

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 農業與食品學科

第一名

052203

金目鱸加工副產物水解後胜肽之抗發炎能力分析

學校名稱：高雄市立高雄女子高級中學

作者： 高二 黃致穎	指導老師： 馬世璋
---------------	--------------

關鍵詞：金目鱸加工副產物、水解後胜肽、抗炎症

得獎感言

科展所教予我的事

很榮幸有機會代表高雄市參加第63屆全國中小學科學展覽會，並且獲得高級中等學校「農業與食品科學組」第一名與特別獎—大成特優獎的殊榮。

從小到大，我參加過數次科展，也曾飲憾得到科展第二名錯失縣市代表權的機會，而越挫越勇的我，今年做到了，我終於成功的站上全國科展的舞台。毫無疑問的，這是對喜愛科學研究的我一大肯定，這些日子的辛苦，終於有了最美好的果實。

在這裡，我要感謝曾經協助陪伴我的老師及家人們，多虧了你們，我才能在人生的路上恣意揮灑出自己的精彩。感謝科教館舉辦全國科展，讓我有這個舞台展現對科學研究的熱忱與長時間研究的成果；感謝一路上悉心指導我的屏東科技大學終身特聘教授-劉俊宏教授及其研究團隊學長姐們提供良好的實驗環境，協助各項實驗的進行，因為有你們的全力支持與協助，才能讓我突破低潮渡過重重難關；感謝高雄女中馬世璋老師，因為有您不厭其煩的指導、作品說明書的反覆校稿及口語表達能力的訓練，才能讓我更有條理的表達研究成果。

回想起做科展時歡笑與淚水交織的日子，有說不完的故事。相對於讀書考試，研究是沒有標準答案的，常常面對的是不可預期的結果，只有秉持對科學的熱忱和永遠再試一次的毅力，才能突破難關堅持到最後。

在整個科展中，我從題目設定、文獻查詢、實驗設計到結果分析，一步步依照科學步驟，致力於主題的探究，過程漫長而艱辛。時常耗費了好幾天準備所做出來的實驗結果，卻跟預期不一致，實驗進度的停滯不前，常令我身心俱疲。多少次實驗過程中不斷遇到瓶頸與挫折的撞牆期及面對學校課業繁重的壓力，讓我蠟燭兩頭燒，感到迷茫，我不斷問自己，是否應該繼續堅持下去？但愛迪生曾說過：「追求成功最有效的方法，就是永遠再多試一下。」在研究的過程中，我經歷過數不清的失敗，在老師的指導與憑著一股不服輸的傻勁與勇氣下，永遠再多試一次，最後終於成功了。

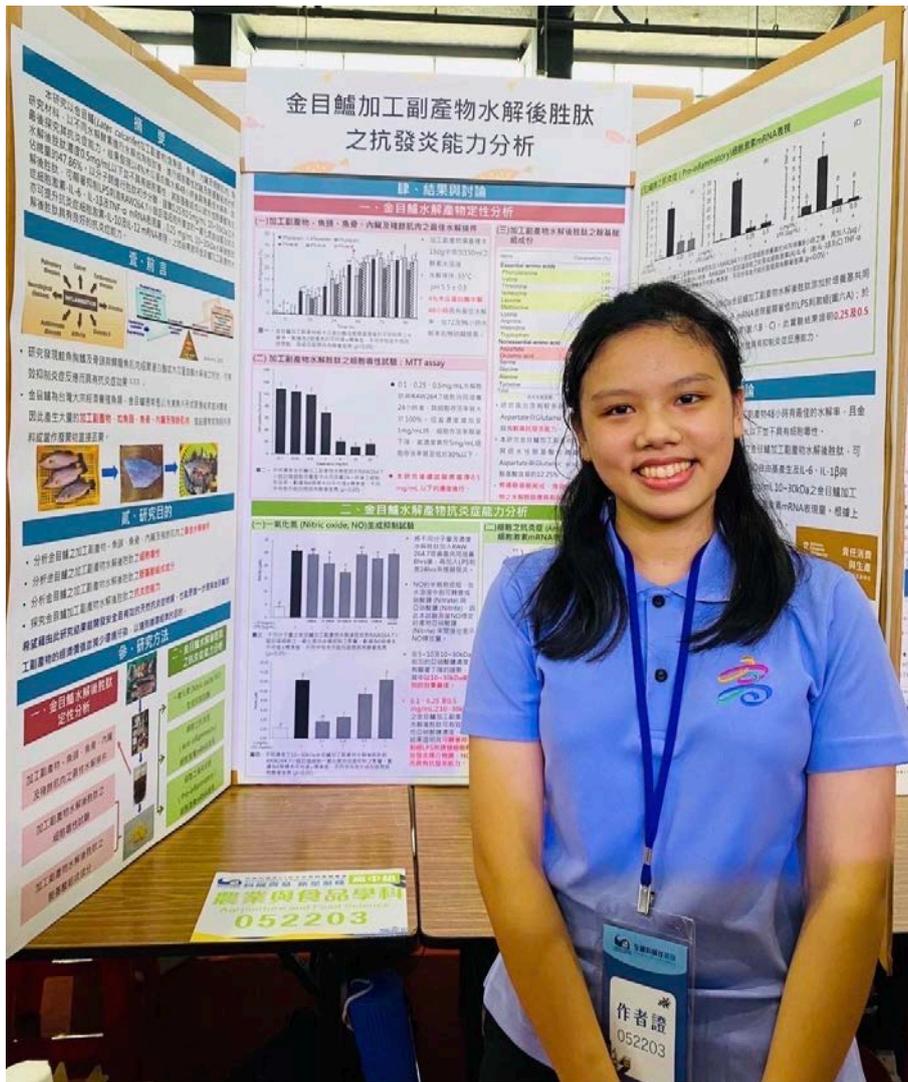
愛因斯坦曾說：「科學絕不是，也永遠不會是一本寫完了的書。每一項重大成就，都會帶來新的問題。任何一個發展，隨著時間的推移，都會出現新的、嚴重的困難。」科學，有太多值得我們去探索的地方了。每當與老師討論、跟評審

接觸的過程，都可以感受到自己研究作品的渺小與微不足道，彷彿盡全力想探究科學的全貌，到頭來卻仍只能摸到一點點邊。

最後，我想引用牛頓的一句話：「如果說我看得比別人遠，那是因為我站在巨人的肩膀上。」未來，我會將在科展路上所學到的獨立思考、努力不懈的能力用於每件事情上。



與指導老師分享得獎的喜悅



與作品合影



代表得獎同學於總統府致詞

摘要

本研究以金目鱸(*Lates calcarifer*)加工副產物(含魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉)為研究材料,以不同水解酵素進行水解成為胜肽後,進行細胞毒性試驗及胺基酸組成分析,最後探究其抗炎症能力。結果發現以4%木瓜蛋白酶水解48小時後具有最佳水解率。該水解後胜肽濃度0.5 mg/mL以下並不具有細胞毒性,其胺基酸組成以疏水性胺基酸為主,佔總量的47.86%。以分子篩進行胜肽初步分離,證實0.25及0.5 mg/mL 10~30kDa之水解後胜肽,可顯著抑制LPS刺激RAW 264.7小鼠巨噬細胞所產生的一氧化氮自由基及前炎症細胞激素-IL-6、IL-1 β 及TNF- α mRNA表現量;0.25 mg/mL 10~30kDa水解後胜肽亦可提升抗炎症細胞激素-IL-10及IL-12 mRNA表現。上述結果證明金目鱸加工副產物水解後胜肽具有良好的抗炎症能力。

壹、前言

一、研究動機

炎症反應(inflammation),是動物體對各種病原或物理、化學刺激造成的傷害所產生的防禦反應。對動物體而言,適當炎症反應是有益的,但過度炎症反應或慢性持續性炎症反應,反而有害於動物體。慢性低度全身性炎症(chronic low-grade systemic inflammation),已被證實於肥胖及體重過重所引起的高血壓、第二型糖尿病、血管硬化及其他代謝症候群之病生理機轉中,扮演極為重要的角色(Baker et al., 2011)。在給予抗炎症藥物後可有效降低胰島素抵抗性改善血糖控制,進而達到治療及預防肥胖及體重過重所引起的第二型糖尿病、代謝症候群及心血管疾病(Esser et al., 2015)。目前臨床上使用抗炎症藥物為類固醇、非固醇類消炎藥及單株抗體(Dinarelo, 2000),雖然其抗炎症效果好且作用快,但伴隨許多副作用,如破壞胃腸道黏膜上皮、延緩組織修復及腎毒性,所以皆無法長期使用(Bindu et al., 2020)。

因此針對慢性低度全身性炎症,目前科學界正在尋找更安全且有效的天然抗炎症物質,來替代或減少抗炎症藥物的使用。目前已有研究發現於魚類加工副產物,如鮭魚魚鰭及骨頭與鱒龍魚肌肉,經蛋白質分解酵素水解後可產生生物活性胜肽(bioactive peptides),其可有效抑制炎症反應及自由基清除能力,進而產生抗炎症效果(Ahn et al., 2015; Saisavoey et al., 2019; Gao et al., 2021)。然而,鱒龍魚與鮭魚皆非我國主要的養殖魚種,因此相關研究結果很難在

台灣實現。台灣四面環海，養殖漁業及相關加工產業發達，因此也產生大量水產加工副產物。根據相關調查水產加工後所產生副產物約佔為原本重量 1/4~2/3，由於水產加工副產物其性質容易腐敗，因此約有九成水產加工副產物以就地掩埋方式處理，僅有不到一成以資源回收處理再利用(周培文，2020)。本研究擬針對南部大宗養殖魚類—金目鱸之加工副產物進行酵素水解並進行相關抗炎症能力的分析評估，以期能開發安全且有效的天然抗炎症物質及提高金目鱸加工副產物之附加價值並減少環境汙染。

二、文獻回顧

(一)炎症反應

炎症反應又稱為發炎，是動物體免疫系統對各種病原、細胞損傷、有毒化合物及輻射等有害刺激所產生的反應，並透過消除有害刺激啟動癒合過程的身體防禦機制(黃美花，2023)。炎症反應為許多細胞類型高度協調活動，當組織受損時，受損部位上皮細胞及內皮細胞會釋放炎症反應因子進而釋放炎症訊息並引發一連串級聯反應(cascading reaction)，首先為誘導嗜中性白血球，其次為單核球、淋巴球和肥大細胞等炎症細胞的聚集，此時單核球可被分化成巨噬細胞和樹突狀細胞並透過趨化作用聚集到受損組織中，同時炎症細胞釋放大量前炎症細胞激素(pro-inflammatory cytokines)，包括腫瘤壞死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、間白素-6(interleukin-6, IL-6)及間白素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)，及其他炎症媒介物質，如一氧化氮(nitric acid; NO)、趨化因子、組織胺與前列腺素(prostaglandin; PG)等，此種細胞與分子間相互作用可有效減少即將發生的損傷及感染而達到消除有害刺激的目的(Dinarello, 2000；黃美花，2023)。儘管炎症是一種身體極為重要防禦機制，但不受控制急性炎症反應或急性炎症無法消除組織損傷時，則會轉變成慢性炎症進而導致心血管疾病、動脈粥樣硬化、第二型糖尿病、類風溼性關節炎及癌症(Baker et al., 2011)。

(二)魚類來源抗炎症蛋白質

自古人類即具有經由攝取食物來治療疾病之「食療」觀念，由於魚類具有優質且具高消化性蛋白質，也不受宗教信仰限制，因此魚類為人類重要動物性蛋白質來源。由於

水產加工後所產生副產物約佔為原本重量 1/4~2/3，以營養學角度來看，魚類加工後副產物仍具有豐富且高品質脂肪、礦物質及蛋白質營養成分(周培文，2020)。目前已有研究發現於魚類加工副產物，如鮭魚魚鰭及骨頭與鱘龍魚肌肉，經酵素水解後之胜肽具有生物活性，可有效抑制炎症反應及自由基清除能力而具有抗炎症效果(表一)(Ahn et al., 2015; Saisavoey et al., 2019 ; Gao et al., 2021)。

表一、魚類來源加工副產物水解後胜肽之抗炎症機制

來源	水解蛋白質之酵素種類	細胞模式	抗炎症機制	出處
鱘龍魚魚肉	胃蛋白酶 (pepsin)	以 LPS 刺激小鼠 264.7 巨噬細胞	1. 抑制 NO 生成 2. 抑制前炎症細胞激素 – IL-6、TNF- α 及 IL-1 β mRNA 表現 3. 抑制 MAPK 及 NF- κ B 訊息傳遞路徑	Gao et al., 2021
鮭魚骨頭	木瓜蛋白酶 (papain)	以 LPS 刺激小鼠 264.7 巨噬細胞	1. 抑制 NO 生成 2. 抑制 COX-2、iNOS、IL-6 及 TNF- α mRNA 表現	Saisavoey et al., 2019
鮭魚胸鰭	胃蛋白酶 (pepsin)	以 LPS 刺激小鼠 264.7 巨噬細胞	1. 抑制 NO 及 PGE ₂ 生成 2. 抑制前炎症細胞激素 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 產生	Ahn et al., 2015

COX-2：cyclooxygenase-2，環加氧酶-2

IL-1 β ：interleukin-1 β ，間白素-1 β

IL-6：interleukin-6，間白素-6

iNOS：inducible nitric oxide synthase，可誘導型一氧化氮合成酶

LPS：Lipopolysaccharide，脂多醣

MAPK：mitogen-activated protein kinase，絲裂原活化蛋白激酶

NF- κ B：nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells，核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子

