-endoprotease	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Flavourzyme 500 MG	7.0	50	Endo-protease and exo-peptidase	<i>Aspergillus oryzae</i>
Viscozyme L	4.5	50	A multi-enzyme complex (containing arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulose, and xylanase)	<i>Aspergillus aculeatus</i>
Celluclast 1.5L FG	4.5	50	Cellulase	<i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921
Termamyl 120L	6.0	60	Heat-stable α - amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>

^a [16,17]

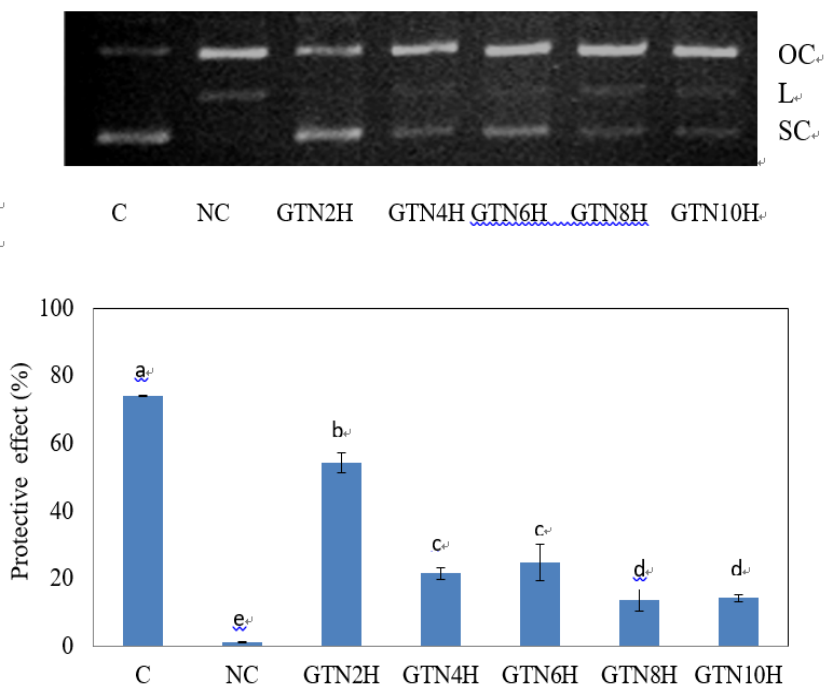
表二、經過 Flavourzyme、Neutrase 和 Alcalase 水解 2-10 小時的海龍鬚菜蛋白質粗水解物

水解時間 (H)	海龍鬚菜蛋白質粗水解物		
	CGTF	CGTN	CGTA
2	CGTF2H	CGTN2H	CGTA2H
4	CGTF4H	CGTN4H	CGTA4H
6	CGTF6H	CGTN6H	CGTA6H
8	CGTF8H	CGTN8H	CGTA8H
10	CGTF10H	CGTN10H	CGTA10H

