

酵素水解豬血的抗菌成分研究⁽¹⁾

張哲誠⁽²⁾ 翁瑞奇⁽³⁾ 黃怡仁⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：105 年 5 月 26 日；接受日期：106 年 3 月 14 日

摘 要

本研究以台糖公司畜殖事業部的豬血血球為原料，經由酵素水解產生具有抗豬鏈球菌和枯草桿菌活性的成分。以半製備 HPLC 純化後的抗菌物質，利用二氫雜菲 (1, 10-phenanthroline) 檢測的結果發現，此抗菌物質含有鐵質，可能為一種血鐵胜肽；於 SDS-PAGE 的分析結果，此抗菌物質的分子量約 3 kDa。利用中間工廠製程生產之抗菌水解液，經過加工並混於飼料進行動物試驗，在 5 週的仔豬餵養試驗中，與對照組比較，其可降低 70% 仔豬軟便(下痢)發生。本研究以台糖公司畜殖事業部的豬血為原料，利用酵素水解產生具有抗菌活性的成分，經動物試驗證實具有預防仔豬下痢之效果。

關鍵詞：抗菌胜肽、酵素水解、豬血。

緒 言

由於全球的人口數一直提高，再加上經濟發展成長快速，因而對於肉製品的需求量也持續增加。而肉品的產量以豬肉最高。至於我國，雖然從 1997 年發生口蹄疫之後，因豬肉無法出口使得養殖豬隻的頭數銳減，但仍維持約 800 多萬頭之年屠宰頭數。在過去，除了少部分的豬血被用於食品、飼料和肥料之外，大部分乃是以廢棄物的方式處理，非常可惜，而且造成了極大的環境污染和處理上的問題。豬的全血中，除了 80% 的水分之外，主要為蛋白質(約 17%)，血球中蛋白質的含量高達 35.1% (Chang *et al.*, 2007)，是個非常好的蛋白質來源。因而，近年來有很多的研究，以各種加工的方式由豬血來生產具有特殊功能的活性胜肽；例如具抗氧化活性胜肽 (Chang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011)、降血壓胜肽 (Mito *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2006; Wei and Chiang, 2009) 和抗菌胜肽 (Shi *et al.*, 1994; Harwig *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008; Leu *et al.*, 2010; Wessely-Szponder *et al.*, 2010)。

抗菌胜肽最早被發現於植物中 (Fernandez de Caleyra *et al.*, 1972)，之後於 80 年代初期，Steiner *et al.* (1981) 從天蠶蛹中分離出具有抗菌活性的胜肽 (cecropins)，Selsted *et al.* (1984) 從巨噬細胞分離另一種抗微生物胜肽 defensins。到目前為止，從細菌、真菌、昆蟲、兩棲類、高等植物、哺乳動物、乃至人類，一直有新的類似胜肽陸續被發現，目前已知的抗菌胜肽已經超過 2,500 條 (Wang *et al.*, 2015)。抗菌胜肽普遍稱為抗微生物胜肽 (Antimicrobial Peptides, AMPs)，長度大約是由 10 – 80 個不等的胺基酸組成。抗微生物胜肽對於細菌、真菌、原蟲、寄生蟲或病毒，具有直接殺死或使之去活性 (inactivate) 或抑制其生長的作用。不同的抗微生物胜肽對抗細菌或真菌的種類各有不同；有的對革蘭氏陽性菌、陰性菌和真菌皆具有殺菌作用，是廣效性的抗微生物胜肽。大多數的抗微生物胜肽組成為 50% 疏水性胺基酸，並含一個到數個帶正電之胺基酸。也有許多抗微生物胜肽具有兩性結構 (amphipathic structure)，帶電荷的親水性部分和疏水性部分分布在不同側，或是摺疊成帶正電雙翼結構 (cationic double wing structures)，其疏水性核心由兩個帶電性部分包圍 (Hancock and Patrzykat, 2002; Stark *et al.*, 2002)。抗微生物胜肽的作用，主要破壞微生物和多細胞生物的細胞膜，其作用會隨其細胞膜結構上的差異性而產生不同的結果 (Park *et al.*, 1998; Zasloff, 2002)，由於此機制不涉及特定受體，主要藉由陰陽離子的物理作用，可以快速殺死微生物而不使之產生抗藥性 (Dathe and Wieprecht, 1999; Hancock and Patrzykat, 2002; Hancock and Rozek, 2002)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2554 號。