NO：nitric acid，一氧化氮

PGE₂：prostaglandin E₂，前列腺素 E₂

TNF- α ：tumor necrosis factor- α ；腫瘤壞死因子 α

(三)金目鱸

金目鱸 (*Lates calcarifer*)，屬於尖嘴鱸科，一種廣鹽性魚類，可於完全淡水或完全海水飼養。與其他鱸魚品種如七星鱸等相比，金目鱸更耐高溫，適合台灣中南部氣候養殖。根據嘉義縣政府統計，全台灣金目鱸的年產量可高達 14,400 公噸、產值達 15 億 4 千萬元，為台灣大宗之經濟魚類 (廖順福，2020)。金目鱸雖非高價位及餐廳宴客之魚種，但金目鱸肉質細緻、有嚼勁，且含有容易被人體消化、吸收的優質蛋白質及豐富膠原蛋白，廣受一般家庭消費者喜愛(何書青，2018)。相較其他魚種，金目鱸通常是以冷凍魚片形式販售給家庭消費者，因此經初級加工取出魚片後伴隨產生大量加工副產物，如魚頭、魚骨、內臟、殘餘肌肉。由於金目鱸加工副產物經濟價值低，因此後續處理通常把其視為廢棄物直接丟棄或做為飼料原料。因此本試驗希望能有效利用金目鱸加工後副產物，利用酵素將其水解成胜肽，並進一步分析其是否具抗炎症能力，期望能提高金目鱸加工副產物之附加價值以達到循環經濟，同時減少廢棄物目的。



圖一、金目鱸。(A)達上市標準成魚，體長約為 50~60 公分；(B)加工後取出魚片；(C)魚頭、魚骨、內臟、殘餘肌肉等加工副產物(為本次收集研究材料)。

三、研究目的

本研究以金目鱸之加工副產物—魚頭、魚骨、內臟殘餘肌肉作為研究材料(圖一 C)，以木瓜蛋白酶與市售嫩精等不同水解酵素進行水解並純化胜肽，評估水解後胜肽之細胞毒性試驗及分析胺基酸組成，並進一步以一氧化氮自由基抑制試驗及即時定量聚合酶連鎖反應(Q-PCR)分析發炎前期及抗炎症細胞激素 mRNA 表現來評估其抗炎症能力。希望藉由此試驗結果能提

高金目鱸加工副產物的經濟價值，以達到循環經濟的目的，也能更進一步尋求更安全且有效的天然抗炎症化合物，來減少抗炎症藥物使用。

- (一) 分析金目鱸之加工副產物—魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉之最佳水解條件
- (二) 分析金目鱸之加工副產物水解後胜肽之細胞毒性試驗
- (三) 分析金目鱸之加工副產物水解後胜肽之胺基酸組成分
- (四) 探究金目鱸加工副產物水解後胜肽之抗炎症能力

貳、研究設備及器材

一、細胞株

採用 RAW264.7 小鼠巨噬細胞 (BioPioneer Tech)作為本次實驗細胞株。

二、研究設備及器材

用途	儀器設備與軟體
金目鱸加工副產物水解	1. 全波長波長酵素免疫分析儀(SpectraMax 190, Molecular Devices) 2. 凍乾機(FD-8530)
粗成分分析	1. 凱氏氮分解爐 (KT8S+TR, Gerhardt) 2. 凱氏氮蒸餾裝置 (Kjeltec System 1002 Distilling Unit, Tecator) 3. 水分分析儀 (MX-50, A& D Company)
胺基酸分析	1. 高效液相層析儀(JASCO) 2. pH 測量機(SP-2100, SUNTEX)
金目鱸胜肽純化	5、10、30、50kDa 分子篩離心管(SP-2100, SUNTEX)
細胞培養	1. 細胞培養基(Medium, Biological Industries) 2. 離心機(UNIVERSAL 320R, HETTICH) 3. 無菌操作台(VCM-420, TOUGHENED) 4. 細胞培養箱(NU-5810, NUAIRE)
細胞活性測定	全波長波長酵素免疫分析儀 (SpectraMax 190, Molecular Devices)
基因表現	1. 聚合酶連鎖反應分析儀(Veriti™ Thermal Cycler, 96-Well, Applied Biosystems™) 2. 微量分光光度計(Maestrogen)

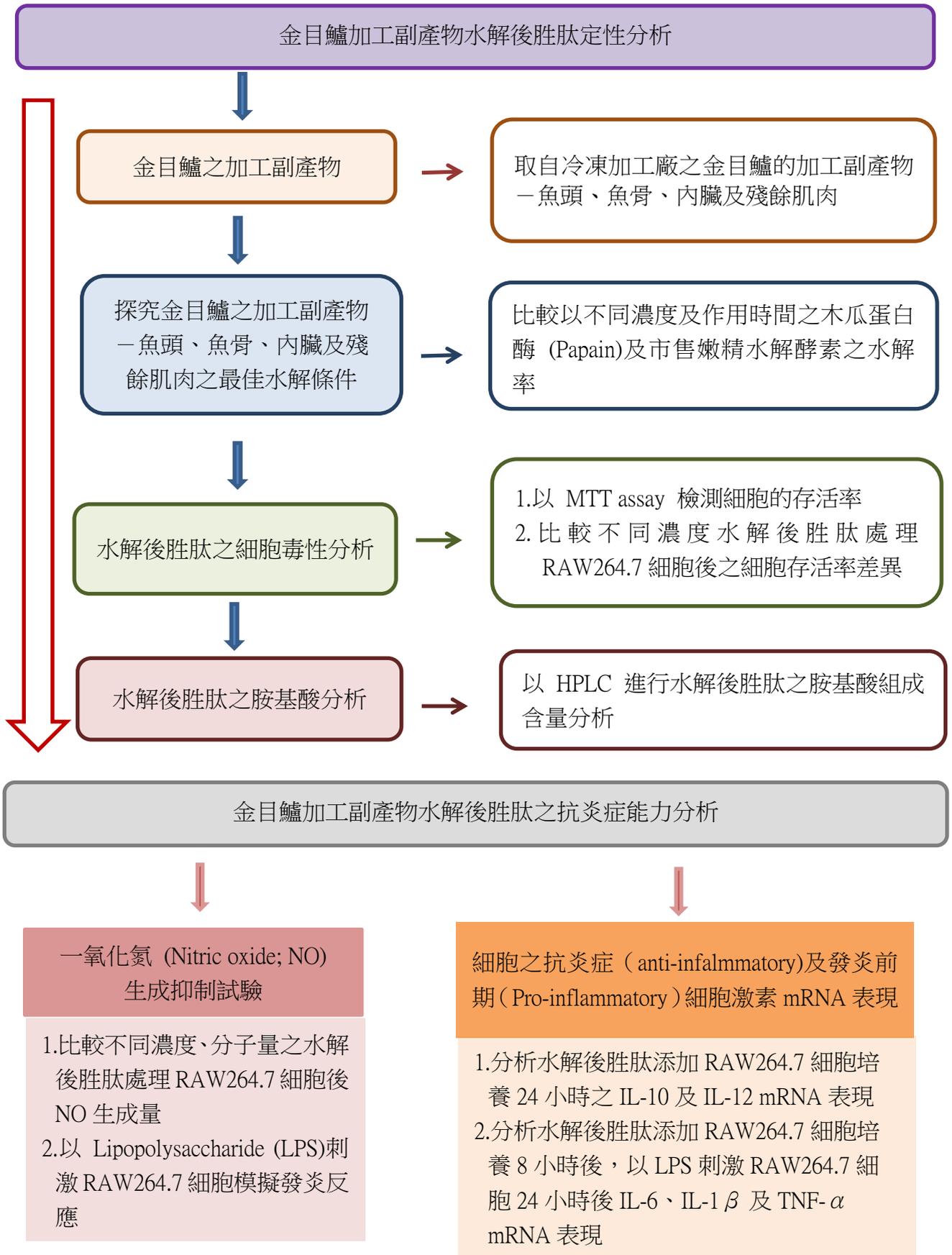
	<ol style="list-style-type: none"> 3. 乾浴槽(MD-02N-110, Major Science) 4. 即時定量聚合酶連鎖反應分析儀(StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems™) 5. Ultraspectm RNA 套組(Biotecx) 6. M-MuLV Reverse Transcriptase 套組 (Protech)
一氧化氮生成抑制試驗	<ol style="list-style-type: none"> 1. 硝酸鹽／亞硝酸鹽 比色分析商業試劑盒 (CAYMAN) 2. 螢光光譜儀(RF-6000, Shimadzu)
統計分析	SAS 統計軟件 (SAS/PC version, SAS Institute)

三、研究試劑

木瓜蛋白酶 (KINKASEI)、市售嫩精 (含鳳梨酵素及木瓜酵素，玉軒食品飛馬牌)、催化劑 (CuSO₄:K₂SO₄=1:10, SIGMA)、硫酸 (日本試藥)、硫酸銨 (J.T.Baker)、硼酸 (日本試藥)、蛋白質指示劑 (0.2%甲基紅酒精：0.2% broomocresol green 酒精混和液=1:5, Fluka)、氯化氫 (0.1N HCl，日本試藥)、氫氧化鈉 (Riedel-de Hean)、磷酸氫二鈉 (AMRESCO)、磷酸二氫鈉 (AMRESCO)、TNBS (SIGMA)、L-Leucine (SIGMA)、十二烷基硫酸鈉 (SIGMA)、雙氧水 (SIGMA)、甲酸混合液 (SIGMA)、溴化氫 (Hydrogen Bromide, HBr, J.T.Baker)、氯化氫 (6N HCl，日本試藥)、二甲基亞砷 (DMSO，日本試藥)、FBS 胎牛血清 (Biological Industries)、細胞抗生素 (ACE Biolabs)、MTT 試劑 (SIGMA)、Rezol™ C&T (PROtech Technologies, Inc.)、DEPC water (MD Bio, Inc.)、磷酸鹽緩衝液 PBS buffer (pH7.4, AMRESCO)、Isopropanol (SIGMA)、Chloroform (SIGMA)、氯化鈉 (NaCl, SIGMA)、氯化鉀 (KCl, AMRESCO)、磷酸一氫鈉 (Na₂HPO₄, AMRESCO)、磷酸二氫鉀 (KH₂PO₄, AMRESCO)、Trypan blue 細胞染色劑 (SIGMA)、Oligo (dt) (Promega)、5x reaction buffer (Promega)、dNTP (Promega)、Rnase inhibitor (Promega)、MMLV reverse transcriptase (Promega)、SYBR®GREEN (PROtech Technologies, Inc.)、牛血清白蛋白 (BSA, SIGMA)、蛋白質標準液 (Bio-rad, Bio-Rad Laboratories, Inc.)、脂多醣 (LPS, OMICS)、5-methly-tryptophan (SIGMA)、Sodium borate (SIGMA)、Acetonitrile (日本試藥)、Trifluoroacetic acid (TFA, Alfa Aesar)

參、研究過程及方法

一、實驗架構圖



二、研究方法步驟

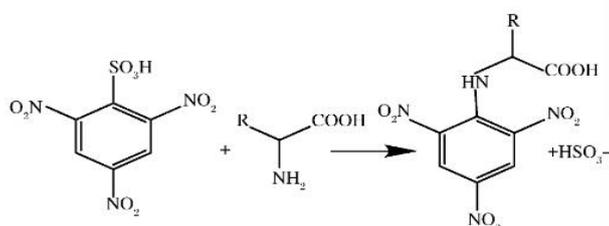
本研究自冷凍加工廠收集金目鱸經初級加工取出魚片後，所產生加工副產物—魚頭、魚骨、內臟、殘餘肌肉，作為本次研究材料。

(一) 金目鱸加工副產物水解後胜肽含量測定 (水解率)

本研究首先確立金目鱸加工副產物之最佳水解條件，本試驗以不同濃度之木瓜蛋白酶 (Papain) 以及市售嫩精(含鳳梨酵素及木瓜蛋白酶，裕軒食品飛馬牌) 進行金目鱸加工副產物水解，比較兩種水解酵素於不同作用時間之水解率，探討最佳水解酵素種類以及作用時間。

1. 水解率分析原理

本實驗採取 TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid) Assay 方法來測定水解率，此方法是透過測定水解前、後游離氨基含量，來測定其水解率。在水解樣本中加入三氯乙酸 (Trichloroacetic acid; TCA) 溶液使蛋白沉澱，過濾掉沉澱的蛋白，透過水解後在三氯乙酸 (TCA) 溶液中增加的游離胺基酸與 TNBS 結合的顯色衍生物之變化來測定其蛋白水解率。



圖二、TNBS assay 原理 (Chu et al., 2020)

2. 步驟

- (1) 在金目鱸的加工副產物濕重樣本 150g 中添加 150ml 之 3%、4%、及 5% 酵素濃度木瓜蛋白酶或市售嫩精水溶液(總重量 300g)。
- (2) 在最佳水解條件 (pH 5.5 ± 0.5, 55°C) (Babalola et al., 2023) 下進行水解，水解完成之樣本以 100°C 加熱 20 分鐘後終止水解反應。
- (3) 抽取上清液 100 μL 加入至含有 900 μL 十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 的 1.5 mL 微量離心管內，以離心機 8,000 rpm 在 4°C 下離心 10 分鐘。
- (4) 離心完成後抽取樣本 15 μL 加入 96 孔盤中，再加入 45 μL 磷酸二氫鈉 (Sodium dihydrogen phosphate) 以及 45 μL TNBS 溶液在培養箱 50°C、70rpm 振盪器中反應 1 小時。

(5)待反應完成後加入 90 μ L 0.1N 氫氯酸 (Hydrochloric acid; HCl)終止反應，並使用全波長酵素免疫分析儀在波長 340 nm 測定其吸光值。

