

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
Tunghai University

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master Thesis

指導教授：江文德 博士
Advisor：Wen-Dee Chiang, Ph. D.

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

Study of Soy Protein Hydrolysate with Enhancing Lipolytic
Activity in 3T3-L1 Adipocytes

研究生：趙佳宏 撰
Graduate Student：Chia-Hung Chao

中華民國九十八年七月
July, 2009

碩士論文指導教授推薦書

食品科學研究所科技組 趙佳宏 君所提之論文

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

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學研究所所長

李松新

指導教授：

吳俊德

中華民國九十八年七月二十二日

碩士論文考試委員審定書

食品科學碩士班食品科技組 趙佳宏 君所提之論文

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

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

<u>蔡正宗</u>	東海大學食品科學系教授
<u>傅傳英</u>	食品工業發展研究所檢驗技術研發及 服務中心副主任
<u>陳淑德</u>	宜蘭大學食品科學系副教授
<u>方淑屏</u>	銘傳大學餐旅管理學系助理教授

指導教授：

王淑娟

中華民國九十八年七月二十二日

謝誌

回首兩年來的學習與研究過程中，身為東海的研究生的我，如今已隨著謝誌而完成我碩士學習。雖然兩年來實驗無數次，在一次又一次的挫折中，卻累積更多寶貴經驗與成果，在此感謝始終陪伴我、幫助我的人，相信唯有您們一路鼓勵，才有今天的我。

在此，首先要感謝恩師江文德博士對我的指導，除了在課業及實驗之外的學習，也讓學生了解許多待人處世的道理，尤其在論文撰寫期間不厭其煩的修改及指正，使論文更趨完善，老師的幫助及鼓勵，我更是會永遠謹記在心。

感謝食品工業發展研究所檢驗技術研發及服務中心 傅偉光博士、宜蘭大學食品科學系 陳淑德博士、銘傳大學餐旅管理學系 高馥君博士、東海大學食品科學系 蔡正宗博士於繁忙中撥空審閱論文，並於口試時給予高度的肯定，給學生的寶貴建議與指導使得本論文能更加的完善，在此致上衷心的感激。

另外，也感謝系上所有的老師和系辦 王琴助理、淑瑜助教、怡君助教及珮玲助教於實驗上的協助，特別要感謝盧錫祺老師於培養細胞方面總是熱心的替學生解惑，還有學長姐瓜哥、靜玫、育玫、于珊、雅紋、舒瑜、文彥、書涵及企鵝的關懷與照顧，共同砥礪的同窗敬宅跟志剛兔、身兼同學及隊友的阿達，學弟妹豪駿(團團)、怡樺(圓圓)、佑年、巧馨、芄萱和瀟菽使我的研究生活充滿歡樂及笑聲。感謝 3T3-L1 脂肪細胞在實驗中的順從與犧牲，才能成就我論文中完善的數據。

最後感謝我的家人，雖然沒辦法常回家陪伴您們，但您們對我的支持及體諒，是我能順利完成學業的一大動力。

學生 趙佳宏 謹致於
東海大學食品科學研究所
機能性食品開發研究室
中華民國九十八年 七月 二十八日

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、 蛋白質水解物的機能性.....	5
三、 酵素膜反應系統的原理與應用.....	6
(一) 原理.....	6
(二) 應用.....	7
四、 脂肪組織.....	8
(一) 白色脂肪組織.....	9
(二) 棕色脂肪組織.....	9
五、 脂肪細胞的研究.....	10
1. 體內模式.....	11
2. 體外模式.....	11
(一) 3T3-L1 前脂肪細胞株.....	12
(二) 前脂肪細胞的分化.....	13
1. 生長停止期.....	13

2. 早期的分化基因表現.....	14
3. 分化末期及分化終止.....	14
六、 脂肪細胞的脂質代謝.....	16
(一) 脂質合成.....	16
(二) 脂肪分解.....	17
七、 脂肪分解酶的特性與調控.....	19
(一) 荷爾蒙敏感性脂解酶 (HSL).....	19
(二) 三酸甘油酯脂解酶 (ATGL).....	21
參、 材料與方法.....	25
一、 實驗材料.....	25
(一) 水解率與凱氏氮測定.....	25
(二) 膜反應系統.....	26
(三) 細胞培養.....	26
(四) Oil red O 染色.....	26
(五) 丙三醇釋放量與三酸甘油酯含量測定.....	27
(六) 蛋白質定量分析.....	27
(七) 細胞毒殺試驗.....	27
(八) 模擬腸胃道消化試驗.....	27
(九) 轉錄因子蛋白質表現量分析.....	27

(十) 螢光免疫染色法.....	28
二、 實驗方法.....	29
(一) 分離大豆蛋白水解物的製備.....	29
(二) 水解率測定.....	29
(三) 產量測定.....	31
(四) 濾膜的區分.....	32
(五) 分子量分布的檢測.....	32
(六) 細胞培養.....	34
(七) Oil red O 染色.....	36
(八) 丙三醇釋放量檢測.....	38
(九) 三酸甘油酯含量檢測.....	38
(十) 蛋白質定量分析.....	38
(十一) MTT 細胞毒殺試驗.....	39
(十二) 模擬腸胃道消化試驗.....	40
(十三) 西方轉漬法 (Western Blot).....	40
(十四) 螢光免疫染色法 (Immunostaining).....	41
肆、 結果與討論.....	42
一、 ISPH 的篩選.....	42
(一) NH ₄ h 水解物.....	45

(二) FH2h 水解物.....	47
二、 水解物的區分.....	49
(一) NH4h 水解物區分.....	51
(二) FH2h 水解物區分.....	51
三、 ISPH 濾膜區分物的篩選.....	54
(一) NH4h 濾膜區分物.....	54
(二) FH2h 濾膜區分物.....	59
四、 模擬腸胃道消化試驗.....	69
(一) NH4h 10 kDa concentrate.....	69
(二) FH2h 1 kDa concentrate.....	71
五、 3T3-L1 脂肪細胞中脂解酶蛋白質表現量分析.....	73
(一) ATGL 蛋白質表現量.....	73
(二) HSL 蛋白質表現量.....	75
(三) phosphor-HSL 蛋白質表現量.....	75
六、 3T3-L1脂肪細胞中HSL之移位作用.....	78
伍、 結論.....	81
陸、 參考文獻.....	83

圖目錄

圖一、3T3-L1 前脂肪細胞分化過程.....	15
圖二、人類脂肪細胞中脂解作用的調控機制.....	22
圖三、膜反應系統.....	33
圖四、3T3-L1 脂肪細胞分化階段之實驗架構.....	35
圖五、3T3-L1 前脂肪細胞(A)於培養第 4 天(B)及第 8 天(C)之分化構 形.....	37
圖六、Flavourzyme 水解時間對分離大豆蛋白水解率及產量之影 響.....	43
圖七、不同水解時間之 Flavourzyme-ISP 水解物對 3T3-L1 脂肪細胞相 對脂肪堆積量之影響.....	44
圖八、NH ₄ h 添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘 油酯殘留量(B)之影響.....	46
圖九、FH ₂ h 添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘 油酯殘留量(B)之影響.....	48
圖十、NH ₄ h (A)與 FH ₂ h (B)添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞存活率的影 響.....	50
圖十一、NH ₄ h 水解物經不同限值濾膜區分所得濃縮物與濾液分子量 分布圖.....	52

圖十二、FH2h 水解物經不同限值濾膜區分所得濃縮物與濾液分子量分布圖.....	53
圖十三、400 ppm NH4h 濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量之影響.....	55
圖十四、NH4h 30 kDa concentrate 的其添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響.....	57
圖十五、NH4h 10 kDa concentrate 的添加劑量對 3T3-L1 已分化脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響.....	58
圖十六、400 ppm FH2h 濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響.....	60
圖十七、FH2h 30 kDa concentrate 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響.....	61
圖十八、FH2h 10 kDa concentrate 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響.....	62
圖十九、FH2h 1 kDa concentrate 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響.....	63
圖二十、分別添加 800ppm NH4h 10 kDa concentrate 與 50ppm FH2h 1 kDa concentrate 後，經過不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響.....	66

圖二十一、分別添加不同濃度之 NH4h 10 kDa concentrate (A)與 FH2h 1kDa concentrate (B)對 3T3-L1 脂肪細胞存活率的影響.....	68
圖二十二、50ppm NH4h 10 kDa concentrate 經腸胃道消化酵素水解後對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響.....	70
圖二十三、50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 經腸胃道消化酵素水解後對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響.....	72
圖二十四、50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 添加後經由不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞中 ATGL 蛋白質表現量之影響.....	74
圖二十五、50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 添加後經由不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞中 HSL 蛋白質表現量之影響.....	76
圖二十六、50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 添加後經由不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞中 Phospho-HSL 蛋白質表現量之影響.....	77
圖二十七、添加 50 ppm FH2h 1kDa concentrate 觀察不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞中 HSL 移位之影響 (螢光顯微鏡放大倍率×400).....	79

表目錄

表一、蛋白酶特性.....	30
---------------	----

摘要

本研究利用 3T3-L1 脂肪細胞的丙三醇釋放量為指標，探討分離大豆蛋白 (ISP) 水解物對細胞脂解作用的影響，並以細胞內三酸甘油酯殘留量作進一步的確認；當胞外較高的丙三醇釋放量，相對於胞內較低的三酸甘油酯殘留量，可說明細胞質中的三酸甘油酯確實被分解。ISP 以 Flavourzyme 水解 2 小時的水解物 (FH2h) 以及 Neutrase 水解 4 小時所得的水解物 (NH4h)，於 400-1600 ppm 的添加濃度皆可顯著的促進脂肪細胞中丙三醇的釋放以及降低三酸甘油酯殘留量 ($p < 0.05$)。為了進一步提升水解物的脂解活性，利用 300-30,000 Da 之間的分分子量限值 (Molecular weight cut-off, MWCO) 濾膜對水解物進行區分，結果指出 FH2h 經 1 kDa MWCO 濾膜區分所得濃縮物 (FH2h 1 kDa concentrate) 提升脂解能力最為顯著，50 ppm 的 FH2h 1 kDa concentrate 可顯著提升丙三醇釋放，從 84.19 nmol/ml 提升至 116.33 nmol/ml ($p < 0.05$)，而三酸甘油酯殘留量也顯著的降低，從 3.08 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 降至 2.21 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ ($p < 0.05$)。經由毒性試驗證實，FH2h 1 kDa concentrate 於 1600 ppm 添加濃度下不影響細胞的存活率。後續模擬腸胃道酵素的消化作用對 FH2h 1 kDa concentrate 活性的影響，結果得知 FH2h 1 kDa concentrate 的活性不易受到腸胃道酵素的破壞。最後利用西方轉漬法以及螢光免疫染色評估 FH2h 1 kDa

concentrate 增強脂肪細胞脂解作用的可能機制；添加 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 會增加細胞中的荷爾蒙敏感性脂解酶 (HSL) 的磷酸化與移位作用，因此大豆胜肽可能藉由活化細胞中的 HSL 而增強脂質的分解。

Abstract

The aim of this research was to explore the lipolytic activity of isolated soy protein (ISP) hydrolysates using 3T3-L1 adipocytes. Both extracellular glycerol release concentration (GRC) and intracellular triglyceride residual (TR) were employed as markers for lipolysis in cells. The higher the glycerol release as well as the lower the triglyceride residual represents the better lipolytic activity. ISP was hydrolyzed with Flavourzyme and Neutrase for 2 h and 4 h to obtain the hydrolysate FH2h and NH4h, respectively. Both FH2h and NH4h showed significant ($p < 0.05$) increase of GRC and decrease of TR in adipocytes at 400-1600 ppm Levels. To enhance their lipolytic activity, the hydrolysates were further fractionated by several membranes with molecular weight cut-off (MWCO) of 300-30,000 Da. The FH2h 1 kDa concentrate obtained from the treatment of FH2h using 1,000 Da MWCO membrane could significantly ($p < 0.05$) increase its GRC from 84.19 to 116.33 nmol/ml and decrease its TR from 3.08 to 2.21 $\mu\text{mol/mg}$ protein at 50 ppm levels. According to cell viability assay, FH2h 1 kDa concentrate did not show any toxicity at 400-1600 ppm levels. The in vitro effect of gastrointestinal proteases on lipolytic activity of FH2h 1 kDa concentrate was also

investigated, the results suggested that gastrointestinal proteases have very little effect on the lipolytic activity of the concentrate. Base on the western immunoblot analysis and immunostaining, FH2h 1 kDa concentrate promotes lipolysis by increasing the phosphorylation of hormone-sensitive lipase (HSL) and its translocation in 3T3-L1 adipocytes.

壹、前言

近年來，肥胖的發生率在許多已開發國家快速的成長，也因國人飲食習慣的改變，逐漸成為現代人的健康殺手 (Kuczmarski et al., 1994；Wolf and Colditz, 1996)。許多研究指出肥胖與許多慢性疾病的發生有關，如高血壓、第二型糖尿病、高血脂心血管疾病、免疫不全及癌症等 (Spiegelman et al., 1993；Moller and Flier, 1991；Gregoire et al., 1998)。肥胖主要之原因為過多的脂肪組織與脂肪堆積，當生物體能量吸收高於能量消耗時，多餘的能量會轉換為三酸甘油酯儲存於脂肪組織中，而脂肪組織的大小取決於脂肪細胞的數目與體積 (Shepherd et al., 1993；Mersmann, 2002)，不同刺激下可使細胞內脂肪堆積有增加或減少的表現。3T3-L1 前脂肪細胞株在刺激其分化後，可正常的表現出脂肪細胞的特性 (Green and Kehinde, 1975)，目前廣泛的應用於探討脂肪代謝途徑、糖尿病與肥胖的關係 (Yan et al., 2003；Isley et al., 2005)，透過此細胞株的生理反應表現，可以體外模式來模擬動物體脂肪代謝的途徑。

根據文獻指出，食品蛋白質在人體新陳代謝過程中為一重要營養來源，具有提供人體所需胺基酸和能量供給等功能，而許多蛋白質隱含著活性片段，通過腸胃道後具有多種特殊的生理調節作用(Choi et al., 2001)。其中植物性蛋白質具有較動物性蛋白質更好的機能性，

如：降低膽固醇、降血脂、改善糖尿病、降低癌症風險等等 (Carroll,1991；Anderson et al.,1995；Lasekan et al., 1995；Kerckhoffs et al., 2002)，以大豆蛋白取代動物性蛋白的來源，亦可降低動脈硬化、心血管疾病與高血脂症發生的機率 (Meeker and Kesten, 1941)。研究也指出，這些蛋白質經由酵素作用後，所分解出具生物活性的胜肽可更加提升原有蛋白質之機能性，即使經消化系統作用後仍具有不同的生理功能 (Pihlanto-Leppälä et al., 2001)。使用 Alcalase 水解大豆蛋白後產生具有抑制高血壓的胜肽片段 (Wu and Ding, 2002；Chiang et al., 2006)。使用源自枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)的蛋白酶水解分離大豆蛋白之水解物可明顯降低大鼠的血脂與體重 (Aoyama et al., 2000)。以 Flavourzyme 與 Neutrase 水解大豆蛋白之水解物可確實降低 3T3-L1 前脂肪細胞脂質生成活性 (曾, 2008)。由此可知大豆蛋白經由不同酵素產生之水解物具有不同的生理功能。

膜反應系統為利用不同孔徑大小濾膜管柱進行區分，可生產出不同分子量之產物可進一步提升其功能性。以膜反應系統區分不同大豆蛋白水解物，所得的區分物比原有水解物更具有溶解度，抗氧化性與降高血壓活性 (Chiang et al., 1999；Chiang et al., 2006)。黑豆蛋白水解物經由濾膜區分後，亦可有效降低 3T3-L1 脂肪細胞脂質堆積的功能 (Kim et al.,2007)。另外，利用膜反應系統生產出的大豆胜肽，可

確實降低 3T3-L1 前脂肪細胞脂質生成活性 (曾, 2008)。

綜合上述論點，本研究將分別以 Flavourzyme 與 Neutrase 兩種酵素對分離大豆蛋白進行水解，來探討水解物對脂肪細胞脂解作用的影響。利用膜反應系統從水解物中篩選出不同分子量之區分物，以驗證區分物是否能更進一步提升促進脂解之活性。另外透過細胞存活率試驗探討區分物是否對細胞造成毒性，以及模擬腸胃道消化試驗探討區分物促進脂解之活性是否會受到腸胃道酵素水解作用的破壞。最後利用西方轉漬法以及螢光免疫染色法評估水解物影響細胞脂解作用的可能機制。

貳、文獻回顧

一、大豆蛋白

大豆學名為*Glycine max Merrill*，又名黃豆，莢豆科 (*Leguminosae*) 一年生草本植物，為一種富含蛋白質及多種營養素的食物，許多研究指出大豆飲食對預防心血管疾病、腎臟病、糖尿病、惡性腫瘤、肥胖、骨質疏鬆症、過敏症、便秘等方面具有改善的功效 (Anderson et al., 1999)，也可以減少乳癌、前列腺癌、結腸癌發生的機率 (Messina et al., 1994；Baggott et al., 1994；Barnes et al., 1995；Barnes et al., 1990；Hakkak et al., 2000)，另外對於預防肥胖或控制體重也有顯著的效果 (Allison et al., 2003)。

大豆相較於其他植物，具高蛋白質含量約 35 %與完整的必需胺基酸，為一種相當於動物性蛋白質的植物性蛋白質 (Young, 1991)，因大豆產量豐富且價格低廉，近年來已被廣泛運用於食品加工上取代動物性蛋白。食品中常見的大豆蛋白原料包括，脫脂大豆粉 (Defatted soy bean flour)、濃縮大豆蛋白 (soybean protein concentrate)及分離大豆蛋白 (isolated soy protein)。脫脂大豆粉蛋白質含量約 50%，為大豆去皮與抽油後再適當處理為細粉的產品；濃縮大豆蛋白為脫脂大豆粉以水、酒精或等電酸液 (pH 4.5)去除水溶性醣類、灰份等成分製品，蛋白質含量可提升至 70 %；分離大豆蛋白為濃縮大豆粉用水或稀鹼

液抽出蛋白質，過濾後加酸至大豆蛋白等電點 (pH 4.5)，去除多數非蛋白質成分的產品，蛋白質含量高達 95 % (Anson, 1957)。脫脂大豆粉與濃縮大豆蛋白價格較低，但具大豆特有的苦味與臭味，含有蛋白酶抑制劑；分離大豆蛋白為無色無香無味安定性高的產品，且不含蛋白酶抑制劑，但價格較高。

許多研究指出大豆蛋白具多種機能，可降低血液中膽固醇與三酸甘油酯濃度 (Anderson et al., 1995; Lovati et al., 2000; Wang et al., 2004)，預防粥狀動脈粥瘤的形成 (Weihua et al., 1998)，改善大鼠葡萄糖耐受性，提升胰島素敏感性 (Lavigne et al., 2000)，減少肥胖大鼠體脂肪堆積 (Nagasawa et al., 2003)。

二、 蛋白質水解物的機能性

藉由控制及調整水解反應之條件，可得到具不同特性的水解物，同時，酵素水解普遍的應用於改變蛋白質結構以促進蛋白質機能性 (Corredig and Dalgleish, 1997)。因蛋白質水解物中小分子片段具重要的機能性，這些片段不需要透過胃液消化即可被腸道輕易的吸收且不會引起過敏反應 (Gonzalez-Tello et al., 1994)，目前已經應用於許多方面，包括營養補充劑、體重控制飲食以及具營養調養功效的減敏配方產品和針對苯丙酮醛尿患者、急慢性肝病患者、腹瀉症患者、局部性迴腸炎患者，與潰爛性結腸炎患者的產品 (Clement, 2000)。

膳食蛋白質透過酵素作用後，會分解出具生物活性的胜肽片段，可作為腸道消化中具有生理代謝功能的調節者，這些片段通常為 3-20 個胺基酸片段 (300-2000 Da) 所組成，其功能取決於胺基酸種類及其序列 (Pihlanto-Leppälä et al., 2001)，目前蛋白質水解物已知的作用有提高吸收、免疫調節功能 (Chen et al., 1995)、抗氧化 (Moure et al., 2006)、降高血壓活性 (Chiang et al., 2006)、降膽固醇活性 (Aoyama et al., 2000；Takamatsu et al., 2004；Zhong et al., 2007)、減少 3T3-L1 脂肪細胞堆積三酸甘油酯 (Kim et al., 2007) 以及具抑制 3T3-L1 前脂肪細胞分化作用及抗脂質生成活性 (曾, 2008)。

除了上述功能，大豆蛋白中的 7S globulin β -conglycinin 可透過提高 LDL 受體的親和性而達到平衡血膽固醇 (Lovati et al., 1992；Manzoni et al., 2003) 與降低血脂 (Aoyama et al., 2001；Kambara et al., 2002) 之功效。此外，大豆蛋白水解物以及乳蛋白中的生物活性片段可透過腸胃道而被吸收後，仍具抑制高血壓的作用 (Maruyama et al., 1987；FitzGerald et al., 2000；Wu and Ding, 2002)。上述結果證明經過腸胃道與血液中酵素作用後，胜肽片段可被吸收到血液中，並有足夠的效力改善生理表現。

三、 酵素膜反應系統的原理與應用

(一) 原理

本研究所採用的是一種掃流式膜分離設備，使用的濾膜為捲式膜 (spiral-wound membrane)，其流體行進的方向與膜面是平行的。膜系統操作通常是一種物理性的作用過程，以循環幫浦將原料液在系統內循環，以適當的速度流經膜面，並在膜面造成掃流作用，以緩和易堵塞物質在膜面上的堆積，其中小分子物質與水分子會通過膜面孔洞成為濾液 (permeate)，而無法通過膜面孔洞的大分子物質，則留在循環液中。隨著操作的進行，原料液被分成兩股液體，一為含高濃度大分子物質的循環液稱為濃縮液 (concentrate)，另一為含有小分子物質及水的濾液 (Chiang et al., 1999)。

(二) 應用

近年來超過濾膜反應系統的技術已成功應用於蛋白質水解物的澄清與區分 (Hamada, 1991)，如醬油的澄清 (Tien and Chiang, 1992)、牛奶蛋白取得高血壓、低過敏性胜肽 (Samuelsson and Poulsen, 1992；Pihlanto-Leppälä, 2001；Guadix et al., 2006)。有文獻利用濃縮大豆蛋白的工業廢棄物經由超濾膜區分不同分子量的蛋白質濃縮物後，再經由 Flavourzyme 水解可得到具抗氧化活性的胜肽 (Moure., 2006)；Chiang 等人 (2006)指出分離大豆蛋白經酵素 alcalase 反應的水解物，利用膜過濾系統進行區分與濃縮後，可確實提升水解物的降高血壓活性；Kim 等人 (2007)純化黑豆水解物的過程中利用超濾膜

區分不同分子量的黑豆胜肽，具降低 3T3-L1 脂肪細胞脂質堆積的功能。此外，利用膜過濾系統生產出的大豆胜肽，可確實降低 3T3-L1 前脂肪細胞脂質生成活性 (曾, 2008)。

蛋白質食品中均含有一些功能性的胜肽，但因為在體內消化時間或是攝取量不夠，不一定能水解出足夠的需求濃度，在預防保健的觀念下，膳食的機能性成分胜肽濃度在達到某種程度時，才能有效預防疾病。因此，利用濾膜區分系統可控制水解產物的分子量分布、濃度以及品質，大量並持續生產出具機能性的胜肽產品 (Pihlanto-Leppälä et al., 2001)。

四、 脂肪組織

脂肪組織為一種特化的結締組織，由脂肪細胞所組成，為能量儲存的場所，負責體內的能量恆定。當動物體攝取過多能量時，會將能量轉換成脂肪儲存於脂肪組織；而當動物體缺乏能量時，則可以將脂肪分解，釋放出供應動物體所缺乏的能量 (Gregoire et al., 1998)。對哺乳動物而言，分布於肌肉肝臟的脂肪組織，同時與腎臟、內分泌系統合作，維持體內糖類與脂肪代謝的恆定。

哺乳動物的脂肪組織分為兩種型態，白色脂肪組織 (white adipose tissue) 與棕色脂肪組織 (brown adipose tissue)，皆與能量調節有關 (Jequier and Tappy, 1999)。白色脂肪組織與棕色脂肪組織於動物

體中存在的數量及分布因年齡及個體而有所差異，於成年動物中大部分為白色脂肪組織 (Carruti and Ricquier, 1992)。

(一) 白色脂肪組織

依據實驗的發現，許多物種出生前即已形成白色脂肪組織，並於性成熟後仍有能力產生新的脂肪細胞 (Gregoire et al., 1998)。動物初生之時，白色脂肪組織的含量極少，但隨著年齡的增長，則會慢慢的增加 (Rangwala and Lazar, 2000)。白色脂肪組織為能量的儲存場所，主要分布於動物的腹部、臀部、大腿及內臟 (Casteilla et al. 2001)。在營養充足的環境下，脂肪組織會將能量以三酸甘油酯形式儲存；當動物體飢餓、缺乏養分時，白色脂肪組織內儲存的三酸甘油酯會進行脂解作用 (lipolysis)，提供動物體所缺乏的能量 (Darlington et al., 1998)。

(二) 棕色脂肪組織

棕色脂肪組織因佈滿血管呈現棕色而得名，分布範圍有限，僅在肩胛間、頸背部、腋窩部及腎周圍 (Casteilla et al. 2001)。在小型哺乳類及冬眠動物中，棕色脂肪組織具重要的溫度調節功能，為主要的熱量來源 (Cannon and Nedergaard, 2004)。人類出生前雖具有棕色脂肪組織，成長過程中則會逐漸變為具儲存能量功能的白色脂肪組織，成年階段僅有極少數的棕色脂肪組織殘留且散佈於白色脂肪組織中

(Carruti and Ricquier, 1992)。棕色脂肪組織與白色脂肪組織具相反的功能，白色脂肪組織累積能量，而棕色脂肪組織消耗能量，具熱生成的作用(Rosen et al., 2000)。熱的產生是透過活化非偶合蛋白-1(uncoupling protein 1; UCP1)，將脂肪酸轉換為熱的形式 (Darlington et al., 1998)，UCP1 只存在於棕色脂肪組織中，為一種粒線體蛋白質，可調控動物體內熱的生成及能量的平衡 (Ricquier and Bouillaud, 2000)。在生理上，棕色脂肪組織可作為禦寒之用，以維持冬眠動物的體溫，而小型哺乳類或剛出生的嬰兒亦使用此方法維持體溫 (Cannon and Nedergaard, 2004)。

