

國立臺灣海洋大學食品科學系碩士班

專題討論書面報告

吳郭魚副產物之活性胜肽特性及應用

任課老師： 蕭心怡 老師

林泓廷 老師

指導老師： 張祐維 老師

學 號： 40842014

學 生： 游庭緯

報告日期： 2020 年 03 月 14 日

內容 40%	時間掌控 10%	表達能力 30%	投影片 10%	書面資料 10%

指導教授簽名：

吳郭魚副產物之活性胜肽特性及應用

游庭緯

2020/3/14

大綱

一、前言

二、分析吳郭魚副產物之活性胜肽

三、吳郭魚皮分離海洋膠原蛋白肽之特性及創傷癒合效果

四、吳郭魚骨及魚皮蛋白水解物的降血壓特性

五、結論

摘要

吳郭魚為目前全世界最重要的淡水養殖漁業之一，全世界對於該原料的需求更是日益增加，因此在加工中也會產生越來越多的副產物，這些副產物在過去因並未受到重視，少部分用於養殖業的飼料加工原料，更多的則是被作為廢棄物，這種不合時宜的處理方式造成了目前大量的浪費、環保上的疑慮，隨著時代的演進，這種處理方式也逐漸備受淘汰。以鹼處理後的吳郭魚骨、魚皮分離蛋白以 BIOPEP 資料庫分析，吳郭魚副產物之生物活性肽主要具有抗氧化、ACE 抑制、抗血酸凝集、抗失憶的活性胜肽。以蛋白酶水解吳郭魚皮獲得的海洋膠原蛋白肽以 HaCaT 及紐西蘭白兔進行創傷修復試驗，並以電子顯微鏡觀察傷口組織，結果表示，吳郭魚皮副產物分離的海洋膠原蛋白肽對於傷口的癒合及疤痕的修復具有較高的恢復效果。以胃蛋白酶水解魚骨膠原蛋白的魚骨膠原蛋白水解物，注射入高血壓小鼠體內，觀察小鼠體內降血壓效果，經實驗得證，胃蛋白酶水解魚骨膠原蛋白的水解物能有效的使體內血壓下降。由三個實驗總結，吳郭魚副產物經過酸、鹼處理或蛋白酶水解的水解物具有各種活性胜肽，可以衍生為高經濟價值的健康、保健食品或與醫療配合，減少化學合成藥物的使用，同時減少處理副產物所造成的環境汙染及成本。

29 一、前言

30 吳郭魚為世界水產養殖業重要的淡水魚類之一。跟據糧食及農業組織
31 2015 年的數據統計，2004-2013 年的世界吳郭魚產量由 179.5 萬噸增加
32 至 488.6 萬噸，每年約增加近 10%。以目前世界對於該原料的需求量日
33 漸增加，吳郭魚在加工過程產生的副產物也逐漸成為目前炙手可熱的研究
34 項目。吳郭魚在加工過程產生的副產物包括：魚頭、魚骨、魚皮、內臟及
35 魚鱗這些部位 (Oliveira et al., 2010)。目前這些副產物因沒有更充分的利用
36 用途，故目前多用於混合低價值的動物性飼料販售或廢棄物處理。然而吳
37 郭魚的副產物中同樣包含了大量的蛋白質，根據不同的部位包含了 16%-
38 30% 的蛋白質。又鑒於目前國內外有許多研究發表指出，很大部分水生
39 生物之蛋白質經加工技術分離能產生的小分子產物能作為功能性食品成分
40 或膳食補充劑的良好來源。因此以吳郭魚副產物更進研究，發現其蛋白質
41 經通過酵素水解或酸、鹼處理所分離後的水解產物或活性肽能提供在民生
42 上有相當大的用途，包括其水解產物的抗菌活性、抗氧化、血管緊張素轉
43 化酶 (ACE) 的抑制、鈣結合肽可預防鈣缺乏症，此外其海洋膠原蛋白肽
44 對於生醫方面也有相重大的突破，藉由該活性肽結合敷用藥膏，能使
45 燒燙等外傷有顯著的修復能力。本篇主旨探討利用吳郭魚副產物所分離的
46 水解物探討其特性，並依其生態特性衍生應用於食品及醫療，使副產物加
47 工為高經濟價值產品及降低環境污染及浪費。

48 二、分析吳郭魚副產物之活性胜肽

49 以吳郭魚 (*Oreochromis spp.*) 之副產物分別為魚骨及魚皮作為實驗樣
50 品。使用改良後的鹼性溶解方法 (Raghavan et al., 2009) 製備魚骨蛋白及魚
51 皮蛋白樣品。

52 其 SDS-PAGE 結果如 Fig. 1，分別表示標準品、魚骨樣品 (A)、鹼
53 溶解魚骨樣品 (B)、魚皮樣品 (C) 及鹼溶解魚皮樣品 (D)。由電泳吳郭魚
54 骨的蛋白帶 (A1、A2) Table 2 中包含 α 肌動蛋白、肌酸激酶 M、果糖-
55 二磷酸醛縮糖酶 A 和肌鈣蛋白 T；然鹼溶解魚骨樣品 (B1) 只有 α 肌
56 動蛋白，表示經鹼處理後僅能分離出 α 肌動蛋白。而魚皮及經鹼溶解的魚
57 皮樣品被檢測出含有膠原 α -1 (I) 鏈狀亞型 X2 及膠原 α -2 (I) 鏈狀

58 亞型 X1。Table1 則表示各樣品中蛋白質含量，魚骨及鹼溶解魚骨樣品
59 分別為 $31.17 \pm 0.75\%$ 和 $82.06 \pm 0.04\%$ ；魚皮及鹼溶解魚皮樣品則分別為
60 $80.75 \pm 0.86\%$ 和 $89.47 \pm 0.86\%$ ，經鹼溶解樣品在數據上皆有較高表現是
61 由於鹼處理將樣品中蛋白質分離所造成。接下來，以 LC-ESI-MS/MS
62 分析吳郭魚蛋白帶，鑑定其胰蛋白酶肽的代表性光譜，分別為 (D1) 的
63 GEAGPSGPSGAVGPAGAR 片段圖譜 Fig. 2-(A) 及 (A2) 的
64 VAPEEHPTLLTEAPLNPK 片段圖譜 Fig. 2-(B)。由 BLAST 分析鑑定的膠
65 原亞型的同源性 Fig. 3 觀察 (C1 及 C2)蛋白質序列，其同一性為 62%
66 且 陽性率為 72%，表示該兩者之間具有高度同源性，並可能具有相似的
67 生物活性肽，此現象可能是膠原蛋白屬於參股螺旋的穩定結構 (Gelse et
68 al., 2003)。利用 BIOPEP 數據庫分析 (B1) 蛋白帶的 α 肌動蛋白潛在生
69 物活性肽，由 Fig. 4 發現大多數生物活性肽為二肽或三肽且肽鏈長度小
70 於 10 個胺基酸所組成。 α 肌動蛋白主要的潛在生物活性肽為 ACE 抑制
71 肽 (146 條)、抗氧化劑肽 (16 條)、少量的抗失憶、抗血栓形成、二肽基
72 氨基肽酶 IV 抑制及葡萄糖攝取刺激活性肽。(D2) 蛋白帶的 α -2 (I) 鏈
73 狀亞型 X1 潛在生物活性肽則為 ACE 抑制肽 (1024 條)、抗失憶肽
74 (254 條) 和抗血栓肽 (294 條)，此外這些肽中的 GP、PG 及 PGP 肽為甘
75 脯氨酸肽家族，具有抗應激行為障礙和對胃粘膜的保護作用 (Badmaeva et
76 al., 2006; Kopylova et al., 2007; Samonina et al., 2002)。由 Table 3 觀察到了
77 7 種鑑定的蛋白質中抗氧化、ACE 抑制、抗血栓形成和抗失憶的活性，
78 但 α 肌動蛋白和肌鈣蛋白 T 卻沒有抗血栓形成和抗失憶的活性。分析潛
79 在的生物活性肽的出現頻率表示，7 種蛋白質中 ACE 抑制肽具有最高的
80 頻率。利用 BIOPEP 數據庫中“酶作用”分析的結果，由 Table 4 鑑定得知
81 有 10 種蛋白酶證明具有產生較大量具有潛在生物活性的生物活性肽的能
82 力，且不同的蛋白酶對於各蛋白質樣品的剪切具有不同的最佳產出能力。
83 木瓜蛋白酶作用於 α 肌動蛋白、膠原 α -1 (I) 鏈狀亞型 X2 及膠原 α -
84 2 (I) 鏈狀亞型 X1，會產生最佳的 ACE 抑制肽產量；而鳳梨蛋白酶、
85 胰凝乳蛋白酶、無花果蛋白酶、胰彈性蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K
86 是產生膠原 α -1 (I) 鏈狀亞型 X2 及膠原 α -2 (I) 鏈狀亞型 X1 釋放
87 具有最多種生物學活性的肽的蛋白酶。

88 實驗結果得知，從吳郭魚加工副產物中鑑定出的蛋白質具有產生高度
89 的生物活性肽。因此，通過適合的蛋白質提取，濃縮，純化和鑑定技術，這
90 些蛋白質可以轉化用於食品，化妝品和保健的高附加價值產品。

91 三、吳郭魚皮分離海洋膠原蛋白肽之特性及創傷癒合效果

92 以吳郭魚皮為實驗樣品，經前處理後加入中性蛋白酶及木瓜蛋白酶分
93 解並加熱至 100°C 使酵素失活。離心將上清液過濾純化，最後進行減壓濃
94 縮及噴霧乾燥後將得到海洋膠原蛋白肽 (MCPs) 保存至後續分析及試驗。

95 利用 HPLC 測定 MCPs 分子量分佈如 Fig. 5 並配合回歸方程式計
96 算，得知小於 1、3 和 5kDa 的分子分別佔 73.92%，95.84%和 99.14%，說
97 明吳郭魚的 MCPs 主要以小分子量的多肽所構成。由於 MCPs 的小分子量
98 結構上有許多極性殘基暴露於水中，造成大量的氫鍵產生，因此 MCPs 具
99 有較高的水溶性 (Gbogouri et al., 2004)。以胺基酸分析儀對 MCPs 進行分
100 析，由 Table 5 可以了解到 MCPs 有 17 種胺基酸。從胺基酸組成角度來
101 看 MCPs 的胺基酸殘基多為親水性的，占了總殘基的 58% 以上，這也說
102 明了 MCPs 的親水性作用於組織改善的相容性會有較高表現的原因。最後
103 以 FTIR 進行紅外光譜分析以確定 MCPs 多肽二級結構，由 Fig. 6 可以
104 看到，多肽的酰胺 I、II 和 III 帶的特徵吸收峰分別在 1650、1534 和
105 1243cm⁻¹ 處 (Yang et al., 2016)，表示吳郭魚皮的 MCPs 內部的主要結構是
106 無規則的捲曲。

