

謝誌

兩年多的碩士生涯，學業讓我從一次次研究失敗中累積寶貴經驗，並終究邁向成功；研究所生活讓我學會如何與人相處，並擁有與師長、同儕、學弟妹們之間的情誼，也感謝各位的陪伴與幫助，使我有今天這番成就。

在此，首先要感謝恩師 江文德博士這兩年多來的辛苦指導，實驗上不斷鼓勵我從失敗中學習，使我的研究更加嚴謹而完善，生活上也感謝老師的關心與教導，使我更加獨立自主，尤其論文撰寫期間更是不厭其煩的替學生修改與指正，使論文更趨完整，老師的教導及鼓勵，我會時時謹記在心。

感謝食品工業發展研究所檢驗技術研發及服務中心主任 傅偉光博士、中興大學生物科技發展中心教授 謝淳仁博士、弘光科技大學食品科技系副教授 蔡政志博士、東海大學食品科學系 蔡政宗博士於繁忙中撥空審閱論文，口試時不吝指教，使得本論文能更加完善，在此致上由衷的感激。

另外，感謝系上所有老師和叔瑜助教、怡君助教與珮玲助教於實驗上的關心和協助，也謝謝王琴助理在學生的事務上時時給予指導與幫忙，使我的求學生涯能順利完成。

感謝學長姐育玫、書涵、文彥、佳佳、志剛、敬哲、麗娟、敬義在實驗上的指導與照顧，同窗好友怡樺、柏村、善存、Peter、仔仔、沂璉、百秀、松鼠、佑年、青蓉、小潘，學弟妹芄萱、巧馨、瀟菽、惠旻、慈樺和小新，謝謝你們為我的研究生涯帶來歡樂，就和拿到畢業證書一樣的開心。特別感謝怡樺，謝謝你讓我學會不認輸的毅力，所有眼前的困難都能迎刃而解，我會永遠記得，我們是肩並肩一起向前的。

最後感謝我的家人，謝謝你們的支持與體諒，讓我能無後顧之憂的完成學業，如今的成就唯有你們是我的最大功臣，願以此成就分享給我最愛的家人。

學生 高豪駿 謹致於
東海大學食品科學研究所
機能性食品開發研究室
中華民國九十九年十二月二十二日

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	4
一、大豆蛋白.....	4
二、蛋白質水解物機能性.....	5
三、蛋白質水解物製程介紹.....	5
四、Flavourzyme 簡介.....	7
五、反應曲面法.....	10
(一) 簡介.....	10
(二) 原理.....	11
1. 極值點區域逼近.....	11
2. 反應曲面數學模式建立.....	12
3. 反應曲面模式適切性之統計檢驗.....	14
(1) 變異數分析法.....	14
(2) 檢定係數.....	15
4. 極值點之決定.....	15
5. 因子影響效應分析.....	15

六、 膜過濾.....	16
(一) 膜分離原理.....	16
(二) 應用.....	19
七、 脂肪組織.....	20
(一) 白色脂肪組織.....	20
(二) 棕色脂肪組織.....	21
八、 脂肪細胞的研究.....	22
(一) 動物體內研究.....	22
(二) 細胞體外培養.....	22
(三) 3T3-L1 前脂肪細胞株.....	23
(四) 細胞株培養.....	23
1. 細胞增生/生長停滯.....	25
2. 荷爾蒙誘發分化/分化初期基因表現.....	25
3. 分化末期及分化停止.....	25
九、 脂肪細胞的脂質代謝.....	27
(一) 脂質生成.....	28
(二) 脂質分解.....	29
參、 材料與方法.....	33
一、 實驗材料.....	33

(一) 膜反應系統.....	33
(二) 膠體層析管柱.....	33
(三) 逆相層析管柱.....	33
(四) 細胞培養.....	34
(五) 丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量測定.....	34
(六) 蛋白質定量分析.....	34
二、 實驗方法.....	35
(一) 實驗設計.....	35
(二) 製備分離大豆蛋白水解物.....	35
(三) 濾膜區分.....	35
(四) 分子量分布檢測.....	38
(五) 膠體層析管柱純化活性區分物.....	39
(六) 逆相層析管柱純化活性胜肽片段.....	39
(七) 胜肽片段定序.....	40
(八) 細胞培養.....	40
(九) 丙三醇釋放量檢測.....	44
(十) 三酸甘油酯殘留量檢測.....	44
(十一) 蛋白質定量分析.....	45
(十二) 統計分析.....	46

肆、 結果與討論.....	47
一、 F-ISPH 最適水解條件.....	47
二、 F-ISPH 區分純化.....	58
(一) 濾膜區分.....	58
(二) 膠體區分.....	62
(三) 逆相層析.....	71
(四) 活性胜肽片段鑑定.....	78
伍、 結論.....	83
陸、 參考文獻.....	85

圖目錄

圖一、 pH 值對 Flavourzyme 活性之影響.....	8
圖二、 溫度對 Flavourzyme 活性之影響.....	9
圖三、 三因子中心混層設計概念圖.....	13
圖四、 垂直過濾與掃流過濾示意圖.....	18
圖五、 3T3-L1 前脂肪細胞分化過程.....	26
圖六、 人類脂肪細胞中脂解作用調控機制.....	31
圖七、 膜反應系統.....	37
圖八、 3T3-L1 脂肪細胞之實驗架構.....	41
圖九、 3T3-L1 脂肪細胞培養第 0 天(A)、第 4 天(B)與第 8 天(C)之分化構型.....	43
圖十、 120 min 水解時間下反應溫度與反應 pH 值對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響.....	53
圖十一、 50 °C 反應溫度下水解時間與反應 pH 值對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響.....	54
圖十二、 反應 pH 值 7 下水解時間與反應溫度對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響.....	55
圖十三、 F-ISPH 經不同分子量限值濾膜區分所得保留液與濾液之分子量分布圖.....	59

圖十四、 400ppm F-ISPH 及其濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇 釋放量之影響.....	61
圖十五、 400ppm F-ISPH 及其濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞中三酸 甘油酯殘留量之影響.....	63
圖十六、 F-ISPH 1kDa retentate 膠體管柱區分圖譜.....	64
圖十七、 400ppm F-ISPH 1kDa retentate 和其膠體管柱區分物對 3T3 -L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響.....	66
圖十八、 400ppm F-ISPH 1kDa retentate 和其膠體管柱區分物對 3T3 -L1 脂肪細胞中三酸甘油酯殘留量之影響.....	67
圖十九、 GF3 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影 響.....	69
圖二十、 GF3 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞中三酸甘油酯殘留量 之影響.....	70
圖二十一、 GF3 高效能液相層析之圖譜.....	72
圖二十二、 4 ppm GF3 和其逆相層析管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞 丙三醇釋放量之影響.....	74
圖二十三、 4 ppm GF3 和其逆相層析管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞 中三酸甘油酯殘留量之影響.....	75
圖二十四、 HF4 高效能液相層析之圖譜.....	76

圖二十五、 4 ppm HF4 和其逆相層析管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞 丙三醇釋放量之影響.....	77
圖二十六、 4 ppm HF4 和其逆相層析管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞 三酸甘油酯殘留量之影響.....	79
圖二十七、 RHF4-2 質譜圖.....	80
圖二十八、 RHF4-3 質譜圖.....	81

表目錄

表一、膜種類與特性.....	17
表二、五階層三變數中心混層實驗設計水解反應參數實驗值之範圍.....	36
表三、3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之五階層三變數中心混層實驗設計與實驗數據.....	48
表四、實驗點丙三醇釋放量曲面之二次多項式、檢定係數與變異係數.....	49
表五、影響 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量相關水解變數之變異數分析.....	50
表六、聯合檢測中丙三醇釋放量變異分析.....	52
表七、促脂解最適化模型驗證結果.....	57

摘要

本研究依據 3T3-L1 脂肪細胞的丙三醇釋放量作為促脂解肽篩選的指標，藉由反應曲面法 (RSM) 探討 Flavourzyme 水解分離大豆蛋白 (ISP) 的最適水解條件，以生產水解物可增加脂肪細胞的丙三醇釋放量。水解的變數分別為反應 pH 值 5.32-8.68、反應溫度 33.2-66.8 °C 與水解時間 19.2-220.8 min。反應曲面迴歸分析 (RSREG) 顯示，pH 7.12、48.8 °C、124.9 min，其水解物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量最大化可達 359.93 nmol/mg protein，依照最適化水解條件進行驗證實驗，結果顯示水解物對丙三醇釋放量為 359.92 nmol/mg protein，與預測值相符。為了進一步纯化與定序促脂解活性肽，首先利用 1,000-30,000 Da 的分子量限值 (MWCO) 濾膜初步區分水解物，結果指出 F-ISPH 經 1 kDa MWCO 濾膜區分所得 1 kDa retentate 促脂解活性最為顯著，400 ppm 的 F-ISPH 1 kDa retentate 可使丙三醇釋放量從 318.73 nmol/mg protein 提升至 378.19 nmol/mg protein ($p < 0.05$)。後續以膠體層析細部分離出分子量介於 189-2,080 Da 胜肽片段區分物具有最顯著的促脂解活性，於 4 ppm 添加濃度可顯著提升丙三醇釋放，從 318.73 nmol/mg protein 提升至 507.06 nmol/mg protein ($p < 0.05$)。最後透過逆相層析分離並纯化出兩種活性胜肽 RHF4-2 和 RHF4-3，各別添

加 4 ppm 對丙三醇釋放量即顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，丙三醇釋放量從 316.18 nmol/mg protein 分別提升至 580.59 nmol/mg protein 與 615.87 nmol/mg protein。RHF4-2 經鑑定其序列可能為 Leu-Leu-Leu、Ile-Leu-Leu 或 Ile-Ile-Ile，而 RHF4-3 則為 Val-His-Val-Val。

Abstract

The research was based on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes as a marker for screening the lipolysis-stimulating peptides. The optimum hydrolysis conditions of isolated soy protein (ISP) with Flavourzyme for increasing glycerol release in 3T3-L1 adipocytes were investigated by response surface methodology (RSM). The independent variables were reaction pH 5.32-8.68, reaction temperature (RT) 33.2-66.8 °C and hydrolysis time (HT) 19.2-220.8 min. Based on response surface regression (RSREG) procedure, the optimum hydrolysis of ISP with Flavourzyme for maximizing glycerol release (359.93 nmol/mg protein) in the cells were: pH = 7.12, RT = 48.8 °C and HT = 124.9 min. According to optimum hydrolysis conditions, the verification studies proved that experimental value (359.92 nmol/mg protein) and predicted value were very closely. In order to purify and sequence the lipolysis-stimulating peptides from Flavourzyme-ISP hydrolysates (F-ISPH), the first purification step employed several membranes with molecular weight cut-off (MWCO) of 1,000-30,000 Da to fractionate F-ISPH. The F-ISPH 1 kDa retentate obtained from the treatment of F-ISPH using 1,000 Da MWCO membrane could significantly ($p < 0.05$) increase glycerol release from 318.73 nmol/mg protein to 378.19 nmol/mg protein at 400 ppm level. The F-ISPH 1 kDa retentate was further fractionated by gel chromatography. The fraction with molecular weight between 189 to 2,080 Da could significantly ($p < 0.05$) increase glycerol release from 318.73 nmol/mg protein to 507.06 nmol/mg protein at 4 ppm level. The reverse-phase chromatography was further employed

to purify lipolysis-stimulating peptides including RHF4-2 and RHF4-3. Their glycerol release were significantly higher than control ($p<0.05$). Glycerol release of RHF4-2 and RHF4-3, respectively, increased from 316.18 nmol/mg protein to 580.59 nmol/mg protein and 615.87 nmol/mg protein at 4 ppm level. Amino acid sequence of RHF4-2 may be Leu-Leu-Leu, Ile-Leu-Leu or Ile-Ile-Ile. The sequence of RHF4-3 was Val-His-Val-Val.

壹、前言

近年來，肥胖已經成為許多已開發國家的流行趨勢，國人肥胖的發生率又與消費能力呈正相關 (Finkelstein et al., 2005)。根據行政院衛生署的研究指出，台灣約有四分之一的成年人體重過重 (行政院衛生署, 2009)。許多研究指出肥胖與一些疾病的發生有關，例如：第二型糖尿病、心血管疾病、睡眠呼吸暫停及癌症等 (Field et al., 2001; Must et al., 1999)。造成體重過重與肥胖的主要原因是能量攝取不平衡，當生物體能量攝取高於能量消耗時，多餘的能量就會以三酸甘油酯的形式儲存於脂肪組織，而脂肪細胞為構成脂肪組織最主要之細胞 (Shepherd et al., 1993; Hauner, 2004)。3T3-L1 前脂肪細胞株在刺激分化後，可正常表現脂肪細胞的特性 (Ntambi et al., 2000)，並使用不同刺激可使細胞內脂肪累積量有增加或減少的表現 (Shepherd et al., 1993; Carmen and Victor, 2006)，因此透過此細胞株的生理反應表現，可作為體外模式探討動物體脂肪的代謝途徑 (Yan et al., 2003)。

食品蛋白質為人體一重要營養來源，其價值為提供人體所需的胺基酸與能量以維持適當的生長與健康，而動物蛋白質又較植物蛋白質容易被消化吸收 (Babji et al., 2010)，但是植物蛋白質比起動物蛋白質較能提供良好的機能性 (Zhong et al., 2007)，例如：降血脂、降血液中膽固醇、減緩糖尿病引發腎臟疾病等 (Merritt, 2004; Sirtori et

al., 1995 ; Kontessis et al., 1990)。研究也指出，大豆蛋白經由不同酵素作用所分解出不同生理活性的胜肽更能提升原有蛋白質的機能性，例如 Alcalase 水解分離大豆蛋白生產具有抑制高血壓活性的胜肽片段 (Chiang et al., 2006)；利用微生物獲得的蛋白酶水解大豆蛋白，其水解物可減緩肉品脂質過氧化影響 (Zhang et al., 2010)；分離大豆蛋白經由枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 的蛋白酶水解產生的水解物可顯著降低肥胖大鼠的血脂與體脂含量 (Aoyama et al., 2000)；使用 Flavourzyme 與 Nutrase 水解分離大豆蛋白所獲得的水解物可促進 3T3-L1 脂肪細胞的脂解活性 (趙，2009)。

Flavourzyme 為來自於真菌的複合蛋白質水解酶，同時含有外切型蛋白酶與內切型蛋白酶特性，因此較一般酵素水解蛋白有更高的水解效率與低苦味之優點，亦可用於開發機能性水解物，例如各種不同來源之蛋白質水解酶水解分離大豆蛋白，結果均顯示以 Flavourzyme 作用具有最佳水解率，其水解物亦有最佳抗脂質累積活性 (崔，1996)。

許多研究指出可利用膜過濾系統中不同分子量限值之濾膜對蛋白水解物進行區分，可提升其機能性；以膜過濾系統區分大豆蛋白水解物，其區分物降高血壓活性為水解物的 8.6 倍 (Chiang et al., 2006)；Nutrase 與 Flavourzyme 生產之大豆蛋白物經膜過濾系統區分

皆能提升其抗脂質生成活性 (Tsou, et al., 2010b ; Tsou, et al.,2010a) ; 另外，分離大豆蛋白水解物經由膜過濾系統區分，可明顯提升促脂解活性 (趙，2009)。經由膜過濾系統初步區分，再進一步分離純化出生理活性胜肽，並鑑定其胜肽序列，將有助於後續探討促脂解肽的調控機制與其胜肽結構的關聯性。

本研究將以 Flavourzyme 對分離大豆蛋白進行水解，配合反應曲面法之實驗設計，探討最佳促脂解活性大豆蛋白水解物的生產條件。並進一步以膜過濾系統、管柱分離純化其活性胜肽與鑑定其序列。

貳、 文獻回顧

一、 大豆蛋白

大豆俗稱黃豆，學名為 *Glycine max Merrill*，屬豆科 (*Leguminosae*)，大豆屬 (*Glycine*) 一年生草本，為一種富含蛋白質、油脂及多種營養物質的食物，蛋白質含量約有 35 %。大豆經由脫脂、去皮與磨粉處理後可獲得脫脂大豆粉 (defatted soy flour)，此時蛋白質含量約為 50 %；脫脂大豆粉再以酸與乙醇去除醣類及風味物質可得濃縮大豆蛋白 (soy protein concentrate)，蛋白質含量提升至 65~70 %；濃縮大豆蛋白進一步以鹼液萃取蛋白質，離心去除纖維，再加酸調製大豆蛋白等電點使蛋白質沉澱而製成分離大豆蛋白 (isolated soy protein; ISP)，蛋白質含量可高達 85~90 % (Lusas and Riaz, 1995)。

早期蛋白質品質評定方法大多以蛋白質效率比 (protein efficiency ratio)，大豆蛋白質的甲硫胺酸 (Methionine) 含量較低，評定大豆蛋白質為非高生物價的蛋白質，但由於實驗對象的大白鼠對甲硫胺酸的需求量是人類的 1.5 倍，因此未能真正反應大豆蛋白質在人體的蛋白質效率比 (Sarwar et al., 1989)。研究也指出無論是濃縮大豆蛋白或分離大豆蛋白，其蛋白質中甲硫胺酸含量皆足夠人體的需求，因此大豆蛋白可作為取代動物性蛋白質之完全植物蛋白 (Young, 1991)。

目前已有許多研究證實大豆蛋白具有許多機能性，例如降低血中膽固醇及三酸甘油酯 (Anderson et al., 1995; Wang et al., 2004)、抑制食慾 (Nishi et al., 2001) 以及降低高血壓患者之血壓 (Yang et al., 2005)。

二、 蛋白質水解物機能性

蛋白質水解物發展的起源為改善消化系統受損之病患獲取足夠蛋白質來源 (Clemente, 2000)，爾後衍生出更多蛋白質水解目的，如改善質地、消除過敏性、降低黏度、增進起泡性或凝聚特性、增加風味等 (Lahl and Braum, 1994; Sathe et al., 2005)。隨著健康意識抬頭，更多研究顯示蛋白質水解物亦具有許多生理活性，如抗氧化活性 (Zhu et al., 2006)、抗菌活性 (McCann et al., 2006)、免疫調節活性 (Gill et al., 2000)、降血壓活性 (Chiang et al., 2006)、降血中膽固醇與三酸甘油酯活性 (Aoyama et al., 2000)、抗脂質生成活性 (Kim et al., 2007)、促進 3T3-L1 脂肪細胞脂肪分解活性 (趙，2009) 等。

三、 蛋白質水解物製程介紹

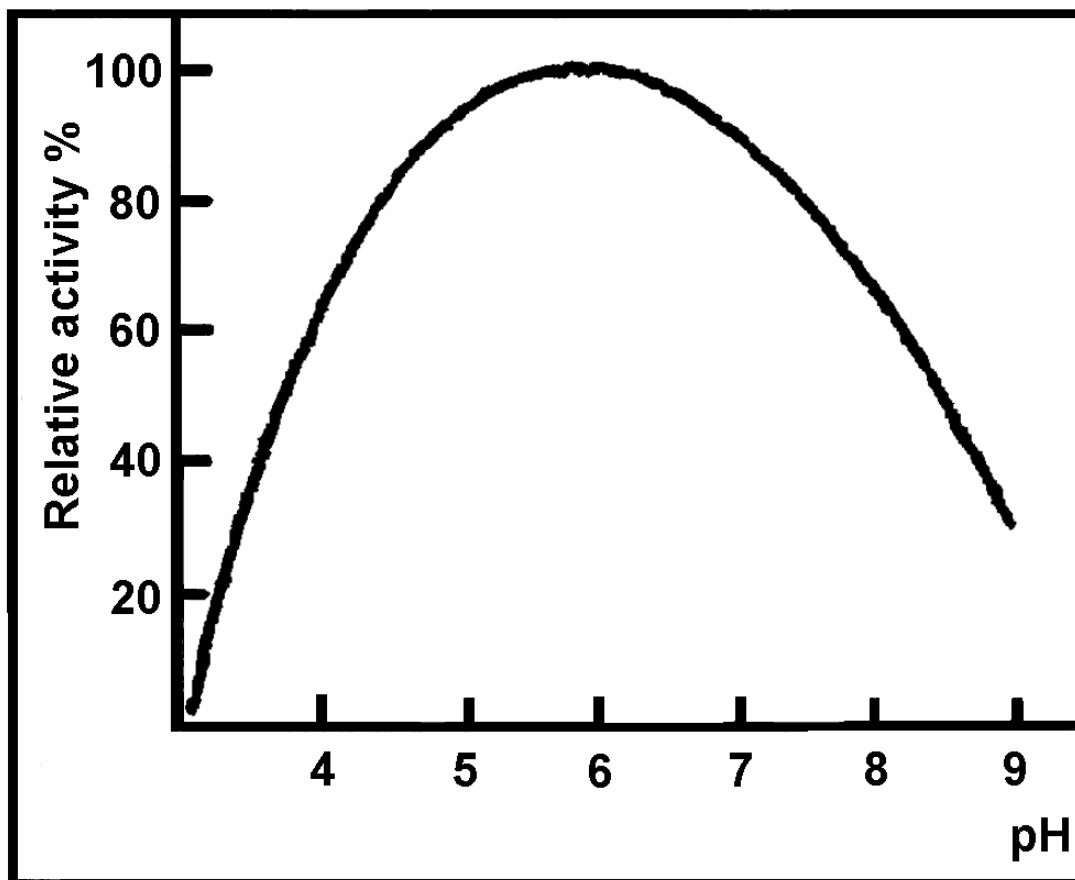
現今蛋白質水解物常用的製程方法有：酸水解、發酵法以及酵素水解。酸水解具有低成本、高水解率、無苦味等特性，但水解過程可能伴隨產生致癌物 monochloropropanol (MCP) 與 dichloropropanol

(DCP)，以及水解後中和 pH 所產生的高鹽分 ($\text{NaCl} > 40\%$) 和高含量麩胺酸鈉 (monosodium glutamate; MSG) 等不良影響 (鄭, 1997)。發酵法因利用麴菌進行水解蛋白質，反應過程不僅單純水解蛋白質，亦會產生揮發性物質，如醇類、有機酸、醛類、酯類等 (陳, 1993)，因此發酵法多用於醬油生產。酵素水解採用單純的蛋白質分解酶對蛋白質進行水解，對於水解產物的控制較發酵法方便，水解過程不會產生 MCP、DCP 等致癌物；水解酵素於溫和條件如常壓、低溫下進行即有很大的反應速率，相對也耗能低、對基質有特異的選擇性等。然而酵素水解之水解率往往不及於酸水解，導致產率下降，不過藉由改變酵素種類、水解環境之 pH 值與離子強度、作用溫度與時間等條件得以改善水解率 (鄭, 1997)。然而酵素水解過程會使蛋白質疏水性結構暴露 (Panyam and Kilara, 1996)，這些疏水性胜肽 (hydrophobic peptide) 是導致蛋白質水解物產生苦味的主要原因 (Ney, 1979)，為此可在水解時使用多種酵素來改善苦味產生，如使用同時含有內切酵素與外切酵素的 Flavourzyme 水解分離大豆蛋白，其水解物具有較高水解率與較低低苦味的特性 (Seo et al., 2008)。由此得知，利用複合酵素生產蛋白質水解物在食品工業和機能性食品開發上有很大的發展前景，本研究室已利用 Flavourzyme 生產具有抗脂質新生活性以及促進脂質分解活性之大豆蛋白水解物 (曾, 2008; 趙, 2009)。