(2) 台灣糖業股份有限公司研究所化學組。

(3) 屏東科技大學動物科學與畜產系。

(4) 通訊作者，E-mail：a04961@taisugar.com.tw。

根據最近的調查，目前很多常用抗生素都出現了相應的抗藥性致病株，致病菌的抗藥性問題日益嚴重。因此科學家致力於尋找全新類型的抗微生物藥物，以解決抗藥性問題。因為抗微生物肽類抗菌活性高，抗菌範圍廣泛，種類多樣化，目標菌株不容易產生抗性突變等優點，而被認為具有開發的價值。

本研究以台糖公司畜殖事業部的豬血為原料，利用酵素水解產生具有抗菌活性的成分，再經由管柱層析的方式將其純化和分析，最後經由仔豬餵養試驗，觀察其對仔豬下痢的預防效果。

材料與方法

I. 酵素水解豬血

由於不同來源和活性的市售酵素之最佳反應條件(pH和溫度)並不相同，為了簡化工業化生產的流程和控制生產成本，經比較各酵素的反應條件後，設定單一反應條件作為後續的研究。於先前試驗中選用5種絲氨酸蛋白酶分解酵素(serine protease)及1種半胱氨酸蛋白酶(cysteine protease)，包括alcalase、protamex、flavourzyme、delvolase、acelerzyme及papain等，採用2種酵素混合及3種酵素混合水解的方式進行測試，選擇其中一組水解液抗菌效果最佳組別作為後續生產使用。

新鮮豬血由台糖公司畜殖事業部委外屠宰場(屏東—臺畜公司)當天收集，立即混合10%(v/v)抗凝血劑(0.16 mol/L檸檬酸鈉溶液)，靜置分離血漿和血球，取下層血球於水浴中攪拌1小時使達恆溫，再加入酵素組合進行水解反應，期間每小時取樣15 mL，取樣後立即以冰浴降溫，再儲放於4°C冰箱待後續抗菌試驗使用。

II. 抗菌肽純化

豬血球酵素水解液經13,400 x G離心(Eppendorf 5415R, Germany)及0.22 μm濾膜(Pall PN 4612, USA)過濾等方式前處理，再經半製備RP-HPLC或陰離子管柱(DEAE)分離來純化抗菌肽。

半製備RP-HPLC純化方式：經前處理之豬血球酵素水解液於半製備型HPLC系統利用C18管柱(XBridge BEH300 Prep C18, 5 μm, 250 x 10 mm, Waters, USA)於0.1%三氟醋酸(trifluoroacetic acid, TFA)/乙腈(acetonitrile, ACN)之梯度條件進行層析，收集液以冷凍乾方式去除酸、水及有機溶劑，再以緩衝液(50 mM Na₂HPO₄-citrate, pH7.0)溶解並定量至所需體積。

陰離子管柱純化方式：經前處理之豬血球酵素水解液於GE AKTA 100系統利用陰離子管柱(DEAE)於50 mM Na₂HPO₄-citrate, pH 8.0環境以1 M NaCl溶液梯度沖提洗，收集液冷凍乾燥後再以緩衝液溶解並定量至所需體積。

III. 抗菌試驗

菌株：大腸桿菌(*Escherichia coli*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、沙門氏桿菌(*Salmonella* sp.)及豬鏈球菌(*Streptococcus suis*)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)及假單胞菌(*Pseudomonas* sp.)，以上菌株來源為食品工業發展研究所。瓊脂擴散法試驗，參考食工所對各菌株的建議培養條件，選用適當培養基，另添加少量Tween 20以協助肽類物質的擴散。針對不同菌株，選用不同的抗生素作為陽性對照組，包括Ampicillin、Streptomycin和Nystatin。

IV. 生產豬血抗菌飼料

經酵素反應後之抗菌水解液，每公升體積加入1公斤臺糖大豆粕混合，於烘箱(Hanchin, Germany)以50°C乾燥48小時，再以破碎機(豪利SJ16, 台灣)破碎至粒徑<5 mm。

V. 鐵離子檢測

取10 mL純化之抗菌肽，經減壓濃縮乾燥後以2 mL 18 N硫酸溶解並加熱消化30分鐘，再以5 N NaOH調整pH值至5.0並定量至20 mL，添加0.1 g碘化鉀為還原劑將三價鐵還原為二價鐵，最後依樣品與0.1%二氫雜菲(1,10-Phenanthroline monohydrate)呈色劑體積比4:1方式混合，避光靜置30分鐘後亞鐵離子與二氫雜菲螯合，生成橘紅色反應物，以分光光度計(GeneQuent 1300, GE, USA)於波長510 nm測量吸收值。

