

## The Peptides Derived from *Botryocladia leptopoda* in the Regulation of Hypertension

Tsung-Kai Yi<sup>1</sup>, Jung-Hsin Chang<sup>1</sup>, Fenny Crista<sup>2</sup> and Huey-Jine Chai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

<sup>2</sup>Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Indonesia

### ABSTRACT

In this study, *Botryocladia leptopoda* was analyzed to identify proteins and bioactive peptides. First, the proteins expressed by *Botryocladia leptopoda* were extracted using enzymatic and alkali treatments and identified using proteomics. Two proteins, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit and phycoerythrin beta chain, were chosen for the analysis of potential bioactive peptides based on phylogenetic relationships and the higher sequence coverage. The two identified protein sequences were subjected to potential active peptide analysis and simulated enzyme hydrolysis using the BIOPEP-UWM database. The results showed *Botryocladia leptopoda* was predicted to generate peptides with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant activities. The simulated enzymatic hydrolysis of *Botryocladia leptopoda* using 6 different enzymes showed that the pepsin hydrolysate produced peptides with the highest ACE inhibitory activities (97.65%  $\pm$  1.78%) compared with the other hydrolysates, which was consistent with the BIOPEP-UWM simulation results. The predicted ACE inhibitory activity of the pepsin hydrolysate is not significantly different from that of a commercial hypertension drug (captopril) used clinically, and the pepsin hydrolysate activity was not affected by pH. In addition, the peptides derived from the pepsin hydrolysate with molecular weights  $\geq 10$  kDa showed the best ACE inhibitory activity and nitric oxide contents compared with peptides with molecular weights of 3–10 kDa and  $\leq 3$  kDa, respectively. This study demonstrates that a proteomics approach combined with the BIOPEP-UWM database can be a powerful tool to assist with the preparation of functional hydrolysates or peptides. This study also revealed that protein hydrolysates generated from *Botryocladia leptopoda* contain peptides with ACE inhibitory activities, especially those in the molecular weight  $\geq 10$  kDa fraction, which can be used as a natural material for blood pressure management. The ACE inhibitor peptide from *Botryocladia leptopoda* proteins could be purified and the sequence determined in future studies to develop functional supplemental foods.

**Key words:** *Botryocladia leptopoda*, proteomics, bioactive peptides, ACE inhibition

---

\*Correspondence: 199 Hou-lh Road, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02)2462-2101 ext. 2601; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw

# 紅葡萄藻 (*Botryocladia leptopoda*) 胜肽於血壓調節之研究

易琮凱<sup>1</sup> · 張榕欣<sup>1</sup> · 柯芬妮<sup>2</sup> · 蔡慧君<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

<sup>2</sup>印度尼西亞海事和漁業部

## 摘 要

本研究將紅葡萄藻 (*Botryocladia leptopoda*) 經酵素及鹼處理萃取的蛋白質，利用蛋白質體技術鑑定其所含的蛋白質種類，並從中挑選親緣關係與紅葡萄藻較為相近且序列覆蓋率較高的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) 以及藻紅蛋白β鏈 (phycoerythrin beta chain) 等2種蛋白質序列，經 BIOPEP-UWM 活性胜肽資料庫分析比對，顯示紅葡萄藻蛋白質具有血管收縮素轉化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 抑制活性及抗氧化活性。再藉由 BIOPEP 資料庫模擬酵素水解紅葡萄藻後發現，胃蛋白酶之水解物相較其他酵素處理組具有最高的 ACE 抑制活性 ( $97.65 \pm 1.78\%$ )，與市售臨床用藥卡托普利 (Captopril) 無顯著差異，且不受 pH 值之影響。另紅葡萄藻之胃蛋白酶水解物以分子量  $\geq 10$  kDa 之區分物對 ACE 及 NO 產生量的抑制作用顯著高於小分子量的區分物 ( $\leq 3$  kDa 和 3 - 10 kDa)。綜上述結果，利用 BIOPEP-UWM 的資料庫模擬酵素水解紅葡萄藻可產生具有調節血壓的活性胜肽，與預測的結果吻合，顯示蛋白質體學之質譜技術搭配 BIOPEP-UWM 能夠作為協助製備功能性水解物或胜肽之有力工具，而紅葡萄藻的蛋白酶水解物，特別是分子量  $>10$  kDa 的區分物，可作為調節血壓保健產品之機能素材。未來可以進一步純化分析其中的 ACE 抑制胜肽，並且定序其胺基酸組成，據以開發調節血壓之保健食品。

關鍵詞：紅葡萄藻、蛋白質體學、活性胜肽、ACE 抑制活性

## 前 言

葡萄藻 (*Botryocladia leptopoda*) 俗稱為紅色葡萄藻 (red grape algae)，屬於紅藻植物門 (Rhodophyta)、真紅藻綱 (Florideophyceae)、紅皮藻目 (Rhodymeniales)、紅皮藻科 (Rhodymeniaceae) 的葡萄藻屬 (*Botryocladia*)。特徵是藻體為單個或分枝，具有圓柱形的單管軸，其上有1至多個直立囊狀分枝，而囊狀分枝有球形、梨形或橢圓形等多種形態，具柄或分枝 (李等, 2018)，因其形狀獨特在臺灣常被當作水族缸背景用水草。

近來隨著中油綠能科技研究所建立液化天然

氣 (liquefied natural gas) 冷排水之陸上大型海藻人工養殖模式，克服陸上大規模養殖大型海藻的困難 (翁等, 2020)，紅葡萄藻在臺灣逐漸被大量推廣。紅葡萄藻的蛋白質含量為大型藻中較高之一，含有 10 - 47% 的蛋白質，這些藻類蛋白與藻體中的多醣結構相互結合形成樹枝狀的醣蛋白 (Qu *et al.*, 2010; Quindere *et al.*, 2014)，它們被認為是一群非活性狀態的功能性胜肽，經由酵素作用後能將其從側鏈分離為 2 - 20 個胺基酸組成的小片段始具有活性，又被稱為活性胜肽，可能具有調節血壓 (Yours and Howell, 2015)、血糖 (Harnedy *et al.*, 2015) 及免疫功能 (Morris *et al.*, 2007) 等生理功效。

高血壓是心臟病、中風、腎臟病、眼疾等疾病之重大危險因子，世界高血壓聯盟估計全球約有 18% 人口 (940 萬) 的死亡原因主要與高血壓有關。另依據衛生福利部國民健康署 2014 - 2017 年

\* 通訊作者 / 基隆市中正區和一路 199 號, TEL: (02)2462-2101 ext. 2601; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: hjchai@mail.tfrin.gov.tw