(6)水解率計算公式：

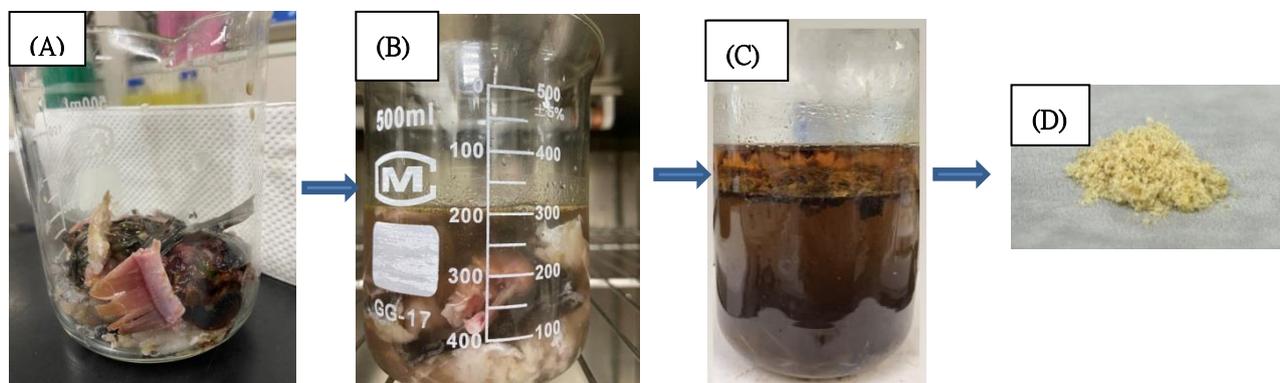
$$\text{水解率} = H/H_{\text{tot}} \times 100\%$$

H：固定時間內之胺基酸濃度

H_{tot}：樣本中之總胺基酸濃度

(二) 金目鱸加工副產物水解後胜肽粉末的製備

將金目鱸加工副產物-魚頭、魚骨、內臟、殘餘肌肉，使用上述實驗所得之最佳水解率條件進行水解。假設實驗發現在 4%木瓜蛋白酶水解 48 小時擁有最佳水解率，則將金目鱸加工副產物加入樣本同重之 4%之木瓜蛋白酶水溶液，並調整 pH 值至 5.5 \pm 0.5，並放置恆溫培養箱 55 $^{\circ}$ C 進行水解，在水解 48 小時後，使用 50mL 離心管收集水解液，使用離心機以 8,000 rpm 下離心 10 分鐘，將沉澱在離心管底部的雜質清除，並收集金目鱸水解液，使用凍乾機對金目鱸水解液進行冷凍乾燥，凍乾完成後，以粉末型態至-20 $^{\circ}$ C 冰箱內保存供進一步實驗使用(圖三)。



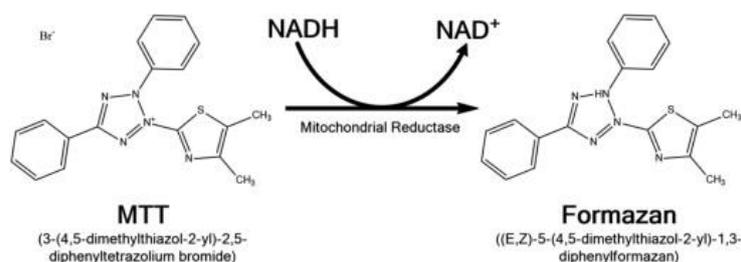
圖三、金目鱸加工副產物水解後胜肽粉末製備流程。(A)金目鱸加工副產物；(B)加入含 4%之木瓜蛋白酶水溶液並調整 pH 值至 5.5 \pm 0.5，並放置恆溫培養箱 55 $^{\circ}$ C 進行水解；(C) 水解 48 小時，收集水解液並離心；(D)離心後取上清液進行冷凍乾燥後之粉末

(三) 金目鱸加工副產物水解後胜肽的細胞毒性分析 (MTT assay)

本試驗採用 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay，分析以及比較不同濃度之水解後胜肽與 RAW264.7 小鼠巨噬細胞共同培養後之細胞存活率差異，作為金目鱸加工副產物之細胞毒性分析。

1.原理：

MTT 為一種水溶性黃色的化合物，它可被活細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶 (Succinate dehydrogenase; SDH)作用，將其 Tetrazolium 成分轉為不可溶性 Formazan 藍紫色結晶，再藉由二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide; DMSO)有機溶劑將紫色結晶溶解成紫色液體，藉由 ELISA reader 測定吸光值。吸光值代表 Formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比，因此 MTT assay 可作為細胞存活率的指標。



圖四、MTT 分析法原理 (Kamiloglu et al., 2020)

2.步驟：

- (1)參考 Gao et al., 2021 作法，將 RAW264.7 細胞以 1×10^6 cells/well 之密度培養於 96 孔盤中培養 24 小時，使細胞貼附盤。
- (2)移除培養基，根據實驗設計在培養基中加入金目鱸加工副產物水解後胜肽 0、0.1、0.25、0.5、1、5、10、20 mg/mL，與細胞共同培養 24 小時。每個組別進行 6 重複之分析。
- (3)加入 $20 \mu\text{L}$ 0.5% MTT 試劑，放入細胞培養箱避光靜待 4 小時移除培養基。
- (4)加入 $200 \mu\text{L}$ DMSO，將 96 孔盤使用錫箔紙避光以震盪器 50rpm 振盪 10 分鐘，使紫色結晶物溶解，並使用全波長酵素免疫分析儀在波長 570 nm 測定其吸光值。
- (5)細胞存活率計算公式如下。

$$\text{Viability (\%)} = (\text{Mean OD}_{\text{sample}} / \text{Mean OD}_{\text{blank}}) \times 100$$

OD_{sample}：樣本的吸光值

OD_{blank}：空白組的吸光值

(四) 金目鱸之加工副產物水解後胜肽之胺基酸組成分分析

本試驗以高效能液相層析法 (High performance liquid chromatography; HPLC)，進行金目鱸之加工副產物水解後胜肽之胺基酸組成分分析。

1. 酸水解與甲酸水解

樣本脫脂凍乾精秤 19.5 mg 放入安瓶中，加入 200 μ L Performic acid (30% H_2O_2 與 Formic acid 比例為 1 : 9)，放入冰箱氧化 24 小時，氧化後加入 300 μ L 溴化氫 (Hydrogen bromide) 後，放置於有 NaOH 的真空乾燥皿中，接著將內部空氣抽出後置於 70°C 烘箱中乾燥，乾燥後完成後樣本加入 1mL 6N HCl，將安瓶注入氮氣清洗排除內部空氣，接著以噴燈加熱安瓶口再以鑷子封瓶，放入 105°C 烘箱中水解 24 小時。水解完成後取出並將安瓶放置室溫冷卻，隨後切開瓶口將安瓶放置於有 NaOH 的真空乾燥皿中，接著將內部空氣抽出後置於 70°C 烘箱中乾燥，其中要定時將吸收水分之 NaOH 進行更換，直到安瓶內液體完全乾涸。隨後加入 1mL 0.001N HCl 進行回溶混勻，並以針筒過濾器 (0.22 μ m PVDF 濾膜) 進行過濾取得樣本濾液。樣本濾液與磷苯二甲醛 (o-Phthalaldehyde; OPA) 藥劑等量混合後，以高效能液相層析儀 (HPLC) 進行胺基酸含量分析。

2. 鹼水解 (分析色胺酸)

將樣本精秤 6mg (± 0.1 mg) + 1mL 4N NaOH + 150 μ L 5-methyl-tryptophan (16mg/100mL) 內標。充氮氣約 15-30 秒後將安瓶封管，放置 100°C 烘箱中 18 小時，取至室溫放涼 30 分鐘，需放置冰上存放，使用 HCl 調整 pH 值至 6.5，並且使用 0.1M sodium borate (pH 9.0) 定量至 8mL 使用離心機 10,000 \times g 離心 4 分鐘，並使用針筒過濾器 (0.22 μ m PVDF 濾膜) 進行過濾取得樣本濾液，以高效液相層析儀 (HPLC) 進行色胺酸分析。

3. 流洗條件

Mobile phase :

A 相 : 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)

B 相 : acetonitrile

Condition :

- (1) column : 250×4 mm, 5 μ m.
- (2) 管柱溫度 : 32°C.
- (3) Sample inject : 20 μ L.
- (4) Excitation/emission : 280/340nm.

表二、移動相條件

Time	Flow (mL/min)	A 相 (水相)	B 相 (Acetonitrile)
Prerun	0.5	100%	0%
20.00	0.5	30%	70%
21.00	0.5	0%	100%
25.00	0.5	0%	100%
30.00	0.5	100%	0%

(五) 金目鱸加工副產物水解後胜肽之純化分子篩

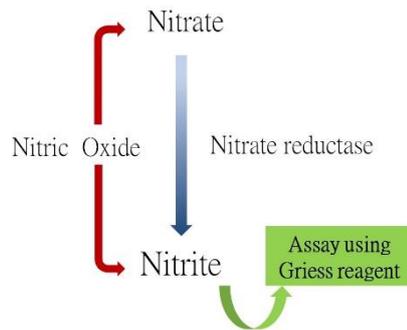
將水解後胜肽分別使用不同孔徑之分子篩離心管，包括 50kDa、30kDa、10kDa 及 5kDa 進行分離，以獲得不同分子量大小之胜肽。離心使用 1,500rpm、4°C 離心 10 分鐘，依序離心，將水解後胜肽分成 >50kDa、30~50kDa、10~30kDa、5~10kDa 及 <5kDa，分離後置於 -20°C 保存，並使用凍乾機進行凍乾，凍乾完成後保存在 -20°C 冰箱內，供進一步的實驗使用。

(六) 一氧化氮 (NO) 自由基抑制試驗

一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 自由基為細菌內毒素感染時重要發炎媒介物質，因此本試驗設計為利用小鼠之巨噬細胞 RAW264.7 經由脂多醣 (Lipopolysaccharide; LPS) 刺激來模擬發炎，藉由分析金目鱸加工副產物水解後胜肽抑制細胞釋放發炎媒介物質 - NO (Nitric oxide) 自由基產生能力，作為評估金目鱸加工副產物水解後胜肽抗發炎能力項目之一。

1. 原理：

一氧化氮其半衰期很短，在水溶液中則可轉變成硝酸鹽 (nitrate) 與亞硝酸鹽 (nitrite)。硝酸鹽可經由硝酸鹽還原酶 (nitrate reductase) 作用轉變成亞硝酸鹽，因此使用 Griess reagent 測量 NO 穩定的產物 nitrite 來間接地表示 NO 釋放量。



圖五、一氧化氮 (NO) 自由基抑制試驗原理 (Sun et al., 2003)

2. 步驟

- (1) 參考(Gao et al.,(2021)方法，將 RAW264.7 小鼠巨噬細胞定量至 1×10^6 cells/ mL，並加入至細胞 6 孔盤中，使細胞貼附 24 小時之後，移除細胞培養基。
- (2) 依組別不同，分別加入不同濃度及分子量之金目鱸水解後胜肽於培養基，與細胞共同培養 8 小時之後，再加入含有 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 之培養基進行刺激 24 小時。每個組別進行 6 重複之分析。
- (3) 使用抽取 $10 \mu\text{L}$ 上清液以及 $90 \mu\text{L}$ NO buffer 在 96 孔盤中進行混合，並在每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 稀釋標準品以及 $30 \mu\text{L}$ buffer 進行混合，在每孔加入 $10 \mu\text{L}$ 的硝酸還原酶 (Nitrate reductase enzyme preparation) 以及 $10 \mu\text{L}$ 的硝酸還原酶輔因子 (Nitrate reductase cofactor preparation)，在室溫下避光反應 1 小時後，加入 $50 \mu\text{L}$ Griess reagent I 後再加入 $50 \mu\text{L}$ Griess reagent II 反應 10 分鐘後，使用螢光光譜儀在波長 540nm 進行測定其 Nitrite 含量。標準曲線則使用一氧化氮試劑盒中的 Nitrite Standards 以等倍稀釋作為標準曲線，

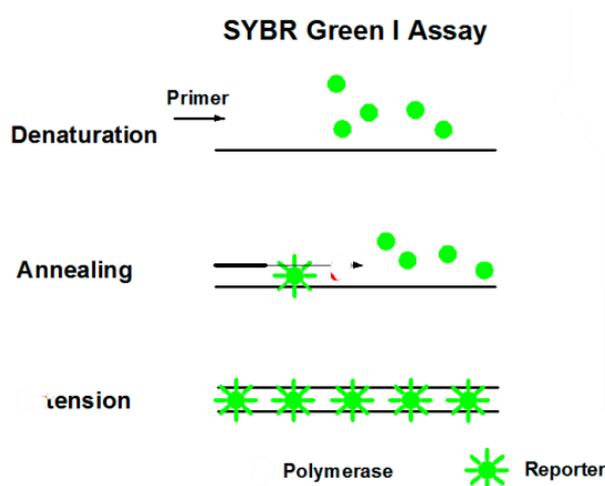
(七) 細胞發炎前期(Proinflammatory)及抗炎症(Anti-inflammatory)細胞激素 mRNA 表現量

當病菌入侵時，血液中單核球會穿過組織並分化成巨噬細胞，這些被激活巨噬細胞會分泌促發炎前期細胞激素如 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 及 $\text{IL-1}\beta$ 來誘導發炎反應，以加速清除入侵病原體。此外，巨噬細胞也會分泌抗炎症細胞激素如 IL-10 及 IL-12 來抑制過度發炎反應，藉此維持免疫平衡。因此本試驗設計分為兩組，一組以金目鱸水解後胜肽處理 RAW 264.7 細胞後，藉由 Q-PCR 測定抗炎症細胞激素 IL-10 及 IL-12 mRNA 表現；另一組則先以金目鱸水解後胜肽處理 RAW 264.7 細胞後，再加入 LPS 刺激來模擬發炎，再以 Q-PCR 測定細胞發

炎前期細胞激素 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表現量，作為評估金目鱸加工副產物水解後胜肽抗炎症能力項目之一。

1.原理：

此次採用 SYBR Green 即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time quantitative polymerase chain reaction; Q-PCR)進行 mRNA 相對定量分析。其原理是利用，PCR 過程中，以特異性引子對增幅特異性基因序列，藉由 SYBR Green I 僅會和雙股 DNA 進行結合並放出螢光特性來偵測每個循環(cycle)所釋放出的螢光強度回推樣本含量而達到定量目的。



圖六、SYBR Green 即時定量聚合酶連鎖反應原理 (Cao et al., 2022)