四、 Flavourzyme 簡介

Flavourzyme 來自於 *Aspergillus oryzae*，由 Novo Nordisk 公司研發，為一同時含有內切型蛋白酶 (endopeptidase) 與外切型蛋白酶 (exo-peptidase) 之複合蛋白酶，內切型蛋白酶包含 aspartic protease、metalloprotease、serine protease，外切型蛋白酶則有 carboxypeptidase，因此使用 Flavourzyme 水解蛋白質具有高效率與低苦味之優點。然而 Flavourzyme 含有多種蛋白分解酶，導致最適作用環境探討無法準確描述。

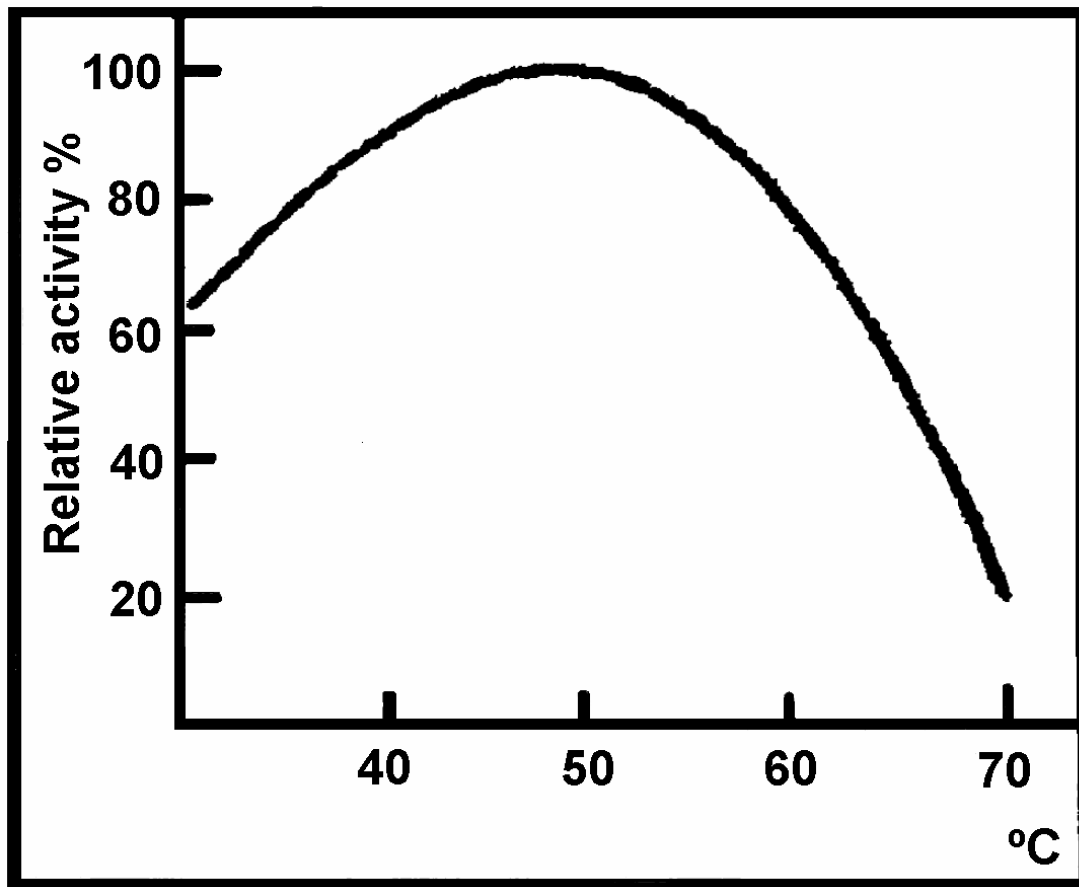
Buck (2003) 以 8% 分離大豆蛋白溶液探討 Flavourzyme 的酵素活性，在固定溫度 50 °C 時，pH 值於 5-7 有較佳的酵素活性 (圖一)，而 Flavourzyme 含外切型蛋白酶-carboxypeptidase 最適反應 pH 值接近 7，且於 pH 7 具有最佳的去除苦味能力，因此後續固定 pH 值為 7 時，顯示作用溫度在 50 °C 具有最佳酵素活性 (圖二)。上述最適作用環境探討是採用一次一因子 (one factor at a time) 實驗設計，此設計無法完全表達出其他固定因子與單一處理因子之間的交互作用 (interaction)，也就無法完整描述實際的最適作用環境，若要同時探討多因子與其交互作用影響，則可使用反應曲面法 (response surface methodology; RSM) 進行最適條件探討。



(Burk, 2003)

圖一、pH 值對 Flavourzyme 活性之影響。

Figure 1. Influence of pH on the activity of Flavourzyme on 8% isolated soy protein in 50 °C.



(Burk, 2003)

圖二、溫度對 Flavourzyme 活性之影響。

Figure 2. Influence of temperature on the activity of Flavourzyme on 8% isolated soy protein in pH7.

五、 反應曲面法

(一) 簡介

對於多因子系統的最適化，傳統大多以一次一因子 (one factor at a time) 實驗設計依序決定一個因子的影響進而找尋出最適條件。然而此方法通常沒有考慮因子與因子之間的交互影響 (interactive effect)，即使要考慮此影響，所需的實驗次數也大為增加，使用上也較耗時與耗成本；此外，倘若因子間的交互影響有顯著差異時，一次一因子實驗設計將無法呈現真正的最適值。為了改善上述缺點，一些最適化方法如：梯度法 (gradient method)、三角點搜尋法 (simplex method)、開展操作法 (evolutionary method) 及反應曲面法 (response surface methodology; RSM) 等被發展出來 (Himmelblau, 1970)，其中又以反應曲面法具有同時測定各因子之間的交互影響，較為許多文獻採用。反應曲面法為一結合數學及統計之技術，將問題模式化並分析求出變數 (variable) 對系統反應值 (response) 的影響 (Myers and Montgomery, 2002)。反應曲面法可同時探討兩個或兩個以上影響因子而產生一最適化反應條件。此方法早期被應用於工商業品管方面，近年來已廣泛應用於物理學、食品科學、社會學與農業化學等領域。而相對於傳統一次一因子實驗設計，反應曲面法可提供實驗更大效益，可由其特性說明之：

1. 運用統計分析技巧以最小成本獲得最多結果：利用對稱特性與回歸運算，可以減少實驗次數。
2. 系統化實驗設計：藉由一次實驗即可獲得多因子影響的反應極值以及因子影響程度。
3. 可解釋因子間的交互作用：利用交叉乘項的係數，得知因子之間的交互影響力。

(二) 原理

Box and Wilson (1951) 首先提出反應曲面法的設計概念，其基本構想係結合統計實驗設計方法及數據契合技巧 (data-fitting technique)，建立描述一群受測因子及目標函數間相互關係之數學模式，進而藉由此一模式探詢極值點所在位置。反應曲面法發展至今可歸納為五個最適化步驟：

1. 極值點區域逼近

根據既有文獻或基礎實驗數據之眾多因子挑選出適當的影響因子，推斷其有效範圍後，再利用陡升路徑法 (method of path of steepest ascent) 來找尋極值點區域。

(1) 陡升路徑法

在探討極值點所在區域時，一開始常常與極值差距極大，陡升路徑法即為探索極值所在區域的有效方法。陡升路徑法是運用起始點

(P₀) 沿著各角度單位距離設定實驗點，得知此區域變化，藉由觀察各角度方向之反應值與起始點之反應值，找尋兩者反應值最大差距角度，再依此角度路徑持續延伸，直到實驗點之反應值下降為止，此時實驗點則相當接近極值區域 (Myers and Montgomery, 2002)。

2. 反應曲面數學模式建立

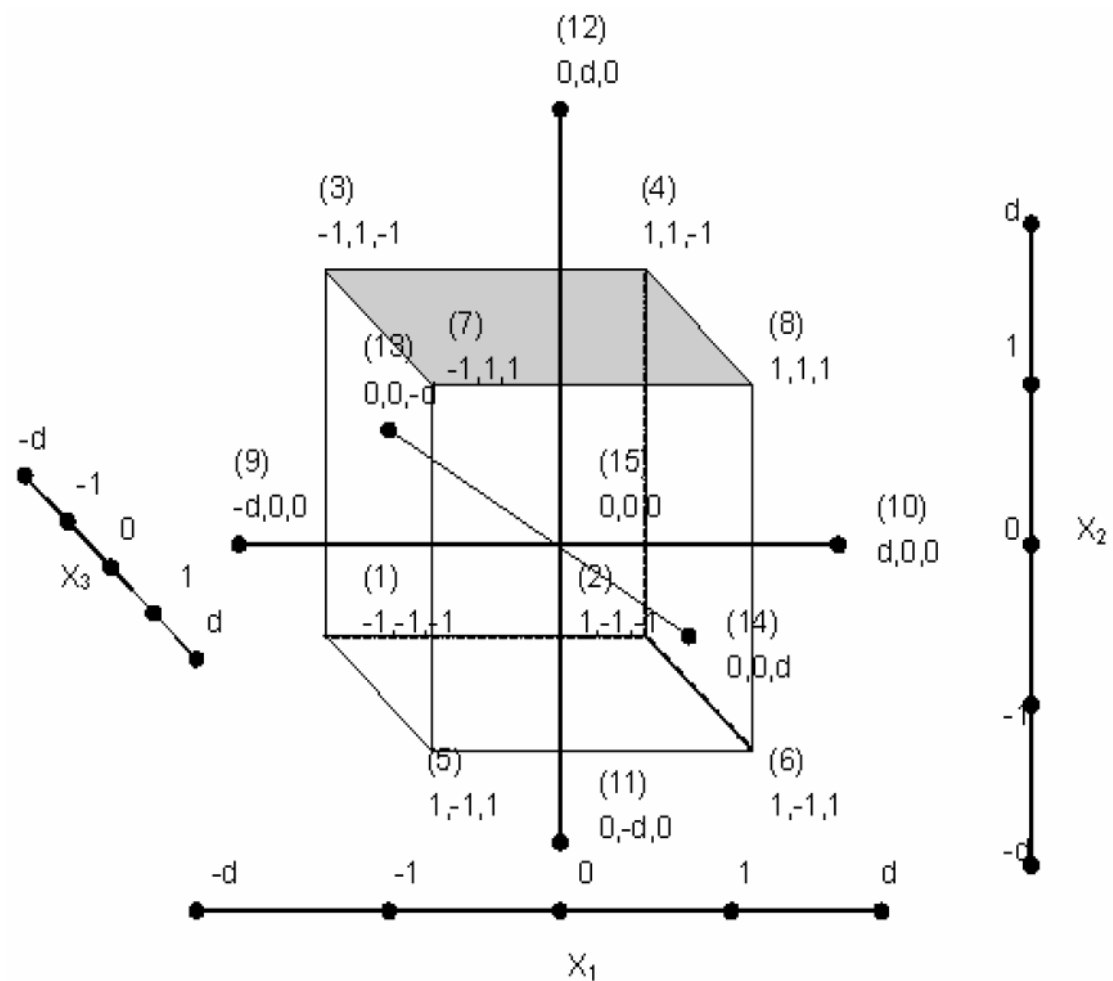
依照陡升路徑法的結果，利用中心混層實驗設計 (central composite design; CCD) 給予補充星點 (star point)、軸點 (axis point) 與中心點 (central point) 實驗，同時結合因子設計實驗之數據，利用多元回歸 (multiple regression) 技巧進行二階模式的數據契合。

(1) 中心混層實驗設計

中心混層實驗設計是利用中心點為起始點，以星點和軸點輔助下，模擬出起點周圍區域的反應狀況，再藉由二階模型 (second-order model) (1) 模擬找尋出極值點座標：

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^n \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i < j=2}^n \sum \beta_{kij} x_i x_j \quad (1)$$

以三因子舉例 (圖三)，依起始點為原點，向外延伸適當距離下設定為星點，星點之延伸距離 (d值) 為 $N_f^{1/4}$ ， N_f 為星點總數，軸點與原點之距離和星點與原點之距離相等，換言之，各星點與軸點都在以原點為中心的球型表面上，且彼此對稱之。中心點為座標原點 (0,0,0)



(Myers and Montgomery, 2002)

圖三、三因子中心混層設計概念圖。

Figure 3. Concept graph of central composite design with three factors.

進行重複實驗，目的為估計由儀器與人為操作所造成的純實驗誤差 (pure error)。如此一來，各因子之測試範圍涵蓋中心點 (0,0,0)、軸延伸點 (-d, +d) 與立方體之頂點 (-1, +1) 等五個測試水準。依照中心混層實驗設計進行實驗所得之結果，可利用 statistical analysis system (SAS) 統計軟體，以反應曲面回歸分析進行二階模式契合，並以此二階模式來描述反應曲面之變化 (Myers and Montgomery, 2002)。

3. 反應曲面模式適切性之統計檢驗

由實驗資料進行統計回歸分析而得之反應曲面模式，此模式對實驗數據適切程度可使用變異數分析法 (analysis of variance; AVONA) 以及檢定係數 (determination coefficient; R^2) 加以檢定。

(1) 變異數分析法

欲檢驗某數學模式其回歸係數是否為顯著時可由 F test 檢定。

$$F_0 = MS_{X1} / MS_E$$

其中， MS_E (residual mean of square) 為殘差之平均平方和

$MS_{X1} = SS_{X1} / \nu_{X1}$ 則為模式之平均平方和

SS_{X1} ($X1$ sum of square) 為模式之回歸變異

ν_{X1} 為自由度

再以F分佈 (F distribution) 來檢驗回歸適切性，由F分佈表查出誤差率為 α ，相對自由度之F值，若 F_0 大於F值則可認定此數學模式之適切性檢驗上有 $(1-\alpha)$ 水準以上的顯著性。

(2) 檢定係數

檢定係數 $R^2=SSR/SST$ ，即為數學模式之回歸變異對實驗總變異所描述的比率，SSR (regression sum of square) 為數學模式之回歸變異，SST (total sum of square) 為實驗總變異。若 R^2 越趨近 1，表示此數學模式可適切描述各實驗數據；反之 R^2 遠低於 1，表示此數學模式與各實驗數據總偏差相當大。

4. 極值點之決定

極值點又稱逗留點 (stationary point)，可能是極大值、極小值或鞍點 (saddle point)，一般以正則分析 (canonical analysis) 進行判斷 (Myers and Montgomery, 2002)。

5. 因子影響效應分析

各因子一階模式與二階模式，以及因子間交感作用對於反應值 Y 皆有不同程度影響，欲了解各系數之影響差異則可利用 t test 檢驗分析。t test 主要是將各項因子的係數與對應之標準偏差 (standard deviation; SD) 進行比較，若該比值和 t table 中相對自由度下 t value 小，表示此因子對反應值並無顯著影響。若該項係數與 SD 比值大於 t value，則此因子對反應值有顯著影響 (Myers and Montgomery, 2002)。

六、 膜過濾

膜過濾 (membrane filtration) 定義為利用流體通過不同孔徑 (pore size) 或分子量限值 (molecular weight cutoff; MWCO) 薄膜以分離出兩種以上分離物 (Cheryam, 1998)。一般過濾膜可依孔徑大小粗略分為四類：微過濾 (microfiltration; MF)、超過濾 (ultrafiltration; UF)、奈米過濾 (nanofiltration; NF) 以及逆滲透 (reverse osmosis; RO)。這四類濾膜依照孔徑大小差異特性而應用於不同物質 (表一) (Cheryam, 1998)。膜過濾系統於食品加工上具有濃縮液體且不會使蛋白質和其他熱敏感物質變性，因此已廣泛應用於果汁濃縮或酒類、牛奶等熱敏感物質的處理 (Giorno and Drioli, 2000)。

(一) 膜分離原理

膜分離原理可依照操作形式分為垂直過濾 (dead-end filtration) 與掃流過濾 (cross-flow filtration)，如圖四所示 (Cheryam, 1998)。垂直過濾為流體直接流過濾膜，濾出液為小於膜孔徑之物質，大於膜孔徑之物質會阻塞於膜上，導致過濾效率易快速降低，因此多運用在少量試樣或大孔徑之微濾膜。掃流過濾為流體沿著濾膜表面上平行流動，藉由調節壓力促使小於膜孔徑物質穿透濾膜成濾液 (permeate)，因流體沿著濾膜表面平行流動產生平行剪應力 (shear stress)，可將堆積在膜上的物質回收形成保留液 (retentate)，並減緩膜面阻塞情況，

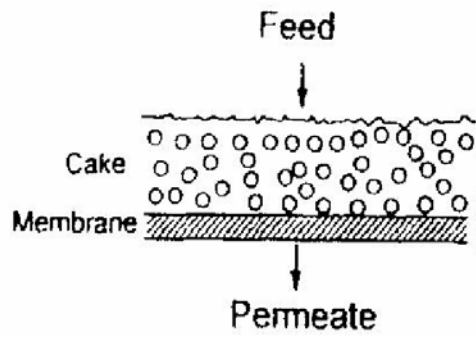
表一、膜種類與特性。

Figure 1. Membrane types and characteristics.

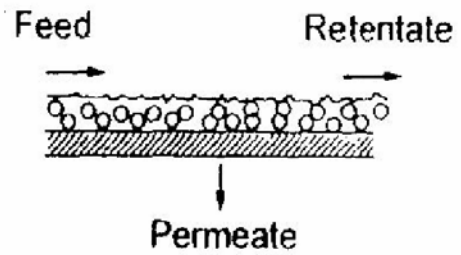
Membrane type	Pore size	Retentate	Permeate	Application
Microfiltration	0.1~10 (μm)	suspended particles, cell, bacteria, water	dissolved solutes, water	fruit juice concentration, alcoholic beverages clarification, removing bacteria
Ultrafiltration	0.002~0.5 (μm)	large molecules, protein, virus, water	small molecules, water	milk concentration, enzyme recovery
Nanofiltration	$8 \times 10^{-4} \sim 7 \times 10^{-3}$ (μm)	small molecules, divalent salts, water	monovalent ions, water	sugar refining, separation of pigment
Reverse osmosis	$3 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-3}$ (μm)	all solutes, water	water	seawater desalting, harvesting metal ions

(Cheryam, 1998)

DEAD-END FILTRATION



CROSS-FLOW FILTRATION



(Cheryam, 1998)

圖四、垂直過濾與掃流過濾示意圖。

Figure 4. Schematic diagram of dead-end filtration and cross-flow filtration.

延長濾膜使用時間並維持高濾速之優點，多運用在大量試樣或小孔徑之超過濾膜以及奈米過濾膜上。

膜過濾操作除了過濾區分還包含濾析 (diafiltration)。濾析是指一邊透析 (dialysis) 一邊過濾 (filtration) 的操作，此操作可降低殘留在保留液中小於膜孔徑的物質。操作時需將循環液維持一定體積，並在處理槽中加入透析液，如此可讓循環液中的小分子物質持續的通過濾膜形成濾液。常用透析液為 RO 水或是緩衝溶液。透析液體量與循環液液體比值越高，則循環液中小分子含量就越低。

(二) 應用

藉由膜過濾系統區分不同分子量的特性，近年來已有許多研究利用膜過濾系統做初步分離純化酵素或胜肽以提高其生理活性，如從大蒜中純化超氧化物歧化酶 (Wang et al., 2010)、魚內臟分離蛋白質分解酶 (Li et al., 2006)、利用超濾膜區分改善鱈魚蛋白水解物抗氧化活性 (Jeon et al., 1999)、玉米蛋白水解物與大豆蛋白水解物經濾膜區分可提升其降血壓活性 (Kim et al., 2004; Chiang et al., 2006) 以及使用超濾膜區分出具有抗脂質生成活性之大豆蛋白水解物 (Tsou et al., 2010)。更有許多純化活性胜肽之研究皆以膜過濾系統作為分離純化之首要步驟，如鱈魚蛋白水解物分離出抗氧化活性胜肽 (Je et al., 2005)、大豆發酵萃取出純化具降血壓活性之胜肽 (Rho et al., 2009)

以及黑豆蛋白水解物純化抗脂質新生活性胜肽 (Kim et al., 2007)，因此本研究將大豆蛋白水解物使用膜過濾系統進行初步區分，篩選出最佳促脂解活性之區分物，以利後續純化步驟的進行。

七、 脂肪組織

脂肪組織為動物體中特化的結締組織，主要由內皮細胞 (endothelium)、無脂質堆積的前脂肪細胞 (preadipocyte) 以及成熟且充滿脂質的脂肪細胞 (adipocyte) 所組成 (Hauner, 2004)，具有儲存與供應個體能量、維持體溫、保護臟器及供應必需脂肪酸等功能。當動物體攝取能量大於消耗時，多餘的能量則轉換成脂肪的形式儲存於脂肪組織；而當動物體攝取能量低於消耗時，則會將脂肪轉化為能量並釋出，以維持動物體能量恆定 (Gregoire et al., 1998)。

哺乳動物的脂肪組織分為兩種類型，即為白色脂肪組織 (white adipose tissue) 與棕色脂肪組織 (brown adipose tissue)，皆具有調節體內能量的功能 (Jequier and Tappy, 1999)。然而分布情況與存在數量則因動物體的年齡及個體產生差異，於成年動物中大部分存在以白色脂肪組織為主；於冬眠動物體內則有較多的棕色脂肪組織 (Albright and Stern, 1998)。

(一) 白色脂肪組織

白色脂肪組織為儲存能量的主要場所，主要分布於動物體的腹

部、臀部、大腿及內臟區域 (Casteilla et al. 2001)。白色脂肪組織於新生動物體含量極少，但隨著年齡的增長會慢慢增加 (Hahn and Novak, 1975)。白色脂肪組織內脂質約佔 65~80 %，其中三酸甘油酯佔脂質的 90~95 %，其餘為少量的游離脂肪酸、雙酸甘油酯、單酸甘油酯、膽固醇與磷脂質等 (Albright and Stern, 1998)。當個體能量不足時，將三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 進行脂解作用 (lipolysis) 轉換成可利用的丙三醇 (glycerol) 與脂肪酸 (fatty acid)，當體內能量過多，白色脂肪組織就會將能量以三酸甘油酯形式儲存備用 (Darlington et al., 1998)。白色脂肪組織亦有熱絕緣、緩衝保護臟器的功能 (Albright and Stern, 1998)，如位於內臟附近的脂肪組織 (visceral adipose tissue) 可作為襯墊 (pad)，以減少震動與摩擦，進而保護內臟不受到物理性的傷害 (Rosen and MacDougald, 2006)。而位於皮下的脂肪 (subcutaneous adipose tissue) 則是隔絕外界的環境對生物體的衝擊，特別是對於生活在寒冷地區的生物 (Trujillo and Scherer, 2006)。