五、 脂肪細胞的研究

脂肪組織中主要的細胞組成包括內皮細胞(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) (Hauner, 2004)。脂肪組織的大小取決於脂肪細胞的數目與體積 (Shepherd et al., 1993 ; Mersmann, 2002)。脂肪組織的增加受增生性生長 (hyperplastic growth)的影響，主要為前脂肪細胞進行有絲分裂，造成細胞數目增加；同樣的，脂肪細胞的肥厚性生長 (hypertrophic growth)亦影響脂肪組織的大小。前脂肪細胞受到適當刺激後可分化為脂肪細胞，分化成熟的脂肪細胞具脂質堆積的能力，脂質的堆積將造成脂肪細胞體積的增加。脂肪細胞的研究模式，分為動物體內研究 (in

vivo)與體外細胞培養 (in vitro)：

1. 體內模式

體內試驗即以動物體當實驗模式，給予受測物後觀察受測物對脂肪組織的影響，因動物體器官構造與人體相當類似，因此使用實驗性動物的研究較體外試驗更能代表人體的生理。但生物體為一複雜的反應器，細胞表現受各種因子及其各個組織的交互作用所影響，動物體內生理環境之變化無法單純的探究個別受測物對目標細胞之影響機制，因此體內試驗通常用於探討受測物對動物體的整體影響。

2. 體外模式

體外細胞培養為模擬體內生理環境，使用培養基提供細胞生長所需養分，使培養中的細胞不受生物體內複雜環境的影響，可單純的研究細胞的生理活性。體外培養的細胞分為初代細胞及細胞株，從生物體組織中直接分離出細胞培養於體外環境稱為初代細胞，再予以處理並進行細胞的機制探討。雖然來自動物體的初代細胞與細胞株比較時較能反映出體內環境，但是從生物體分離初代細胞的程序較細胞株培養繁複，且初代細胞活力依動物體年齡而逐漸下降，使實驗結果的闡釋更加困難 (Toth and Tchernof, 2000)。其它研究亦指出，來自年輕動物的前脂肪細胞經過適當處理近乎 100 % 會分化，但分化能力會隨著動物體年齡的增加而逐漸下降 (Gregoire et al., 1998)；細胞株通常是

腫瘤細胞 (tumor cell)或是正常細胞經過腫瘤細胞融合的不死化 (immortalized)細胞，因經過特殊處理與馴化，可容易的分株製備與持續的培養。前脂肪細胞株與初代前脂肪細胞在型態上皆相似於纖維母細胞，且於適當處理皆可誘發分化為脂肪細胞並累積脂肪 (Gregoire et al., 1998)，但脂肪細胞株能長期在人為的環境下生存繁衍，本研究需要大量的脂肪細胞為實驗對象，因此將以 3T3-L1 前脂肪細胞株進行大量的擴增培養與分化。

(一) 3T3-L1 前脂肪細胞株

為了研究上的方便，許多前脂肪細胞被挑選出來 (Rosen et al., 2000)，例如:3T3-L1 (Green and Kehinde, 1974)、3T3-F442A (Green and Kehinde, 1976)、TA1 (Chapman et al., 1984)、OB17 (Negrel et al., 1978)、1246 (Darmon et al.,1981)、ST13 (Hiragun et al., 1980)與 PFC6 (Ailhaud, 1982)。3T3-L1 前脂肪細胞是從老鼠的初代胚胎細胞中，分離出具有持續分裂能力的 3T3 纖維母細胞，經過單株劃分出具有分化為脂肪細胞能力的前脂肪細胞株 (Green and Kehinde, 1974)。在 3T3-L1 前脂肪細胞培養過程中發現，細胞於分裂、增生的階段時，細胞型態會隨著細胞質的延長 (cytoplasmic prolongation)而變的細長，外型與纖維母細胞相似 (O'Shea Alvarez, 1991)。除了原始細胞外 (primary cell)，3T3-L1 細胞是目前最常用來研究脂肪細胞發展與脂肪

代謝的細胞株之一 (Gregoire et al., 1998)。

(二) 前脂肪細胞的分化

欲從 3T3-L1 前脂肪細胞分化為具堆積油脂功能的脂肪細胞，需要添加分化試劑來促進脂質生成相關基因的表現。當細胞於培養皿長滿後，添加外源性分化試劑包括 dexamethasone (DEX)、3-methyl-1-isobutylxanthine (IBMX)與胰島素 (insulin)可誘導其分化 (Rubin et al., 1978)。DEX 為 glucocorticoid agonist，與 glucocorticoid receptor 結合後可活化細胞內轉錄因子 CEBP (CCAAT/enhancer-binding protein)/ β 的活性，調節細胞分化 (Shugart and Umek, 1997)；IBMX 為環化腺苷酸二酯酶 (phosphodiesterase)抑制劑，可提高細胞內 cAMP 濃度，進而促進脂肪細胞分化 (Hauner, 1990)；胰島素可與胰島素生長受體 (insulin-like growth factor-1 receptor)作用，進而活化相關轉錄因子以促進細胞分化 (Ntambi and Kim, 2000)與三酸甘油酯合成 (Smith et al., 1998)。前脂肪細胞分化為脂肪細胞時，會經歷生長停止期 (growth arrest)、早期的分化基因表現、分化末期及分化終止，此過程稱為脂肪新生 (adipogenesis) (Gregoire et al., 1998)。

1. 生長停止期

細胞於培養過程中會不斷的分裂，直到互相接觸而產生抑制分裂的現象 (contact inhibition) (Green and Kehinde, 1974)。此時細胞週期

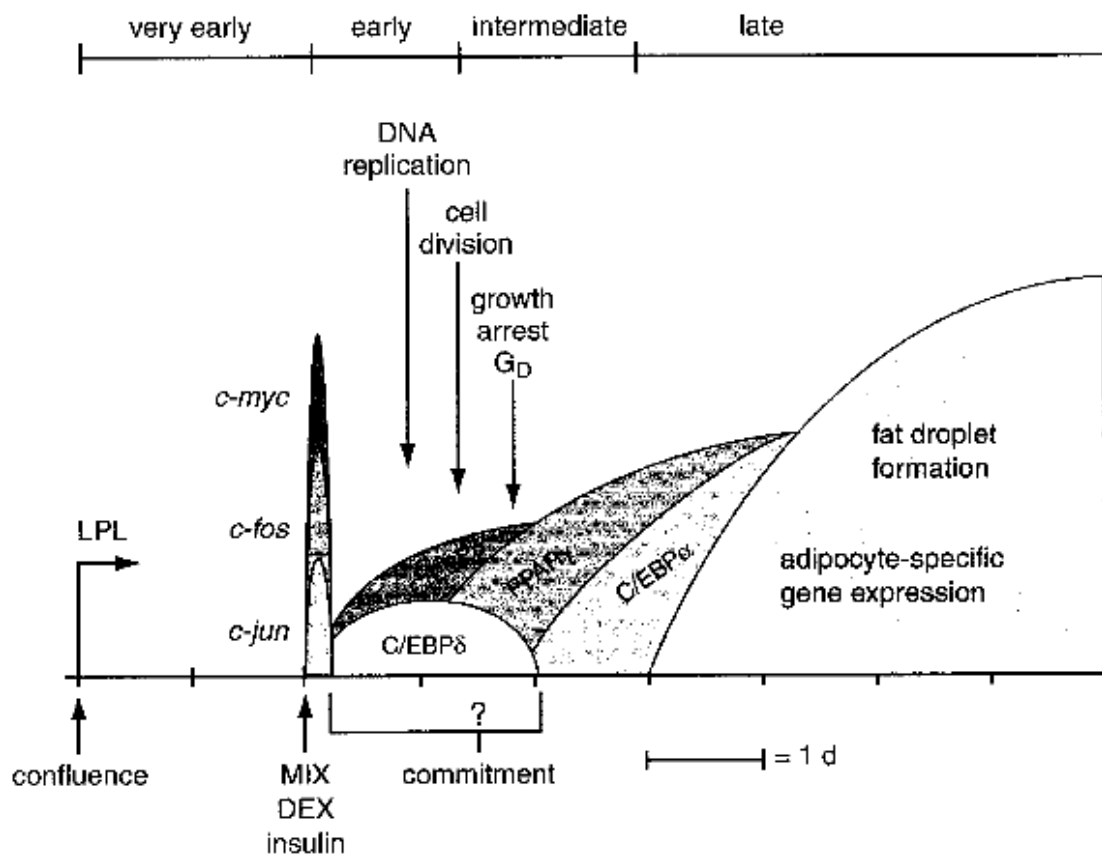
會停滯於 G0/G1，細胞停止複製和分裂，準備進入分化階段，部份基因的轉錄作用開始進行 (Dani et al., 1990)

2. 早期的分化基因表現

脂肪細胞經由分化試劑 (DEX、IBMX 與 insulin) 誘導後 1 h，c-fos、c-jun、junB、c-myc、C/EBP β 以及 C/EBP δ 等轉錄因子開始表現 (Cornelius et al., 1994)。其中 c-fos、c-jun、junB、c-myc 僅為細胞早期分裂的開端，於誘導分化後 2-6 h 停止表現；DEX 及 IBMX 分別誘導 C/EBP β 及 C/EBP δ ，此兩者轉錄因子的表現被認定為決定脂肪細胞是否分化的角色。分化試劑誘導後 48-72 h 期間主要表現脂肪生成以及脂肪分解的酵素，C/EBP β 與 C/EBP δ 將會繼續誘導下游因子 PPAR(peroxisome proliferators activated receptor) γ 與 C/EBP α 的表現 (Cornelius et al., 1994; Ntambi and Kim, 2000) (圖一)。

3. 分化末期及分化終止

當 PPAR γ 與 C/EBP α 啟動後，C/EBP β 及 C/EBP δ 就會逐漸減弱且不再影響脂肪細胞，PPAR γ 與 C/EBP α 的持續表現開始誘導脂肪細胞的特異性基因，此時細胞會分化至無法回復的程度，進入分化末期 (Wier and Scott, 1986)。此時細胞對胰島素的敏感性增加，許多脂質合成相關酵素的 mRNA、蛋白質以及酵素活性都明顯增加，如檸檬酸 ATP 裂解酶 (ATP citrate lyase)、蘋果酸酶 (malic enzyme)、乙醯輔酶



(Ntambi and Kim, 2000)

圖一、3T3-L1 前脂肪細胞分化過程。

Figure 1. Progression of 3T3-L1 preadipocyte differentiation.

A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase)、甘油-3-磷酸醯基轉移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase)、甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH)、脂肪酸合成酶 (Fatty acid synthase)、甘油醛-3-磷酸去氫酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (Paulauskis and Sul, 1988 ; Weiner et al., 1991)。於分化末期亦合成及分泌特殊之產物，包括脂肪酸結合蛋白 (adipose fatty acid binding protein, A-FABP) (Bernloir et al., 1984)、脂肪相關蛋白 (lipid droplet-associated protein, ADRP)、脂肪表面蛋白 perilipin (Greenberg et al., 1993)、leptin (MacDougald et al., 1995)及 HSL (Rosen and Spiegelman, 2000)。在分化的最後，型態原本類似纖維母細胞的前脂肪細胞，會隨者細胞骨架與細胞外間質的改變而變圓，並且在 actin、tubulin 減少與 collagen 增加後開始具有累積脂質的功能 (Prins and O'Rahilly, 1997)。

六、 脂肪細胞的脂質代謝

已分化完全的脂肪細胞會進行脂質的生成作用 (lipogenesis)與脂質的分解作用 (lipolysis)，脂肪堆積程度決定於兩者間的平衡。

(一) 脂質合成

生物體內過多的能量可以脂肪形式儲存於脂肪組織中，此為脂質生成作用。儲存的脂質可由各種非脂肪物質轉換獲得，如飲食中所獲

取的碳水化合物與蛋白質。大多數哺乳類動物中，葡萄糖是脂質生成作用的主要受質 (Hanson and Ballard, 1967)。脂肪細胞中主要以三酸甘油酯 (triglyceride, TG)作為脂質的儲存形式。三酸甘油酯由一分子的丙三醇與三分子脂肪酸所構成。然而，脂肪細胞中缺乏甘油激酶 (glycerol kinase, GyK) (Reshef et al., 2003)，無法直接利用丙三醇合成三酸甘油酯；因此脂肪細胞以糖酵解作用的中間產物—二羥丙酮磷酸 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP)為前驅物，透過甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH)，利用 NADH 將 DHAP 還原，而得甘油-3-磷酸 (glycerol-3-phosphate, G3P)。甘油-3-磷酸再分別與 3 個醯基-CoA (acyl-CoA)作用接上 3 個游離脂肪酸形成三酸甘油酯 (Steinberg et al., 1961；Kozak and Jensen, 1974)。

(二) 脂肪分解

脂肪分解作用為三酸甘油酯的水解過程，經三個連續反應而完成，此反應由三種酵素所催化：三酸甘油酯脂質分解酶 (Adipose triglyceride lipase, ATGL)、荷爾蒙敏感性脂質分解酶 (Hormone-sensitive lipase, HSL) 與單酸甘油酯脂質分解酶 (monoglyceride lipase, MGL)，於此三種酵素依序作用之下將三酸甘油酯分解為丙三醇 (glycerol)與脂肪酸 (fatty acids, FAs) (Arner, 2005)。首先 ATGL 與 HSL 初步分解三酸甘油酯形成雙酸甘油酯 (diglycerides)

與脂肪酸，HSL 又對雙酸甘油酯作用產生單酸甘油酯 (monoglycerides)與脂肪酸，最後 MGL 將單酸甘油酯分解成丙三醇與脂肪酸。

脂肪細胞中三酸甘油酯的分解，牽涉於脂肪分解酶、細胞膜上的運輸、脂肪酸鍵結蛋白與油滴相關聯的蛋白質。如脂肪細胞內之油滴表面存在著一結構蛋白 perilipin (Blanchette-Mackie et al., 1995 ; Greenberg et al., 1991)。平時 perilipin 可阻礙脂肪分解酶分解細胞中的油滴 (Brasaemle et al., 2000)，當細胞內的 cAMP 依賴性蛋白質激酶 A (protein kinase A, PKA)受到活化後，會促使 perilipin 與 HSL 的磷酸化作用，磷酸化之 perilipin 會失去保護油滴的功能，磷酸化之 HSL 移位 (translocation)至失去 perilipin 保護的油滴上並進行三酸甘油酯的分解 (Clifford et al.,2000 ; Sztalryd et al., 2003)。脂解作用產生之丙三醇在脂肪組織中不易被利用，因此會釋放至血漿中，被含有高甘油激酶活性的組織所利用，如肝臟、腎臟等，循糖代謝途徑轉換為 ATP 或是循糖質新生途徑轉為葡萄糖 (Robinson and Newsholme, 1969 ; Wang et al., 2008)。

脂肪分解作用所產生的游離脂肪酸，可在脂肪組織中被醯基 CoA 合成酶 (acyl-CoA synthase)再次催化轉變為醯基-CoA，與甘油-3-磷酸再酯化成三酸甘油酯；若脂肪分解速率大於再酯化速率，游離脂肪酸

會被釋放至血漿中，與白蛋白 (albumin) 結合後輸送至其他組織，進行脂肪酸氧化產生能量 (Robinson and Newsholme, 1969 ; Wang et al., 2008)。

在脂解酶的活性探討中，雖然 HSL 具分解三酸甘油酯與雙酸甘油酯的活性，但是它對於雙酸甘油酯的分解作用遠高於三酸甘油酯達 10 倍左右 (Fredrikson et al., 1981)。也就是說，ATGL 仍然控制著大部分三酸甘油酯的分解作用，為細胞中分解三酸甘油酯的關鍵性酵素，分解三酸甘油酯形成雙酸甘油酯以促使 HSL 分解雙酸甘油酯，若提高 ATGL 的表現量則會促進脂肪酸與丙三醇的釋放 (Zimmermann et al., 2004)。有文獻指出，於大鼠的白色脂肪組織中包含許多脂解酶，其中 ATGL 與 HSL 就負責將近 95% 三酸甘油酯的脂解作用 (Schweiger et al., 2006)，MGL 則鮮少學者探討其機制，因此本研究的機制探討中著重於 ATGL 與 HSL 蛋白質表現量之影響，以初步的評估大豆蛋白水解物影響細胞脂解作用的可能機制。

七、 脂肪分解酶的特性與調控機制

(一) 荷爾蒙敏感性脂解酶 (HSL)

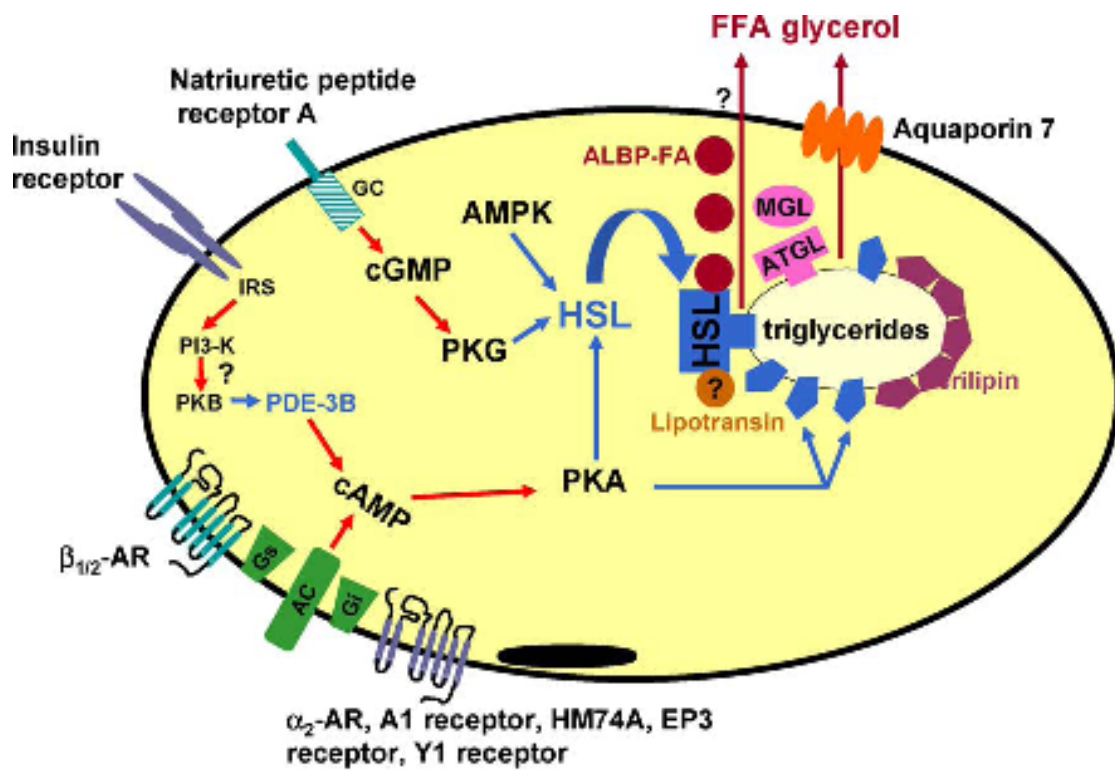
在早期 HSL 就已被認為是白色脂肪組織中脂肪分解最為重要的酵素 (Hollenberg et al 1961 ; Stralfors et al., 1984)。HSL 除了水解三酸甘油酯外，也可水解膽固醇酯 (cholesteryl ester)、維生素 A 醇視紫酯

(retinyl ester)、類固醇酯 (steroid ester)與 p-硝基酯 (p-nitrophenyl ester) (Holm, 2003)。多項實驗已證明 HSL 於脂肪細胞的功能，3T3-F442A 脂肪細胞中過量表現 HSL，會使細胞無法累積三酸甘油酯 (Sztalryd et al., 1995)；另外，HSL 基因剔除小鼠分離的脂肪細胞研究中，雖仍有基礎的脂質分解作用，但荷爾蒙所刺激的脂解作用效果則明顯的被抑制 (Wang et al., 2001)。HSL 可受多種荷爾蒙活化，如兒茶酚胺類、促腎上腺皮質素 (ACTH)及升糖素 (glucagon)皆可活化 HSL 促進脂解作用 (Vaughan et al., 1964)。其調控路徑為，荷爾蒙與細胞表面上的 β -腎上腺素受體結合，再經由細胞內刺激型 G 蛋白 (guanine nucleotide-binding regulatory proteins, G protein)活化腺苷酸環化酶 (adenylate cyclase)，活化後的腺苷酸環化酶則催化 ATP 產生 cAMP，使細胞中 cAMP 濃度提升，最後活化 PKA，PKA 的活化可使 HSL 磷酸化並往脂肪油滴表面移動 (translocation) (Holm, 2003; Clifford et al., 2000)。相反的，胰島素具有抗荷爾蒙刺激脂肪分解的能力，經由活化磷酸二酯酶 3B (Phosphodiesterase 3B)進一步降低細胞內 cAMP 的濃度 (Shakur et al., 2001)，進而抑制 HSL 的磷酸化作用，降低脂解作用的活性。除了 cAMP/PKA 的調控路徑外，MAPK/ERK 路徑亦可磷酸化 HSL，添加 MAPK 的抑制劑會造成荷爾蒙所刺激的脂解作用減少約 30% (Greenberg et al., 2001)。除了荷爾蒙外，生物體內自行合成

的胜肽也能活化 HSL，如 natriuretic peptide 可透過專一性的受體直接活化脂肪細胞中的 PKG (protein kinase G)，進而使 HSL 被磷酸化 (Sengenès et al., 2003) (圖二)。

(二) 三酸甘油酯脂解酶 (ATGL)

ATGL 為近年來才被學者發現的脂解酶，Zimmermann 等人 (2004) 提出 ATGL 為脂肪細胞中三酸甘油酯分解的關鍵脂解酶。HSL 基因剔除 (HSL-knock out) 的小鼠中，三酸甘油酯仍會被分解，而造成雙酸甘油酯的累積，此結果顯示出脂肪分解酵素不止 HSL 的作用而已，進而發現 ATGL (Zimmermann et al., 2004)。ATGL 不只存在於脂肪細胞，也存在心肌細胞 (Haemmerle et al, 2006)、第 I 型纖維骨骼肌 (Jacken et al, 2008)、副睪組織、巨噬細胞、肝臟組織 (Reid et al, 2008) 以及其他類型的細胞 (Smirnova et al, 2006)。相較於其他組織，ATGL 在脂肪組織中有很高的表現量，在脂肪細胞分化期間，其 ATGL 表現量會顯著的提升 (Zimmermann et al, 2004; Villena et al, 2004; Kershaw et al, 2006; Kim et al, 2006)。於脂肪細胞中的 ATGL 能分解三酸甘油酯產生雙酸甘油酯與游離脂肪酸，其對三酸甘油酯作用的活性高於雙酸甘油酯將近 10 倍，由此可知 ATGL 對三酸甘油酯具高度的分解作用，如果抑制了 ATGL 活性則會嚴重抑制細胞中的脂解作用 (Zimmermann et al., 2004; Smirnova et al., 2006)。此外，ATGL 具有磷脂酶與醯基轉



(Langin, 2006)

圖二、人類脂肪細胞中脂解作用的調控機制。

Figure 2. Control of Human adipocyte lipolysis.

移酶的活性，但對於其他脂質受質，如膽固醇酯與視酯並無水解的活性 (Jenkins et al, 2004)。

ATGL 調控機制的研究中，Lass 等人 (2006)提出一種活性蛋白 (coactivators)： α/β hydrolase domain 288 containing protein 5, ABHD5；也被稱為 comparative gene 289 identification-58 (CGI-58)會刺激 ATGL 的活性。在 CGI-58 存在下，大鼠的 ATGL 提升 20 倍以上的活性，人類的 ATGL 在人類的 CGI-58 存在下也會提昇將近 5 倍的活性 (Lass et al, 2006)。此活性蛋白並不是偶然發現的，因許多作用於油滴上的 TG 分解酶，如脂蛋白分解酶與胰脂酶都具有活性蛋白 (apolipoprotein-CII 與 co-lipase)，然而 CGI-58 對 ATGL 的正確調控機制至今仍未明瞭 (Zimmermann et al., 2009)。

目前已有許多研究透過偵測丙三醇釋放量來探討機能性成分或物質的添加對促進脂肪細胞脂解作用的影響 (Harmon and Harp, 2001；Juan et al., 2004；Park et al., 2004；He et al., 2006；Kovsan et al., 2007；Szkudelska et al., 2008；Lee et al., 2008)。然而大豆蛋白水解物運用於此方面的文獻則相當有限，因此本研究利用 3T3-L1 脂肪細胞培養液中的丙三醇釋放量為指標，探討分離大豆蛋白水解物的添加對細胞脂解作用的影響，並以細胞中的三酸甘油酯殘留量作進一步的確認；當丙三醇釋放量高，相對於較低的三酸甘油酯殘留量，可說明細

胞質中的三酸甘油酯確實被分解成丙三醇與游離脂肪酸，並釋放到細胞外。此外，利用膜分離系統從蛋白質水解物中篩選出不同分子量的濃縮物與濾液，以探討這些不同片段的區分物對脂肪細胞脂解作用之影響，並初步評估大豆蛋白水解物影響細胞脂解作用的可能機制。

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 與 Neutrase[®] 購自 Novo Industry A/S (Copenhagen, Denmark)。

(一) 水解率與凱氏氮測定

Leu-Gly、o-phthaldialdehyde (OPA)、sodium dodecyl sulphate (SDS) 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)； β -mercaptoethanol、Trichloroacetic acid (TCA) 購自 Merck (Darmstadt, Germany)；Sodium tetraborate 購自和光純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)；Boric acid 購自 Panreac Quimica Sa (Barcelona, Spain)；消化錠購自台灣今日儀器股份有限公司 (Taipei, Taiwan)。

OPA 溶液配製：

Solution A：3.184 g sodium tetraborate 溶於去離子水中並定量至
100 mL

Solution B：20 g sodium dodecyl sulphate (SDS) 以去離子水定量至
100 mL

Solution C：20 mg OPA 粉末溶於 0.5mL 甲醇中

Solution D：50 μ L β -mercaptoethanol

OPA 溶液組成：12.5mL Solution A + 1.25 mL Solution B + Solution

C + Solution D 定量至 25mL 並儲存於棕色瓶中。

(二) 膜反應系統

捲式膜 (Polyethersulfone spiral-wound membrane)，分子量限值 (molecular weight cutoff, MWCO) 分別為 30、10、1 kDa (kilo daltons) 與 300 Da 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)。

(三) 細胞培養

本實驗所採用 3T3-L1 前脂肪細胞株購自食品工業研究所 (Hsinchu, Taiwan)；胎牛血清 (Charcoal/Dextran treated fetal bovine serum, Lot : 015428) 購自 Biological Industries (Kibbutz, Israel)；Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-0) 購自 Gibco (New York, USA)；Gentamicin sulfate、dexamethasone (DEX)、acetic acid、isobutyl-methylxanthine (IBMX)、D-(+)-glucose、dimethyl sulphoxide、insulin、ethylenediaminetetraacetic acid、potassium chloride、potassium phosphate monobasic、sodium bicarbonate、sodium phosphate、HEPES 均購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。

(四) Oil-red O 染色

染劑 Oil-red O、Isopropanol 與 37 % formaldehyde 購自 Sigma (St.