2.步驟：

- (1)將 RAW264.7 小鼠巨噬細胞定量至 $1 \times 10^6 / \text{mL}$ 並加入至 6 孔盤中，使細胞貼附 24 小時之後移除培養基。
- (2)以最佳抑制 NO 產生之分子量及濃度的金目鱸水解後胜肽添加於培養基培養 24 小時後，進行 IL-10 及 IL-12 mRNA 表現量測定；另一組則以最佳抑制 NO 產生之分子量及濃度的金目鱸水解後胜肽添加於培養基培養 8 小時後，再加入 $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ LPS 於細胞培養基共同培養 24 小時後，測定 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表現量。

- (3)將上述兩組細胞收集後，以 Ultraspectm RNA 套組(Biotechx, Houston, TX, USA)進行 RAW264.7 小鼠巨噬細胞核糖核酸 (RNA)萃取，最後使用分光光度計波長 260/280 測定樣本之 RNA 濃度，保存在-20°實驗冰箱供進一步後續實驗使用。
- (4)依 M-MuLV Reverse Transcriptase 套組 (Protech Technology Enterprise CO, Ltd)說明書進行互補去氧核糖核酸(Complementary deoxyribonucleic acid；cDNA)合成。
- (5)以 SYBR Green 即時定量聚合酶連鎖反應進行基因相對表現量之分析，參考 Chiu et al., (2021)即時定量聚合酶連鎖反應試驗方法，首先將 cDNA 回溶並混勻後，於 96 孔盤中加入 2 μ L (10 ng cDNA)互補去氧核糖核酸樣本、10 μ L 2 \times SYBR Green 以及 0.8 μ L primer (F)、0.8 μ L primer (R) (表三)，再加入 DEPC 水將體積定量到 20 μ L，最終濃度為 10ng，以即時定量聚合酶連鎖反應分析儀 (StepOne™ Real-Time PCR System,Applied Biosystems™)中分析(表四)。每個組別進行 6 重複之分析，並使用 β -actin 基因當作內控基因(Internal control)，之後依據 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法 (Livak and Schmittgen, 2001)計算各組基因之相對表現量。

表三、即時定量聚合酶連鎖反應之引子序列 (Xie et al., 2019)

Gene	Primers	Sequences (5' to 3')
β -actin	β -actin-F	ACTCTTCCAGCCTTCCTTCC
	β -actin-R	CGTACAGGTCTTTGCGGATG
IL -6	IL -6-F	AGTCCTGATCCAGTTCCTGC
	IL -6-R	CTACATTTGCCGAAGAGCCC
IL -1 β	IL -1 β -F	TCTGTCATTCGCTCCCACAT
	IL -1 β -R	AGAGAGCACACCAGTCCAAA
TNF- α	TNF- α -F	GTCAACCTCCTCTCTGCCAT
	TNF- α -R	CCAAAGTAGACCTGCCCAGA
IL -10	IL -10-F	GTTCTTTGGGGAGCCAACAG
	IL -10-R	GCTCCCTGGTTTCTCTTCCT
IL -12	IL -12-F	AATGTTCCCATGCCTTCACC
	IL -12-R	CCAATGGTAAACAGGCCTCC

表四、即時定量聚合酶連鎖反應反應條件

Holding stage	95°C	3 minute	1 cycle
Cycling stage	95°C	30 second	40 cycle
	60°C	20 second	
Melt curve stage	95°C	15 second	1 cycle

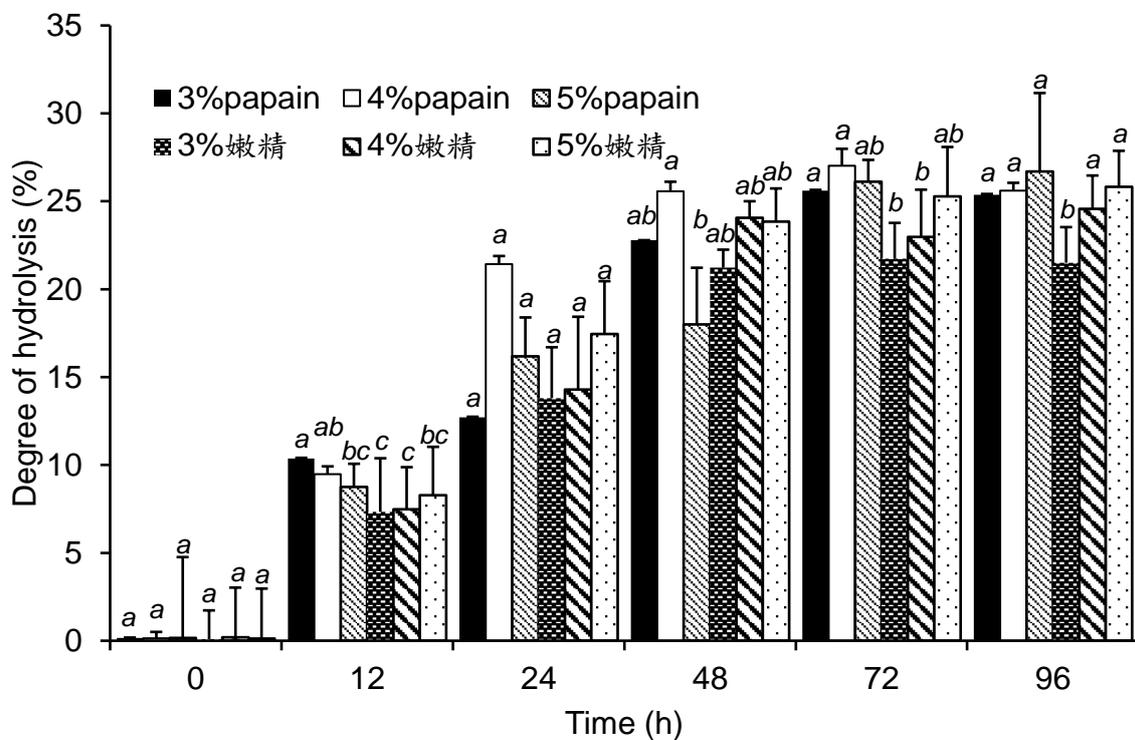
(八) 統計分析

此次實驗之數據使用 SAS 統計軟件 (SAS/PC version, SAS Institute, Cary, CA, USA) 計算平均數 (Mean) 以及標準誤差 (Standard error, S.E.)，利用單因子變異係數 (ANOVA, Analysis of Variance) 與鄧肯多變域分析 (Duncan's New-multiple Range Test) 來比較各組間差異之顯著性， $p < 0.05$ 被認定具有顯著差異。

肆、研究結果

一、金目鱸之加工副產物—魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉之最佳水解條件

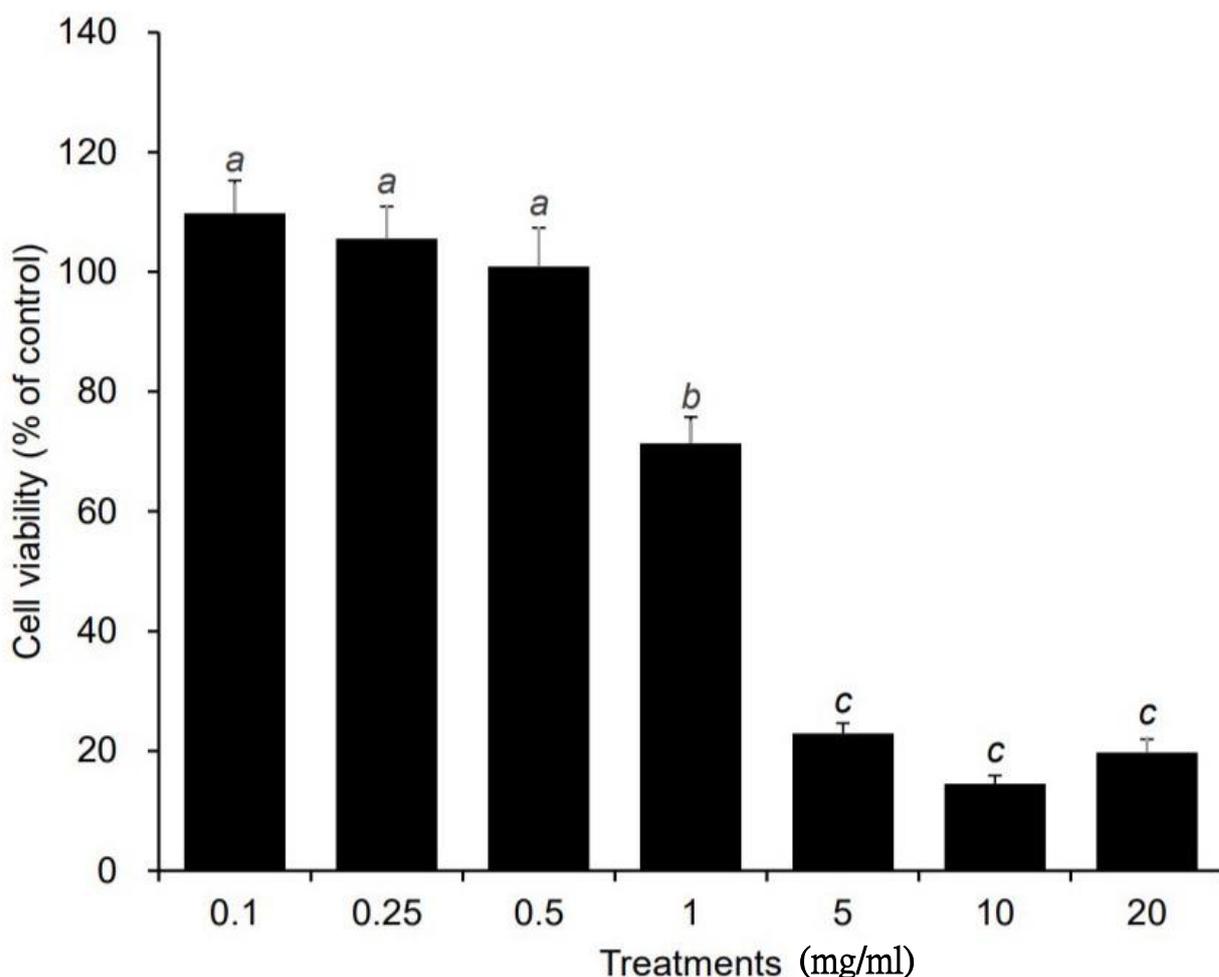
為確立金目鱸加工副產物之最佳水解條件，本試驗以不同濃度木瓜蛋白酶 (Papain)及市售嫩精進行金目鱸之加工副產物水解，比較此兩種水解酵素於不同作用時間之水解率，探討最佳水解酵素種類及作用時間。實驗結果顯示，4%木瓜蛋白酶水解 48 小時後具有最佳水解率，在 72 小時以及 96 小時水解率則無明顯提高(圖七)。因此後續的實驗將以 4%木瓜蛋白酶水解 48 小時，做為金目鱸加工副產物之水解後胜肽製備的條件。



圖七、金目鱸加工副產物經木瓜蛋白酶及嫩精處理後，於 0、12、24、48、72 及 96 小時後的水解率。數據為 6 個樣本的平均值±標準差，不同字母表示相同時間點，各組別區間具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

二、金目鱸加工副產物水解後胜肽之細胞毒性分析

為瞭解金目鱸加工副產物水解後胜肽是否具有細胞毒性，本試驗採用 MTT assay 分析比較不同濃度金目鱸加工副產物水解後胜肽處理 RAW264.7 細胞後之細胞存活率，以做為後續實驗使用濃度之參考。結果顯示添加 0.1、0.25、0.5 mg/mL 金目鱸加工副產物水解後胜肽其細胞存活率分別為 109.8%、105.6%以及 100.9%，但當濃度增加至 1 mg/mL 時，細胞存活率下降到 71.3%，且濃度高於 5 mg/mL 細胞存活率甚至低於 30%以下 (圖八)，因此本實驗後續試驗將選擇 0.5 mg/mL 以下的濃度進行。



圖八、金目鱸副副產物水解後胜肽之細胞毒性分析。添加濃度分別為 0.1、0.25、0.5、1、5、10 及 20 mg/mL。數據為 6 個樣本的平均值±標準差，不同字母表示組別間具有顯著差異 ($p<0.05$)。

三、金目鱸加工副產物水解後胜肽之胺基酸分析

胜肽為數個胺基酸經共價鍵結組成之聚合物，因此胺基酸組成種類、組成比例與排序可決定此胜肽的特性。此次金目鱸加工副產物水解後胜肽之胺基酸分析顯示，必需胺基酸有 Phenylalanine (1.55%)、Valine (2.19%)、Threonine (1.82%)、Isoleucine (1.89%)、Leucine (3.18%)、Methionine (10.12%)、Lysine (2.85%)、Arginine (3.07%)、Histidine (0.8%)及 Tryptophan (0.29%)；而非必需胺基酸則有 Aspartate (4.19%)、Glutamic acid (7.46%)、Serine (1.48%)、Glycine (5.53%)、Alanine (4.51%)及 Tyrosine (1.24%)。胺基酸含量為 52.17%，其中疏水性胺基酸佔總量的 47.86% (表五)。

表五、金目鱸加工副產物水解後胜肽之胺基酸含量。

水解後胺基酸含量(%)	
必需胺基酸	
Phenylalanine (Phe)	1.55
Valine (Val)	2.19
Threonine (Thr)	1.82
Isoleucine (Ile)	1.89
Leucine (Leu)	3.18
Methionine (Met)	10.12
Lysine (Lys)	2.85
Arginine (Arg)	3.07
Histidine (His)	0.8
Tryptophan (Trp)	0.29
非必需胺基酸	
Aspartate (Asp)	4.19
Glutamic acid (Glu)	7.46
Serine (Ser)	1.48
Glycine (Gly)	5.53
Alanine (Ala)	4.51
Tyrosine (Tyr)	1.24
Total	52.17