國民營養健康狀況變遷調查顯示，18 歲以上民眾高血壓盛行率為 25.2%，約 4 人就有 1 人罹患高血壓，估計罹患高血壓民眾有 462 萬人。調查結果也顯示，國內 18 - 39 歲年輕人的高血壓盛行率為 4.7%，亦即平均約每 21 個人就有 1 人患有高血壓，估計 18 - 39 歲的國人有超過 36 萬人罹患高血壓 (衛生福利部, 2018)，顯見各年齡層的國人都遭受高血壓之威脅。

血管收縮素轉化酶 (angiotension converting enzyme, ACE) 主要作用是將血壓調節系統中的腎素 - 血管收縮素 - 醛固酮 (renin-angiotensin aldosterone system) 中無活性的血管收縮素 I (angiotensin I) 轉化為具有強烈收縮血管作用的血管收縮素 II，產生血管收縮，造成血壓升高，並且會刺激腎上腺皮質分泌醛固酮 (aldosterone)，引起鈉和水份滯留，刺激心臟和腎臟鈉離子的再吸收等作用；使心臟負荷量增加，造成腎絲球高度過濾導致蛋白尿而增加腎臟負擔 (Sheih *et al.*, 2009)。此外 ACE 還能夠催化使血管產生舒張作用的緩激肽產生水解，從而造成血壓上升。ACE 抑制劑是一類發展迅速的抗高血壓藥物，主要的藥理作用係抑制 ACE 活性，減少血管收縮素 II 的生成和緩激肽的水解作用 (Saad *et al.*, 2019)，使血管舒張和血容量減少，而使血壓下降，但可能有咳嗽、味覺異常、粒細胞減少、皮疹、發熱等不良反應。

目前高血壓的控制藥物仍以化學合成的 ACE 抑制劑為主流，但近年來追求天然成為主流意識 (Gomes *et al.*, 2020)，越來越多的消費者希望能借由食源性的胜肽來取代合成藥物，達到日常保健的效果 (Chakrabarti *et al.*, 2014)。因此本研究利用蛋白質體學之質譜技術搭配 BIOPEP-UWM 資料庫探討紅葡萄藻之功能性水解物或胜肽的製備條件並進行生理活性測定，以評估紅葡萄藻萃取物對 ACE 的抑制作用，來做為調節血壓的保健素材。

## 材料與方法

### 一、實驗樣品採集與前處理

紅葡萄藻原料由本所東部海洋生物研究中心提供，以 50°C 乾燥 48 hr，再經均質機粉粹成粉末後，保存於乾燥箱中備用。

## 二、實驗方法

### (一) 一般成分分析

依照分析化學協會 (Association of Official Analytical Chemists, A.O.A.C.) (2000) 方法分析樣品之水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分與碳水化合物含量 (%)。

### (二) 蛋白質萃取

參考修飾 Kadam *et al.* (2017) 的方法，於紅葡萄藻粉中加入去離子水，並區分為添加及無添加纖維酶的共培養組，於 50°C 下水解 3 hr 後，離心將沉澱物加入 0.4 M NaOH 溶液 400 ml 震盪 10 min，分離上清液並以 20% TCA/Acetone 沉澱蛋白質，即得蛋白質分離物，並置於 -20°C 備用，另分析其蛋白質萃取效率。

### (三) 電泳分析

使用十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 進行蛋白質分析，參考 Huang *et al.* (2015) 的方法，使用 12% 分離膠體和 4% 集膠膠體。秤取 5 mg 紅葡萄藻蛋白質凍乾粉，溶解於 100  $\mu$ l 緩衝溶液中 (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, glycerol, 10% SDS, 0.5% bromophenol blue, v/w/w)，並以 95°C 水浴槽加熱 5 min，即為分析溶液。在樣品槽內分別注入 10  $\mu$ l 分析溶液和 5  $\mu$ l 電泳標準品，並以 70 V 電壓下進行 30 min 電泳後，再以電壓 130 V 進行電泳 90 min 後，再以 coomassie brilliant blue 進行染色 30 min，接著退染處理至膠片底色呈現透明狀。

### (四) 蛋白質鑑定

#### 1. 膠內消化 (in gel digestion)

在微量離心管中加入 200  $\mu$ l 的 25% Acetonitrile (ACN) / 25 mM ammonium bicarbonate (ABC) 退染數次後，置於 4°C 隔夜至膠粒透明。加入 100  $\mu$ l 的 50 mM dithioerythritol (DTE) / 25 mM ABC 於 37°C 下反應 60 min 後離心移除上清液，再加入 100  $\mu$ l 的 100 mM iodoacetamide (IAM) / 25 mM ABC 於室溫下暗反應 60 min，移除管中溶液並加入 200  $\mu$ l 之 25% ACN / 25 mM ABC 浸泡 5 min，移除管中

溶液並加入 100  $\mu$ l 之 100% ACN 室溫反應 5 min 後離心，重複數次直至膠粒完全變硬，於蛋白質真空濃縮系統 5 min，將管中溶液完全抽乾後加入 Lys-C 蛋白酶溶液，並以 25 mM ABC 淹沒膠粒，於 37°C 中反應 180 min，再加入胰蛋白酶 (trypsin) 溶液於 37°C 反應 16 hr，使蛋白質水解產生胜肽。

## 2. 胜肽萃取

加入 50  $\mu$ l 的 50% ACN / 5% trifluoroacetic acid (TFA) 於酵素反應完成的微量離心管中，以超音波振盪萃取，離心再將上清液轉移到新的微量離心管，重複上述步驟 2 次，使用蛋白質真空濃縮系統將微量離心管中的溶液完全抽乾。

## 3. 純化胜肽

加入 10  $\mu$ l 的 0.1% formic acid (FA) 於胜肽萃取完成的微量離心管中，並以 Zip-Tip 依序吸取 10  $\mu$ l 的 100% ACN、10  $\mu$ l 的 50% ACN / 0.1% FA、10  $\mu$ l 的 0.1% FA 進行吸取，於含有胜肽之微量離心管重複吸取 10 次，並以 10  $\mu$ l 0.1% FA 進行清洗，最後以 10  $\mu$ l 50% ACN / 0.1% FA 沖提胜肽至新的微量離心管中，使用蛋白質真空濃縮系統將管中溶液完全抽乾，保存在 -20°C 備用。

## 4. 資料庫比對與蛋白質鑑定

抽乾的微量離心管中加入 40  $\mu$ l 移動相進行回溶並以超聲波作用 1 min 後，以 15,000 rpm 離心 15 min 移除雜質，上清液以液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC/MS) 分析，並以 Mascot 資料庫進行搜尋比對來鑑定蛋白質種類，並且獲得 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 登記碼。