(二) 棕色脂肪組織

棕色脂肪組織為熱生成場所，因佈滿血管與粒腺體而呈現紅棕色，動物體分布範圍有限，僅於肩胛間、頸背部、液窩和腎周圍 (Albright and Stern, 1998)。人類於新生兒期間即有棕色脂肪組織以維持體溫，但於孩童時期即大量消失，並轉變成白色脂肪組織，到成年

階段僅有極少數棕色脂肪組織殘留 (Nedergaard et al., 2007)。棕色脂肪組織主要功能為消耗能量產生熱，產熱方式是利用非耦合蛋白 (uncoupling protein 1; UCP1) 作為粒腺體內氫離子通道，藉由運送氫離子使 UCP1 產生振動而產熱 (Rosen et al., 2000)。在動物生理上，棕色脂肪組織可做為禦寒之用，哺乳動物於冬眠時期或新生嬰兒皆使用此方法維持體溫 (Cannon and Nedergaard, 2004)。

八、 脂肪細胞的研究

脂肪細胞為構成脂肪組織最主要之細胞 (Hauner, 2004)，而研究脂肪細胞主要可分為動物體內研究 (*in vivo*) 與體外細胞培養 (*in vitro*) 兩種方式：

(一) 動物體內研究

動物體內研究為直接觀察樣品處理對動物體的整體影響，包括脂肪組織或其他組織以及不同時期之動物體等。因動物體為一複雜之反應器，脂肪細胞表現受各種因子及其交互作用影響，其生理環境變化無法單純探討各別處裡對目標細胞之影響與機制，因此探討樣品對目標細胞的直接作用可採用體外細胞培養。

(二) 細胞體外培養

體外細胞培養為模擬體內的生理環境(溫度、滲透壓、無菌環境)，使用培養基提供細胞生長所需之的養分，因此體外培養具有培

養之細胞不受體內複雜環境影響的特性，可單純研究細胞的運動、訊息傳遞、生合成與代謝等；然而，細胞於體外培養，在缺乏體內其他因子影響，使細胞表現與體內細胞不完全等同。

(三) 3T3-L1 前脂肪細胞株

目前用於體外研究的前脂肪細胞模型主要有兩類：一類即間質幹細胞模型 (mesenchymal stem cell model)，這類細胞還未進行定向 (non-committed) 到脂肪細胞譜系 (adipocyte lineage)，此種幹細胞除了可分化成脂肪細胞外，還可分化成肌肉細胞 (myocytes)、神經細胞 (neurocytes) 及軟骨細胞 (chondrocytes) (Minguell et al., 2005)，常見的細胞為 C3H10T1/2。另一類為前脂肪細胞模型 (preadipose cell model)，屬於定向 (committed) 的脂肪細胞譜系，經由誘發分化成為成熟的脂肪細胞。常用於研究之細胞為 3T3-L1 與 3T3-F422A，此二種細胞皆從 Swiss 3T3 小鼠胚胎細胞分離出來 (Green and Kehinde, 1974)，其中 3T3-L1 前脂肪細胞為目前最廣泛用於研究脂肪細胞分化過程的細胞模型 (Ntambi and Kim, 2000)，3T3-L1 細胞經由分化過程，可完整的表現出脂肪細胞的生理活性及細胞型態 (Green and Kehinde, 1974)。

(四) 細胞株培養

3T3-L1前脂肪細胞的發展過程可分為四個時期：細胞生長/生長

停滯、荷爾蒙誘發分化、分化初期基因表現、分化末期及分化停止，此過程稱為脂質新生 (adipogenesis) (Cowherd et. al., 1999; Gregoire et al., 1998)。3T3-L1前脂肪細胞於培養過程中會持續增生分裂，型態狀似纖維母細胞，當細胞與細胞間緊密接觸使細胞週期進入G₀/G₁期而停止增生，此時細胞於培養皿上長滿成單層 (monolayer) (Green and Kwhinde, 1974)。其次添加外源性分化試劑 insulin、dexamethasone (DEX)、3-methyl-1-isobutylxanthine (IBMX) 於含胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS) 之培養基可有效地誘導細胞分化 (Student et al., 1980)。Insulin 可藉由 insulin-like growth factor-1 (IGF1) receptor 作用而誘導脂肪細胞的分化 (Smith et al., 1988)。DEX 為一種合成的 glucocorticoid 類似物，與 glucocorticoid receptor 結合可活化細胞轉錄因子 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) β 達到誘導分化 (Shugart and Umek, 1997)。IBMX 為 cycle adenosine monophosphate (cAMP) phosphodiesterase 的抑制劑，造成細胞內 cAMP 濃度上升而誘導分化 (Ntambi and Kim, 2000)。經由分化試劑影響，細胞分化初期轉錄因子 C/EBP β 與 C/EBP δ 表現，進而影響分化末期轉錄因子 C/EBP α 與 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 表現，完成細胞分化並開始進行脂質堆積與脂肪細胞激素表現，此時細胞型態轉變為圓形巨大的成熟脂肪細胞 (Gregoire et al., 1998)。

1. 細胞增生/生長停滯：

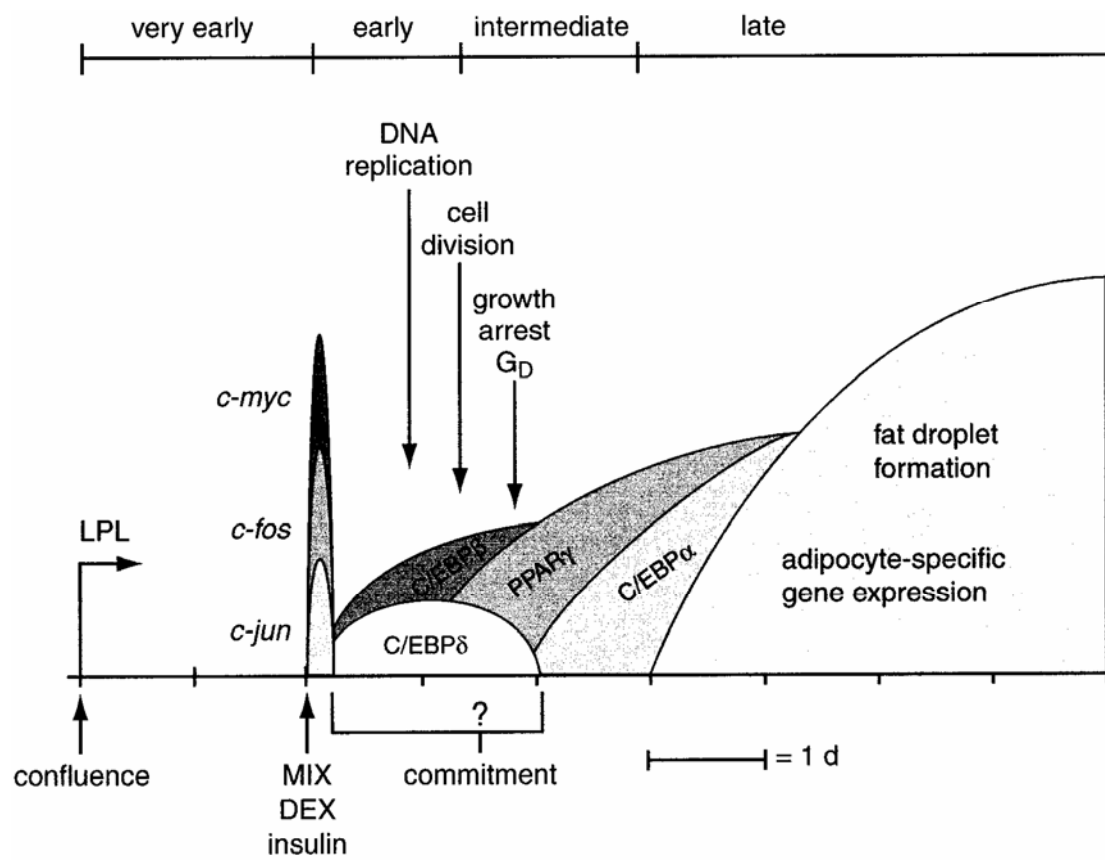
在刺激 3T3-L1 前脂肪細胞分化前，須讓細胞增生至長滿，藉由細胞與細胞相互接觸而產生接觸性生長抑制作用，使細胞處在細胞週期G₀/G₁時期，細胞停止分裂，準備進入分化階段。

2. 荷爾蒙誘發分化/分化初期基因表現：

前脂肪細胞於生長停滯期，給予外源性分化試劑 (insulin、DEX、IBMX) 誘導 1 hr 後，分化初期轉錄因子 c-fos、c-jun、c-myc、C/EBPβ 與 C/EBPδ 即開始表現 (Ntambi and Kim, 2000)。c-fos、c-jun 與 c-myc 的表現促使前脂肪細胞脫離生長停滯期並進行一至二次的細胞分裂，於誘導分化後 2 至 6 hr 停止表現，接著前脂肪細胞脫離細胞週期，走向分化 (Richon et al., 1994)。C/EBPβ 與 C/EBPδ 分別藉由 DEX、IBMX 和 insulin 誘導而表現，並於分化 24 hr 有最大表現。此三種轉錄因子的表現會提升分化末期轉錄因子 C/EBPα 與 PPARγ 表現 (Ntambi and Kim, 2000) (圖五)。

3. 分化末期及分化停止：

隨著分化末期轉錄因子 PPARγ 與 C/EBPα 表現，初期轉錄因子 C/EBPβ 與 C/EBPδ 逐漸減弱表現，使細胞增生完全停止，並開始表現脂肪細胞特異基因 (Rosen et al,2000; Ntambi and Kim, 2000)。此期間的脂肪細胞對三酸甘油酯代謝相關的酵素、蛋白質、mRNA 開



(Ntambi and Kim, 2000)

圖五、3T3-L1 前脂肪細胞分化過程。

Figure 5. Progression of 3T3-L1 preadipocyte differentiation.

始表現，包括甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GPDH)、甘油醛-3-磷酸去氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH)、甘油-3-磷酸醯基轉移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase; GPAT)、乙醯輔酶 A 羧化酶 (acyl CoA carboxylase)、檸檬酸 ATP 裂解酶 (ATP citrate lyase)、蘋果酸酶 (malic enzyme) 與脂肪酸合成酶 (fatty acid synthetase) (Wise and Green, 1979; Weiner et al., 1991)。另外脂肪細胞還會生成脂肪組織特異性產物，如葡萄糖轉運子 (glucose transporter; GLUT) 4、胰島素受體 (insulin receptor; IR)、脂肪酸結合蛋白 (adipocyte protein 2/fatty acid binding protein; aP2/FABP) 及脂肪油滴表面蛋白 (Perilipin) (Herreros and Birnbaum, 1989; Cowherd et al., 1999; Greenberg et al., 1993)；以及脂肪細胞分泌激素，如瘦體素 (Leptin)、介白質素-6 (interleukin-6) 與脂聯素 (adiponectin) (Cowherd et al., 1999; Bastard et al., 2002; Kern et al., 2003)。

九、 脂肪細胞的脂質代謝

分化完成的脂肪細胞即具有脂質生成作用 (lipogenesis) 和脂質分解作用 (lipolysis)，兩者作用的平衡是影響細胞脂質堆積程度的關鍵。

(一) 脂質生成

脂質生成作用包含脂肪酸的合成與三酸甘油酯的合成，脂質的生成來源可由各種非脂肪物質轉換獲得，如飲食中獲取的碳水化合物與蛋白質。

脂肪酸獲得方式由飲食中三酸甘油酯獲得或經由細胞合成，食品中三酸甘油酯經過消化吸收後在血液中以乳糜微粒 (chylomicrons) 或脂蛋白 (lipoprotein) 的形式運送，藉由脂肪細胞分泌的脂蛋白脂解酶 (lipoprotein lipase, LPL) 水解成丙三醇與游離脂肪酸，血液中的游離脂肪酸以濃度依賴性的方式 (concentration-dependent manner) 藉由脂肪細胞膜上轉移蛋白 (transmembrane transport protein) 與脂肪酸結合蛋白，運送至脂肪細胞內 (Abumrad et al., 1984)。細胞合成脂肪酸途徑主要發生於細胞質中，藉由丙酮酸氧化產生的乙醯輔酶 A 作為受質，經乙醯輔酶 A 羧化酶羧化為丙二醯輔酶 A (malonyl-CoA)，再利用脂肪酸合成酶構成脂肪酸。

脂肪細胞中主要以三酸甘油酯作為脂質儲存的形式，三酸甘油酯是由一分子的丙三醇與三分子的游離脂肪酸所構成。然而許多研究認為脂肪細胞中缺乏甘油激酶 (glycerol kinase) (Reshef et al., 2003)，無法直接利用丙三醇合成三酸甘油酯；因此合成三酸甘油酯則以醱酵解作用中的中間產物-二羥基丙酮磷酸 (dihydroxyacetone phosphate)

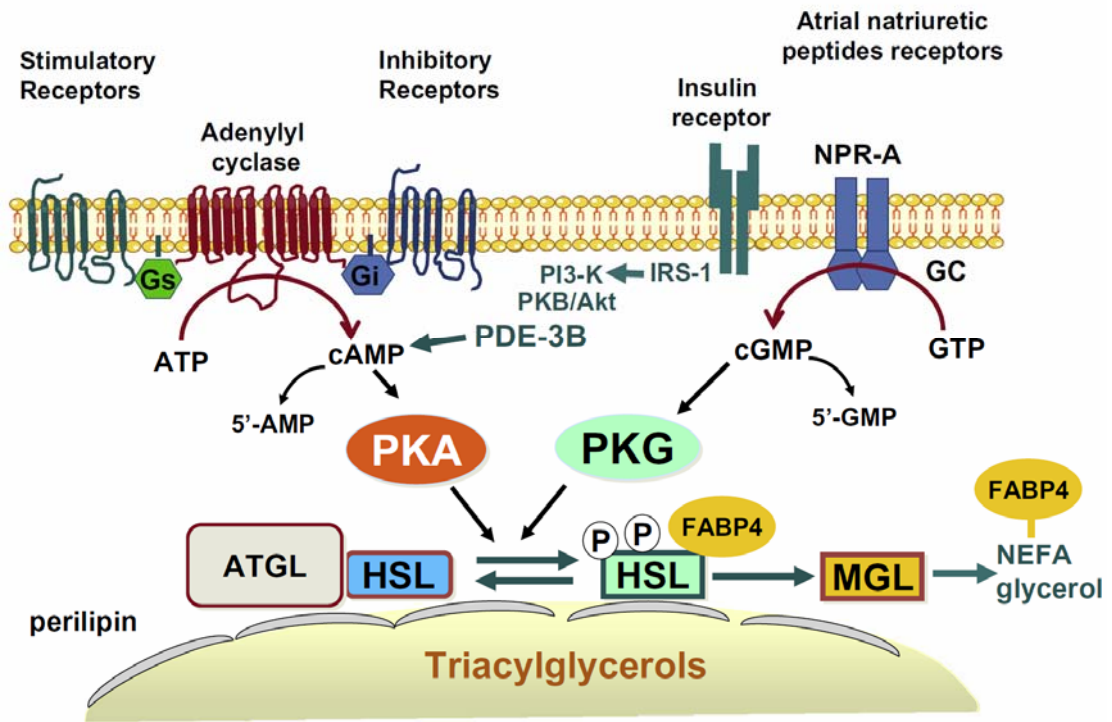
為前驅物，經由 NADH 與甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GPDH) 反應生成甘油-3-磷酸 (glycerol-3-phosphate, G3P)。脂肪酸加上 ATP 與 CoA，經由醯基輔酶 A 合成酶 (acyl-CoA synthetase) 生成醯基 CoA (fatty acyl-CoA)，二分子醯基 CoA 與甘油-3-磷酸在醯基轉移酶 (acyl transferase) 作用下形成 1,2-二醯基甘油磷酸 (1,2-diacylglycerol phosphate)，另一分子的醯基 CoA 於二醯基甘油醯基轉移酶作用下與 1,2-二醯基甘油磷酸形成三酸甘油酯 (Weiss et al., 1960)。

(二) 脂質分解

脂質分解作用為三酸甘油酯的水解過程，脂肪細胞中三酸甘油酯的水解經三個連續反應完成，此反應藉由三種脂解酵素作用：三酸甘油酯分解酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL)、荷爾蒙敏感性脂解酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 與單酸甘油酯分解酶 (monoglyceride lipase)。首先三酸甘油酯先經由 ATGL 與 HSL 作用，釋放一分子的脂肪酸與雙酸甘油酯 (diglyceride)，雙酸甘油酯接著與 HSL 作用產生單酸甘油酯 (monoglyceride) 與脂肪酸，最後以 MGL 將單酸甘油酯水解成丙三醇與脂肪酸，完成一系列的脂解作用 (Jocken and Blaak, 2008)。然而一系列的脂解作用，在脂肪細胞內又受許多荷爾蒙因子所調控，當細胞膜上腎上腺素受體接受刺激導致細

胞內 cAMP 表現量上升，使得 cAMP 依賴性蛋白質激酶 (protein kinase A, PKA) 活化，PKA 的活化可磷酸化 HSL 與脂肪油滴表面蛋白 (perilipin)，當 HSL 磷酸化可提升其酵素的脂解活性且產生位移作用 (translocation) 至油滴進行脂解 (Lafontan and Langin, 2009)；perilipin 為附著在細胞油滴表面上的結構蛋白，具有阻礙脂肪分解酶分解細胞中油滴的作用，perilipin 磷酸化則會失去阻礙脂解酵素接近的能力 (Brasaemle, 2007)，並釋出 perilipin 上附著蛋白 (α/β hydrolase domain containing protein 5; ABHD5)，ABHD5 可與細胞質中脂解酵素 ATGL 結合產生位移作用至油滴表面，以提升細胞脂肪分解能力 (Granneman et al., 2007)。MGL 於脂肪細胞內表現量豐富，因此活性也不易受荷爾蒙調控 (Lafontan and Langin, 2009) (圖六)。

三酸甘油酯經由上述脂解作用後所產生的遊離脂肪酸，可於脂肪細胞中由醯基輔酶 A 合成酶再次催化成醯基 CoA，再和甘油-3-磷酸進行酯化反應形成三酸甘油酯；倘若脂解速率大於再酯化速率，游離脂肪酸將由脂肪酸結合蛋白 (fatty acid binding protein) 4 運送至細胞外與血漿中白蛋白 (albumin) 結合，藉由血液運送至各組織，進行脂肪酸氧化產生能量 (Wang et al., 2008)。至於脂解作用另一產物-丙三醇於脂肪細胞中不易被利用，因此大多由細胞膜上通道蛋白 (aquaporin 7; AQP7) 釋放至血漿中，再運送至具有高甘油激酶活性的



(Lafontan and Langin, 2009)

圖六、人類脂肪細胞中脂解作用調控機制。

Figure 6. Regulated mechanism of human adipocyte lipolysis.

組織利用，如肝臟、腎臟等 (Wang et al., 2008; Robinson and Newsholme, 1969)。

由上述脂肪細胞脂解作用的過程可得知，測定脂肪細胞釋出於培養基中的丙三醇含量，可作為探討機能性成分對脂肪細胞脂解作用影響的主要指標，已有許多文獻採用丙三醇釋放量為指標探討受測物對脂解活性的影響 (Hsu et al., 2003; Green et al., 2004; Juan et al., 2005; Szkudelska et al., 2008; Li et al., 2008)。本研究室先前已篩選出 Flavourzyme 水解 ISP 生產之分離大豆蛋白水解物 (Flavourzyme-isolated soy protein hydrolysate; F-ISPH) 與其濾膜區分物具有良好的促脂解活性，並初步了解促脂解的機制。本研究將以 3T3-L1 脂肪細胞培養液中丙三醇釋放量為指標，利用反應曲面法進一步探討促脂解活性 F-ISPH 的最適生產條件。接著以膜過濾系統、膠體管柱與逆相層析管柱依序分離純化活性胜肽，再配合測定脂肪細胞中三酸甘油酯殘留量為輔助指標，篩選出活性胜肽片段，最後鑑定其胺基酸序列並合成適量胜肽驗證促脂解活性。

參、材料與方法

一、實驗材料

分離大豆蛋白 (isolated soy protein, ISP) 購自台灣振芳股份有限公司；蛋白酶 Flavourzyme® Type A 購自 Novo Industry A/S (Copenhagen, Denmark)。

(一) 膜反應系統

捲式膜 (spiral-wound membrane)，分子量限值 (molecular weight cutoff, MWCO) 分別為30、10、1 kDa (kilo daltons) 皆購自 Osmonics Inc. (Minnesota, USA)；膜反應系統 (membrane reactor system)購自邁先生物技術股份有限公司 (Taipei, Taiwan)。

(二) 膠體層析管柱

膠體層析管柱 Superdex™ peptide 10/300 GL_10×300mm 購自 GE Healthcare (Sweden)，標準品 cytochrome C、aprotinin、gastrin I、glycine*3、glycine 皆購自於 Sigma(St. Louis, MO, USA)。蛋白質純化儀 ÄKTAprime plus 購自 GE Healthcare (Sweden)。

(三) 逆相層析管柱

逆相層析管柱 Develosil™ ODS-HG-5_4.6×250mm 購自 Nomura (Japan)。HP 1100 series quaternary pump、variable wavelength detector 購自 Waldbromm (Germany)。

(四) 胜肽質譜分析

液相串聯層析質譜儀 Finnigan LTQ XL 購自 Thermo Electron (Massachusetts, USA).

