

## 參、結果與討論

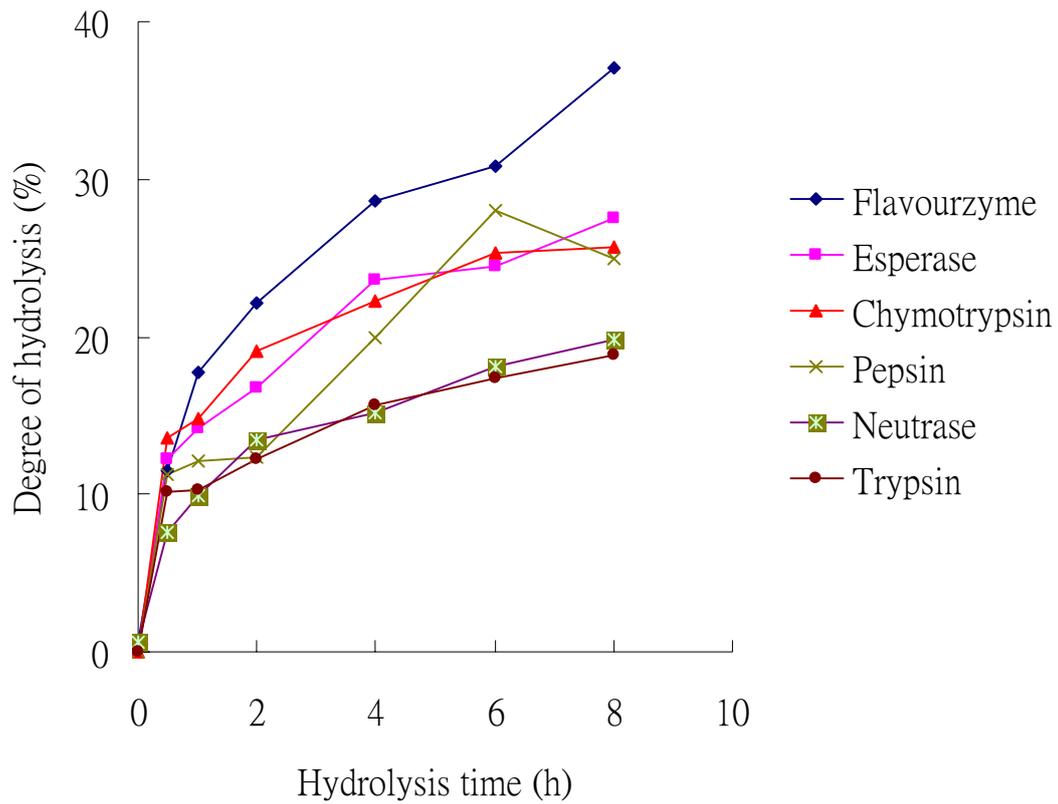
### 一、分離大豆蛋白水解物特性分析

圖三為不同酵素與水解時間對分離大豆蛋白(Isolated soy protein; ISP)水解率之影響。所使用的酵素包括 Flavourzyme、Pepsin、Neutrase、Trypsin、Chymotrypsin 與 Esperase，所有酵素水解 ISP 的水解率均隨時間增加而提高，當水解時間以 1-8 h 時，水解率由大到小依序為 Flavourzyme、Esperase、Chymotrypsin、Pepsin、Neutrase、與 Trypsin，其中以 Flavourzyme 水解效果最佳，當水解時間為 8 h 時即可達最大水解率 37.11%；由此可以確定不同酵素對 ISP 隨著時間而有持續的水解作用，產生更多的水解片段，但是否水解率愈高的水解物，即代表具有較佳的降三酸甘油酯或降脂肪的作用則有待進一步的以 3T3-L1 前驅脂肪細胞來進行評估，因此後續將探討上述所有 ISPH 對脂肪細胞的生長、分化與成熟等各階段培養之影響，以篩選出最具有降三酸甘油酯作用之大豆胜肽。

### 二、分離大豆蛋白水解物對脂肪細胞之影響

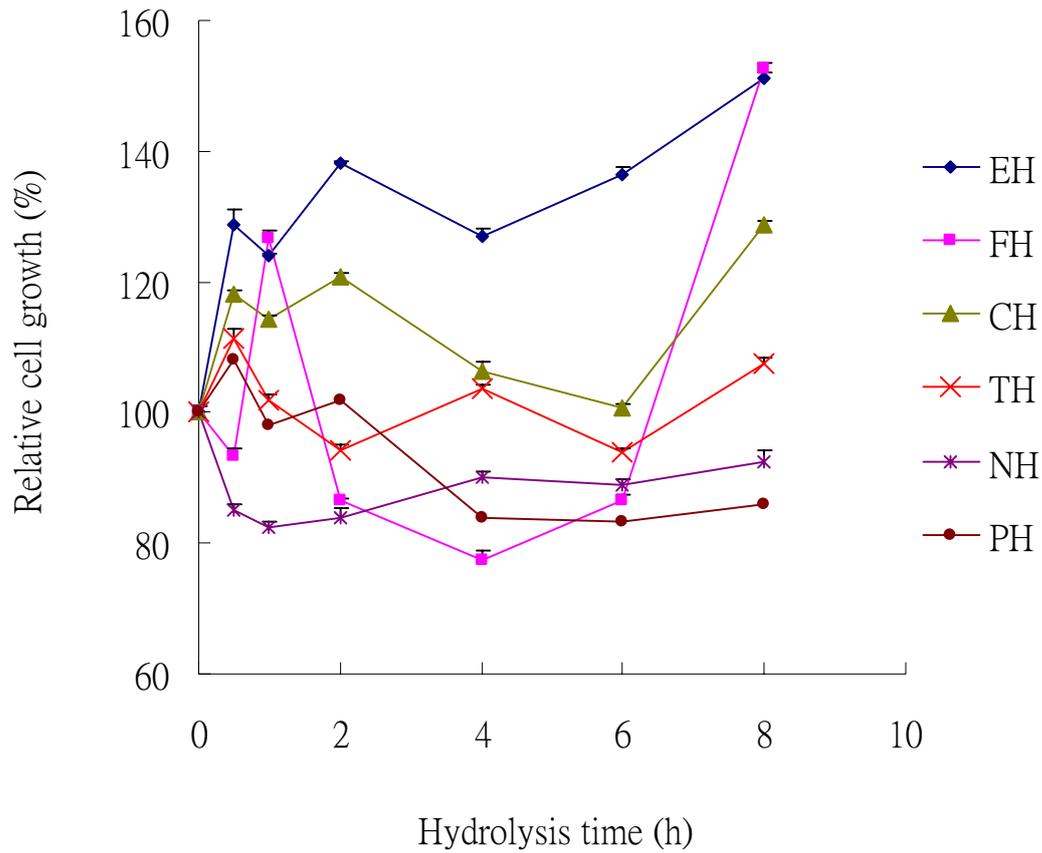
本實驗分成三部分，分別討論分離大豆蛋白水解物(ISP hydrolysates; ISPH)對前驅脂肪細胞的生長、前驅細胞的分化與成熟脂肪細胞脂肪堆積的影響。

#### (一)、ISPH 對前驅脂肪細胞的生長影響



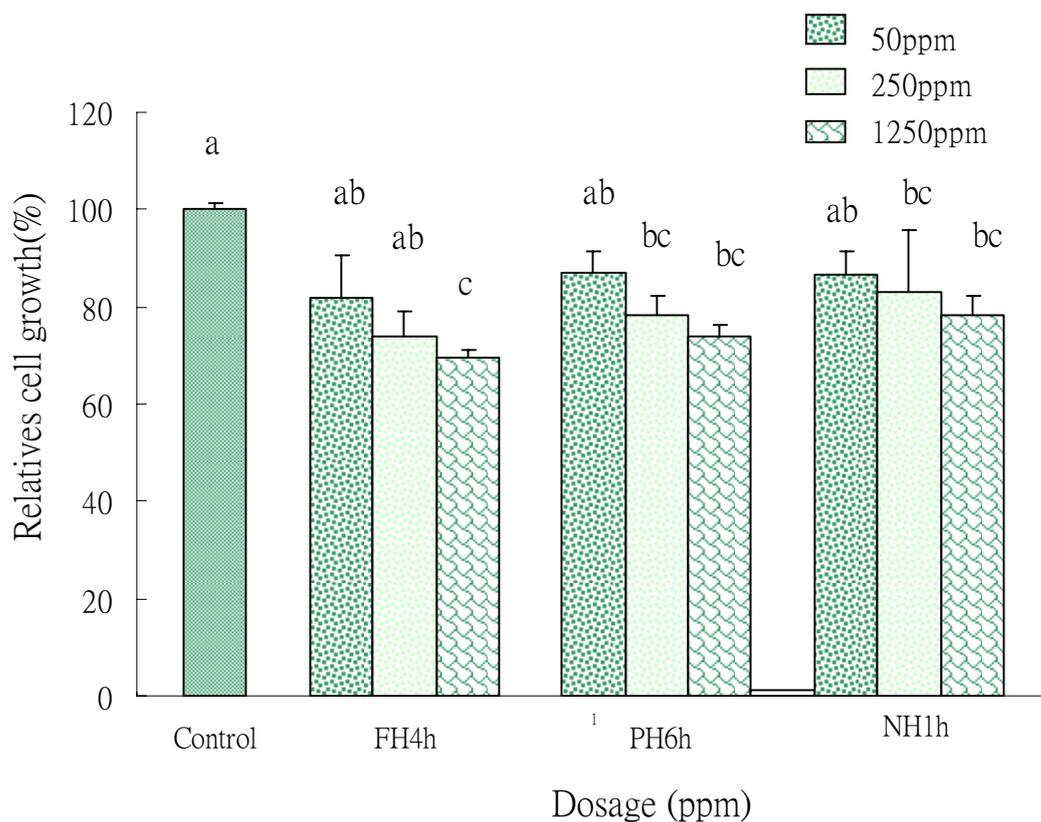
圖三、不同酵素與水解時間對分離大豆蛋白水解率之影響  
 Figure 3. Effect of different enzymes and hydrolysis time of isolated soy protein on degree of hydrolysis.