## (五) 生物資訊工具分析

將 NCBI 登記碼輸入 NCBI 資料庫中以獲得蛋白質序列，再將所得之蛋白質序列貼入活性胜肽資料庫 (BIOPEP-UWM) 進行分析，可得知蛋白質序列中潛藏的活性胜肽種類、生理活性，以及蛋白質中活性胜肽之位置、數量等資料，另外進行模擬酵素水解，根據所得的資料進行統整分析，以找出較適之水解酵素。

## (六) 酵素水解物製備

參考 Huang *et al.* (2015) 的方法，將紅葡萄藻蛋白質溶於二次水中，分別調整至 papain、pepsin、proteinase K、subtilisin、pancreatic elastase、leukocyte elastase 等 6 種酵素之最適作用溫度及 pH 值，再進行水解 0、1、3、5、7 hr 後，將水解液加熱使酵素失活和凍乾存於 4°C 備用。

### 1. 水解率測定

利用 O-Phthalaldehyde (OPA) 法測定 (Rutherford, 2010)，10  $\mu$ l 標準品 (Gly - Gly - Gly) 或樣品與 200  $\mu$ l OPA 試劑混合後，於測量波長 340 nm 下測吸光值。另外將樣品置於 6 N HCl 中進行酸水解 24 hr (110 °C) 以分析計算樣品中總胜肽鍵數量。取 6 個不同濃度的 Gly - Gly - Gly 標準品繪製檢量線，並推算樣品胜肽含量，以計算水解率。推算公式如下：

$$DH (\%) = [(NH_2)_x - (NH_2)_0] / [(NH_2)_A - (NH_2)_0] \times 100 \%$$

(NH<sub>2</sub>)<sub>x</sub> : x 分鐘時的胜肽含量 (mg/ml)

(NH<sub>2</sub>)<sub>0</sub> : 0 分鐘時的胜肽含量 (mg/ml)

(NH<sub>2</sub>)<sub>A</sub> : 酸水解後的胜肽含量 (mg/ml)

### 2. 胜肽含量測定

同水解率分析中所使用的 OPA 法，以 Gly-Gly 標準品的檢量線計算水解物胜肽含量。

## (七) 胜肽生理活性測定

### 1. ACE 抑制能力

參考 Girgih *et al.* (2015) 的方法，取紅葡萄藻胜肽 0.5 mg 溶於 1 ml 的 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液製成樣品溶液。將 20  $\mu$ l 樣品溶液、25 mU ACE 溶液 10  $\mu$ l 及 170  $\mu$ l 0.5mM N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-L-phenylalanyl-glycyl-glycine / 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液均勻混合，於 37°C 下每 3 min 偵測波長 345 nm 吸光值，持續測量 30 min。將值帶入公式：

$$\% \text{ ACE inhibition} = [(\text{slope of blank} - \text{slope of sample}) / \text{slope of blank}] \times 100 \%$$

### 2. 細胞毒性試驗

鼠巨噬細胞 (Raw cell 264.7) 於 37°C、5% CO<sub>2</sub>

濃度下培養 24 hr 後，加入各濃度之葡萄藻胃蛋白酶水解物 (pepsin-hydrolysate) 繼續培養 24 hr，吸取培養液，在 phenazine methosulfate (PMS) 存在下，將 MTS 還原成水溶性的紅紫色產物，測其 OD<sub>490nm</sub>，以對照組 100% 來估算各組別之死亡率。

### 3. 細胞抗發炎活性 NO (nitric oxide) 含量分析

依 Kim and Mendis (2006) 的方法，將收集到的細胞上清液取 100 µl 加入新的 96-well，並且加入 100 µl 由等量的 1% (w/v) sulfanilamide 以及 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloriden 所配製的 griess reagent 進行呈色反應，以 ELISA reader (TECAN, Nano Quant Plate, Infinite M200 PRO.) 測量並記錄其 540 nm 波長之吸光值。利用不同濃度 200 mM NaNO<sub>2</sub> (0 - 100 µM/mL) 製作標準曲線，將樣品吸光值帶入標準曲線，即可換算出樣品中相對 NaNO<sub>2</sub> 濃度。

### (八) 統計分析

實驗數據以 SPSS 軟體 (12.0.1C, 2000) 進行統計上的分析，並以 ANOVA (analysis of variance) 法探討樣品之間是否具有顯著差異。

## 結果與討論

### 一、紅葡萄藻之成分分析

一般成分分析結果如 Table 1 所示，紅葡萄藻組成分較高為粗灰分 (35.05%) 和粗蛋白 (34.19%)，碳水化合物次之。大型藻的蛋白質含量約 5 - 56%，且大都低於 30%，如 *Alaria esculenta* (褐藻) 之蛋白質含量為 9 - 20% (Holdt and Kraan, 2011; Pereira, 2011)；*Gracilaria tikvahiae* (紅藻) 為 12 - 23% (Taboada *et al.*, 2013)；*Saccharina latissima* (褐藻) 為 6 - 26% (Lakshmi *et al.*, 2014; Pereira, 2011)；*Porphyridium* (紫球藻屬) 為 56% (Safi *et al.*, 2013)，由此可發現紅葡萄藻較其他藻種含有相對較高量的蛋白質。另外，Fleurence (1999) 指出，根據藻種及其生長之地理位置和季節的不同，其蛋白質含量也有所不同約為 3 - 47%，因此以人為方式控制藻類的養殖環境，即可降低量產製程中每批次藻類蛋白質含量的誤差，利於產業應用。

**Table 1** Approximate composition of *Botryocladia leptopoda* (values expressed as % dry weight). All data are shown as the mean ± SD (n = 3)

Compositions	%
Ash	35.05 ± 0.06
Crude protein	34.19 ± 0.08
Carbohydrate	23.41 ± 0.05
Crude lipid	7.35 ± 0.01

### 二、紅葡萄藻蛋白質鑑定

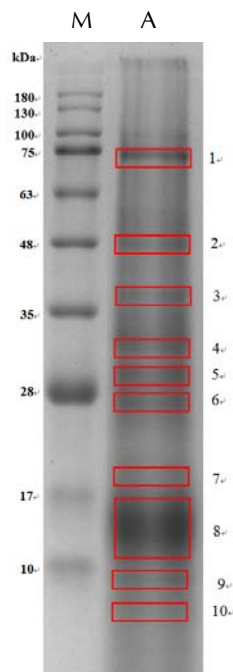
將乾燥紅葡萄藻分為兩組，分別為鹼液搭配纖維酶之萃取組及鹼液萃取組，並且比較兩者的萃取率 (Fig. 1)，試驗結果顯示，使用鹼液和纖維酶之處理組的蛋白質萃取產率 (7.1%) 顯著比後者高 (5.9%)，此結果係因藻類細胞壁含有豐富的纖維素，添加纖維酶可分解纖維素，並破壞細胞壁結構而提升蛋白質的萃取率 (Bleakley and Hayes, 2017)。因此後續實驗將使用鹼液及纖維酶進行紅葡萄藻前處理，其水解物的水溶性蛋白質含量為 62.09 ± 0.13%。