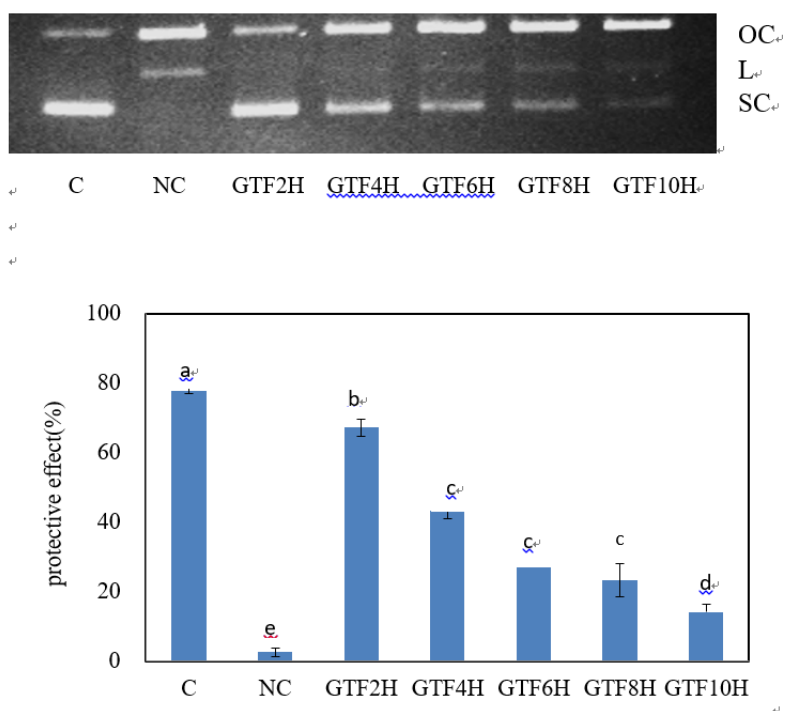




圖一、紅藻蛋白質水解物 (GTA) 對質體DNA氧化傷害保護效應。樣品濃度為10 mg/mL。DNA構形，OC：開環 (open circular)，SC：超螺旋 (supercoiled)；線型 (linear, L)。C：控制組 (control)、NC：負控制組、GTA2H (經Alcalase酵素水解2小時)、GTA4H (經Alcalase酵素水解4小時)、GTA6H (經Alcalase酵素水解6小時)、GTA8H (經Alcalase酵素水解8小時)、GTA10H (經Alcalase酵素水解10小時)。The different lower-case letters are significant differences ($p < 0.05$)。

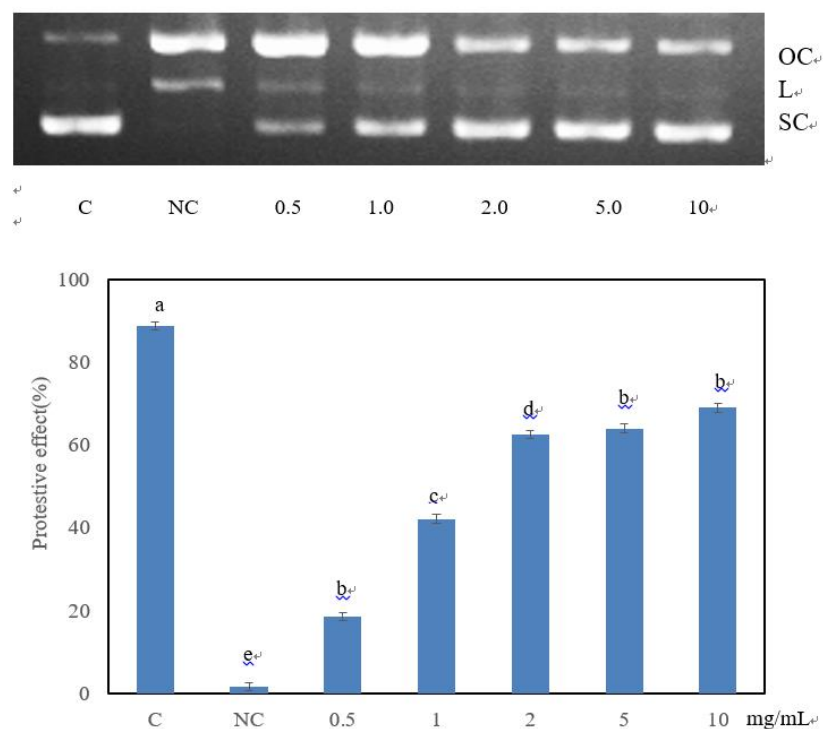


圖二、紅藻蛋白質水解物 (GTN) 對質體DNA氧化傷害保護效應。樣品濃度為10 mg/mL。DNA構形，OC：開環 (open circular)，SC：超螺旋 (supercoiled)；線型 (linear, L)。C：控制組 (control)、NC：負控制組、GTN2H (經 Neutrase 酵素水解2小時)、GTN4H (經 Neutrase 酵素水解4小時)、GTN6H (經 Neutrase 酵素水解6小時)、GTN8H (經 Neutrase 酵素水解8小時)、GTN10H (經 Neutrase 酵素水解10小時)。The different lower-case letters are significant differences ($p < 0.05$)。