(五) 細胞培養

本實驗採用 3T3-L1 前脂肪細胞株購自食品工業發展研究所 (Hsinchu, Taiwan) ; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-0) 購自 Gibco (New York, USA) ; 胎牛血清 (Charcoal/Dextran treated fetal bovine serum, Lot : 315734) 購自 Biological Industries (Kibbutz, Isral) ; isobutyl-methylxanthine (IBMX) 、 dexamethasone (DEX) 、 insulin 、 potassium chloride 、 sodium chloride 、 sodium bicarbonate 、 HEPES 、 nonidet P-40 substitute (NP-40) 、 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 及 sodiun deoxycholate 均購自 Sigma (St. Louis, MO, USA) potassium phosphate monobasic 、 sodium phosphate dibasic 購自於 Mallinckrodt Baker (NJ, USA) 。 Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane 購自 Bio-Rad (CA, USA) ; 倒立顯微鏡 IX71 購自 Olympus (Japan) 。

(六) 丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量測定

試劑組 GY 105 與 TR 213 購自 Randox (Antrim, United Kingdom) 。

(七) 蛋白質定量分析

BCA™ Protein Assay Kit 購自 Pierce Biorechology (IL, USA) 。

二、 實驗方法

(一) 實驗設計

本實驗採用三變數、五階層之中心混層實驗設計 (CCD)，探討 Flavourzyme® Type A 水解大豆蛋白生產促脂解蛋白水解物之最適水解條件。依據趙 (2009) 製備促脂解大豆蛋白水解物之水解條件，設計探討的水解變數分別為：反應 pH 5.32-8.68、反應溫度 33.2-66.8 °C、水解時間 19.2-220.4 min，如表二所示。

(二) 製備分離大豆蛋白水解物

配製 2.5% (w/v) ISP，並加入酵素，其酵素與受質比例為 1:100 (w/w of ISP)，依實驗設計條件下於不同的反應 pH 值、反應溫度以及水解時間進行水解；所得之水解物於設定水解時間內取出，以沸水浴加熱 15 min 使酵素失活，冷卻後水解物經 9,000 ×g 離心 15 min，取上清液進行冷凍乾燥所得 ISP 水解物 (ISP hydrolysate, ISPH) 作為後續細胞實驗樣品。

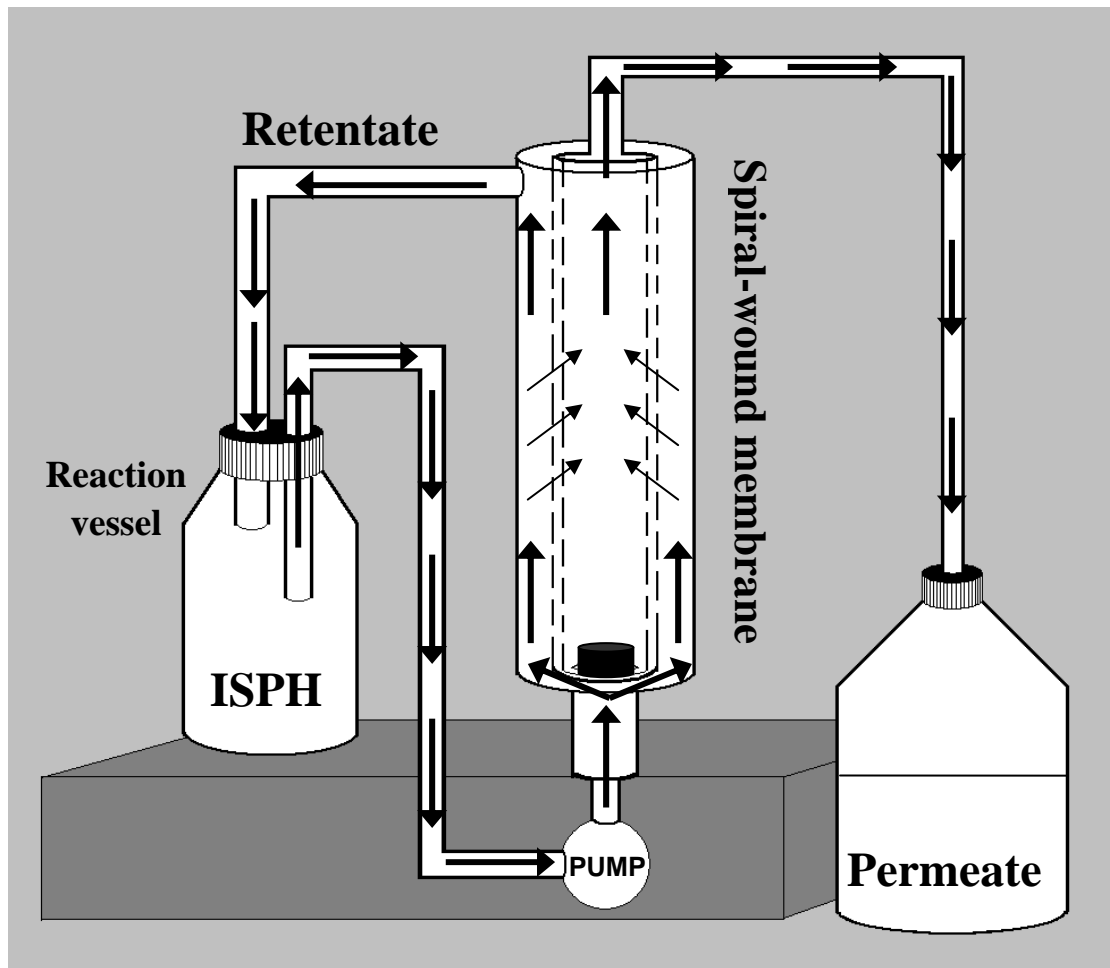
(三) 濾膜區分

膜反應系統如圖七所示，使用不同分子量限值 (molecular weight cutoff; MWCO) 之濾膜依序進行區分。水解後之離心上清液置於樣品槽，經由幫浦運送至濾膜，分子量小於濾膜的水解物會通過濾膜，並收集為濾液 (permeate)；無法通過濾膜的大分子則回到反應

表二、五階層三變數中心混層實驗設計水解反應參數實驗值之範圍。

Table 2. The reaction parameters experiment range of five-level -three-factor central composite rotatable experimental design.

Independent variable	Coded level of variable				
	-1.68	-1	0	1	1.68
pH (X_1)	5.32	6	7	8	8.68
reaction temperature (X_2) (RT, °C)	33.2	40	50	60	66.8
hydrolysis time (X_3) (HT, min)	19.2	60	120	180	220.8



圖七、膜反應系統。

Figure 7. Membrane reactor system.

槽中持續循環，直到反應槽中水解液體積降至原來的 1/10，再加入等體積去離子水濾析 (diafiltration) 兩次後，收集反應槽中分子量大於濾膜之保留液 (retentate)。實驗參考 Chiang 等人 (2006) 的篩選方法並作些微修改，首先將水解後離心所得上清液以 30 kDa MWCO 濾膜處理後，無法通過 30 kDa MWCO 的水解物稱為 30 kDa retentate；接著將通過 30 kDa 濾液以 10k Da MWCO 濾膜處理，收集大於 10 kDa 的水解物稱為 10 kDa retentate；將 10 kDa 的濾液以 1 kDa MWCO 濾膜處理，得到大於 1 kDa 的水解物稱為 1kDa retentate，小於 1 kDa 的水解物稱為 1kDa permeate。

(四) 分子量分布檢測

實驗參考 Chiang 等人 (1999) 利用高效能液項層析系統 (High performance liquid chromatography; HPLC) 搭配 SuperdexTM peptide 10/300GL 膠體層析管柱分析透過濾膜區分後區分物分子量分布情形。樣品經過適當稀釋後過濾，再由標準品定義分子量。標準品與分子量如下：cytochrome C (12,588 Da)、aprotinin (6,512 Da)、gastrin I (2,080 Da)、glycine*3 (189 Da) 及 glycine (75 Da)。移動相為含有 0.25 M NaCl 的 0.02 M phosphate buffer, pH 7.2，在流速 0.5 mL/min 偵測波長 214 nm 的吸光值，測定其分此量分布。

(五) 膠體層析管柱純化活性區分物

本實驗參考Kim等人 (2007)，將促脂解活性較佳的濾膜區分物，使用Superdex™ peptide 10/300GL 管柱，以蛋白質純化儀進行分離純化。配製適當濃度的樣品經由 0.22 μm 濾膜過濾後，進行注射 500 μL，並以 30% 乙腈 (acetonitrile) 為移動相，在流速為 0.5 mL/min，偵測波長為 280 nm的吸光值，將具有吸光值之分離物依序收集。

(六) 逆相層析管柱純化活性胜肽片段

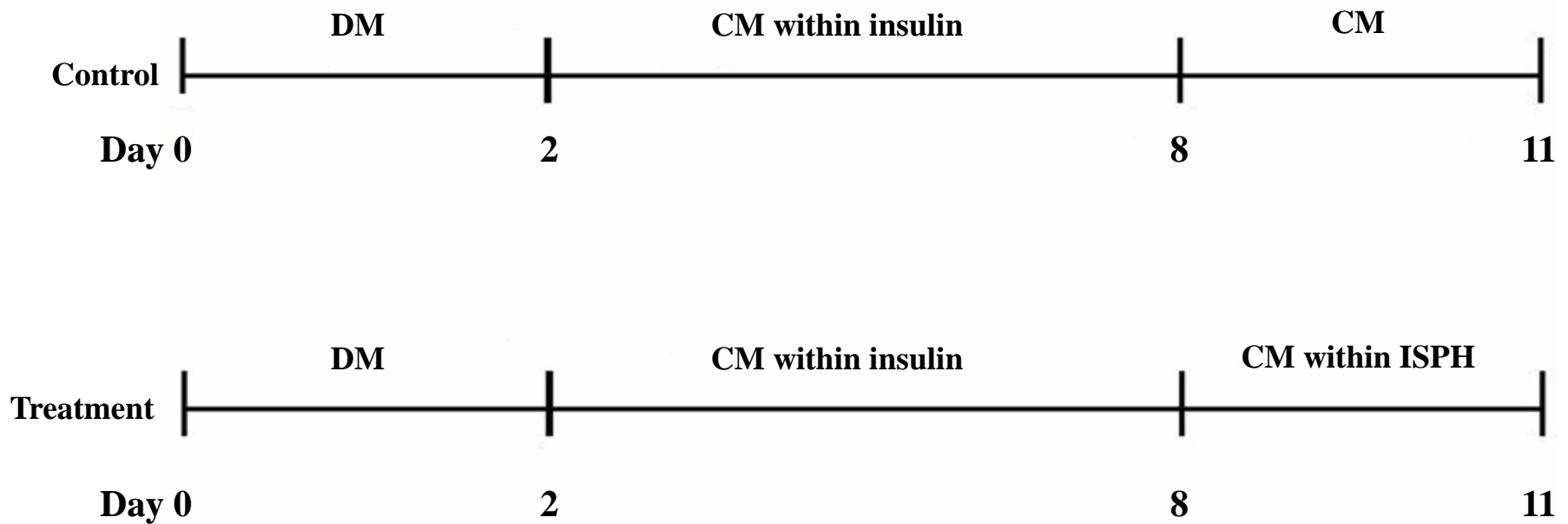
參考Kim等人 (2007) 方法並做修改，將較佳促脂解活性膠體管柱區分物，使用 Develosil™ ODS-HG-5 逆相層析管柱，以高效能液相層析系統 (HP 1100 series) 進行分離純化。樣品配製適當濃度並經 0.22 μm 濾膜過濾後，注射 20 μL，移動相為去離子水與乙腈，乙腈於滯留時間 0-20 min 自 5 % 提升至 75 %，進行梯度沖提，流速為 1.0 mL/min 進行分離，偵測波長為 214 nm，將具有吸光值之分離物依序收集測定促脂解活性。再將具活性之片段使用 Develosil™ ODS-HG-5 逆相層析管柱進行分離，樣品注射量為 20 μL，移動相為去離子水與乙腈，乙腈於滯留時間 0-15 min 自 10 % 提升至 40 % 進行梯度沖提，流速為 1.0 mL/min。將區分片段重複收集注射至單一波峰。

(七) 胜肽片段定序

將純化後的單一胜肽片段收集至一定量，經冷凍乾燥成粉末，送請國立中興大學生生物科技發展中心，使用液相層析串連質譜儀 (liquid chromatograph tandem mass spectrometer; LC/MS/MS) 進行胜肽定序。原理為液相層析儀將樣品分離後，以電灑游離法 (electro-spray ionization; ESI) 將其離子化，離子化片段依質量電荷比 (mass per charge) 的差異於質譜儀中產生不同滯留時間，最後離子化片段進入偵測器產生訊號，將訊號圖譜進行資料庫比對，得知其序列結構。經定序後之胜肽片段，送請曜鴻生技股份有限公司合成增量，以進行胜肽促脂解活性測定。

(八) 細胞培養

本實驗採用第11代 3T3-L1 前脂肪細胞，培養至 24 孔盤，細胞數為每孔 1×10^4 個。使用含有 10% FBS、1.6 g/L sodium bicarbonate、5.96 g/L HEPES 之 DMEM (DMEM-10, pH7.2) 為培養液 (culture medium; CM)，培養於 37 °C、5 % CO₂ 的培養箱，每兩天更換一次培養液。分化方式參考 Kim 等人 (2006) 的方法，實驗架構如圖八，於細胞長滿平面 (post-confluence) 後定為分化開始的第 0 天，置換成含外源性分化試劑之分化培養液 (differentiation medium; DM) 以促進細胞分化，外源性分化試劑為 1.74 μ M insulin、0.86 mM

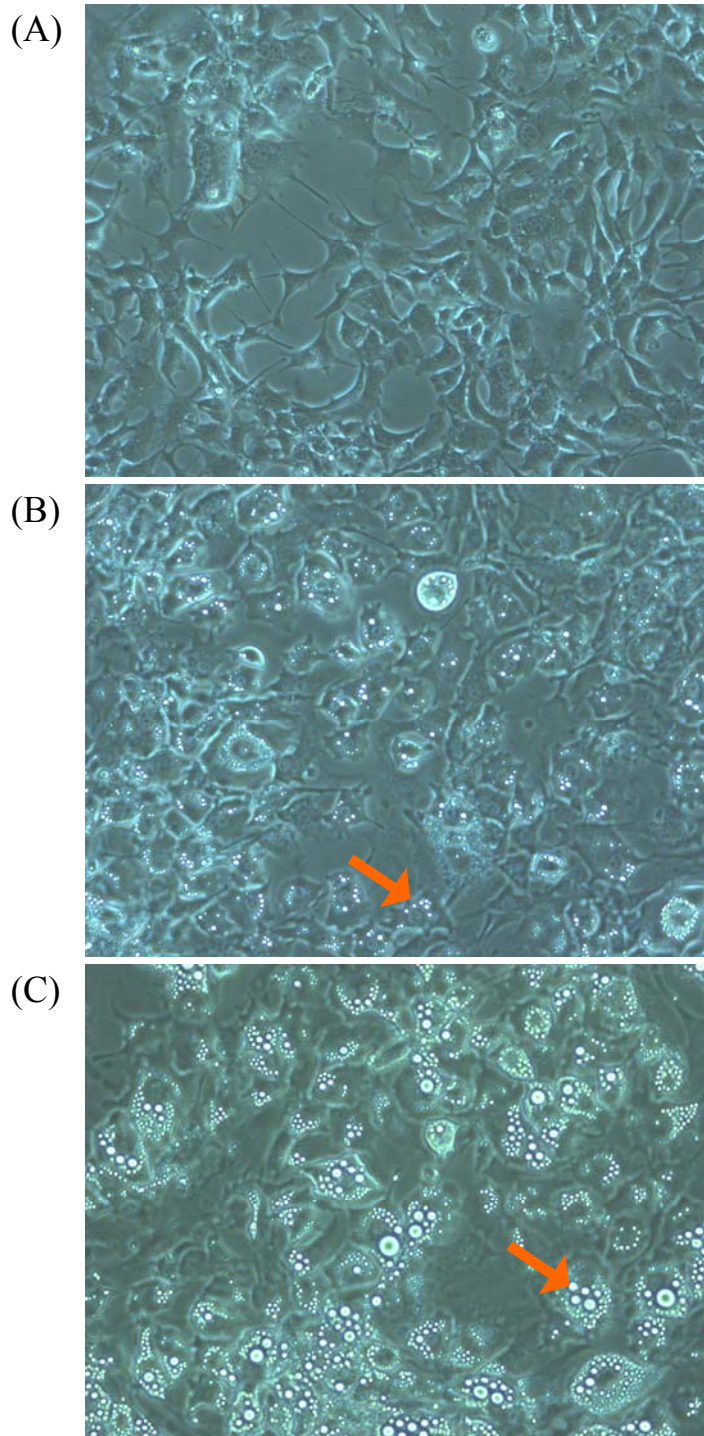


圖八、3T3-L1 脂肪細胞之實驗架構。

Figure 8. Experimental design of 3T3-L1 adipocytes. DM is differentiation medium which three agents added to DMEM-10. CM is culture medium. ISPH is ISP hydrolysates or fraction.

DEX 和 0.5 mM IBMX 。於分化第2天更換含有 1.74 μ M insulin 的培養液，爾後每2天更換含有 insulin 培養液直到第8天，於第8天先以 PBS (0.14 M NaCl, 5.36 mM KCl, 0.35 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 4.17 mM NaHCO₃, pH 7.2) 清洗細胞，再更換含有 ISPH 的培養液培養至第11天，ISPH 須先以 0.22 μ m 濾膜進行過濾後隨培養基添加。於第11天後收集培養液檢測細胞外丙三醇釋放量。另外以 PBS 清洗細胞，再加入 200 μ L 的 Lysis buffer (5 M NaCl, 1 M pH8.0 Tris, 0.5 M EDTA, 20 % SDS, NP-40, 6.03 mM C₂₄H₃₉NaO₄) 將細胞破碎後，以 13,000 \times g 離心 10 min ，取其上清液檢測細胞內三酸甘油酯殘留量與蛋白質含量。

本實驗以光學顯微鏡觀察細胞分化情形如圖九所示，(A) 為分化第0天，細胞型態為紡錘狀。(B) 為分化培養至第4天，由外觀可知細胞型態成微橢圓且已分化成熟並開始堆積油脂，細胞中所含的脂肪油滴為 (B) 與 (C) 箭頭所指之亮點，(C) 為分化第8天之細胞型態，可發現細胞油脂累積程度也多於 (B)。此細胞培養結果與 Ntambi and Kim (2000) 相符合，分化 48 至 72 hr 期間3T3-L1 脂肪細胞已分化成熟，其轉錄因子 PPAR γ 與 C/EBP α 開始表現，誘導脂質生成相關 mRNA、蛋白質表現，並進行脂肪的生成。



圖九、3T3-L1脂肪細胞培養第0天(A)、第4天(B)與第8天(C)之分化構型 (光學顯微鏡放大倍率 $\times 200$)。

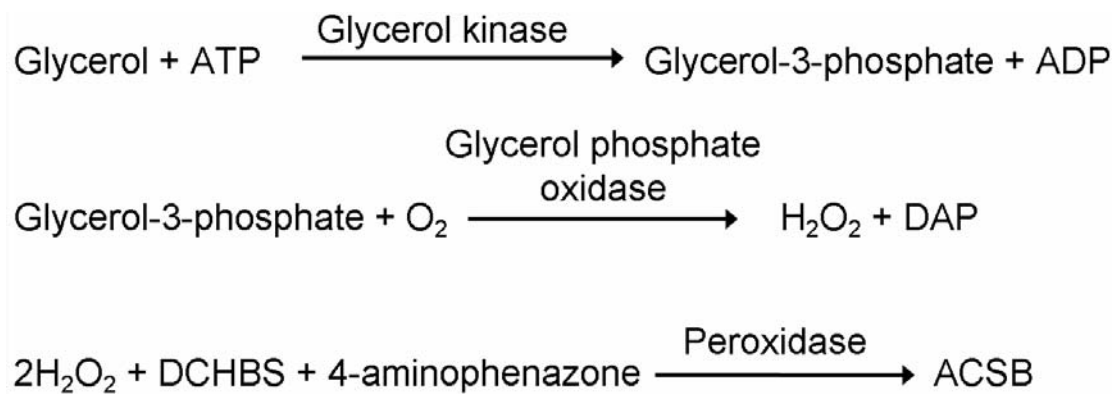
Figure 9. Differentiation profile of 3T3-L1 adipocytes with Day 0 (A), Day 4 (B) and Day 8 (C) incubation time in light microscope with $\times 200$ magnification.

(九) 丙三醇釋放量檢測

脂肪細胞內的三酸甘油酯經由脂解酶作用後產生丙三醇並釋放至細胞外，藉由丙三醇釋放量大小可評估脂解作用的程度。本實驗使用丙三醇含量檢測套組 (GY105, Randox) 測定培養液中丙三醇濃度。丙三醇濃度測定原理為檢驗試劑中所含之 glycerol kinase 將培養液中的丙三醇轉化為 glycerol-3-phosphate，glycerol-3-phosphate 接著被 glycerol phosphate oxidase 轉化為 hydrogen peroxide 與 dihydroxyacetone phosphate，hydrogen peroxide 再與試劑中 3,5-dichloro-2-hydroxybenzene sulphonic acid 和 4-aminophenazone 經由 peroxidase 催化產生 ACSB (n-(4-antipyryl)-3-chloro-5-sulphonate-p-benzoquinoneimine) (圖十)，ACSB 於波長 520 nm 下有最大吸光值，而測定此波長下之吸光值愈高表示細胞的丙三醇釋放量越高。測定方式為取 30 μ L 的細胞培養液或標準品與 1 mL 檢驗試劑混合，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 min，隨即檢測波長 520 nm 的吸光值，並利用標準品換算出細胞培養液中的丙三醇釋放量 (nmol/mL)。

(十) 三酸甘油酯殘留量檢測

本實驗利用三酸甘油酯含量檢測套組 (TR213, Randox) 測定細胞中三酸甘油酯含量。三酸甘油酯含量測定原理為檢驗試劑中所含脂解酶 (Lipase) 將細胞破碎液中的三酸甘油酯分解成丙三醇與游離脂



圖十、丙三醇檢測原理。

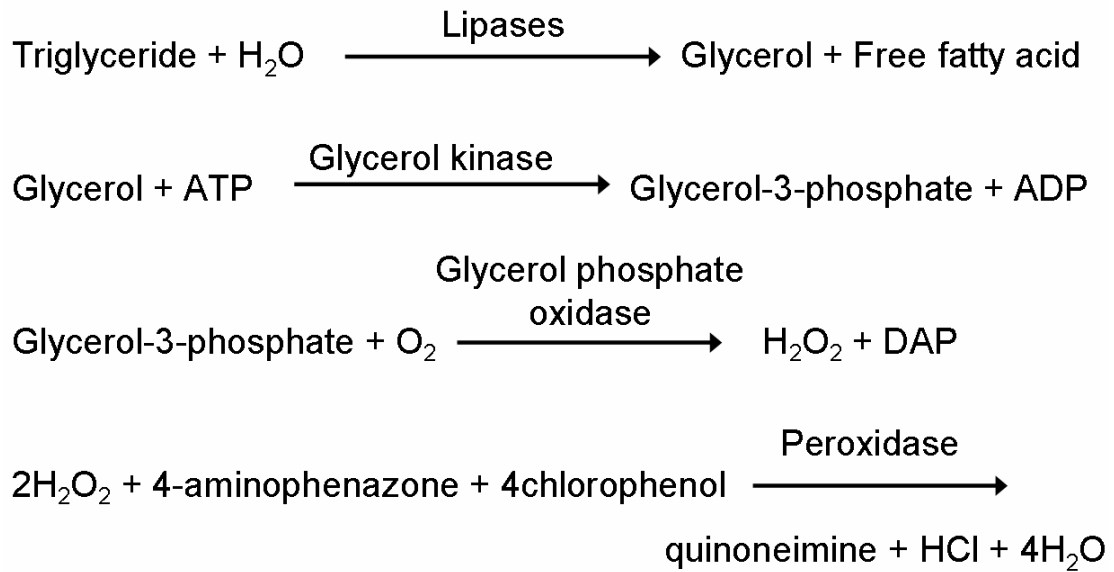
Figure 10. The principle of glycerol assay. DAP is dihydroxyacetone-phosphate. DCHBS is 3,5-dichloro-2-hydroxybenzene sulphonic acid. ACSB is n-(4-antipyryl)-3-chloro-5-sulphonate-p-benzoquinoneimine.