VI. 動物試驗

仔豬餵養動物試驗於屏東科技大學動物科學與畜產系執行，為期共5週。

(i) 動物與飼料：

24頭28 ± 2日齡離乳豬，依體重隨機分配成2組(對照組及試驗組)，每組3欄，每欄4頭，飼料組成

列於表 1，試驗組以 2% (w/w) 豬血抗菌飼料取代原飼料中的大豆粕，所有試驗用飼料皆使用臥式混料機 (信強 JU-100，台灣) 混合均勻。

表 1. 餵養飼料配方及營養組成

Table 1. Composition and nutritive value of diets

Ingredient (%)	Control	Experiment
Roasted corn	45	45
Fatted Soybean	27	27
Corn	17	17
Soybean meal	3	1
Enzymatic hydrolysate powder	0	2
Lard oil	4	4
Methionine	0.65	0.65
Lysine	0.15	0.15
Calcium phosphate primary	1.75	1.75
Calcium carbonate	0.75	0.75
Salt	0.3	0.3
Premix vitamin ^(a)	0.2	0.2
Premix mineral ^(b)	0.2	0.2
Total	100	100
Nutrient composition (per 100 g)		
Energy (kcal)	374	377
Fat (g)	7.5	7.6
Saturated fat (g)	2.5	2.5
Protein (g)	19.1	19.6
Carbohydrates (g)	57.6	57.5

^(a) 0.2% Premix vitamin (Supplied per kg of diet): Vitamin A. 9,000 I.U.; Vitamin D3. 1,800 I.U.; Vitamin B1. 2.4 mg; Vitamin B2. 3.6 mg; Vitamin B6. 0.6 mg; Vitamin E. 19.5 mg; Vitamin K3. 2.4 mg; Pantothenic acid 10.5 mg; Nicotinic acid 27 mg; Folic acid 0.2 mg; Choline 100 mg and Vitamin B12. 20 µg.

^(b) 0.2% Premix mineral (Supplied per kg of diet): Cooper 10 mg, Iron 50 mg, Zinc 100 mg, Manganese 30 mg, Iodine 1 mg and Cobalt 1 mg.

(ii) 飼養環境：

所有豬隻飼養於同棟全網狀一般畜舍 (非負壓水濺)，無圈養其他非屬本次試驗豬隻，各處理組間隔一空欄，欄面積為 180 × 220 cm²，欄內設置一個 30 公斤圓形飼料槽一只水碗及一盞 175 W 保溫燈；監控試驗期間室內溫度及相對濕度 (每日早、午、晚各記錄一次)。

(iii) 飼養管理：

飼養管理依據一般商業豬場飼養管理辦理，試驗期間不清洗豬舍，人員進出必須更換衣、鞋，室內通道灑布石灰，每日掃除各欄床面糞便。仔豬 3 週齡時注射豬瘟減毒及豬丹毒死毒疫苗，試驗期間不再補強或施打任何疫苗。

(iv) 試驗紀錄與檢測分析：

1. 試驗紀錄：測量試驗開始及結束之豬隻體重，飼養期間每日記錄各類疾病 (下痢或其他)、死亡數及飼料採食量。
2. 生長性狀分析：包括日增重、日採食量、飼料換肉率、各類疾病 (下痢或其他) 發生率與淘汰率。
3. 飼料分析：包括熱能 (黃及游, 1985)、脂肪 (CNS 總號 5036, 類號 N6117, 1984)、飽和脂肪 (衛生福利部授食字第 1021950978 號, 2013)、粗蛋白質 (CNS 總號 5035, 類號 N6116, 1986)、碳水化合物 (Nielsen, 1994)。

4. 統計分析：利用統計軟體 (GraphPad Prism v5.01) 分析兩組間的生長性能及軟便 (下痢) 是否有顯著差異，顯著水準訂為 5%。

結果與討論

I. 豬血酵素水解物試驗

本研究由豬血來源之血球為受質，以市售之酵素進行蛋白水解反應生產具有抗菌活性成分。結果發現，雙絲胺酸酵素水解產物，經冷凍乾燥再覆水方式濃縮約 5 倍後，對枯草桿菌及豬鏈球菌有明顯的抑菌作用 (圖 1)。不同酵素組合及反應時間對豬鏈球菌及枯草桿菌有不同程度的抑菌作用。酵素水解液對枯草桿菌的抑菌效果較明顯，水解反應時間約 7 小時後活性達到穩定。在所有的組合中，具較佳抗菌活性共有 6 組，但是考量保存、價格和生產程序便利性後，只保留第 A 組之組合使用於後續的中間工廠製程。