**Fig. 1** Protein extraction yields of *Botryocladia leptopoda* treated with or without cellulase. All data are shown as the mean ± SD (n = 3). Different symbols on the bar graph indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

紅葡萄藻蛋白質鑑定步驟第一步係為樣品前處理，接著將纖維酶水解紅葡萄藻之液體，以 SDS-PAGE 進行蛋白質分離，其所得蛋白質條帶分別以 1 - 10 表示 (Fig. 2)。將所有條帶裁切後進行膠內消化，也就是蛋白質鑑定的第三步 - 蛋白質分解。膠內消化主要是利用酵素的專一性，在

蛋白質的特定切位進行消化分解，形成不同胺基酸組合的勝肽片段。將紅葡萄藻之 SDS-PAGE 蛋白質條帶，以胰蛋白酶進行消化剪切，因胰蛋白酶主作用於 arginine 和 lysine 的 C 端位置，故可產生不同胺基酸序列的勝肽，這些勝肽也因胺基酸組合不同而具有不同質量與特異性，可再藉由液相層析-質譜儀 (LC/MS) 分析的質譜圖中勝肽質量分佈，和電腦資料庫中已知序列的蛋白質所對應的勝肽質量作比對，並以統計的方式找出最有可能產生該勝肽質量分佈圖的蛋白質序列，來鑑定出此蛋白質的身份。故蛋白質鑑定最後步驟-質譜儀 (mass spectrometer) 分析與資料庫比對。質譜儀是一種量測帶電粒子質量/電荷 ( $m/z$ ) 的分析方法，其基本原理是當分析樣品進入質譜儀後，在離子源 (ion source) 中被游離化 (ionization) 轉成氣相的帶電離子，再經質量分析器 (mass analyser) 中電場 (或磁場) 作用下，偵測器可測得不同離子的質荷比 (mass-to-charge ratio,  $m/z$ ) 與相對強度的質譜圖。由於分子破碎時，具有各自特定的模式，經由解讀這些碎片“指紋”，即可推知原先分子的結構，所以不同化合物會呈現不同的質譜圖，也因為質譜圖具有類似指紋的功能，故可以進行快速、靈敏的鑑定及定量分析。



**Fig. 2** SDS-PAGE of *Botryocladia leptopoda* protein using a 12% resolving gel.

將紅葡萄藻經胰蛋白酶水解後的勝肽片段導入液相層析儀分離成分，再經串聯質譜儀分析其特徵圖譜並比對 Mascot 資料庫結果顯示，自紅葡萄藻中的蛋白質主要以藻紅蛋白  $\alpha$ 、 $\beta$  鏈、藻藍蛋白質  $\alpha$ 、 $\beta$  次單元、別藻藍蛋白  $\beta$  鏈、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大次單元及果糖-1,6-雙磷酸醛縮酶等蛋白質所組成，其序列覆蓋率為 7-61% 不等 (Table 2)。

### 三、資料庫分析潛在活性勝肽

BIOPEP-UWM 為分析蛋白質序列中潛在的活性勝肽和模擬其水解酵素作用的線上資料庫，共收錄如降血壓、抗血栓、抗氧化和抗健忘等三千種以上活性勝肽，已廣泛被作為電腦模擬活性勝肽的分析工具 (Minkiewicz *et al.*, 2019)。

將紅葡萄藻的蛋白質經 LC/MS 所鑑定出的蛋白質種類，以 BIOPEP-UWM 進行潛在活性勝肽分析和模擬酵素水解。結果顯示核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大次單元 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) 以及藻紅蛋白  $\beta$  鏈 (phycoerythrin beta chain)，與紅葡萄藻的分類學關係較為相近，且序列覆蓋率較高。故以此 2 種蛋白質序列經 BIOPEP-UWM 活性勝肽資料庫進行分析比對，發現紅葡萄藻蛋白質以六種不同的酵素 (papain、pepsin、proteinase K、subtilisin、pancreatic elastase、leukocyte elastase) 進行水解，可獲得較多的 ACE 抑制活性勝肽、DPP-4 抑制活性勝肽及抗氧化活性勝肽 (Table 3)，顯示可作為調節血糖和血壓、抗氧化等保健商品之素材。

### 四、勝肽之活性分析

#### (一) 水解物特徵分析

經前項資料庫分析後得知紅葡萄藻蛋白質經 papain、pepsin、proteinase K、subtilisin、pancreatic elastase、leukocyte elastase 水解後可能具有較高的 ACE 抑制活性勝肽，取此六種酵素在各最適 pH 值及溫度下水解 1、3、5、7 hr，以求酵素水解最適時間。另因大部分蛋白酵素於作用 5-6 小時後其水解效能不再增加 (Albin *et al.*, 2000)，因此本實驗

**Table 2** Proteins identified in *Botryocladia leptopoda*

Protein name	Sequence coverage (%)
Phycocerythrin beta chain	45(band1), 17(band2), 24(band3), 33(band5), 25(band6) 17(band7) 42(band8) 、 33(band10)
Phycocyanin beta subunit	20(band1), 20(band2), 20(band3), 19(band5), 20(band6) 20(band7), 29(band8)
Allophycocyanin beta chain	29(band1), 19(band2), 29(band3), 29(band4), 29(band5) 29(band6), 29(band7), 19(band10)
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	31(band1), 21(band2), 11(band3), 7(band7), 15(band8)

**Table 3** Number of predicted bioactive peptides released from identified *Botryocladia leptopoda* proteins, using BIOPEP's enzyme action tool (accessed on 26 February 2019)

Protease	ACE inhibitory activity		Antioxidant activity		Other activity	
	R <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>
Papain	24	6	2	ND	1	1
Pepsin	39	13	2	ND	9	9
Proteinase K	23	5	4	ND	3	ND
Subtilisin	16	3	4	ND	5	1
Pancreatic Elastase	24	14	1	ND	3	4
Leukocyte Elastase	19	11	1	ND	3	2
Papain	33	14	1	ND	4	1

<sup>1</sup>R: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit

<sup>2</sup>P: Phycocerythrin beta chain

以 7 hr 為最長水解時間，來分別測定各個酵素處理組之水解率及胜肽含量。

### 1. 水解率

水解率越高代表蛋白質被分解的程度越大，產生的胜肽越多。紅葡萄藻以 BIOPEP-UWM 活性胜肽資料庫模擬酵素水解，結果顯示不同的酵素處理組皆隨水解時間的增長，其水解率呈現顯著的增加，並以水解 7 hr 達最高之水解率分別為 papain (39.03 ± 1.26%)、pepsin (8.63 ± 0.25%)、proteinase K (40.87 ± 0.42%)、subtilisin (33.82 ± 1.42%)、pancreatic elastase (11.69 ± 0.71%)、leukocyte elastase (7.86 ± 0.28%) (Fig. 3)。