肪酸，丙三醇再由 glycerol kinase 轉化為 glycerol-3-phosphate，glycerol-3-phosphate 接著被 glycerol phosphate oxidase 轉化為 dihydroxyacetone phosphate 與 hydrogen peroxide，hydrogen peroxide 再與試劑中 4-aminophenazone 跟 chlorophenol 經由 peroxidase 反應生成 quinoneimine (圖十一)，quinoneimine 在波長 500 nm 下有最大吸光值，因此測定此波長之吸光值越低則代表細胞中三酸甘油酯殘留量越低。測定方式為取 10 μ L 的細胞破碎上清液或標準品與 1 mL 檢驗試劑混合，在 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 min，隨即測定波長 500 nm 下的吸光值，並利用標準品換算出細胞內三酸甘油酯殘留量 (μ mol/mL)。

(十一) 蛋白質定量分析

本實驗利用 BCATM Protein Assay Kit 檢測細胞中蛋白質濃度。其反應原理為蛋白質在鹼性環境下，會將環境中二價銅離子還原成一價亞銅離子，此時兩分子 bicinchoninic acid (BCA) 會與一分子一價亞銅離子進行螯合反應，產生呈色為紫色之水溶性聚合物，此聚合物在波長 562 nm 下有最大吸光值。

測定方式為每 well 加入 10 μ L 不同濃度 bovine serum albumin (BSA) 標準品以及細胞破碎上清液於96孔盤中，再分別加入 200 μ L 的 working solution (Reagent A : Reagent B=49 : 1) 後均勻混



圖十一、三酸甘油酯檢測原理

Figure 11. The principle of triglyceride assay. DAP is dihydroxyacetone-phosphate.

合，於 37 °C 下避光反應 30 min ，再使用 ELISA reader 以波長 562 nm 檢測其吸光值。而不同濃度之 BSA 所得之標準曲線即可計算出細胞中的蛋白質濃度 (µg/mL)，做為計算細胞之丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量之基準。

(十二) 統計分析

反應曲面法採用統計軟體 SAS (Statistical analysis system) 中反應曲面回歸分析 (response surface regression; RSREG) 的程序進行分析，以契合下列之二次多項式 (1)：

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^n \beta_{ki} x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{kii} x_i^2 + \sum_{i < j=2}^n \sum_{j=2}^n \beta_{kij} x_i x_j \quad (1)$$

Y 為反應值 丙三醇釋放量， β_{ki} 為一次式影響常數， β_{kij} 為交感作用影響常數， β_{kii} 為二次式影響常數， x_i 為獨立變數；採用 Sigma Plot (version: 10.0; Jandel Scientific, Erkrath, Germany) 繪圖軟體，三變數中的一變數固定為常數項，進行兩變數對反應值的曲面圖與等高線圖之繪製。

丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量結果則以統計軟體 SAS 中 Duncan's multiple range test 分析各樣品之間的影响差異。

肆、 結果與討論

本研究首先利用反應曲面法探討具有促脂解活性的 F-ISPH 其最適生產條件，其次利用濾膜區分 (membrane filtration)、膠體層析 (gel chromatography) 與逆相層析 (reverse-phase chromatography) 依序分離純化出最佳促脂解活性之胜肽，並鑑定其胺基酸序列。

一、 F-ISPH 最適水解條件

表三為五階層三因子的中心混層實驗設計 (CCD)，探討添加 400 ppm 水解物的十九個實驗點對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響，結果顯示，八個星點 (star point) 與六個軸點 (axial point) 之實驗點對 3T3-L1 脂肪細胞的丙三醇釋放量介於 339.27-352.79 nmol/mg protein，其中預設為最佳生產條件之中心點 (central point) 對 3T3-L1 脂肪細胞的丙三醇釋放量則介於 357.59-362.68 nmol/mg protein，由此可推測最佳生產條件相當接近中心點。將表三中十九個實驗點以統計分析軟體 SAS 中的反應曲面回歸分析 (RSREG)，獲得其二次模型方程式、檢定係數 (R^2) 和變異係數 (CV%) 如表四，由檢定係數 0.935 與變異係數 0.73，表示此二次模型多項式具有顯著的重要性，並可適當呈現反應值與各變數之間實際關係。二次多項式的變異數分析 (ANOVA) 結果如表五所示，二次多項式 (total model) 於 F-test 顯示具有顯著影響 ($p < 0.05$)，表示此二次模型多項

表三、 3T3-L1脂肪細胞丙三醇釋放量之五階層三變數中心混層實驗設計與實驗數據。

Table 3. 5-level-3-factor central composite design and experimental data of glycerol release in 3T3-L1 adipocytes.

Treatment	Coded level of variable.			glycerol release (nmol/mg protein)
	reaction pH (X_1)	RT (X_2) ($^{\circ}$ C)	HT (X_3) (min)	
1	-1	-1	-1	352.26
2	-1	-1	1	340.56
3	-1	1	-1	344.06
4	-1	1	1	339.27
5	1	-1	-1	345.20
6	1	-1	1	352.79
7	1	1	-1	344.86
8	1	1	1	351.15
9	0	0	-1.68	346.98
10	0	0	1.68	350.52
11	0	-1.68	0	349.60
12	0	1.68	0	346.99
13	-1.68	0	0	344.09
14	1.68	0	0	343.23
15	0	0	0	362.68
16	0	0	0	358.55
17	0	0	0	358.14
18	0	0	0	361.93
19	0	0	0	357.59

表四、實驗點丙三醇釋放量曲面之二次多項式、檢定係數與變異係數。

Table 4. Second-order model equations for the response surfaces fitted to the experimental data points, as a function of glycerol release respectively, coefficient of determination (R^2) and coefficient of variation (CV %). ^a Y = glycerol release content, X_1 = reaction pH, X_2 = reaction temperature (°C), X_3 = hydrolysis time (min).

Model equations ^a	R^2	CV %
$Y = 55.43 + 68.35X_1 + 3.12X_2 - 0.24X_3 - 5.67X_1^2 - 0.04X_2^2 - 0.0011X_3^2 + 0.094X_1X_2 + 0.0634X_1X_3 + 0.0012X_2X_3$	0.935	0.73

表五、影響3T3-L1脂肪細胞丙三醇釋放量相關水解變數之變異數分析。

Table 5. Analysis of variance for variables pertaining to the response of glycerol release in 3T3-L1 adipocytes.

Source	Degree of freedom	Sum of Squares	Means of Squares	F-value	Prob > F
Total model	9	844.056137	93.784015	14.38	0.0002
Linear	3	38.922158	12.974053	1.99	0.1862
Quadratic	3	687.752488	229.250830	34.69	<.0001
Cross product	3	126.381490	42.127163	6.46	0.0127
Total error	9	58.692639	6.521404		
Lack of fit	5	36.694139	7.338828	1.33	0.4014
Pure error	4	21.998500	5.499625		

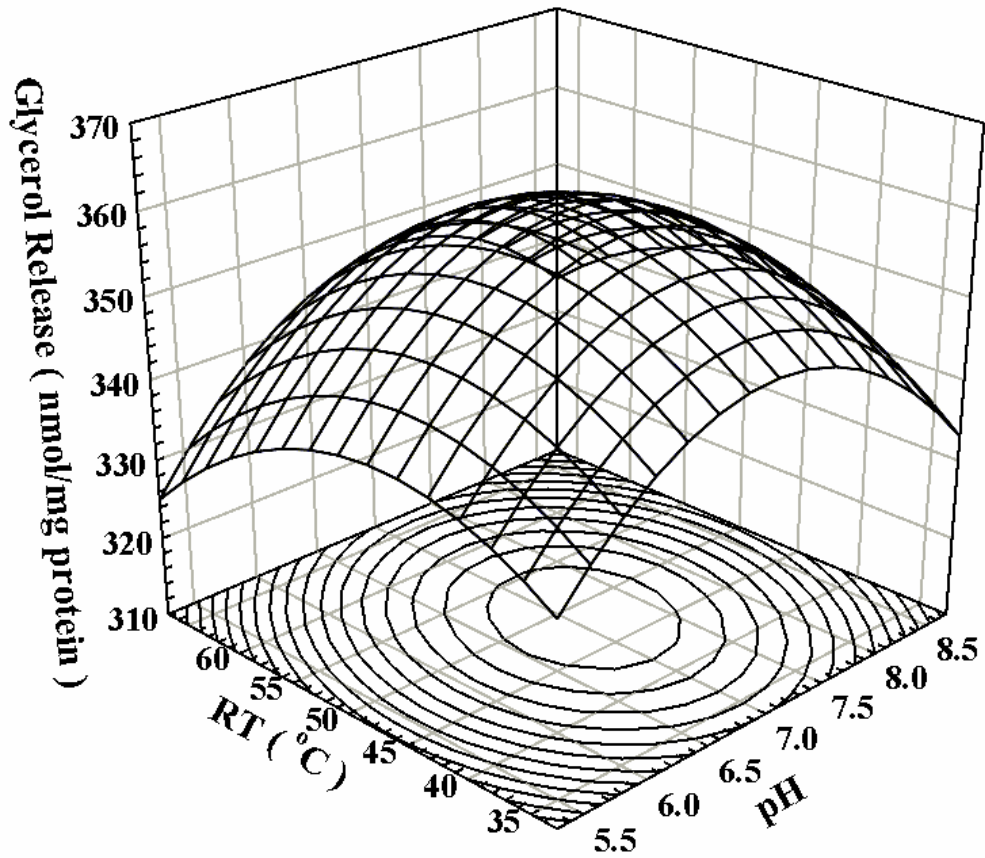
式對丙三醇釋放量有高度相關性，其中又以二次式 (quadratic) 具顯著影響 ($p < 0.05$)，而交感作用 (cross product) 亦呈現顯著差異 ($p < 0.05$)，表示此實驗探討三個變數之間產生的交感作用具有顯著影響丙三醇釋放量的效果。總誤差 (total error) 分析中，此二次多項式適缺性 (lack of fit) 無顯著影響 ($p > 0.05$)，由此亦可得知此二次多項式所呈現的誤差無顯著影響，總誤差來源多來自實驗誤差 (pure error)。此外，進一步以聯合檢測分析 (表六) 瞭解三個反應變數對細胞丙三醇釋放量之整體影響，結果顯示反應pH (X_1)、反應溫度 (X_2)、與水解時間 (X_3) 對細胞丙三醇釋放量皆為顯著性影響因子 ($p < 0.05$)，表示反應pH值與反應溫度除了對酵素活性有相當影響性，也同時反應在促脂解活性肽的表現量，酵素活性越高促脂解肽越多；水解時間亦是影響促脂解活性肽含量的顯著影響因子，表示適當的水解程度可獲得較多促脂解活性肽，Tsou 等人 (2010) 表示，Flavourzyme在適當的水解時間下，其大豆蛋白水解物有最佳的抗脂質新生活性，過度的水解可能會破壞活性肽結構而降低水解物生理活性。

根據上述二次模型多項式，分別固定其中一變數，以其餘兩變數繪製出一系列曲面圖 (圖十二至圖十四)，以了解各變數跟丙三醇釋放量之間的關係。圖十二為固定水解 120 min 時，反應 pH 與反

表六、聯合檢測中丙三醇釋放量變異分析。

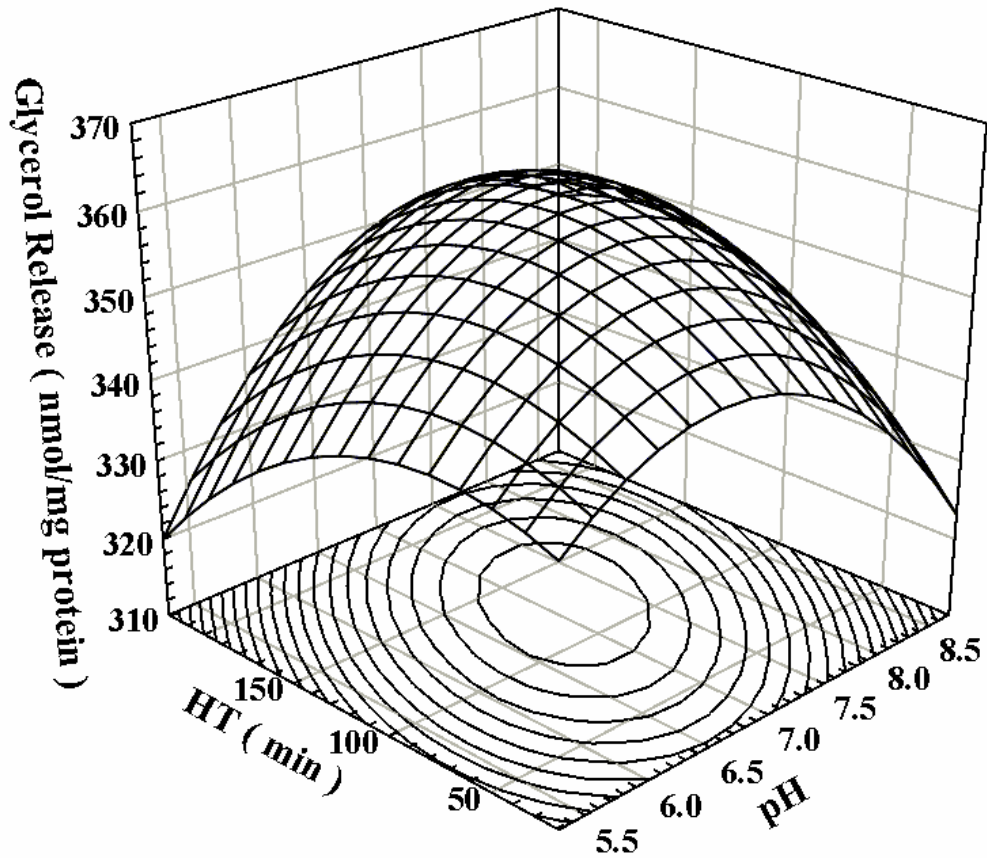
Table 6. Analysis of glycerol release variance for joint test.

Factor	Degree of freedom	Sum of Squares	Prob > F
reaction pH (X_1)	4	580.312147	0.0001
reaction temperature (X_2) (RT, °C)	4	250.475789	0.0026
hydrolysis time (X_3) (HT, min)	4	323.727730	0.0010



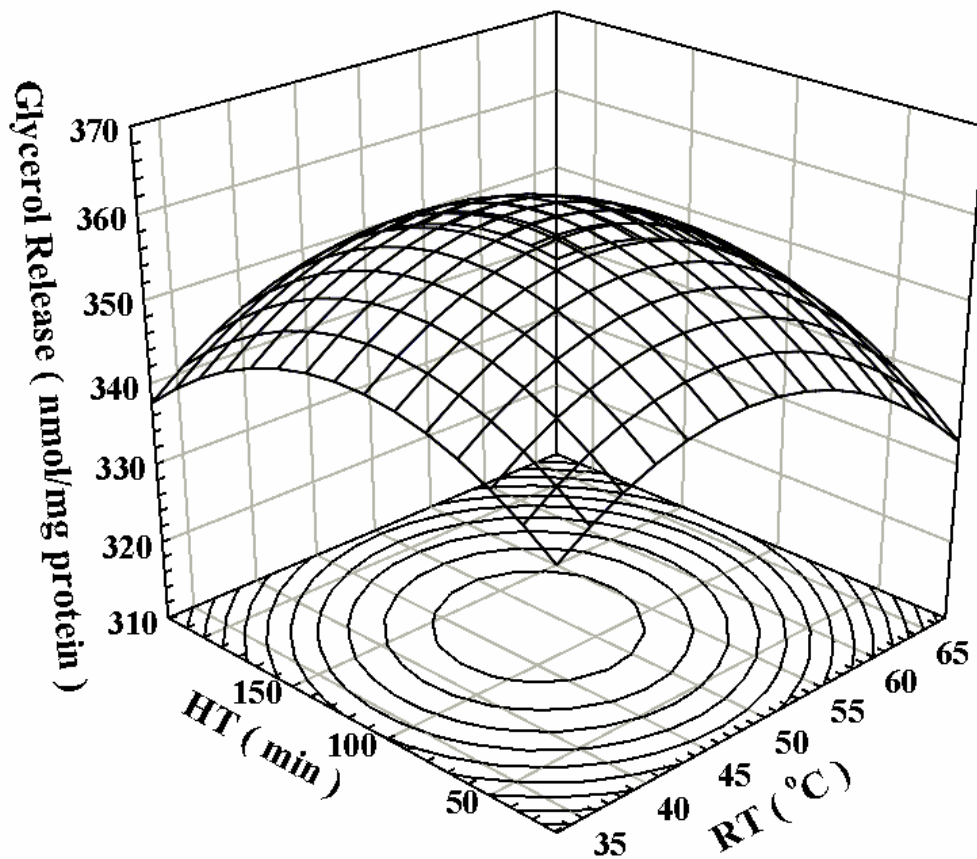
圖十二、 120 min 水解時間下反應溫度與反應 pH 對3T3-L1脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。

Fig. 12. Effect of reaction temperature (RT) and reaction pH in 120 min hydrolysis time (HT) on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes.



圖十三、50 °C 反應溫度下水解時間與反應 pH 對3T3-L1脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。

Fig. 13. Effect of hydrolysis time (HT) and reaction pH at 50 °C reaction temperature (RT) on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes.



圖十四、反應pH值 7 下水解時間與反應溫度對3T3-L1脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。

Fig. 14. Effect of hydrolysis time (HT) and reaction temperature (RT) at reaction pH 7 on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes.

應溫度對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響，結果顯示反應 pH 值在 6.5-7.5 與反應溫度 45-50 °C，具有最高丙三醇釋放量，過高或過低的反應 pH 與反應溫度都會降低水解物對丙三醇釋放量影響，與酵素活性相似，應證了促脂解活性 F-ISPH 的生產條件與其酵素活性具有相關性。圖十三為固定溫度 50 °C 時，反應 pH 與水解時間對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響，pH 值介於 7.0-7.5 與水解時間保留 100-150 min 具有最高丙三醇釋放量，水解時間若未介於 100-150 min 內，則其 F-ISPH 促脂解活性也就隨之減少，也與 Tosu 等人 (2010) 水解時間對抗脂質新生活性有相似趨勢。圖十四為固定 pH 7 時，反應溫度與水解時間對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響，顯示反應溫度在 40-50 °C 與水解時間在 100-150 min 有最高丙三醇釋放量。

依照實驗結果所得之二次模型多項式，估計反應 pH 為 7.12、反應溫度為 48.8 °C 和水解時間為 124.9 min 時，其 F-ISPH 對 3T3-L1 脂肪細胞具有最大的丙三醇釋放量，可達 359.93 nmol/mg protein，依照上述預測最佳化的水解條件進行六次獨立之三重複實驗，如表七所示，驗證結果顯示 F-ISPH 對 3T3-L1 脂肪細胞之丙三醇釋放量實際值為 359.92 nmol/mg protein，預測值亦坐落在實驗值的 95% 信心區間 (340.48-379.36 nmol/mg)，表示依照最適化條件

表七、促脂解最適化模型驗證結果。

Table 7. Results of verification tests for fitted model of lipolysis-stimulating activity.

Response variables	Glycerol release (nmol/mg protein)
Predict value	359.93
Experimental value (mean)	359.92 ± 18.53
Sample size	6
95% confidence interval	(340.48, 379.36)

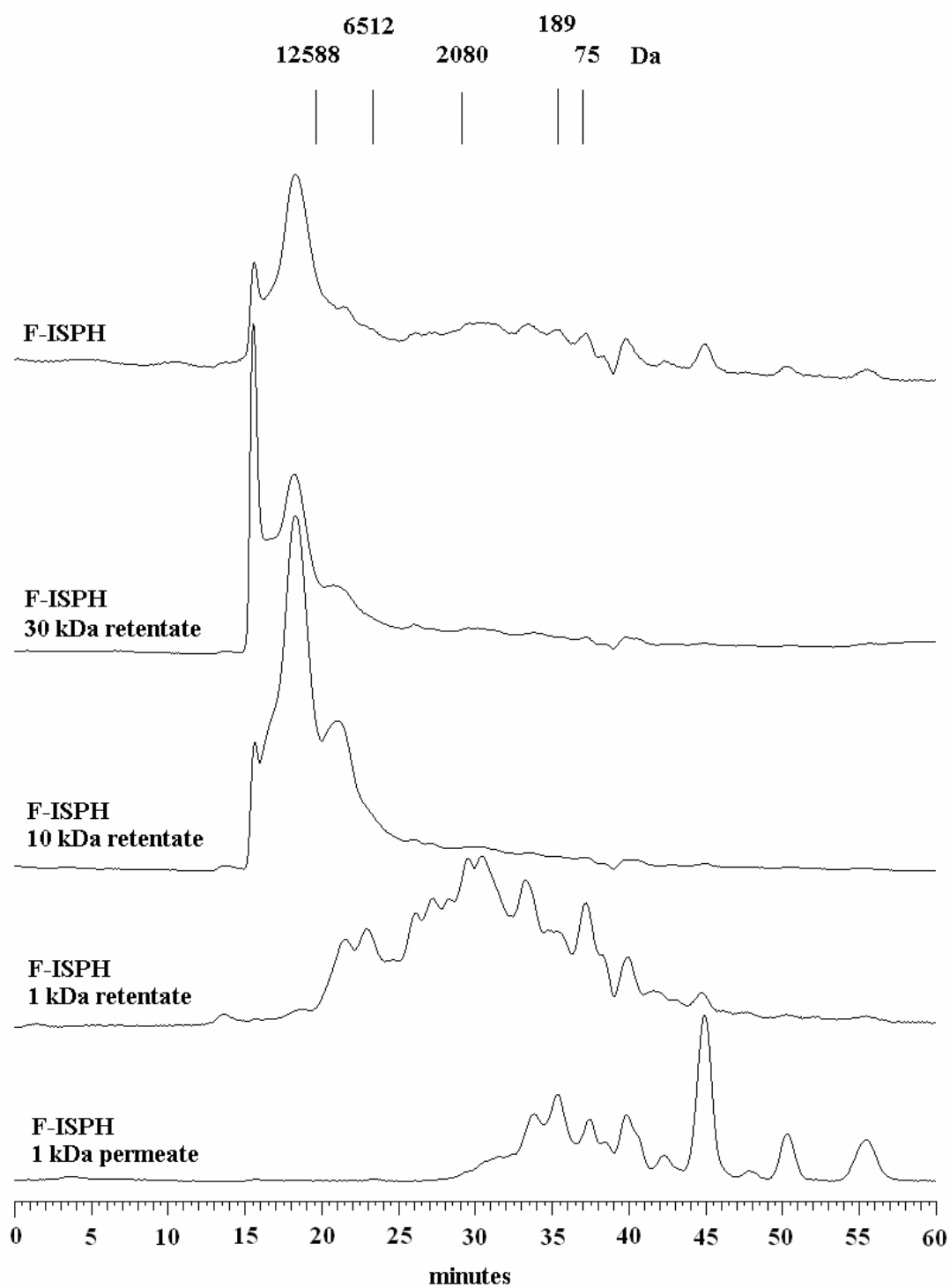
生產之大豆蛋白水解物對丙三醇釋放量影響確實與預測結果相符。

於後續實驗中，將依照最適化條件生產 F-ISPH，並依序利用濾膜區分、膠體層析與逆相層析純化促脂解活性肽。

二、 F-ISPH 區分純化

(一) 濾膜區分

大豆蛋白水解物中含有各種不同分子量大小之蛋白質與胜肽片段，其中亦存在著促脂解活性肽，膜過濾具有短時間區分大量樣品之特點，透過膜過濾將水解物內大分子蛋白質與特定分子片段加以區隔分離，再將各區分物以細胞模式測試，篩選出最佳促脂解活性濾膜區分物。本研究大量製備最佳促脂解活性之 F-ISPH，並依序以 30 kDa、10 kDa 與 1kDa MWCO 濾膜區分，得到各分子量限值區間的濾膜區分物，經凍乾後以相同克數回溶，利用 HPLC 搭配膠體管柱檢測其分子量分布情形，確定濾膜的區分效果；圖十五為 F-ISPH 及其濾膜區分物的分子量分布圖，標準品分子量依序為 12,588、6,512、2,126、189 與 75 Da。F-ISPH 分子量分布主要以大於 12,588 Da 為主，小於 12,588 Da 之胜肽片段相對較少，表示酵素水解 124.9 min 下並未擁有最多小分子胜肽產量，但卻有最多脂解活性肽含量。F-ISPH 經由 30 kDa MWCO 濾膜區分所得之保留液 (30 kDa retentate) 分子量大多集中在大於 12,588 Da 為主，通過 30 kDa