107 接下來進行創傷癒合試驗。利用 HaCaT 細胞體外劃痕試驗 MCP 對癒
108 合過程的影響。分別對 HaCaT 細胞進行劃痕後做了包括對照組共 6 組的
109 試驗，由 Fig. 7 可以發現在添加 10.0 ng / mL 濃度的 MCPs 人工皮在 24
110 小時內劃痕閉合。在 6 小時並未有顯著的表現，而 12 小時後開始有顯著
111 的效果。由結果表示，吳郭魚所分離的 MCPs 對於 HaCaT 細胞能有效的
112 引導細胞遷移。接下來將三組紐西蘭白兔後腿以燙傷器在設定條件下燙傷，
113 於一天後以顯微鏡觀察表皮，Fig. 8 看到真皮層出現凝固性壞死、皮下水腫、
114 血管擴張及橫紋肌局部性的壞死。以燙傷未治療、燙傷藥膏、MCPs 三組進
115 行觀察，Table 6 表示，前 7 天由於組織液滲出，傷口癒合度為皆為負值，
116 而第 11、14 天開始，燙傷藥膏組及 MCPs 組開始有顯著的癒合，尤其

117 MCPs 組在第 11 天傷口癒合率為 $38.8\% \pm 22.8$ 的顯著表現，且第 18 天
118 幾乎完全癒合；而未治療組則僅達到 $72.1\% \pm 13.9$ 的癒合程度。因此 MCPs
119 對白兔傷口癒合具有有效作用。此外，Fig. 9 觀察到第 14 天，未治療組及
120 燙傷藥膏組幾乎沒有新表皮覆蓋，而 MCPs 組則幾乎完全覆蓋，而在第 28
121 天三組的傷口皆完全被新表皮所覆蓋，但未治療組及燙傷藥膏組的肌肉層
122 可以觀察到有疤痕組織形成。在這項研究中，發現吳郭魚皮中的 MCPs 可
123 以通過減少炎症，促進肉芽組織形成以及促進上皮細胞，內皮細胞的快速
124 增殖來加速兔皮膚燙傷傷口的癒合過程並改善其癒合效果及合成纖維細胞
125 (Pazyar et al., 2014; Maver et al., 2015; Gurtner et al., 2008; Chen et al., 2013)。

126 綜合上述可以得論，吳郭魚皮經過中性蛋白酶及木瓜蛋白酶水解的
127 MCPs 為小分子量的多肽所構成，且其結構為不規則的捲曲，而 MCPs 對
128 於細胞牽引及傷口的癒合或護理是相當具有效果的，然其中癒合過程的分
129 子機制目前尚未確定。

130 四、吳郭魚骨及魚皮蛋白水解物的降血壓特性

131 以吳郭魚副產物之魚骨及魚皮為樣品，使用 Raghavan 等人 (2009)及
132 Zhang 等人 (2014) 方法做修改，分離出魚骨膠原蛋白 (FPI) 及魚皮膠原
133 蛋白 (SPI) 的樣品。

134 首先將兩組樣品分別以 Shamloo 等人 (2013) 的方法，使用胃蛋白酶、
135 鳳梨蛋白酶、木瓜蛋白酶在設定條件下進行水解，再將酵素失活後並分析
136 其水解產物，分別為胃蛋白酶水解物 (FPHPe)、木瓜蛋白酶水解物 (FPHPa)
137 及 鳳梨蛋白酶水解物 (FPHBr)。在水解過程中的不同時間點以
138 Charoenphun 等人 (2013) 所發表方法以測量水解度 (DH)。由 Fig. 10 所
139 示，FPI 水解的第一個小時，胃蛋白酶和鳳梨蛋白酶水解速度高於木瓜蛋白
140 酶，而在 30 分鐘後水解速度明顯下降；SPI 水解與 FPI 水解有相似的現
141 象，然 30 分鐘後其鳳梨蛋白酶水解速度高於其他兩者，但 DH 不超過
142 10%。由於 SPI 為三股螺旋的結構，導致酵素較難水解，因此 SPI 的水解
143 產物明顯低於 FPI。由 Table 7 可以看到在水解 4 小時後，水解 FPI 的
144 FPHPe 和 FPHBr 產生的 FPH 高於 FPHPa；而水解 SPI 的 SPHPe、SPHPa
145 所產生的 SPH 高於 SPHBr。接下來進行 SDS-PAGE 分析，由 Fig. 11 FPI

146 蛋白水解物的 B、C、D 道並未觀察到高於 37kDa 的條帶，表示蛋白質已
147 被水解。SPI 蛋白水解物的 F 道主要是由大於 25kDa 的胜肽組成；G 道
148 則為 10-50kDa 胜肽所組成。FPH 和 SPH 的蛋白條帶與 DH 有密切相關。
149 隨著 DH 隨時間增加，分子量低於 14.4 kDa 的肽帶變得更加明顯
150 (Shamloo et al., 2012)。在 BIOPEP 數據庫中預測活性肽，由預測結果 Table
151 8 觀察到，FPI 被鑑定出具有 ACE 抑制的蛋白質為 α 肌動蛋白、重鏈肌
152 球蛋白、肌酸激酶、肌鈣蛋白 T 及果糖-二磷酸醛縮糖酶 A，而其出現
153 頻率為 0.350–0.414 (Huang et al., 2015) 小於 SPI 被鑑定到的膠原 α -1(I)
154 及膠原 α -2 (I) 的出現頻率為 0.722 和 0.756，因此可以判斷 SPI 可能比
155 FPI 的蛋白質來源含有更多的 ACE 抑制肽。而由 Fig. 12 可以觀察到
156 FPH 對 ACE 抑制活性皆高於 SPH，且 DH 對於 ACE 抑制活性呈正相
157 關，而 Fig. 13 則說明，通過超膜過濾分離的胃蛋白酶水解的魚骨蛋白中
158 ACE 抑制肽的 70% 以上是二肽、約 18% 是三肽所組成，其中以 <1kDa
159 的 FPHPe 對 ACE 抑制具有最好的作用，且隨著分子量的增加而不斷降
160 低其作用。另外血管收縮素原酶的抑制則是 FPHPe <1kDa 為最佳。由於
161 FPHPe 具有較好的抑制作用因此另外進行了在雄性自發性高血壓大鼠
162 (SHR) 中的降壓試驗。由 Fig. 14 中可以觀察到鹽水的攝取在 24 小時無
163 法使 SHR 的收縮壓 (SBP)、舒張壓 (DBP) 及動脈壓 (MAP) 有效降低，而
164 FPHPe 則有明顯效果，並且在 2 小時出現大幅度的下降，因此可以判定
165 FPHPe 具有快速且持久的減壓效果。

166 綜合實驗結論可得知，吳郭魚副產物中的魚骨及魚皮可以利用不同的
167 酵素水解，產生蛋白質水解物，能針對外血管收縮素原酶及 ACE 產生有
168 效的抑制作用，而 DH 值的高低對於抑制效果也會有很大的影響。FPHPe
169 在 SHR 中表現出具有快速且持久的減壓效果表明，吳郭魚骨的蛋白水解
170 物能夠發展成降壓功能食品或保健食品。

171

172 五、結論

173 綜合以上實驗總結，吳郭魚之副產物，經過不同酵素水解或是鹼溶解
174 等方法，得到的生物活性肽，是具有包括了抗氧化、ACE 抑制、抗血栓形
175 成和抗失憶、增加創傷癒合的功效。因此吳郭魚副產物的再利用除了對於

176 經濟、環境的益處提升之外，對於民生上也是具有相當大的突破；然研究中
177 尚無生物活性肽可能會造成的負面影響做探討，如食用或使用水產的衍生
178 產品是否會產生過敏現象發生或其他的問題，這方面也是相當值得被討論。

179

180 六、參考文獻

181 Badmaeva, S. E., Kopylova, G. N., Abushinova, N. N., Samonina, G. E., &
182 Umarova, B. A. (2006). Effects of glyprolines on stressinduced behavioral
183 disorders in rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 36, 409–413.

184 Chen, X., Shi, Y., Shu, B., Xie, X., Yang, R., Zhang, L., Ruan, S., Lin, Y.,
185 Lin, Z., Shen, R., Zhang, F., Feng, X., & Xie, J. (2013). The effect of porcine
186 ADM to improve the burn wound healing. *International Journal of Clinical and*
187 *Experimental Pathology*, 6, 2280–2291.

188 Gelse, K., Poschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens- Structure, function,
189 and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531–1546.

190 Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence
191 of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts
192 hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69, C615–C622.

193 Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound
194 repair and regeneration. *Nature*, 453, 314–321.

195 **Huang, B. B., Lin, H. C., & Chang, Y. W. (2015). Analysis of proteins**
196 **and potential bioactive peptides from tilapia (*Oreochromis spp.*) processing**
197 **co-products using proteomic techniques coupled with BIOPEP database.**
198 ***Journal of Functional Foods*, 19, 629-640.**

199 **Hu, Z., Yang, P., Zhou, C., Li, S., & Hong, P. (2017). Marine collagen**
200 **peptides from the skin of nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*):**
201 **Characterization and wound healing evaluation. *Marine drugs*, 15, 102.**

202 Kopylova, G. N., Bakaeva, Z. V., Badmaeva, S. E., Umarova, B. A.,
203 Samonina, G. E., & Guseva, A. A. (2007). Therapeutic effects of glyprolines (PGP,
204 GP, and PG) in rats with stress-induced behavioral disorders. *Bulletin of*
205 *Experimental Biology and Medicine*, 143, 167–170.

206 **Lin, H. C., Alashi, A. M., Aluko, R. E., Sun Pan, B., & Chang, Y. W.**
207 **(2017). Antihypertensive properties of tilapia (*Oreochromis spp.*) frame and**
208 **skin enzymatic protein hydrolysates. *Food and Nutrition Research*, 61(1),**

209 **1391666.**

210 Maver, T., Hribernik, S., Mohan, T., Smrke, D. M., Maver, U., & Stana-
211 Kleinschek, K. (2015). Functional wound dressing materials with highly tunable
212 drug release properties. *RSC Advances*, 77873–77884.

213 Oliveira Filho, P. R. C., Flavia, M. N., Ramos, K. K., Trindade, M. A., &
214 Viegas, E. M. M. (2010). Elaboration of sausage using minced fish of Nile tilapia
215 filleting waste. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 1383–1391.

