

## 壹、文獻回顧

### 一、膳食蛋白質對脂質的影響

食物中的蛋白質以植物性蛋白質較動物蛋白質更有益於人體健康，例如降低膽固醇、控制肥胖及降低癌症風險，特別是降低血膽固醇的功效已在動物與人體實驗得到證實(Carroll, 1991; Greaves *et al.*, 1992; Anderson *et al.* 1995 b ; Lasekan *et al.*, 1995; Danielle *et al.*, 2002)。以豆類食品為例，大豆蛋白已被證實具有降膽固醇與降三酸甘油酯的功效(Carroll, 1991 ; Potter, 1995 ; Potter, 1996; Lichtenstein, 1998 ; Potter, 1998 ; Wang *et al.*, 2004) , Greaves 等人(1992)分別以 15%的大豆蛋白與 15%的酪蛋白作為猴子的飼料蛋白質來源，經過三個月的餵食後，餵食大豆蛋白組的猴子有較低的血膽固醇、VLDL(very low density lipoprotein, VLDL)與 LDL(low density lipoprotein, LDL)含量。另外黃金豌豆蛋白也有類似的功能;利用大鼠分成四組分別餵食含有 20%黃金豌豆蛋白、20%酪蛋白、20%黃金豌豆蛋白添加膽固醇或 20%酪蛋白添加膽固醇的飼料持續四週，結果顯示餵食黃金豌豆蛋白的大鼠與餵食酪蛋白組比較，其血膽固醇、肝中膽固醇與血脂都有顯著下降的趨勢。即使對照在飲食中添加膽固醇的實驗組，黃金豌豆蛋白依舊可以降低血膽固醇與血脂含量。因此黃金豌豆蛋白較酪蛋白更具有降低血脂和血膽固醇的作用

(Lasekan *et al.*, 1995)。

許多研究顯示大豆蛋白具有多種機能，如：降膽固醇、抗肥胖、預防癌症、預防骨質疏鬆及改善女性更年期症狀等(Takamatsu *et al.*, 2004)。自 1941 年起，就已發現使用大豆蛋白取代動物性蛋白具有減少動脈硬化與高脂蛋白血症的功能(Meeker & Kesten, 1941)，同時並具有降低血膽固醇濃度的作用(Manson, 1992)。由於，大豆成分中的異黃酮也被證實具有降低血膽固醇的功能(Perea *et al.*, 1996; Kirk *et al.*, 1998)，因此為了證明大豆蛋白也具有降低膽固醇的特性，在 2002 年有研究利用疏水性吸附管柱去除分離大豆蛋白 (Isolated soy protein, ISP) 中的異黃酮，使其含量由原有的 3.91 mg/mL 下降至 0.01 mg/mL，再以此分離大豆蛋白作為飼料餵食老鼠，並與酪蛋白作為對照。比較分離大豆蛋白、去除異黃酮的分離大豆蛋白、及去除異黃酮的分離大豆蛋白但額外加純化異黃酮組別時，均有降低血中膽固醇的作用且彼此並無顯著差異，而酪蛋白組與酪蛋白添加純化異黃酮組則無此功效。這些結果顯示異黃酮的存在與否並不改變分離大豆蛋白的功能，也間接證實了分離大豆蛋白獨特的功效 (Fukui *et al.*, 2000)。另外，根據研究報告顯示，分離大豆蛋白、胜肽及胺基酸分別在降低血清中膽固醇及三酸甘油酯、抑制食慾及增加餐後碳水化合物氧化的功效方面各有其效果(莊, 2005)。特別是針