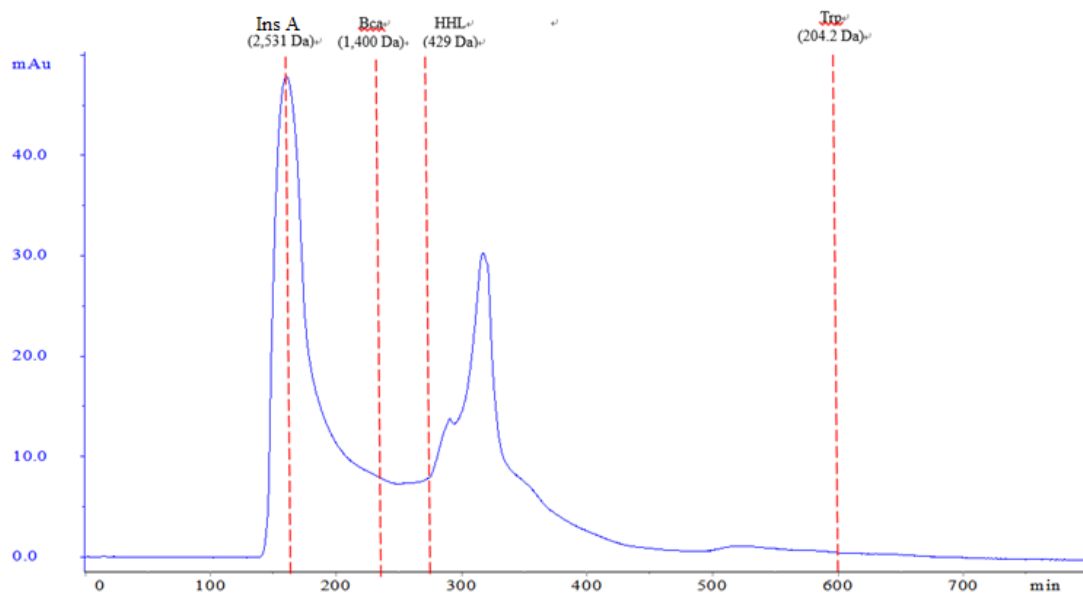


圖三、紅藻蛋白質水解物 (GTF) 對質體DNA氧化傷害保護效應。樣品濃度為10 mg/mL。DNA構形，OC：開環 (open circular)，SC：超螺旋 (supercoiled)；線型 (linear, L)。C：控制組 (control)、NC：負控制組、GTF2H (經 Flavourzyme 酵素水解2小時)、GTF4H (經 Flavourzyme 酵素水解4小時)、GTF6H (經 Flavourzyme 酵素水解6小時)、GTF8H (經 Flavourzyme 酵素水解8小時)、GTF10H (經 Flavourzyme 酵素水解10小時)。The different lower-case letters are significant differences ($p < 0.05$)。





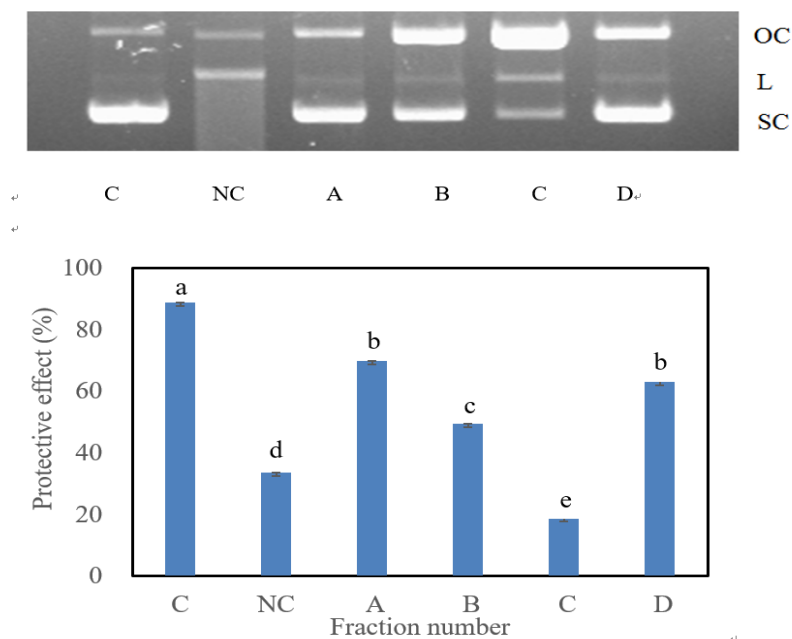
圖四、GTF2H 質體DNA氧化傷害保護效應電泳圖。樣品濃度為0.5~ 10 mg/mL。DNA構形，OC：開環（open circular），SC：超螺旋（supercoiled）；線型（linear, L）。C：控制組（control）、NC：負控制組。The different lower-case letters are significant differences ($p < 0.05$)。