圖四為探討不同酵素的水解時間所得 ISPH 對 3T3-L1 前驅脂肪細胞相對生長率之影響，ISP 分別經六種酵素在水解 0.5-8 h 分別取樣離心後冷凍乾燥所得之 ISPH，各取 50 ppm 的劑量添加於前驅脂肪細胞培養液中，72 h 後以 tryphan blue 計算總細胞數。前驅脂肪細胞經過培養後，結果顯示，Esperase、Chymotrypsin 水解所得水解物對於前驅細胞生長均呈現促進的趨勢，其中以 Esperase-ISP 水解物 (EH)，在 72 h 內其細胞相對生長率均可達 120% 以上，甚至高達 150%。Neutrased-ISP (NH) 的水解物均可抑制前驅細胞生長的作用，特別是在水解 1 h 有較明顯的效果。其他產物如經由 Pepsin、Trypsin、Flavourzyme 所得水解物則因不同水解時間而分別有促進或抑制行為。由於本研究的目的為尋找可有效抑制前驅脂肪細胞生長的 ISPH，因此挑選 Flavourzyme 4 h 水解物 (Flavourzyme-ISP hydrolysate at 4 h; FH4h)、Pepsin 6 h 水解物 (Pepsin-ISP hydrolysate at 6 h; PH6h) 與 Neutrased 1 h 水解物 (Neutrased-ISP hydrolysate at 1 h; NH1h)，進一步探討不同劑量的水解物對前驅脂肪細胞相對生長速率之影響。如圖五使用三種添加劑量 50、250、1250 ppm 進行細胞培養，72 h 後細胞計數並與控制組細胞數作比較，實驗組相對細胞生長率在 50 ppm、250 ppm、1250 ppm 的水解物劑量下添加時，分別為 FH4h 的 81.8%、74.05%、69.54%；PH6h 的 86.84%、78.37%、73.87%；NH1h，86.48%、82.88%、78.37%，此結果顯示隨著水解物劑量的增加細胞相



圖四、不同酵素與水解時間所得大豆蛋白水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞相對生長率之影響(每組數據為三次獨立實驗平均)。

Figure 4. Effect of protein hydrolysates obtained from hydrolysis of isolated soy protein with different enzymes and hydrolysis time on relative cell growth in 3T3-L1 preadipocytes. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3.



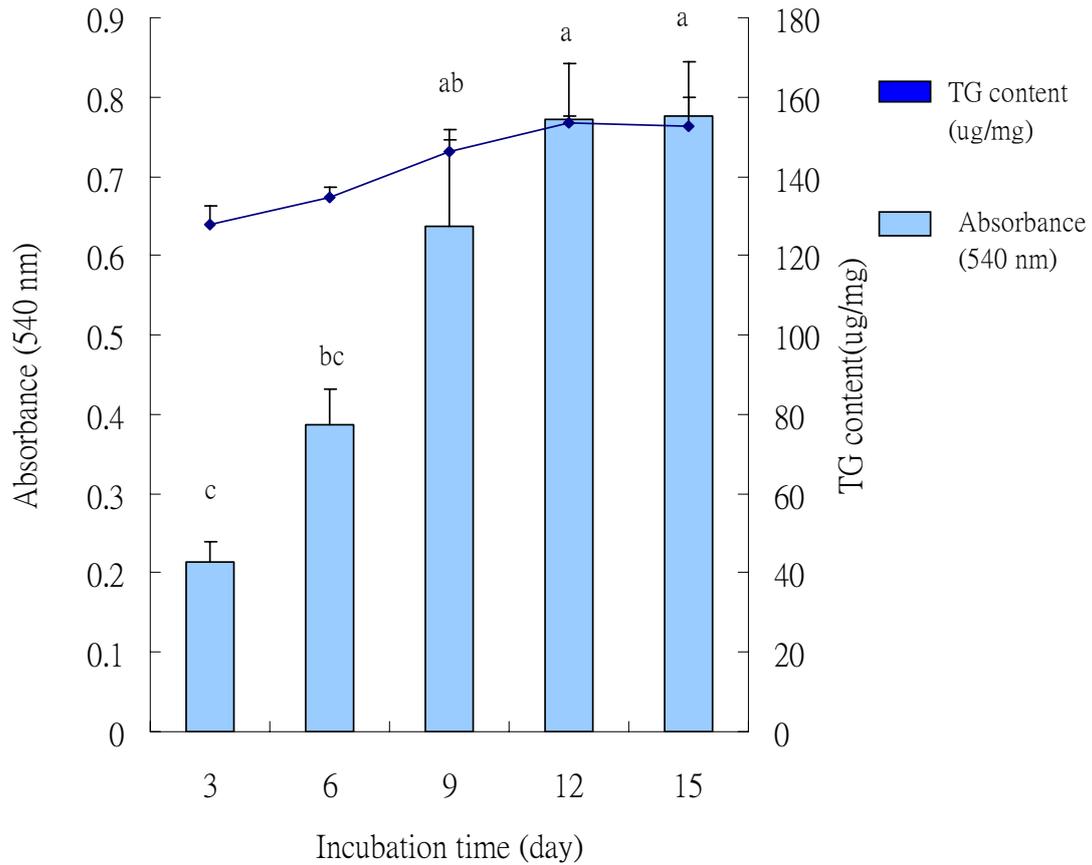
圖五、不同劑量的酵素水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞相對生長率之影響(不同字母表示具有顯著差異  $P < 0.05$ )。

Figure 5. Effect of hydrolysates with different dosage on relative cell growth in 3T3-L1 preadipocytes. Bars represent mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

對生長率均呈現顯著的降低( $P < 0.05$ )，亦表示前驅脂肪細胞生長受到抑制，其中以 FH4h 抑制效果最佳，隨著添加劑量提高對前驅細胞生長的抑制也跟著提高，添加 1250 ppm 時其相對生長速率可降至 69.54%。其次為 PH6h 添加 1250 ppm 時相對生長速率為 86.84%，但在 250 ppm 後亦可顯著使相對生長率降至 78.37%。最後為 NH 1h 添加 250 ppm 與 1250 ppm 下相對生長率分別可降低至 82.88% 與 78.37%。此外，FH4h、PH6h 與 NH1h 三種水解物均未達最大水解率時即具有抑制生長作用，其水解分別為 43.18%、84.3% 與 32.4% (如圖三)，由此顯示僅有特定酵素與在特定時間所達的水解率而產生的水解物對於前驅脂肪細胞的生長有抑制的作用，而肥胖起因於脂肪組織的增加，包括脂肪細胞的數量與其體積的擴增 (Hirsch and Batchelor, 1976; Shepherd et al., 1993)，抑制前驅脂肪細胞的生長與降低脂肪細胞內脂肪的堆積即能降低肥胖的風險，因此在後續實驗中也將探討水解物對前驅脂肪細胞分化的影響。

## (二)、ISPH 對前驅脂肪細胞分化的影響

為探討蛋白水解物對 3T3-L1 前驅細胞分化的影響，可藉由測定細胞中脂肪堆積狀況來判定，當脂肪含量越高表示分化程度越好 (Fu et al., 2005)。圖六為 3T3-L1 前驅脂肪細胞在分化後不同培養時間對 540 nm 吸光值與脂肪含量之影響，結果顯示，3-12 天的培養細胞內脂肪堆積與吸光值均隨分化後培養天數而增加，但在 12-15 天的脂



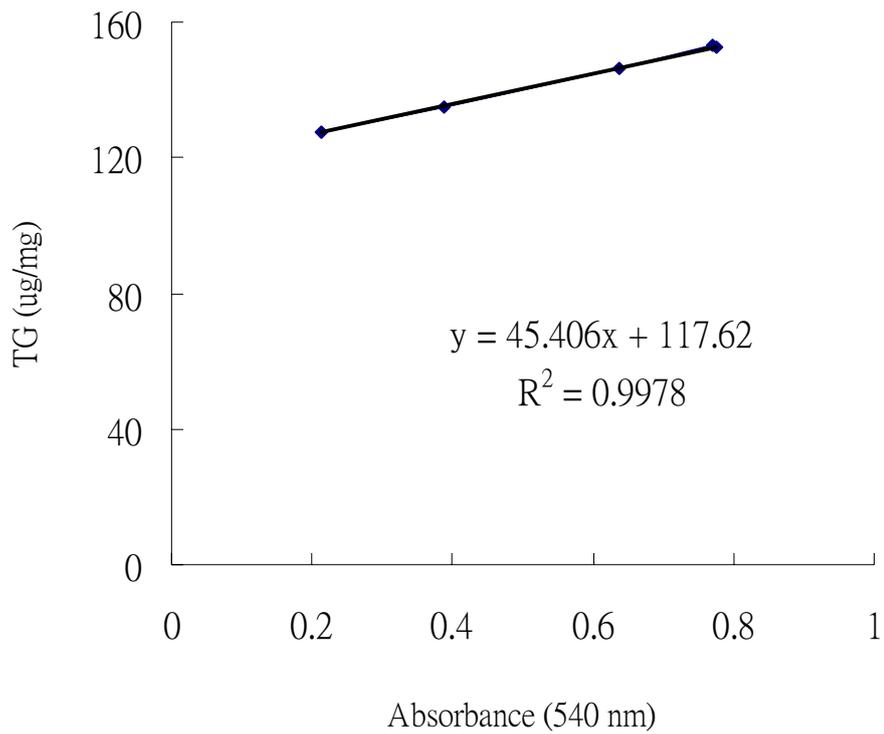
圖六、3T3-L1 前驅脂肪細胞在分化後不同培養時間對吸光值與脂肪堆積之影響(不同字母表示具有顯著差異  $P < 0.05$ )。

Figure 6. Effect of different incubation time on absorbance and triglyceride content in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan' s multiple range test.