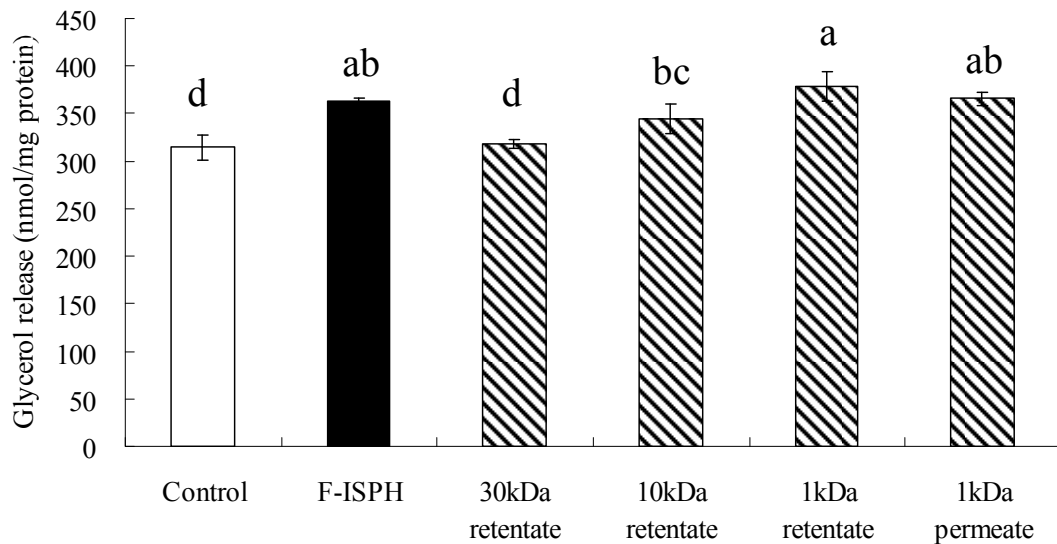


圖十五、F-ISP H 經不同分子量限值濾膜區分所得保留液與濾液之分子量分布圖。

Fig. 15. The molecular weight distribution for retentates and permeate obtained from the fractionating F-ISP H with different molecular weight cut-off (MWCO) membranes, F-ISP H was sequentially filtered by a membrane module with 30kDa, 10kDa and 1kDa retentate or permeate, respectively.

MWCO 濾膜之濾液再透過 10 kDa MWCO 濾膜區分可得 10 kDa retentate，分子量分布則以 12,588 Da 為主，並含有小部分區分物介於 6,512-12,588 Da，最後將通過 10 kDa MWCO 濾膜區分之濾液以 1 kDa MWCO 濾膜區分，其保留液 (1 kDa retentate) 分子量除了包含 2,126-12,588 Da，也還殘留小於 2,126 Da 片段，最大吸光值經由標準品分子量對數與滯留時間之標準曲線換算為 941-1,249 Da，表示 1 kDa retentate 可再增加濾析操作次數，提升分離效果，而濾液 (1 kDa permeate) 分子量分布則大多小於 2,126 Da。由以上結果可知，F-ISPH 經過一系列濾膜區分後的各濾膜區分物，可初步區分出不同分子量大小的保留液與濾液，後續將以細胞模式篩選最佳促脂解活性之濾膜區分物。

圖十六為 400 ppm F-ISPH 與其濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響。相較於控制組丙三醇釋放量 314.39 nmol/mg protein，添加 F-ISPH 可顯著促進脂肪細胞丙三醇釋放達 363.13 nmol/mg protein ($p < 0.05$)，透過濾膜區分後的保留液與濾液，10 kDa retentate、1 kDa retentate 與 1 kDa permeate 均可顯著提升丙三醇釋放量，唯獨 30 kDa retentate 與控制組無顯著差異，其中又以 1 kDa retentate 具有最高丙三醇釋放量 378.19 nmol/mg protein，但統計分析顯示 F-ISPH、1 kDa retentate 與 1 kDa permeate 之間



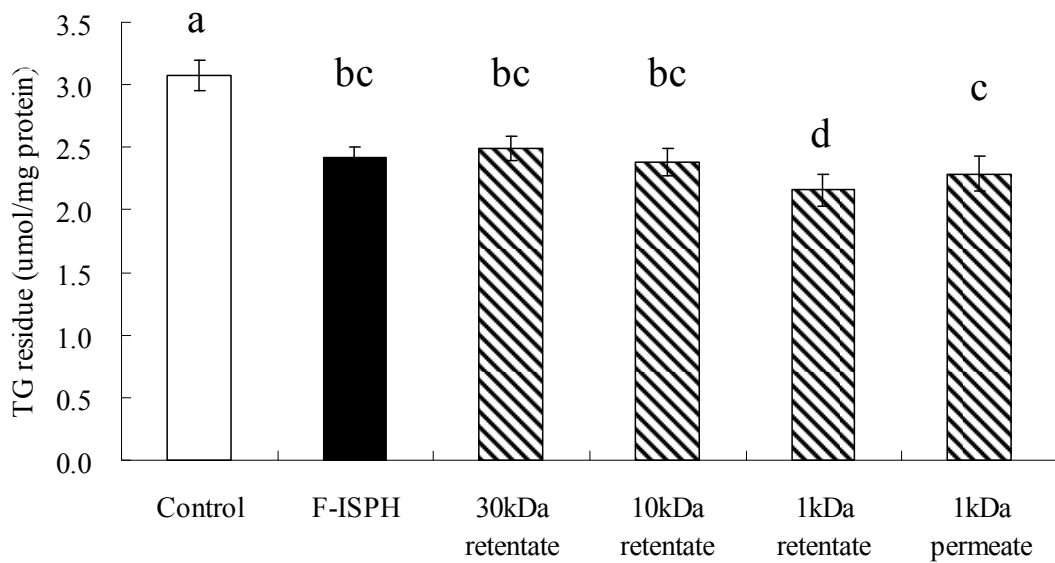
圖十六、400ppm F-ISP 及其濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇
釋放量之影響。

Fig. 16. Effect of 400ppm F-ISP and its membrane fractions on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. F-ISP was sequentially filtered by a membrane module with 30kDa, 10kDa and 1kDa retentate or permeate, respectively. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

並無顯著差異。圖十七為 400 ppm F-ISPH 與其濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞三酸甘油酯殘留量的影響。經過 400 ppm F-ISPH 處理後的三酸甘油酯殘留量 2.42 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 顯著低於控制組的 3.08 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ ($p<0.05$)，濾膜區分物中各保留液與濾液也都可顯著降低三酸甘油酯殘留量，其中又以 1 kDa retentate 具有最低三酸甘油酯殘留量 2.16 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ ，且顯著低於未區分的 F-ISPH ($p<0.05$)，1 kDa permeate 對三酸甘油酯殘留量 2.29 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 雖有下降趨勢，但與未區分的 F-ISPH 處理無顯著差異。綜合圖十六與圖十七之結果，相較於未區分前的 F-ISPH，經由濾膜區分處理，1 kDa retentate 可更加提升脂肪細胞丙三醇釋放量，丙三醇釋放量由原本提升 15% 增加為 20%，相對的三酸甘油酯的殘留量也由原本降低 21% 減少為 30%。後續將以 1 kDa retentate 進行膠體區分，初步分離出促脂解活性肽片段。

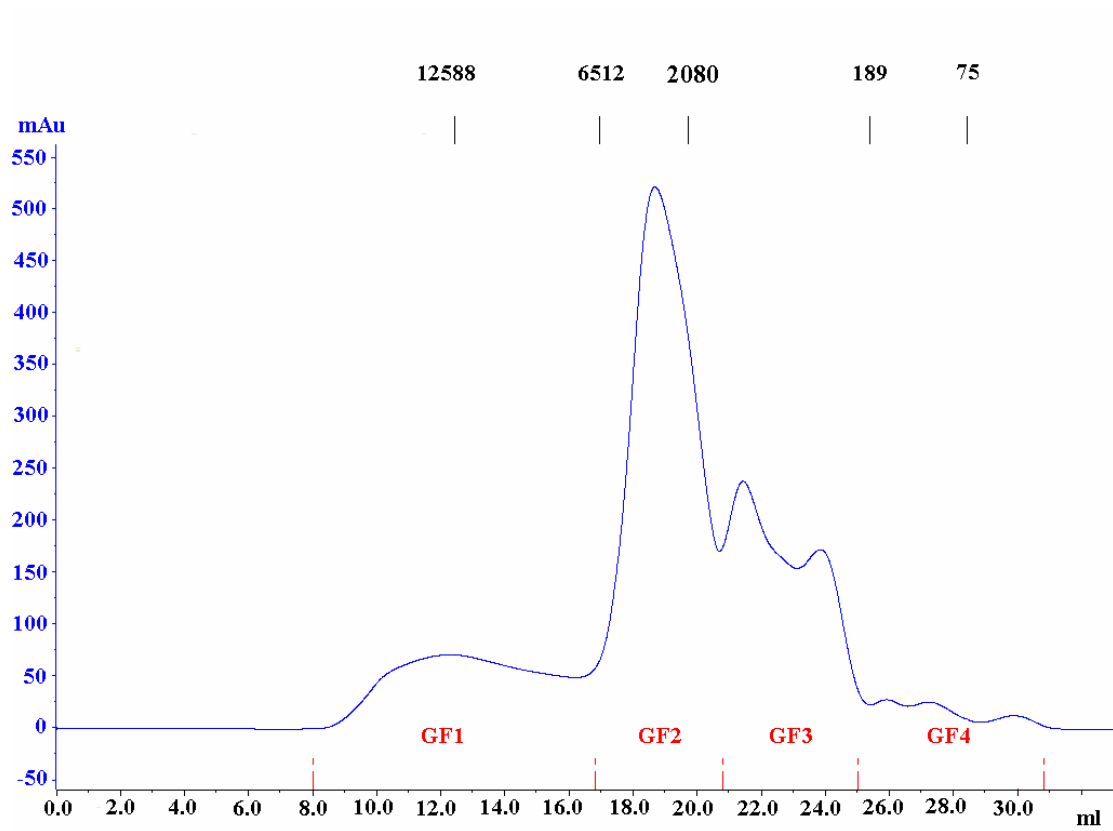
(二) 膠體區分

F-ISPH 透過濾膜區分後所得濾膜區分物以 1 kDa retentate 具最佳促脂解活性，分子量分布結果可知大部分為 1,000-10,000 Da 與少量小於 1,000 Da 胜肽片段，為分離出促脂解活性肽片段，本研究續以膠體層析法進一步分離活性胜肽片段以提高活性胜肽純度。圖十八為 1 kDa retentate 經由膠體管柱區分後之層析圖譜，依照吸收波



圖十七、400ppm F-ISP 及其濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞中三酸甘油酯殘留量之影響。

Fig. 17. Effect of 400ppm F-ISP and its membrane fractions on triglyceride residue in 3T3-L1 adipocytes. F-ISP was sequentially filtered by a membrane module with 30kDa, 10kDa and 1kDa retentate or permeate, respectively. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

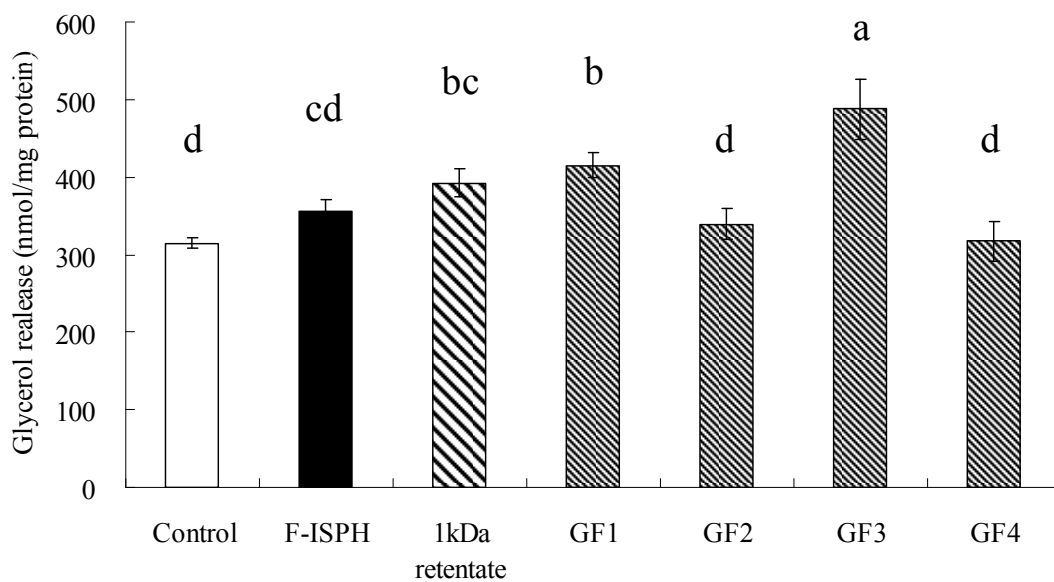


圖十八、F-ISP 1kDa retentate 膠體管柱區分圖譜。

Fig. 18. Gel filtration chromatography of F-ISP 1kDa retentate obtained from ultrafiltration.

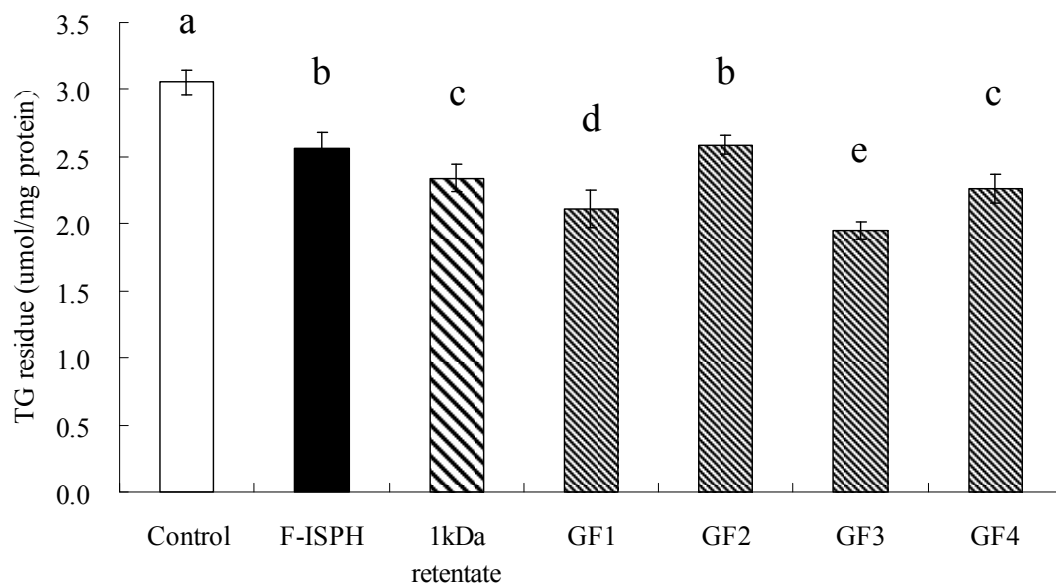
鋒起伏情況區分為四個區段，配合分子量標準品對照，可分別獲得分子量大於 6,512 Da (gel filtrate 1; GF1) 、介於 2,080-6,512 Da (gel filtrate 2; GF2) 、介於 189-2,080 Da (gel filtrate 3; GF3) 以及小於 189 Da (gel filtrate 4; GF4) 的區分片段，將四個區分片段收集後測定其脂肪細胞中的脂解活性。

圖十九為添加 400 ppm F-ISPH、1 kDa retentate 與其膠體區分片段對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響。1 kDa retentate 透過膠體層析後，其區分片段 GF2 與 GF4 對丙三醇釋放量與控制組比較均無顯著差異，而區分片段 GF1 與 GF3 相較於控制組可顯著提升丙三醇釋放量，從控制組基礎釋放量 314.79 nmol/mg protein 分別提升至 415.23 nmol/mg protein 與 487.73 nmol/mg protein，其中 GF1 和區分前的 1kDa retentate 之間其丙三醇釋放量經統計分析後無顯著差異，但 GF3 則顯著高於 1kDa retentate ($p<0.05$)。圖二十為添加 400 ppm F-ISPH、1 kDa retentate 與其膠體區分片段對 3T3-L1 脂肪細胞三酸甘油酯殘留量的影響。相較於控制組，區分片段 GF1、GF2、GF3 和 GF4 皆可顯著降低細胞中三酸甘油酯殘留量，但 GF2 與 GF4 的三酸甘油酯殘留量與未區分的 1 kDa retentate 比較均並無顯著差異，GF3 具有最低三酸甘油酯殘留量 1.95 $\mu\text{mol/mg protein}$ ，且顯著低於 GF1 的 2.11 $\mu\text{mol/mg protein}$ ($p<0.05$)。



圖十九、400ppm F-ISP 1kDa retentate 和其膠體管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。

Fig. 19. Effect of 400ppm F-ISP 1kDa retentate and its gel filtration fractions on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

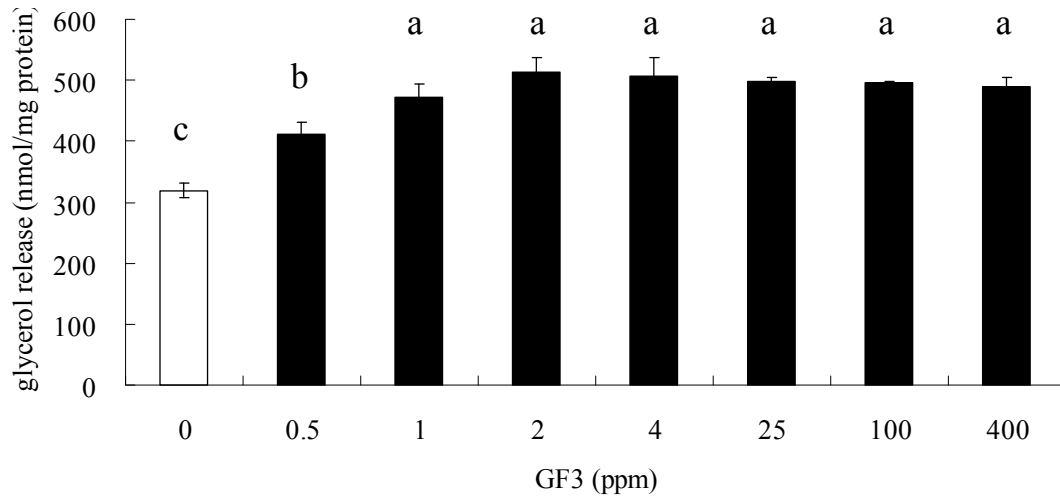


圖二十、400ppm F-ISP 1kDa retentate 和其膠體管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞中三酸甘油酯殘留量之影響。

Fig. 20. Effect of 400ppm F-ISP 1kDa retentate its gel filtration fractions on triglyceride residue in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

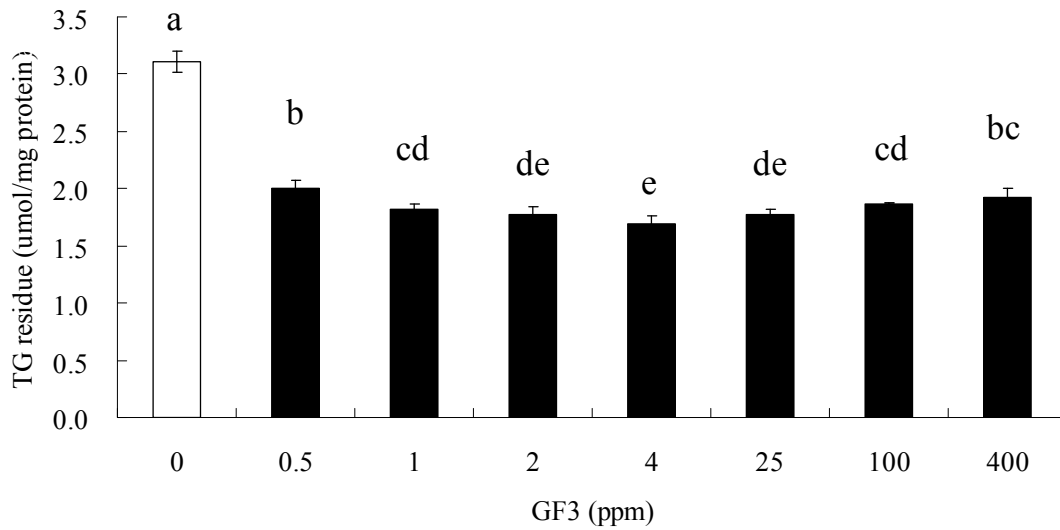
綜合圖十八至圖二十的結果指出經由膠體層析後所獲得四個不同分子量區間片段中，雖然分子量介於 2,080-6,512 Da 的 GF2 與小於 189 Da 的 GF4，均無法顯著提升丙三醇釋放量，但是對脂肪細胞中三酸甘油酯殘留量卻可顯著的抑制 ($p<0.05$)，因此 GF2 和 GF4 兩者應含有抗脂質累積活性肽。其次，分子量大於 6,512 Da 的 GF1 與介於 189-2,080 Da 的 GF3 可提升細胞脂解活性，分別提升 32 % 與 55 % 丙三醇釋放量，且相對減少 31 % 與 36 % 的三酸甘油酯殘留量，兩者經由統計分析後顯示，GF1 和 GF3 均有促進脂解活性之胜肽片段，藉由丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量，可確認 GF3 促脂解活性高於 GF1。後續將再利用 3T3-L1 脂肪細胞探討 GF3 添加濃度對其脂解活性之影響。

圖二十一為 GF3 添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。相較於控制組，當濃度添加至 0.5 ppm 即可顯著提升細胞丙三醇釋放量，而 1-400 ppm 添加劑量之丙三醇釋放量皆顯著高於 0.5 ppm 之劑量 ($p<0.05$)，添加劑量為 2 ppm 時具有最大丙三醇釋放量，可提升 61 % 至 512.9 nmol/mg protein，但與添加 4 ppm 時丙三醇釋放量 507.06 nmol/mg protein 相當接近。圖二十二為 GF3 不同添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞三酸甘油酯殘留量之影響。和控制組比較，添加 0.5-400 ppm 均可顯著降低脂肪細胞中三酸甘油酯殘留



圖二十一、GF3 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。

Fig. 21. Effects of GF3 dosages on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.