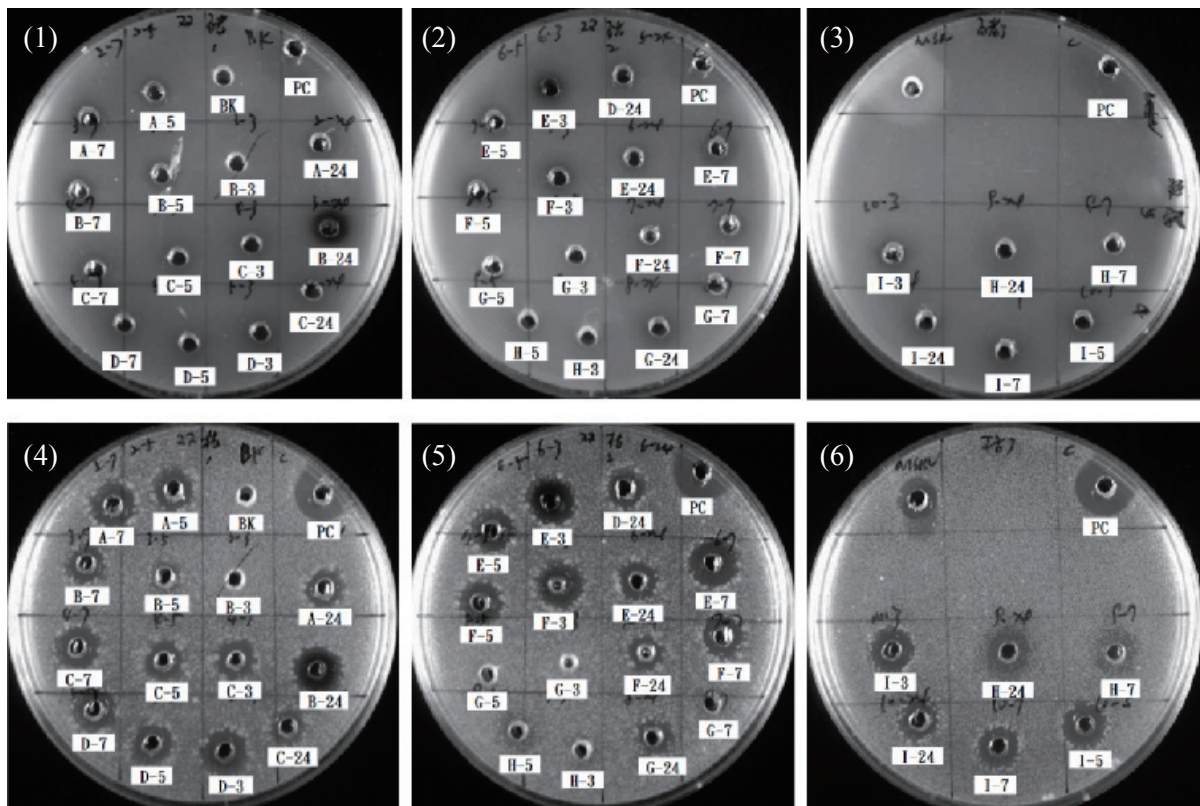


圖 1. 由豬紅血球製備的酵素水解物之抗菌活性。

A 到 I 表示不同雙絲氨酸蛋白酶組合的處理組。數字表示酵素水解反應的小時數。上圖：酵素水解物在營養瓊脂平板上抗豬鏈球菌的抗菌試驗，PC：氨苄青黴素；下圖：酵素水解物在營養瓊脂平板上抗枯草芽孢桿菌的抗菌試驗，PC：鏈黴素。

Fig. 1. Antimicrobial activity of enzymatic hydrolysates prepared from porcine erythrocytes.

A to I represented combinations of different double serine-protease sets. The numbers represented the hours of enzymatic hydrolysis reaction. Top: Antimicrobial assay on nutrient-agar plate against *Streptococcus suis* of enzymatic hydrolysates, PC: ampicillin; Bottom: Antimicrobial assay on nutrient-agar plate against *Bacillus subtilis* of enzymatic hydrolysates, PC: streptomycin.

在試驗過程中，初期為避免豬血球太過濃稠，及為了破壞細胞膜以釋出內部成分，曾以加水方式脹破血球。然而後續試驗發現，在高轉速及反應溫度下即可破壞血球和完成酵素水解反應，減少處理時間及費用。

溫度的敏感性測試中，發現溫度對抗菌成分活性影響不大，符合抗菌肽的特性，因此可以使用各種乾燥方式處理成抗菌血粉，然而來自血球的酵素水解液，因其高黏性及血色素的問題必須列入考慮，以免將來量產時影響或污染乾燥設備，造成後續的困擾。在經濟效益的考量下，以添加賦型劑再乾燥的方式較為可行，所以本研究於後續動物飼料試驗，即先將酵素水解液與臺糖大豆粕混合乾燥再添加於仔豬飼料調配成抗菌飼料。