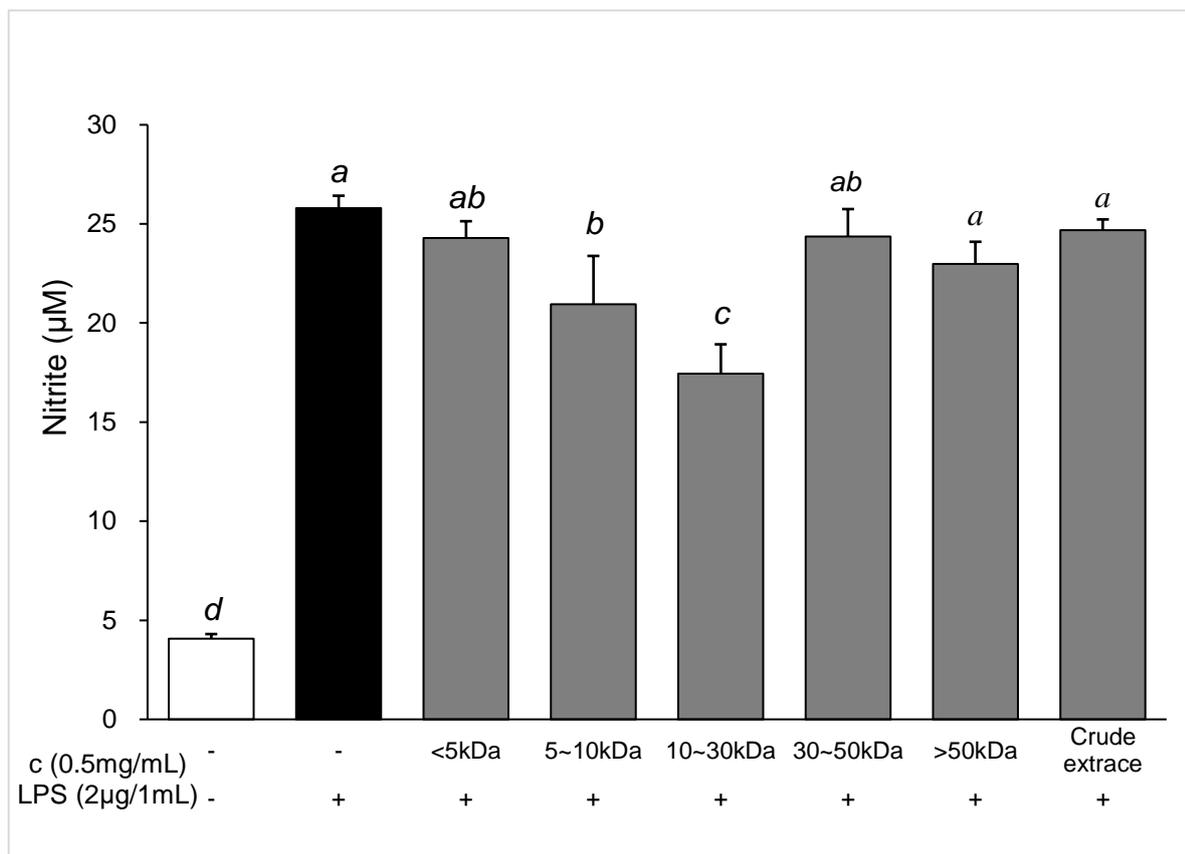
疏水性胺基酸：Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Pro, Tyr

帶正電荷胺基酸：Arg, Lys, His

四、一氧化氮 (NO) 自由基生成抑制試驗

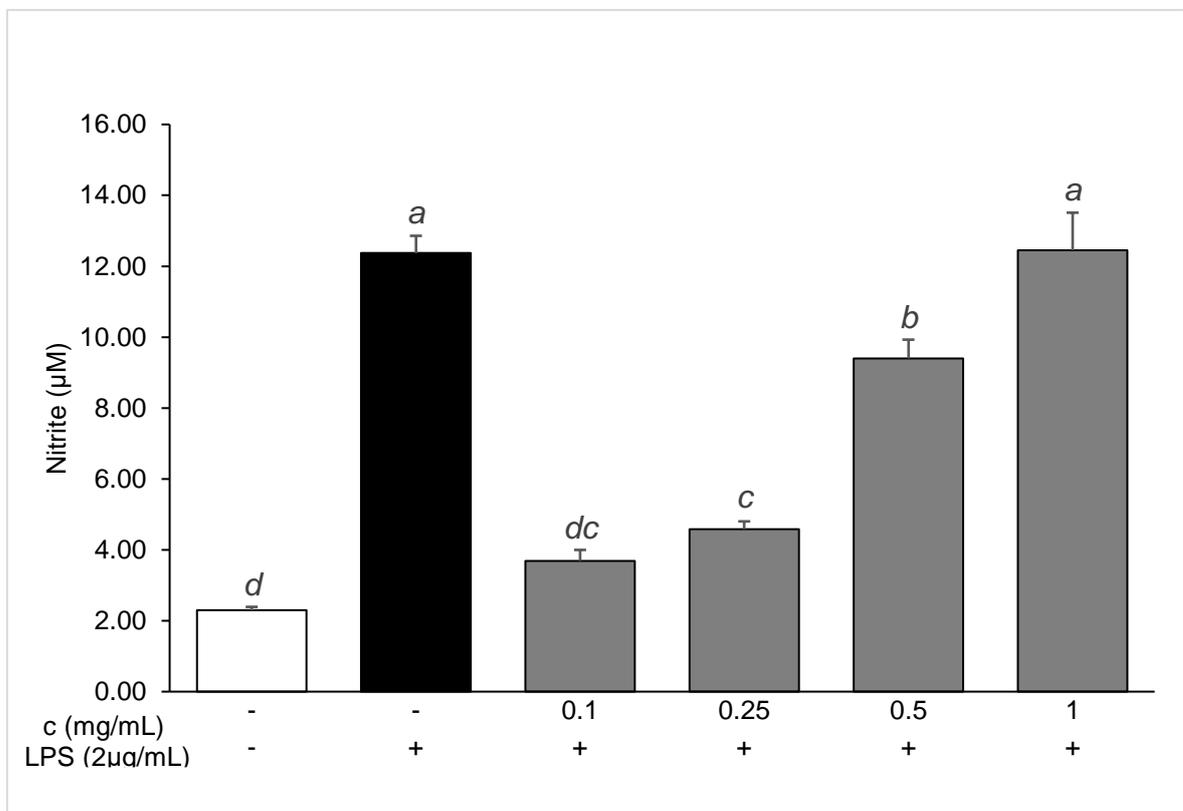
本試驗設計為利用小鼠之巨噬細胞 RAW 264.7 加入水解後胜肽共同培養後，再加入 LPS 刺激來模擬發炎，藉以分析金目鱸加工副產物水解後胜肽抑制細胞釋放發炎媒介物質—NO 自由基產生能力，作為評估金目鱸水解後胜肽抗發炎能力項目之一。由於 NO 其半衰期很短，在水溶液中則可轉變成硝酸鹽 (Nitrate) 與亞硝酸鹽 (Nitrite)。硝酸鹽可經由硝酸鹽還原酶 (Nitrate reductase) 作用轉變成亞硝酸鹽，因此本試驗測量 NO 穩定的產物亞硝酸鹽 (Nitrite) 來間接地表示 NO 釋放量。

首先確認何種分子量大小之水解後胜肽具有最佳抗發炎效果，因此根據水解後胜肽之細胞毒性分析結果，添加 0.5 mg/mL 之 >50 kDa、30~50 kDa、10~30 kDa、5~10 kDa、<5 kDa 之金目鱸加工副產物水解後胜肽於 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞培養基共同培養 8 小時之後，再加入含有 2 μ g / mL LPS 之培養基進行刺激 24 小時。結果觀察到單純僅使用 LPS 刺激組別之亞硝酸鹽濃度上升至 25.80 \pm 0.63 μ M，而在 5~10kDa 以及 10~30kDa 組別的亞硝酸鹽濃度有明顯下降的趨勢，其中以 10~30kDa 組別的效果最佳，其亞硝酸鹽濃度分別為 20.95 \pm 2.44 μ M 以及 17.44 \pm 1.48 μ M，相對於 LPS 組分別下降了 4.85 μ M 和 8.36 μ M (圖九)，但當水解後胜肽分子量再提升時，則亞硝酸鹽濃度與 LPS 組並無顯著性差異。



圖九、不同分子量之金目鱸加工副產物水解後胜肽對 RAW264.7 小鼠巨噬細胞一氧化氮自由基抑制之影響。Control 組為無添加脂多醣及水解後胜肽組別，LPS 組為只添加脂多醣刺激組別，而金目鱸加工副產物水解後胜肽處理組依序為添加 0.5 mg/mL 之 <5kDa、5~10kDa、10~30kDa、30~50kDa 及 >50kDa 水解後胜肽。數據為 6 個樣本平均值±標準差，不同字母表示組別區間具有顯著差異 ($p<0.05$)。

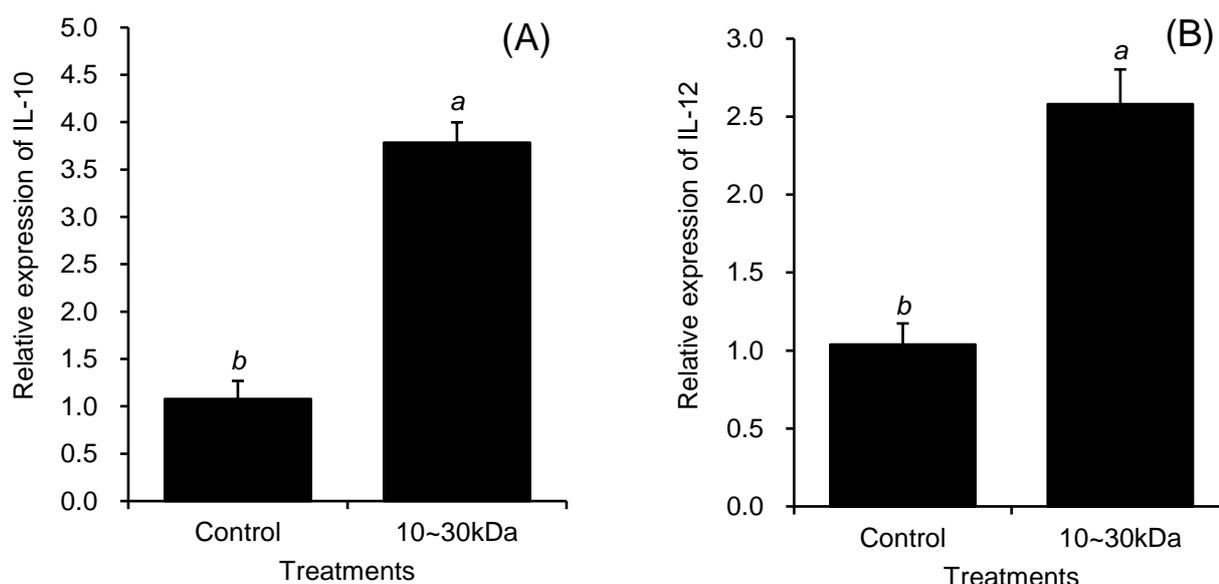
為進一步瞭解分析何種濃度之 10~30kDa 金目鱸加工副產物水解後胜肽具有最佳的抗發炎效果，分別使用了 0.1、0.25、0.5 和 1.0 mg/mL 之 10~30kDa 水解後胜肽處理 RAW264.7 小鼠巨噬細胞，再以 LPS 刺激。結果顯示，在 1.0 mg/mL 水解後胜肽組中，其亞硝酸鹽濃度與 LPS 組並無顯著差異，代表 1.0 mg/mL 之 10~30kDa 水解後胜肽並無抗發炎效果；但於較低濃度之 0.1、0.25 及 0.5 mg/mL 之組別，其亞硝酸鹽濃度與 LPS 組別相比，分別降低了 8.68、7.79 以及 2.97 μM ，具有顯著性差異(圖十)。依據上述實驗結果，以 LPS 刺激來模擬發炎之細胞模式下，0.1 mg/mL、0.25 mg/mL 及 0.5mg/mL 之 10~30kDa 之金目鱸加工副產物水解後胜肽可有效降低亞硝酸鹽濃度，也代表其可顯著抑制釋放發炎媒介物質 -NO 自由基產生能力而具有抗發炎能力。



圖十、不同濃度之 10~30kDa 金目鱸加工副產物水解後胜肽對 RAW264.7 小鼠巨噬細胞一氧化氮自由基抑制之影響。對照組無添加脂多醣及水解後胜肽，LPS 組只添加脂多醣刺激組別。數據為 6 個樣本平均值±標準差，不同字母表示組別區間具有顯著差異 ($p<0.05$)。