216 Pazyar, N., Yaghoobi, R., Rafiee, E., Mehrabian, A., & Feily, A. (2014). Skin
217 wound healing and phytomedicine: A review. *Skin Pharmacol. Physics*, 27, 303–
218 310.

219 Samonina, G., Ashmarin, I., & Lyapina, L. (2002). Glyproline peptide family:
220 Review on bioactivity and possible origins. *Pathophysiology*, 8, 229–234.

221 Shamloo, M., Bakar, J., Mat Hashim, D., & Khatib, A. (2012). Biochemical
222 properties of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates.
223 *International Food Research*, 19:183–188.

224 Yang, G., Wu, M., Yi, H., & Wang, J. (2016). Biosynthesis and
225 characterization of a non-repetitive polypeptidederived from silk fibroin heavy
226 chain. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*,
227 59, 278–285.

228

229

230

231

232

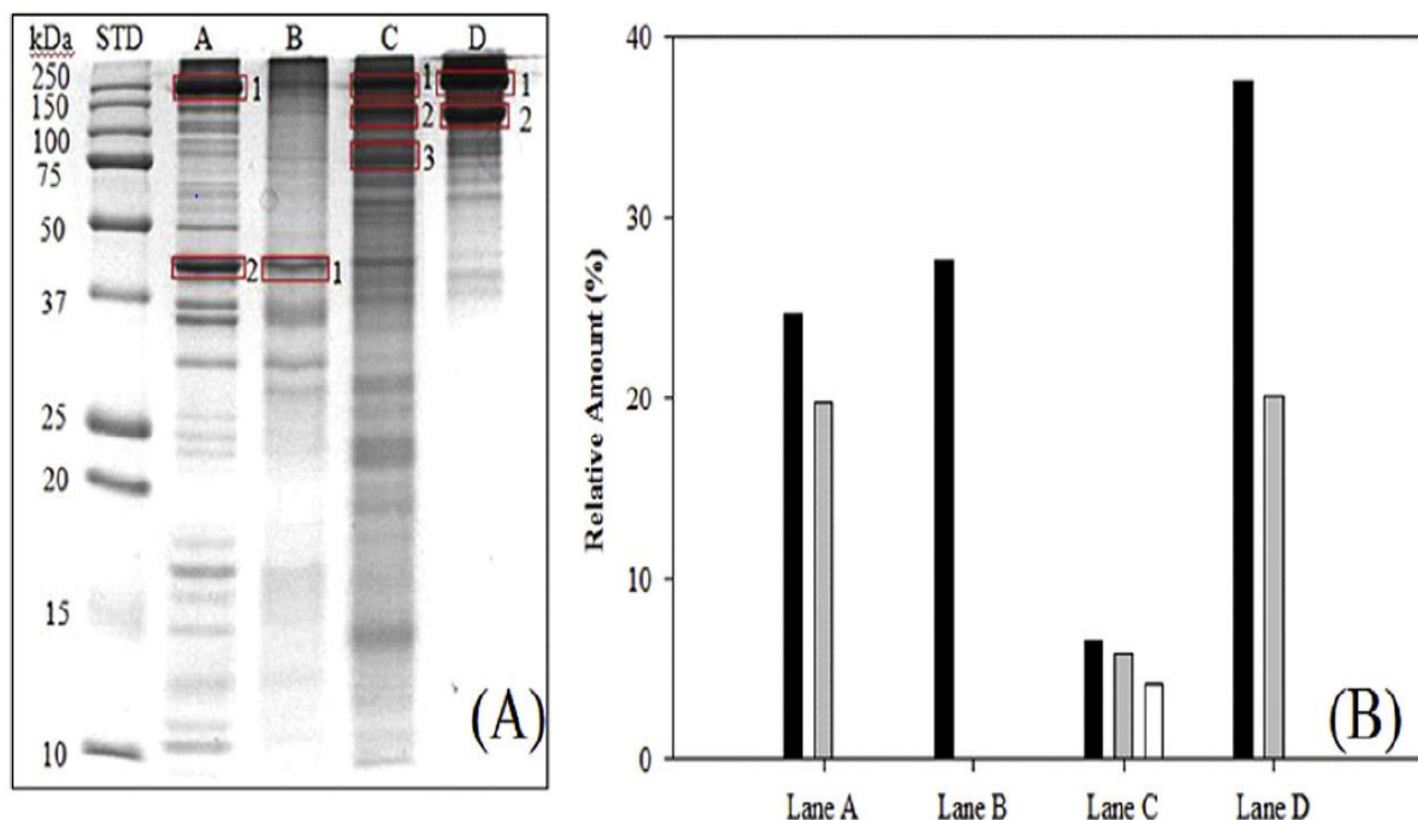
233

234

235

236

237



238 Fig. 1 - (A) SDS-PAGE of samples from the tilapia frame (lane A), frame
 239 protein isolate (lane B), skin (lane C), and skin protein isolate (lane D); (B)
 240 relative amounts of proteins per lane; band 1 (black), band 2 (grey), and band 3
 241 (white).

(Huang, et al., 2016)

256 Table 1 - Crude protein contents and yields of tilapia frame and skin, and their
257 protein isolates.

Samples	Protein content (% (w/w)) ^a	Yields (% (w/w)) ^b
Frame	31.17 ± 0.75	NA
Frame protein isolate	82.06 ± 0.04	11.93 ± 0.88
Skin	80.75 ± 0.97	NA
Skin protein isolate	89.47 ± 0.86	23.04 ± 4.42
NA: not available.		
^a Crude protein content was determined by micro-Kjeldahl method with triplicate measurement on dry basis.		
^b Yields were calculated on the basis of the protein weights of tilapia frame and skin protein isolates against the tilapia frame and skin on dry basis.		

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

(Huang, et al., 2016)

275 Table 2 - Tilapia proteins identified by SDS-PAGE and LC-MS/MS analy

Protein name	Accession (NCBI)	Score	Sequence coverage (%)	Length (AA)	Molecular weights from NCBI database (kDa)	Molecular weights (kDa) estimated from SDS-PAGE ^a
Alpha actin	gil125971743	676	50	353	39.3	41.3 (A2)
Collagen alpha-1(I) chain-like isoformX2	gil542241967	262	6	1450	136.7	41.2 (B1) 233 (C1, D1) 120.7 (C2) 119.0 (D2) 75 (C3)
Collagen alpha-2(I) chain-like isoformX1	gil348539636	453	10	1355	126.9	233 (C1, D1) 120.7 (C2) 119.0 (D2) 75 (C3)
Creatine kinase M-type-like	gil348524677	506	43	381	43.0	41.3 (A2)
Fructose-bisphosphate aldolase A	gil348501948	301	42	363	39.6	41.3 (A2)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle-like	gil542181730	2071	29	1523	173.3	238.6 (A1)
Troponin T	gil348503780	206	17	280	32.9	41.3 (A2)
^a Molecular weights of protein bands were estimated by using gel image analysis software (Vision-Capt, V16.08a); letters in parentheses represent the protein bands identified in Fig. 1(A).						