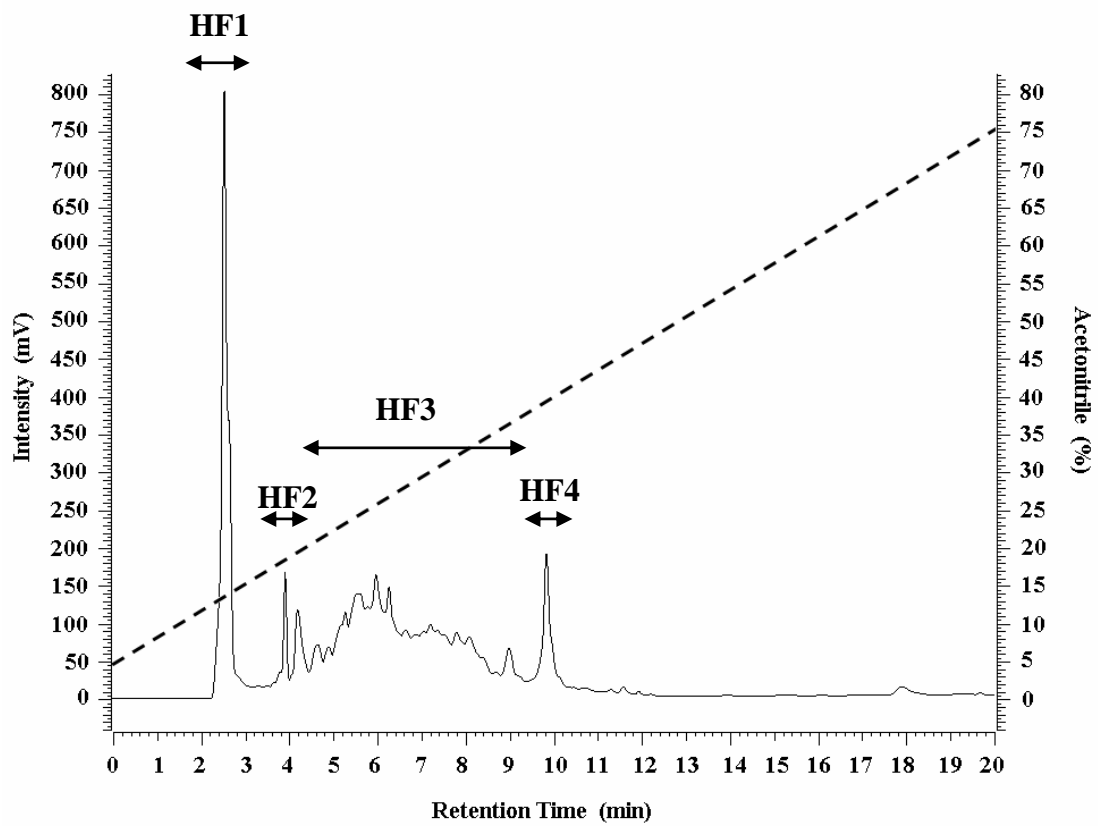
圖二十二、GF3 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞中三酸甘油酯殘留量之影響。

Fig. 22. Effects of GF3 dosages on triglyceride residue in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent means±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

量 ($p<0.05$)，統計分析顯示，添加劑量為 2 ppm、4 ppm 與 25 ppm 時均有最低三酸甘油酯殘留量，但之間並無顯著差異。綜合圖二十一與圖二十二結果指出 GF3 添加劑量在 0.5 ppm 以上對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量即有顯著的影響，其中以 2 ppm 與 4 ppm 達為大丙三醇釋放量，且三酸甘油酯殘留量分別從 3.11 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 減少為 1.77 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 與 1.69 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ ，統計分析結果顯示，雖然添加 2 ppm 與 4 ppm 其三酸甘油酯殘留量並無顯著差異，但以添加 4 ppm 可達到最低三酸甘油酯殘留量，因此確認 GF3 在添加劑量為 4 ppm 即有最佳促脂解活性，後續實驗將依據此劑量作為篩選純化物標準。最後將 GF3 以逆相層析法分離出單一活性胜肽。

(三) 逆相層析

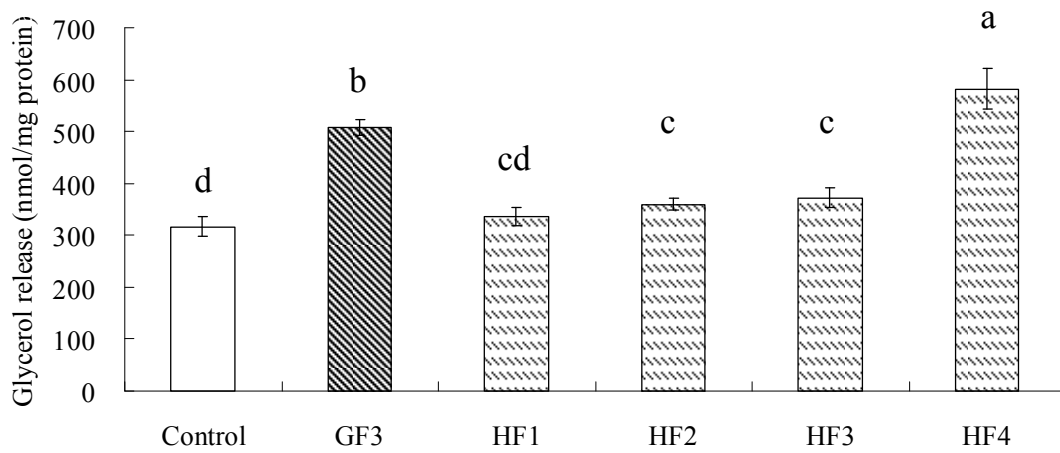
經過膠體層析分離之區段以 GF3 具有最佳促脂解活性，分子量分布介於 189 - 2,080 Da，內含各種不同胺基酸序列之胜肽片段，各胜肽片段依照組成胺基酸的差異會有不同極性，因此本實驗將以 GF3 中各胜肽片段的極性差異，利用逆相層析法分離出各個胜肽片段，再以細胞模式篩選出促脂解活性胜肽，並鑑定其胺基酸序列。圖二十三為 GF3 經由逆相層析管柱分離之圖譜，由圖譜訊號大致區分為四個區段，分別為 HPLC filtrate 1 (HF1)、HPLC filtrate 2 (HF2)、



圖二十三、GF3 高效能液相層析之圖譜。

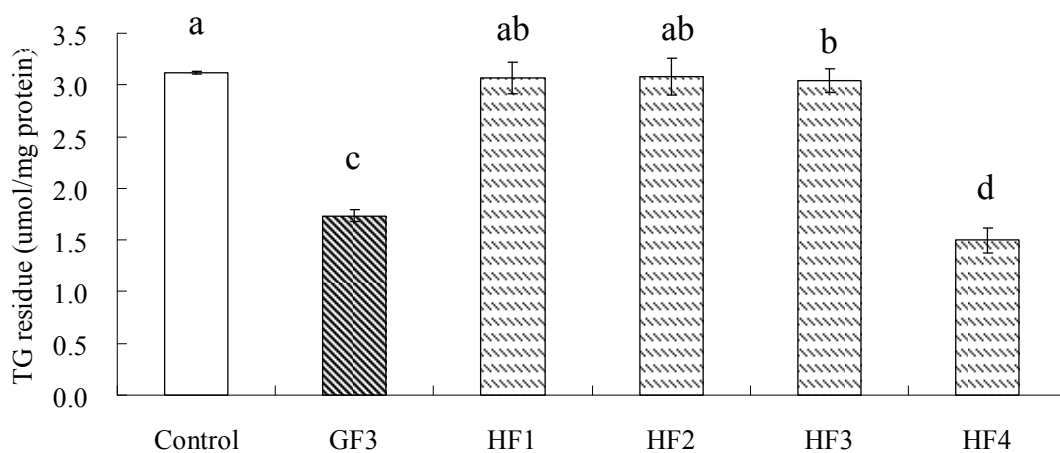
Fig. 23. High-performance liquid chromatography of GF3 obtained from gel filtration.

HPLC filtrate 3 (HF3) 與 HPLC filtrate 4 (HF4) ，將此四個區段分別收集凍乾後測定其促脂解活性。圖二十四為添加 4 ppm 的 GF3 與其逆相層析分離的區段對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。逆相層析法分離之區段 HF2、HF3 與 HF4 相較於控制組，對脂肪細胞丙三醇釋放量有顯著提升 ($p<0.05$)，其中又以 HF4 影響最為顯著，丙三醇釋放量由基礎釋放量 317.15 nmol/mg protein 提升 83 % 至 581.63 nmol/mg protein ，HF4 對細胞丙三醇釋放量亦顯著高於未分離之 GF3 ($p<0.05$) ；此結果也反應在三酸甘油酯殘留量 (圖二十五)， HF4 和控制組相比之下，對細胞三酸甘油酯殘留量有顯著下降 ($p<0.05$)，由基礎殘留量 3.12 $\mu\text{mol/mg protein}$ 減少 52 % 至 1.5 $\mu\text{mol/mg protein}$ ， HF4 對細胞三酸甘油酯殘留量亦顯著低於未分離之 GF3 ($p<0.05$)。藉由逆相層析圖譜得知 HF4 為疏水性胜肽片段，由於本次逆相層析梯度沖提極性變化大，為確認分離之 HF4 是否為單一胜肽片段，將區段 HF4 進行第二次逆相層析分離，依圖譜波峰分別收集為 repeat HF4-1 (RHF4-1)、repeat HF4-2 (RHF4-2) 與 repeat HF4-3 (RHF4-3) (圖二十六)，並將上述三區段重複分離成單一波峰後收集，進行細胞模式測定各區段促脂解活性。圖二十七為添加 4 ppm 的 HF4 與經逆相層析分離的區段對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。經區分後之區段 RHF4-2 與 RHF4-3 ，相較於控制



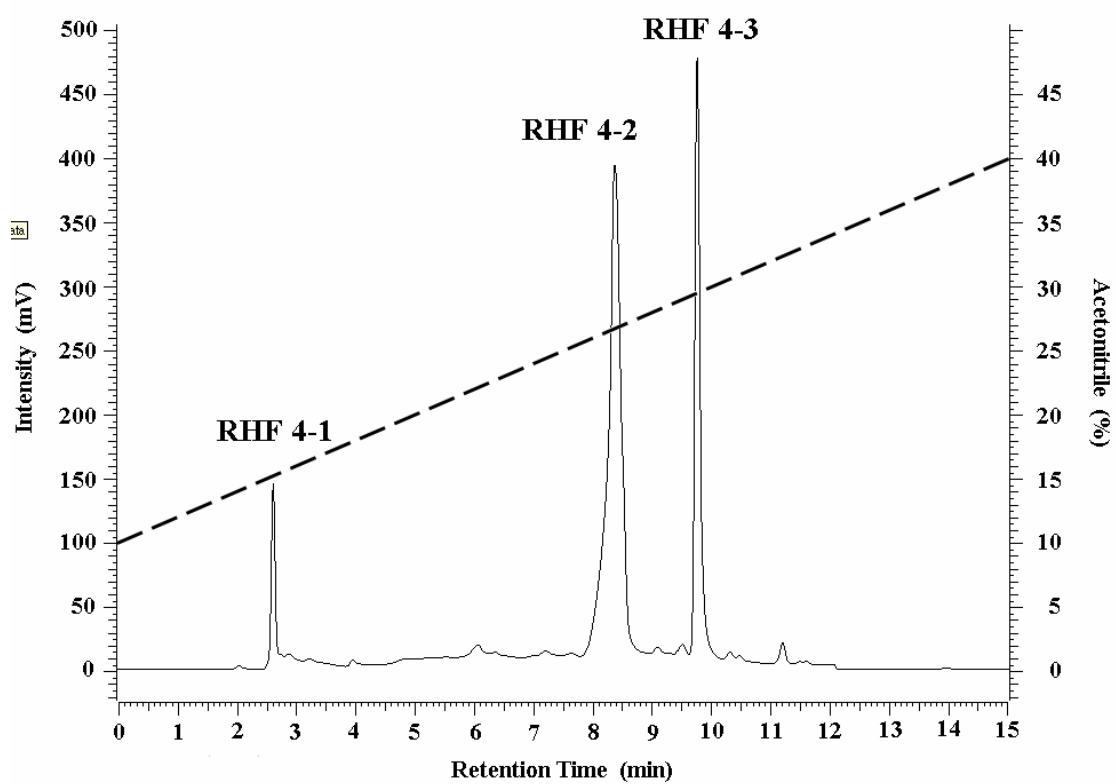
圖二十四、4 ppm GF3 和其逆相層析管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。

Fig. 24. Effect of 4 ppm GF3 and its reverse phase chromatography fractions on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.



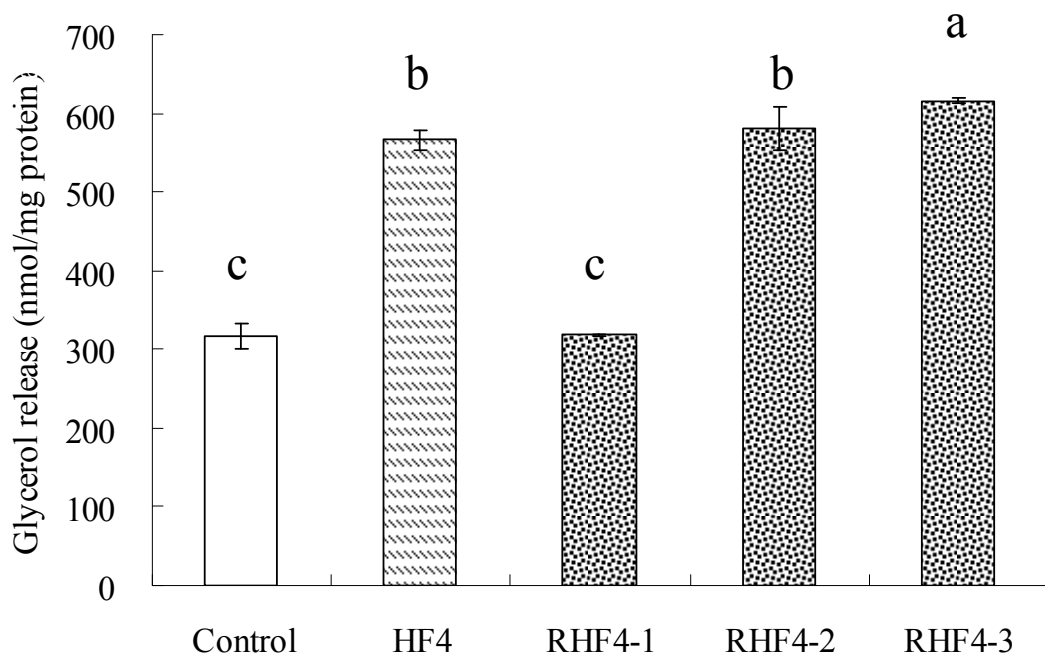
圖二十五、4 ppm GF3 和其逆相層析管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞中三酸甘油酯殘留量之影響。

Fig. 25. Effect of 4 ppm GF3 and its reverse phase chromatography fractions on triglyceride residue in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖二十六、HF4 高效能液相層析之圖譜。

Fig. 26. High-performance liquid chromatography of HF4.



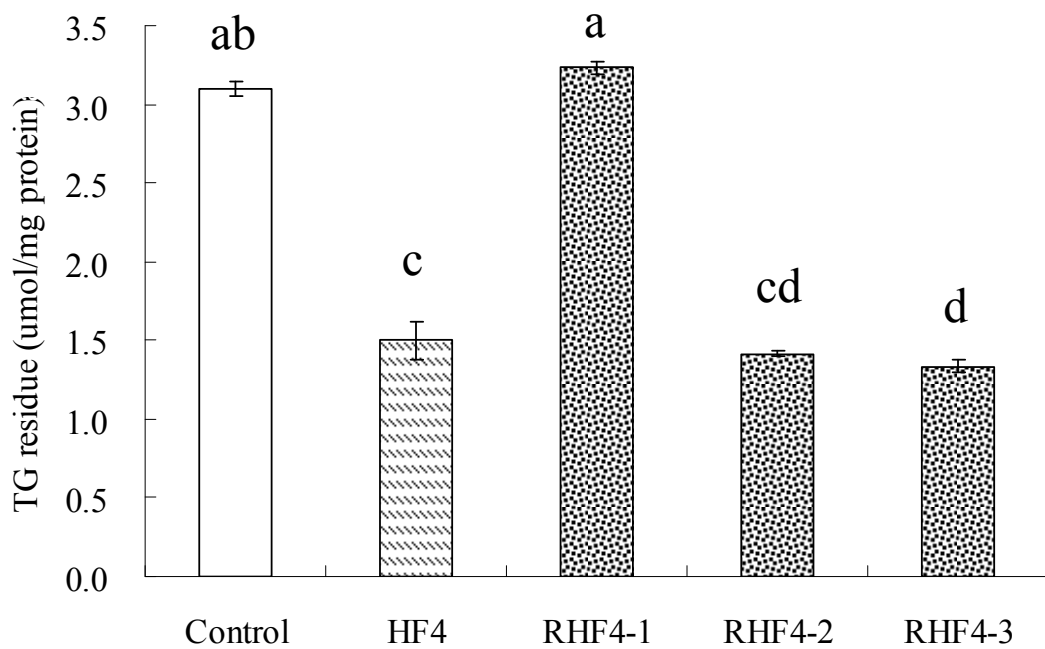
圖二十七、4 ppm HF4 和其逆相層析管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。

Fig. 27. Effect of 4 ppm HF4 and its reverse phase chromatography fractions on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

組可顯著提升脂肪細胞丙三醇釋放量 ($p<0.05$)，分別提升 84 % 與 95 % 至 580.59 nmol/mg protein 與 615.87 nmol/mg protein，此結果亦與脂肪細胞三酸甘油酯殘留量 (圖二十八) 相符，區段 RHF4-2 與 RHF4-3 對脂肪細胞三酸甘油酯殘留量由控制組的 3.1 $\mu\text{mol/mg protein}$ 分別減少 54 % 與 57 % 至 1.42 $\mu\text{mol/mg protein}$ 與 1.34 $\mu\text{mol/mg protein}$ ，與控制組相比皆顯著降低 ($p<0.05$)。因此 RHF4-2 及 RHF4-3 將進一步鑑定其序列。

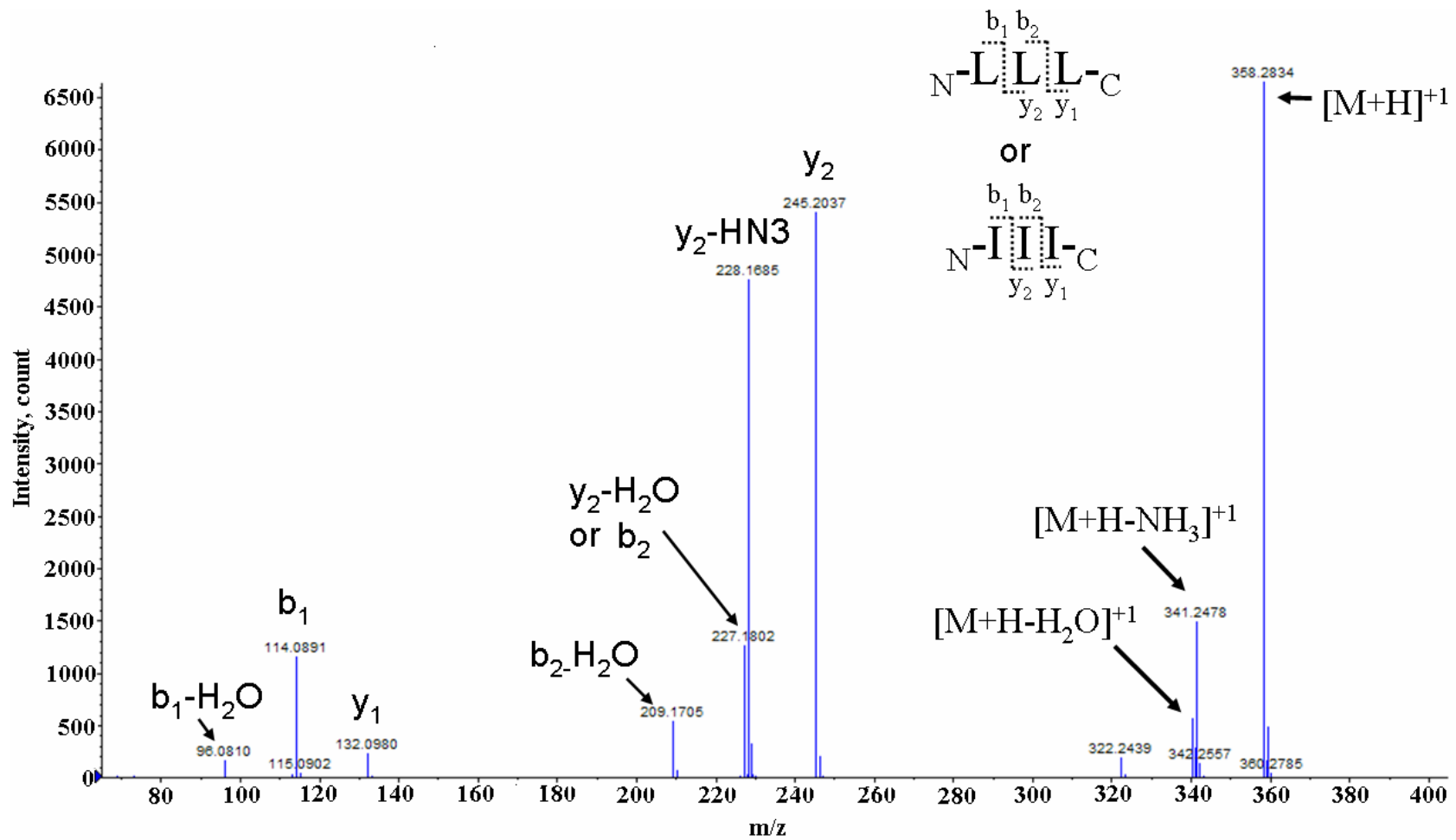
(四) 活性胜肽片段鑑定

RHF4-2 與 RHF4-3 經由液相層析串聯質譜儀 (LC/MS/MS) 進行質譜分析；將質譜訊號圖譜經由圖譜指紋資料庫比對結果如圖二十九與圖三十所示。圖二十九判別 RHF4-2 為 leucine (Leu) 或 isoleucine (Ile) 組成之三胜肽 (tripeptide)，質譜儀是依照質量電荷比訊號進行分析，Leu 與 Ile 互為同分異構物，導致質譜訊號產生重疊而無法判別，因此上述三胜肽胺基酸組合可能共有八種：Leu-Leu-Leu、Leu-Leu-Ile、Leu-Ile-Leu、Leu-Ile-Ile、Ile-Leu-Leu、Ile-Leu-Ile、Ile-Ile-Leu 與 Ile-Ile-Ile，為確定可能胜肽序列組合，藉由參考大豆蛋白主要組成蛋白質 glycinin 與 β -conglycinin 胺基酸序列比對，得知唯有 Leu-Leu-Leu、Ile-Leu-Leu 與 Ile-Ile-Ile 三種組合存在於大豆蛋白質胺基酸序列中。接著依據圖三十顯示 RHF4-3