II. 抗菌胜肽純化

具抗菌活性的酵素水解液，利用半製備型 HPLC 系統區分成 7 個區間 (fractions)，其中以 F7 的抗菌效果最佳 (圖 2)。除了以逆相層析技術純化抗菌成分之外，本研究亦以陰離子層析管柱 (DEAE) 來分離抗菌成分，結果主要的抗菌活性位於 0.6 M NaCl 之沖提區間 (圖 3)。利用此二種方式所得到的抗菌成分經 HPLC 分析，其滯留時間均為 32 min (data not show)，而且具有類似的抗菌效果，因此可能為同一成分。

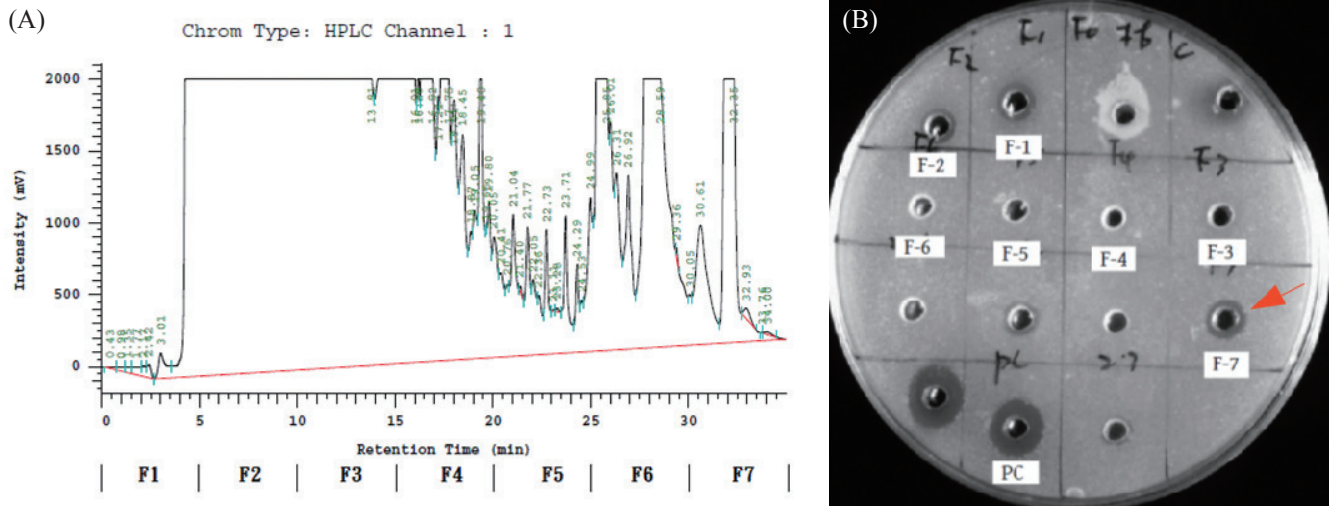


圖 2. 利用半製備型 RP-HPLC 從酵素水解產物中純化抗菌成分。如材料和方法所述，將具有抗菌活性的酵素水解物進行 RP-HPLC。每 15 mL 為區分 (F1 至 F7) 作收集。在瓊脂平板上測試每個區分對枯草芽孢桿菌的抗菌活性。
(A) RP-HPLC 層析圖；(B) 收集區分在營養瓊脂平板上抗枯草芽孢桿菌的抗菌試驗。

Fig. 2. Purification of antimicrobial component from enzymatic hydrolysates by semi-preparative RP-HPLC. Enzymatic hydrolysate with antimicrobial activity were subjected to RP-HPLC as described in the materials and methods. Fractions (F1 to F7) were collected every 15 mL. Each fraction was tested for the antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* in an agarose plate. (A) RP-HPLC chromatography; (B) Antimicrobial assay on nutrient-agar plate against *Bacillus subtilis* of collected fractions.