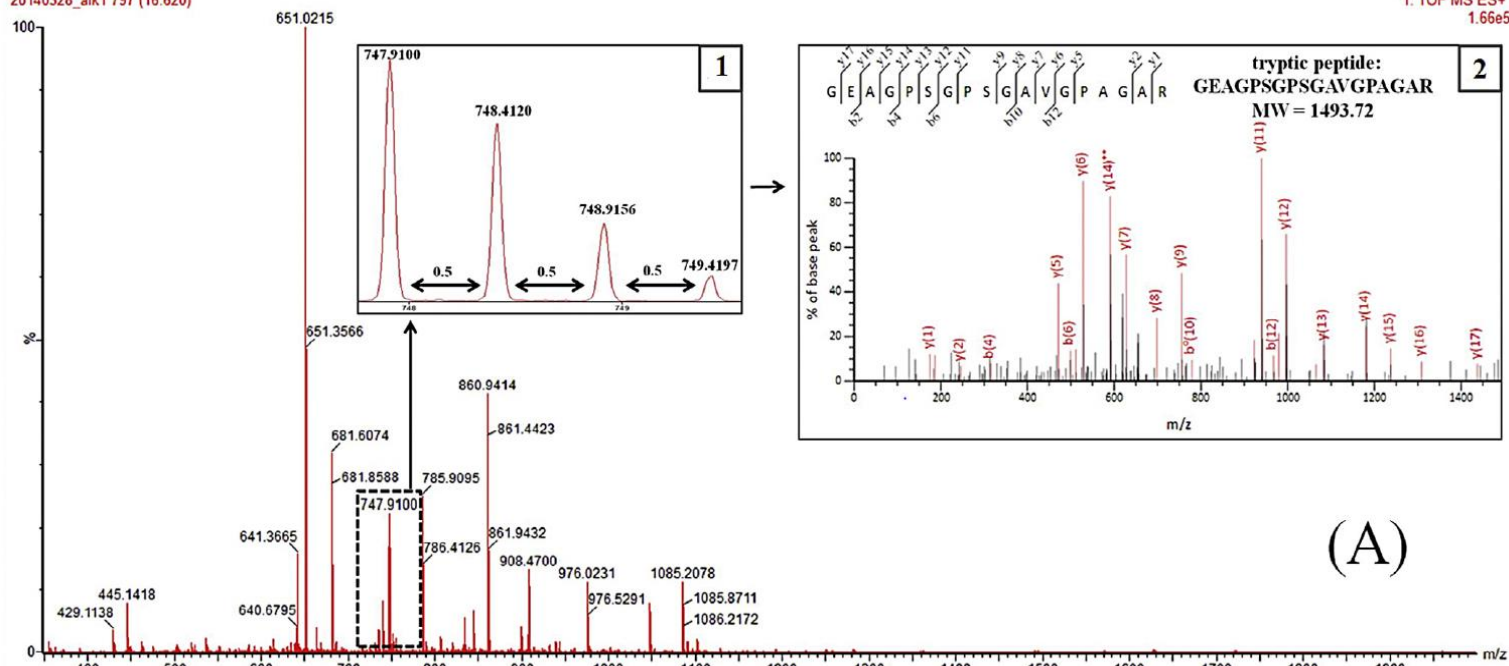
276

277

278

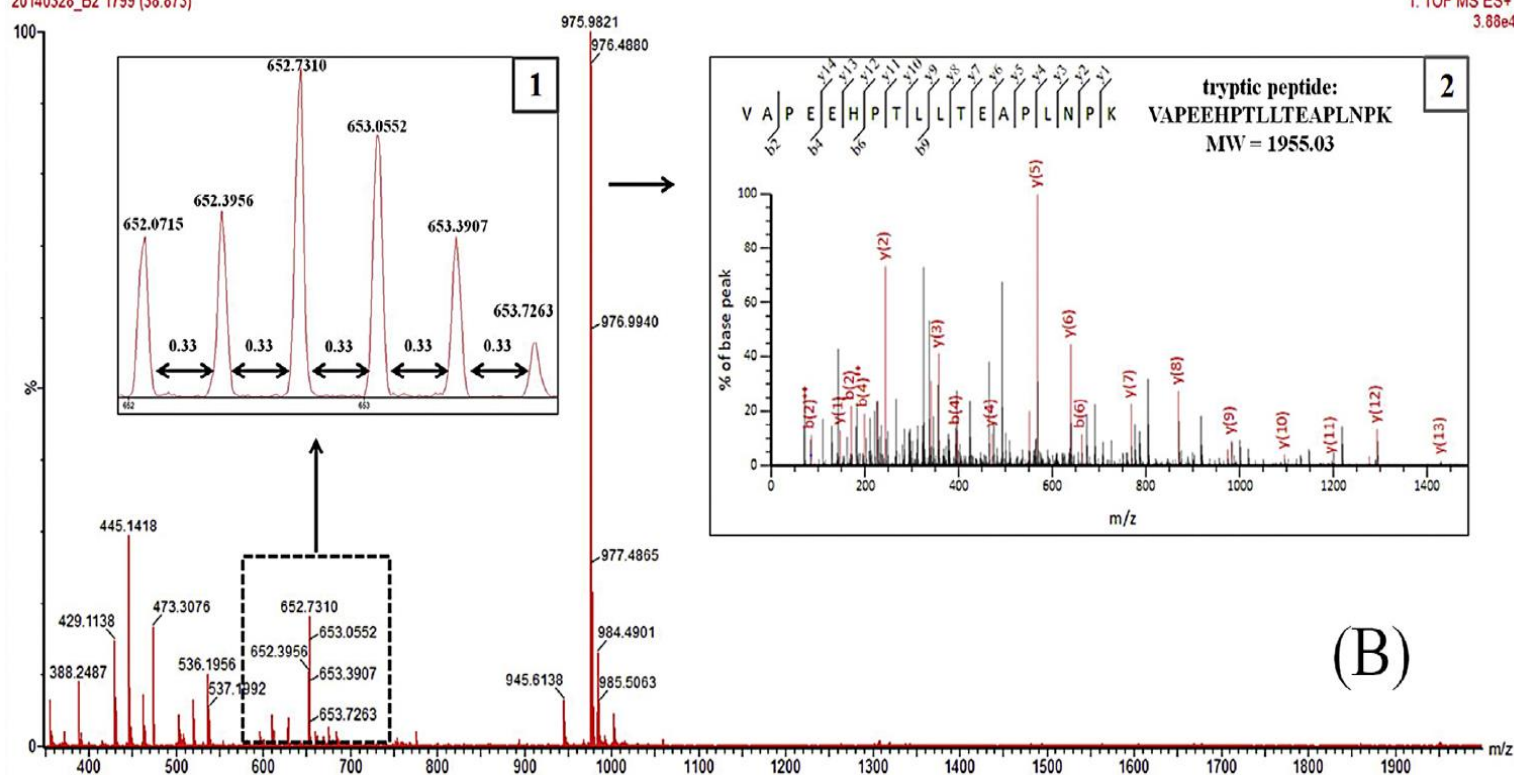
(Huang, et al., 2016)

20140328_alk1 797 (16.620)

1: TOF MS ES+
1.66e5

(A)

20140328_B2 1799 (38.873)

1: TOF MS ES+
3.88e4

(B)

279 Fig. 2 - Representative spectra of identified tryptic peptide scanning at m/z
 280 region 400–1900 Da with double charge (A) and triple charge (B) from LC–
 281 ESI–MS/MS analysis.

282

283

284

(Huang, et al., 2016)



Fig. 4 - Potential bioactive peptides identified from the alpha actin sequence (NCBI: gi|125971731) using BIOPEP database.

(Huang, et al., 2016)

298 Table 3 - Number of potential bioactive peptides of identified proteins using BIOPEP's Profiles of potential biological activity tool.

Proteins	Antioxidant	ACE-inhibitory	Antithrombotic	Antiamnestic
Alpha actin	16 (0.045)	146 (0.414)	–	–
Collagen alpha-1(I) chain-like isoform X2	28 (0.019)	1047 (0.722)	294 (0.203)	272 (0.188)
Collagen alpha-2(I) chain-like isoformX1	27 (0.020)	1024 (0.756)	294 (0.217)	254 (0.187)
Creatine kinase M-type-like	18 (0.047)	148 (0.388)	2 (0.005)	1 (0.003)
Fructose-bisphosphate aldolase A	30 (0.083)	149 (0.410)	2 (0.006)	3 (0.008)
Myosin heavy chain, fast skeletal muscle-like	97 (0.064)	533 (0.350)	3 (0.002)	2 (0.001)
Troponin T	17 (0.061)	109 (0.389)	–	–
Numbers in parentheses represent frequency of bioactive peptides with specific activities and numbers are rounded off to the 3rd decimal place.				

299

300

301

302

303

304

305

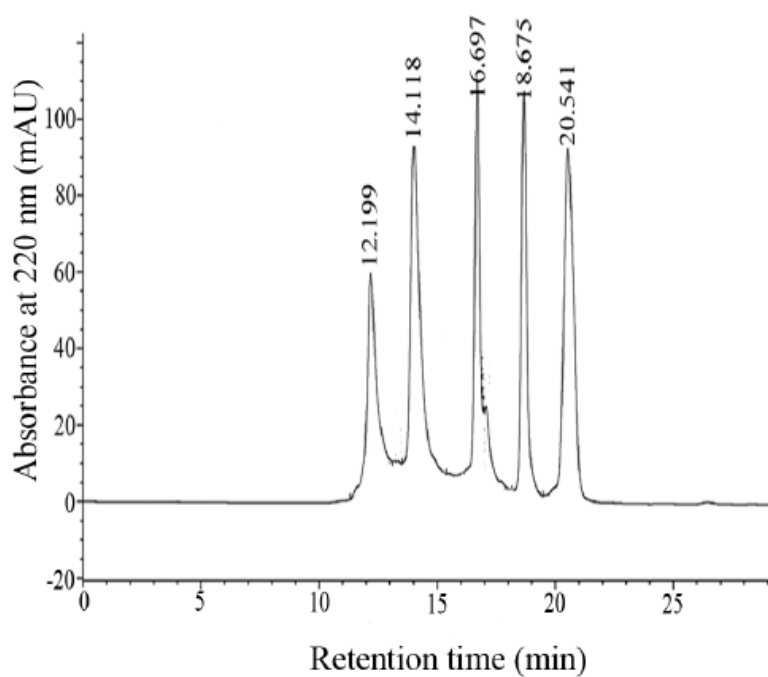
306

(Huang, et al., 2016)

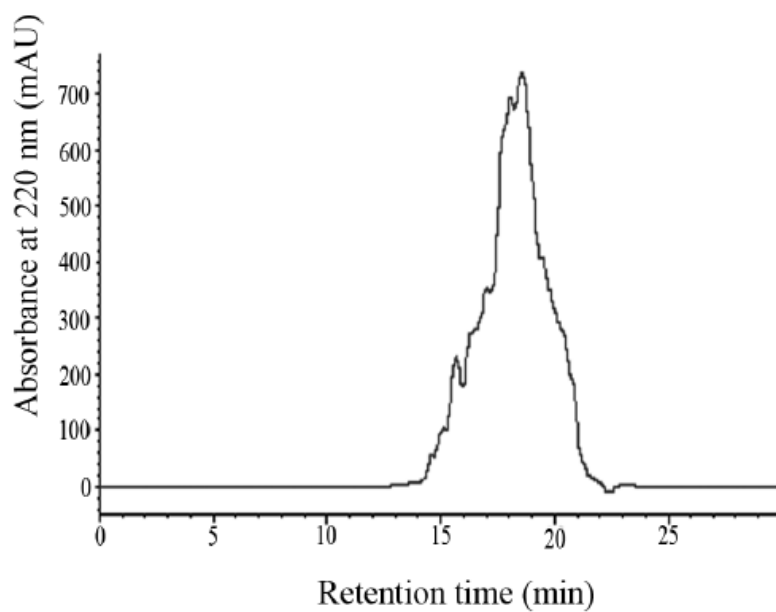
Table 4 - Number of predicted bioactive peptides to be released from identified tilapia proteins using BIOPEP's enzyme action tool.

Protease	Actin				Myosin heavy chain				Collagen alpha-1(I) chain ^a				Collagen alpha-2(I) chain ^b			
	AO	ACE	AT	AA	AO	ACE	AT	AA	AO	ACE	AT	AA	AO	ACE	AT	AA
Bromelain	1	12	1	1	3	33	–	–	2	96	35	35	1	80	19	19
Chymotrypsin A	1	3	–	–	3	6	–	–	1	4	–	–	1	5	–	–
Chymotrypsin C	2	12	1	1	13	53	1	1	1	80	45	45	–	65	37	37
Ficin	–	7	1	1	13	60	1	–	3	104	47	47	2	87	30	30
Pancreatic elastase	1	10	–	–	8	56	–	–	–	98	46	46	1	81	25	25
Papain	1	17	1	1	9	60	–	–	4	130	50	50	1	117	39	39
Pepsin	2	13	–	–	7	68	–	–	1	54	–	–	1	50	–	–
Proteinase K	1	12	–	–	8	28	1	1	4	87	48	48	4	88	44	44
Thermolysin	2	11	–	–	17	49	–	–	4	46	–	–	2	39	–	–
Trypsin	–	3	–	–	–	20	–	–	1	4	–	–	–	1	2	–
Abbreviation: antioxidant (AO), ACE-inhibitor (ACE), antithrombotic (AT), antiasthmatic (AA).																
^a Collagen alpha-1(I) chain-like isoformX2.																
^b Collagen alpha-2(I) chain-like isoformX1.																

(Huang, et al., 2016)



(a)



(b)

Fig. 5 - The HPLC chromatograms of (a) the standard molecular weight samples and (b) marine collagen peptides (MCPs) from the skin of tilapia.