對降低老鼠血清中的三酸甘油酯，分別在飼料中添加 18%酪蛋白與大豆蛋白，觀察在進食兩小時內胰島素的變化，結果發現食用大豆蛋白的老鼠其血液中胰島素濃度上升幅度低於食用酪蛋白，但在兩小時後，兩組老鼠的胰島素濃度都恢復一致。餵食大豆蛋白組的老鼠，肝中 SREBP-1 (Sterol response element-binding protein-1, SREBP-1) 基因的 mRNA 表現量也持續的低於餵食酪蛋白組 (Ascencio *et al.*, 2004)。SREBP-1 被認為與脂肪酸合成、刺激脂肪酸合成的表現有關，會受到胰島素的刺激而提高 (Shimomura *et al.*, 1999)。上述實驗結果顯示，在大豆蛋白的存在下，胰島素與 SREBP-1 會被抑制，進而減少肝臟合成脂肪酸。除了上述短期觀察，使老鼠分別餵食含有酪蛋白或大豆蛋白的普通飼料與高油脂飼料 (15% 豬油) 持續 150 天，分析其體重、血清生化與肝中脂質等各項數值後發現，長期食用大豆蛋白組與高油脂大豆蛋白組的血中三酸甘油酯含量均低於食用含有酪蛋白之普通飼料組與含有酪蛋白之高油脂飼料組約 68%。在肝中三酸甘油酯的含量方面，餵食大豆蛋白組較酪蛋白組低約 70%，至於體重增加以食用高油脂的酪蛋白飼料最多，其次為食用高油脂大豆蛋白、酪蛋白，最後為單純食用大豆蛋白組。由此證明大豆蛋白不管在短時間或是長期的影響下都會抑制脂肪的形成。

## 二、蛋白質水解物之機能性

藉由控制水解反應條件，可以得到具有不同特性的水解物，同時，酵素水解也普遍的運用在改變蛋白質結構以促進蛋白質機能性 (Corredig and Dalgleish, 1997)。研究指出蛋白質水解物中的小分子片段具有重要的機能性，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)，因此常被作為膳食處方中嬰幼兒產品、成人病患或潛在過敏病患用產品 (Kong *et al.*, 2006)。

Kim 等人(2006)提出生物活性胜肽片段透過酵素水解的方式由食用蛋白質中釋放出來後，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 胺基酸片段所組成，其功能取決於胺基酸的種類與序列 (Pihlanto *et al.*, 2000)，目前已知的作用有提高吸收，促進免疫功能 (Chen *et al.*, 1995)，抗氧化 (Mendis *et al.*, 2005) 與降高血壓活性 (Chiang *et al.*, 2006)。

蛋白質水解物與其胜肽片段除了上述功能外，對於心血管相關疾病也有特殊功效。Ringseis 等人(2005)綜合多種酵素水解酪蛋白與大豆蛋白，並觀察水解物對動脈內皮細胞的影響後提出，特定酵素作用所得到的水解物可抑制內皮細胞生長並刺激細胞分泌 PGI<sub>2</sub> (prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>)；，一種可以預防粥狀動脈硬化的物質。另

一方面，酪蛋白與大豆蛋白的水解物也可以促進 NO 的濃度以使血管擴張。

大豆中的 7S globulin  $\beta$ -conglycinin 已被證實透過提高 LDL 受器的親合性而平衡血膽固醇( Lovati *et al.*, 1992, Manzoni *et al.*, 2003)與降低血脂(Aoyama *et al.*, 2001 ; Kambara *et al.*, 2002)。乳蛋白中的生物活性片段因其初級結構而具有抑制高血壓作用，且此片段可以透過腸道而吸收(Maruyama *et al.*, 1987; FitzGerald., 2000 )。以上結果都證明了，即使經歷了腸道與血液中酵素的作用，這些胜肽片段依舊可以被吸收到血液中，並有足夠的能力去改善生理表現。

也有多位作者提出，小片段胜肽或二、三胜肽片段較游離胺基酸易被腸道吸收(Samuelsson and Poulsen, 1987; Gonzalez -Tello *et al.*, 1994)。此外，分子量小於 2000 Da 的片段較能避免過敏反應，也不具苦味。事實上，當乳清蛋白胜肽大於 1000Da 時就會造成苦味。也就是說，片段長度小於 1000 Da 最適合做為機能性的發展(Kammoun *et al.*, 2003)。