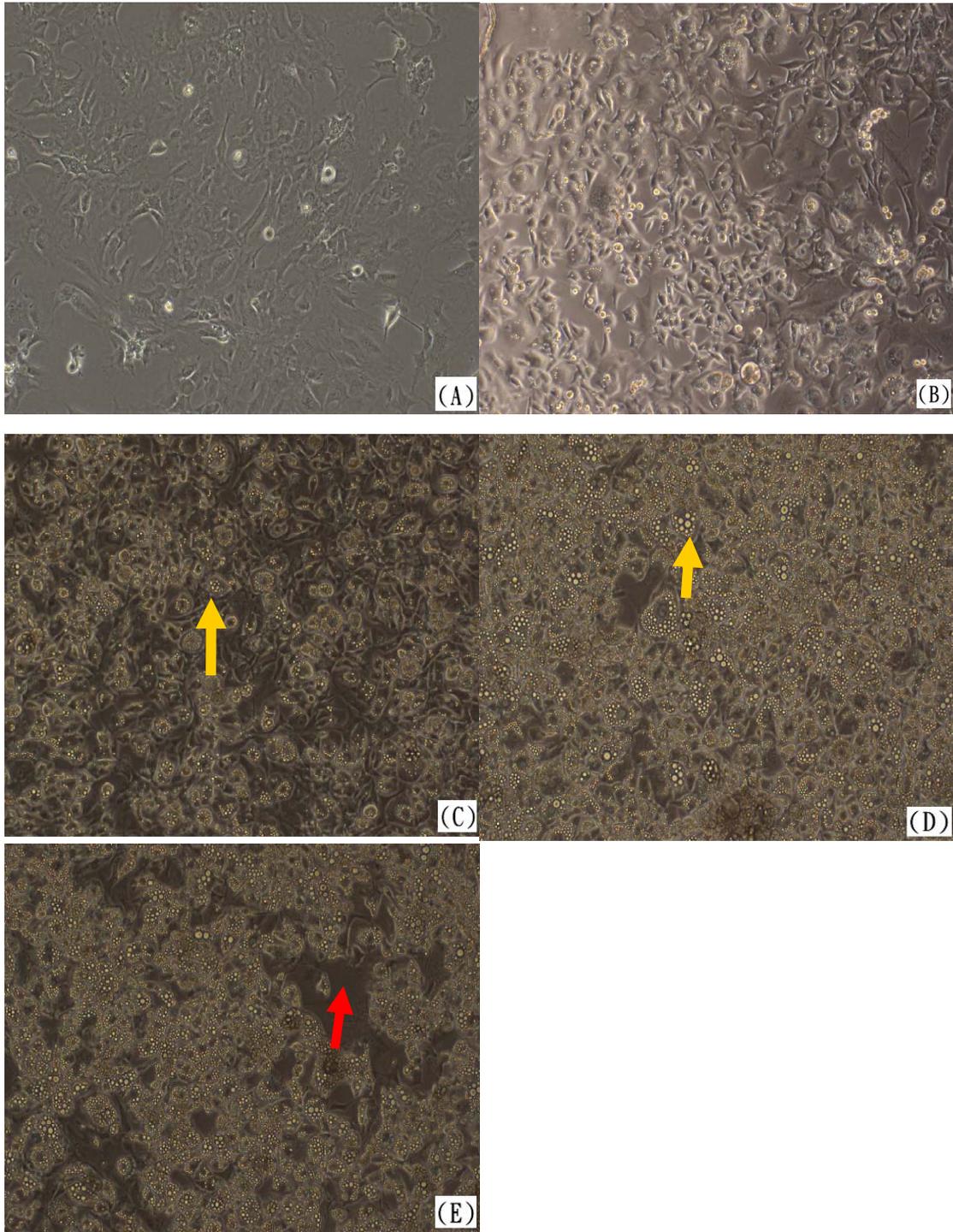
肪含量與吸光值則無明顯差異。將 3-12 天的脂肪堆積與其相對應的吸光值作用作圖，可得依線性關係，其方程式為  $y=45.406x + 117.62$  ( $R^2=0.9978$ )，如圖七，爾後脂肪堆積含量均以染色後於 540 nm 吸光值來換算。其次以顯微鏡觀察各培養階段細胞生長的情形如圖八，由 (A) 至 (E) 代表分化後第 3、6、9、12、15 天的培養時間，自第 6 天起細胞內脂肪堆積明顯增加，其脂肪顆粒如圖八 (C) 與 (D) 黃色鍵頭所指處，為單一脂肪細胞與其所含脂肪。在第 12 天時細胞開始出現脫落情形，第 15 天時脫落情形更為明顯，如圖八 (E) 紅色箭頭所指處為細胞脫落後所遺留的空缺，顯示細胞培養不宜超過兩個禮拜。

圖九探討不同酵素與水解時間所得水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後脂肪堆積之影響；前驅脂肪細胞同時添加分化試劑與 100 ppm ISPH 進行分化，於 48 h 後更換為含有 100 ppm ISPH 的培養液持續培養，在第 9 天將細胞染色於 540 nm 測吸光值且與對照組吸光值作比較而得相對脂肪堆積。結果顯示，不同水解時間的樣品對於脂肪堆積狀況各有不同，也就是說，其分化程度也因此受到影響。

以 Esperase-ISP(EH) 為例，水解 2 h 以前的水解物對於相對脂肪堆積有促進的效果，尤其是 0.5 h 的樣品更可以提高相對脂肪含量達 138% 左右，但是 2 h 與 4 h 的水解物卻造成較低的相對脂肪含量，分別為 97.81% 與 91.9%，至於 6 h 與 8 h 的樣品則又促進了脂肪的

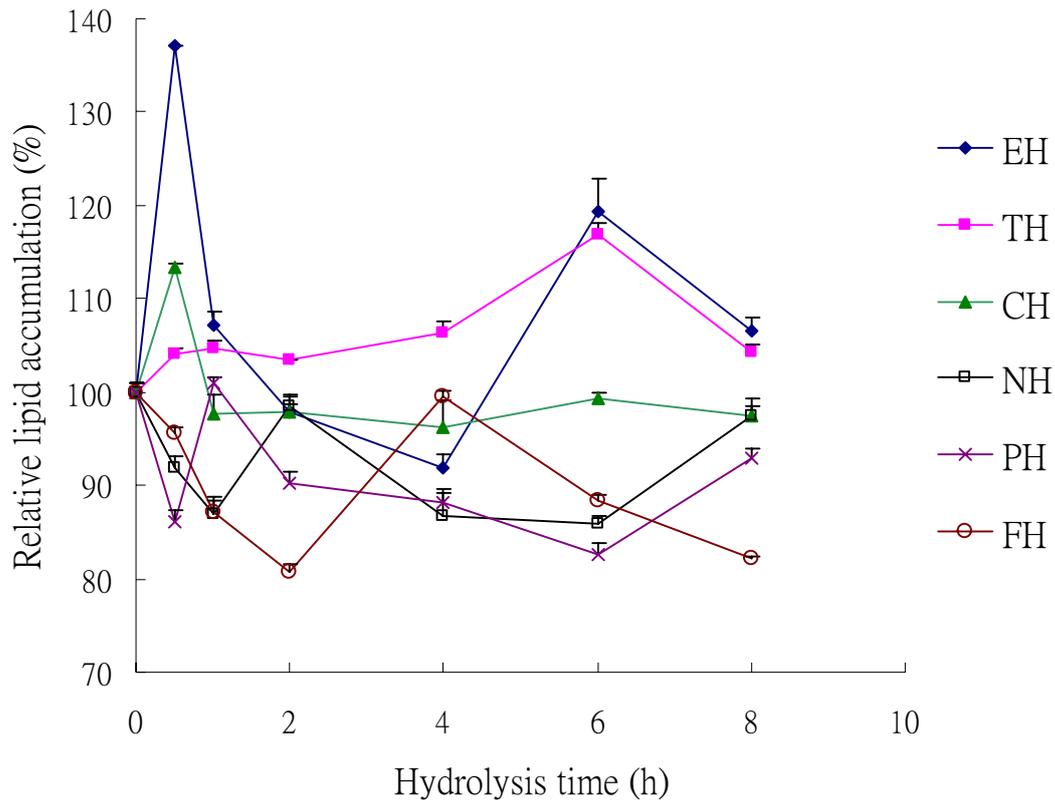


圖七、細胞內脂肪堆積與 540 吸光值之關係圖  
Figure 7. Relationship between triglyceride content and absorbance at 540 nm in cells.



圖八、在顯微鏡下觀察不同培養時間 3T3-L1 前驅脂肪細胞生長情形  
(A)3 天(B)6 天(C)9 天(D)12 天(E)15 天

Figure 8. Growth profile of 3T3-L1 preadipocytes after differentiation with different incubation time  
(A)3 days(B)6 days (C)9 days (D)12 days (E)15 days under microscope

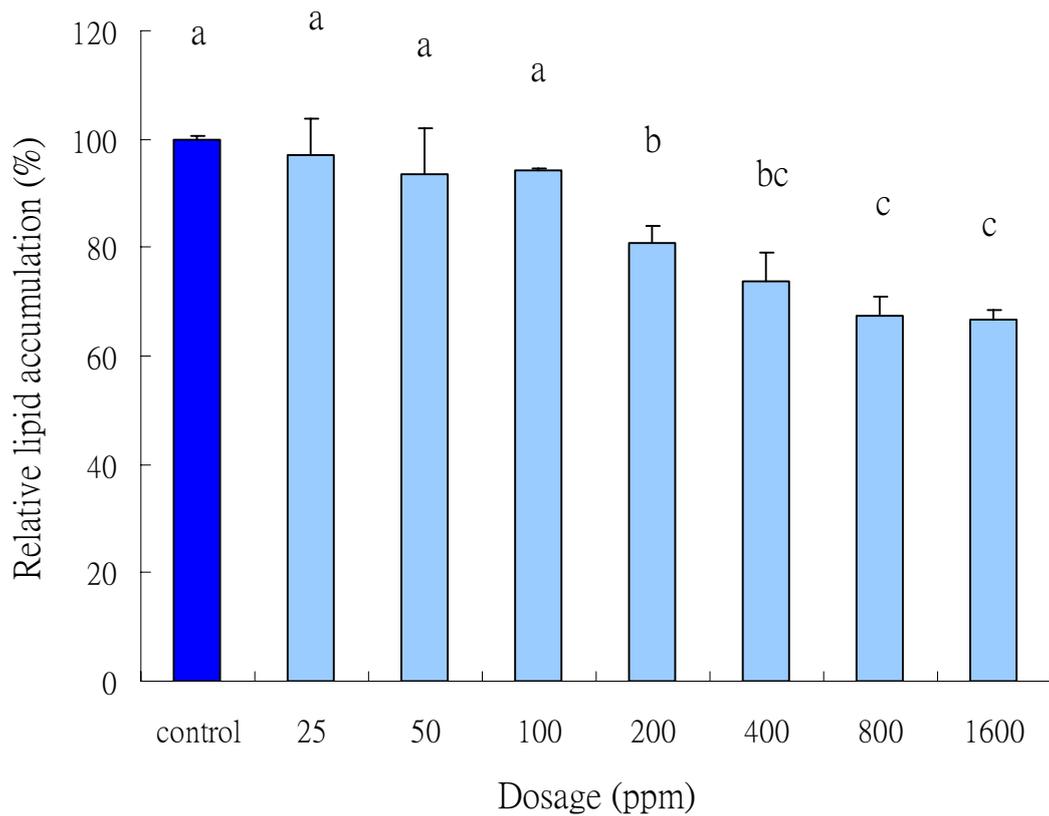


圖九、不同酵素與水解時間所得水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響(每組數據為三次獨立實驗平均)。

Figure 9. Effect of protein hydrolysates obtained from hydrolysis of isolated soy protein with different enzymes and hydrolysis time on relative lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan' s multiple range test.