(Hu, et al., 2017)

334 Table 5- Composition and contents of amino acids of MCPs.

Amino Acids	Contains (g/100 g)	Residues Per 1000 Total Amino Acid Residues
Aspartic acid	5.53	48
Threonine *	2.67	25
Serine	3.17	34
Glutamic acid	9.40	81
Glycine	20.92	317
Alanine	9.23	118
Valine *	2.17	22
Methionine *	1.33	10
Isoleucine *	1.33	11
Leucine *	3.18	27
Tyrosine	0.74	6
Phenylalanine *	2.17	15
Histidine	1.01	8
Lysine *	3.33	26
Arginine	7.96	52
Proline	11.32	111
Hydroxy proline	10.28	89
Total	95.74	1000

Note: * essential amino acids.

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

(Hu, et al., 2017)

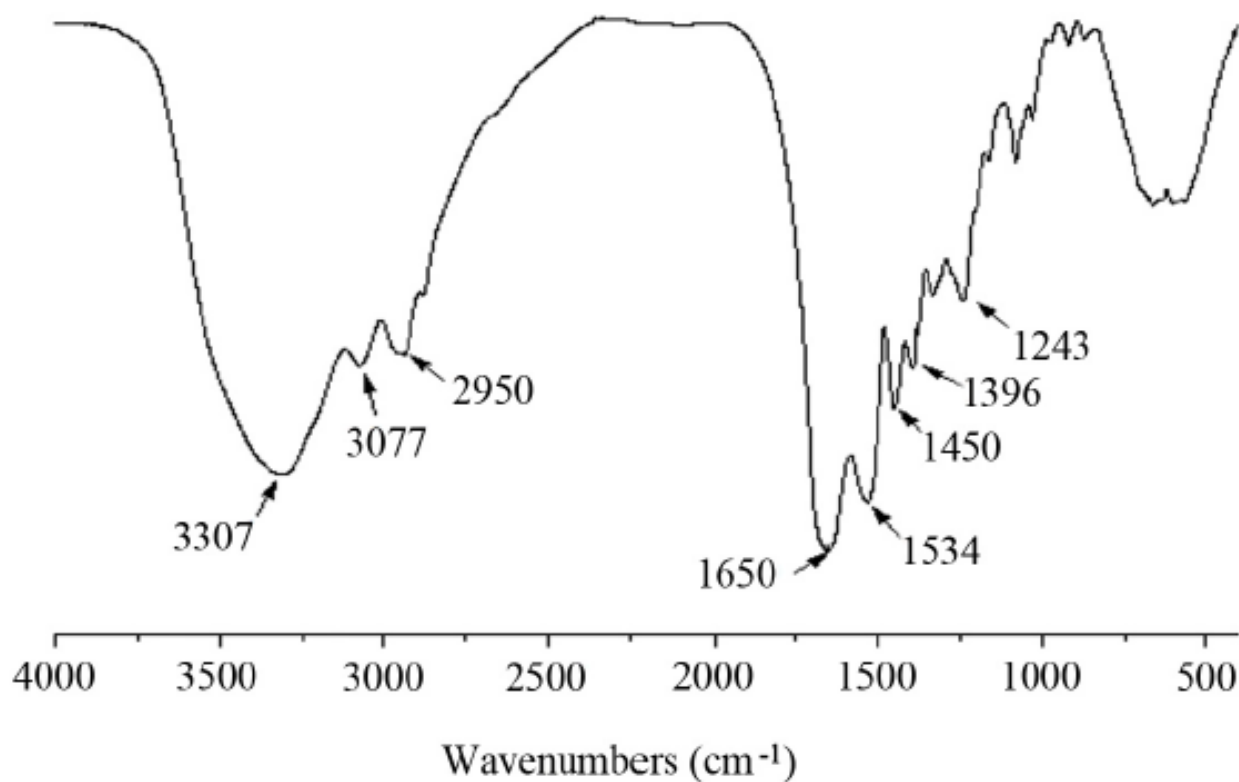
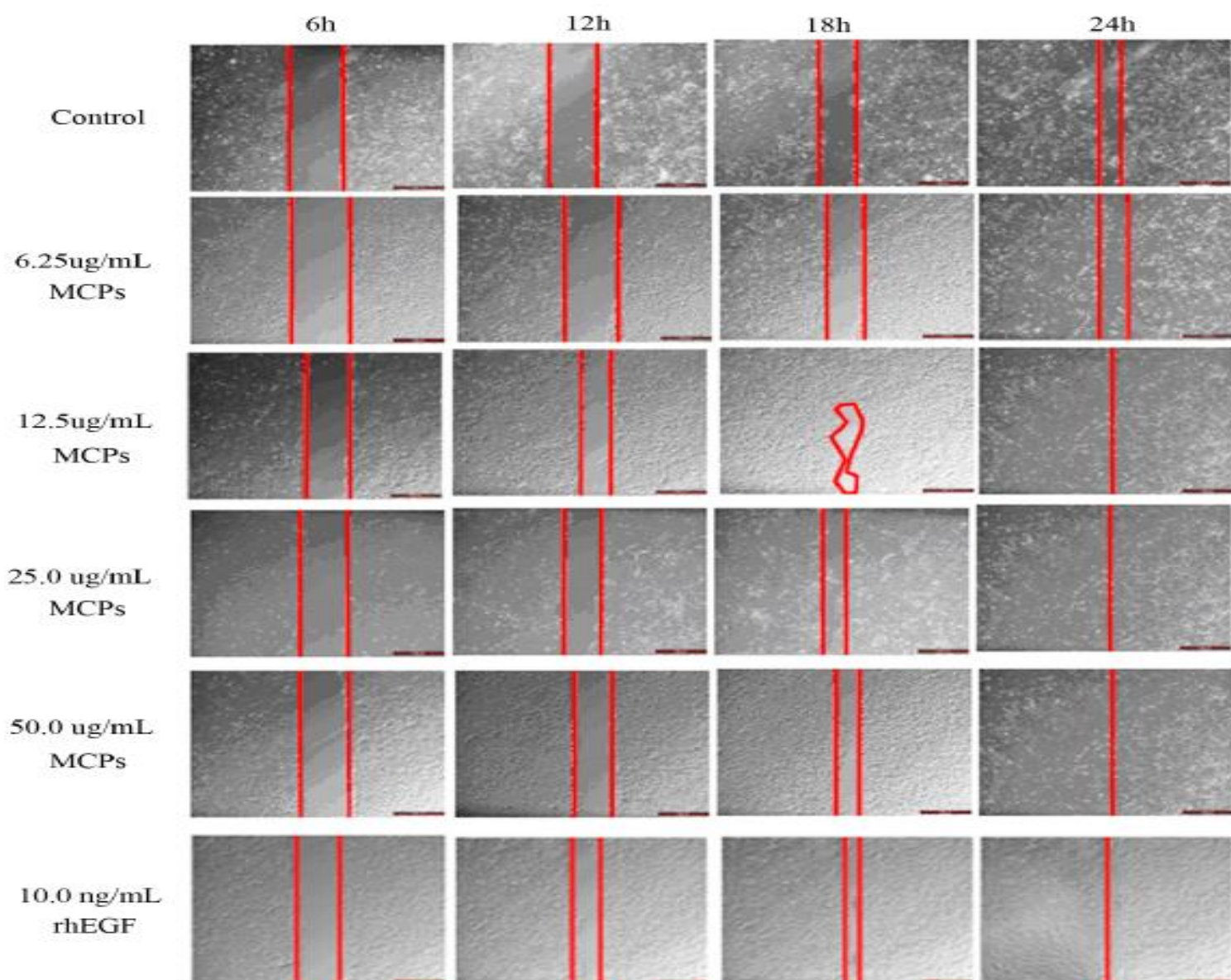


Fig. 6 - FTIR spectrum of MCPs from the skin of tilapia.

(Hu, et al., 2017)



369 Fig. 7 - Effect of MCPs from the skin of tilapia on the scratch closure in vitro.

370 Scale bar: 100 μ m.

371

372

373

374

375

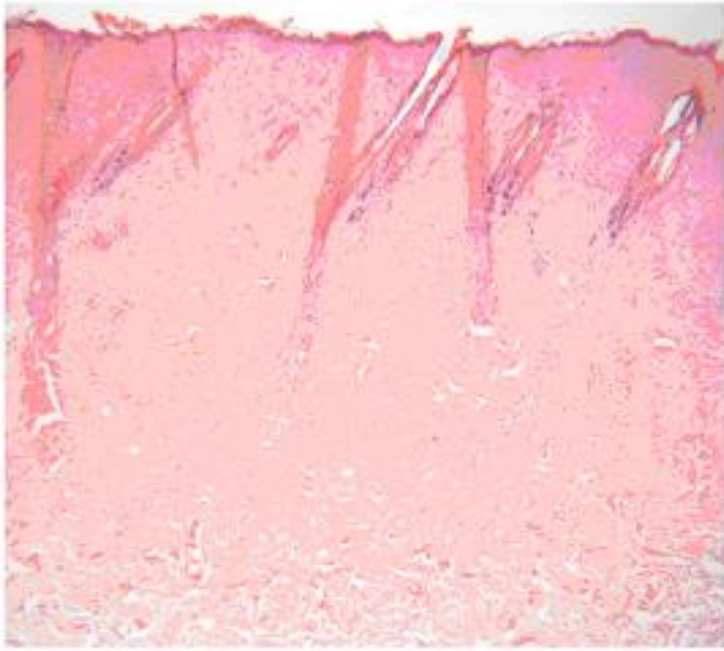
376

377

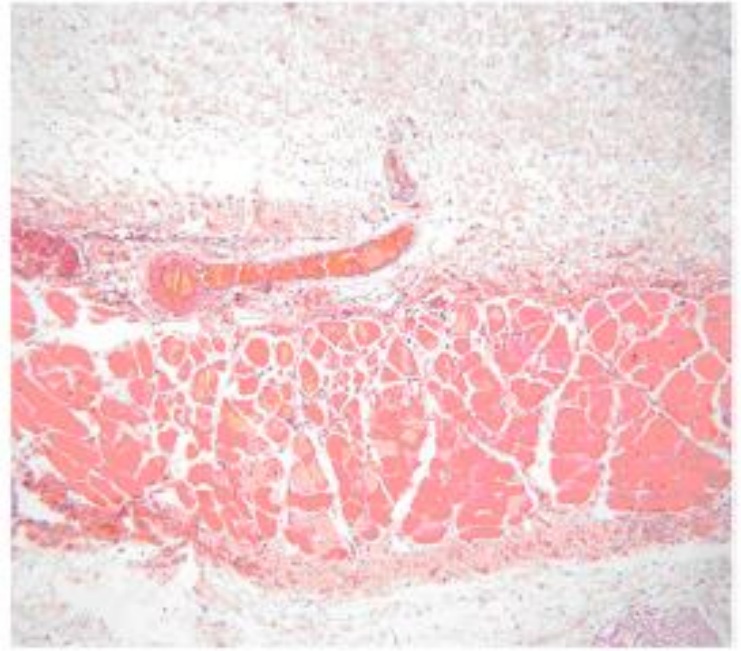
378

379

(Hu, et al., 2017)



(a)



(b)

380 Fig. 8 - Microscope observation of pathological sections on the post-scald day
 381 (H&E, 100x). (a) Coagulation necrosis of the epidermis and dermis; (b)
 382 Impaired skin appendages and focal necrosis associated with inflammatory cell
 383 infiltration.