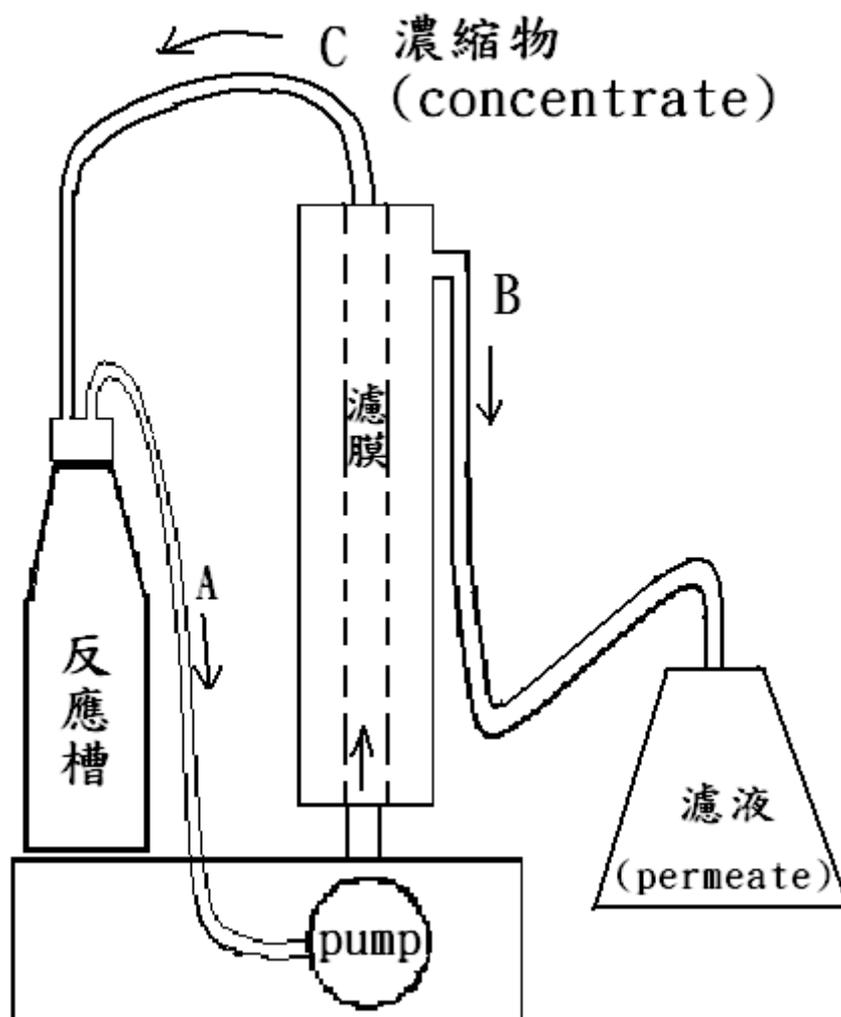
Iwai 等人(1987)的研究中指出，大豆蛋白水解物透過膽囊收縮素(cholecystokinin, CCK)來達到抑制食慾效果、抑制胃排空和胃酸分泌。膽囊收縮素最初是由腸道萃取物中分離而來，由小腸前段黏膜

細胞所分泌。分泌機制是由膽囊收縮素釋放因子(luminal cholecystinin-releasing factor)，一個對胰蛋白酶敏感的胜肽，釋放到腸道後而控制 CCK 的調節(Iwai *et al.*, 1987)。大豆蛋白水解物同時也可以提供抗氧化的功能，減少自由基與過氧化物所帶來的傷害。將分離大豆蛋白於 50°C、pH 8 以 Alcalase 作用八小時所得水解物其抑制能力大於傳統抗氧化物 glutathione，對亞麻油酸過氧化系統的抑制能力亦隨著添加濃度增加而提高。作者進一步指出，片段長平均為 7 的胜肽具有最好的抑制效果，有較好的穩定性與被腸道吸收能力，又不易引起免疫問題。一些研究也指出，水解物相較於原蛋白質有更高的機能性(Mullally *et al.*, 1997; Pihlanto-Leppala *et al.*, 1998)，Yoshie (2004)比較羽扇豆、分離羽扇豆蛋白以及羽扇豆蛋白水解物對兩種膽酸 chenodeoxycholate 與 deoxycholate 的結合作用後發現，羽扇豆蛋白水解物對兩者的結合能力優於羽扇豆與分離羽扇豆蛋白；尤其以對 deoxycholate 的結合效果更為重要，因為 deoxycholate 由腸道內微生物所產生，在過高濃度下會引起腸炎。透過與膽酸的結合，羽扇豆蛋白水解物具有有效降低膽固醇的效用，甚至優於降膽固醇藥物 cholestyramine。因此本研究將探討分離大豆蛋白經不同酵素水解後所得水解物，是否可進一步提升其降三酸甘油酯的機能，藉此篩選出最佳的蛋白水解酵素。