堆積。Trypsin-ISP(TH)在所有水解時間中都會促進前驅脂肪細胞分化進而提高相對脂肪含量，其促進趨勢隨著水解時間增加，在水解6h 到達最高的 116.92%。Chymotrypsin-ISP(CH)除了 0.5 h 水解物會促進分化達 113%外，其餘水解物則均沒有明顯抑制脂肪分化的趨勢。Neutrase-ISP(NH)在 2 h 與 8 h 對細胞無影響外，其餘水解時間 0.5、1、4、6 h 都可抑制分化。特別是 6 h 的水解物(NH6h)可以抑制相對脂肪堆積下降至 85.95%。在 0.5、2、4、6 h 所得之 Pepsin-ISP(PH)其相對脂肪堆積均可降至 90%以下，特別以 6 h(PH6h)的 82.67%為最低。最後是 Flavourzyme-ISP(FH)，其抑制趨勢自 0.5 h 的水解物開始作用，2 h 的水解物(FH2h)達到最低的相對脂肪含量 80.77%，而 4 h 的水解物對細胞分化沒有影響。但是相同的抑制趨勢在 6 與 8 h 的水解物又再次出現，其相對脂肪堆積分別為 88.32%、82.15%。因此可以確定，ISP 經 Flavourzyme 水解 2h 所得水解物 FH2h 有最大抑制前驅脂肪細胞其分化效果。

綜觀上述的結果指出，NH6h、PH6h、FH2h 與 FH8h 有較佳的抑制脂肪堆積的作用，在第九天其相對脂肪堆積百分比分別降至 85.95%、82.67%、80.77%與 82.15%，因此進一步針對此四種水解物探討不同的劑量對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化的影響。圖十為不同劑量的 NH6h 對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響。在低劑量 25-100 ppm 時，相對脂肪含量雖有降低的趨勢但與控制組之間沒有顯



圖十、不同劑量的 NH6h 水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響(不同字母表示具有顯著差異  $P < 0.05$ )。

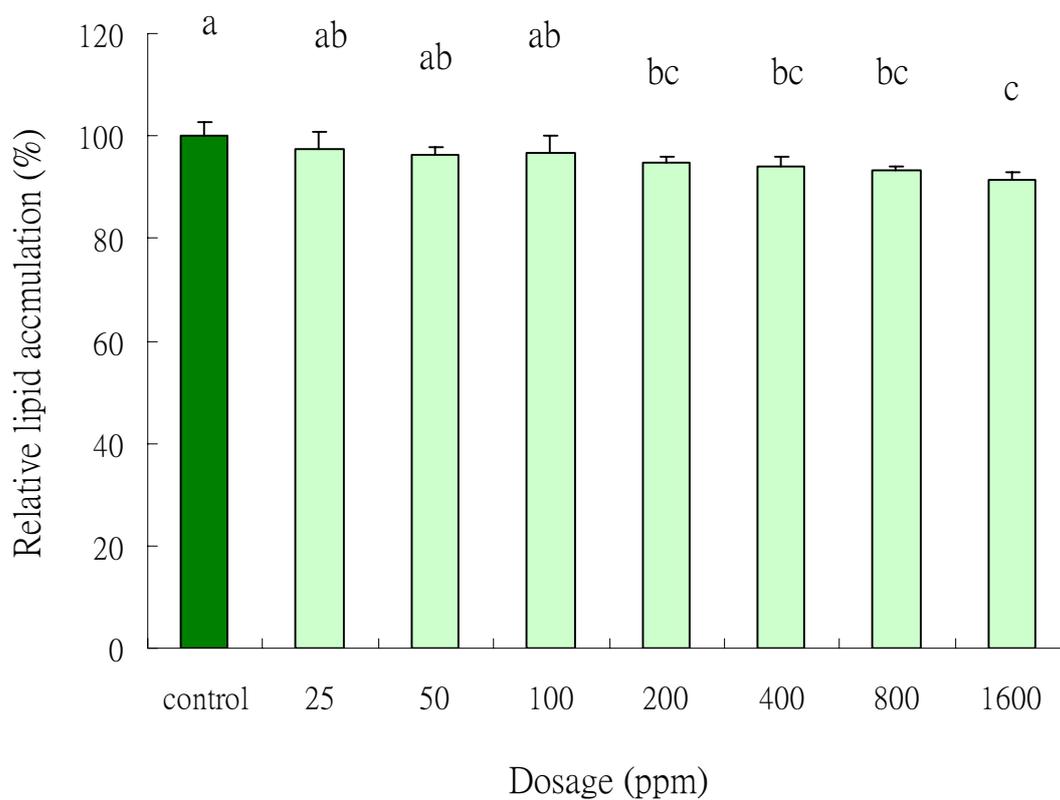
Figure 10. Effect of NH6h with different dosages on relative lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. Bars represent mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

著差異。當添加劑量高於 200 ppm 時相對脂肪堆積有顯著的降低效果 ( $P < 0.05$ )，特別是在 800 ppm 與 1600 ppm 時，則可將相對脂肪堆積抑制到 67.31% 和 66.74%，這些結果顯示前驅細胞的分化會受到 NH6h 劑量提高而抑制。

圖十一為不同劑量的 PH6h 水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積的影響。就整體趨勢而言，隨著添加劑量提升，相對脂肪堆積逐漸下降就表示分化程度會隨著添加劑量提高而受到抑制，當劑量高於 200 ppm 時有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。最大分化抑制效果出現在 1600 ppm 時，相對油脂堆積下降到 91.4%，PH6h 劑量越高對於抑制分化效果更好。劑量介於 200 ppm 至 800 ppm 之間的相對脂肪堆積雖然隨著劑量增加而降低，但彼此間沒有差異。

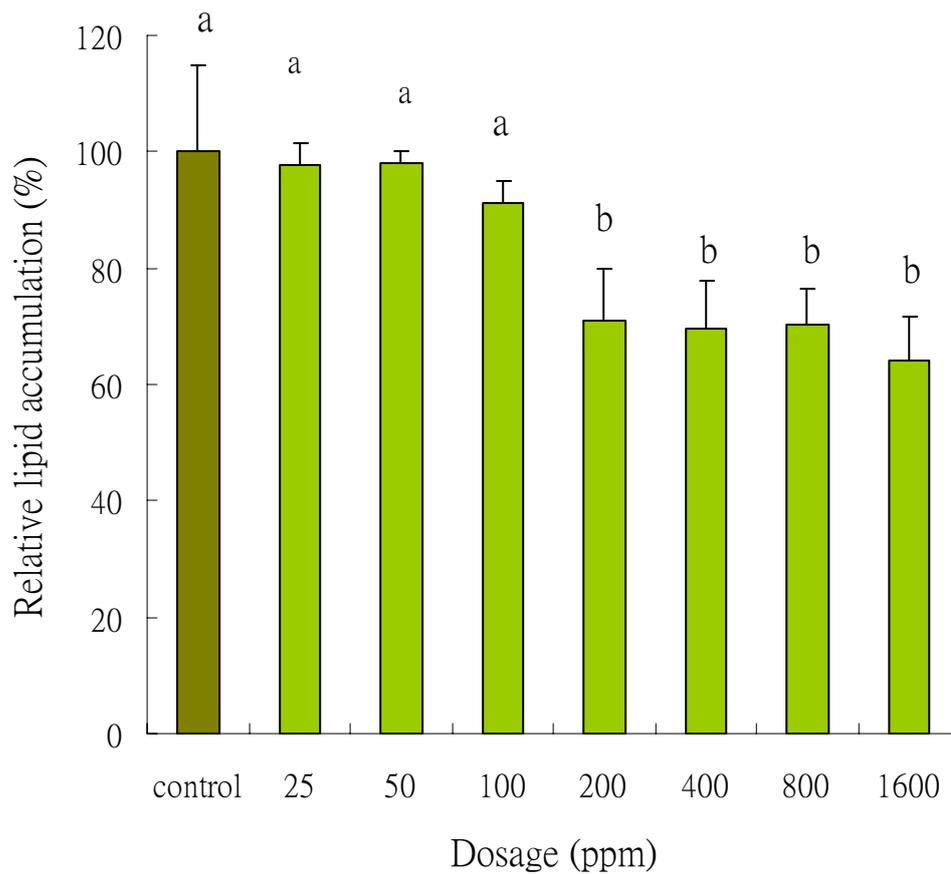
圖十二為不同劑量的 FH2h 水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積的影響。添加濃度 25-100 ppm 雖然其相對脂肪堆積有降低趨勢，但在統計學上沒有差異。當水解物添加劑量為 200-1600 ppm，對於相對脂肪堆積與對照組比較顯著降低 ( $P < 0.05$ ) 至 60~70%，但添加 200 ppm 以上時，彼此間降低的抑制趨勢沒有差異，換句話說，添加 200 ppm 即可達到最佳的抑制效果。

圖十三為不同劑量的 FH8h 水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積的影響。相對脂肪堆積隨 FH8h 添加劑量提高而有先降後升的趨勢，劑量為 25 -100 ppm 時其相對脂肪含量雖略有提升，但



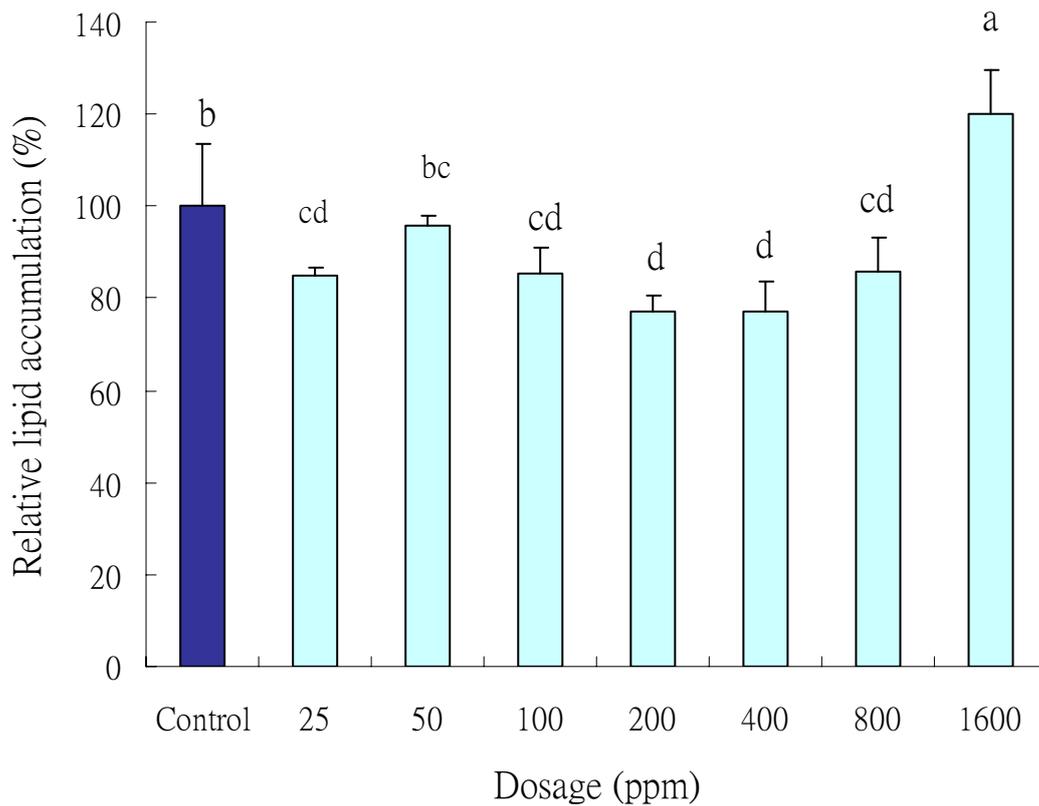
圖十一、不同劑量的 PH6h 水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響(不同字母表示具有顯著差異  $P < 0.05$ )。

Figure 11. Effect of PH6h with different dosages on relative cell growth in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



圖十二、不同劑量的 FH2h 水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響(不同字母表示具有顯著差異  $P < 0.05$ )。

Figure 12. Effect of FH2h with different dosages on relative cell growth in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different( $p < 0.05$ ) by Duncan' s multiple range test.