五、細胞之發炎前期及抗發炎細胞激素 mRNA 表現

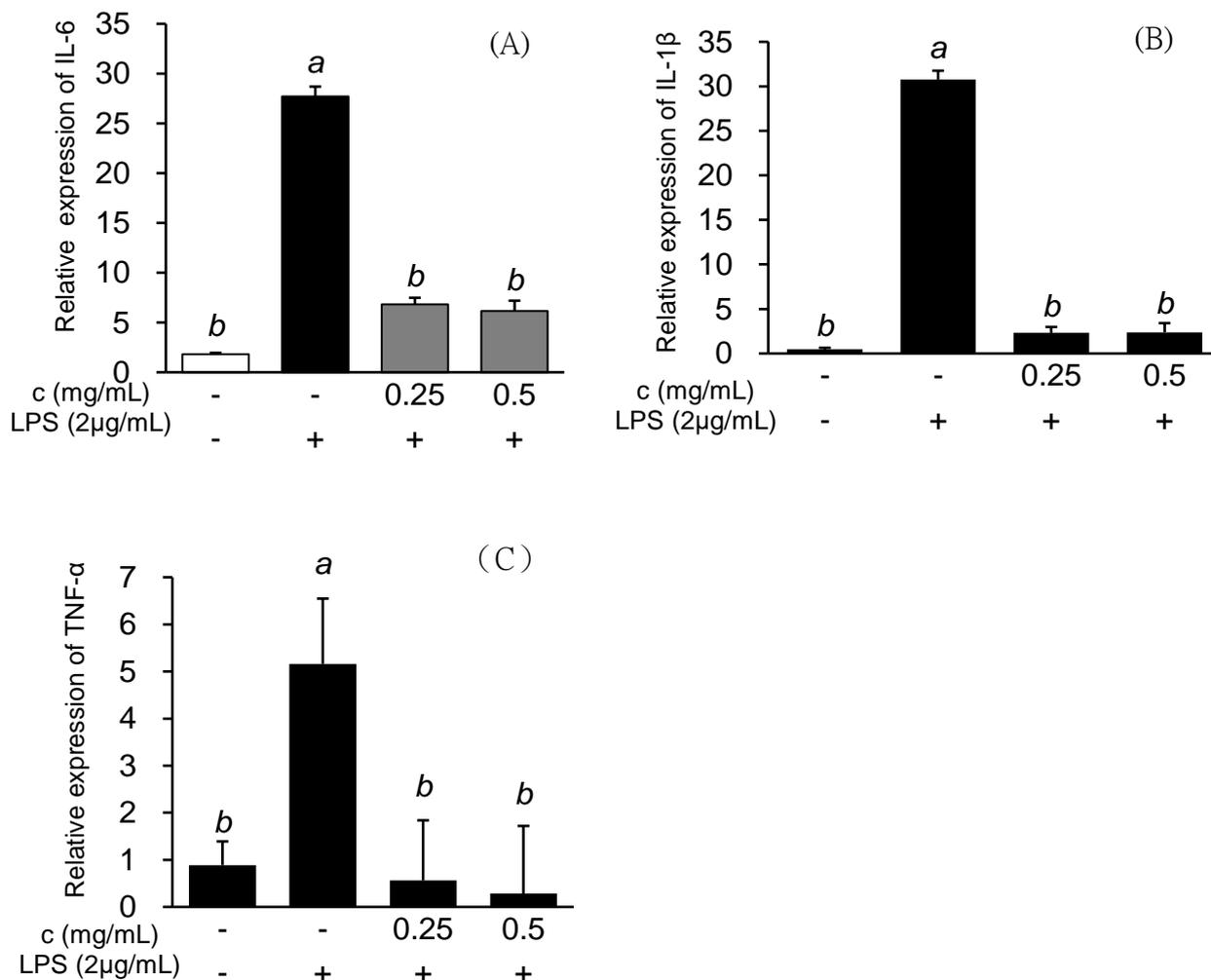
IL-10 及 IL-12 為調節細胞炎症反應的抗發炎細胞激素，因此以金目鱸副產物水解後胜肽添加於細胞培養基中共同培養，用 LPS 刺激來模擬發炎反應並分析 IL-10 及 IL-12 mRNA 表現量，來評估其抗發炎能力。以 0.25 mg/mL 之 10~30kDa 金目鱸加工副產物水解後胜肽添加於培養基共同培養 24 小時後，RAW264.7 小鼠巨噬細胞之 IL-10 及 IL-12 mRNA 的表現量皆明顯提高，且相較於對照組具有顯著性差異($p<0.05$) (圖十一)。顯示金目鱸加工副產物水解後胜肽，確實可促進巨噬細胞分泌抗發炎因子-IL-10 及 IL-12 來調節細胞炎症反應。



圖十一、添加 0.25 mg/mL 10~30kDa 金目鱸加工副產物水解後胜肽於培養基中培養 24 小時後 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞(A) IL-10 以及(B) IL-12 mRNA 表現量。數據為 6 個樣本平均值±標準差，不同字母表示組別區間具有顯著差異 ($p<0.05$)。

本試驗利用 LPS 刺激 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞來模擬發炎反應，分析其前炎症細胞激素 -IL-6、IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表現量，來評估 10~30kDa 金目鱸加工副產物水解後胜肽抗的抗發炎能力。結果發現將 0.25 mg/mL 及 0.5 mg/mL 的 10~30kDa 金目鱸加工副產物水解後胜肽添加於培養基共同培養 8 小時，再以 LPS 刺激 24 小時後，其 IL-6 mRNA 表現量顯著低於

僅使用 LPS 刺激組(圖十二 A)；於 IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表現也都有相類似的結果(圖十二 B、C)。此實驗結果證明金目鱸加工副產物水解後胜肽可有效抑制 LPS 誘發之前炎症細胞激素-IL-6、IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表現量，而具有抑制炎症反應能力。



圖十二、 10~30kDa 金目鱸加工副產物水解後胜肽對 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞前發炎細胞激素(A) IL-6、(B) IL-1 β 以及(C) TNF- α mRNA 相對表現量。數據為 6 個樣本平均值 \pm 標準差，不同字母表示組別區間具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

伍、討論

一、金目鱸之加工副產物—魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉之最佳水解條件

酵素之催化始於酵素與受質之專一性結合，所以相同蛋白質經不同酵素作用後，產生具生物活性胜肽種類也不同(Wang et al., 2013)。因此酵素種類選擇，對水解蛋白質後所產生生物活性胜肽之抗炎症能力影響扮演極為重要角色。(Saisavoey et al.,(2019)分別使用內切蛋白水解酵素(Alcalase)、風味蛋白酵素(Flavourzyme)、中性蛋白酵素(Neutrase) 及木瓜蛋白酶(Papain)等四種不同蛋白質酵素水解鮭魚骨頭，結果發現使用木瓜蛋白酶其所產生生物活性胜肽其一氧化氮(NO)自由基清除能力為最高。由於本實驗研究材料為金目鱸加工副產物—魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉，其中骨頭佔極大比例，因此本實驗選定木瓜蛋白酶及含有木瓜蛋白酶之嫩精，作為金目鱸加工副產物之蛋白質水解酵素。

除蛋白質水解酵素種類外，酵素／受質比例、pH 值、溫度及酵素水解時間皆會影響水解率(Xiang et al., 2023)。本實驗以木瓜蛋白酶最佳水解條件 (pH 5.5 ± 0.5 ， 55°C)(Babalola et al., 2023)下，進行金目鱸加工副產物水解，以探討最佳水解酵素種類及作用時間。實驗結果顯示，4%木瓜蛋白酶水解 48 小時後具有最佳水解率，在 72 小時以及 96 小時水解率則無明顯提高。

本次實驗的最佳水解率 25.56%相較於 Gao et al.,(2021)使用木瓜蛋白酶用於鱈魚肌肉水解 ($32.58 \pm 0.64\%$)的結果來的稍低，推測可能與選擇的魚種不同且此次實驗材料除殘留金目鱸魚肉外尚有魚頭、魚骨、內臟有關。

二、金目鱸加工副產物水解後胜肽之細胞毒性分析

此次細胞毒性分析結果顯示添加 0.1、0.25、0.5 mg/mL 金目鱸加工副產物水解後胜肽其細胞存活率分別為 109.8%、105.6%以及 100.9%，但當濃度增加至 1 mg/mL 時，細胞存活率下降到 71.3%，且濃度高於 5 mg/mL 時細胞存活率甚至低於 30%。此結果與(Gao et al., 2021)研究結果相似，其研究發現使用胰蛋白酶(trypsin)水解鱈魚肌肉所得之水解後胜肽，添加 0.125、0.25、0.5 及 1.0 mg/mL 濃度於 RAW264.7 細胞後，其細胞存活率皆顯著高於對照組且皆高於 100%；但當添加濃度提高到 2.0 mg/mL，則細胞存活率下降至 91%。此實驗結果證明，當添加魚類水解後胜肽於較高濃度時即具有細胞毒性。

三、金目鱸加工副產物水解後胜肽之胺基酸分析

研究指出含有較多疏水性胺基酸，如 phenylalanine、leucine、tyrosine、glycine 及 tryptophan 之胜肽，其可經由(1)增加細胞膜運輸通透性進而破壞炎症路徑級聯反應(inflammatory pathway cascades)；(2)對鈣離子具有較高結合能力，而破壞鈣訊息(Ca^{2+} signaling)進而使炎症反應扮演重要角色—NF- κ B 路徑及前炎症細胞激素產生受阻；(3)清除脂肪來源自由基，而具有抗發炎功能 (Kemp et al., 2021)。

此外亦有研究指出 Aspartate 以及 Glutamic acid 其可扮演電子捐贈者(electron donor)，可緩解氧化壓力(oxidative stress)進而可減少活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)所誘發之炎症發生(Gao et al., 2021)。

本次實驗金目鱸加工副產物水解後胜肽中，疏水性胺基酸含量為 24.97%，佔總量的 47.86%。此外，Aspartate 以及 Glutamic acid 含量分別為 4.79%以及 7.46%，佔總胺基酸含量的 12.25% (表四)，根據金目鱸加工副產物水解後胜肽的胺基酸組成，推測金目鱸加工副產物水解後胜肽應具有良好的抗發炎效果。

四、一氧化氮 (NO)自由基抑制試驗

脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)為葛蘭氏陰性菌細胞壁成份，當葛蘭氏陰性菌死亡後細胞壁被溶解而被釋放出來，因此又被稱為內毒素(endotoxin)。LPS 可刺激動物體免疫細胞釋放炎症相關細胞激素，如 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6，與其他炎症媒介物質，如一氧化氮、趨化因子、組織胺、與前列腺素(prostaglandin; PG)等產生進而導致炎症產生(Dinarello, 2000)。因此 LPS 添加於巨噬細胞培養基中，作為誘發細胞發炎模式，成為篩選(pre-screening)具抗炎症與抗氧化能力胜肽之重要體外試驗(*in vitro*)研究工具(Ahn et al., 2015; Saisavoey et al., 2019; Gao et al., 2021, Xing et al., 2023)。

當巨噬細胞受到 LPS 或 TNF- α 刺激時，會促使巨噬細胞產生誘發型一氧化氮合成酶(inducible NO synthase, iNOS)進而催化左旋精胺酸(L-arginine)氧化作用，進而產生大量 NO(Saisavoey et al., 2019)。因此藉由評估 NO 生成量，可用以間接評估發炎狀態。NO 生成量可藉由添加 Griess 試劑經比色法(colorimetric)即可評估出來，相較其他抗炎症能力分析試驗

較為簡便，因此 NO 自由基生成抑制試驗常為評估物質是否具有抗炎症能力初步篩選試驗(Ahn et al., 2015; Saisavoey et al., 2019 ; Gao et al., 2021, Xing et al., 2023)。

本實驗以 LPS 刺激 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞做為模擬發炎反應之細胞模式，再利用 NO 自由基生成抑制試驗初步篩選何種分子量大小及濃度之水解後胜肽具有最佳抗炎症能力。結果發現 0.25 及 0.5 mg/mL 10~30kDa 之金目鱸加工副產物水解後胜肽，可顯著抑制 LPS 刺激 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞所產生的 NO 自由基而具有最佳抗炎症能力。根據上述結果，將以 0.25 及 0.5 mg/mL 10~30kDa 之金目鱸加工副產物水解後胜肽，進行細胞之發炎前期及抗發炎細胞激素 mRNA 表現分析。

五、細胞之發炎前期及抗發炎細胞激素 mRNA 表現

細胞激素為一種低分子量分泌蛋白質(< 40kDa)，主要扮演訊息傳遞功能，其可影響免疫細胞功能、分化與活性，於炎症級聯反應(cascading reaction)中扮演極為重要角色(Dinarello, 2000)。當炎症發生，巨噬細胞即會釋放大量 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 以增強免疫反應，因此上述細胞激素又稱為發炎前期細胞激素(pro-inflammatory cytokine)；此外為避免過度發炎而導致宿主傷害，免疫系統會釋放抗發炎細胞素(anti-inflammatory cytokine)，如 IL-10、IL-12，抑制過多發炎前期細胞激素釋放以避免過度炎症發生(Dinarello, 2000； Chung, 2001)。

先前研究指出，使用濃度為 0.75 mM 的鮭魚胸鰭副產物水解後胜肽於 RAW264.7 小鼠巨噬細胞培養基中，可顯著抑制 LPS 刺激 RAW264.7 小鼠巨噬細胞分泌 TNF- α 、IL-6 以及 IL-1 β 濃度(Ahn et al., 2015)。使用濃度為 1.25、2.5 及 5.0 μ g/ml 鮭魚骨頭之水解後胜肽於 RAW264.7 小鼠巨噬細胞培養基中，可顯著抑制 LPS 刺激 RAW264.7 小鼠巨噬細胞之 TNF- α 及 IL-6 mRNA 表現(Saisavoey et al., 2019)。於鱒龍魚相關研究發現，添加 0.5 mg/mL 的 < 3 kDa 鱒龍魚肌肉水解後胜肽也可顯著抑制 LPS 刺激 RAW264.7 小鼠巨噬細胞分泌 TNF- α 、IL-6 以及 IL-1 β 濃度(Gao et al., 2021)。本實驗使用 0.25 及 0.5 mg/mL 的 10~30kDa 金目鱸加工副產物水解後胜肽添加於 RAW264.7 小鼠巨噬細胞培養基共同培養 8 小時，再以 LPS 刺激 24 小時後，其 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表現量顯著低於僅使用 LPS 刺激組。此結果證明金目鱸加工副產物水解後胜肽與鮭魚胸鰭、鮭魚骨頭及鱒龍魚肌肉水解後胜肽相同，可藉由抑制 LPS 刺激

RAW264.7 小鼠巨噬細胞之 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 等前炎症細胞激素之 mRNA 表現而具有良好的抗發炎效果。

此外，以 0.25 mg/mL 之 10~30kDa 金目鱸加工副產物水解後胜肽添加於培養基共同培養 24 小時後，RAW264.7 小鼠巨噬細胞之 IL-10 及 IL-12 mRNA 的表現量皆明顯提高，且相較於對照組具有顯著性差異(p<0.05)。顯示金目鱸加工副產物水解後胜肽，確實可促進巨噬細胞分泌抗發炎因子-IL-10 及 IL-12 來調節細胞炎症反應。