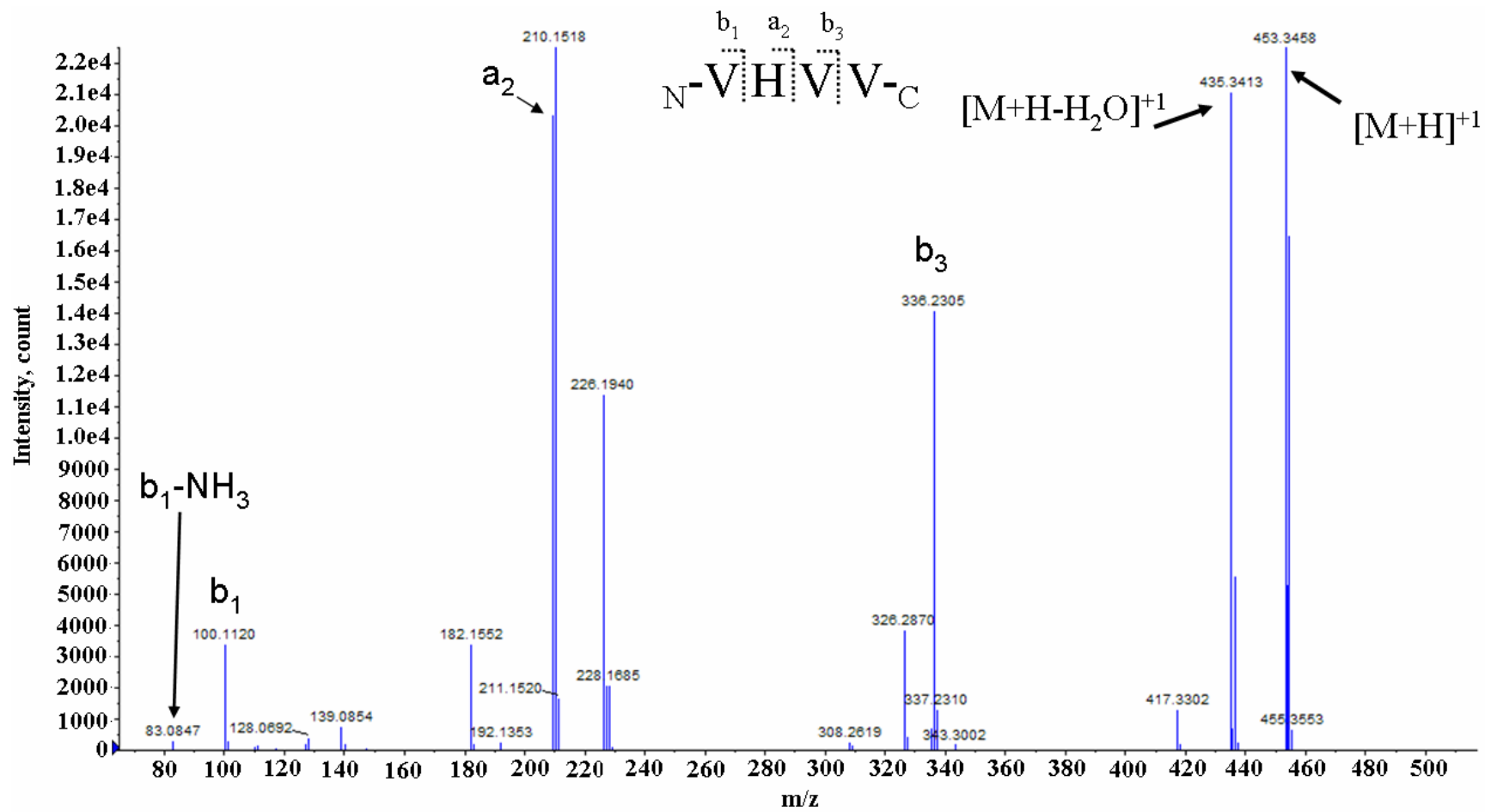
圖二十八、4 ppm HF4 和其逆相層析管柱區分物對 3T3-L1 脂肪細胞三酸甘油酯殘留量之影響。

Fig. 28. Effect of 4 ppm HF4 and its reverse phase chromatography fractions on triglyceride residue in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent means \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖二十九、 RHF4-2 質譜圖。

Figure 29. The mass spectrum of RHF4-2.



圖三十、 RHF4-3 質譜圖。
Figure 30. The msaa spectrum of RHF4-3.

質譜圖判別其胺基酸序列為 Val-His-Val-Val 的四胜肽 (tetrapeptide)。綜合以上胺基酸序列鑑定結果，RHF 4-2 可能為 Leu-Leu-Leu、Ile-Leu-Leu 與 Ile-Ile-Ile 之三胜肽，RHF 4-3 為 Val-His-Val-Val 之四胜肽，表示 RHF4-2 與 RHF4-3 都是由疏水性胺基酸組成之胜肽，Minami 等人 (1990) 指出，大豆蛋白水解物中疏水性基團與酸性基團可降低血中三酸甘油酯與調控脂質代謝的能力，Kagawa 等人 (1996) 亦從球蛋白酵素水解物中純化出四胜肽 (Val-Val-Tyr-Pro)，並得知四胜肽藉由調控肝臟三酸甘油酯解酶 (hepatic triglyceride lipase) 達到提升降血脂活性，趙 (2008) 也証實大豆蛋白水解物可活化 3T3-L1 脂肪細胞中荷爾蒙敏感性脂解酶以提升促脂解活性。由此推測本實驗純化之疏水性胜肽是 Flavourzyme-大豆蛋白水解物中具有促脂解活性的主要原因。未來將以化學合成 Leu-Leu-Leu、Ile-Leu-Leu、Ile-Ile-Ile 與 Val-His-Val-Val 四種寡肽進行細胞實驗，以確立各胜肽的促脂解活性，並藉由體外模擬腸胃道實驗與模擬胰島素環境影響試驗，進一步了解促脂解肽對生物體脂解活性的影響，以深入探討促脂解活性肽調控脂解反應的機制。

伍、 結論

本研究利用反應曲面法的中心混層實驗設計探討促脂解 F-ISPH 最適水解條件，以獲得最多量促脂解活性肽之水解物，結果顯示本次中心混層實驗設計的檢定係數與變異係數分別為 0.935 與 0.73，表示此次實驗設計具有高解釋度；變異數分析 (ANOVA) 顯示模擬二次多項式 (total model) 具有顯著影響性 ($p < 0.05$)，以及二次多項式的適缺性 (lack of fit) 並無顯著影響，再次證實本實驗設計的高度解釋能力；聯合分析亦顯示此次實驗探討的水解變數皆對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量具有顯著影響。最後分析最適水解條件為反應 pH 值 7.12、反應溫度 48.8 °C 與水解時間 124.9 min，水解物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量為 359.93 nmol/mg protein，依最適水解條件進行六次獨立之三重複實驗，驗證水解物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量為 359.92 nmol/mg protein 顯示實際與預測相符。

其次依照最適水解條件製備促脂解活性 F-ISPH，先利用膜過濾系統初步分離，結果顯示透過 30 kDa - 1 kDa MWCO 濾膜能區分出不同分子量大小的保留液與濾液。其中以添加 400 ppm 1 kDa retentate 對脂肪細胞促脂解作用有較顯著提升 ($p < 0.05$)。進一步將 1kDa retentate 透過膠體層析純化，獲得分子量介於 189-2,080 Da 胜

肽片段 (GF3) 可進一步顯著提升其脂解活性 ($p < 0.05$)，其添加劑量於 4 ppm 即可達最大促脂解作用。最後利用逆相層析分離 GF3 獲得單一胜肽片段 RHF4-2 與 RHF4-3 具有顯著的促脂解活性 ($p < 0.05$)，與控制組比較可分別提升 84% 與 95%。經由液相串聯層析質譜儀鑑定 RHF4-2 可能為 Leu-Leu-Leu、Ile-Leu-Leu 或 Ile-Ile-Ile 之三胜肽，RHF4-3 為 Val-His-Val-Val 四胜肽，推測胜肽促脂解活性可能與側鏈基團為疏水性有關。未來將確立化學合成上述四種短鏈胜肽驗證其促脂解活性後，以進一步探討胜肽調控脂解的完整機制。

陸、 參考文獻

- 行政院衛生署 (2009) 2005-2008 國人過重與肥胖狀況。
- 陳秀蓮 (1993) 常用調味料中的蛋白質水解液。食品工業，
25(6):33-43.
- 崔詠菱 (2006) 3T3-L1前脂肪細胞篩選具有降三酸甘油酯作用之大豆
胜肽。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- 曾群凱 (2008) 用膜分離系統生產對3T3-L1前脂肪細胞具有抗脂質
生成活性之大豆胜肽。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士
論文。
- 趙佳宏 (2009) 大豆蛋白水解物對3T3-L1脂肪細胞具有促進脂解活
性之研究。東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- 鄭靜桂 (1997) 蛋白質之水解與水解液之利用。食品工業，
29(5):10-17。
- Abumrad, N. A., Park, J. H. and Park, C. R. (1984) Permeation of
long-chain fatty acid into adipocytes. *J. Bio. Chem.* 259 (14):
8945-8953.
- Albright, A.L. and Stern, J.S. (1998) Adipose tissue. In: *Encyclopedia of
Sports Medicine and Science*, T.D.Fahey (Editor). Internet Society
for Sport Science.
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M. and Cook-Newell, M. E. (1995)
Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N.
Engl. J. Med.* 333:276-282.
- Aoyama, T., Frukui, K., Takamatsu, K., Hashimoto, Y. and Yamamoto, T.
(2000) Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of
dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition*
16:349-354.

- Babji, A. S., Fatimah, S., Ghassem, M. and Abolhassani, Y. (2010) Protein quality of selected edible animal and plant protein sources using rat bio-assay. *Food Res. Int.* 17:303-308.
- Bastard, J. P., Maach, M., Nhieu, J. T., Jardei, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J. J., Capeau, J. and Hainque, B. (2002) Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both *in vivo* and *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(5):2084-2089.
- Box, G. E. and Wilson, K. B. (1951) On the experimental attainment optimum conditions. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* 13:1-45.
- Brasaemle, D. L. (2007) The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48:2547-2559.
- Buck, C. J. (2003) Compositions and methods for softening, thinning and removing hyperkeratotic tissue. US Patent: 20030232042.
- Cannon, B. and Nedergaard, J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84:277-359.
- Carmen, G. Y. and Victor, S. M. (2006) Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal.* 18:401-408.
- Casteilla, L., Penicaud, L., Cousin, B. and Calise, D. (2001) Choosing an adipose tissue depot for sampling. Factors in selection and depot specificity. *Methods Mol. Biol.* 155:1-19.
- Cheryam, M. (1998) Ultrafiltration and microfiltration handbook. Technomic Lancaster.
- Chiang, W. D., Shih, C. J. and Chu, Y. H. (1999) Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chem.* 65:198-194.
- Chiang, W. D., Ysou, M. J., Tsai, Z. Y. and Tsai, T. C. (2006) Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chem.* 98:725-732.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. and Catignani, G. L. (1983) Spectrophotometric assay using *o*-Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66:1219-1227.
- Clemente, A. (2000) Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 11:254-262.

- Cowherd, R. M., Lyle, R. E. and McGehee, R. E. (1999) Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin.Cell Dev. Biol.* 10:3-10.
- Darlington, G., Ross, S. E. and MacDougald, (1998) The role of C/EBP gene in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 273(46): 30057-30060.
- Field, A. E., Coakley, E. H., Must, A., Spadano, J. L., Laird, N., Dietz, W. H., Rimm, E. and Colditz, G. A. (2001) Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch. Intern. Med.* 161:1581-1586.
- Finkelstein, E. A., Ruhm, C. J. and Kosa, K. M. (2005) Economic causes and consequences of obesity. *Annu. Rev. Public Health.* 26:239-257.
- Gill, H. S., Doull, F., Rutherford, K. J. and Cross, M. L. (2000) Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutr.* 84: S111-S117.
- Giorno, L. and Drioli, E. (2000) Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Tibtech* 18:339-349.
- Granneman, J. G., Moore, H. P., Granneman, R. L., Greenberg, A. S. and Obin, M. S. (2007) Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J. Bio. Chem.* 282(8):5726-5735.
- Green, H. and Kwhinde, O. (1974) Subline 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1:113-116.
- Green, A., Rumberger, J. M., Stuart, C. A. and Ruhoff, M. S. (2004) Stimulation of lipolysis by tumor necrosis factor- α in 3T3-L1 adipocytes is glucose dependent. *Diabetes* 53:74-81.
- Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Moos, M. C., Londos, C. and Kimmel, A. R. (1993) Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:12035-12039.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78:783-809.
- Hahn, P. and Novak, M. (1975) Development of brown and white adipose tissue. *J. Lipid Res.* 16:79-91.
- Hauner, H. (2004) The concept of adipose tissue function. *Physiol. Behav.* 83:653-658.
- Herreros, A. G. and Birnbaum, M. J. (1989) The regulation by insulin of glucose transporter gene expression in 3T3 adipocytes. *J. Bio. Chem.* 264(17):9885-9890.

- Himmelblau, D. M. (1970) Process analysis by statistical methods. John Wiley and Sons, New York. 230-292.
- Hsu, H. K., Yang, Y. C., Hwang, J. H. and Hong, S. J. (2003) Effects of *Toona Sinensis* leaf extract on lipolysis in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 19:385-390.
- Je, J. Y., Park, P. J. and Kim, S. K. (2005) Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.* 38:45-50.
- Jeon, Y., Byun, H. and Kim, S. (1999) Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochem.* 35:471-478.
- Jequier, E. and Tappy, L. (1999) Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* 79:451-480.
- Jocken, J. W. and Blaak, E. E. (2008) Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.* 94:219-230.
- Juan, C. C., Chang, C. L., Lai, Y. H. and Ho, L. T. (2005) Endothelin-1 induces lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 228:E1146-E1152.
- Kagawa, K., Matsutaka, H., Fukuhama, C., Watanabe, Y. and Fujino, H. (1996) Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertriglyceridemia and Val-Val-Tyr-Pro, one of its constituents, possesses most superior effect. *Life Sci.* 58(20):1745-1755.
- Kern, P. A., Gregorio, G. B., Lu, T., Rassouli, N. and Ranganathan, G. (2003) Adiponectin expression from human adipose tissue. *Diabetes* 52:1779-1785.
- Kim, H. J., Bae, I. Y., Ahn, C., Lee, S. and Lee, H. G. (2007) Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysates. *Peptides* 28:2098-2103.
- Kim, H. K., Della-Fera, M., Lin, J. and Baile, C. A. (2006) Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr.* 136:2965-2969.
- Kim, J. M., Whang, J. H. and Suh, H. J. (2004) Enhancement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and improvement of the emulsifying and foaming properties of corn gluten hydrolysate using ultrafiltration membranes. *Eur. Food Res. Technol.* 218:133-138.

- Kontessis, P., Jones, S., Dodds, R., Trvisan, R., Nosadini, R., Fioretto, P., Borsato, M., Sacerdoti, D. and Viberti, G. C. (1990) Renal, metabolic and hormonal responses to ingestion of animal and vegetable proteins. *Kidney Int.* 38:136-144.
- Lafontan, M. and Langin, D. (2009) Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* 48:275-297.
- Lahl, W. J. and Braun, S. D. (1994) Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* 48:68-71.
- Li, Z., Youravong, W. and H-Kittikun, A. (2006) Separation of proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. *Bioresour. Technol.* 97:2364-2370.
- Li, Y., Zheng, X. and Yang, G. (2008) Effects of leptin on porcine primary adipocytes lipolysis and mRNA expression of key lipolytic enzymes. *Chin. J. Biotechnol.* 24(9):1613-1619.
- Lusas, E. W. and Riaz, M. N. (1995) Soy protein products: processing and use. *J. Nutr.* 125:573S-580S.
- McCann, K. B., Shiell, B. J., Michalski, W. P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. and Coventry, M. J. (2006) Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide from bovine α_{S1} -casein. *Int. Dairy J.* 16:316-323.
- Merritt, J. C. and Carolina, C. N. (2004) Metabolic syndrome: soybean foods and serum lipids. *J. Natl. Med. Assoc.* 96:1032-1041.
- Minami, K., Moriyama, R., Kitagawa, Y. and Makino, S. (1990) Identification of soybean protein components that modulate the action of insulin *in vitro*. *Agri. Biol. Chem.* 54 (2):511-517.
- Minguell, J. J., Erices, A. and Conget, P. (2005) Mesenchymal stem cells. *Exp. Bio. Med.* 226(6):507-520.
- Must, A., Spadano, J., Coakley, E. H., Field, A. E., Colditz, G. and Dietz, W. H. (1999) The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA.* 282:1523-1529.
- Myers, R. H. and Montgomery, D. C. (2002) Response surface methodology (2nd. ed.) John Wiley and Sons. New York.
- Nedergaard, J., Bongtsson, T. and Cannon, B. (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293:E444-E452.
- Ney, K. H. (1979) Bitterness of peptides; amino acid composition and chain length. In: J.C. Bondreau, Editor, Food taste chemistry, American Chemical Society, Washington DC. 149-173.

- Nishi, T., Hara, H., Hira, T. and Tomita, F. (2001) Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal cells. *Exp. Biol. Med.* 226(11): 1091-1096.
- Ntambi, J. M. and Kim, Y. C. (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 130:3122S-3126S.
- Panyam, D. and Kilara, A. (1996) Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci. Technol.* 7:120-125.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M. and Hanson, R. W. (2003) Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Bio. Chem.* 278(33):30413-30416.
- Rho, S. J., Lee, J. S., Chung, Y. I., Kim, Y. W. and Lee, H. G. (2009) Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochem.* 44:490-493.
- Richon, V. M., Lyle, R. E. and McGehee, R. E. (1994) Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Bio. Chem.* 272(15):1011-10124.
- Robinson, J. and Newsholme, E. A. (1969) The effects of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. *Biochem. J.* 112:449-453.
- Rosen, E. D. and MacDougald, O. A. (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Mol. Cell Biol.* 7:885-896.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. and Spiegelman, B. M. (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Gene Dev.* 14:1293-1307.
- Sarwar, G., Peace, R. W., Botting, H. G. and Brule, D. (1989) Relationship between amino acid scores and protein quality indices based on rat growth. *Plant Foods Hum. Nutr.* 39:33-44.
- Sathe, S. K., Teuber, S. S. and Roux, K. H. (2005) Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnol. Adv.* 23:423-429.
- Seo, W. H. and Baex, H. H. (2008) Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis. *J. Food Sci.* 73:S41-S46.
- Shepherd, P. R., Gnudi, L., Tozzo, E., Yang, H., Leach, F. and Kahn, B. B. (1993) Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in

- transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 268:22243-22246.
- Shugart, E. C. and Umek, R. M. (1997) Dexamethasone signaling is required to establish the postmitotic state of adipocyte development. *Cell Growth Differ.* 8:1091-1098.
- Sirtori, C. R., Lovati, M. R., Manzoni, C., Monetti, M., Pazzucconi, F. and Gatti, E. (1995) Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *J. Nutr.* 125:598S-602S.
- Smith, P. J., Wise, L. S., Berkowitz, R., Wan, C. and Rubin, C. S. (1988) Insulin-like growth factor-1 is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Bio. Chem.* 263(19):9402-9408.
- Student, A. K., Hus, R. Y. and Lane, M. D. (1980) Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Bio. Chem.* 255(10):4745-4750.
- Szkudelska, K., Nogowski, L. and Szkudelski, T. (2008) Genistein, a plant-derived isoflavone, counteracts the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109:108-114.
- Trujillo, M. E. and Scherer, P. E. (2006) Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr. Rev.* 27(7):762-778.
- Tsou, M. J., Kao, F. J., Tseng, C. K. and Chiang, W. D. (2010a) Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. *Food Chem.* 122:243-248.
- Tsou, M. J., Lin, W. T., Lu, H. C., Tsui, Y. L. and Chiang, W. D. (2010b) The effect of limited hydrolysis with Nuetrase and ultrafiltration on the anti-adipogenic activity of soy protein. *Process Biochem.* 45:217-222.
- Wang, Y., Jones, P. H., Ausman L. M. and Lichtenstein, A. H. (2004) Soy protein reduces triglyceride levels and triglyceride fatty acid fractional synthesis rate in hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis* 173:269-275.
- Wang, J., Liu, J., Lu, J. and Cui, Z. (2010) Isolation and purification of superoxide dismutase from garlic using two-stage ultrafiltration. *J. Memb. Sci.* 352:231-238.
- Wang, S., Soni, K. G., Semache, M. and Casavant, S. (2008) Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Mol.*

- Genet. Metab. 95:117-126.
- Weiner, F. R., Smith, P. J., Wertheimer, S. and Rubin, C. S. (1991) Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor α in 3T3-L1 cells. *J. Bio. Chem.* 266(35):23525-23528.
- Weiss, S. B., Kennedy, E. P. and Kiyasu, J. Y. (1960) The enzymatic synthesis of triglycerides. *J. Bio. Chem.* 235(1):40-44.
- Wise, L. S. and Green, H. (1979) Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in adipose conversion of 3T3 cells. *J. Bio. Chem.* 254(2) 273-275.
- Wu, J. and Ding, X. (2002) Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.* 35:367-375.
- Yan, H., Kermouni, A., Abdel-Harfez, M. and Lau, D. C. (2003) Role of cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in modulating adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Lipid Res.* 44:424-429.
- Yang, G., Shu, X., Jin, F., Zhang, X., Li, H., Li, Q., Gao, Y. and Zheng, W. (2005) *Am. J. Clin. Nutr.* 81:1012-1017.
- Young, V. R. (1991) Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *J. Am. Diet Assoc.* 91:828-835.
- Zhang, L., Li, J. and Zhou, K. (2010) Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat peroxidation. *Bioresour. Technol.* 101:2084-2089.
- Zhong, F., Zhang, X., Ma, J. and Shoemaker C. F. (2007) Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. *Food Res. Int.* 40:756-762.
- Zhu, K., Zhou, H. and Qian, H. (2006) Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochem.* 41:1296-1302.