Louis, MO, USA)。

(五) 丙三醇釋放量與三酸甘油酯含量測定

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

(六) 蛋白質定量分析

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

(七) 細胞毒殺試驗

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 購自 Invitrogen (OR, USA)；Dimethyl sulfoxide minimum (DMSO) 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。

(八) 模擬腸胃道消化試驗

Hydrochloric Acid 購自 聯工化學製藥 (Hsinchu, Taiwan)；pepsin、pancreatin、potassium chloride 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。

(九) 轉錄因子蛋白質表現量分析

Ponceau S、Glycin、Tween-20、Sodium *di*-hydrogen phosphate phosphate 1-hydrate 購自 Panreac Quimca Sa (Barcelona, Spain)；DTT、Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride (Tris-HCl)、Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) 購自 GERBU(Gaiberrg, Germany)；Ammoniumperoxodisulfate (APS)、Acryamide-bis Fertiglosung 40% 購自 Merck (Darmstadt, Germany)；Sodium dodecyl sulfate、Sodium tetraborate、Sodium Chloride、Sodium phosphate dibasic

購自 Sigma (St. Louis, MO, USA) ; Bronophenol blue 購自 Koch-Light Limited (Suffolk, England) ; N,N,N,N,-Tetramethylethylenediamine 購自 AlfaAesar (MA, USA) ; 一級抗體 ATGL antibody、HSL antibody、Phospho-HSL(Ser660) antibody、 β -actin antibody 與二級抗體 Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody 購自 Cell Signaling Technology (Boston, USA)。

(十) 螢光免疫染色法

Bovine serum albumin(BSA)購自 Amresco (OH, USA) ; HSL antibody 購自 Cell Signaling Technology (Boston, USA) ; 二級螢光抗體 Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-rabbit IgG antibody 購自 Invitrogen (OR, USA) ; Triton X-100 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。

二、實驗方法

(一) 分離大豆蛋白水解物的製備

表一為本研究所使用蛋白酶最適作用溫度與 pH 值。配置 2.5 % (w/v) ISP 依不同酵素特性調整反應溫度與 pH 值，攪拌 20 min 後加入酵素，酵素與受質比例為 1:100 (w/w of ISP)。加入酵素前進行 0 h 樣品取樣，加入酵素後開始計時；取樣時間為 0、1、2、4、6、8 h，所得樣品以沸水浴加熱 15 min 使酵素失活，冷卻後取一部份樣品進行水解率分析，其餘樣品經 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。

(二) 水解率測定

酵素對蛋白質的水解程度可經由水解率評估，蛋白質水解率以 o-phthaldialdehyde (OPA) 分光光度法測量 (Church et al., 1983)；作用原理為在鹼性及還原劑 (β -Mercaptoethanol) 存在的環境下，OPA 會與游離胺基酸或胜肽上的 α -胺基反應，形成在 340 nm 有吸光值的螢光物質。

測定時取適當稀釋後的水解液樣品 50 μ L，加入 1 mL 現配的 OPA 試劑均勻混合後，於室溫下避光反應 2 min，立即以波長 340 nm 測定其吸光值。另外利用不同濃度的雙肽 (Leu-Gly) 標準物質得到之標準檢量線換算 α -胺基態氮或胜肽鍵 (peptide bonds) 數。水解率

表一、蛋白酶特性。

Table 1. General characteristics of proteases used in this study.

Proteases	Sources	Type of protease	Reaction conditions	Preperential specificity
Flavourzyme type A	Fungi (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Endoprotease + exopeptidase	50°C , pH 7.0	Very broad specificity
Neutrase	<i>Bacillus subtilis</i>	Endoprotease	45°C , pH 6.0	Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr- 7-amino-4-methyl-coumarin

算公式如下：

$$DH (\%) = (H_s/H_{total}) \times 100 \%$$

DH 表示水解率 (degree of hydrolysis, DH)， H_s 代表水解物或樣品中胜肽斷鍵數， H_{total} 為等量蛋白質中胜肽總鍵數，即 ISP 克數乘以 ISP 轉換係數 7.8 meq α -胺基/g ISP。

(三) 產量測定

使用凱氏氮分析法 (Mico-kjeldahl method) 測定 ISPH 的產量 (Yield)，並扣除未水解的 ISP 中起始非蛋白態氮 (nonprotein nitrogen ; NPN) 加以校正 (AOCS, 1989)。取 2 mL ISPH 與 4 mL 15 % 三氯醋酸溶液 (trichloroacetic acid ; TCA) 混合過濾後，所得濾液加入 10 mL 濃硫酸與消化錠 (含 5 g K_2SO_4 及 5 mg Se) 於 400 °C 分解爐上加熱至少 2 h，等待 ISPH 與濃硫酸完全反應為硫酸胺後取出，靜置冷卻後添加 75 mL 蒸餾水。加入 40 % NaOH，放入半自動快速蛋白質蒸餾裝置 (KjeltecTM 2100, FOSS, Sweden)，以 4 % H_3BO_3 (Boric acid) 收集游離胺，最後使用 0.1 N HCl 滴定，根據酸的消耗量計算出 ISPH 的產量即 TCA 可溶性氮 (TCA-soluble nitrogen)。其計算公式如下：

$$TCA\text{-soluble nitrogen} = (V_1 - V_2) \times C \times f \times 14 / \text{Sample (g)}$$

V_1 為 ISPH 所消耗 0.1 N HCl 的毫升數， V_2 為 ISP 所消耗 0.1 N HCl

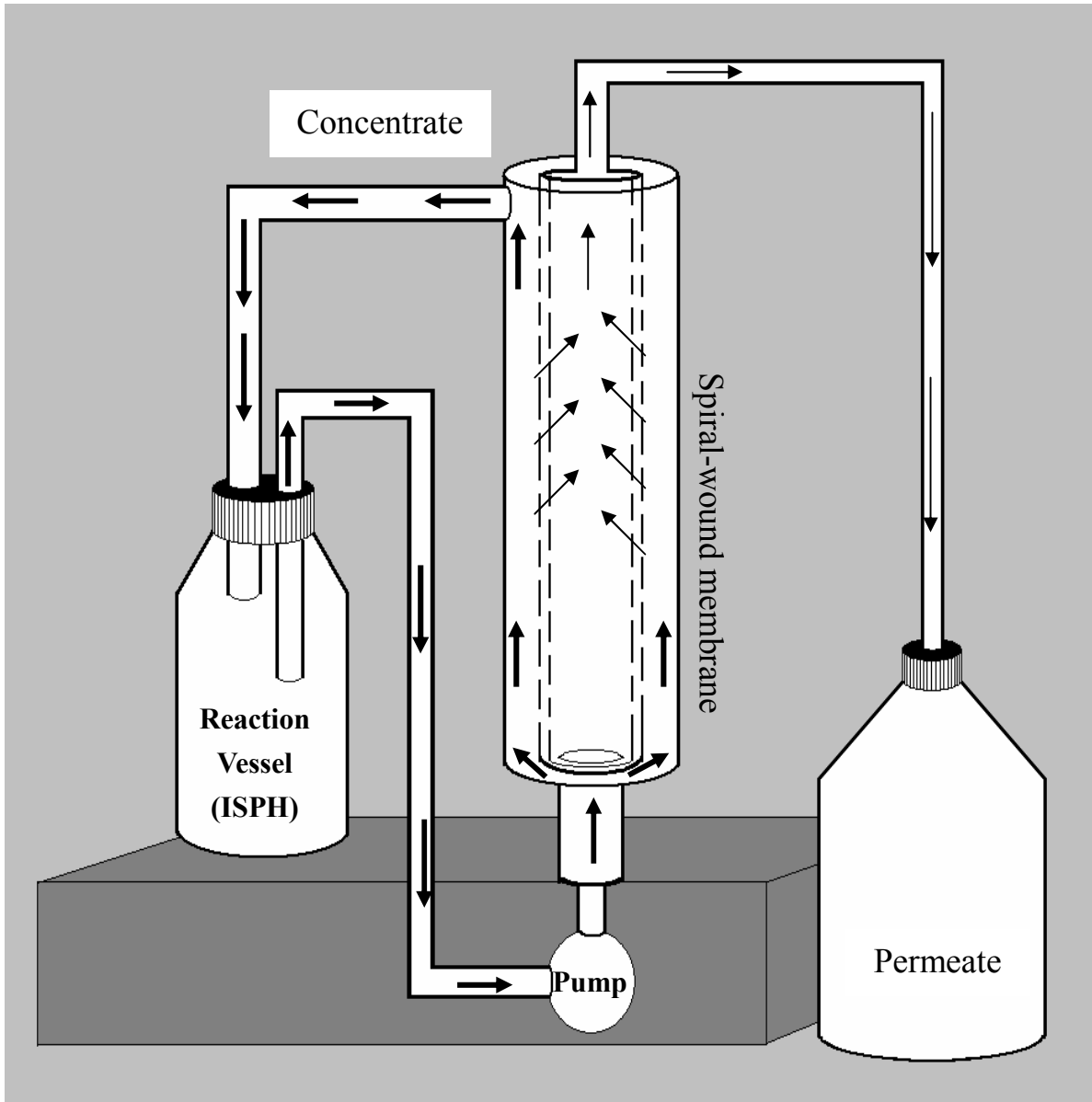
的毫升數，C 為 0.1 N (HCl 當量濃度)，f 為 HCl 之力價，14 是氮的分子量 (g/mol)。

(四) 濾膜的區分

膜反應系統如圖三所示，使用不同分子量限值 (molecular weight cutoff; MWCO) 之濾膜進行水解物的區分。將水解液之離心上清液置於反應槽中，經由幫浦輸送至濾膜內，分子量小於濾膜的水解物，會通過濾膜收集為濾液 (permeate)；無法通過濾膜的大分子水解物，則回到反應槽中持續循環，直到反應槽中水解液體積降為原來的 1/10，再加入等體積 ddH₂O 濾析 (diafiltration) 兩次後，收集為分子量小於濾膜的濃縮物 (concentrate)。實驗方式參考 Chiang 等人 (2006) 的篩選方法並作些微修改，首先先將水解物上清液以 30 kDa MWCO 濾膜處理後，無法通過 30 kDa MWCO 的水解物稱為 30 kDa concentrate；接著將通過濾膜小於 30 kDa 的濾液以 10 kDa MWCO 濾膜處理，收集到大於 10 kDa 的水解物稱為 10 kDa concentrate，將 10 kDa 的濾液以 1 kDa MWCO 濾膜處理，所得到的濃縮物稱為 1 kDa concentrate，通過 1 kDa MWCO 的濾液以 300 Da MWCO 濾膜處理得到 300 Da concentrate 與通過濾膜的 300 Da permeate。

(五) 分子量分布的檢測

本實驗參考 Chiang 等人 (1999)，使用 SuperdexTM peptide



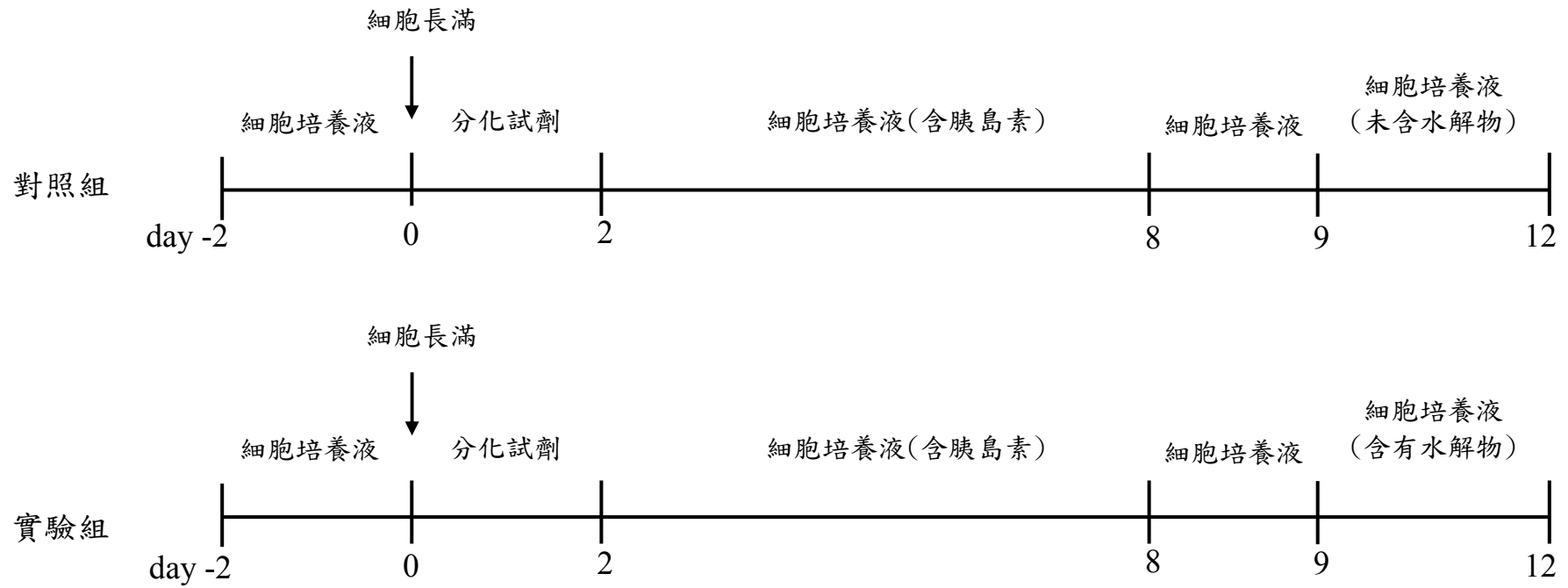
圖三、膜反應系統。

Figure 3. Membrane reactor system.

10/300GL column (GH Healthcare, Sweden), 以 HPLC 方式探討經由濾膜區分後的區分物其分子量分布情形。適當稀釋的樣品經由 0.2 μm filter 過濾後, 以 0.02 M phosphate, 0.25 M NaCl pH 7.2 為移動相, 在流速 0.5 ml/min 偵測波長 214 nm 的吸光值, 測定其分子量分布。標準品為: Cytochrome C (12,500 Da)、Aprotinin (6,500 Da)、Gastrin I (2,126 Da)、Substance P (1,329.8 Da)、Glycine*3 (189 Da)。

(六) 細胞培養

本實驗使用第 11 代 3T3-L1 前脂肪細胞 (peradipocytes), 依不同實驗需求個別注入 1×10^5 、 4×10^4 、 1×10^4 cell/well 於 10 cm、6 孔、24 孔培養盤中; 以含有 10 % FBS (Charcoal/Dextran treated) 之 DMEM 為培養液, 培養於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的環境中, 每兩天更換新鮮培養液。分化方式參考 Kim 等人 (2006) 的方法, 實驗架構如圖四, 於細胞長滿後添加外源性分化劑包括 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin、0.1 mM DEX 和 0.5 mM IBMX, 以促進細胞分化 (分化第 0 天)。分化後第 2 天更換含有 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin 的培養液, 爾後每 2 天更換含有 insulin 培養液直到第 8 天, 第 8 天更換不含 insulin 培養液, 第 9 天即更換含有 ISPH 的培養液, ISPH 需先以 0.22 μm filter 進行過濾後隨著培養基添加。於第 12 天收集培養液檢測細胞外丙三醇釋放量。另外以 PBS (0.14 M NaCl, 5.36 mM KCl, 0.35 mM Na_2HPO_4 , 0.44 mM KH_2PO_4 , 4.17 mM



圖四、3T3-L1 脂肪細胞分化階段之實驗架構。

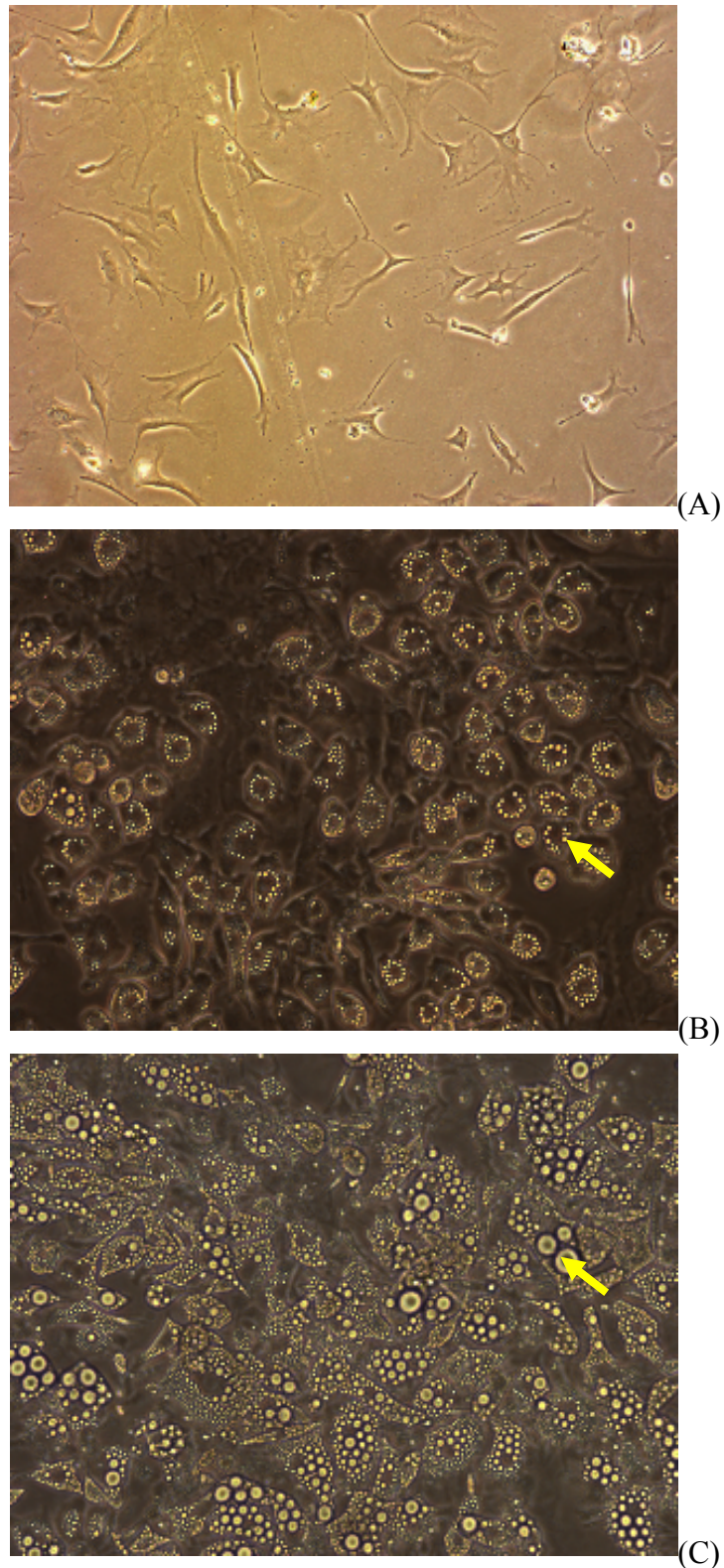
Figure 4. Experimental design for the differentiation of 3T3-L1 adipocytes.

NaHCO₃，pH7.2)清洗細胞，浸泡 10 %福馬林保存於 4 °C 待 Oil red O 染色測定脂肪堆積量；或是使用 Lysis buffer (5 M NaCl，1 M pH 8.0 Tris，0.5 M EDTA，20 % SDS，NP-40，6.03 mM C₂₄H₃₉NaO₄) 將細胞破碎後，以 13,000×g 離心 10 min，取其上清液檢測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五，(A)為前驅脂肪細胞，細胞型態成紡錘狀。細胞長滿後添加外源性分化試劑培養至第 4 天，圖五(B)可知第 4 天細胞已分化成熟並開始堆積油脂，細胞中所含的脂肪顆粒為圖五(B)與(C)黃色箭頭所指之亮點，圖五(C)第 8 天油脂的累積達到一定程度。此細胞培養結果與 Ntambi and Kim (2000) 相符合，分化 48 至 72 h 期間 3T3-L1 脂肪細胞已分化成熟，其分化轉錄因子 PPAR γ 與 C/EBP α 開始表現，並進行脂肪的生成。

(七) Oil red O 染色

依據 Green 與 Kehinde (1975) 染色方式，於 24 孔盤中培養 12 天的已分化脂肪細胞，移除細胞的培養液後，將細胞以 PBS 清洗三次，加入 10 %福馬林於 4 °C 下固定細胞 2 h 至隔夜，之後移除福馬林並用 ddH₂O 清洗細胞，加入反應溶液避光染色 15 min，之後移除反應溶液並用 ddH₂O 清洗數次，加入 0.5 ml/well 異丙醇退染 15 min，即以波長 540 nm 檢測其吸光值。脂肪細胞三酸甘油酯堆積量與 Oil red O 染



圖五、3T3-L1 前脂肪細胞(A)於培養第 4 天(B)及第 8 天(C)之分化構形 (光學顯微鏡放大倍率 $\times 200$)。

Figure 5. Differentiation profile of 3T3-L1 preadipocytes (A) with 4 days (B) and 8 days (C) incubation time in light microscope with $\times 200$ magnification.

色後 540 nm 吸光值呈正相關 (崔, 2006), 吸光值愈高表示細胞內油脂含量愈高。儲備溶液為 Oil red O 粉末 0.09 g/18 ml 的異丙醇, 並使用 0.22 μm filter 過濾雜質。染色前儲備溶液與 ddH₂O 以 3:2 比例混合成為反應溶液。

(八) 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釋放至細胞外, 丙三醇釋放量大小可評估脂解作用的程度, 本實驗使用試劑組 (GY105, Randox) 測定培養液中丙三醇濃度。將 30 μL 細胞培養液與 1 mL 檢驗試劑混合, 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 5 min, 隨即以波長 520 nm 檢測其吸光值, 換算為丙三醇釋放量 ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)。丙三醇濃度測定原理為檢驗試劑所含之甘油激酶 (glycerol kinase) 將培養液中的丙三醇轉化為甘油-3-磷酸 (glycerol-3-phosphate) 後, 甘油-3-磷酸持續被甘油-3-磷酸氧化酶 (Glycerol phosphate oxidase) 轉化為 H₂O₂ 及 DHAP (Dihydroxyacetone -phosphate), H₂O₂ 受過氧化酶 (Peroxidase) 催化後與 DCHBS (3,5-dichloro-2-hydroxybenzene sulphonic acid) 及 4-aminophenazone 作用產生 ACSB (n-(4-antipyryl)-3-chloro-5-sulphonate-p-benzoquinoneimine), ACSB 於 520 nm 下具有吸光值, 吸光值越大代表細胞的丙三醇釋放量越多。

(九) 三酸甘油酯含量檢測

實驗中利用 TG 試劑組 (TR213, Randox) 檢測細胞中三酸甘油酯殘留量。取細胞破碎上清液 10 μ L 溶於 1 mL 檢驗試劑，37 $^{\circ}$ C 下反應 5 min，隨即以波長 500 nm 檢測其吸光值，並換算為三酸甘油酯殘留量 (μ mol/ml)。三酸甘油酯測定原理為檢驗試劑所含脂解酶(lipase)將細胞破碎液中三酸甘油酯分解為丙三醇及游離脂肪酸，丙三醇被甘油激酶轉化為甘油-3-磷酸，甘油-3-磷酸持續被甘油-3-磷酸氧化酶轉化為 H_2O_2 及 DHAP， H_2O_2 受過氧化酶 (Peroxidase) 催化後與 4-aminophenazone 及 chlorophenol 作用後生成於 500 nm 下具吸光值的紫紅色化合物 (quinoneimine)，吸光值越小代表細胞中三酸甘油酯殘留量越低。

(十) 蛋白質定量分析

本實驗利用 BCA kit 檢測細胞中蛋白質濃度。先將 BCA 蛋白質分析試劑 A 與 B 以 50:1 的比例混合成反應試劑，將反應試劑以每 well 200 μ L 加入 96 孔盤中，再各別加入蛋白質標準品 (5-2000 μ g/ml bovine serum albumin, BSA) 或細胞破碎上清液 10 μ L，與反應試劑均勻混合，37 $^{\circ}$ C 下作用 30 min 後冷卻至室溫，使用 ELISA reader 以波長 562 nm 檢測其吸光值。而 BSA 濃度所得的標準曲線即可計算出細胞中的蛋白質濃度 (μ g/ml)，做為計算細胞中三酸甘油酯殘留量之基準以及西方轉漬法中細胞內總蛋白質定量。

(十一) MTT 細胞毒殺試驗

MTT 為一種常見於分析細胞增生 (cell proliferation)、存活率 (percent of viable cells) 和細胞毒性 (cytotoxicity) 的分析方法。其原理是利用檢測細胞內粒線體的琥珀酸去氫酶 (succinate-tetrazolium reductase) 活性測定細胞的生長狀態，進而得知相對的細胞比例。只有正常存活的細胞可將 MTT 代謝成不溶性的藍色結晶體 formazan。當細胞中粒線體活性越高，代謝 MTT 能力越強，因此 formazan 生成量與活細胞數目呈正比，即可作為細胞存活率的指標 (Mosmann, 1983)。

於 24 孔盤中種入前脂肪細胞 1×10^4 cells/well，分化 9 天後所得脂肪細胞其培養液中分別添加不同濃度的 ISPH，3 天後去除培養基並以 PBS 洗滌兩次，再加入 100 μ L (0.5 mg/ml PBS) MTT 繼續培養 4 h 進行反應，4 h 後去除 MTT 試劑並加入 DMSO 20 min，目的為打破細胞溶解出 formazan 結晶，並終止 MTT 反應，之後將細胞破碎液更換至 96 孔盤，使用 ELISA reader 測定 590 nm 的吸光值。

(十二) 模擬腸胃道消化試驗

參考 Wu 與 Ding (2002) 的試驗方法，將 0.1 g 水解物或其區分物粉末溶於 0.1 M KCl-HCl 緩衝溶液 (pH 2.0)，定量至 100 mL，添加 pepsin (E/S=1/25 w/w) 於 37 $^{\circ}$ C 作用 4 h 以模擬胃的環境，之後以 2 N

NaOH 調整 pH 值至中性，取部份樣品經沸水浴 15 min 使酵素失活後凍藏備用，其餘樣品再使用 pancreatin (E/S=1/25 w/w) 於 37°C 作用 4 h 以模擬腸的環境，並經沸水浴 15 min 使酵素失活，冷卻至室溫後凍藏備用。凍藏備用之水解液經回溫後離心 (10,000×g) 40 min，取上清液以 0.22 μm filter 過濾後進行細胞試驗。

(十三) 西方轉漬法 (Western Blot)