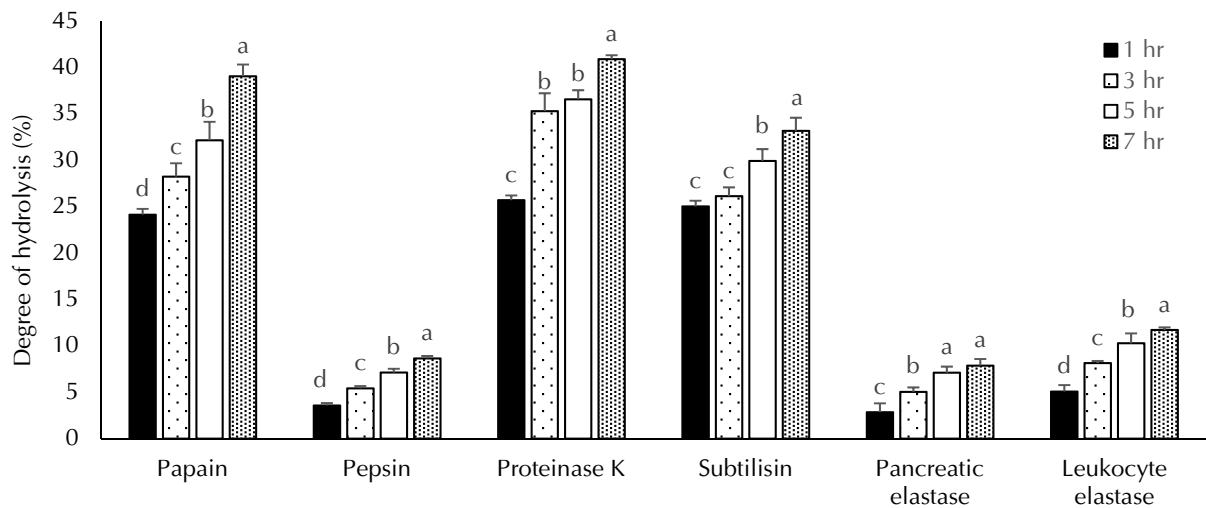
### 2. 胜肽含量

另為探討紅葡萄藻之較適水解條件，以水解物中的胜肽含量作為評估指標，結果如 Fig. 4 所示，紅葡萄藻經 6 種酵素分別水解 5 hr 和 7 hr 後，

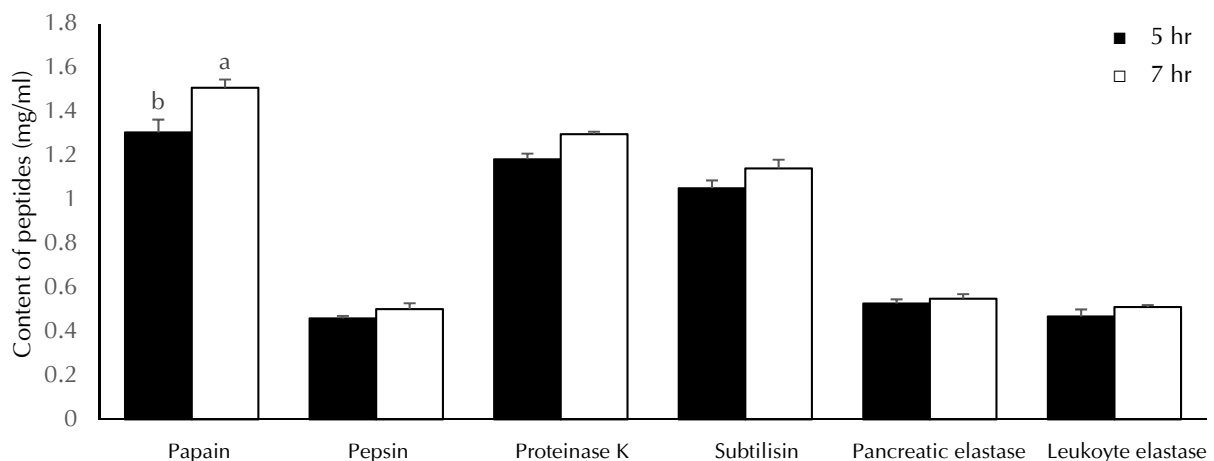
其水解物中胜肽量在 papain 組為 1.31 mg/ml 和 1.51 mg/ml；pepsin 組為 0.46 mg/ml 和 0.50 mg/ml；proteinase K 組為 1.18 mg/ml 和 1.29 mg/ml；subtilisin 組為 1.05 mg/ml 和 1.14 mg/ml；pancreatic elastase 組為 0.53 mg/ml 和 0.55 mg/ml；leukocyte elastase 組為 0.47 mg/ml 和 0.51 mg/ml，其中僅 papain 之處理組在水解 5 hr 和 7 hr 之間呈現顯著差異。

### (二) ACE 抑制能力

ACE 為調節血壓的酵素，會將血管收縮素 I 轉變成血管收縮素 II，以及催化血管擴張素的降解，目前已有抗高血壓藥物，透過抑制 ACE 的方式以達到抗高血壓的功效，因此 ACE 抑制能力 (ACE inhibition, ACEi) 可以作為評估調節血壓的指標之一 (Iwaniak *et al.*, 2014)。將不同酵素作用之紅葡萄藻蛋白水解物與市售臨床用藥卡托普利 (Captopril，作為對照組)，在相同胜肽濃度 (0.5



**Fig. 3** Degree of *Botryocladia leptopoda* hydrolysis following 1, 3, 5, or 7 hr of treatment with papain, pepsin, proteinase, subtilisin, pancreatic elastase, and leukocyte elastase at the appropriate temperature and pH for each enzyme. All data is shown as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Different letters for each enzyme indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