根據上述結果證明金目鱸加工副產物水解後胜肽可藉由抑制 LPS 刺激 RAW264.7 小鼠巨噬細胞-TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 前炎症細胞激素之 mRNA 表現及促進 IL-10 及 IL-12 等抗炎症細胞激素 mRNA 的表現量而具有良好抗炎症能力。

陸、結論

- 一、實驗結果證實 4%木瓜蛋白酶水解金目鱸加工副產物 48 小時有最佳的水解率，且金目鱸加工副產物水解後胜肽濃度於 0.5 mg/mL 以下並不具有細胞毒性。
- 二、實驗結果證實 10~30kDa 之金目鱸加工副產物水解後胜肽，可顯著抑制 LPS 所刺激 RAW264.7 小鼠巨噬細胞釋放發炎媒介物質—NO 自由基產生及抑制前炎症細胞激素-IL-6、IL-1 β 及 TNF- α mRNA 表現量並可顯著提升 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞抗炎症細胞激素-IL-10 及 IL-12 mRNA 表現量。根據上述結果證明金目鱸加工副產物經 4%木瓜蛋白酶水解後胜肽具有良好抗發炎能力。
- 三、整體而言，本研究證實金目鱸加工副產物經 4%木瓜蛋白酶水解後胜肽具有良好抗發炎能力，可更進一步利用此結果開發出具生物功能之天然抗炎症物質並將其應用於慢性炎症治療上，有助提升金目鱸加工副產物經濟價值並減少加工後廢棄物產生。此研究方向及成果符合當前農業循環經濟及淨零排碳之農政重點發展方向。

柒、未來研究方向

- 一、本次研究初步證明金目鱸加工副產物經 4%木瓜蛋白酶水解後胜肽具有抗發炎能力，未來須進一步探討此水解後胜肽之抗炎症機轉，如 MAPK 及 NF- κ B 訊息傳遞路徑。
- 二、未來須進一步探討並分析具抗發炎功能胜肽之胺基酸序列，利用液相層析串聯式質譜儀 (LC/MS/MS) 分析 10~30kDa 水解後胜肽中的胜肽種類及其胺基酸序列，並逐一分析每一條胜肽抗發炎能力，以確認具最佳抗發炎能力之胜肽種類及其胺基酸序列。
- 三、於體外試驗(*in vitro*)雖已證明金目鱸加工副產物水解後胜肽具有抗發炎能力，但金目鱸加工副產物水解後胜肽實際運用於臨床上最大的挑戰為胃腸道的穩定性及吸收力。因此於未來需更進一步進行活體試驗(*in vivo*)，以 10~30kDa 的水解後胜肽餵食小鼠後分析其抗發炎效果，以確認金目鱸加工副產物水解後胜肽於臨床上應用可行性。

捌、參考文獻

周培文 (2020 年 12 月 16 日)。循環經濟讓海洋重生 漁業水產廢棄物再利用。漁業推廣，411，6-11。

廖順福 (2020 年 1 月 10 日)。嘉義鱸魚 金目閃耀七星。農訓雜誌，359 期。
<https://ntifotd.blogspot.com/2020/01/359.html?view=flipcard>

何書青、游鎮槐 (2018 年 1 月 20 日)。吃進金目鱸 高營養低脂肪。中國時報。
<https://www.chinatimes.com/newspapers/20180120002114-260114?chdtv>

黃美花 (2023 年 2 月 24 日)。炎症。台灣急診醫學通訊，6 期 e2023060107

Ahn C.B., Cho Y.S., & Je J.Y. (2015). Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 168, 151-156.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.112>

Babalola B.A., Akinwande A.I., Gboyega A.E., & Otunba A.A. (2023). Extraction, purification and characterization of papain cysteine-proteases from the leaves of *Carica papaya*. *Scientific African*, 19, e01538. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01538>

Bindu S., Mazumder S., & Bandyopadhyay U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, *180*, 114147-114168. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>.

Baker R.G., Hayden M. S., & Ghosh S. (2011). NF- κ B, inflammation and metabolic disease. *Cell Metabolism*, *13*, 11 – 22. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.008>.

Cao Y., Yu M., Dong G., Chen B., & Zhang B. (2022). Digital PCR as an emerging tool for monitoring of microbial biodegradation. *Molecules*, *25*, 706. <https://doi.org/10.3390/molecules25030706>

Chiu S.T., Chu T.W., Simangunsong T., Ballantyne R., Chiu C.S., & Liu C.H. (2021). Probiotic, *Lactobacillus pentosus* BD6 boost the growth and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via oral administration. *Fish & Shellfish Immunology*, *117*, 124-135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.024>

Chu Q.Q., Han Q., Chen B., & BAO B. (2020). Determination of free amino group content of protein using trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) method. *Food and Fermentation industries*, *4*, 275-279. <http://doi.10.13995/j.cnki.11-1802/ts.021275>

Chung F. (2001). Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: Interleukin-10, interleukin-12, interferon- γ . *Mediator of Inflammation*, *10*, 51-59. <https://doi.org/10.1080/09629350120054518>

Dinarello C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, *118*, 503-8. <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>

Esser N., Paquot N., & Scheen A.J. (2015). Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *24*, 283-307. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.974804>

Gao R., Shu W., Shen Y., Shen Y., Suna Q., Jin W., Li D., Li Y., & Yuan L. (2021). Peptide fraction from sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via MAPK and NF- κ B pathways. *Food Science and Human Wellness*, *10*, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.04.014>

Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., & Capanoglu E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, *1*, 332 – 349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>

Kemp D.C. & Kwon J. Y. (2021). Fish and shellfish-derived anti-inflammatory protein products: Properties and mechanisms. *Molecules*, *26*, 3225-3237. <https://doi.org/10.3390/molecules26113225>

Livak K.J., & Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, *25*, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Saisavoey T., Sangtanoo T., Reamtong O., & Karnchanatat A. (2019). Free radical scavenging and anti-inflammatory potential of a protein hydrolysate derived from salmon bones on RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*, 5112-5121. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9755>

Sun J., Zhang X., Broderick M., & Fein H. (2003). Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. *Sensors*, *3*, 276-284. <https://doi.org/10.3390/s30800276>

Wang B., Li L., Chi C.F., Ma J.H., Lo H.Y., & Xu Y.F. (2013). Purification and characterization of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. *Food Chemistry*, *138*, 1713-1719. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.002>.

Xiang E., Xue Q., Gao Q., Yu H., Wu M., Zho Z., Li Y., Wang S., Zhang J., & Dai L. (2023). Antioxidant peptides from edible aquatic animals: preparation method, mechanism of action, and structure-activity relationships. *Food Chemistry*, *404*, 134701-134716. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134701>

Xie Z., Wang Y., Huang J., Qian N., Shen G., & Chen, L. (2019). Anti-inflammatory activity of polysaccharides from *Phellinus linteus* by regulating the NF- κ B translocation in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules*, *129*, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.023>

【評語】 052203

1. 本研究確認金目鱸魚類之副產物的活性胜肽以及其體外抗發炎活性，實驗設計嚴謹、邏輯清晰，研究數據的分析與結果討論完整，成果報告之撰寫亦相當專業，口語報告清晰。
2. 本研究初步成果可提供未來再利用以及加值魚類廢棄物的一個參考方向。惟若能針對 10-30 kDa peptide 之胺基酸組成進行確認，並確認具生理功效之指標成分的定性及定量標準，將有利後續應用及商品化。

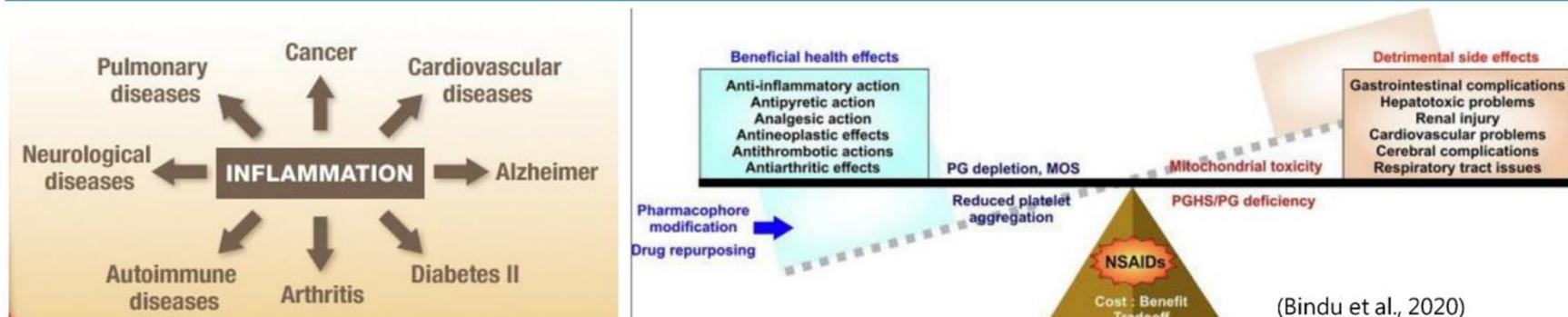
作品海報

金目鱸加工副產物水解後胜肽 之抗發炎能力分析

摘要

本研究以金目鱸(*Lates calcarifer*)加工副產物(含魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉)為研究材料，以不同水解酵素進行水解成為胜肽後，進行細胞毒性試驗及胺基酸組成分析，最後探究其抗炎症能力。結果發現以4%木瓜蛋白酶水解48小時後具有最佳水解率。該水解後胜肽濃度0.5mg/mL以下並不具有細胞毒性，其胺基酸組成以疏水性胺基酸為主，佔總量的47.86%。以分子篩進行胜肽初步分離，證實0.25及0.5mg/mL 10~30kDa之水解後胜肽，可顯著抑制LPS刺激RAW264.7小鼠巨噬細胞所產生的一氧化氮自由基及前炎症細胞激素-IL-6、IL-1 β 及TNF- α mRNA表現量；0.25 mg/mL 10~30kDa水解後胜肽亦可提升抗炎症細胞激素-IL-10及IL-12 mRNA表現。上述結果證明金目鱸加工副產物水解後胜肽具有良好的抗炎症能力。

壹、前言



- 研究發現鮭魚胸鰭及骨頭與鱒龍魚肌肉經胃蛋白酶或木瓜蛋白酶水解後之胜肽，可有效抑制炎症反應而具有抗炎症效果 (1,3,5)。
- 金目鱸為台灣大宗經濟養殖魚類。金目鱸通常是以冷凍魚片形式販售給家庭消費者，因此產生大量的**加工副產物**，如**魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉**，這些通常做為飼料原料或當作廢棄物直接丟棄。



貳、研究目的

- 分析金目鱸之加工副產物 - 魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉之**最佳水解條件**
- 分析金目鱸之加工副產物水解後胜肽之**細胞毒性**
- 分析金目鱸之加工副產物水解後胜肽之**胺基酸組成成分**
- 探究金目鱸加工副產物水解後胜肽之**抗炎症能力**

希望藉由此研究結果能開發安全且有效的天然抗炎症物質，也能更進一步提高金目鱸加工副產物的經濟價值並減少環境汙染，以達到循環經濟的目的。

參、研究方法

一、金目鱸水解後胜肽定性分析

加工副產物 - 魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉之最佳水解條件

加工副產物水解後胜肽之細胞毒性試驗

加工副產物水解後胜肽之胺基酸組成成分



二、金目鱸水解後胜肽之抗炎症能力分析

一氧化氮 (Nitric oxide; NO) 生成抑制試驗

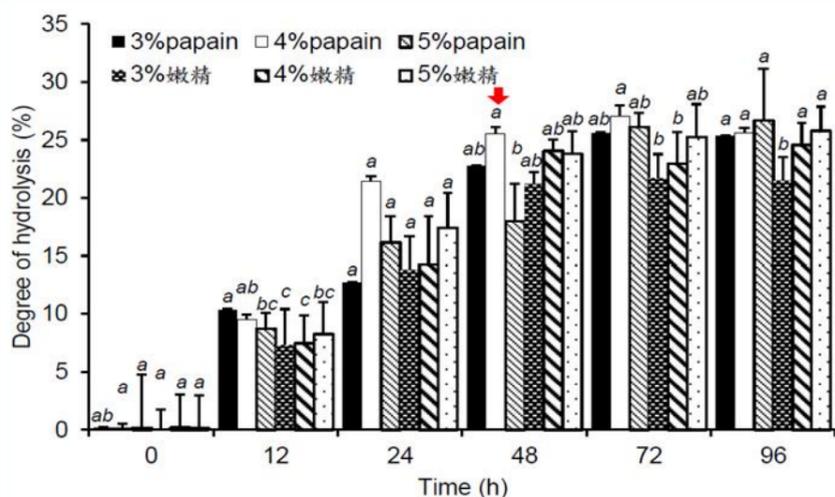
細胞之抗炎症 (Anti-inflammatory) 細胞激素mRNA表現

細胞之發炎前期 (Pro-inflammatory) 細胞激素mRNA表現

肆、結果與討論

一、金目鱸水解產物定性分析

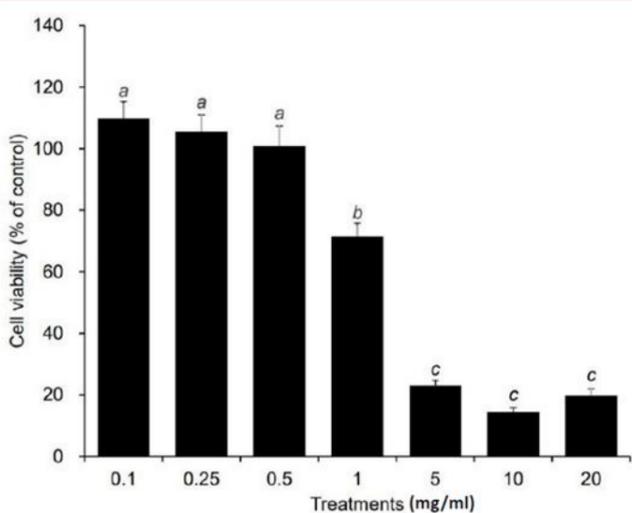
(一)加工副產物 - 魚頭、魚骨、內臟及殘餘肌肉之最佳水解條件



圖一、金目鱸加工副產物經木瓜蛋白酶及嫩精處理後於不同時間之水解率。數據為3個樣本的平均值±標準差，不同字母表示相同時間點，各組別區間具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