圖十三、不同劑量的 FH8h 水解物對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響(不同字母表示具有顯著差異  $P < 0.05$ )。

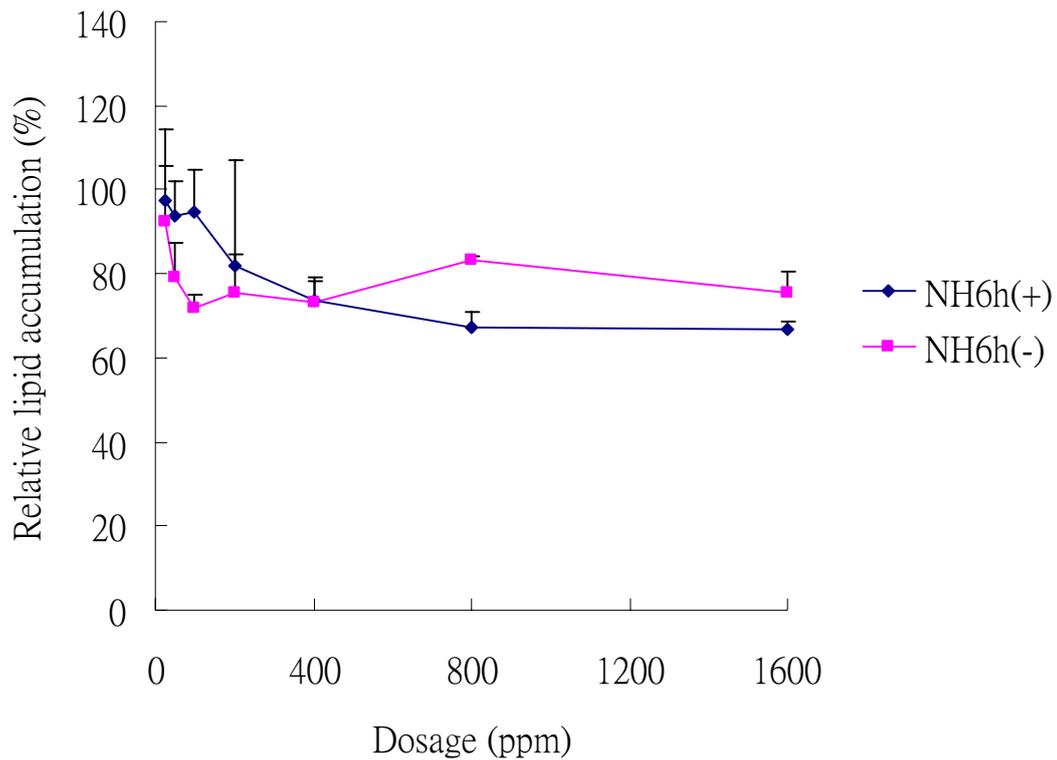
Figure 13. Effect of FH8h with different dosages on relative cell growth in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. Bars represent mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

在統計上差異不顯著，當添加劑量介於 200-800 ppm 時，相對脂肪堆積最低可降至 77%，之後在 1600 ppm 時又提高到 120.11%，顯示 FH8h 對脂肪堆積的抑制作用限制於添加劑量 100~800 ppm 之間，且與前述三種水解物最大差別在於添加劑量高於 1600 ppm 就不能提高對脂肪堆積的抑制，反而有促進的作用。

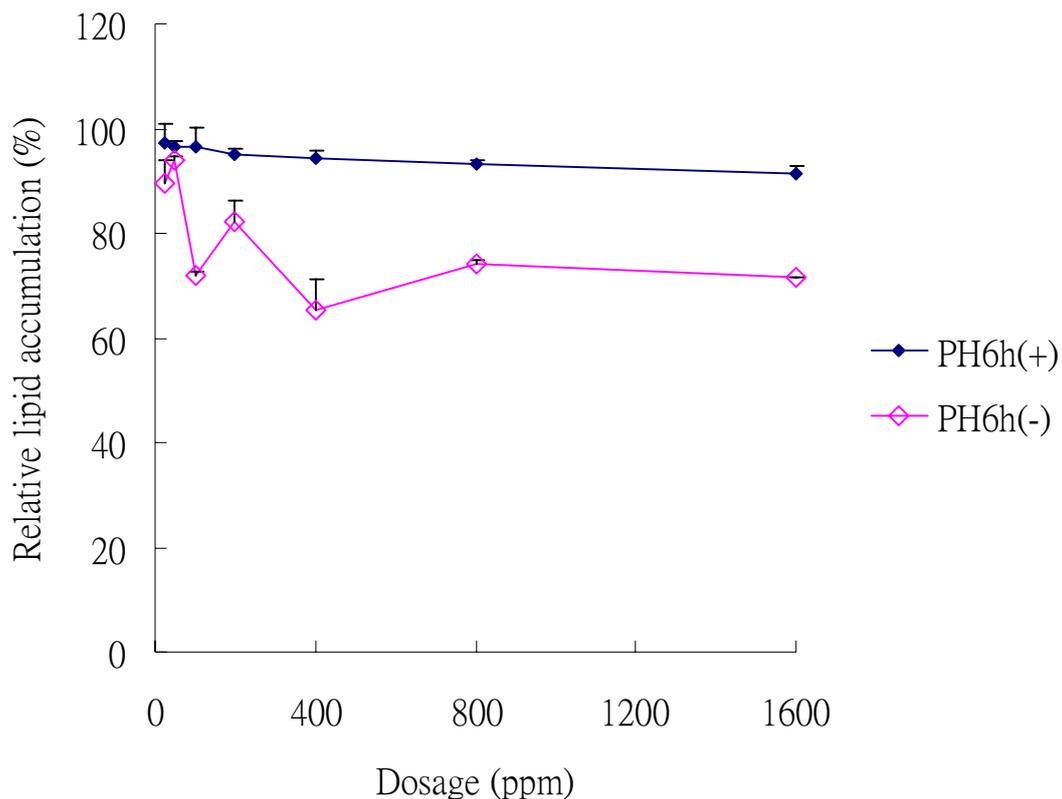
對於此四種水解物的劑量分析結果來看，水解物 NH6h、PH6h、FH2h 與 FH8h 添加 200 ppm 時即均有顯著抑制脂肪堆積的效果。其中以 FH2h 與 FH8h 的水解物在 200 ppm 下對於前驅脂肪細胞相對脂肪堆積有較佳的抑制作用，分別為 70.89%與 77.32%，其相對應的水解率分別為 32.84%與 57.87%，如圖三。Cammalleri 等人(2003)曾提出細胞內的酵素抑制物在脂肪細胞內可抑制其分化與脂肪堆積，但不影響細胞脂解程度，此抑制物在胰島素的存在下會透過抑制 IRS-1 (insulin receptor substrate-1) tyrosine 的磷酸化降低脂肪合成的作用，此抑制作用亦隨添加劑量增加而提高。因此，透過抑制分化即可有效抑制脂肪堆積的作用。

為了更進一步確定水解物對分化的影響，進而減少細胞內脂肪的堆積，此實驗另外參考了 Harmon 等人(2001)實驗中不同的分化方法。在前驅脂肪細胞分化時期內添加 ISPH，48 h 分化後更換回一般細胞培養液且不再添加 ISPH，持續培養到第九天時測定 540 nm 吸光值。分別針對 NH6h、PH6h、FH2h 與 FH8h 進行重複驗證以確認其效果。

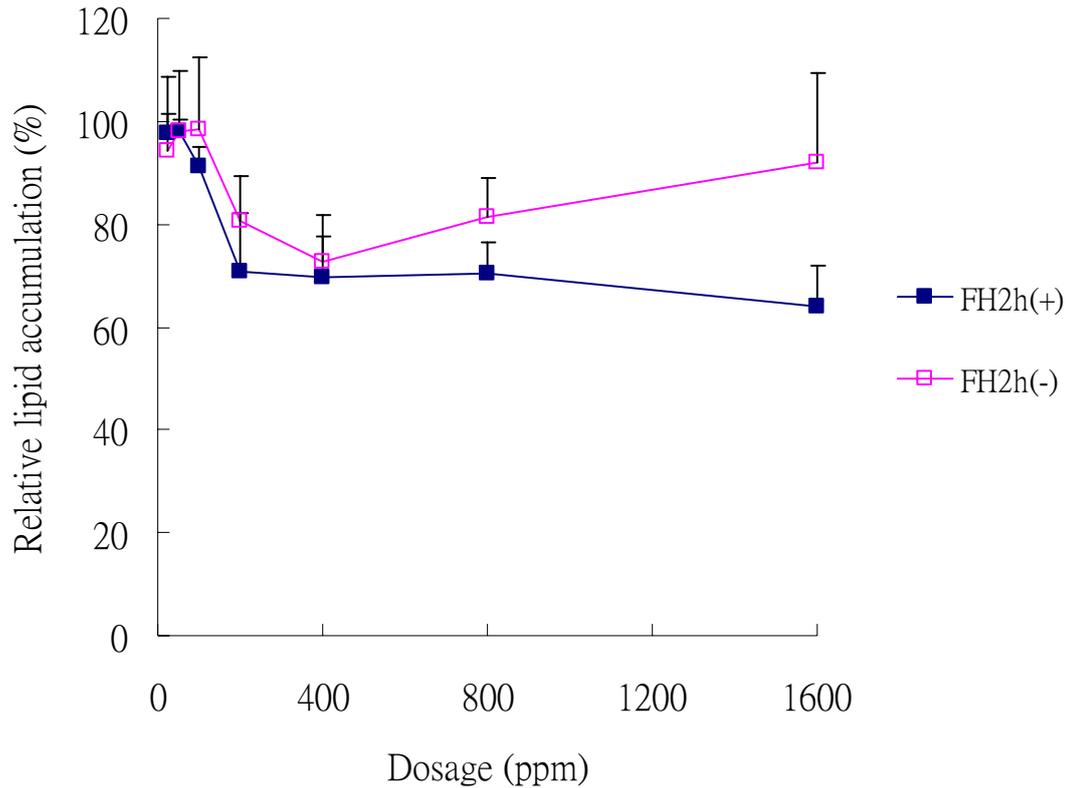
圖十四為培養液內 NH6h 及其添加與否對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響。NH6h(+)表示在前驅脂肪細胞分化及其後的培養期間持續添加含有 ISPH 的培養液，如圖二 stage B<sub>1</sub> ;NH6h(-)代表使用 Harmon 等人(2001)的分化方式，僅在分化期間添加 ISPH，之後以一般培養液更換，如圖二中 stage B<sub>2</sub>。在 400 ppm 以下，NH6h(+)的其相對脂肪堆積均高於 NH6h(-)，且在 100 ppm 以下 NH6h(+)無法有效抑制脂肪堆積，而 NH6h(-)在分化期間添加 50 ppm 可有效抑制脂肪堆積於 80%以下。但是當劑量高於 800 ppm 後，NH6h(+)表現出比 NH6h(-)更好的抑制能力，顯示 NH6h(+)對於脂肪堆積抑制能力會隨著添加劑量提高而增加，NH6h(-)在 50 ppm 時即有顯著抑制的作用。圖十五為培養液內 PH6h 及其添加與否對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響。分化後持續的添加 PH6h(+)對於脂肪堆積的抑制不如 PH6h(-)顯著，在 1600 ppm 下僅使相對脂肪堆積降至 91.4%，但是 PH6h(-)在 25 ppm 時有可抑制脂肪堆積至 90%，而 100 ppm 與 400 ppm 時可分別抑制相對脂肪堆積於 71.97%與 65.44%。因此前驅脂肪細胞脂肪的堆積，僅需在分化期間添加 PH6h 即可達到抑制的作用。圖十六為培養液內 FH2h 及其添加與否對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響。100 ppm 以下，分化後持續添加 FH2h 與否並不造成細胞脂肪堆積的差異；劑量高於 200 ppm 後，FH2h(+)有效抑制脂肪堆積於 70%以下而 FH2h(-)在劑量介於 200 ppm~800 ppm