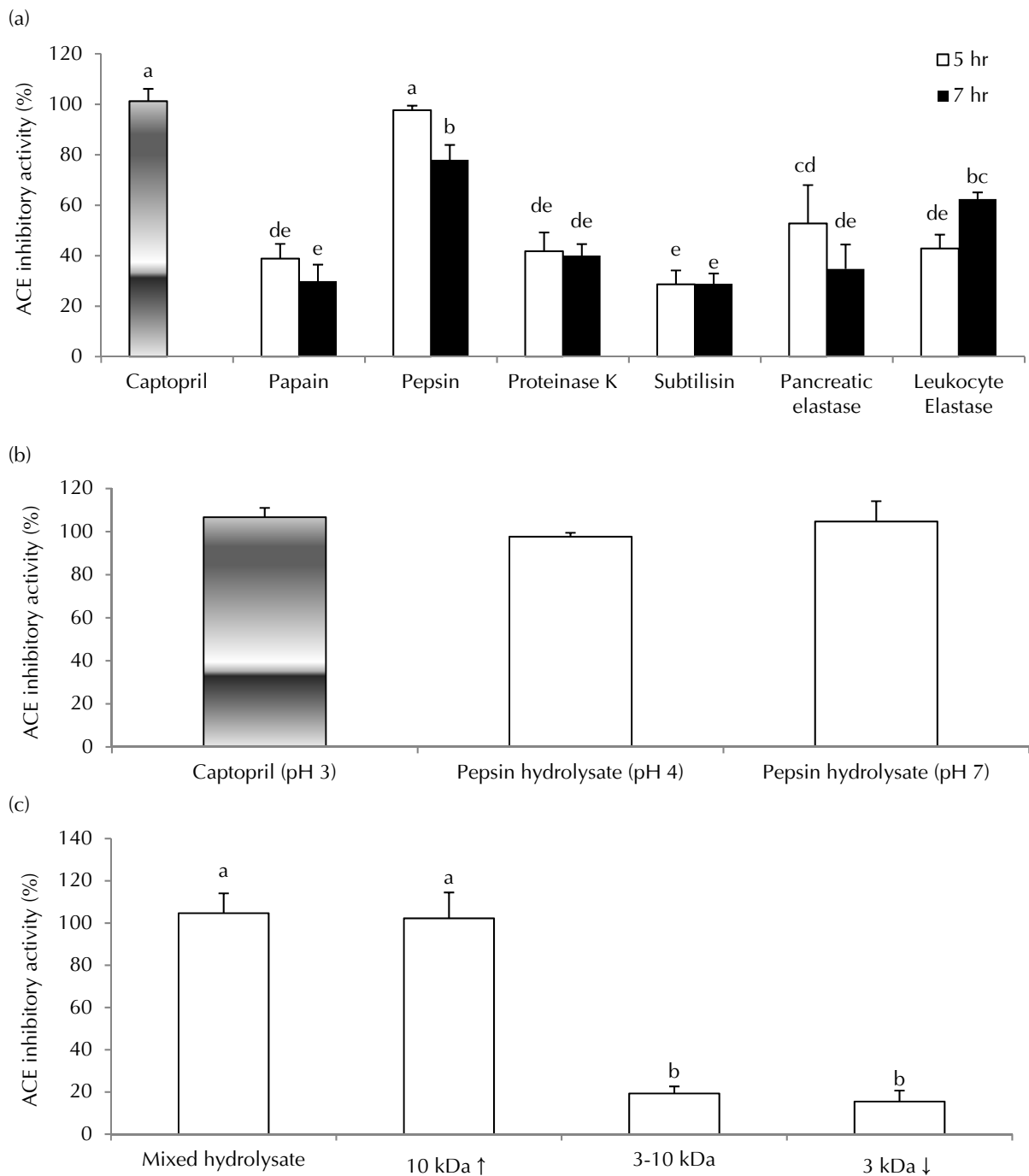


**Fig. 4** Peptide contents of *Botryocladia leptopoda* after treatment for 5 or 7 h with papain, pepsin, proteinase, subtilisin, pancreatic elastase, and leukocyte elastase at an appropriate temperature and pH for each enzyme. All data is shown as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

mg/ml) 探討對 ACE 的抑制作用，結果顯示以 pepsin 分別水解 5 hr 和 7 hr 的水解物呈現最高的抑制率，其中又以水解 5 hr 的處理組其 ACEi ( $97.65 \pm 1.78\%$ ) 與市售臨床用藥 (Captopril) 無顯著差異 (Fig. 5a)，此結果也代表紅葡萄藻經蛋白酶水解可產生抑制 ACE 的活性胜肽，與 BIOPEP-UWM 預測結果吻合。余 (2005) 指出源自食品中所分離的降血壓活性胜肽，其副作用比臨床藥物低，將蠅煮汁再經乳酸菌發酵後的產物，其抑制 ACE 能力由 49.84% 提升至 97.91%，也與本試驗的紅葡萄藻蛋白酶水解物相當。

另為考量紅葡萄藻之 pepsin 水解物 (pH 4) 的產業應用性，將偏酸性的水解物調整至中性 (pH 7) 再進行抑制 ACE 活性的分析結果顯示，pH 值的調整對其 ACEi 值無顯著影響，且與 pH 值為 3 的對照組 (Captopril) 相當 (Fig. 5b)。此結果顯示，紅葡萄藻之 pepsin 水解物可同市售品般，在偏酸性下藉由錠劑或膠囊以外層屏障，而不與口腔或食道直接接觸以維持其血壓調節的活性，抑或是將其調整至中性 pH 值的水解物，也能保有 ACE 的抑制功能，擴增其產業應用性。