取蛋白質濃度約 10 μg 的細胞破碎液與樣品緩衝液 (58.3 mM pH6.8 Tris-HCl, 0.17 % SDS, 100.48 mM DTT, 6 % glycerol, 0.013 % bromophenol blue) 混合，於 95 °C 加熱 5 min。以 10 % SDS-PAGE 進行電泳 (Mini-PROTEIN 3 electrophoresis cell system, BioRad, USA) 將蛋白質分離。隨後以 10 mM Na₂B₄O₇ 於 35 volt/200 mA/16 h 將蛋白質轉漬於 polyvinylidene fluoride (Millipore, Inc., USA) 膜上。將膜置於 2 % skim milk/PBST (0.14 M NaCl, 0.74 mM Na₂HPO₄, 9.2 mM NaH₂PO₄, 0.1% Tween-20, pH7.4) 以 150 rpm 震盪 1 h，再以一級抗體辨識目標蛋白質，於室溫下震盪 2 h 或 4 °C 震盪至隔夜。於 PBST 中漂洗膜 3 次後，加入二級抗體在室溫下震盪 1 h。最後再以 PBST 漂洗三次後，於膜上加入反應基質 (Enhanced chemiluminescent substrate, Pierce Biotechnology, Inc., USA)，使用 X 光底片進行曝光。

(十四) 螢光免疫染色法 (Immunostaining)

實驗方式參考 He 等人 (2006) 的染色方法並作些微修改，將脂肪細胞培養至特定天數後，以 PBS (0.14 M NaCl, 2.68 mM KCl, 0.01 M Na_2HPO_4 , 1.76 mM KH_2PO_4 , pH7.4) 清洗細胞三次，加入 4 % 福馬林於室溫下固定細胞 15 min，再使用 PBS 清洗細胞三次以移除福馬林，加入預冷的甲醇於 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下 10 min，目的為加強細胞固定於培養皿上。接著直接對細胞進行螢光免疫染色，將細胞浸於 1 % BSA / PBST (PBS, 0.3 % Triton X-100) 處理 1 h 以固定細胞內蛋白質，再加入一級抗體辨識胞內目標蛋白質，於 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 靜置至隔夜。以 PBS 清洗三次後，加入二級螢光抗體於室溫靜置 1 h。最後再以 PBS 清洗三次後，於倒立式螢光顯微鏡 (IX71, Olympus, Japan) 觀察細胞染色情形。

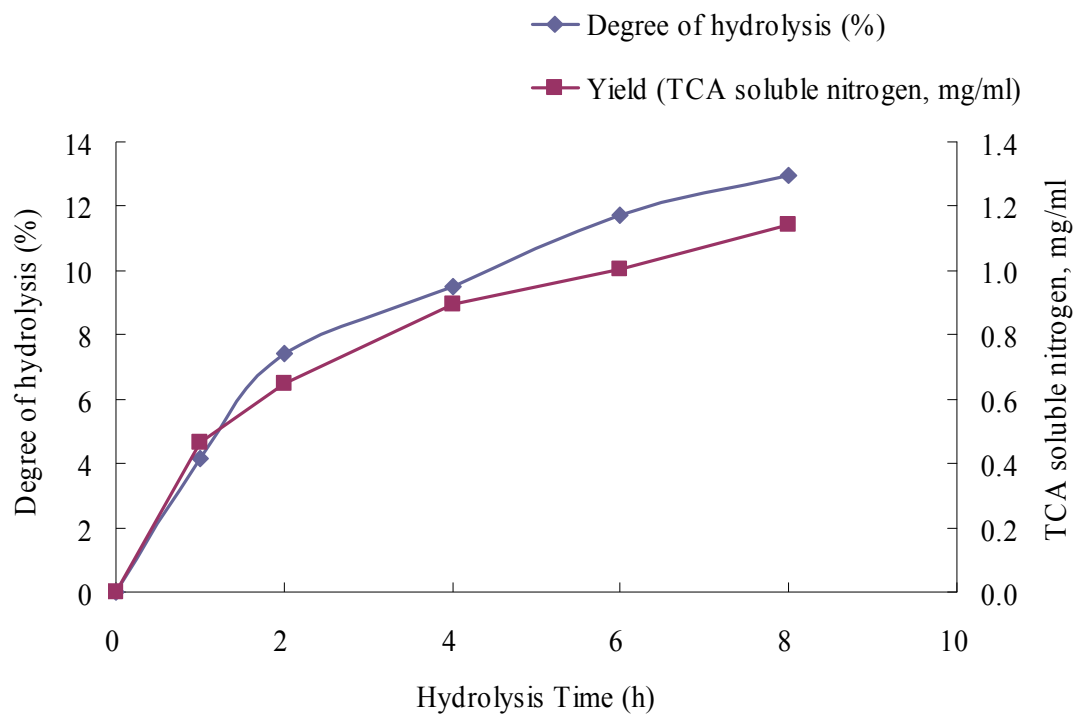
肆、結果與討論

Flavourzyme-ISP 水解物經初步測試具有促進 3T3-L1 脂肪細胞釋放丙三醇的作用 (崔, 2006), 而 Nuetrase-ISP 水解物也被證實具有抑制 3T3-L1 前脂肪細胞分化作用及抗脂質生成的活性 (曾, 2008), 因此本論文將進一步探討經由此兩種酵素水解後, 所生產的 ISP 水解物 (Isolated soy protein hydrolysate, ISPH) 與其濾膜區分物對促進 3T3-L1 脂肪細胞脂解作用之影響, 以及探討促進脂解作用的可能機制。

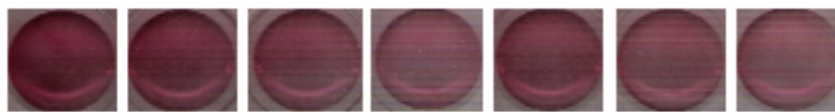
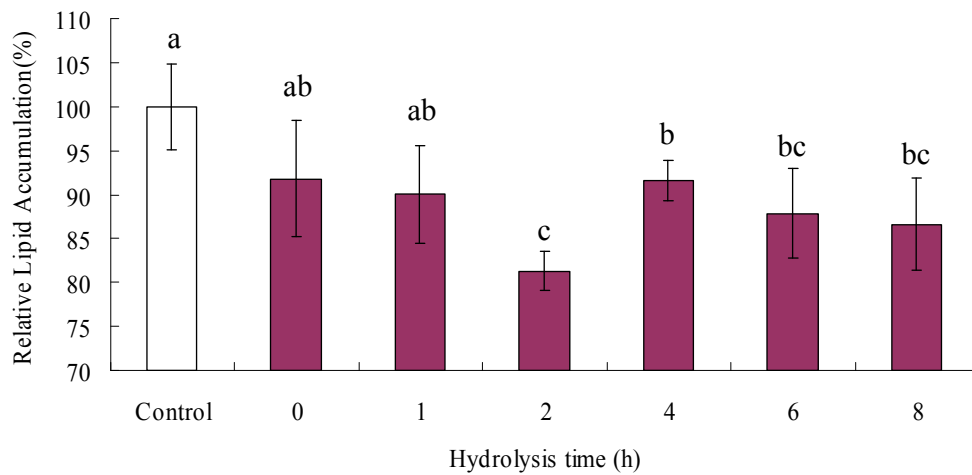
一、ISPH 的篩選

圖六為 Flavourzyme 水解 ISP 的水解時間對其水解率與產量的影響, 結果顯示, 水解率以及產量均隨著水解時間的增加而提高, 當水解時間大於 2 h 時其增加的趨勢則會逐漸平緩, 在 8 h 時其水解率為 12.95 % 以及產量為 1.14 mg N/ml; 由此可證明酵素對 ISP 具有持續的水解作用, 隨著水解時間的增加產生更多的蛋白質水解片段, 但是否水解率愈高的水解物, 即代表有較佳的促進脂解活性, 則有待進一步以脂肪細胞的脂質堆積量來評估。

圖七為不同水解時間所得的 Flavourzyme-ISP hydrolysate (FH) 對 3T3-L1 脂肪細胞脂質堆積之影響。以 400 ppm 不同水解時間 FH 分別添加於分化第九天所得的脂肪細胞中, 培養三天後以 Oil red O 染色



圖六、Flavourzyme 水解時間對分離大豆蛋白水解率及產量之影響。
 Figure 6. Effect of different hydrolysis time of isolated soy protein hydrolysates on degree of hydrolysis and yield.



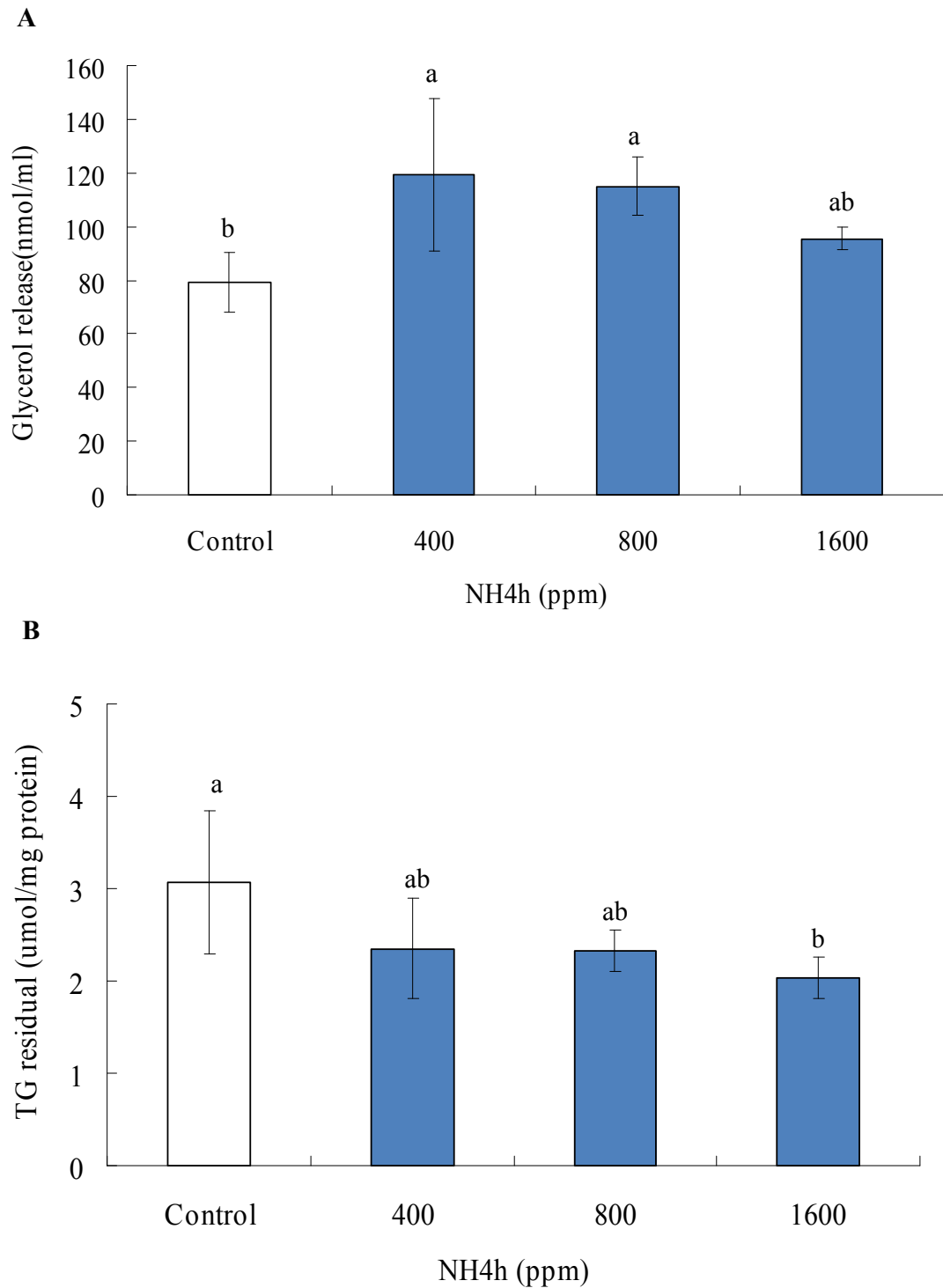
圖七、不同水解時間之 Flavourzyme-ISP 水解物對 3T3-L1 脂肪細胞相對脂肪堆積量之影響。

Figure 7. Effect of Flavourzyme-ISP hydrolysates with different hydrolysis time on relative lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

法觀察細胞中脂肪堆積的程度，將細胞染色後於 540 nm 測吸光值且與對照組比較而得相對脂肪堆積 (RLA, %), 對照組為未添加任何 FH 的脂肪細胞基本油脂累積量。結果發現添加不同水解時間的 FH 後，細胞中脂質含量與對照組比較均有下降的趨勢，其中以添加 2 h 的 FH 有最低的 RLA，較對照組下降了 18.74%。此結果與崔 (2006)的論文相符合，ISP 經 Flavourzyme 水解 2 h 所得水解物 FH2h (Flavourzyme-ISP hydrolysate at 2h)可顯著的降低 3T3-L1 脂肪細胞的脂質堆積。此外，曾 (2008)利用 Neutralse 水解 ISP 4 h 所得水解物 NH4h (Neutralse-ISP hydrolysate at 4h)能有效抑制 3T3-L1 前脂肪細胞脂質的生成，因此後續的實驗，將探討 FH2h 與 NH4h 對脂肪細胞中丙三醇釋放量 (Glycerol release)與三酸甘油酯殘留量 (Triglyceride residual)的影響。

(一) NH4h 水解物

本研究探討 NH4h 除了具抗脂質生成活性外，是否也具有促進脂解作用的效果。圖八(A)為 NH4h 不同添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響，利用 400、800、1600 ppm 添加量進行細胞培養，添加 FH2h 三天後收取細胞培養液進行丙三醇含量檢測，對照組為未添加水解物的脂肪細胞，其基本丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量。與對照組比較，添加 400-800 ppm 可顯著提升細胞培養液中丙三醇釋



圖八、NH₄h 添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

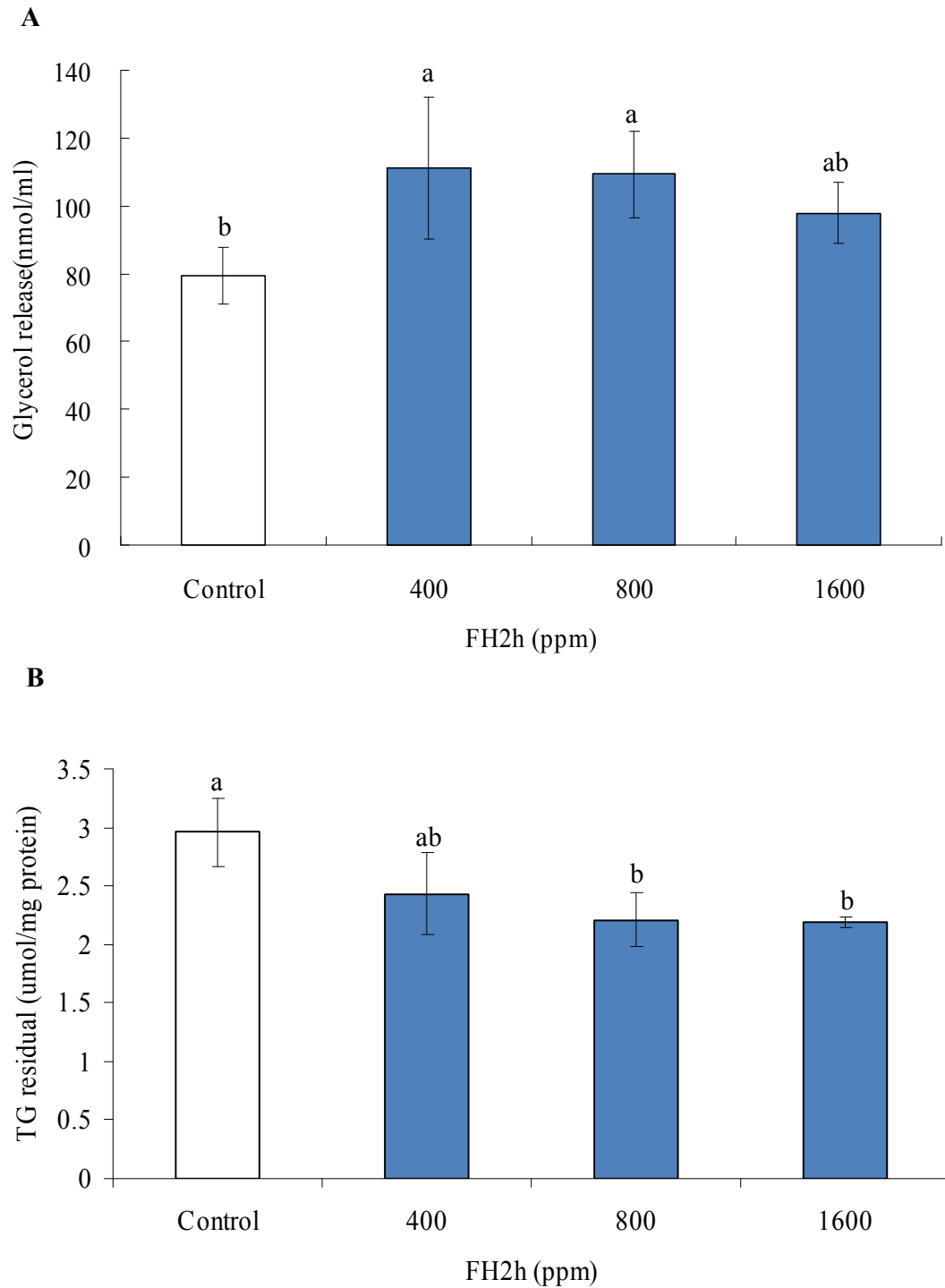
Figure 8. Effect of NH₄h with different dosages on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

放量 ($p < 0.05$)，其中 400 ppm 濃度時就已具有最高的釋放量，丙三醇含量從 79.03 nmol/ml 提升至 119.24 nmol/ml，達到促進脂解作用的效果，但隨著添加量的增加，卻無法更進一步促進丙三醇的釋放，可能原因為本研究生產的大豆蛋白水解物已達到促進脂肪細胞丙三醇釋放的極限。此外本研究也利用細胞質中的三酸甘油酯殘留量進一步印證脂解作用，由圖八(B)可知，隨著 NH₄h 水解物添加濃度的提升，細胞中的三酸甘油酯殘留量有逐漸減少的趨勢，更加證明，細胞中的三酸甘油酯確實被分解成丙三醇與游離脂肪酸，釋放到細胞外的培養液中。

(二) FH2h 水解物

圖九(A)為探討 FH2h 不同添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響。與對照組比較，400-1600 ppm 均具有促進細胞釋放丙三醇至胞外的趨勢，其中添加 400 ppm 可使細胞丙三醇釋放量最高，從 79.50 nmol/ml 提升至 111.32 nmol/ml。另外測定細胞質中的三酸甘油酯殘留量也印證脂解作用的進行，添加 800-1600 ppm 的 FH2h，與對照組比較其三酸甘油酯殘留量可顯著的減少 ($p < 0.05$)，當添加 1600 ppm 時，三酸甘油酯殘留量從 2.96 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 降至 2.18 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 。

綜合上述結果可知，本實驗所生產的 NH₄h 與 FH2h 都具有促進



圖九、FH2h 添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

Figure 9. Effect of FH2h with different dosages on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

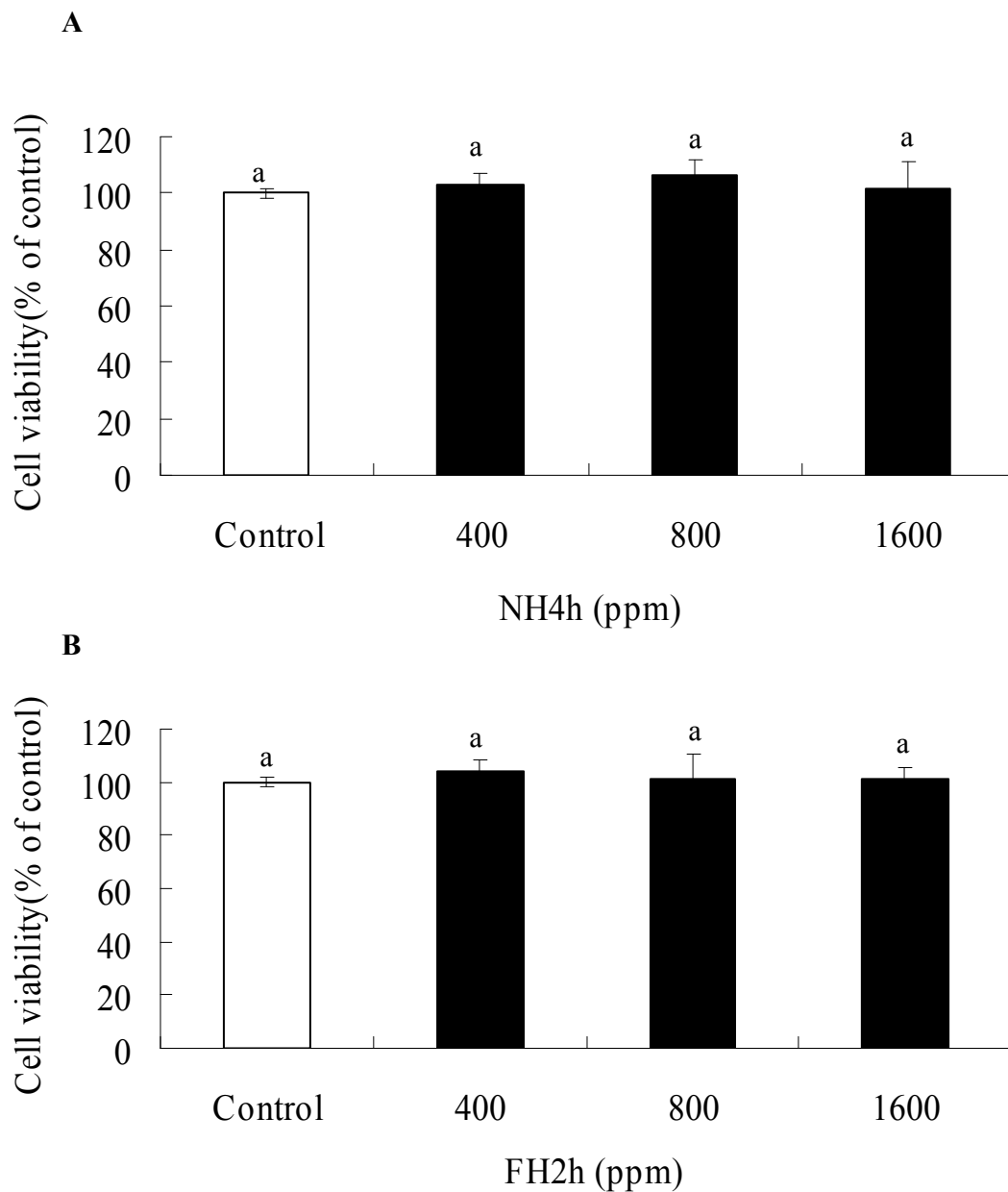
脂解作用的功效，另外將利用此兩種水解物進行細胞存活率測試，探討本研究所生產 ISPH 對細胞是否具有毒性。

本研究使用 MTT 試劑檢測細胞的存活率，在細胞分化第九天並添加水解物後經過三天，檢測其琥珀酸去氫酶的活性，去氫酶活性愈低代表細胞存活率高，與對照組比較，進而換算出水解物對細胞存活率之變化。圖十為 NH4h 與 FH2h 添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞存活率的影響，與對照組比較，分別加入 400-1600 ppm 的 NH4h 和 FH2h 三天，細胞存活率均在 100 % 以上。許多文獻指出，具促進脂肪細胞脂解活性的物質，卻會造成細胞的凋亡，降低脂肪細胞的存活率，如 DHA (Kim et al., 2006)、Genistein 與 Resveratrol (Rayalam et al., 2007)、Guggulsterone (Yang et al., 2008)。由此可知本研究所生產的 ISPH 對細胞並不具有毒性，具不傷害正常細胞生長的優點。

於後續實驗中，將生產 FH2h 與 NH4h 水解物，並以不同分子量限值 (molecular weight cut-off, MWCO) 濾膜進行區分，分離出不同分子量大小的區分物後，探討此區分物是否能更進一步提升脂肪細胞脂解作用的活性。

二、 水解物的區分

大豆蛋白水解物中含有不同大小分子片段的胜肽，透過膜反應系統將特定片段加以區隔分離後，所得的區分物再分別以脂肪細胞重複



圖十、NH4h (A)與 FH2h (B)添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞存活率的影響。
 Figure 10. Effect of NH4h (A) and FH2h (B) dosage on cell viability of 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

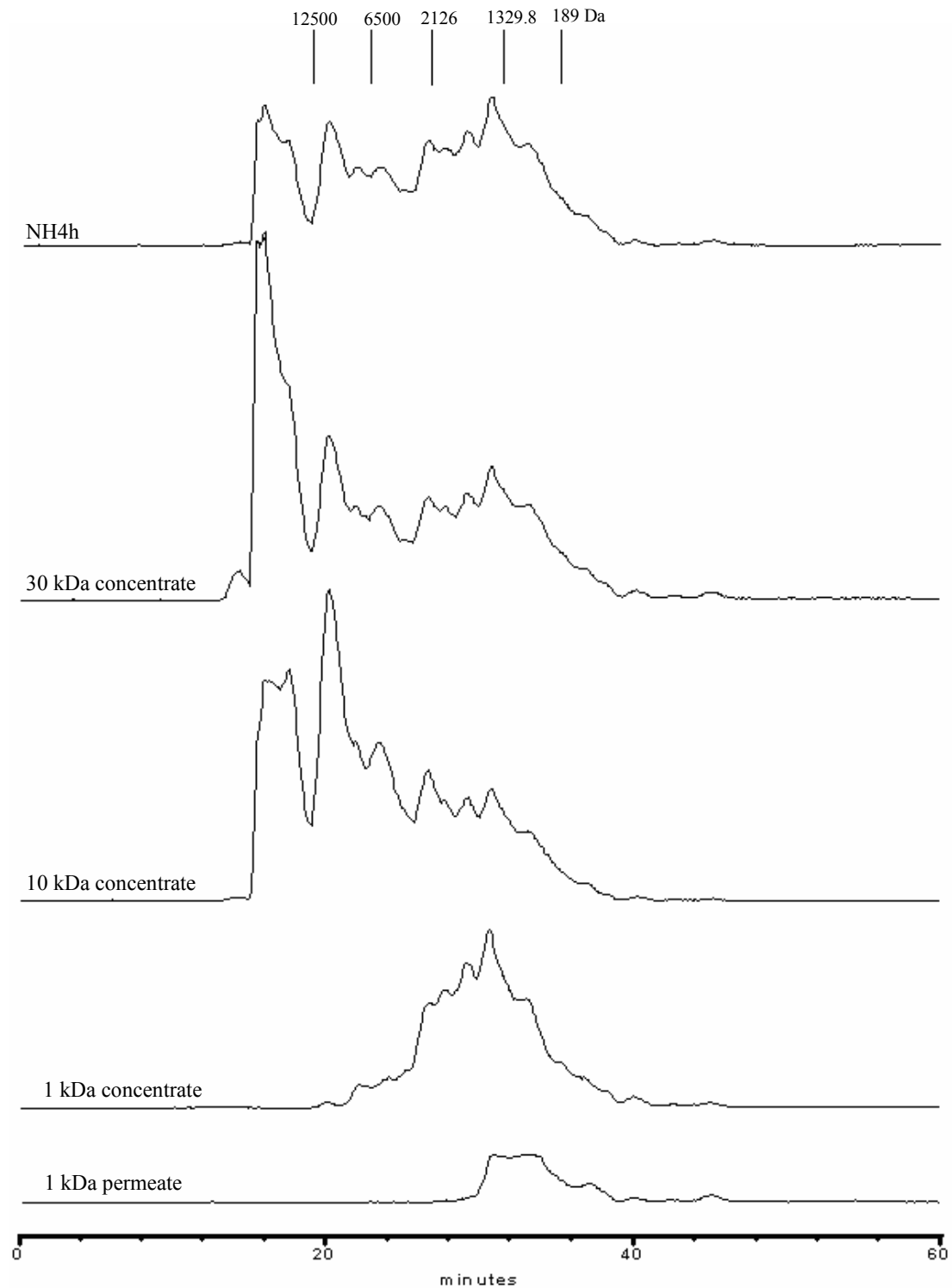
測試，以篩選出最佳的促進脂解作用胜肽。本研究大量製備 FH2h 水解物，依序以 30、10、1 kDa 與 300 Da MWCO 濾膜區分，得到濾膜的濃縮物與濾液，至於 NH4h 也以 30、10 與 1 kDa MWCO 濾膜進行區分。區分物經凍乾後以相同克數回溶，利用 HPLC 檢測其分子量分布情形，確定濾膜的區分效果。