圖十四、培養液內 NH6h 及其添加與否對分化後的 3T3-L1 前驅脂肪細胞內相對脂肪堆積之影響(每組數據為三次獨立實驗平均)。  
 Figure 14. Effect of media with "+" or without "-" NH6h and dosage on relative lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. 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、培養液內 PH6h 及其添加與否對分化後的 3T3-L1 前驅脂肪細胞內相對脂肪堆積之影響(每組數據為三次獨立實驗平均)。  
 Figure 15. Effect of media with "+" or without "-" PH6h and dosage on relative lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

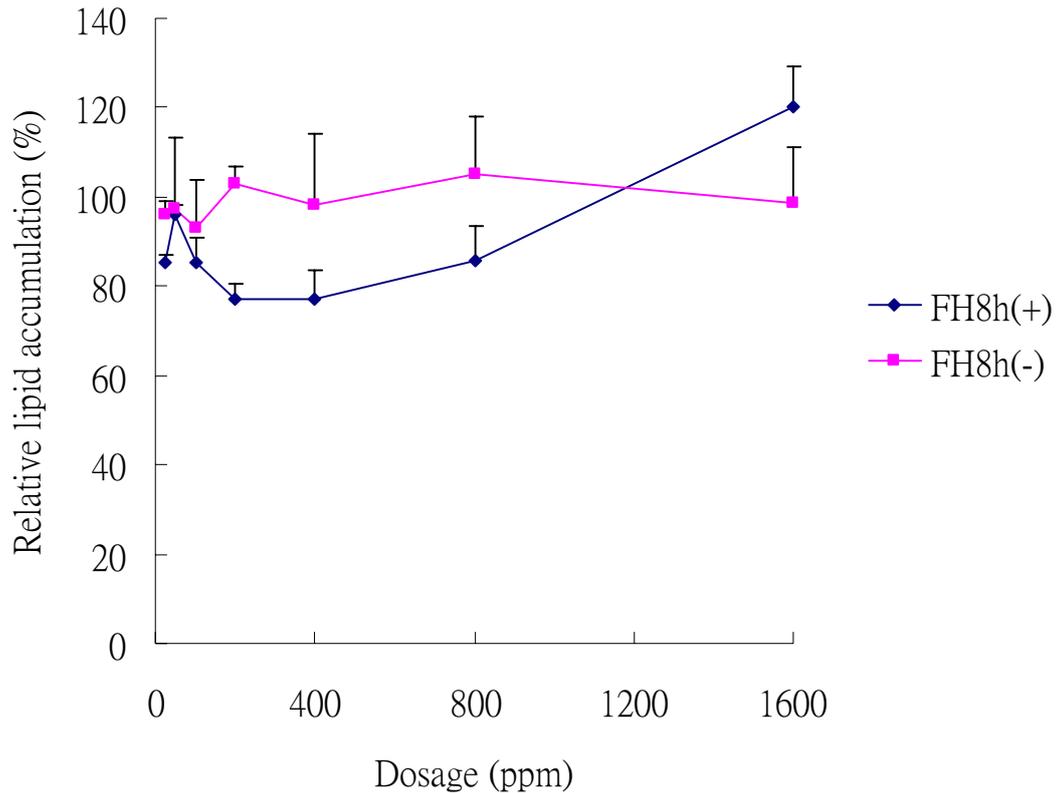


圖十六、培養液內 FH2h 及其添加與否對分化後的 3T3-L1 前驅脂肪細胞內相對脂肪堆積之影響(每組數據為三次獨立實驗平均)。  
 Figure 16. Effect of media with "+" or without "-" FH2h and dosage on relative lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

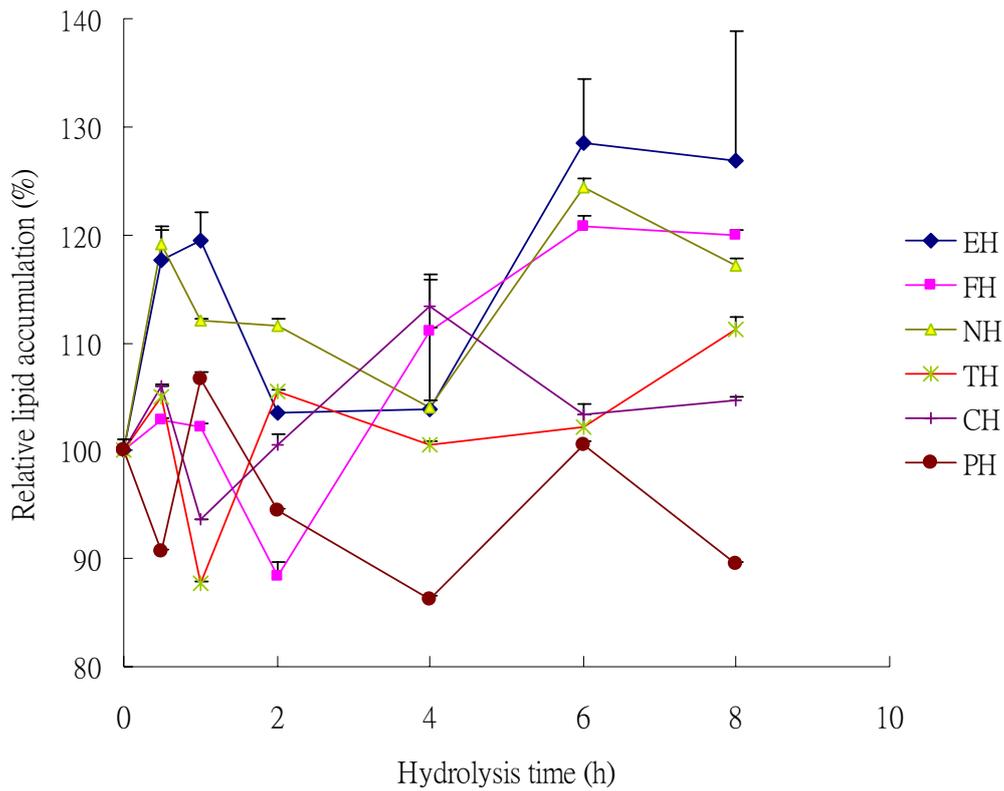
可抑制脂肪堆積於 80%以下，但在 1600 ppm 時抑制脂肪堆積能力僅達 91.84%，顯示 FH2h 在分化及其後的培養期間可以隨劑量的提高而有效抑制脂肪堆積作用。圖十七為培養液內 FH8h 及其添加與否對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後相對脂肪堆積之影響。添加劑量低於 50 ppm 時兩種分化方法對脂肪堆積影響差異不大；劑量提高到 100 ppm 時，FH8h(+)的相對脂肪堆積下降至 85%，明顯低於 FH8h(-)的 93.2%，顯示 FH8h 在分化後的培養期間內，水解物的添加下可持續強化其抑制脂肪堆積的效果；在 800 ppm 下也有相同的結果，但在 1600 ppm FH8h(+)與 FH8h (-)的相對脂肪含量分別為 120%與 98.78%，顯示在此劑量下的 FH8h 對於細胞脂肪堆積能力沒有顯著抑制效果。綜合以上結果可知，ISPH 劑量的多寡對脂肪堆積的抑制並非正比關係，而不同的分化培養方式對於脂肪堆積抑制的程度也不盡相同。以 FH2h 為例，分化後持續添加與否對於相對脂肪堆積結果呈現不同的趨勢，FH2h(+)可以隨劑量的提高而有效抑制脂肪堆積，但 FH2h(-)添加高於 400 ppm 後卻會促進脂肪的堆積。另一方面，分化後持續添加水解物與否不完全代表可以有效抑制脂肪堆積；PH6h(+)對於 3T3-L1 前驅脂肪的分化抑制作用即低於 PH6h(-)的表現，顯示不同水解物對於細胞分化與分化後添加的影響各有不同。

### (三) ISPH 對成熟脂肪細胞脂肪堆積的影響

圖十八為不同酵素水解物對 3T3-L1 成熟脂肪細胞相對脂肪堆積



圖十七、培養液內 FH8h 及其添加與否對分化後的 3T3-L1 前驅脂肪細胞內相對脂肪堆積之影響(每組數據為三次獨立實驗平均)。  
 Figure 17. Effect of media with "+" or without "-" FH8h and dosage on relative lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes after differentiation. Bars represent mean±SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.