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

(Hu, et al., 2017)

400 Table 6 - The effect of MCPs from the skin of tilapia on wound healing rate (%)
 401 in the rabbits ($\bar{x} \pm s$).

Post-Scald Day	Model Control Group	Positive Control Group	MCPs Group
3	-16.4 ± 19.3	-22.7 ± 22.9	-11.8 ± 23.1
7	-7.0 ± 23.1	-1.8 ± 27.5	-3.6 ± 28.6
11	8.7 ± 17.2	19.5 ± 35.0	$38.8 \pm 22.8^{**,\#}$
14	56.6 ± 31.1	70.5 ± 23.5	$78.6 \pm 11.1^*$
18	72.1 ± 13.9	$95.3 \pm 6.4^{**}$	$95.9 \pm 7.2^{**}$
21	86.2 ± 16.0	$98.9 \pm 2.0^{**}$	$98.0 \pm 6.8^{**}$
24	89.8 ± 6.3	$100.0 \pm 0^{**}$	$100.0 \pm 0^{**}$
28	100.0 ± 0	100.0 ± 0	100.0 ± 0

Note: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ were significantly different compared to the model control group; # $p < 0.05$ were significantly different compared to the positive control group.

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

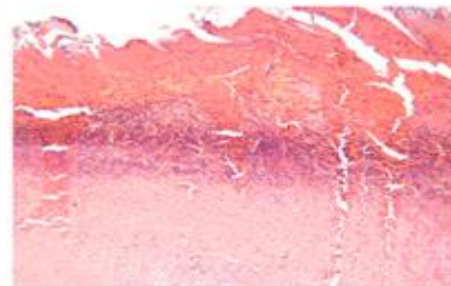
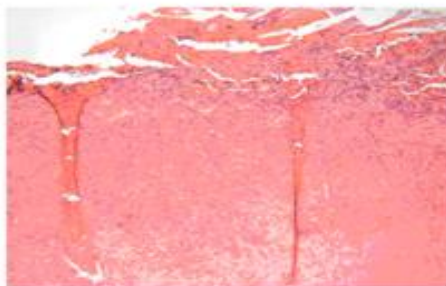
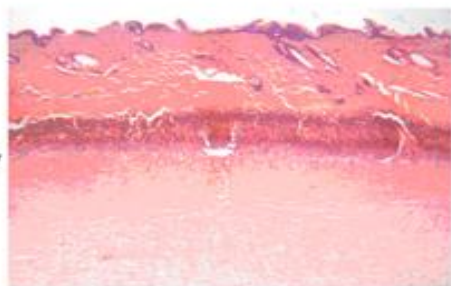
(Hu, et al., 2017)

Model control

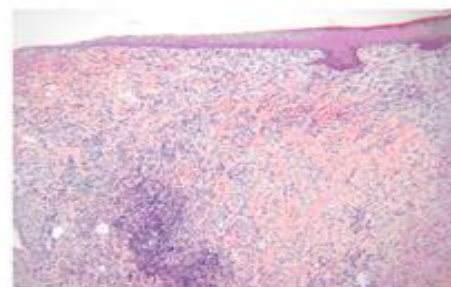
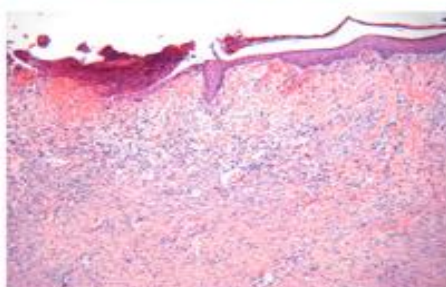
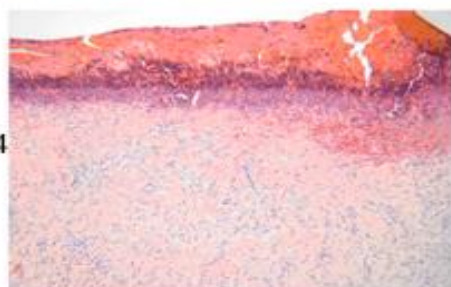
Positive control

MCPs

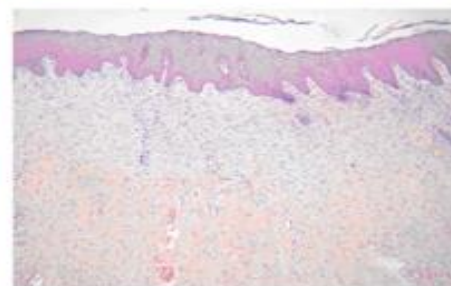
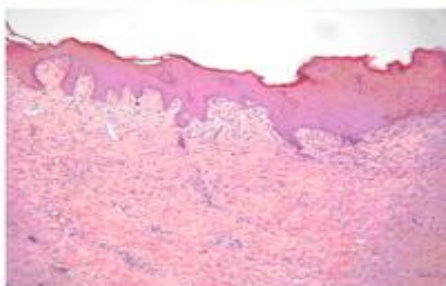
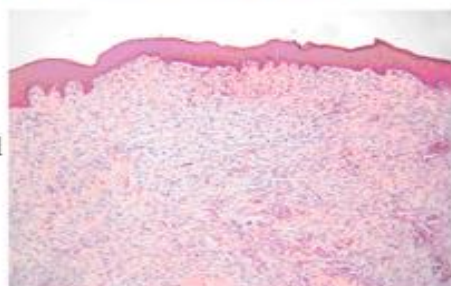
PSD7



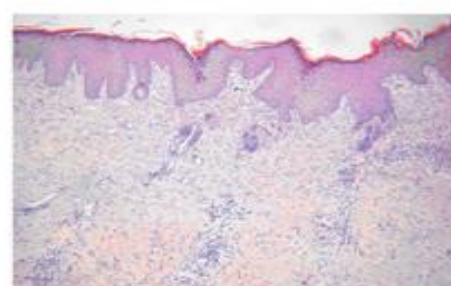
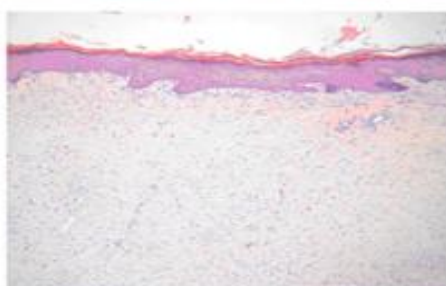
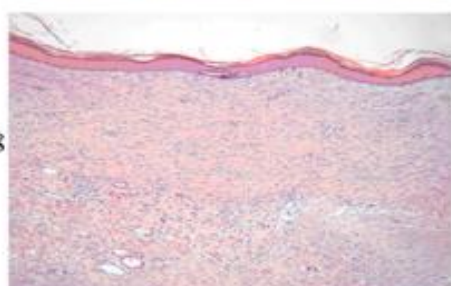
PSD14



PSD21



PSD28



424 Fig. 9 - Micrographs of wound tissues in rabbits (H&E, 100x).

425

426

427

428

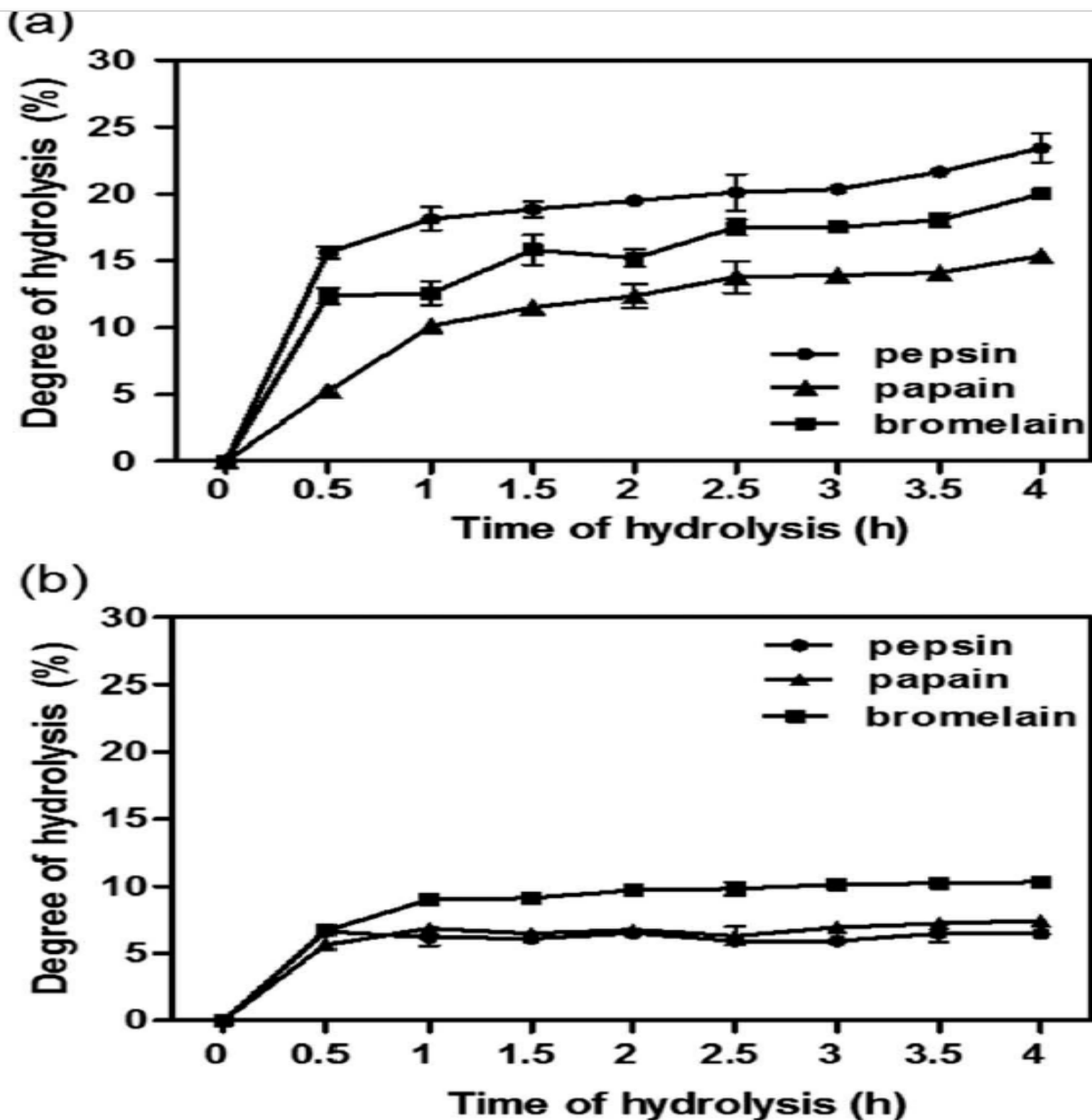
429

430

431

432

(Hu, et al., 2017)



433 Fig. 10 - (a) Degree of hydrolysis (DH) of tilapia frame protein isolate (FPI)
 434 during enzymatic hydrolysis. (b) DH of tilapia skin protein isolate (SPI) during
 435 enzymatic hydrolysis.