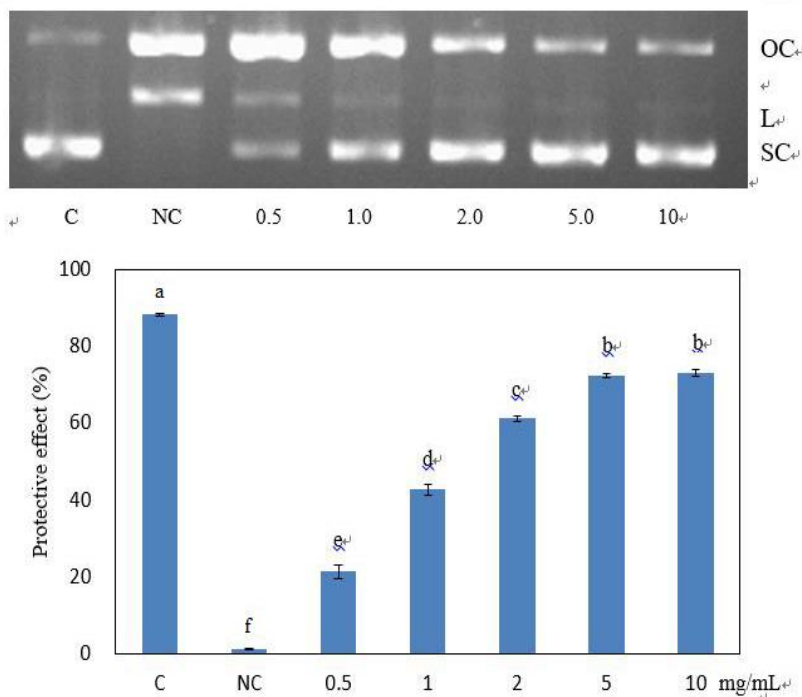
圖五、GTF2H經FPLC的Sephadex G-25膠體過濾層析圖譜及分子量分布
 *Ins A: Insulin A (2,531 Da), Bca: Bacitracin zinc salt (1,400 Da), HHL: Hippury-histidyl-leucine (429 Da), Trp: Tryptophan (204.2 Da)。



Time: A (15-24管)、B (25-29管)、C (30-34管)、D (35-45管)



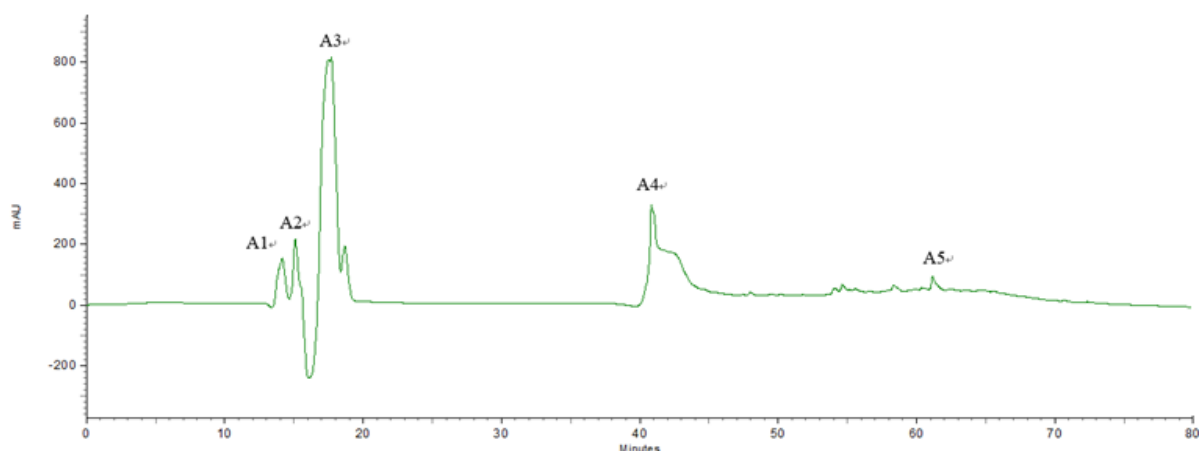
圖六、GTF2H FPLC各區分物A至D之質體DNA氧化傷害保護效應電泳圖。樣品濃度為10 mg/mL。DNA構形，OC：開環（open circular），SC：超螺旋（supercoiled）；線型（linear,L）。C：控制組（control）、NC：負控制組。The different lower-case letters are significant differences ($p < 0.05$)。