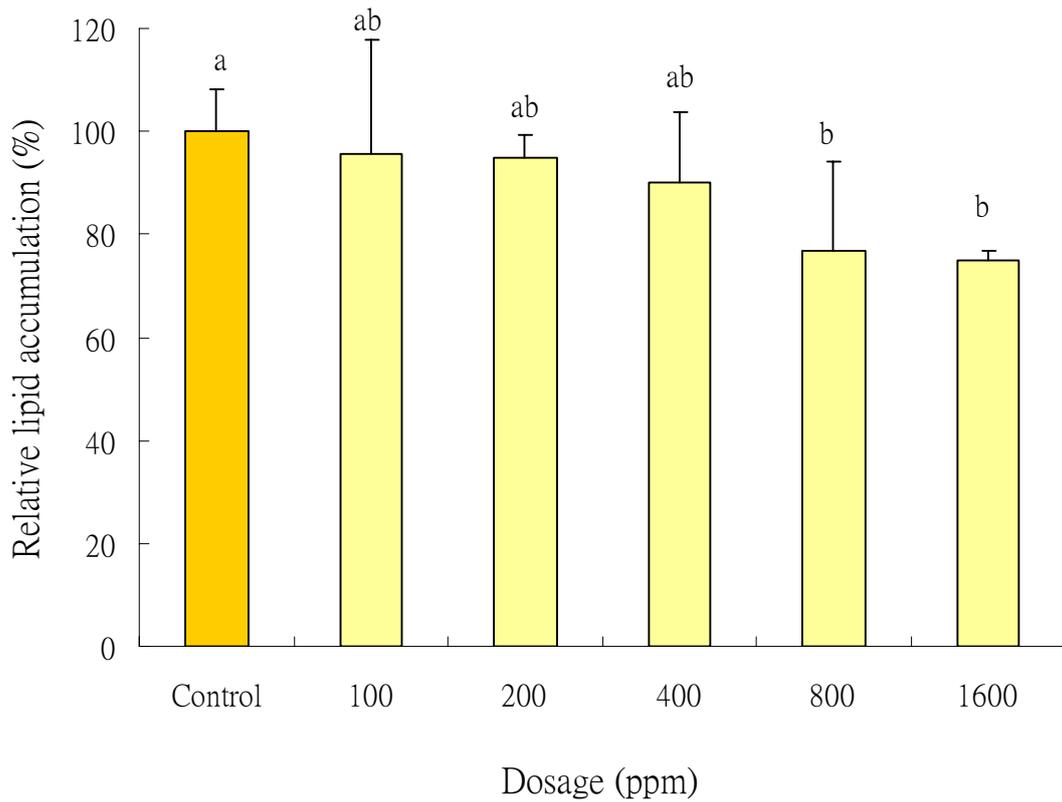
圖十八、不同酵素與水解時間所得水解物對 3T3-L1 成熟脂肪細胞相對脂肪堆積之影響(每組數據為三次獨立實驗平均)。

Figure 18. Effect of protein hydrolysates obtained from hydrolysis of isolated soy protein with different enzymes and hydrolysis time on relative lipid accumulation in 3T3-L1 mature adipocytes. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

之影響。3T3-L1 前驅脂肪細胞分化後第九天更換為含有 ISPH 的培養液，並於第十二天測定相對脂肪堆積的結果。水解物添加濃度均為 100 ppm。首先 ISP 經過 Esperase 水解 0.5~8 h 所得 Esperase-ISP 水解物(EH)都會提升成熟脂肪細胞相對脂肪堆積，特別是在水解 6 h 與 8 h 可提高相對脂肪堆積達 128%左右。其次 ISP 經過 Flavourzyme 水解所得水解物(FH)其相對脂肪堆積的表現則呈現 U 型趨勢，水解 2 h 的產物有最低的相對脂肪堆積，其成熟的脂肪細胞在 FH2h 的影響下減少了細胞內部的脂肪含量，使相對脂肪堆積下降到 88.46%。0.5 h 與 1 h 的水解產物稍微有促進脂肪堆積的趨勢，到了 4 h 以後促進趨勢更為顯著，而 6 h 水解物有最大的相對脂肪堆積達 120%。第三個酵素為 Neutrase-ISP 水解物(NH)，其水解物均會促進相對脂肪的堆積，促進趨勢同樣近似 U 型，在 4 h 水解物有最低的促進率，其相對脂肪堆積為 104%，至於 6 h 水解物具有最大促進脂肪堆積能力，其相對脂肪含量高達 124.35%。以上三種酵素水解物對成熟細胞的影響結果指出，水解初期與後期的產物都會使細胞的脂肪堆積更多，只有適當的水解時間才能釋放出具有降低脂肪堆積功能的特殊胜肽片段，例如 ISP 經過 Flavourzyme 水解 2 h 所得水解物(FH2h)具有最佳抑制效果，但在圖三顯示 FH2h 水解率為 32.84%，並非到最大水解率，因此控制適當的水解率以獲得具有特殊功能的胜肽片段是相當重要的。

第四個為 Trypsin-ISP 水解物(TH)，除了 1 h 的產物可以減少 87.72%的相對脂肪堆積外，其他水解時間產物均些微促進脂肪堆積，但是脂肪提高的百分比偏低，只有在 8 h 產物有 111.26%的效果，其他產物都介於 100%~105%之間。第五個酵素為 Chymotrypsin-ISP 水解物(CH)，1 h 有降低相對脂肪含量至 93.65%的效果。不同時間的水解物對脂肪細胞影響的結果以 W 型分佈，除了 1 h 水解物具有降低脂肪堆積效果外，其他則均可提高至 103.35%~113.43%不等的範圍。第六種為 Pepsin-ISP 水解物(PH)，在所有水解時間中，0.5、2、4、8 h 等水解物都具有減少相對脂肪堆積的功效，其中以 4h 水解物最佳，可降至 86.17%，但 1、6 h 水解物則略有提高的趨勢，其相對脂肪堆積分別為 106.69%與 100.58%。綜合以上結果可以提出，具有較佳降低脂肪堆積的水解物分別為 FH2h、TH1h 與 PH4h，但彼此間並無顯著差異。由於酵素 Flavourzyme 屬於商業酵素，未來可降低量產成本，因此選擇 FH2h 做進一步的劑量試驗以觀察對成熟脂肪細胞的影響。

圖十九為 FH2h 添加劑量對 3T3-L1 成熟脂肪細胞相對油脂堆積之影響。隨著劑量增加相對脂肪含量均有下降的趨勢，當添加劑量為 100 ppm~400 ppm 之間，相對脂肪堆積有下降但並不顯著。當在 800 ppm 與 1600 ppm 時，相對脂肪含量分別為 76.95%與 75.09，與控制組比較有顯著降低的效果( $P < 0.05$ )。FH2h 不僅對於分化有所抑制，亦可



圖十九、不同劑量的FH2h水解物對3T3-L1成熟脂肪細胞相對脂肪堆積之影響(不同字母表示具有顯著差異 $P < 0.05$ )。

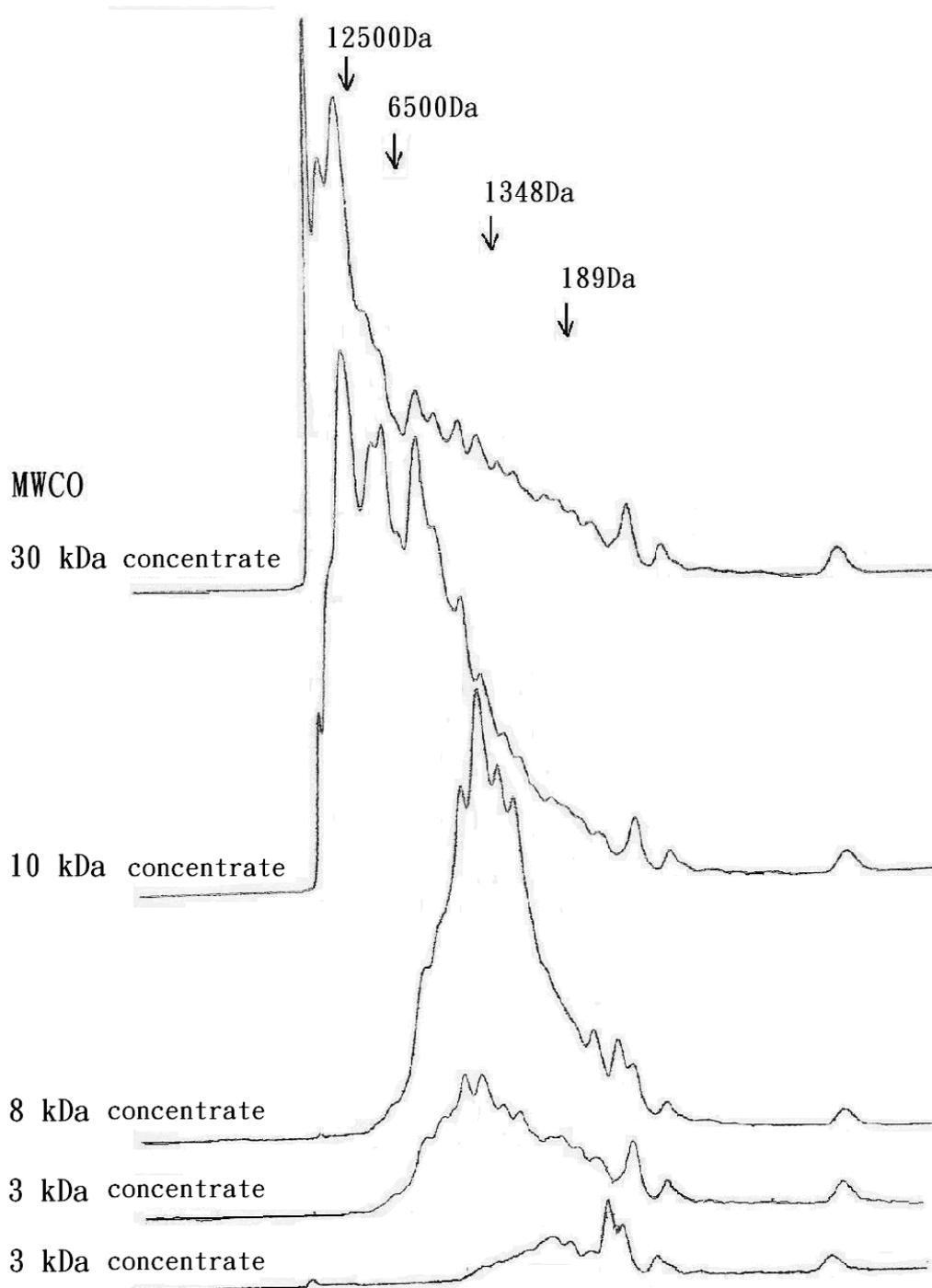
Figure 19. Effect of FH2h with different dosages on relative lipid accumulation in 3T3-L1 mature adipocytes. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

以減少成熟細胞內脂肪堆積，因此本研究將以 FH2h 做進一步的量產區分，以篩選出具有最佳抑制脂肪堆積的胜肽混合液。

#### (四)FH2h 水解物的區分與相對脂肪堆積的測定

就水解物而言，水解液中含有不同大小分子片段的胜肽，透過膜分離的篩選將特定片段予以區隔分離後，所得區分物再分別以細胞重複測試方可確定影響細胞表現的片段大小。本實驗製備大量 FH2h 水解液後，依序以 30 kDa(kilo daltons;KDa)、10 kDa、8 kDa、3 kDa 不同的分子量限值 (molecular weight cut-off;MWCO)濾膜進行區分，所得各濾膜濃縮液透過高效液相層析來檢測其分子量分布，結果如圖二十所示；箭號分別表示標準分子量大小包括 12500 Da、6500 Da、1348 Da 與 189 Da。FH2h 經 30 kDa MWCO 濾膜濃縮所得之濃縮物(30 kDa MWCO retentate)其分子量以大於 12500 Da 的胜肽為主，其濾液通過 10 kDa MWCO 濾膜所得濃縮物後，其分子量明顯降低主要界於 5000 Da 與 13000 Da，接下來將 10 kDa 濾液再以 8 kDa MWCO 濾膜濃縮所得濃縮物的分子量則介於 1000 Da 至 5000 Da 之間，8 kDa 濾液再以 3 kDa MWCO 濾膜濃縮所得濃縮物其分子量分布近似於 8 kd MWCO 濾膜濃縮物，但胜肽片段明顯減少，而 3 KDa 濾液則以小於 189 Da 的胜肽或胺基酸為主。因此上述結果指出透過膜分離系統的篩選可以成功地區分不同片段大小的胜肽組合以供進一步研究。