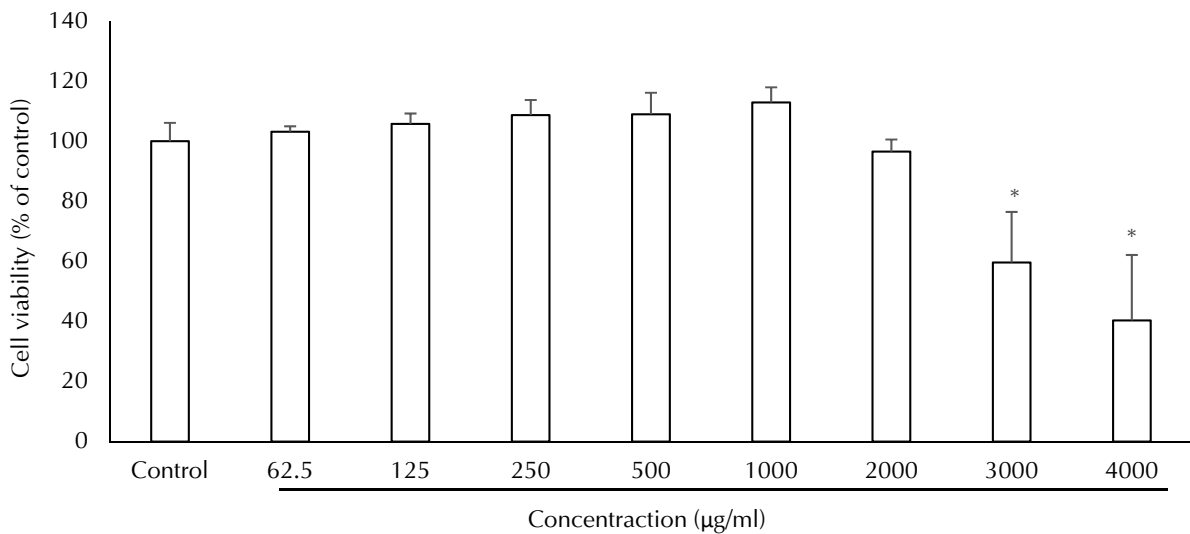




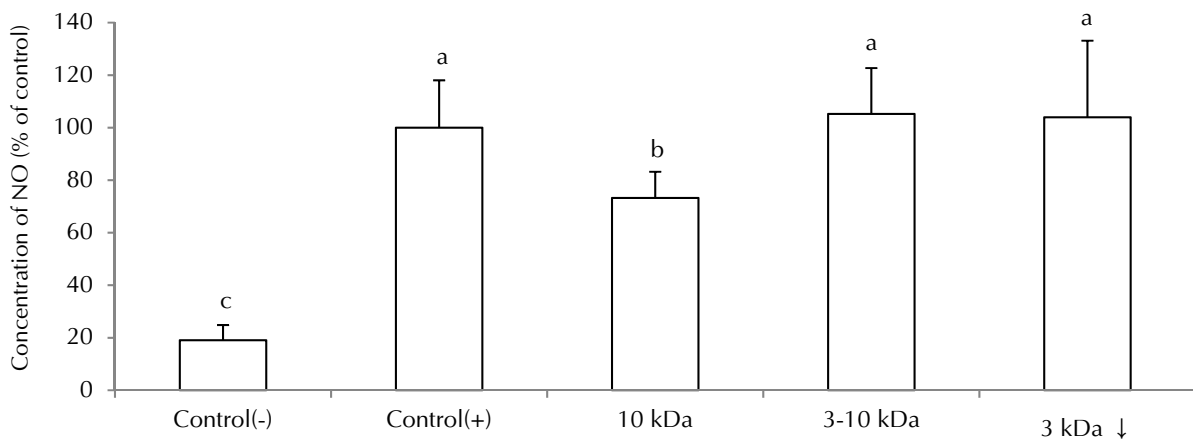
**Fig. 5** ACE inhibitory activity of (a) *Botryocladia leptopoda* protein hydrolysates after 5 or 7 h of treatment with 6 different enzymes at the appropriate temperature and pH for each enzyme. (b) Comparison of ACE inhibitory activity between captopril and *Botryocladia leptopoda* pepsin hydrolysates at different pH values. (c) Differences in the molecular weights of *Botryocladia leptopoda* pepsin hydrolysates at the 0.5 mg/ml peptide concentration. All data is shown as the mean  $\pm$  SD (n = 3). Different letters for each enzyme indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

將紅葡萄藻之 pepsin 水解物參考 Sun *et al.* (2019) 之方法，將其劃分為不同分子量 (<3 kDa, 3 - 10 kDa 和 >10 kDa) 的區分物，並以肽濃度 0.5 mg/ml 進行進行 ACEi 活性分析結果顯示，分

子量>10 kDa 的區分物其 ACEi 值與未區分分子量之水解物 (mixed hydrolysate) 無顯著差異，並都呈現較高的抑制活性，然小分子量的區分物 (3 - 10 kDa 和 <3 kDa)，其 ACE 抑制活性則大幅降低。



**Fig. 6** Cell viability of *Botryocladia leptopoda* pepsin hydrolysates treated with raw 264.7 cells for 24 h. All data is shown as the mean  $\pm$  SD (n = 3). \* indicates a significant difference at  $p < 0.05$ .



**Fig. 7** The NO (nitric oxide) production of *Botryocladia leptopoda* pepsin hydrolysates treated with RAW 264.7 cells exposed to 1 µg lipopolysaccharide (LPS) for 24 h. All data is shown as the mean  $\pm$  SD (n = 3). Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

### (三) 發炎活性因子 NO 含量測定

慢性的發炎會導致血管壁增生，血液阻塞與血壓上升的風險，而伴隨發炎反應的產生是免疫巨噬細胞中一氧化氮的濃度增加 (Lee *et al.*, 2011)，因此若能有效的抑制發炎反應的發生則可能改善高血壓的狀況。

將不同濃度之紅葡萄藻 pepsin 水解物與鼠巨噬細胞 (Raw cell 264.7) 共同培養 24 hr 後測其細胞存活率，發現水解物於試驗濃度低於 2 mg/ml 時，細胞存活率皆高於 96.04%，但濃度達 3 mg/ml 以上時，其細胞存活率顯著降為 59.63%，表示水

解物的濃度低於 2 mg/ml 時，對鼠巨噬細胞無毒性 (Fig. 6)。

另依據細胞毒性與 ACE 抑制活性等試驗之結果，將 0.5 mg/ml 之紅葡萄藻 pepsin 水解物的不同分子量 (<3 kDa、3-10 kDa、>10 kDa) 區分物，以細胞試驗評估其對 NO 產生量之影響，結果顯示脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 處理組 (Control(-)) 相較於對照組可誘導鼠巨噬細胞產生大量的 NO，然分子量 >10 kDa 的紅葡萄藻胜肽則可調降 LPS 產生的 NO 量，表示具有調節發炎反應的能力 (Fig. 7)。

## 結 論

本研究利用蛋白質體學比對線上 BIOPEP-UWM 活性胜肽資料庫預測紅葡萄藻蛋白質序列中潛藏有抑制 ACE 的活性胜肽。故將紅葡萄藻以資料庫模擬酵素水解後，發現以 pepsin 水解 5 hr 之紅葡萄藻水解物較其他酵素處理可呈現較高的 ACE 抑制活性 ( $97.65 \pm 1.78\%$ )，而紅葡萄藻 pepsin 水解物區分為不同分子量 ( $< 3$  kDa,  $3-10$  kDa 和  $> 10$  kDa) 胜肽，並經由抑制發炎因子與 ACE 等試驗證實，胜肽分子量  $> 10$  kDa 的片段具有較高的 ACE 抑制作用，同時也能調降 LPS 誘導鼠巨噬細胞 (Raw cell 264.7) 所產生的 NO 量，顯示紅葡萄藻蛋白質具有開發成為機能性保健素材的潛力。此外在 BIOPEP-UWM 的資料庫預測上，調節血壓活性與預測的結果吻合，此也代表利用蛋白質體學之質譜技術搭配 BIOPEP-UWM 資料庫能夠作為協助製備功能性水解物或胜肽的有力工具。