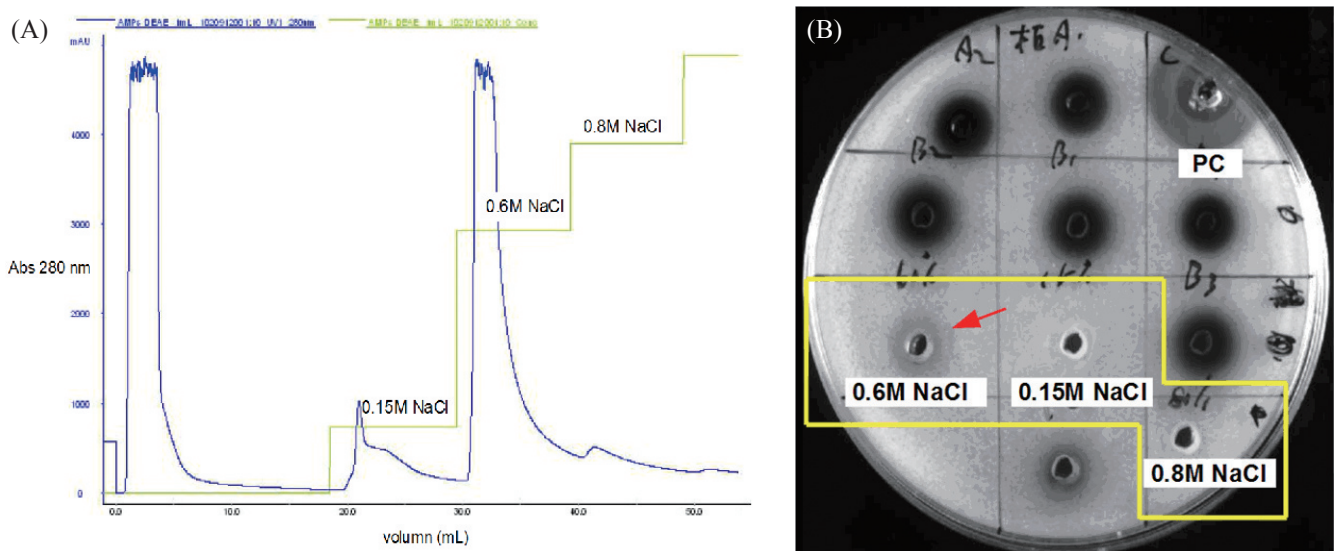


圖 3. 利用陰離子交換樹脂從酵素水解產物中分離抗菌成分。抗菌成分在 0.6 M NaCl 時被充提。(A) DEAE 離子交換層析圖；(B) 收集區分在營養瓊脂平板上抗枯草芽孢桿菌的抗菌試驗。

Fig. 3. Fractionation of antimicrobial component from enzymatic hydrolysates by anion-exchange chromatography. The antimicrobial component was eluted at 0.6 M NaCl. (A) DEAE ion exchange chromatogram; (B) Antimicrobial assay on nutrient-agar plate against *Bacillus subtilis* of collected fractions.

III. 抗菌胜肽成分分析

由 HPLC 層析所純化收集的抗菌成分，以 Tricine SDS-PAGE 電泳分離後，經考馬斯亮藍－R250 (Coomassie brilliant blue R250) 染色，並與蛋白質分子量標準品比對的結果顯示，此抗菌物質的分子量約 3 kDa (圖 4)。利用二氫雜菲呈色法檢測結果發現，此抗菌物質與鐵標準品溶液 (0.275 µg/mL) 均勻呈現橘紅色含鐵反應，於 510 nm 均可測得吸光值。因此，此豬血來源的抗菌成分可能為一種血鐵胜肽。乳鐵蛋白 (lactoferrin) 同樣也為含鐵蛋白，具有多種抗微生物的活性，本研究純化的血鐵胜肽是否也意謂著除抗細菌功能以外，還有其他類似的生理功效；比如抗病毒活性 (Nozaki *et al.*, 2003)、抗真菌活性 (Wakabayashi *et al.*, 2000) 等，值得進一步研究。

IV. 動物試驗

於中間工場利用生產抗菌胜肽製程製造的酵素水解液，經過與台糖大豆粕混合並乾燥，以 2% (乾重) 的添加量調配成仔豬飼料 (抗菌飼料) 後，進行仔豬飼養試驗，觀察其對仔豬生長的影响。此酵素水解物經過乾燥後之主要成分整理於表 2；粗蛋白質含量占 82.7%，胜肽 (TCA 可溶) 含量占 43.8%，推算蛋白質水解效率達 53%，並保留了血液中的鈣、磷、鐵等元素。

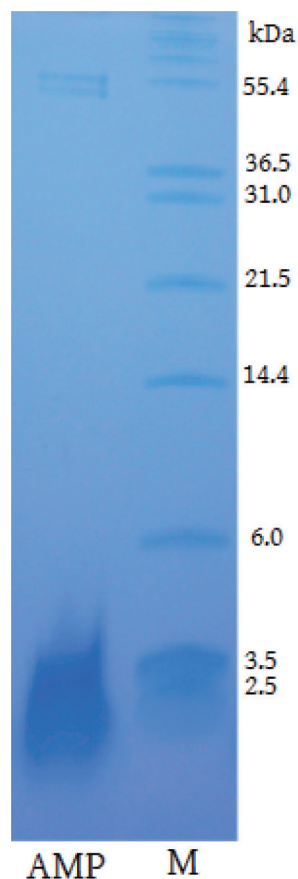


圖 4. 抗菌胜肽之 Tricine SDS-PAGE 電泳結果。

Lane M：低分子量蛋白質標記。分子量標示在右邊；Lane AMP：12.5 µL 經純化的抗菌肽以 17% denaturing tricine SDS-PAGE 分離，並經考馬斯亮藍 R250 染色。

Fig. 4. Gel electrophoresis of antimicrobial peptide RP-HPLC purified from enzymatic hydrolysate.