### 三、酵素膜反應系統之應用

傳統食品工業使用批式水解系統生產酵素水解物的產品，雖然批式水解在操作上簡單且容易控制作用結果，但是最大的缺點為酵素的損耗與花費(Rios *et al.*, 2004)。酵素固定化(Lamas *et al.*, 2001; Tardioli *et al.*, 2005)提供一個可連續生產與酵素回收的系統以提高整體產率，但在酵素的包埋技術或是難以維持反應槽中酵素總量仍使它在應用上有諸多限制。

連續酵素膜反應系統在反應環境下可同時區分混合的反應物與產物(Mannheim and Cheryan, 1990 ; Perea and Ugalde, 1996 ; Martin-Orue *et al.*, 1999 ; Prata-Vidal *et al.*, 2001; Guadix *et al.*, 2006;)。膜反應系統避免了傳統酵素批式作用的缺點，包括批式反應中仍有活性的酵素無法回收利用與產量低。產物的分子片段大小受到膜孔徑的影響，小分子胜肽片段可穿透膜上孔徑流出形成濾液，大分子片段的受質與酵素在系統內持續的循環，持續水解出小分子片段；唯一的缺點是膜反應系統中的濾液流量會隨著膜孔隙被未反應的基質阻塞或是小片段產量下降而減少(Giorno & Drioli, 2000; Rios *et al.*, 2004)。圖一為膜酵素反應系統循環途徑，分離大豆蛋白酵素水解液經幫浦由管線 A 進入濾膜，小分子片段透過濾膜上孔徑流出管線 B 形成液(permeate)，含有大分子片段的水解液，亦稱為濃縮物



圖一、酵素膜反應系統

Figure 1. Enzymatic membrane reactor system .

(concentrate)，自管線 C 回到原料槽與酵素繼續作用。連續膜分離系統除了可連續的生產水解物，亦可對水解物依其分子大小進行區分，本研究依序使用 30 kDa (kilo-daltons;kDa)、10 kDa、8 kDa、3 kDa、300 Da 孔徑大小的濾膜進行水解物的區分，以探討區分物中胜肽分子量大小對脂肪細胞油脂堆積的影響。

#### 四、脂肪細胞簡介

脂肪組織由脂肪細胞所構成，具有儲存能量、維持體溫、保護體內器官的功能。對於哺乳動物而言，分布於肌肉肝臟的脂肪組織，同時與腎臟、內分泌系統合作，維持醣類與脂質代謝的衡定。脂肪組織分為兩種：白色脂肪組織(white adipocyte tissue, WAT)與棕色脂肪組織(brown adipocyte tissue, BAT)。WAT 在體內呈現白色，主要作用為儲存能量，細胞在分化成熟後即具有儲存脂肪的能力，當生物體攝取的能量超過耗費的能量時，多餘的能量即以三酸甘油酯(triglycerides, TGs)形成脂肪球的形式儲存在細胞內。WAT 受到神經與內分泌的調控而釋出或儲存脂肪。BAT 因為佈滿血管呈現棕色而得名，它主要作為身體熱能來源，在成熟過程中會逐漸轉變成為具有儲存能量的 WAT(Casteilla *et al.*, 1989; Soppela *et al.*, 1991; Trayhurn *et al.*, 1993)，亦可透過 thymidine kinase 的刺激轉變成具有近似 WAT 功能的脂肪細胞(Kim, 2003)。BAT 在哺乳動物體中，