436

437

(Lin, et al., 2017)

438 Table 7 - Degree of hydrolysis (DH), protein content and yields of tilapia frame and skin protein hydrolysates after 4-h hydrolysis.

Samples	Enzyme (E/S ^a : 1%)	Degree of Hydrolysis (%)	Protein content (%)	Yield ^b (%)
Frame protein hydrolysates (FPHs)	Pepsin (FPHPe)	23.46 ± 1.08 ^a	84.93 ± 1.01 ^a	80.66 ± 6.83 ^a
	Papain (FPHPa)	15.38 ± 0.04 ^c	68.88 ± 5.36 ^b	56.42 ± 14.03 ^b
	Bromelain (FPHBr)	20.01 ± 0.22 ^b	89.05 ± 1.10 ^a	67.85 ± 0.78 ^a
Skin protein hydrolysates (SPHs)	Pepsin (SPHPe)	6.48 ± 0.10 ^e	79.51 ± 8.37 ^a	105.14 ± 14.09 ^a
	Papain (SPHPa)	7.44 ± 0.20 ^e	81.43 ± 3.33 ^a	81.25 ± 17.47 ^a
	Bromelain (SPHBr)	10.33 ± 0.15 ^d	68.21 ± 2.80 ^b	92.39 ± 0.40 ^a

^aE/S: the ratio of the weights of enzymes against substrates.

^bThe yield was calculated based on the dry weight of resultant hydrolysate against the dry weight of protein isolate used for hydrolysis.

Results are presented as mean ± standard deviation with triplicate measurements. For each column, values that contain different letters are significantly different at $p < 0.05$.

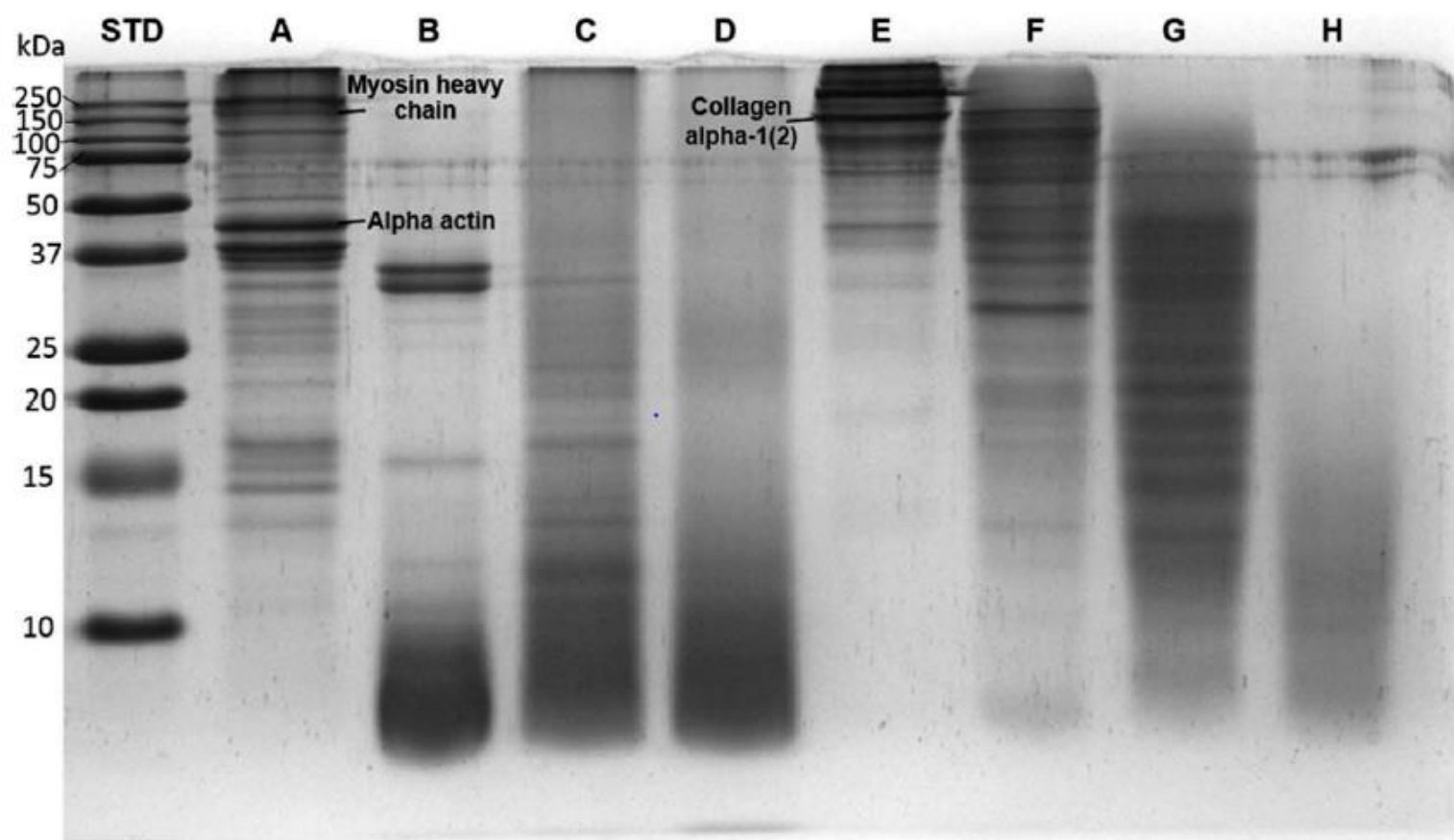
439

440

441

442

(Lin, et al., 2017)



443 Fig. 11 - SDS-PAGE of samples from tilapia frame protein isolate (FPI, lane A),
 444 frame protein hydrolysates generated by pepsin (FPHPe, lane B), papain
 445 (FHPa, lane C) and bromelain (FPHBr, lane D), skin protein isolate (SPI, lane
 446 E), and skin protein hydrolysates generated by pepsin (SPHPe, lane F), papain
 447 (SPHPa, lane G) and bromelain (SPHBr, lane H).

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

(Lin, et al., 2017)

460 Table 8 - Number of predictive angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides released from identified tilapia (a) frame
 461 proteins and (b) skin proteins using BIOPEP's enzyme action tool.

(a)	Alpha actin*	Myosin heavy chain ^{a,*}	Creatine kinase ^{b,*}	Troponin T*	Fructose-bisphosphate aldolase A*
Pepsin	13	68	16	21	11
Papain	18	61	18	15	13
Bromelain	12	38	5	5	10
Pepsin+Trypsin+ Chymotrypsin A	18	76	24	18	10
Pepsin+Trypsin+ Chymotrypsin C	22	78	27	16	11
(b)	Collagen alpha-1(I) chain ^{c,*}			Collagen alpha-2(I) chain ^{d,*}	
Pepsin	54			51	
Papain	129			121	
Bromelain	97			85	
Pepsin+Trypsin+ Chymotrypsin A	104			96	
Pepsin+Trypsin+ Chymotrypsin C	221			214	

^aMyosin heavy chain, fast skeletal muscle-like.

^bCreatine kinase M-type-like.

^cCollagen alpha-1(I) chain-like isoformX2.

^dCollagen alpha-2(I) chain-like isoformX1.

*Protein sequences of the tilapia skin proteins shown in this table were all identified in our previous study [2].

462

463

(Lin, et al., 2017)