## 謝 辭

本計畫執行期間，承蒙本所東部海洋生物研究中心提供紅葡萄藻，使得本試驗得以順利完成，謹此致謝。

## 參考文獻

- 余雅雯 (2005) 臺灣蜆煮汁乳酸發酵產品之生產技術及其生理活性探討。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文, 75 pp.
- 李沛珊, 黃君毅, 何源興 (2018) 葡萄藻之培育、成分分析及抗氧化能力探討。水試專刊, 61: 25-30.
- 衛生福利部 (2018) 107年死因統計結果分析。內政部衛生福利部統計處, 台北, 16 pp.
- 翁培翔, 王昭竣, 陳信舟, 洪培景, 張文騰, 余宗賢, 周金言, 高艾玲, 劉軒良, 蔡承佳, 朱紹西, 曾裕峰, 黃冬梨 (2020) LNG 冷排水應用於大型海藻養殖研發與試量產研究。石油季刊, 56: 83-103.
- A.O.A.C. (2005) Official Methods of Analysis (18 th ed.) Association of Official Analysis Chemists, Gaithersburg, Md, Chap., 35: 1.
- Albin, D. M., J. E. Wubben, and V. M. Gabert (2000) Effect of hydrolysis time on the determination of amino acids in samples of soybean products with ion-exchange chromatography or precolumn derivatization with phenyl isothiocyanate. J. Agric. Food Chem., 48(5): 1684-1691.
- Saad, H.B., I. B. Amara, N. Kharrat, M. A. Giroux-Metges, A. Hakim, K. M. Zeghal and H. Talarmin (2019) Cytoprotective and antioxidant effects of the red alga *Alsidium corallinum* against hydrogen peroxide-induced toxicity in rat cardiomyocytes. Arch. Physiol. Biochem., 125(1): 35-43.
- Bleakley, S. and M. Hayes (2017) Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. Foods, 6(5): 33-44.
- Chakrabarti, S., F. Jahandideh and J. Wu, (2014) Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. Biomed. Res., 2014: 608979.
- Fleurence, J. (1999) Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. Trends in Food Sci & Tech., 10(1): 25-28.
- Girgih, A. T., I. D. Nwachukwu, F. Hasan, T. N. Fagbemi, T. Gill and R. E. Aluko (2015) Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates and their antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. Food Nutr. Res., 59: 29788-29788.
- Gomes, C., D. Ferreira, J. P. F. Carvalho, C. A. V. Barreto, J. Fernandes, M. Gouveia, F. Ribeiro, A. S. Duque and S. I. Vieira (2020) Current genetic engineering strategies for the production of antihypertensive ACEI peptides. Biotechnol Bioeng., 117(8):2610-2628.
- Harnedy, P. A., M. B. O'Keefe and R. J. FitzGerald (2015) Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata*. Food Chem., 172: 400-406.
- Holdt, S. L. and S. Kraan (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. J. Appl. Phycol., 23(3): 543-597.
- Huang, B. B., H. C. Lin and Y. W. Chang (2015) Analysis of proteins and potential bioactive peptides from tilapia (*Oreochromis* spp.) processing co-products using proteomic techniques coupled with BIOPEP database. J. Funct. Foods, 19: 629-640.
- Kadam, S. U., C. Alvarez, B. K. Tiwari, and C. P. O'Donnell (2017) Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. Food Res. Int., 99(3): 1021-1027.
- Kim, S. K. and E. Mendis (2006) Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review.

- Food Res. Int., 39: 383-393.
- Lakshmi, V., R. Kumar, P. Gupta, V. Varshney, M. N. Srivastava, M. Dikshit, P. K. Murthy and S. Misra-Bhattacharya, (2004) The antifilarial activity of a marine red alga, *Botryocladia leptopoda*, against experimental infections with animal and human filariae. Parasitol. Res., 93(6): 468-474.
- Lee, W. W., G. Ahn, W. A. J. P. Wijesinghe, X. Yang, C. I. Ko, M. C. Kang, B. J. Lee and Y. J. Jeon (2011) Enzyme-assisted extraction of *Ecklonia cava* fermented with *Lactobacillus brevis* and isolation of an anti-inflammatory polysaccharide. Algae, 26: 343-350.
- Iwaniak, A., P. Minkiewicz and M. Darewicz (2014) Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 13: 114-134.
- Minkiewicz, P., A. Iwaniak and M. Darewicz (2019) BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: current opportunities. Int. J. Mol. Sci., 20: 5978.
- Morris, H. J., O. Carrillo, A. Almarales, R. C. Bermúdez, Y. Lebeque, R. Fontaine, G. Llauradó, and Y. Beltrán (2007) Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. Enzyme Microb. Technol., 40(3): 456-460.
- Pereira, L. (2011) Seaweeds: ecology, nutrient composition and medicinal uses. Nova Science Publishers, Coimbra, 15-47.
- Qu, W., H. Ma, Z. Pan, L. Luo, Z. Wang and R. He (2010) Preparation and antihypertensive activity of peptides from *Porphyra yezoensis*. Food Chem., 123(1): 14-20.
- Quindere, A. L., G. R. Santos, S. N. Oliveira, B. F. Glauser, B. P. Fontes, I. N. Queiroz, P. A. Mourao (2014) Is the antithrombotic effect of sulfated galactans independent of serpin? J. Thromb. Haemost., 12(1): 43-53.
- Qureshi, N., B. C. Saha, R. E. Hector and M. A. Cotta (2008) Removal of fermentation inhibitors from alkaline peroxide pretreated and enzymatically hydrolyzed wheat straw: production of butanol from hydrolysate using *Clostridium beijerinckii* in batch reactors. Biomass Bioenergy, 32: 1353-1358.
- Rutherford, S. M. (2010) Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in Hydrolysates: a review. J. AOAC Int., 93(5): 1515-1522.
- Safi C, M. Charton, O. Pignolet, F. Silvestre, C. Vaca-Garcia and P. Y. Pontalier (2013) Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. J. Appl. Phycol., 25: 523-529.
- Sheih, I. C., T. J. Fang and T. K. Wu (2009) Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. Food Chem., 115(1): 279-284.
- Sun, S., X. Xu, X. Sun, X. Zhang, X. Chen and N. Xu (2019) Preparation and identification of ACE inhibitory peptides from the marine macroalga *Ulva intestinalis*. Mar. Drugs, 17(3): 179.
- Taboada, M. C., R. Millán and M. I. Miguez (2013). Nutritional value of the marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and nori (*Porphyra purpurea*) as food supplements. J. Appl. Phycol., 25(5): 1271-1276.
- Tejano, L. A., J. P. Peralta, E. E. S. Yap, F. C. A. Panjaitan and Y. W. Chang (2019) Prediction of bioactive peptides from *Chlorella sorokiniana* proteins using proteomic techniques in combination with bioinformatics analyses. Int. J. Mol. Sci., 20(7): 1786-1802.
- Yousr, M. and N. Howell (2015) Antioxidant and ACE inhibitory bioactive peptides purified from egg yolk proteins. Int. J. Mol. Sci., 16(12): 29161-29178.