Lane M: low molecular weight protein marker. The molecular weight are indicated on the right; Lane AMP: 12.5 µL of purified antimicrobial peptide was loaded and separated by 17% denaturing tricine SDS-PAGE following stained with Coomassie brilliant blue R250.

飼料水準分析結果陳列於表 1，各組飼料的營養組成接近，每 100 g 飼料的熱量約 376 ± 2 Kcal。抗菌飼料對仔豬生長性能影響試驗結果整理於表 3。本次試驗淘汰率為零。整體而言，試驗組 (添加抗菌飼料) 優於對照組。計算 5 週總攝食量與總體重增加量，結果添加抗菌飼料可提升 6.2% 飼料換肉率 (攝食 / 增重)，但利用 t-test 的分析結果並沒有達到顯著差異。試驗開始第一週各組均有軟便發生的情形，但以添加抗菌飼料組次數較少，對照組：試驗組為 33：11 (次 / 週)；第二週則全部趨緩，分別為 10：2 (次 / 週)；第三週開始所有組別都沒軟便、下痢或其他疾病發生，統計 5 週總發生次數，添加豬血抗菌飼料可降低 70% 仔豬軟便 (下痢) 發生，利用 t-test

分析達顯著差異 ($p < 0.05$)。動物試驗結果發現，本研究之產品可降低仔豬軟便(下痢)發生次數，顯示本產品對仔豬腸道健康有一定的幫助，未來應在教槽階段再進行相關試驗，以確定產品功效。至於本抗菌肽是否經由透過控制仔豬腸道內的菌相分配，來達到減少仔豬下痢的次數，則尚需更一步的研究。在提升飼料換肉率方面，雖然提升 6%，可惜未達統計上的顯著水準，可能原因是因試驗場所管理方式良好，並採非開放式飼養，豬隻營養及健康狀況佳，以至於無法顯著突顯產品的成效，未來應在一般飼養環境再進行相關測試。

表 2. 抗菌血粉成分分析

Table 2. Analysis of the enzymatic hydrolysate powder

Ingredients (%)	Powder
Crude protein	82.7 ± 0.3*
Peptide (TCA soluble)	43.8
Water	5.2 ± 0.3
Crude ash	5.5 ± 0.1
Crude fat	0.27 ± 0.02
Carbohydrates	6.3
Calcium	0.020
Phosphorus	0.259
Iron	0.297
Sodium	0.701
Potassium	1.00
Magnesium	0.037

* Mean ± SD.

表 3. 含抗菌水解物飼料對仔豬生長性能之影響

Table 3. Effect of the antimicrobial hydrolysate diet on the growth performance of piglets

Group	Control	Experiment
Average body weight gain (kg/Pen)	70.1	71.4
Average feed intake (kg/Pen)	101	97.5
Average feed conversion rate (FCR)	1.45	1.36
FCR improved (%)	—	6.2
Soft feces/diarrhea (times during study)*	43	13
Decrease of soft feces/diarrhea (%)	—	
Mortality rate (%)	0	0

* $P < 0.05$.