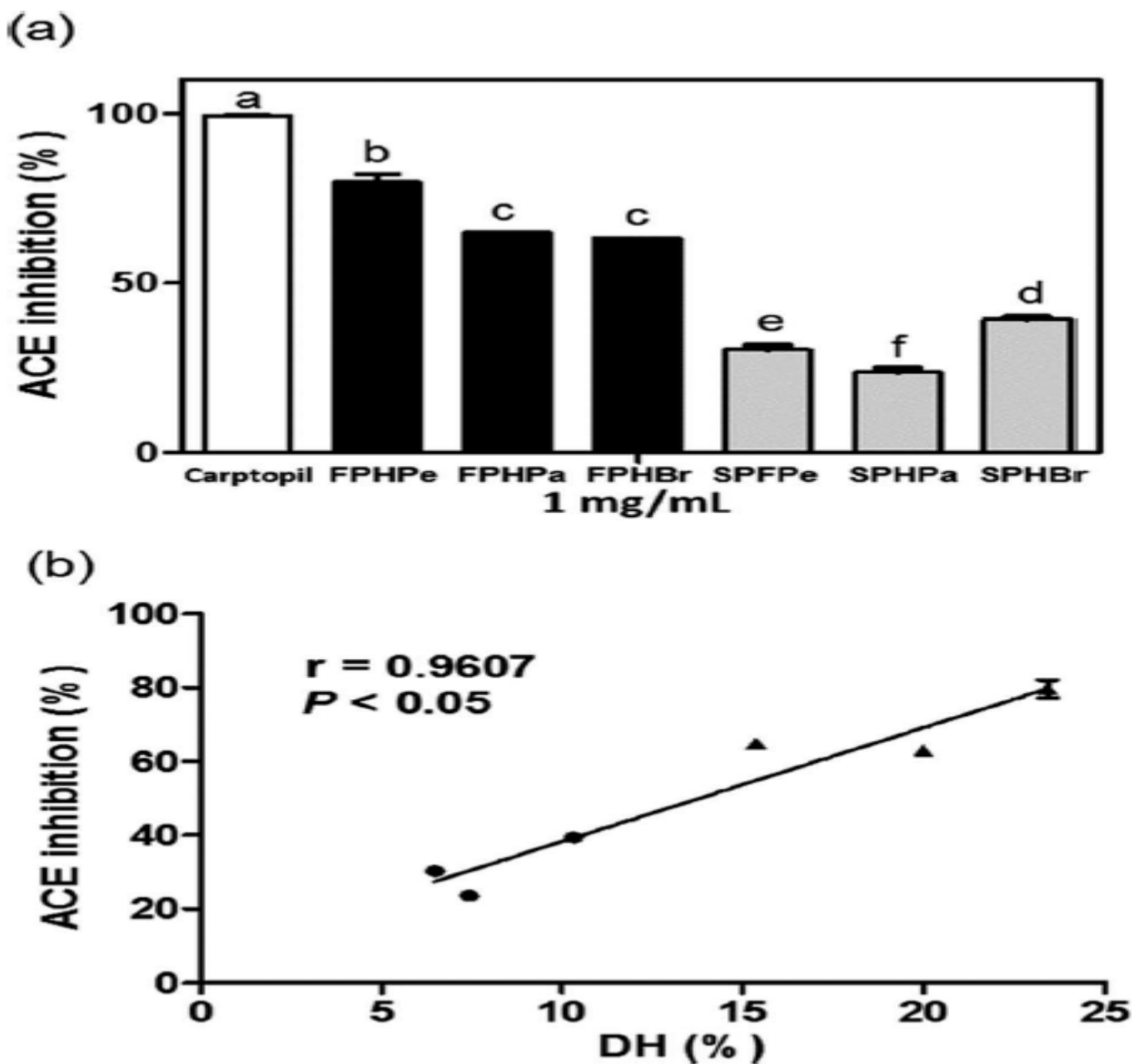
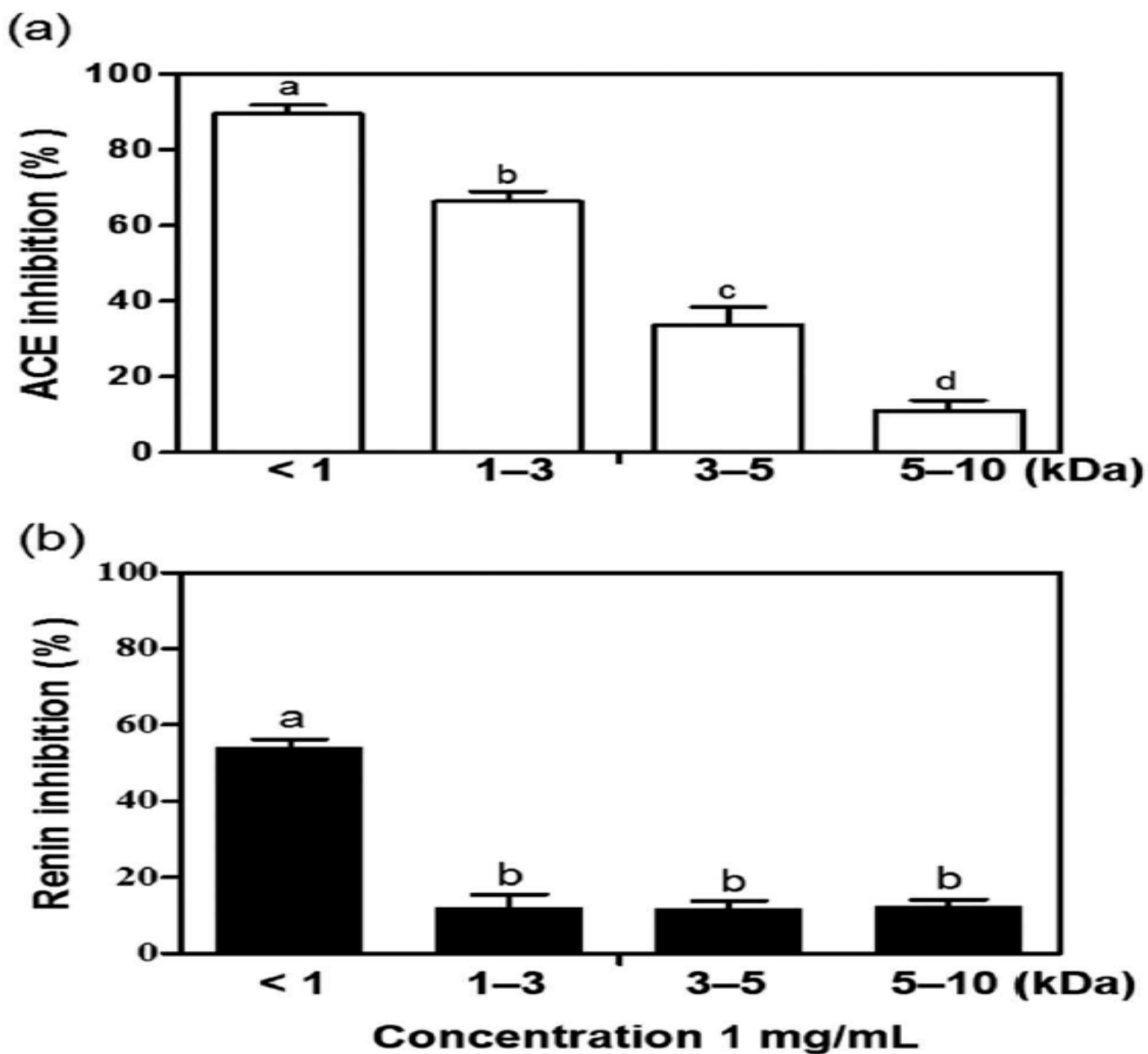


Fig. 12 - (a) In vitro Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of frame protein hydrolysates (FPHs: FPHPe, FPHPa, and FPHBr) and skin protein hydrolysates (SPHs: SPHPe, SPHPa, and SPHBr) generated by pepsin, papain, or bromelain. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). (b) The correlation plot between degree of hydrolysis (DH) and ACE inhibitory activities for FPHs (●) and SPHs (▲). The Pearson's r value is 0.9607 and $p < 0.05$ represents the correlation is significant.

(Lin, et al., 2017)



472 Fig. 13 - (a) In vitro angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory
 473 activities of the ultrafiltration fractions of pepsinhydrolyzed frame protein
 474 hydrolysate (FPHPe) at of 0.6 mg/ mL. (b) In vitro renin inhibitory activities of
 475 the fractions from FPHPe at of 1 mg/mL. Bars with different letters have
 476 significantly ($p < 0.05$) different mean values.

477

478

(Lin, et al., 2017)

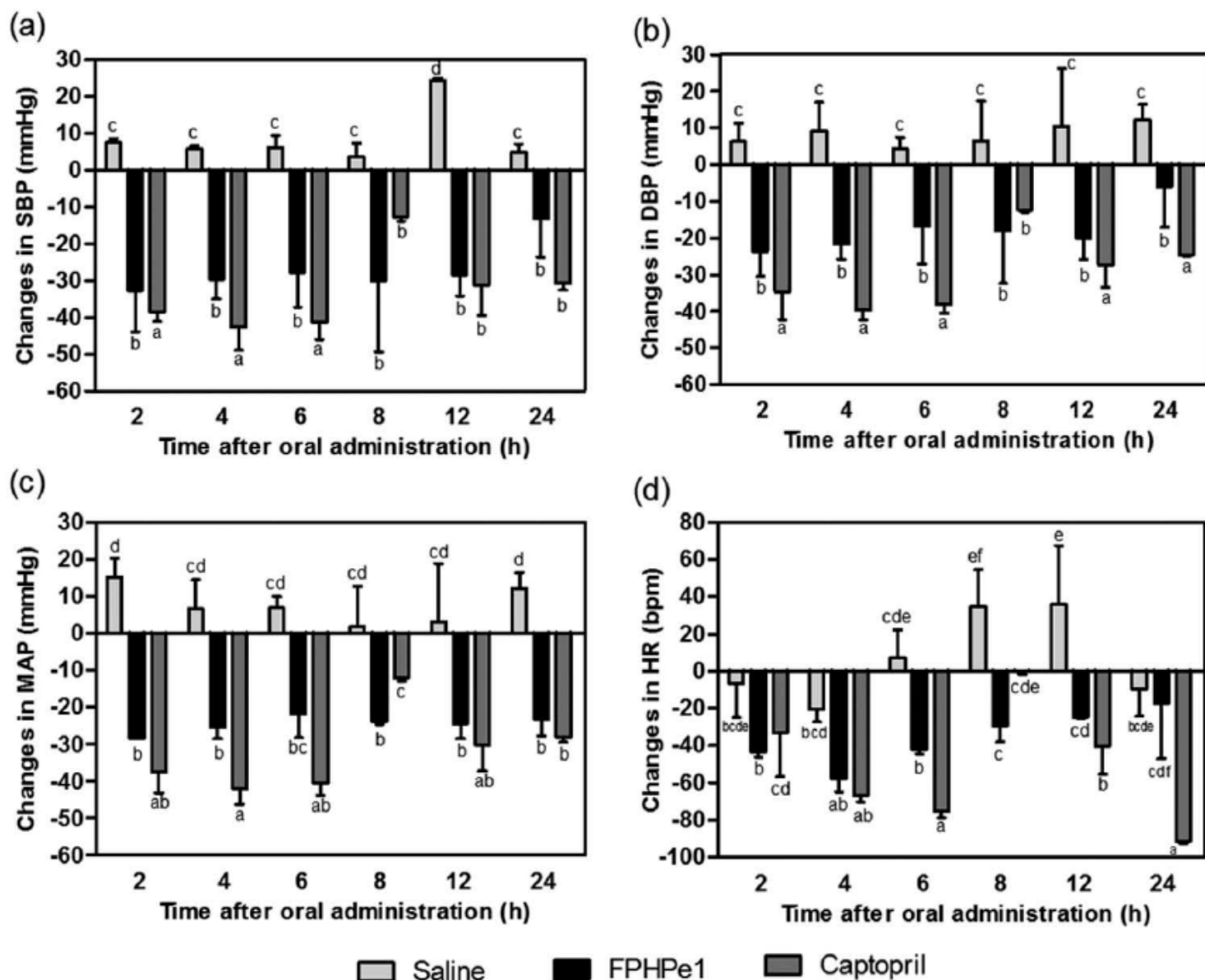


Fig. 14 - The effect of the < 1 kDa ultrafiltration fraction from pepsin-hydrolyzed frame protein hydrolysate (FPHPe1) on (a) systolic blood pressure (SBP), (b) diastolic blood pressure (DBP), (c) mean arterial pressure (MAP), and (d) heart rate (HR) of spontaneously hypertensive rats (SHRs) after oral gavage. Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

(Lin, et al., 2017)