(一) NH4h 水解物區分

圖十一為 NH4h 及其濾膜區分物的分子量分布圖，標準品的分子量依序為 12,500、6,500、2,126、1,329.8 與 189 Da。NH4h 經由 30 kDa MWCO 濾膜所得之濃縮物 (30 kDa concentrate) 以分子量大於 12,500 Da 的胜肽為主，通過 30 kDa 濾膜收集的濾液再經由 10 kDa 濾膜區分，所得的濃縮物 (10 kDa concentrate) 分子量介於 12,500 與 6,500 之間，接著將 10 kDa 濾膜處理後的濾液再經由 1 kDa 濾膜區分，其濃縮物 (1kDa concentrate) 分子量以 2,126 Da 與 1,329 Da 之間為主，而 1 kDa 濾液 (1kDa permeate) 分子量分布以 1,329 Da 的胜肽為主。

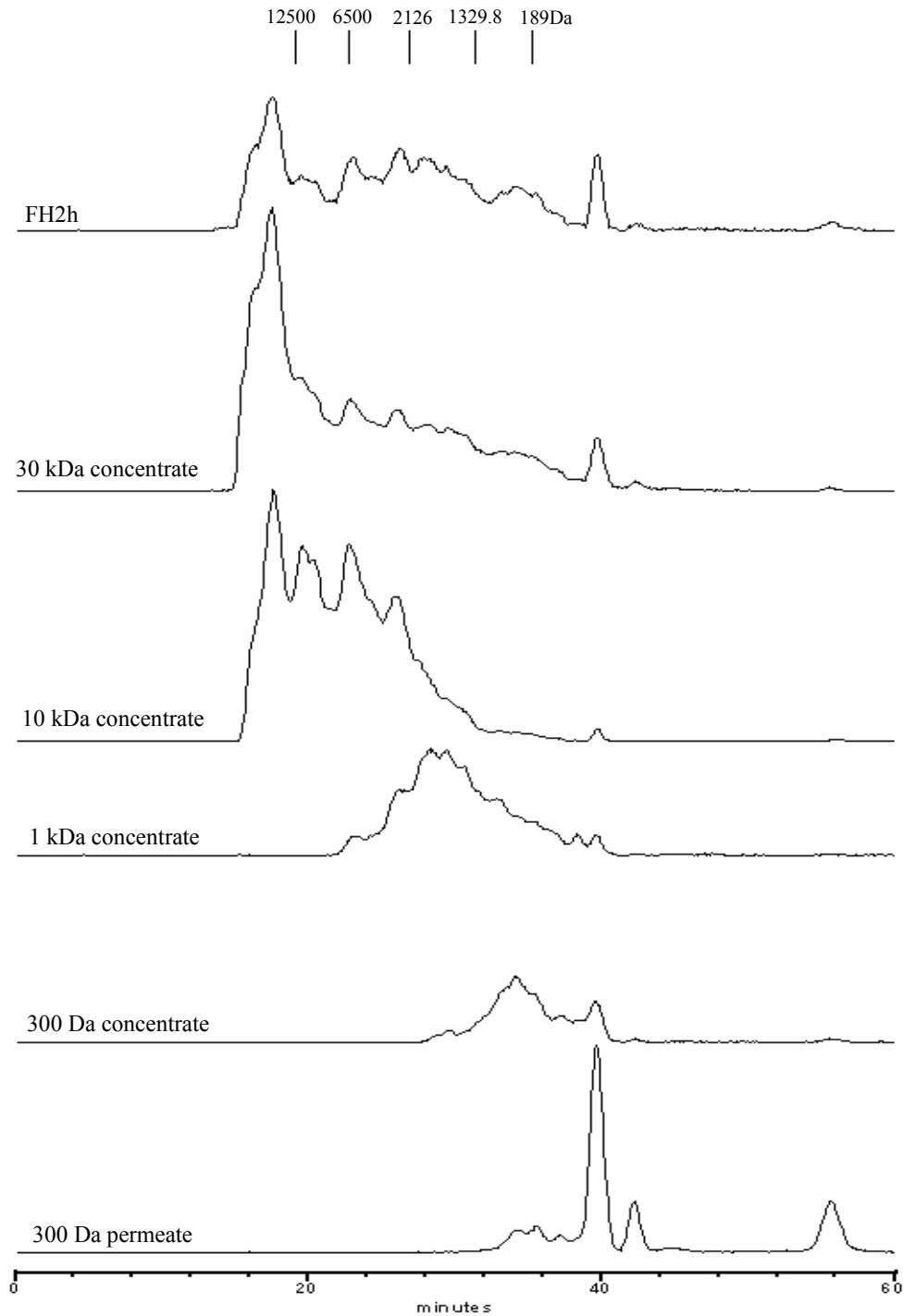
(二) FH2h 水解物區分

圖十二為 FH2h 及其濾膜區分物的分子量分布圖。30 kDa concentrate 以超過 12,500 Da 分子量片段為主。10 kDa concentrate 以 12,500 與 2,126 Da 之間為主，1 kDa concentrate 則明顯降低至 2,126 與 1,329 Da 之間，最後 1 kDa 的濾液通過 300 Da 濾膜區分，其濃縮



圖十一、NH4h 水解物經不同限值濾膜區分所得濃縮物與濾液分子量分布圖。

Figure 11. The molecular weight distribution for concentrates and permeate obtained from the fractionating NH4h with different molecular weight cut-off (MWCO) membranes. NH4h was sequentially filtered by a membrane module with 30 kDa, 10 kDa and 1 kDa concentrate or permeate, respectively.



圖十二、FH2h 水解物經不同限值濾膜區分所得濃縮物與濾液分子量分布圖。

Figure 12. The molecular weight distribution for concentrates and permeate obtained from the fractionating FH2h with different molecular weight cut-off (MWCO) membranes. FH2h was sequentially filtered by a membrane module with 30 kDa, 10 kDa, 1 kDa and 300 Da concentrate or permeate, respectively.

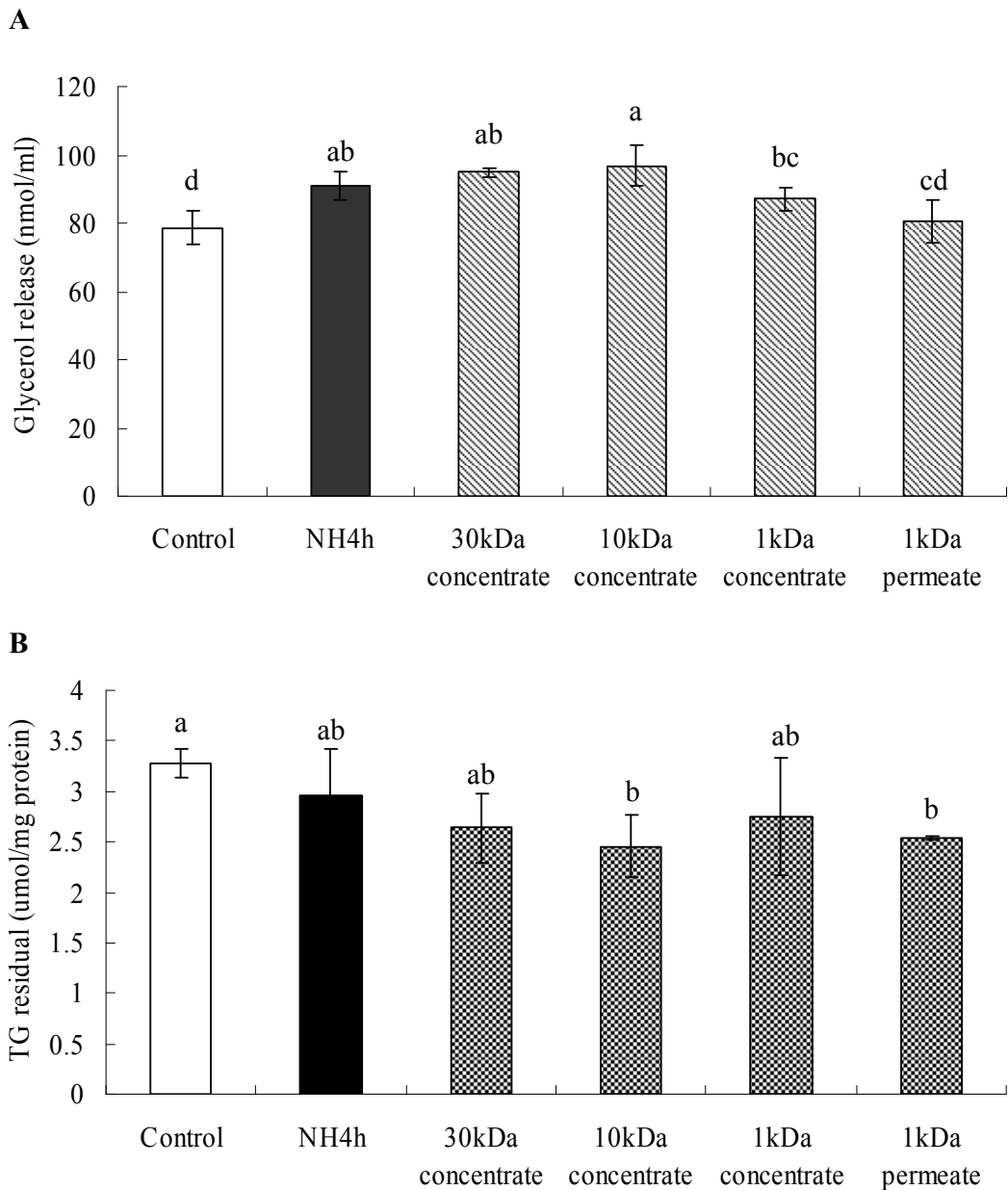
物 (300 Da concentrate) 分子量以 1,329 與 189 Da 之間為主，而 300 Da 濾膜濾液 (300 Da permeate) 主要分布為 189 Da 以下的胜肽片段。以上結果指出，經過此一系列濾膜區分後的水解物，確實能分離出不同分子量大小的濃縮物與濾液，後續將以區分後的胜肽片段進行細胞實驗。

三、 ISPH 濾膜區分物的篩選

在確定 NH4h 與 FH2h 可透過本研究的膜反應系統分離出不同分子量大小的胜肽片段後，分別添加各區分物 400 ppm 於脂肪細胞培養液中，探討不同 MWCO 濾膜濃縮物及濾液對細胞丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量的影響。

(一) NH4h 濾膜區分物

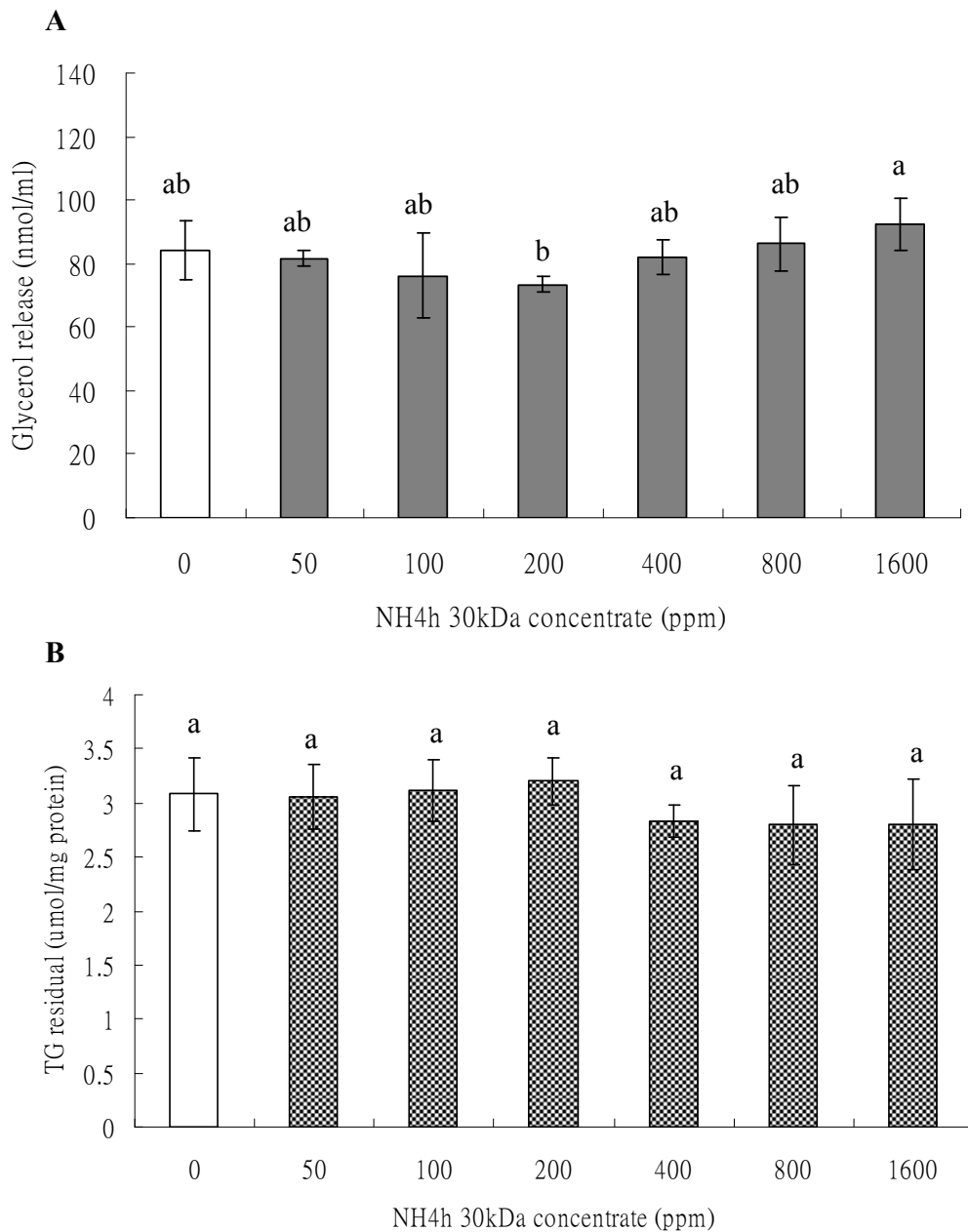
圖十三(A)為 400 ppm NH4h 及其濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響。與對照組比較，添加 NH4h 確實能促進脂肪細胞丙三醇的釋放，透過濾膜區分後的濃縮物與濾液，30 kDa、10 kDa 及 1 kDa concentrate 均可顯著提昇脂肪細胞丙三醇的釋放 ($p < 0.05$)，而 1 kDa permeate 之小分子片段無法顯著促進丙三醇的釋放，其中以 10 kDa concentrate 具最大的丙三醇釋放量，從對照組的基礎釋放量 78.70 nmol/ml 顯著提升至 96.88 nmol/ml，但統計學上 NH4h 及所有濃縮物之間引起的釋放量並無顯著差異。而圖十三(B)的三酸



圖十三、400 ppm NH₄h 濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量之影響。

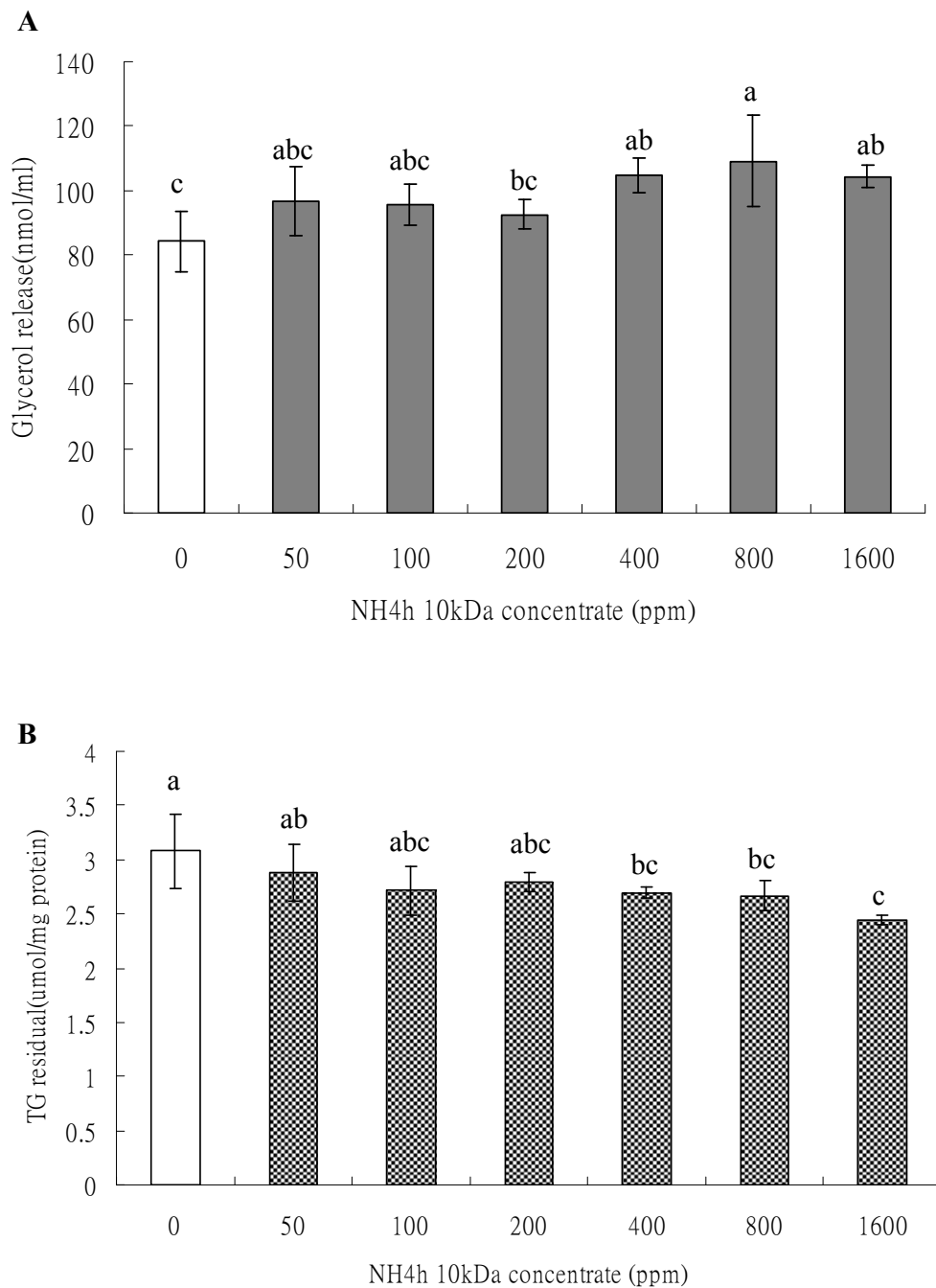
Figure 13. Effect of 400ppm concentrate or permeate on glycerol release and triglyceride residual in 3T3-L1 adipocytes. NH₄h was sequentially filtered by a membrane module with 30 kDa, 10 kDa and 1 kDa concentrate or permeate, respectively. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

甘油酯殘留量結果顯示，添加 400 ppm NH₄h 及其區分物與對照組比較皆有下降的趨勢，10 kDa concentrate 具有最低的三酸甘油酯殘留量，但統計學上與 NH₄h 及其 30 kDa concentrate 比較並無顯著差異，此結果與圖十三(A)丙三醇釋放量互相呼應，因此後續的濃度效應實驗中，將選擇具較高丙三醇釋放量的 30 kDa 與 10 kDa concentrate，進一步分別探討其添加劑量對脂肪細胞丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量的影響，以確認最佳效果的區分片段如圖十四與圖十五，NH₄h 30 kDa concentrate 於 50-1600 ppm 的濃度下均無法顯著的促進脂肪細胞丙三醇的釋放，但 400-1600 ppm 有些微促進丙三醇釋放的趨勢，但與對照組比較並無顯著差異 (圖十四(A))。此釋放丙三醇的趨勢也反應到 400-1600 ppm 添加劑量之下三酸甘油酯殘留量下降的趨勢 (圖十四(B))。由此可知 NH₄h 30 kDa concentrate 對脂肪細胞促進脂解的影響效果不顯著。相反的，脂肪細胞丙三醇釋放量隨著 NH₄h 10 kDa concentrate 添加量的增加，有明顯上升的現象，當添加劑量達到 800 ppm 時具有最高的釋放量，其丙三醇含量從對照組的基礎釋放量 84.19 nmol/ml 顯著提升至 109.15 nmol/ml (圖十五(A))；此結果也反應到三酸甘油酯殘留量，隨著 NH₄h 10 kDa concentrate 添加濃度的上升有明顯下降的趨勢，添加劑量至 1600 ppm 時，從對照組的 3.08 μmol/mg protein 降至 2.44 μmol/mg protein。



圖十四、NH4h 30 kDa concentrate 的其添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

Figure 14. Effect of NH4h 30 kDa concentrate with different dosages on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



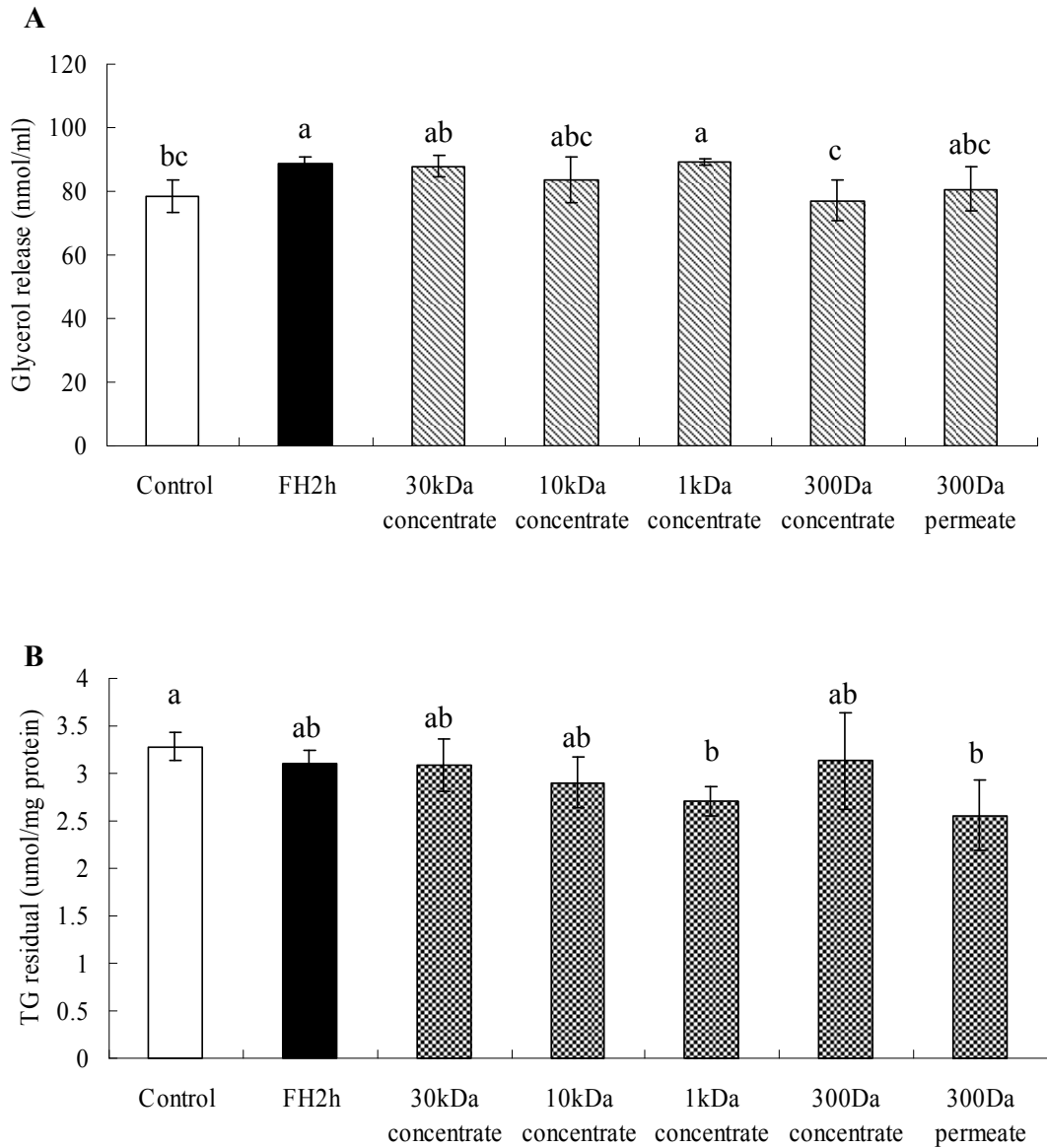
圖十五、NH4h 10 kDa concentrate 的添加劑量對 3T3-L1 已分化脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

Figure 15. Effect of NH4h 10 kDa concentrate with different dosages on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(二) FH2h 濾膜區分物