圖七、GTF2H-A區質體DNA氧化傷害保護效應電泳圖。樣品濃度為0.5~10 mg/mL。DNA構形，OC：開環（open circular），SC：超螺旋（supercoiled）；



線型 (linear, L) 。 C：控制組 (control) 、 NC：負控制組 。 The different lower-case letters are significant differences ($p < 0.05$) 。



圖八、GTF2H-A劃分物經逆向高效能液相層析 (C18) 分離之圖譜。

表三、GTF2H FPLC fraction A和GTF2H-A5之區分物胺基酸組成

胺基酸	A	A5
天門冬胺酸 (Asp)	8.36	7.17
麩胺酸 (Glu)	8.01	7.41
絲胺酸 (Ser)	7.39	9.07
甘胺酸 (Gly)	12.73	13.57
組胺酸 (His) ^a	2.07	1.78
精胺酸 (Arg)	7.36	1.19
羥丁胺酸 (Thr) ^a	5.01	4.51
丙胺酸 (Ala)	7.86	5.69
脯胺酸 (Pro)	7.50	5.33
酪胺酸 (Tyr)	1.28	3.44
纈胺酸 (Val) ^a	6.23	5.87
甲硫胺酸 (Met) ^a	1.50	3.14
胱胺酸 (Cys)	1.30	9.78
異白胺酸 (Ile) ^a	7.56	6.64
白胺酸 (Leu) ^a	8.52	7.59
苯丙胺酸 (Phe) ^a	3.09	2.73
離胺酸 (Lys) ^a	4.25	5.10
TEAA	38.23	37.34



TEAA/NEAA

0.61

0.60

^a : Essential amino acid

Note: Hydrophobic amino acids were marked with bold face.

TEAA : 總必需胺基酸 NEAA : 非必需胺基酸

參考文獻

1. Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 6(5), 33.
<https://doi.org/10.3390/foods6050033>
2. Weidinger, A., & Kozlov, A. (2015). Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5, 472–484. <https://doi.org/10.3390/biom5020472>
3. Ye, Z.-W., Zhang, J., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850, 1607–1621.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.010>
4. Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity foods. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Woodhead Publishing.
5. Agyei, D., Danquah, M. K., Sarethy, I. P., & Pan, S. (2015). Antioxidative peptides derived from food proteins. *Free Radicals in Human Health and Disease*, 417–430.
https://doi.org/10.1007 / 978-81-322-2035-0_26
6. Food and Agriculture Organization. (2019). Food Balance Sheets. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
7. Lafarga, T., Acién-Fernández, F. G. & Garcia-Vaquero, M. (2020). Bioactive peptides and carbohydrates from seaweed for food applications: Natural occurrence, isolation, purification, and identification. *Algal Research*, 48, 101909.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101909>
8. Chiang, Y. M., & Lin, J. L. (1989). Nitrate uptake by nitrogen-starved plants of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. Liui. *Jpn. J. Phycol.*, 37, 187–193.
9. Ajisaka, T., & Chiang, Y. M. (1993). Recent status of *Gracilaria* cultivation in Taiwan. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/BF00049037>
10. Yang, J.-I., Yeh, C.-C., Lee J.-C., Yi, S.-C., Tseng, C.-N., & Chang, H.-W. (2012). Aqueous extracts of the edible *Gracilaria tenuistipitata* are protective against H₂O₂-induced DNA damage, growth inhibition, and cell cycle arrest. *Molecules*, 17(6) 7241-7254. <https://doi.org/10.3390/molecules17067241>
11. Fleurence, J. (1999). The enzymatic degradation of algal cell walls: A useful approach for improving protein accessibility?. *Journal of Applied Phycology*, 11, 313–314. <https://doi.org/10.1023/A:1008183704389>