結 論

以中間工場製程生產的抗菌肽，除了在體外試驗有抗菌的活性之外，於仔豬飼養試驗中也能夠具有減少仔豬下痢的功能，因此，具有成為仔豬保健產品之潛能。

誌 謝

本文作者感謝楊順淵先生與沈潔瑩小姐的協助，使本計畫得以順利完成，特此致謝。

參考文獻

- 中華民國國家標準。1984。食品中粗脂肪之檢驗法。CNS 5036, N6117。
- 中華民國國家標準。1986。食品中粗蛋白質之檢驗法。CNS 5035, N6116。
- 中華民國衛生福利部。2013。食品中脂肪酸之檢測方法。部授食字第 1021950978 號。
- 黃伯超、游素玲。1985。營養學精要。健康文化事業有限公司，臺北，pp. 97-98。
- Chang, C. Y., K. C. Wu and S. H. Chiang. 2007. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chem.* 100: 1537-1543.
- Dathe, M. and T. Wieprecht. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1462: 71-87.
- FAOSTAT, n. d. Food and Agriculture Organization of the United Nations [WWW Document]. URL <http://faostat3.fao.org/download/Q/QL/E> (accessed 6.8.15).
- Fernandez de Caleya, R., B. Gonzalez-Pascual, F. Garcia-Olmedo and P. Carbonero. 1972. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. *Appl. Microbiol.* 23: 998-1000.
- Hancock, R. E. W. and A. Patrzykat. 2002. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 2: 79-83.
- Hancock, R. E. W. and A. Rozek. 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 143-149.
- Harwig, S. S., V. N. Kokryakov, K. M. Swiderek, G. M. Aleshina, C. Zhao and R. I. Lehrer. 1995. Prophenin-I, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett.* 362: 65-69.
- Kim, Y. H., C. B. Chung, J. G. Kim, K. I. Ko, S. H. Park, J. H. Kim, S. Y. Eom, Y. S. Kim, Y. I. Hwang and K. H. Kim. 2008. Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 303-311.
- Leu, S. J., Y. C. Lee, N. Y. Shih, I. J. Huang, K. J. Liu, H. F. Lu, S. Y. Huang and Y. Y. Yang. 2010. Generation and characterization of anti-alpha-enolase single-chain antibodies in chicken. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137: 251-260.
- Liu, Q., B. Kong, Y. L. Xiong and X. Xia. 2010. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chem.* 118: 403-410.
- Mito, K., M. Fujii, M. Kuwahara, N. Matsumura, T. Shimizu, S. Sugano and H. Karaki. 1996. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin. *Eur. J. Pharmacol.* 304: 93-98.
- Nielsen, S. S. 1994. Introduction to the chemical analysis of foods. Jones and Bartlett Publishers, USA. p. 142.
- Nozaki, A., M. Ikeda, A. Naganuma, T. Nakamura, M. Inudoh, K. Tanaka and N. Kato. 2003. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.* 278: 10162-10173.
- Park, C. B., H. S. Kim and S. C. Kim. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 253-257.
- Selsted, M. E., D. Szklarek and R. I. Lehrer. 1984. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* 45: 150-154.
- Shi, J., C. Ross, M. Chengappa and F. Blecha. 1994. Identification of a proline-arginine-rich antibacterial peptide from neutrophils that is analogous to PR-39, an antibacterial peptide from the small intestine. *J. Leukoc. Biol.* 56: 807-811.
- Stark, M., L. P. Liu and C. M. Deber. 2002. Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3585-3590.
- Steiner, H., D. Hultmark, A. Engström, H. Bennich and H. G. Boman. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248.
- Sun, Q., H. Shen and Y. Luo. 2011. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *J. Food Sci. Technol.* 48: 53-60.
- Wakabayashi, H., K. Uchida, K. Yamauchi, S. Teraguchi, H. Hayasawa and H. Yamaguchi. 2000. Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 595-602.
- Wang, G., B. Mishra, K. Lau, T. Lushnikova, R. Golla and X. Wang. 2015. Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals (Basel)* 8: 123-150.

- Wei, J. T. and B. H. Chiang. 2009. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *J. Sci. Food Agric.* 89: 372-378.
- Wessely-Szponder, J., B. Majer-Dziedzic and A. Smolira. 2010. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. *J. Microbiol. Methods* 83: 8-12.
- Yu, Y., J. Hu, Y. Miyaguchi, X. Bai, Y. Du and B. Lin. 2006. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. *Peptides* 27: 2950-2996.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
- Zhang, G., C. R. Ross and F. Blecha. 2000. Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet. Res.* 31: 277-296.

Antimicrobial property study of enzymatic hydrolysate prepared from porcine erythrocytes ⁽¹⁾

Che-Cheng Chang ⁽²⁾ Ruey-Chee Weng ⁽³⁾ and I-Jen Huang ⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: May. 26, 2016 ; Accepted: Mar. 14, 2017

Abstract

Enzymatic hydrolysate with anti *Streptococcus suis* and *Bacillus subtilis* activity were prepared from porcine erythrocytes by a double-enzyme reaction process. The hydrolysate was fractionated and purified by RP-HPLC and anion-exchange chromatography. The antimicrobial component was possible an iron-peptide with a molecular weight approximate 3 kDa. The antimicrobial component prepared by a pilot-scale production process was shown able to reduce loose stools or diarrhea of piglets in a five-week period animal test.

Key words: Antimicrobial peptides, Enzymatic hydrolysis, Porcine blood.

(1) Contribution No. 2554 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Department of Applied Bioscience Division, Taiwan Sugar Research Institute, Tainan 701, Taiwan, R.O.C.

(3) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung 91201, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: a04961@taisugar.com.tw.