尤其對於冬眠與新生動物而言，可作為身體維持溫度的來源，而 BAT 中的非偶合蛋白質(uncoupling protein, UCP)存在於粒腺體內，則是供應熱能的來源(Himms-Hagen, 1990 ; Aquila *et al.*, 1985)。兩種脂肪組織均源自於各自的前驅脂肪細胞(preadipocyte)，經過分化的刺激後才會形成成熟的脂肪細胞(Student *et al.*, 1980)。以 WAT 為例，其前驅脂肪細胞在分化的刺激下，才會成為具有堆積脂肪能力的 WAT。脂肪組織的大小關鍵在於脂肪細胞的體積與數量(Herberg *et al.*, 1974)。動物體未出生時就有已分化的前驅脂肪細胞存在，成長過程中脂肪細胞內的油脂堆積會隨著攝取熱量大於消耗的熱量而增加，長期處於此狀況時，會引起更多前驅脂肪細胞數目的增加與分化，以儲存這些過多的熱量(Eleanor & Sharon, 1999)。脂肪細胞儲存油脂的關鍵在於前驅脂肪細胞的分化；以 BAT 為例，經由分化過程提高 Glc-6-phosphate dehydrogenase 與 malic enzyme 的表現，兩者產生更多的 NADPH 而使脂肪堆積(Garcia-Jimenez *et al.*, 1993)；在 WAT 中 G 型過氧化酶活化增生受體(peroxisome proliferator activated receptors  $\gamma$ , PPAR  $\gamma$ )的存在可以促使前驅脂肪細胞開始分化並堆積油脂(Mueller *et al.*, 2002 ; Tontonoz *et al.*, 1994 a )，PPAR  $\gamma$  屬於 PPARs (peroxisome proliferator activated receptors, PPARs) 家族，為細胞內荷爾蒙受器，在前驅脂肪細胞分

化時產生，與調節脂肪合成有關，當 PPAR  $\gamma$  表現量越高，前驅脂肪細胞分化程度越高，脂肪堆積能力越強(Barak *et al.*, 1999 ; Lazar, 2002 ; Mueller *et al.*, 2002 ; Ren *et al.*, 2002)。因此，若能有效抑制前驅脂肪細胞的生長便能降低其數量，同時抑制其分化即可降低油脂堆積。

至於已存在於生物體內過多的脂肪組織而言，可以特定蛋白質誘導脂肪細胞失去儲存脂肪的能力或使脂肪細胞內脂肪降解。Orci 等人(1998)將基因肥胖鼠以外源病毒感染的方式提高鼠體內瘦體素(leptin)的分泌量並於飼養 14 天後犧牲。瘦體素主要由 WAT 所分泌，可調節動物的能量代謝與攝食(Zhang *et al.*, 1994; Halaas *et al.*, 1995)，結果顯示鼠體內的 WAT 在大量的瘦體素影響下促進細胞內脂肪的消耗，減少脂肪合成酵素的表現並提高粒腺體合成能力，粒腺體在 BAT 內主要功用為消耗脂肪產生熱能。透過瘦體素的影響，WAT 改變原有堆積脂肪的功能並開始消耗細胞內脂肪含量，因此本研究以分離大豆蛋白水解物觀察是否具有相同作用，並在實驗設計上將同時觀察分離大豆蛋白水解物分別針對前驅脂肪細胞數量的生長、分化後油脂堆積能力與成熟脂肪細胞油脂含量做討論。