12. Cermeño, M., Kleekayai, T., Amigo-Benavent, M., Harnedy-Rothwell, P. & FitzGerald, R. J. (2020). Current knowledge on the extraction, purification, identification, and validation of bioactive peptides from seaweed. *Electrophoresis*, 41, 1694–1717. <https://doi.org/10.1002/elps.202000153>
13. Siriwardhana, N., Kim, K. N., Le, K.W., Kim, S. H., Ha, J. H., & Song, C. B. (2008). Optimization of hydrophilic antioxidant extraction from *Hizikifusiformis* by integrating treatments of enzymes, heat and pH control. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(4), 587–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01485.x>
14. del Pilar Sánchez-Camargo, A., Montero, L., Stiger-Pouvreau, V., Tanniou, A., Cifuentes, A., Herrero, M., & Ibañez, E. (2016). Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chemistry*, 192, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.098>
15. Le Guillard, C., Bergé, J.-P., Donnay-Moreno, C., Bruzac, S., Ragon, J.-Y., Baron, R., Fleurence, J. & Dumay, J. (2016). Soft liquefaction of the red seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis process. *Journal of Applied Phycology*, 28, 2575–2585. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0788-x>
16. Heo, S.-J., Park, E.-J., Lee, K.-W., & Jeon, Y.-J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96(14), 1613–1623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.07.013>
17. Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K., Kobayashi, A., & Nakano, T. (2002). Angiotensin I- converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6245–6252. <https://doi.org/10.1021/jf020482t>
18. Cao, W., Chen, W. J., Suo, Z. R., & Yao, Y. P. (2008). Protective effects of ethanolic extracts of buckwheat groats on DNA damage caused by hydroxyl radicals. *Food Research International*, 41, 924–929. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.014>
19. Maehre, H. K., Jensen, I.-J., & Eilertsen, K.-E. (2016). Enzymatic pre-treatment increases the protein bioaccessibility and extractability in Dulse (*Palmaria palmata*). *Marine Drugs*, 14, 196. <https://doi.org/10.3390/md14110196>
20. Habeebullah, S. F., Alagarsamy, S., Sattari, Z., Al-Haddad, S., Fakhraldeen, S., Al-Ghunaim, A. & Al-Yamani, F. (2020). Enzyme-assisted extraction of bioactive



- compounds from brown seaweeds and characterization. *Journal of Applied Phycology*, 32, 615–629. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01906-6>
21. 林志遠 (2008)。海龍鬚菜萃取物抗氧化性之探討。國立高雄海洋科技大學水產食品科學所碩士學位論文。
22. Pan, X., Zhao, Y. Q., Hu, F. Y., Wang, B. (2016). Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage. *Journal of Functional Foods*, 25, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.008>
23. Chen, C., Chi, Y. J., Zhao, M.Y., & Lv, L. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids*, 43, 457–466. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1102-0>
24. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Ren, X. J., Deng, S. G., & Wu, C. W. (2015). Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolyzate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle. *Food Chem*, 168, 662–667. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.117>
25. Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., & Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: Macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. *Marine Bioactive Compounds*. Springer.
26. Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine Drugs*, 9(6), 1056–1100. <https://doi.org/10.3390/md9061056>
27. Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Rodenas, S., & Sanchez-Muniz, F. J. (2009). Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *Journal of Medicinal Food*, 12(2), 236–258. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0151>
28. Taboada, C., Millán, R., & Míguez, I. (2010). Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(3), 445–449. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3836>