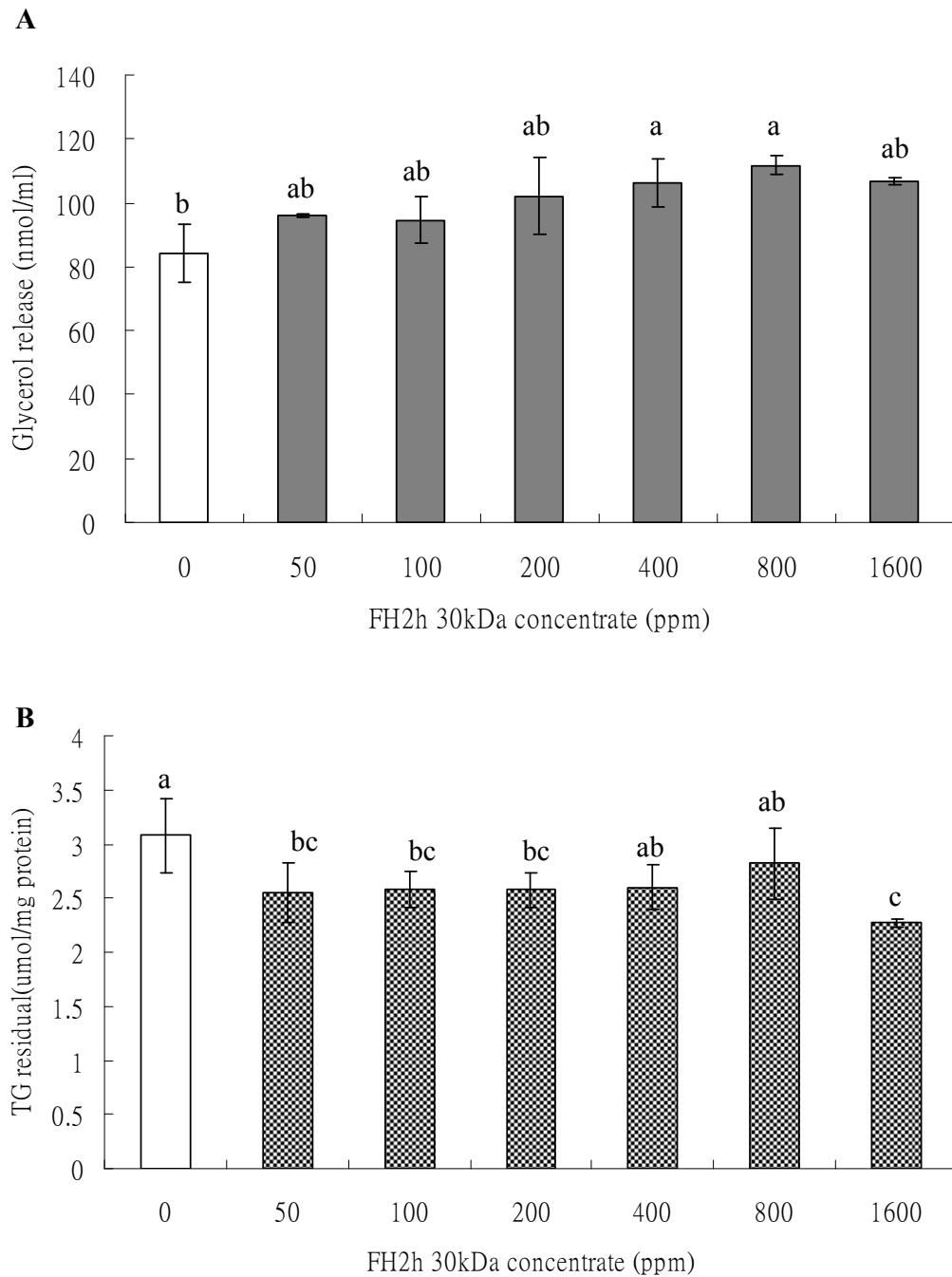
圖十六(A)為 400 ppm FH2h 及其濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量的影響。與對照組比較，添加 FH2h 能顯著地促進脂肪細胞丙三醇的釋放 ($p < 0.05$)，透過濾膜區分後的濃縮物與濾液，添加 30 kDa 與 1 kDa concentrate 均能顯著促進脂肪細胞丙三醇的釋放 ($p < 0.05$)，而 10 kDa concentrate 與 300 Da permeate 也有提升丙三醇釋放量的趨勢，但與對照組比較無顯著差異，300 Da concentrate 則無促進脂肪細胞丙三醇釋放的現象。其中以 1 kDa concentrate 具最大的丙三醇釋放量，從對照組的基礎釋放量 78.70 nmol/ml 顯著提升至 89.32 nmol/ml ($p < 0.05$)，但統計學上與 FH2h 及其 30 kDa、10 kDa concentrate 之間無顯著差異。圖十六(B)的三酸甘油酯殘留量結果顯示，添加入 FH2h 與其區分物，與對照組比較有下降的趨勢，以 1 kDa concentrate 與 300 Da permeate 具有最低的三酸甘油酯殘留量，但統計學上與 FH2h 及其他區分物比較無顯著差異，此結果與圖十六(A)互相呼應，因此在後續的濃度效應實驗，將選擇具較高丙三醇釋放量的 30 kDa、10 kDa 與 1 kDa concentrate，進一步探討其添加劑量對脂肪細胞丙三醇釋放量與三酸甘油酯殘留量的影響，以確認最佳效果的區分片段 (圖十七至圖十九)。

FH2h 30 kDa concentrate 對脂肪細胞的丙三醇釋放量會隨著添加



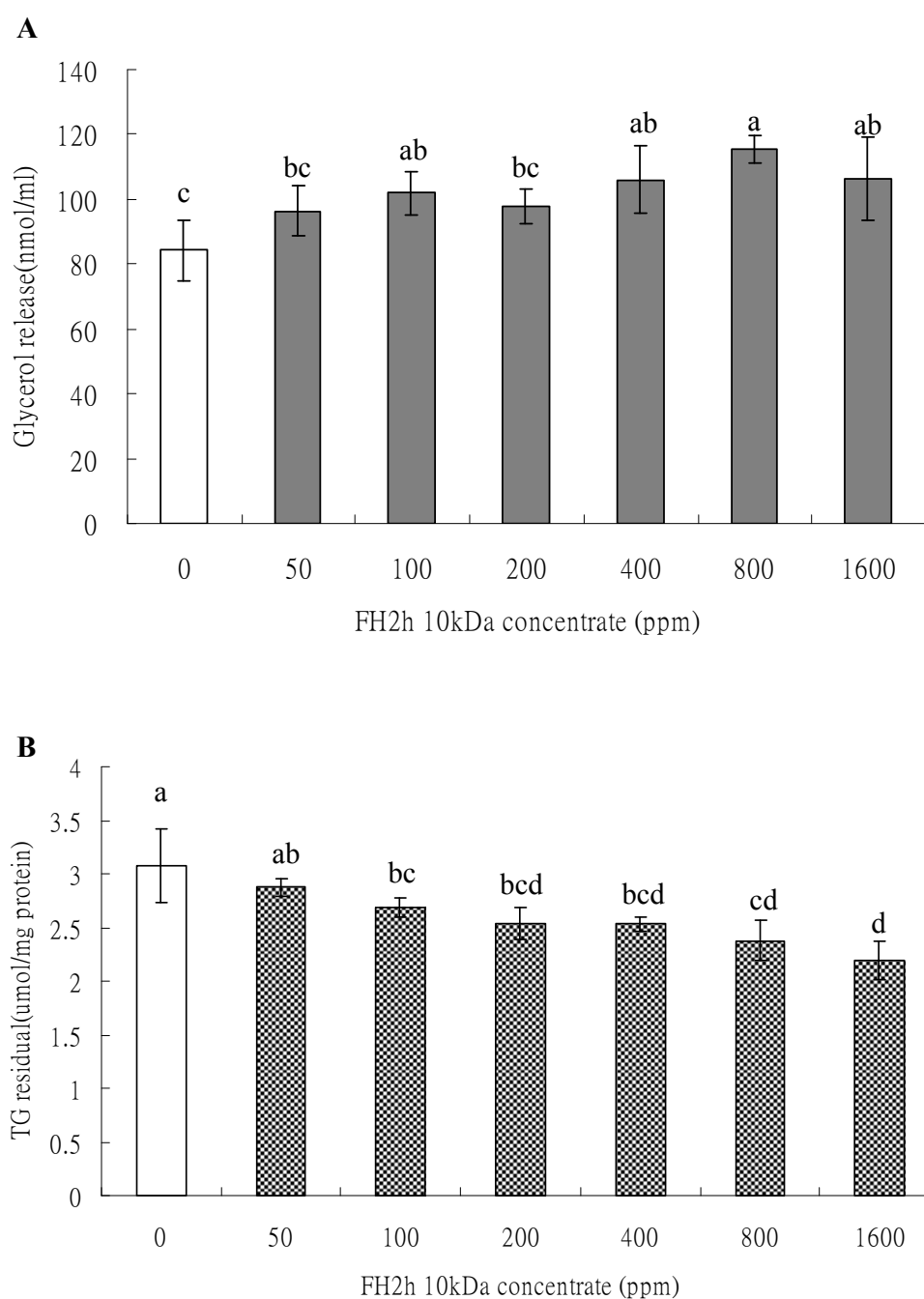
圖十六、400 ppm FH2h 濾膜區分物對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A) 與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

Figure 16. Effect of 400ppm concentrate or permeate on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. FH2h was sequentially filtered by a membrane module with 30 kDa, 10 kDa, 1 kDa and 300 Da concentrate or permeate, respectively. Bars represent mean \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



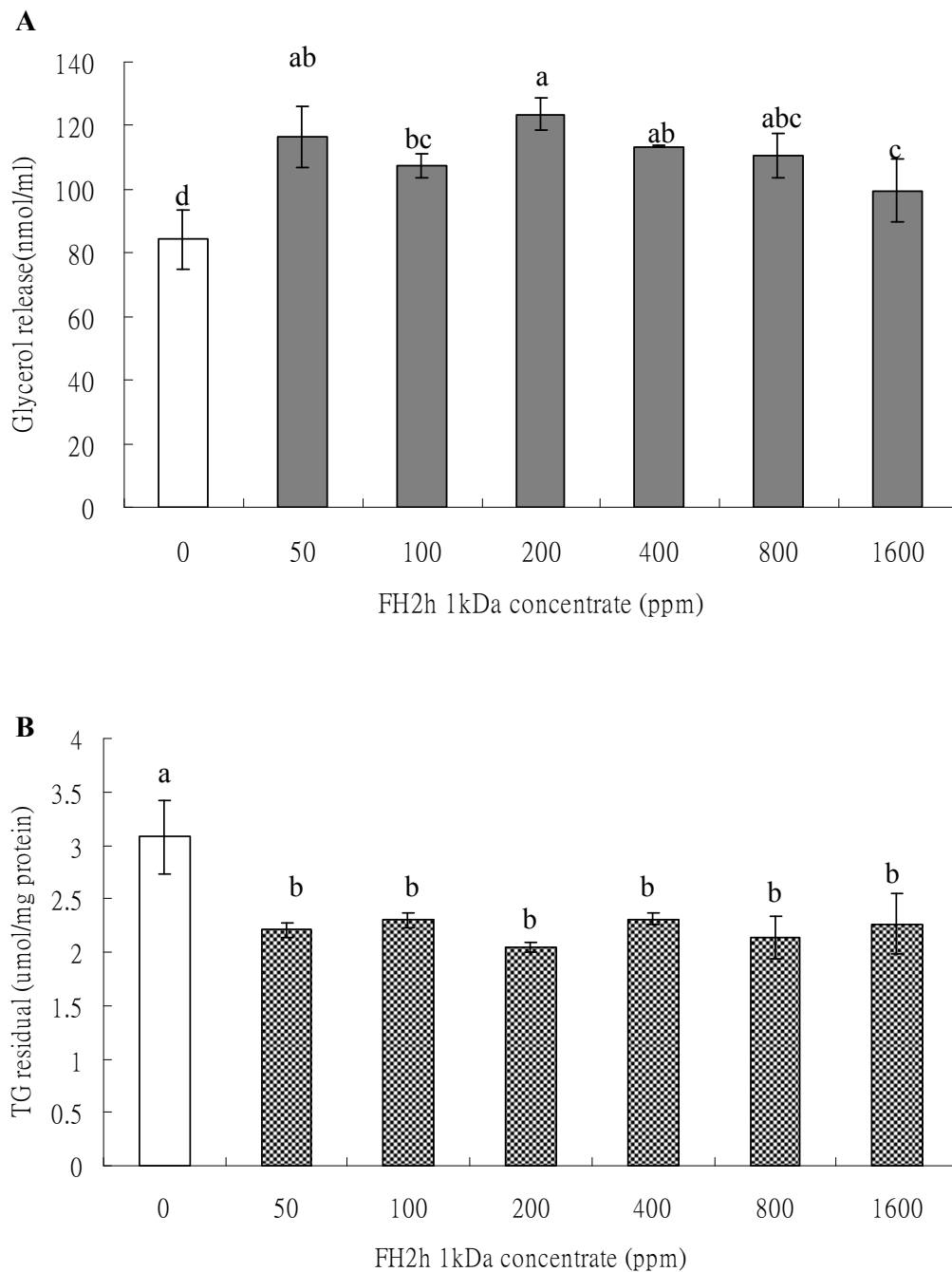
圖十七、FH2h 30 kDa concentrate 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

Figure 17. Effect of FH2h 30 kDa concentrate with different dosages on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖十八、FH2h 10 kDa concentrate 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇
 釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

Figure 18. Effect of FH2h 10 kDa concentrate with different dosages on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



圖十九、FH2h 1 kDa concentrate 的添加劑量對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

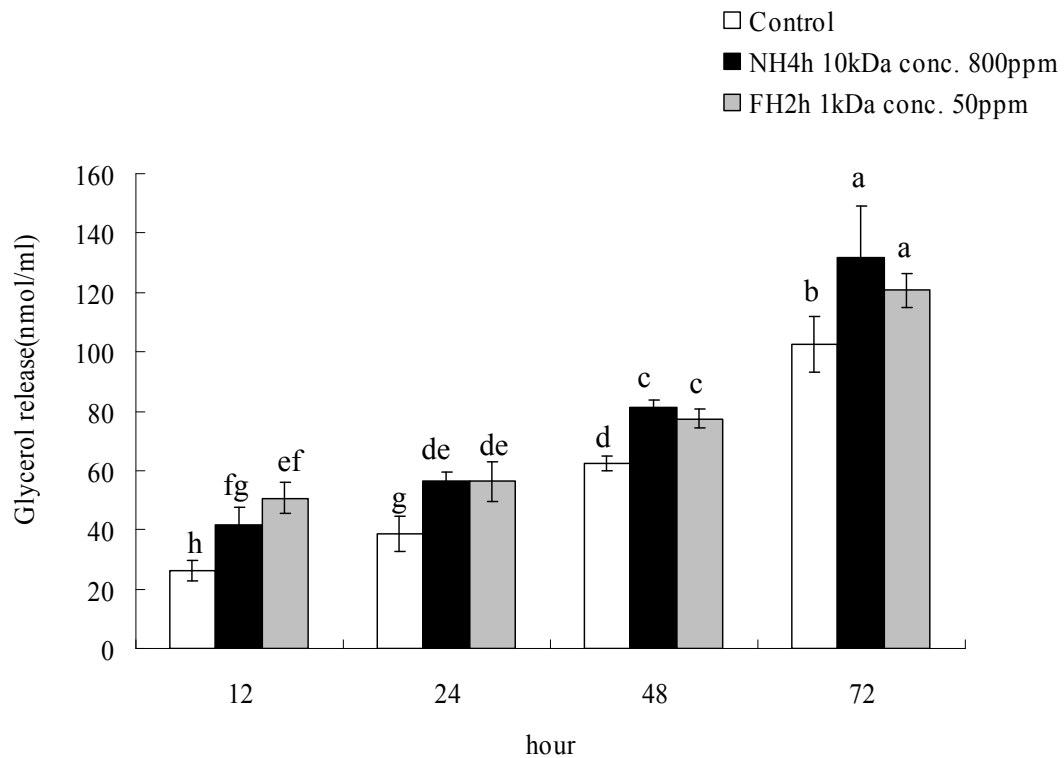
Figure 19. Effect of FH2h 1 kDa concentrate with different dosages on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

濃度增加而提升，50-200 ppm 的濃度下可些微促進丙三醇的釋放，添加至 400 ppm 時與對照組比較，顯著提升丙三醇釋放 ($p < 0.05$)，800 ppm 具最高的丙三醇釋放量，從 84.19 nmol/ml 提升至 111.79 nmol/ml (圖十七(A))。而丙三醇釋放量反應至三酸甘油酯殘留量，於 50-1600 ppm 添加劑量下與對照組比較有下降的趨勢，添加劑量 1600 ppm 時，三酸甘油酯殘留量從 3.08 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 顯著降至 2.27 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ (圖十七(B))。FH2h 10 kDa concentrate 與 FH2h 30 kDa concentrate 結果相似，脂肪細胞的丙三醇釋放量隨著 FH2h 10 kDa concentrate 添加量的增加有明顯上升的趨勢，與對照組比較於 100 ppm 的添加劑量可顯著促進丙三醇的釋放 ($p < 0.05$)，添加劑量達到 800 ppm 具最高的釋放量，其丙三醇含量從 84.19 nmol/ml 顯著提升至 115.36 nmol/ml (圖十八(A))；此結果也反應至三酸甘油酯殘留量，隨著 FH2h 10 kDa concentrate 添加量的增加，有明顯滑落的趨勢，於 100 ppm 添加劑量下三酸甘油酯殘留量有顯著的降低 ($p < 0.05$)，添加劑量至 1600 ppm 具最低的三酸甘油酯殘留量，從 3.08 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 降至 2.18 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ (圖十八(B))。FH2h 1 kDa concentrate 於 50 ppm 的添加濃度就可顯著促進脂肪細胞丙三醇的釋放 ($p < 0.05$)，從 84.19 nmol/ml 提升至 116.33 nmol/ml，隨著添加劑量的提升，與對照組比較仍能顯著提升脂肪細胞丙三醇的釋放量 (圖

十九(A))。此結果也反應至三酸甘油酯殘留量，添加 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 顯著的降低細胞中三酸甘油酯殘留量 ($p < 0.05$)，從 3.08 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 降至 2.21 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ ，隨著添加劑量的提升，與對照組比較仍能顯著降低細胞中三酸甘油酯殘留量 (圖十九(B))。FH2h 1 kDa concentrate 的結果不同於 30 kDa 與 10 kDa concentrate，50 ppm 添加量已明顯促進脂肪細胞的脂解作用。

綜合圖十三至圖十九的比較，我們可以發現，NH4h 與 FH2h 經由 MWCO 濾膜區分後，可區分出不同的胜肽片段，其促進脂解作用的功效也有所差異。添加 800 ppm NH4h 10 kDa concentrate 時，對脂肪細胞的脂解作用有顯著的促進效果，其丙三醇釋放量提升 30 % 至 109.15 nmol/ml；也相對反應於三酸甘油酯殘留量下降 21 % 至 2.44 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 。而 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate，雖只有 NH4h 10 kDa concentrate 1/16 濃度亦可顯著促進脂肪細胞的脂解作用，其丙三醇釋放量提升 38% 至 116.33 nmol/ml；上述結果也相對反應於三酸甘油酯殘留量，下降 28% 至 2.21 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 。由此可知 FH2h 1 kDa concentrate 促進脂肪細胞脂解作用的活性高於 NH4h 10kDa concentrate。

圖二十為探討添加 800 ppm NH4h 10 kDa concentrate 與 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 後，經過不同培養時間之下對 3T3-L1 脂肪細

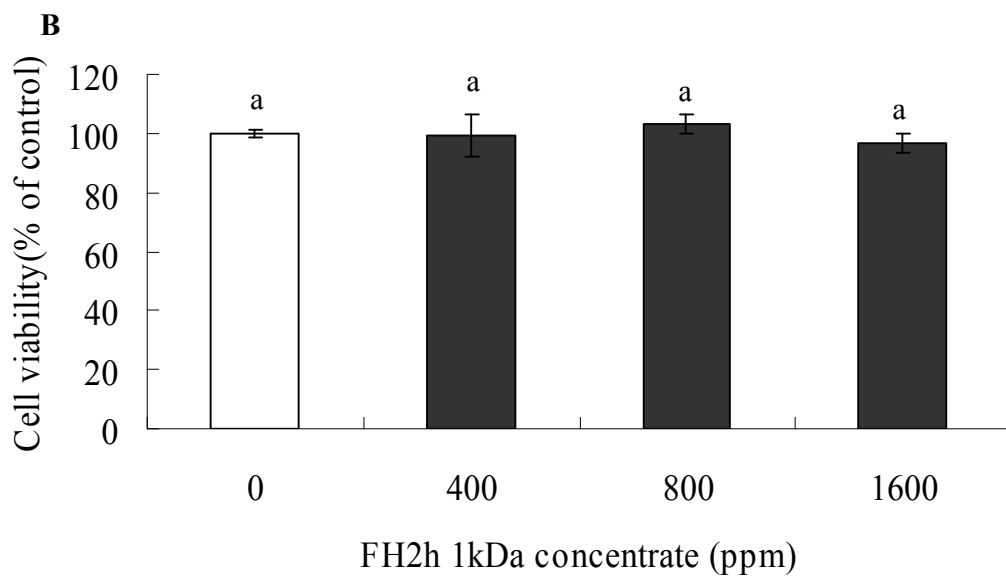
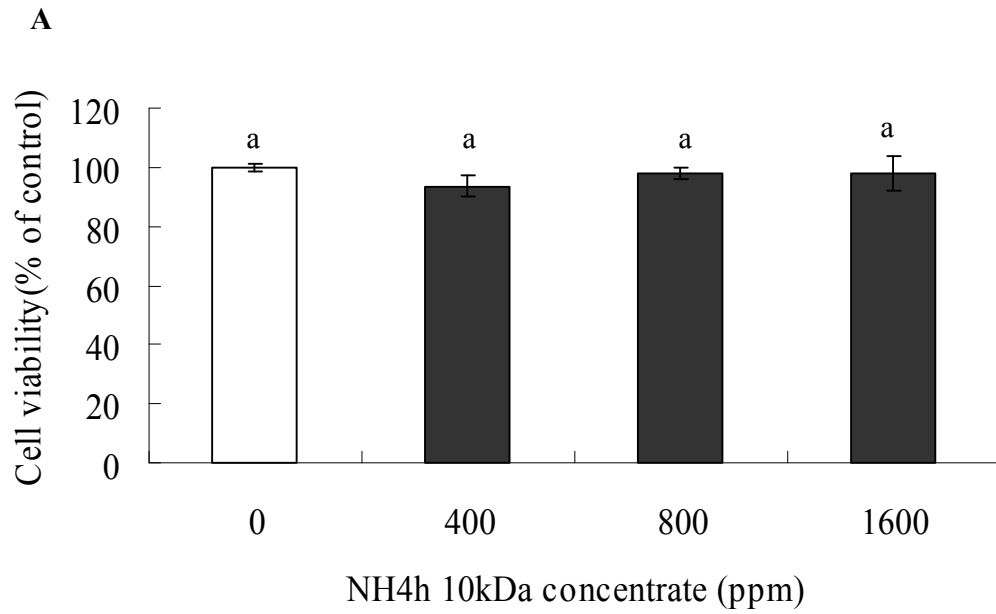


圖二十、分別添加 800ppm NH4h 10 kDa concentrate 與 50ppm FH2h 1 kDa concentrate 後，經過不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量之影響。

Figure 20. Effect of 800ppm NH4h 10 kDa concentrate or 50ppm FH2h 1 kDa concentrate for various times on glycerol release in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

胞丙三醇釋放量的影響。分別添加入此兩種濃縮物後，經過培養時間 12 h 與對照組比較雖有顯著促進丙三醇釋放的效果，但卻無法大幅增加。隨著培養時間的增長，其整體釋放量會逐漸的上升，於 72 h 達到最高，添加 800 ppm NH4h 10 kDa concentrate 其丙三醇釋放量從 102.61 nmol/ml 顯著提升至 131.73 nmol/ml ($p < 0.05$)，添加 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 釋放量從 102.61 nmol/ml 顯著提升至 120.63 nmol/ml ($p < 0.05$)。由此結果可知 NH4h 10 kDa concentrate 與 FH2h 1 kDa concentrate 促進脂肪細胞的脂解作用較為溫和，無法於短時間內迅速影響。

接著探討經由濾膜濃縮的區分物對細胞是否具有毒性，分別添加 400-1600 ppm NH4h 10 kDa 與 FH2h 1 kDa concentrate 對脂肪細胞存活率之影響 (圖二十一)。與對照組比較，脂肪細胞添加不同濃度濃縮物處理三天後，隨著 NH4h 10 kDa 與 FH2h 1 kDa concentrate 添加劑量的提昇，脂肪細胞存活率並無明顯下降的趨勢，即使添加高劑量 1600 ppm 下仍不影響細胞存活率。由此可得知本研究使用膜過濾系統所生產出的區分物不具毒殺細胞的作用。Kovsan 等人 (2007) 添加 Nelfinavir 可在 8 -24 h 大幅促進 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇的釋放，但肌肉組織無法及時代謝脂肪酸，使血液中游離脂肪酸過多，造成血脂異常 (dyslipidemia) 的症狀，也會促使細胞凋亡 (Rudich et al.,



圖二十一、分別添加不同濃度之 NH4h 10 kDa concentrate (A)與 FH2h 1kDa concentrate (B)對 3T3-L1 脂肪細胞存活率的影響。

Figure 21. Effect of NH4h 10kDa concentrate (A) or FH2h 1kDa concentrate (B) on cell viability of 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