在確立 FH2h 水解物可以透過不同濾膜區分其胜肽片段大小後，

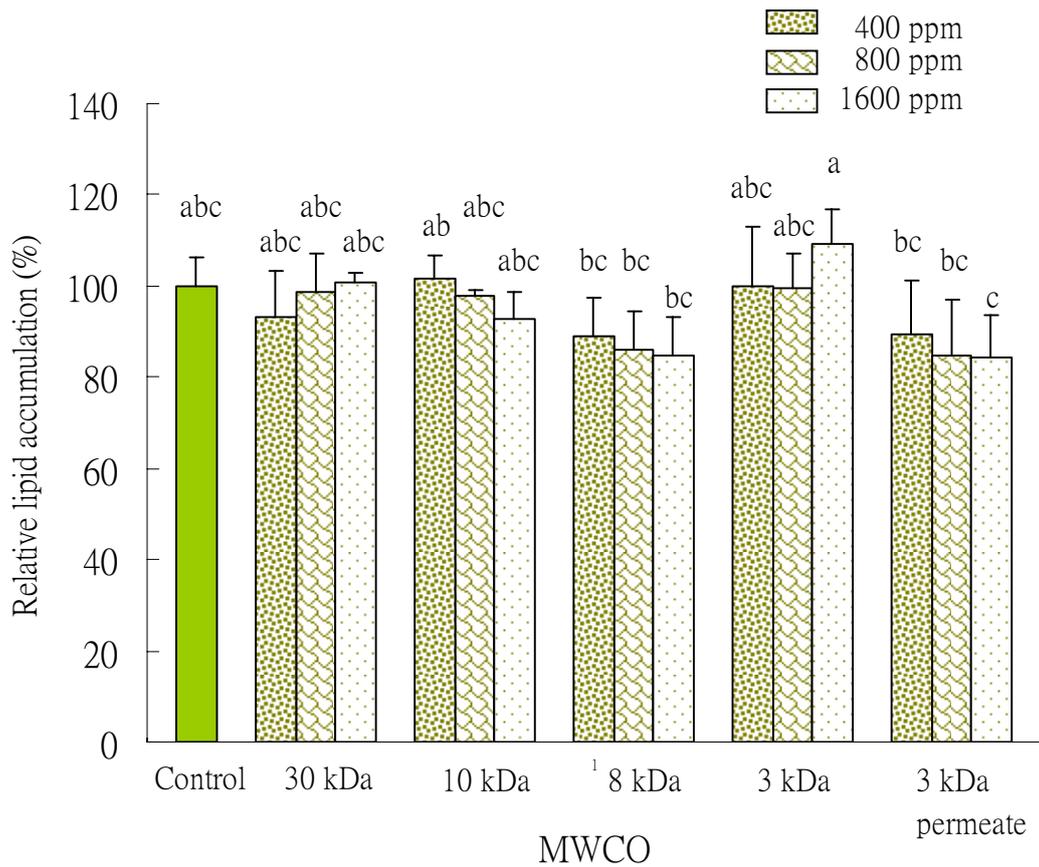


圖二十、FH2h 水解物經不同限值濾膜區分後所得濃縮物及濾液的分  
子量分布圖

Figure 20. The molecular weight profiles of concentrates and permeate obtained from the fractionation of FH2h with different molecular weight cut-off (MWCO) membranes.

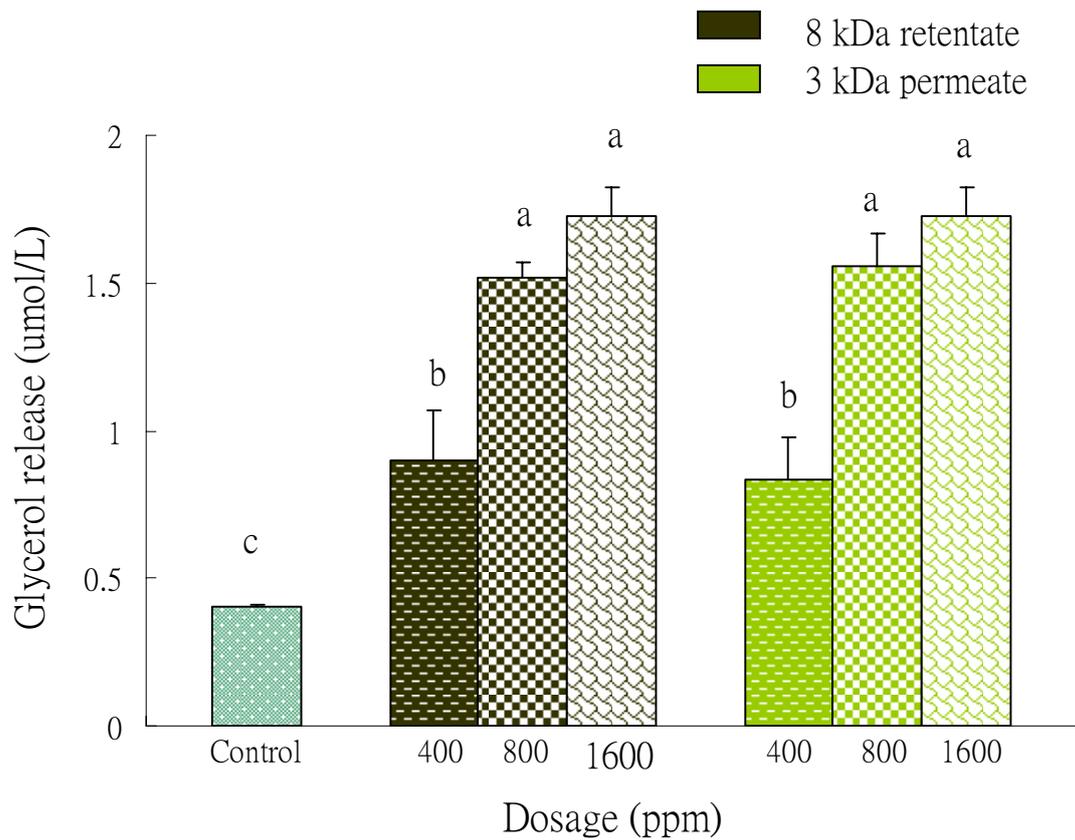
將各濾膜濃縮物冷凍乾燥並分別添加 400~1600 ppm 於成熟脂肪細胞，以探討不同 MWCO 濾膜濃縮物及濾液對 3T3-L1 成熟脂肪細胞內脂肪堆積的影響，因為 FH2h 添加劑量需要提高至 800 ppm(含)以上才會造成細胞降低脂肪堆積的顯著表現(如圖十九)。因此在圖二十一中觀察 FH2h 的區分濃縮物對成熟脂肪細胞的影響時，其添加量以 400 ppm 以上來測試。30 kDa MWCO 濾膜濃縮物對於成熟脂肪細胞的相對脂肪堆積會隨添加劑量提高而增加。10 kDa MWCO 濾膜濃縮物對於相對脂肪堆積在劑量越高的情況下具有抑制脂肪堆積的作用，8 kDa MWCO 濾膜濃縮物使脂肪堆積下降的趨勢更為明顯，其相對油脂堆積可降低至 84.68%，而 3 kDa MWCO 濾膜濃縮物則因添加劑量提高而促進脂肪堆積高達 109.03%。但對於可通過 3 kDa MWCO 的濾液隨添加劑量提高，亦可顯著降低油脂堆積至 84%。從不同孔徑大小濾膜濃縮液對相對油脂堆積的結果顯示，即使 FH2h 水解液具有降低脂肪堆積的作用，其中不同片段大小的胜肽分別具有降低或提高脂肪堆積的功能，因此更證明了不同的生理特性可由不同胜肽片段加以改變。綜合以上結果顯示，具有降低脂肪作用的胜肽片段主要為 8 kDa MWCO 濾膜濃縮物中 2400 Da-5500 Da 的胜肽混合液以及 3 kDa MWCO 濾膜濾液中小於 189 Da 的胜肽或胺基酸混合物。

細胞內油脂的分解會提高培養液中丙三醇的含量，因此藉由測定培養液中丙三醇的含量可以確定 3T3-L1 細胞脂解的活性。圖二十二為



圖二十一、不同濾膜濃縮物及劑量對 3T3-L1 成熟脂肪細胞相對脂肪堆積之影響(P<0.05)。

Figure 21. Effect of different concentrates and their dosages on relative lipid accumulation in 3T3-L1 mature adipocytes. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different(p<0.05) by Duncan' s multiple range test.



圖二十二、不同劑量 8 kDa MWC0 濾膜濃縮物與 3 kDa MWC0 濾膜濾液對 3T3-L1 成熟脂肪細胞內丙三醇釋放量之影響 (P<0.05)。

Figure 22. Effect of 8 kDa MWC0 concentrate and 3 kDa MWC0 permeate with different dosages on glycerol release in 3T3-L1 mature adipocytes. Bars represent mean $\pm$ SD, n=3. Means with different letters are significant different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

探討8 kDa MWC0濾膜濃縮物與3 kDa MWC0濾膜的濾液對成熟脂肪細胞釋放丙三醇含量的影響。前驅脂肪細胞分化後第9天即分別更換為含有8 kDa MWC0濾膜濃縮物與3 kDa MWC0濾膜的濾液的培養液，並於24 h後測量培養液中丙三醇含量。兩種濾膜濃縮的產物對丙三醇的釋放都會隨著添加劑量提高而增加，添加8 kDa MWC0濾膜濃縮物400 ppm時其丙三醇釋放量明顯低於800 ppm與1600 ppm，但是後二者釋放丙三醇的量並無顯著差異，此結果引證了圖二十一中 8 kDa MWC0濾膜濃縮物添加800 ppm與1600 ppm時兩者相對脂肪堆積均較控制組顯著下降，但兩者下降的效果沒有差異。3 kDa MWC0濾膜濾液對成熟脂肪細胞也有相同的結果，隨著添加劑量提高而使丙三醇的釋放增加。脂解作用可透過刺激 $\beta$ -adrenergic receptors或是抑制 $\alpha_2$ -adrenergic receptors而促進(Morimoto et al., 1997)，或透過epinephrine促使3T3-L1細胞內脂解提升(Chernick et al., 1986);亦可利用calyculin與okadaic acid促使脂肪細胞內的perilipin磷酸化，進而增加丙三醇釋放，提高脂解的效果(He et al., 2006)。由以上結果得知，8 kDa MWC0濃縮產物與3 kDa MWC0濾膜濾液具有促進3T3-L1成熟細胞中脂解酶的活性，進而釋放丙三醇，也證實可以因而降低細胞中脂肪堆積。因此未來將進一步探討本研究所產生的混合胜肽或胺基酸液是如何調控脂解的作用。