## 五、脂肪代謝機制

哺乳類動物體內以脂肪細胞中的 TGs 來協助能量的儲存，且 TGs 佔該細胞 95%的體積。在適當的刺激下會使這些細胞釋出脂肪酸 (fatty acids, FAs) 作為能量來源。TGs 一旦開始分解，就會持續的進行，一直到產生一分子的丙三醇與三分子的 FAs，但是他們的比例未必絕對以 3:1 的形式出現，因為部分 FAs 會重新被脂肪細胞所利用，甚至做為新的 TGs 合成(Arner, 2005)。脂肪分解的關鍵酵素為 hormone-sensitive lipase (HSL)(Stralfors *et al.*, 1984)，細胞內的 cAMP 可活化 cAMP-dependent protein kinase (PKA) 而使 HSL 被磷酸化而具有活性。原本散佈於細胞內的 HSL 在收到脂肪分解的訊號後，會集中於細胞內的油滴上準備代謝 TGs，並分解油滴上負責保護油脂儲存作用的蛋白質 perilipin A。除了透過 HSL 作為脂肪分解的關鍵酵素外，尚有研究指出 adipose triglyceride lipase (ATGL) 亦可能為水解 TGs 第一個酯鍵的酵素(Zimmermann *et al.*, 2004)。在 HSL 基因剔除(HSL-knock out; HSL-KO)的小鼠身上可以發現 diglycerides(DGs)的累積，顯示脂肪水解酵素不僅侷限於 HSL 的作用。脂肪細胞內 TGs 經由三種酵素作用而形成丙三醇(glycerol)，此三種酵素為 ATGL、HSL 與 MGL(monoglyceride lipase)，在不同酵素作用下使 TGs 逐步釋放出 FAs 與丙三醇(Arner, 2005)。首先 ATGL 與

HSL 先對 TGs 做初步的分解，形成 FAs 與 DGs。HSL 又對 DGs 進一步作用產生 FAs 與 MGs(monoglycerides)，最後 MGL 將 MGs 分解成 FAs 與丙三醇。雖然 HSL 同時對 TGs 與 DGs 作用，但是它對 DGs 水解作用的專一性遠高於對 TG 達 10 倍左右(Fredrikson *et al.*, 1981)。也就是說，TGs 的水解主要來自於 ATGL 的作用。Zimmermann 等人(2004)也提出，ATGL 為 TGs 水解的關鍵步驟，提供了 DGs 做為基質以促使之後 HSL 的作用，若提高 ATGL 的表現會促進 FAs 與丙三醇的釋放(Zimmermann *et al.*, 2004)。

細胞透過不同的方式可以調節脂肪分解。首先，脂解步驟會因為荷爾蒙或其他調節因子的作用，表現在血液中的 FAs 與丙三醇濃度上(Carey *et al.*, 1998 ; Langin *et al.*, 2000 ; Frayn *et al.*, 2003 ; Large *et al.*, 2004)。在老鼠體內已確定有數種荷爾蒙可促進脂解的產生，人體中的部份生長荷爾蒙對脂解作用也有長期性的影響，而性別、年齡與運動乃至於營養和基因特異性都對脂解有所影響(Arner, 2005)。本研究探討分離大豆蛋白水解物是否能降低成熟脂肪細胞中油脂的堆積，並藉由測定細胞培養液中的丙三醇含量，探討脂解酶的活性與脂肪堆積的關連性。

## 六、脂肪細胞模式的建立

對於脂肪代謝的研究模式分為動物實驗與細胞實驗，而動物實

驗又分為動物飼養與活體細胞初級培養。動物實驗由於耗費不貲，牽涉道德倫理問題，所以細胞模式成為替代動物實驗的方案。目前細胞模式所使用的細胞株有 3T3-L1 與 3T3-F442(Ross *et al.*, 2000)。

自小鼠胚胎所分離的前驅脂肪細胞，在荷爾蒙的刺激下，依舊可以透過分化而成為成熟的脂肪細胞(Green and Kehinde, 1975)。目前應用 3T3-L1 細胞模式的研究很多，如探討胰島素抗性、糖尿病與肥胖的關係(Himms-Hagen *et al.*, 2005; Isley *et al.*, 2005; )，脂肪代謝路徑(Orlicky *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2003; Snyder *et al.*, 2005)，特別是抑制脂肪生成作用(Choi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006)。因此細胞模式可以成功的模擬動物實驗中前驅脂肪細胞的分化行為，本研究使用 3T3-L1 前驅脂肪細胞作為觀察 ISPH 對其生長與分化是否有抑制作用，以及是否對 3T3-L1 成熟脂肪細胞脂肪堆積有所影響，以此建立一個技術平台，可用於篩選降低脂肪含量與促進脂肪分解的大豆蛋白水解物。