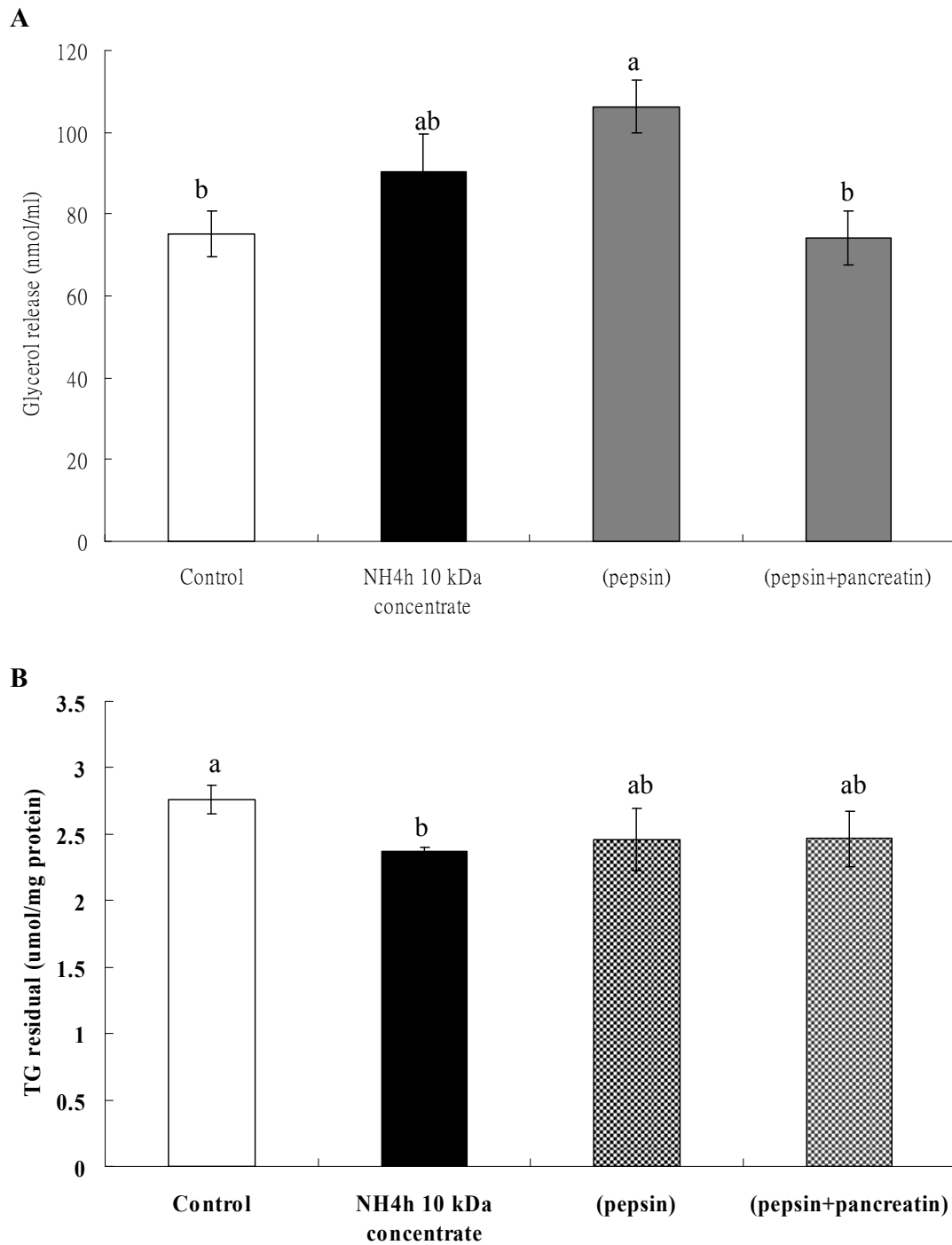
2005)。不同於藥物強烈的效果，本研究所生產大豆蛋白水解物能溫和促進脂肪分解，且不具細胞毒性，可開發為降脂相關的保健食品。

四、模擬腸胃道消化試驗

將篩選出來的 NH4h 10 kDa concentrate 與 FH2h 1 kDa concentrate，進一步探討腸胃道的消化作用，是否會影響其促進脂肪細胞的脂解活性；本研究利用體外模擬腸胃道消化試驗，探討上述兩種濃縮物的促進脂解活性，是否會受到腸胃道酵素水解作用的破壞。

(一) NH4h 10 kDa concentrate

圖二十二(A)為 50 ppm NH4h 10kDa concentrate 通過腸胃道酵素作用前後，對脂肪細胞丙三醇釋放量的影響。添加 NH4h 10 kDa concentrate 與對照組比較，有促進細胞丙三醇釋放的趨勢，將 NH4h 10 kDa concentrate 通過模擬胃道環境以 pepsin 水解，可更加提昇脂肪細胞丙三醇的釋放，從對照組的基礎釋放量 75.22 nmol/ml 顯著上升至 106.21 nmol/ml ($p < 0.05$)。上述 pepsin 水解物再通過模擬腸道環境以 pancreatin 水解，可發現促進丙三醇釋放活性降低，與對照組比較無顯著差異；另外圖二十二(B)結果顯示，添加 50 ppm NH4h 10 kDa concentrate 可顯著減少細胞中三酸甘油酯殘留量 ($p < 0.05$)，其濃縮物經 pepsin 與 pancreatin 水解後與對照組比較，細胞中三酸甘油酯殘留量有下降的趨勢，但統計學上無顯著差異。此結果顯示 NH4h 10



圖二十二、50ppm NH4h 10 kDa concentrate 經腸胃道消化酵素水解後對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

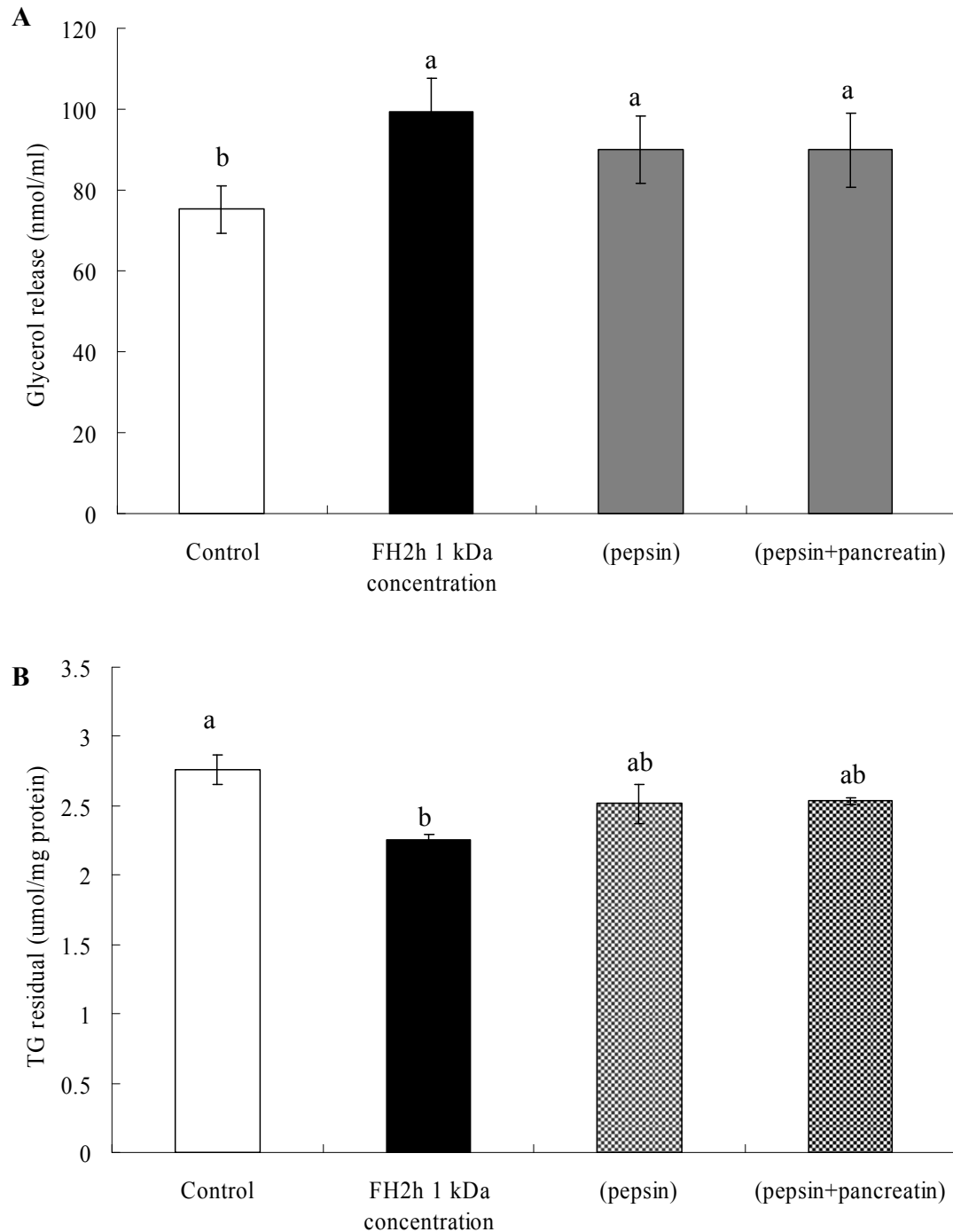
Figure 22. Effect of NH4h 10 kDa concentrate following digestion by gastrointestinal protease on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

kDa concentrate 經由 pepsin 水解後可更加提昇脂肪細胞的脂解作用，再經由 pancreatin 作用後其促進脂解活性卻下降，可能原因為 NH₄h 10 kDa concentrate 其分子量仍然太大 (如圖十一)，當通過人體胃道時具功能性的胜肽片段被腸道酵素進一步水解，而破壞其功能。

(二) FH2h 1 kDa concentrate

圖二十三(A)為 50 ppm FH2h 1kDa concentrate 通過腸胃道酵作用前後，對脂肪細胞丙三醇釋放量的影響。與對照組比較，添加 FH2h 1 kDa concentrate 可顯著的促進丙三醇的釋放 ($p < 0.05$)，FH2h 1 kDa concentrate 模擬胃道環境以 pepsin 水解，其丙三醇釋放量與未通過腸胃道水解的濃縮物比較有些微降低，但與對照組比較仍具顯著的釋放活性 ($p < 0.05$)，接著 pepsin 水解物再以 pancreatin 水解後，與對照組比較仍具顯著的活性 ($p < 0.05$)；此結果也反應到三酸甘油酯殘留量，未通過腸胃道的 FH2h 1 kDa concentrate 與對照組比較，三酸甘油酯殘留量有顯著的下降 ($p < 0.05$)，通過腸胃道酵素水解後則有些微的回升 (圖二十三(B))。

綜合上述模擬腸胃道消化試驗之結果顯示，FH2h 1 kDa concentrate 經由腸胃道酵素水解後仍保有其促進脂解的活性；但 NH₄h 10 kDa concentrate 卻因酵素水解而顯著降低其促進脂解的活性。其可能原因為 NH₄h 10 kDa concentrate 的分子量以大分子蛋白居



圖二十三、50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 經腸胃道消化酵素水解後對 3T3-L1 脂肪細胞丙三醇釋放量(A)與三酸甘油酯殘留量(B)之影響。

Figure 23. Effect of FH2h 1 kDa concentrate following digestion by gastrointestinal protease on glycerol release (A) and triglyceride residual (B) in 3T3-L1 adipocytes. Bars represent mean \pm SD, n=3. Means with different letters are significant different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

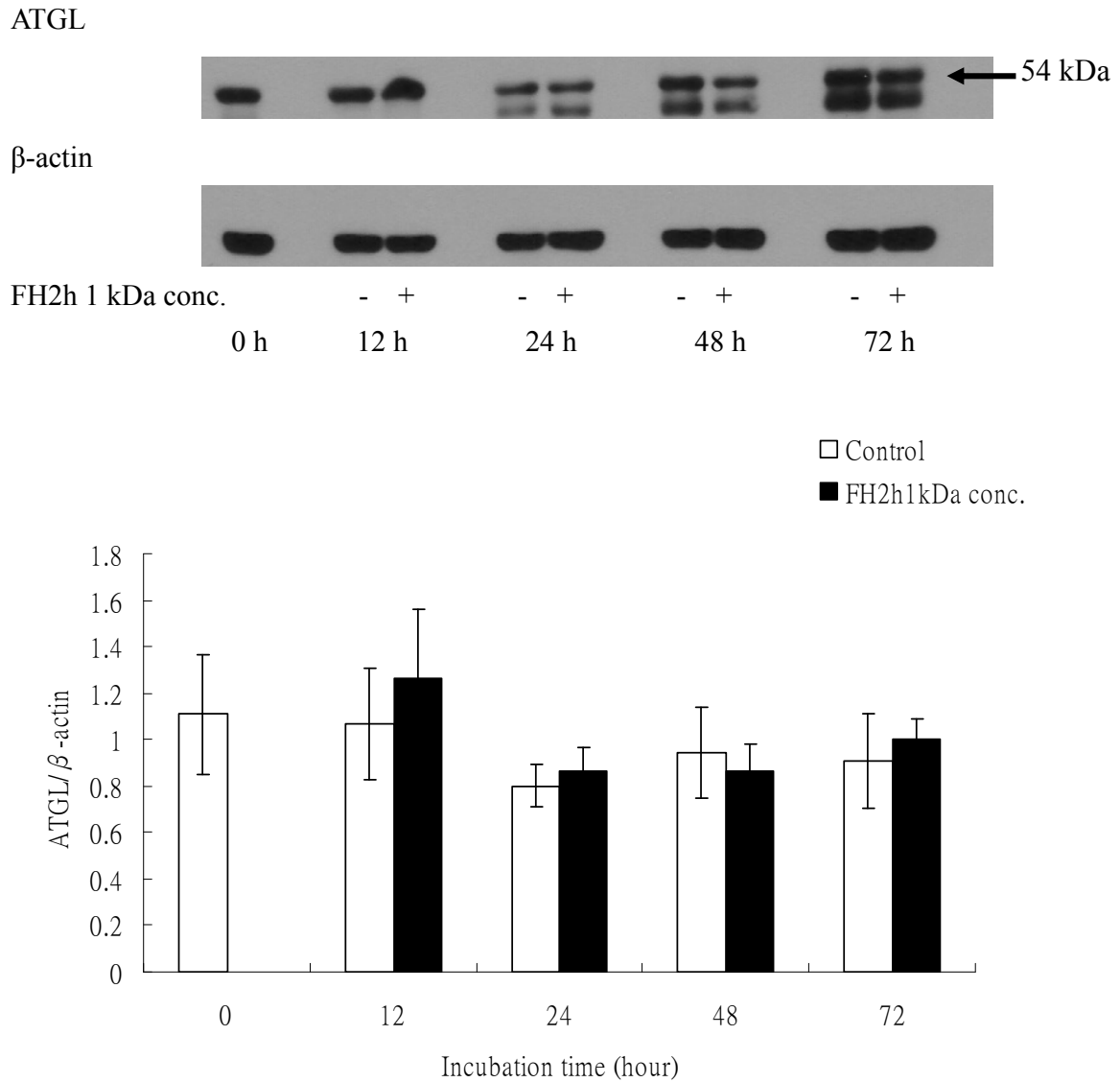
多 (圖十一), 因此容易受到腸胃道酵素的水解。至於 FH2h 1 kDa concentrate 分子量以小分子片段為主 (圖十二), 不易受到腸胃道酵素的破壞, 此結果與 Wu and Ding (2002)相似, 他們指出小分子胜肽混合液經 pensin 與 pancreatin 水解後對於胜肽原有活性並無明顯改變。後續將採用 FH2h 1kDa concentrate, 添加於 3T3-L1 脂肪細胞培養液中, 探討其促進脂肪細胞脂解的可能機制。

五、 3T3-L1 脂肪細胞中脂解酶蛋白質表現量分析

大鼠的白色脂肪組織中包含許多脂解酶, 其中 ATGL (adipose triglyceride lipase)與 HSL (hormone sensitive lipase)就負責將近 95%三酸甘油脂的脂解作用 (Schweiger et al., 2006)。因此本研究利用西方轉漬法分析 FH2h 1 kDa concentrate 添加於脂肪細胞後, 對細胞中關鍵脂解酶 ATGL、HSL 與磷酸化 HSL (phospho-HSL)蛋白質表現量之影響, 以初步的評估大豆蛋白水解物影響細胞脂解作用的可能機制。

(一) ATGL 蛋白質表現量

圖二十四為脂肪細胞添加 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 與否, 於不同培養時間下對脂解酶 ATGL 蛋白質表現量之影響。ATGL 分子量為 54 kDa, 而小於 54 kDa 的 band 可能為其他類似 ATGL 的家族蛋白 (Patatin-like phospholipase domain-containing 1 to 5, PNPLA 1-5) (Zechner et al., 2005; Wilson, et al., 2006) 或受到 CGI-58 活化的 ATGL



圖二十四、50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 添加後經由不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞中 ATGL 蛋白質表現量之影響。

Figure 24. Time course of FH2h 1 kDa concentrate on protein expression of ATGL in 3T3-L1 adipocytes. Values are mean \pm SD for three replicate cultures and * is significant different $p < 0.05$ within each incubation time by Duncan's multiple range test.

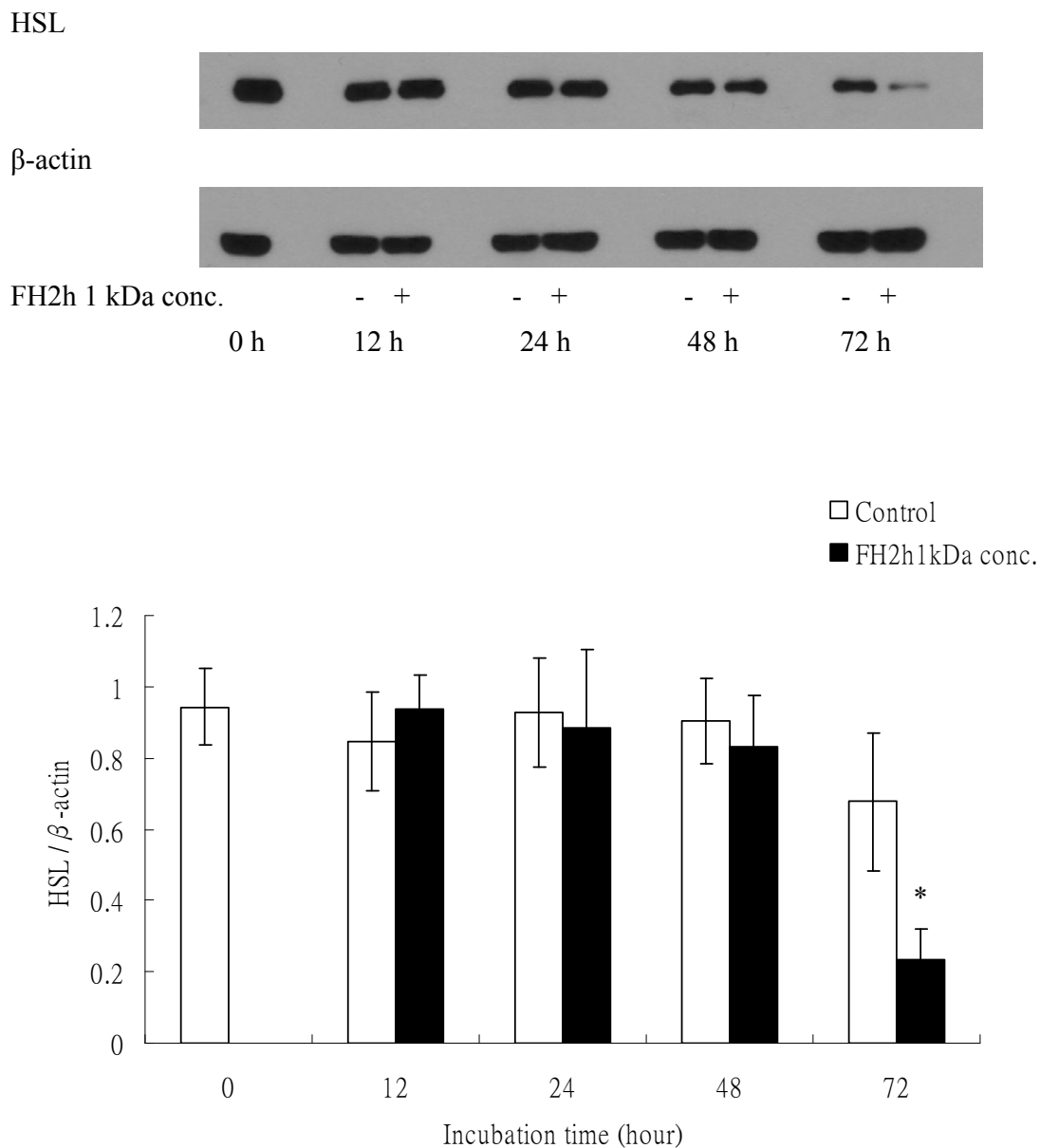
(Brasaemle, 2007)。但 ATGL/CGI-58 之間的調控機制仍未明瞭，因此本研究只探討 ATGL 蛋白質表現量的變化。無論是否添加 FH2h 1 kDa concentrate，隨著培養時間 0-72 h 所產生的 ATGL 表現量 (54 kDa) 與對照組比較並無顯著差異 ($p > 0.05$)。因此添加入 FH2h 1 kDa concentrate 不影響脂肪細胞中 ATGL 蛋白質表現量。

(二) HSL 蛋白質表現量

圖二十五為脂肪細胞添加 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 與否，於不同培養時間下對脂解酶 HSL 蛋白質表現量之影響。結果發現添加 FH2h 1 kDa concentrate 與對照組比較，於培養時間 24-48 h 其 HSL 蛋白質表現量有下降的趨勢，且 72 h 表現量有顯著降低的現象 ($p < 0.05$)，推測於脂肪細胞中添加入 FH2h 1 kDa concentrate 72 h 後可能會造成 HSL 的磷酸化現象，由於部分 HSL 磷酸化因而造成 HSL 測定量的減少。

(三) phospho-HSL 蛋白質表現量

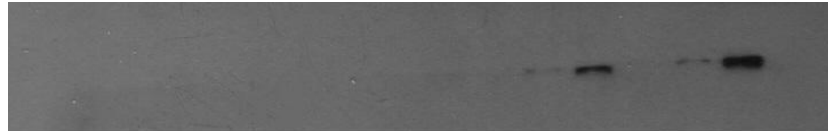
圖二十六為脂肪細胞添加 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 與否，於不同培養時間下對脂解酶 phospho-HSL 蛋白質表現量之影響。結果顯示，於培養時間 48-72 h 其 phospho-HSL 蛋白質表現量與對照組比較顯著提升 ($p < 0.05$)，此結果與圖二十五中 HSL 表現量減少相互呼應，表示添加 FH2h 1 kDa concentrate 確實會促進 HSL 的磷酸化，使



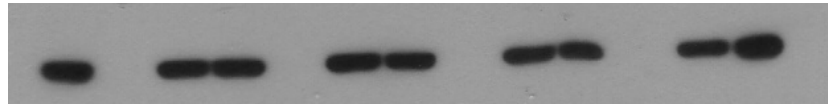
圖二十五、50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 添加後經由不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞中 HSL 蛋白質表現量之影響。

Figure 25. Time course of FH2h 1 kDa concentrate on protein expression of HSL in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Values are mean \pm SD for three replicate cultures and * is significant different $p < 0.05$ within each incubation time by Duncan's multiple range test.

Phospho-HSL

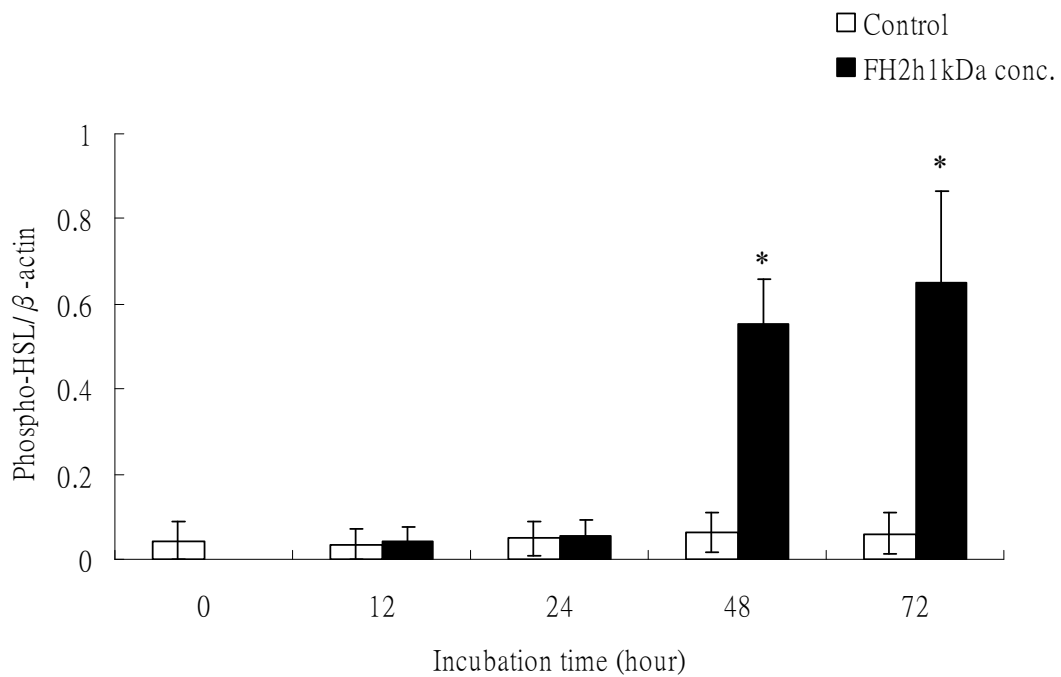


β -actin



FH2h 1 kDa conc.