- 加工副產物濕重樣本 150g中添加150ml之酵素水溶液
- 水解條件: 55°C、pH 5.5 ± 0.5
- 4%木瓜蛋白酶水解 48小時具有最佳水解率，在72及96小時水解率則無明顯提高。

(二) 加工副產物水解胜肽之細胞毒性試驗: MTT assay



圖二、不同濃度金目鱸加工副產物水解胜肽於RAW264.7小鼠巨噬細胞培養基中共同培養24小時後之細胞存活率。數據為6個樣本的平均值±標準差，不同字母表示組別間具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

- 0.1、0.25、0.5mg/mL水解胜肽與RAW264.7細胞共同培養24小時後，其細胞存活率皆大於100%。但當濃度增加至1mg/mL時，細胞存活率顯著下降，若濃度高於5mg/mL細胞存活率甚至低於30%以下。

- 本研究後續試驗將選擇0.5 mg/mL以下的濃度進行。

(三)加工副產物水解後胜肽之胺基酸組成

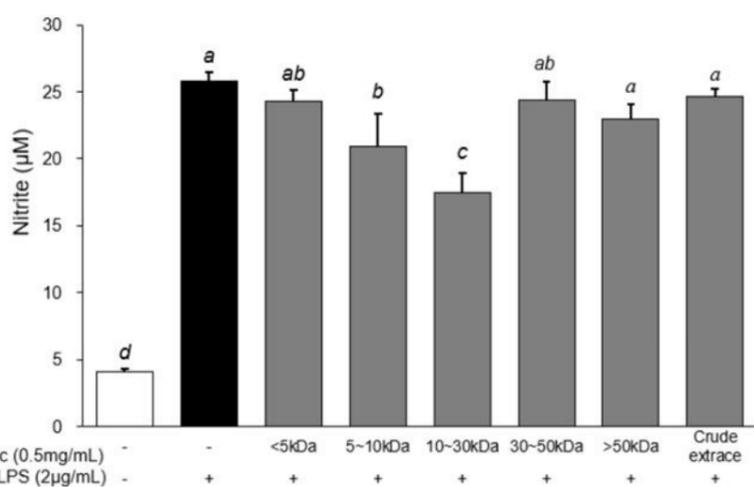
Items	Composition (%)
Essential amino acids	
Phenylalanine	1.55
Valine	2.19
Threonine	1.82
Isoleucine	1.89
Leucine	3.18
Methionine	10.12
Lysine	2.85
Arginine	3.07
Histidine	0.8
Tryptophan	0.29
Nonessential amino acid	
Aspartate	4.19
Glutamic acid	7.46
Serine	1.48
Glycine	5.53
Alanine	4.51
Tyrosine	1.24
Total	52.17

：疏水性胺基酸

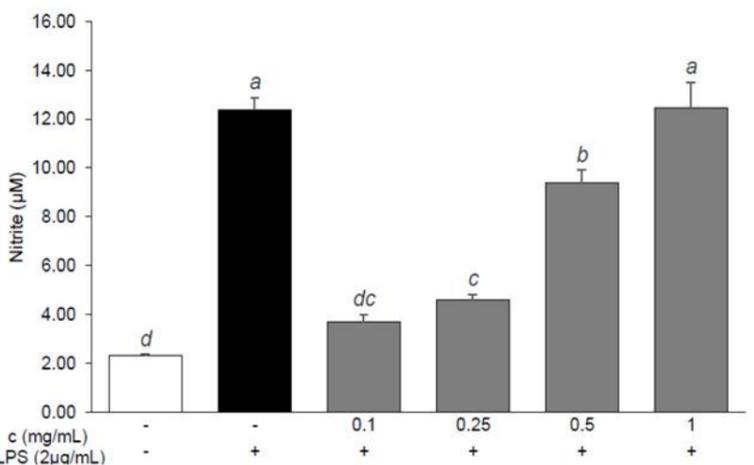
- 研究指出含有較多疏水性胺基酸⁽⁴⁾及Aspartate與Glutamic acid^(3,6)之胜肽，具有較高抗發炎能力。
- 本研究金目鱸加工副產物的水解胜肽，其疏水性胺基酸佔總量的47.86%；Aspartate與Glutamic acid，兩者佔總胺基酸含量的12.25%。
- 根據胺基酸組成，推測金目鱸加工副產物之水解胜肽應具有良好抗發炎效果。

二、金目鱸水解產物抗炎症能力分析

(一)一氧化氮 (Nitric oxide; NO)生成抑制試驗



圖三、不同分子量之金目鱸加工副產物水解後胜肽對RAW264.7小鼠巨噬細胞之一氧化氮自由基抑制之影響。數據為6個樣本平均值±標準差，不同字母表示組別區間具有顯著差異 ($p < 0.05$)。



圖四、不同濃度之10~30kDa金目鱸加工副產物水解後胜肽對RAW264.7小鼠巨噬細胞一氧化氮自由基抑制之影響。數據為6個樣本平均值±標準差，不同字母表示組別區間具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

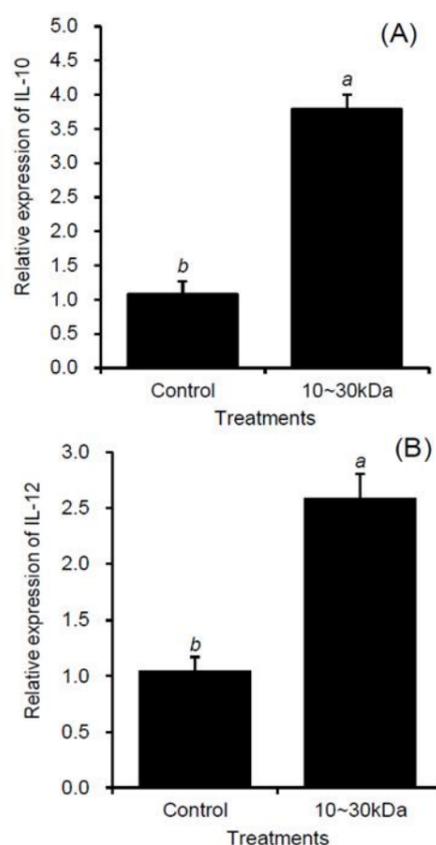
- 將不同分子量及濃度水解胜肽加入RAW 264.7培養基共同培養8hrs後，再加入LPS刺激24hrs來模擬發炎。

- NO的半衰期很短，在水溶液中則可轉變成硝酸鹽 (Nitrate) 與亞硝酸鹽 (Nitrite)。因此本試驗測量NO穩定的產物亞硝酸鹽 (Nitrite) 來間接地表示NO釋放量。

- 在5~10及10~30kDa組別的亞硝酸鹽濃度有顯著下降的趨勢，其中以10~30kDa組別的效果最佳。

- 0.1、0.25及0.5 mg/mL之10~30kDa之金目鱸加工副產物水解後胜肽可有效降低亞硝酸鹽濃度，此結果證明其可顯著抑制經LPS所誘發細胞釋放發炎媒介物質 - NO而具有抗發炎能力。

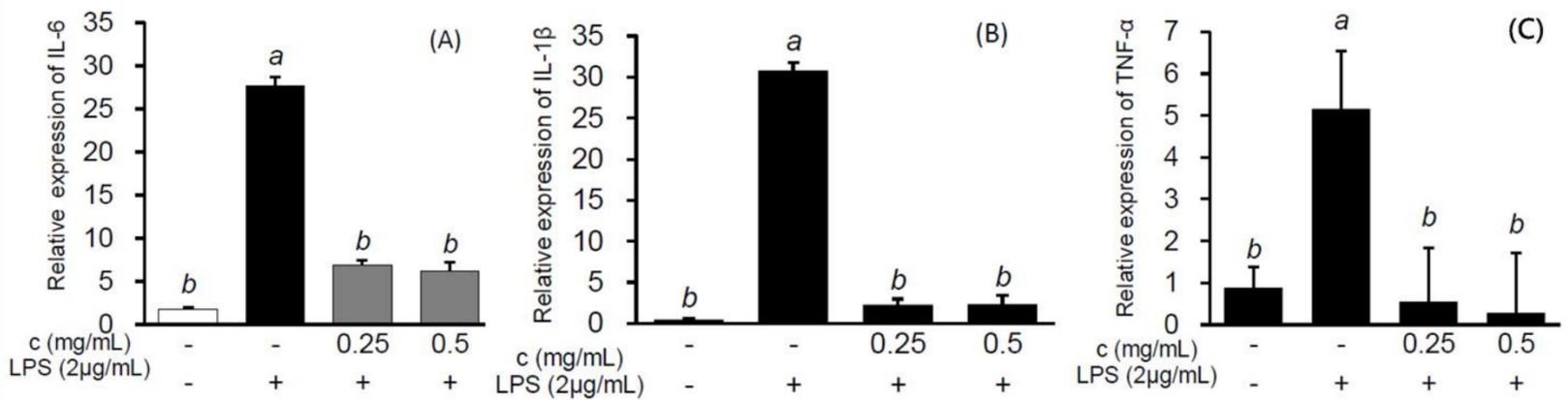
(二)細胞之抗炎症 (Anti-inflammatory) 細胞激素mRNA表現



圖五、0.25mg/mL 10~30kDa金目鱸加工副產物水解胜肽於培養基中培養24小時後RAW264.7小鼠巨噬細胞(A) IL-10以及(B) IL-12 mRNA相對表現量。數據為6個樣本平均值±標準差，不同字母表示組別區間具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

- 金目鱸加工副產物水解後胜肽可促進巨噬細胞分泌抗炎症細胞激素-IL-10及IL-12來調節細胞炎症反應。

(三)細胞之前炎症 (Pro-inflammatory)細胞激素mRNA表現



圖六、10~30kDa金目鱸加工副產物水解後胜肽加入RAW264.7小鼠巨噬細胞培養基於共同培養8小時之後，再加入2µg/mL LPS於培養基中進行刺激24小時後，RAW264.7小鼠巨噬細胞之前發炎細胞激素(A) IL-6、(B) IL-1β及(C) TNF-α mRNA相對表現量。數據為6個樣本平均值±標準差，不同字母表示組別區間具有顯著差異 (p<0.05)。

- 結果發現將0.25及0.5mg/mL的10~30kDa金目鱸加工副產物水解後胜肽添加於培養基共同培養8小時，再以LPS刺激24小時後，其IL-6 mRNA表現量顯著低於LPS刺激組(圖六A)；於IL-1β及TNF-α mRNA表現也都有類似的結果(圖六B、C)。此實驗結果證明**0.25及0.5 mg/mL的10~30kDa**金目鱸加工副產物水解後胜肽具有抑制炎症反應能力。

伍、結論

- 實驗結果證實4%木瓜蛋白酶水解金目鱸加工副產物48小時有最佳的水解率，且金目鱸加工副產物水解後胜肽濃度於0.5mg/mL以下並不具有細胞毒性。
- 實驗結果證實0.25及0.5mg/mL 10~30kDa之金目鱸加工副產物水解後胜肽，可顯著抑制LPS刺激RAW264.7小鼠巨噬細胞之NO自由基產生及IL-6、IL-1β與TNF-α等前炎症細胞激素mRNA的表現；0.25mg/mL 10~30kDa之金目鱸加工副產物水解後胜肽可提升IL-10及IL-12等抗炎症細胞激素mRNA表現量。根據上述結果證明金目鱸加工副產物水解後胜肽具有抗發炎能力。
- 整體而言，本研究證實金目鱸加工副產物經4%木瓜蛋白酶水解後之10~30kDa胜肽具有良好抗發炎能力，可更進一步利用此結果開發出具生物功能之天然抗炎症物質並將其應用於慢性炎症治療，有助提升金目鱸加工副產物經濟價值並減少加工後廢棄物產生。



責任消費
與生產

確保永續消費及生產模式

陸、未來研究方向

- 本次研究初步證明金目鱸加工副產物水解後胜肽具有抗發炎能力，未來須進一步探討此水解後胜肽之抗炎症機轉，如MAPK及NF-κB訊息傳遞路徑。
- 進一步探討分析具抗發炎功能胜肽之胺基酸序列，如利用液相層析串聯式質譜儀(LC/MS/MS)分析10~30kDa的水解後胜肽中胜肽種類及其胺基酸序列，並逐一分析每一條胜肽抗發炎能力，以確認具最佳抗發炎之胜肽種類及其胺基酸序列。
- 未來可更進一步進行活體試驗 (*in vivo*)，以10~30kDa的水解後胜肽餵食小鼠評估抗發炎效果，以確認金目鱸加工副產物水解後胜肽於臨床上應用之可行性。

柒、參考文獻

- Ahn C.B., Cho Y.S., & Je J.Y. (2015). Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 168, 151-156.
- Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, 180, 114-147.
- Gao R., Shu W., Shen Y., Shen Y., Suna Q., Jin W., Li D., Li Y., & Yuan Li. (2021). Peptide fraction from sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages and NF-κB pathways. *Food Science and Human Wellness* 10, 103-111.
- Kemp D.C. & Kwon J. Y. (2021). Fish and shellfish-derived anti-inflammatory protein products: Properties and via MAPK mechanisms. *Molecules*, 26, 3225-3237.
- Saisavoey T., Sangtanoo T., Reamtong O., & Karnchanat A. (2019) Free radical scavenging and anti-inflammatory potential of a protein hydrolysate derived from salmon bones on RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 5112-5121.
- Song J., Li T., Cheng X., Ji X., Gao D., Du M., & Mao X. (2016). Sea cucumber peptides exert anti-inflammatory activity through suppressing NF-κB and MAPK and inducing HO-1 in RAW264.7 macrophages. *Food & Function*, 7, 2773-2779.