	-	+	-	+	-	+	-	+
0 h								
12 h								
24 h								
48 h								
72 h								



圖二十六、50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 添加後經由不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞中 Phospho-HSL 蛋白質表現量之影響。

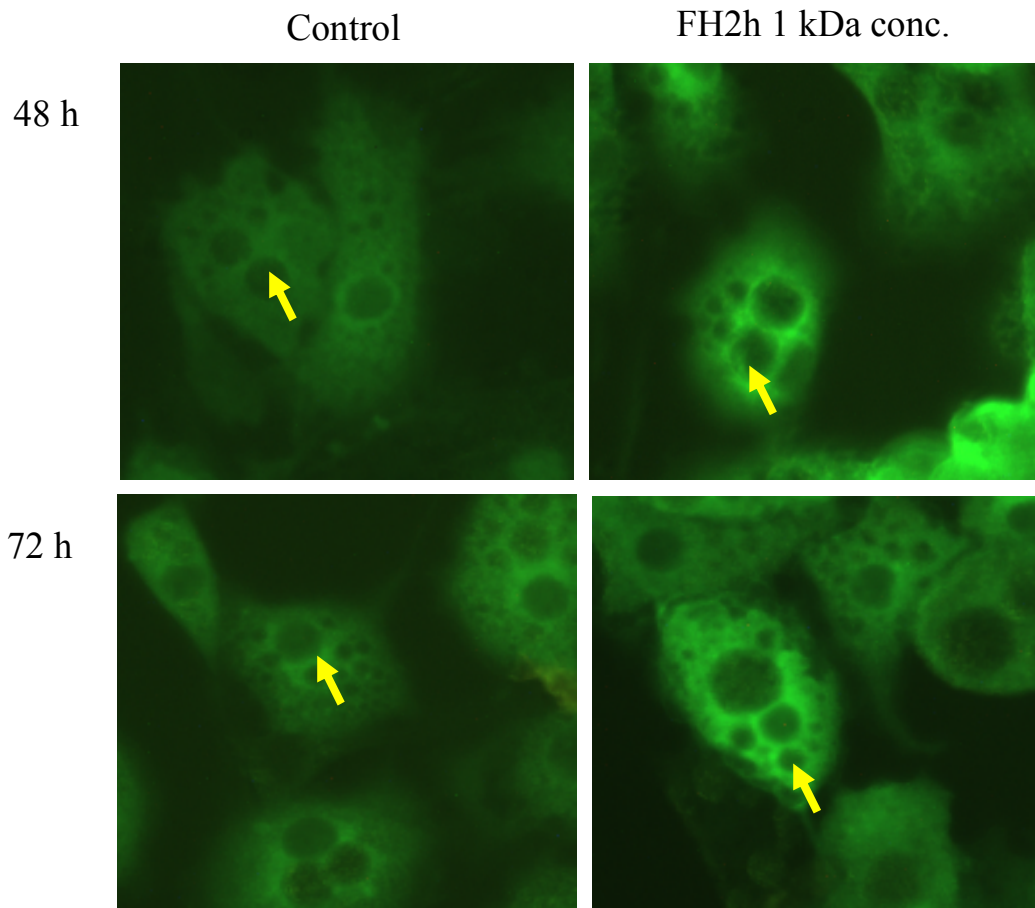
Figure 26. Time course of FH2h 1 kDa concentrate on protein expression of phospho-HSL in 3T3-L1 adipocytes. Values are mean \pm SD for three replicate cultures and * is significant different $p < 0.05$ within each incubation time by Duncan's multiple range test.

phospho-HSL蛋白質表現量增加。HSL受到磷酸化作用後，會移位至油滴表面上並分解油滴，促使脂解作用的進行 (Egan et al., 1992)。本研究以蛋白質表現量初步評估機制的結果可得知，FH2h 1 kDa concentrate可促進脂肪細胞中關鍵脂解酶HSL的磷酸化現象。後續的實驗將利用螢光免疫染色法標定細胞中的HSL，進一步驗證HSL脂解酶的移位作用 (translocation)。

六、 3T3-L1脂肪細胞中HSL之移位作用

本研究以螢光抗體標記細胞中的關鍵脂解酶HSL，於螢光顯微鏡下觀測HSL於胞內位置的改變。圖二十七結果顯示，添加50 ppm FH2h 1 kDa concentrate經過培養時間48 h，其受螢光標記之HSL與相同培養時間之對照組比較有明顯向油滴聚集的現象，使細胞中油滴周圍的螢光強度增加，細胞中所含的油滴如黃色箭頭所指之黑色圓圈。經過72 h培養的對照組其細胞中之HSL也逐漸向油滴聚集，此為脂肪細胞基礎脂解作用的進行，而添加50 ppm FH2h 1 kDa concentrate經過培養時間72 h，其油滴周圍的螢光強度仍大於相同培養時間之對照組。由此可知，FH2h 1 kDa concentrate可促使脂肪細胞中HSL產生移位作用 (translocation)並分解細胞中的油滴，進而促進脂解作用的進行。

綜合以上結果顯示相較於NH4h 10 kDa concentrate，FH2h 1 kDa concentrate於50 ppm低添加劑量下已能顯著提升脂肪細胞的丙三醇



圖二十七、添加 50 ppm FH2h 1kDa concentrate 觀察不同培養時間對 3T3-L1 脂肪細胞中 HSL 移位之影響 (螢光顯微鏡放大倍率 $\times 400$)。

Figure 27. Time course of FH2h 1 kDa concentrate on translocation of HSL in 3T3-L1 adipocyte. The cells were observed in fluorescence microscope with $\times 400$ magnification.

釋放量，且經模擬腸胃道酵素處理，並不影響其促進丙三醇釋放的活性。FH2h 1 kDa concentrate 促進脂解的活性，初步結果顯示可經由促進細胞中 HSL 磷酸化與移位作用，促進脂解作用的進行。

許多研究指出 HSL 磷酸化可能機制為，透過刺激 β -adrenergic receptor 或抑制 α 2-adrenergic receptor 並活化腺苷酸環化酶，促使 ATP 轉變 cAMP，最後活化 PKA (Holm, 2003)，PKA 活化後促進 HSL 磷酸化並往脂肪表面移動，促使脂肪細胞內的脂解作用 (Clifford et al., 2000)，或是透過 MAPK/ERK 路徑活化 PKC，並促進 HSL 磷酸化作用 (Greenberg et al., 2001)。此外亦可透過專一性的受體直接活化脂肪細胞中的 PKG，進而使 HSL 被磷酸化 (Sengenès et al., 2003)。或是降低胰島素對脂肪細胞的抗脂肪分解活性，而胰島素無法拮抗腎上腺素的活性，間接使腎上腺素促進脂肪細胞中 HSL 的磷酸化作用 (Szkudelska et al., 2008)。因此未來可進一步純化大豆胜肽，以提升脂解作用的活性，生產出純度更高的胜肽後，探討更詳細的機制路徑。另外，在腸胃道實驗方面，也可利用各種不同多醣蛋白的包埋方式 (Lee and Yuk, 2007)，使其純化後的大豆胜肽通過腸胃道後仍能保留水解物的機能性。

伍、結論

依據本研究的結果發現，ISP 分別經 Neutrased 與 Flavourzyme 水解，於特定水解時間所生產的 ISPH 可促進 3T3-L1 脂肪細胞的脂解作用，以水解率 7.42 %，產率 0.65 mg/ml 的 FH2h 降低脂肪細胞脂質堆積的效果最佳，NH4h 與 FH2h 可顯著促進脂肪細胞丙三醇的釋放 ($p < 0.05$)，並造成細胞中三酸甘油酯殘留量的下降。此外經毒性試驗證實，分別添加 1600 ppm NH4h 與 FH2h 不影響細胞的存活率。其次利用膜反應系統區分 NH4h 與 FH2h，結果顯示透過 300 Da-30 kDa MWCO 濾膜能有效生產出不同分子量大小的濃縮物與濾液。其中以 800 ppm NH4h 10 kDa concentrate 以及 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate 對於促進脂肪細胞脂解作用有較顯著的活性 ($p < 0.05$)。添加濃縮物後隨著培養時間的增加，會溫和促進脂解作用，於 72 h 時達到最高丙三醇釋放量。另外經由毒性試驗證實，本研究所生產的濃縮物具不傷害細胞正常生長的優點。於模擬腸胃道試驗中，NH4h 10 kDa concentrate 其促進脂解活性會受到腸道酵素的破壞，然而 FH2h 1 kDa concentrate 的活性不受腸胃道酵素的影響。

最後對脂肪細胞中關鍵脂解酶進行蛋白質表現以及螢光免疫染色法分析，結果顯示添加 50 ppm FH2h 1 kDa concentrate，會增加關鍵脂解酶 HSL 的磷酸化以及移位作用，進而促進細胞脂解作用的進

行。因此證實大豆胜肽可能藉由活化脂肪細胞中的 HSL 而達到增強脂質分解的效果。本研究生產出可溫和促進脂肪細胞脂解作用進行之大豆胜肽，並且具有不傷害正常細胞生長與通過腸胃道酵素水解後仍具活性的優點，可開發為降脂相關的保健食品。經由機制探討，初步了解大豆胜肽促進脂解作用的可能路徑，但對於大豆胜肽提升脂解活性之詳細機制仍有待進一步評估。除了 HSL 活化的調控路徑外，將脂肪細胞油滴表面上的結構蛋白 perilipin 磷酸化，也會促進脂解作用的進行 (Sztalryd et al, 2003 ; He et al, 2006)。未來可利用製備型管柱生產出純度更高的胜肽後，探討更詳細的機制，並經由胺基酸定序得知機能性胜肽的胺基酸組成。

陸、參考文獻

- 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。
- Albright, A. L. and Stern, J. S. (1998) Adipose tissue. In: Encyclopedia of Sports Medicine and Science.
- Allison, D. B., Gadbury, G., Schwartz, L. G., Murugesan, R., Kraker, J.L., Heshka, S., Fontaine, K.R. and Heymsfield, S.B. (2003) A novel soy-based meal replacement formula for weight loss among obese individuals: a randomized controlled clinical trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57:514-522.
- Ailhaud, G. (1982) Adipose cell differentiation in culture. *Mol. Cell Biochem.* 49:17-31.
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M. and Cook-Newel, M. E. (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipid. *N. Engl. J. Med.* 333:276-282.
- Anderson, J. W., Smith, B. M. and Washnock, C. S. (1999) Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 464S-474S.
- Anson, M. L. (1957) Extraction of Soy protein. US Patent 2:785.
- Aoyama, T., Fukui, 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). *Nutri.* 16:459-460.
- Aoyama, T., Kohono, M., Saito, T., Fukui, K., Takamatsu, K., Yamamoto, T., Hashimoto, Y., Hirtosuka, M. and Kito, M. (2001) Reduction by phytate-reduced soybean β -conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:1071-1075
- Arner, P. (2005) Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19:471-482.
- Baggott, J.E., Ha, T., Vaughn, W.H., Juliana, M.M., Hardin, J.M. and Grubbs, C.J. (1994) Effects of Miso (Japanese soybean paste) and NaCl on DMBA-induced rat mammary tumors, *Nutr. Cancer* 14:103-109.
- Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D. and Carlson, J. (1990) Soybeans

- inhibit mammary tumors in models of breast cancer, *Prog. Clin. Biol. Res.* 347:239-253.
- Barnes, S., Peterson, T.T.G. and Coward, K.D. (1995) Rationale for the use of genistein-containing soy materials in chemoprevention trials in breast and prostate cancer, *J. Cell. Biochem. Suppl.* 22:181-187.
- Bernloir, D. A., Angus, C. W., Lane, M. D., Bolanowaki, M. A. and Kelly, T. J. (1984) Expression of specific mRNA during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:5468-5472.
- Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Baver, T., Coxey, R. A., Takeda, T., Rondinone, C. M., Theodorakis, J. L., Greenberg, A. S. and Londos, C. (1995) Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets. *J. Lipid Res.* 36:1211-1226.
- Brasaemle, D. L. (2007) The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48:2547-2551.
- Brasaemle, D. L., Levin, D. M., Adler-Wailes, D.C. and Londos, C. (2000) The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim. Biophys. Acta.* 1483:251-262.
- Cannon, B. and Nedergaard, J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84:277-359.
- Carroll, K. K. (1991) Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. *J. Am. Diet. Assoc.* 91:820-827.
- Casteilla, L., Pénicaud, L., Cousin, P. and Calise, D. (2001) Choosing an adipose tissue depot for sampling. In: Ailhaud G, ed. *Adipose tissue protocols*. Totowa: Humana Press. Vol. 155:1-19.
- Champman, A. B., Knight, H., Dickmann, B. S. and Ringold, G. M. (1984) Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of developmental program. *J. Biol. Chem.* 259:15548-15555.
- Chen, J., Suetsuna, K. and Yamauchi, F. (1995) Isolation and characterization of immunostimulative peptides from soybean. *J Nutr. Biochem.* 6:310-313.
- 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., Tsou, 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.
- Choi, H.S., Cho, H.Y., Yang, H.C., Ra, K. S., and Suh, H.J. (2001) Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Res. Int.* 34:177-182
- Church, F. S., 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.
- Clifford, G., Londos, C., Kraemer, F. and Vernon, R. (2000) Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocyte. *J. Biol. Chem.* 275:5011-5015.
- Cornelius, P., MacDougald, O. A. and Lane, M. D. (1994) Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 14:99-129.
- Corredig, M. and Dalgleish, D. G. (1997) Studies on the susceptibility of membrane-derived proteins. *Food Res. Int.* 30:689-697.
- Dani, C., Amri, E. Z., Bertrand, B., Enerback, S., Bjursell, G., Grimaldi, P. and Ailhaud, G. (1990) Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipose conversion. *J. Cell Biochem.* 43:103-110.
- Darlington, G. J., Ross, S. E. and MacDougald O. A. (1998) The role of C/EBP gene in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 273:30057-30060.
- Darmon, M., Serrero, G., Rizzino, A. and Sato, G. (1981) Isolation of myoblastic, fibro-adipogenic, and fibroblastic clonal cell lines from a common precursor and study of their requirements for growth and differentiation. *Exp. Cell Res.* 132:313-327.
- Egan, J. J., Greenberg, A. S., Chang, M. K., Wek, S. A., Jr, M. M. C. and Londos, C. (1992). Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:8537-8541.
- FitzGerald, R. J. and MEisel, H. (2000) Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *J. Nutr.* 84:33-37.
- Fredrikson, G., Stralfors, P., Nillsson N.O. and Belfrage P. (1981) Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 256:6311-6320.

- Garruti, G. and Ricquier, D. (1992) Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 16:383-390.
- Gonzalez-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Paez, M. P. and Guadex, E. M. (1994) Enzymatic hydrolysis of whey protein II. Molecular-weight range. *Biotechnol. Bioeng.* 44:529-534.
- Green, H. and Kehinde, O. (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5:19-27.
- Green, H. and Kehinde, O. (1976) Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7:105-113.
- Green, H. and Kehinde, O. (1974) Sublines of 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1:113-116.
- Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Garty, N. B., Blanchette-Makie, E. J. and Lodos, C. (1991) Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplet. *J. Bio. Chem.* 266:11341-11346.
- Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Moos, M. and Kimmel, A. R. (1993) Isolation for cDNA perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated protein of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:12035-12039.
- Greenberg, A. S., Shen, W. J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S. C., Roth, R. A. and Kraemer, F. B. (2001) Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol.Chem.* 276:45456-45461.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78:783-809.
- Guadix, A., Camacho, F. and Guadix, E. M. (2006) Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *J. Food Eng.* 72:398-405.
- Hakkak, R., Korourian, S., Shelnut, S.R., Lensing, S., Ronis, M.J.J. and Badger, T.M. (2000) Diets containing whey protein or soy protein isolate protect against 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary tumors in female rats, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9:113-117.
- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky,

- D., Wagner, E. F., Klingenspor, M., Hoefler, G. and Zechner, R. (2006) Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase, *Science* 312:734-737.
- Hamada, J. S. (1991) Membrane reactor for enzymic deamidation of food proteins. *J Food Sci.* 56(6):1725-1728.
- Hanson, R. W. and Ballard, F. J. (1967) The relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. *Biochem. J.* 105:529-536.
- Harmon, A. W. and Harp, J. B. (2001) Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J. Physiol Cell Physiol.* 280: C807–C813.
- Hauner, H. (1990) Complete adipose differentiation of 3T3-L1 cells in a chemically defined medium: comparison to serum-containing culture conditions. *Endocrinol.* 127:865-872.
- Hauner, H (2004) The new concept of adipose tissue function. *Physiol. Behavior.* 83:653–658
- He, J., Jiang, H., Tansey, J. T., Tang, C., Pu, S. and Xu, G. (2006) Calyculin and okadaic acid promote perilipin phosphorylation and increase lipolysis in primary rat adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761:247-255.
- Hiragun, A., Sato, M. and Mitsui, H. (1980) Establishment of clonal cell line that differentiates into adipose cell in vitro. *In vitro.* 16:685-693.
- Hollenberg, C. H., Raben, M. S. and Astwood, E. B. (1961) The lipolytic response to corticotrophin. *Endocrinology.* 68:589-598.
- Holm, C. (2003) Molecular mechanisms regulating hormone- sensitive lipase and lipolysis. *Soc. Trans.* 31:1120-1124.
- Isley, W. L., Miles, J. M., Patterson, B. W. and Harris, W. S. (2005) The effect of high-dose simvastatin on triglyceride-rich lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Lipid Res.* 47:193-200.
- Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W., Sims, H. F., Gibson, B. and Gross, R. W. (2004) Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylgly- cerol transacylase activities, *J. Biol. Chem.* 279:48968–48975.
- Jequire, E. and Tappy, L. (1999) Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* 79:451-480.

- Jocken, J. W., Smit, E., Goossens, G. H., Essers, Y. P., van Baak, M. A., Mensink, M., Saris, W. H. and Blaak, E. E. (2008) Adipose triglyceride lipase (ATGL) expression in human skeletal muscle is type I (oxidative) fiber specific, *Histochem. Cell Biol.* 129:535-538.
- Juan, C. C., Chang, C. L., Lai, Y. H. and Ho, L. T. (2004) Endothelin-1 induces lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Physiol Endocrinol Metab.* 288:1146-1152.
- Kamabra, H., Motohiko, H., Takamatsu, K. and Kito, M. (2002) Triglyceride lowering effect of soybean β -conglycinin in humans. *Ther. Res.* 23:85-89.
- Kerckhoffs, D. A. J. M., Brouns, F., Hornstra, G. and Mensink R. P. (2002) Effects on human serum lipoprotein profile of β -Glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. *J. Nutr.* 132:2494-2505.
- Kershaw, E. E., Hamm, J. K., Verhagen, L. A., Peroni, O., Katic, M. and Flier, J. S. (2006) Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin, *Diabetes.* 55:148-157.
- Kim, H. J., Bae, I. Y., Ahn, C. W., Lee, S. and Lee, H. G. (2007) Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. *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. Y., Tillison, K., Lee, J. H., Rearick, D. A. and Smas, C. M. (2006) The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291:E115–E127.
- Kovsan, J., Ben-Romano, R., Souza, S. C., Greenberg, A. S. and Rudich, A. (2007) Regulation of adipocyte lipolysis by degradation of the perilipin protein. Nelfinvir enhances lysosome-mediated perilipin proteolysis. *J Biol. Chem.* 282:21704-21711.
- Kozak, L. P. and Jensen, J. T. (1974) Genetic and developmental control of multiple forms of L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 249:7775-7781.
- Kuczmarski, R. J., Flegal, K. M., Campbell, S. M. and Johnson, C. L. (1994). Increasing prevalence of overweight among US adults. *The*

- National Health and Examination Surveys, 1960 to 1991. *Jama*. 272(3):205-211.
- Langin, D. (2006) Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacological Res.* 53:482-491.
- Lasekan, J. B., Larissa, G. and Sukur, K. (1995) Influence of dietary golden pea proteins versus casein on plasma and hepatic lipids in rats. *Nurs. Res.* 15:71-84.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G. and Zechner, R. (2006) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome, *Cell. Metab.* 3:309-319.
- Lavigne, C., Marette, A. and Jacques, H. (2000) Cod and soy protein compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am. J. Physiol. Metab.* 278:E491-E500.
- Lee, K. Y. and Yuk, S. H. (2007) Polymeric protein delivery systems. *Prog. Polym. Sci.* 32:669-697.
- Lee, M. S., Kwun, I. S., Kim, Y. (2008) Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Genes Nutr.* 2:327-330
- Lovati, M. R., Manzoni, C., Corsini, A., Granata, A., Frattini, R., Fumagalli, R. and Sirtori, C. R. (1992) Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. *J. Nutr.* 122:1971-1978.
- Lovati, M. R., Manzoni, C., Gianazza, E., Arnoldi, A., Kurowska, E. and Carroll, K. K. (2000) Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J. Nutr.* 130:2543-2549.
- MacDougald, O. A., Hwang, C. S., Fan, H. and Lane, M. D. (1995) Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:9034-9037.
- Manzoni, C., Duranti, M., Eberini, I., Scharnag, H., Marz, W., Castiglioni, S. and Lovati, M. R. (2003) Subcellular localization of soybean 7S globulin in HepG2 cells and LDL receptor up-regulation by its alpha' constituent subunit. *J. Nutr.* 133:2149-2155.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N. and Suzuki, H.

- (1987) Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Bio. Chem.* 51:1581-1586.
- Meeker, D. R. and Kesten, H. D. (1941) Effect of high protein diets on experimental atherosclerosis of rabbits. *Arch. Pathol.* 31:147-162.
- Mersmann, H. J. (2002) Bioregulation of adipocyte growth and differentiation. *Semin. Plast. Surg.* 16:195-198.
- Messina, M., Persky, V., Setchell, K.D. and Barnes, S. (1994) Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data, *Nutr. Cancer* 21:113-131.
- Moller, D. E. and Flier, J. S. (1991) Insulin resistance: mechanisms, syndromes, and implaction. *N. Engl. J. Med.* 325:938-948.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- Moure, A., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (2006) Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochem.* 40:447-456.
- Nagasawa, A., Fukui, K., Kojima, M., Kishida, K., Maeda, N., Nagaretani, H., Hibuse, T., Nishizawa, H., Kihara, S., Waki, M., Takamatsu, k., Funahashi, and Nishizawa, H., (2003) Divergent effects of soy protein diet on expression of adipocytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311:909-914.
- Negrel, R., Grimaldi, P. and Ailhaud, G. (1978) Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:6054-6058.
- Ntambl, J. M. and Kim Y. C. (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 130:3122S-3126S.
- O'Shea Alvarez, M. S. (1991) 3T3 cells in adipocytic conversion. *Arch. Invest. Med.* 22:235-244.
- Park, Y., Storkson J. M., Liu, W., Albright, K. J., Cook, M. E. and Pariza, M. W. (2004) Structure-activity relationship of conjugated linoleic acid and its cognates in inhibiting heparin-releasable lipoprotein lipase and glycerol release from fully differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutri. Biochem.* 15:561-569.
- Paulauskis, J.D. and Sul, H. S. (1988) Clonin and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. *Developmental and*

- hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 263:7049-7054.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001) Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory. *Trends Food Sci. Technol.* 11:347-356.
- Prins, J. B. and O'Rahilly, S. (1997) Regulation of adipose cell number in man. *Clin. Sci.* 92:3-11.
- Rangwala, S. M. and Lazar, M. A. (2000) Transcriptional control of adipogenesis. *Annu. Rev. Nutr.* 20:535-59.
- Rayalam, S., Della-Fera, M. A., Yang, J. Y., Park, H. J. Ambati, S. and Baile, C. A. (2007) Resveratrol Potentiates Genistein's Antiadipogenic and Proapoptotic Effects in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Nutri. GA* 30602-2771.
- Reid, B. N., Ables, G. P., Otlivanchik, O. A., Schoiswohl, G., Zechner, R., Blaner, W. S. Goldberg, I. J. Schwabe, R. F., Chua Jr, S. C. and Huang, L. S. (2008) Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis, *J. Biol. Chem.* 283:13087-13099.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M. and Hanson, R. W. (2003) Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 278:30413-30416.
- Robinson, J. and Newsholme, E. A. (1969) The effect of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. *J. Biochem.* 112:449-453.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. and Spiegelman, B. M. (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14:1293-1307.
- Rosen, E. D. and Spiegelman, B. M. (2000) Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:145-171.
- Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *J. Biochem.* 345:161-179.
- Rubin, C. S., Hirsch, A., Fung, C. and Rosen, O. M. (1978) Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte from 3T3-L1 cells. *J. Bio. Chem.* 253:7570-7578.
- Rudich, A., Ben-Romano, R., Etzion, S. and Bashan, N. (2005) Cellular mechanisms of insulin resistance, lipodystrophy and atherosclerosis induced by HIV protease inhibitors. *Acta Physiol. Scand.* 183:75-88

- Samuelsson, E. G. and Poulsen, O. M. (1992) Peptide preparation, a process for producing it and use of the peptide preparation. United States Patent 5,112,812.
- Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C. and Jacobsen, P. (2006) Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem.* 282:40236-40241.
- Sengenès, C. Bouloumiè, A., Hauner, H. Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M. and Galitzky, J. (2003) Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J. Bio. Chem.* 278:48617-48626.
- Shakur, Y., Holst, L. S., Landstrom, T. R., Movsesian, M., Degerman, E. and Manganiello, V. (2001) Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 66:241-277.
- Shepherd, P. R., Gnudi, L. and Tozzo, E. (1993) Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose development. *Cell Growth Differ.* 8:1091-1098.
- 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.
- Smirnova, E., Goldberg, E. B., Makarova, K. S., Lin, L., Brown, W. J. and Jackson, C. L. (2006) ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells, *EMBO Rep.* 7:106-113.
- Spiegelman, B. M., Choy, L., Hotamisligil, G., Graves, R. A. and Tontonoz, P. (1993). Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J. Biol. Chem.* 268:6823-6826.
- Steinberg, D., Vaughan, M. and Margolis, S. (1961) Studies of triglyceride biosynthesis in homogenates of adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 236:1631-1637.
- Stralfors, P., Bjorgell, P. and Belfrage, P. (1984) Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: Identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3317-3321.

- Szkudelska K. Nogowski, L Szkudelski T. (2008) Genistein, a plant-derived isoflavone, counteracts the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J. Steroid Biochem. & Molecular Biolo.* 109:108-114.
- Sztalryd, C., Komaromy, M. C. and Kraemer, F. B. (1995) Overexpression of hormone-sensitive lipase prevents triglyceride accumulation in adipocytes. *J. Clin. Invest.* 95:2652-2661.
- Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J. T., Contreras, J. A. Kimmel, A. R. and Londos, C. (2003) Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* 161:1093-1103.
- Takamatsu, K., Tachibana, N., Matsumoto, I. and Abe, K. (2004) Soy protein functionality and nutrigenomic analysis. *Biofactors* 20:49-53.
- Tien, C. J. and Chiang, B. H. (1992) Filtration of soy sauce by ceramic membrane. *J. Food Sci.* 57(3):740-742.
- Toth, M. J. and Tchernof, A. (2000) Lipid metabolism in the elderly. *Eur. J. Clinical Nur.* 54:S121-S125.S121–S125.
- Vaughan, M., Berger, J. E. and Steinberg, D. (1964) Hormone-sensitive lipase and monoglycerol lipase activities in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 239:401-409.
- Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H. and Sul, H. S. (2004) Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 279 47066-47075.
- Weihua, N., Yasuyuki, T., Masanobu, S. and Katsumi, I. (1998) Dietary soy protein isolate, compared with casein, reduces atherosclerotic lesion area in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.* 128:1884-1889.
- Weiner, F. R., Smith, P. J., Wertheimer, S. and Rubin, C. S. (1991) Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 cells. Modulation of transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and steary-CoA desaturase-1. *J. Bio. Chem.* 266:23525-23528.
- Wang, S., Soni, K. G., Semache, M., Casavant, S., Fortier, M., Pan, L. and Mitchell, G. A. (2008) Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism* 95:117–126

- Wang, S. P., Laurin, N., Himms-Hagen, J., Rudnicki, M. A., Levy, E., Robert, M. F., Pan, L., Oligny, L. and Mitchell, G. A. (2001) The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes. Res.* 9:119-128.
- Wang, Y. W., 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.
- Wier, M. L. and Soctt, R. E. (1986) Regulation of terminal event in cellular differentiation: biological mechanisms of the loss of proliferative potential. *J. Cell Biol.* 102:1955-1964.
- Wilson, P. A., S. D. Gardner, N. M. Lambie, S. A. Commans and D. J. Crowther. (2006) Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J. Lipid Res.* 47: 1940-1949.
- Wolf, A. M. and Colditz, G. A. (1996) Social and economic effects of body weight in the United States. *Am J. Clin. Nutr.* 63 (3 Suppl):466S-469S.
- Wu, J. P. and Ding, X. L. (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-Hafez, 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, J. Y., Della-Fera, M. A. and Baile, C. A. (2008) Guggulsterone Inhibits Adipocyte Differentiation and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Cells. *Obesity* 16:16-22.
- Young, V.R. (1991) Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *JAMA.* 91: 828–835.
- Zechner, R., J. G. Strauss, G. Haemmerle, A. Lass, and R. Zimmermann. (2005) Lipolysis: pathway under construction. *Curr. Opin. Lipidol.* 16: 333–340.
- 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. Interac.* 40:756-762
- Zimmermann, R., Strauss, J. G. and Haemmerle, G. (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-1386.

Zimmermann, R., Lass, A., Haemmerle, G. Zechner, R. (2009) Fate of fat:
The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim. Biophys.
Acta* 1791:494-500.