

麴菌發酵之小分子大豆蛋白對血液中 膽囊收縮素濃度之誘發效果

Induction of Serum Cholecystokinin by a Koji-Fermented Low-Molecule Soy portein

錢阜甯^{*1} Fu-Ning Chien

財團法人食品工業發展研究所

林志城³ Chih-Cheng Lin

元培科技大學生物科技暨製藥技術系

高婷玉² Ting-Yu Kao

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

陳怡宏¹ Yi-Hong Chen

財團法人食品工業發展研究所

¹Food Industry Research and Development Institute

²Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University

³Department of Biotechnology and Pharmaceutical Technology, Yuanpei University

(Received, November 21, 2013; Revised, March 19, 2013; Accepted, March 24, 2014)

摘 要：大豆水解蛋白擁有多種生理活性，其中包括刺激膽囊收縮素(cholecystokinin, CCK)產生，具有促進飽足感、抑制胃排空速率和降低攝食量等之生理功能。本研究的目的是想瞭解受試者攝食麴菌發酵之小分子大豆蛋白，在人體血液中誘發產生 CCK 分泌的情形及探討其所提供的飽足感官強度的效應。本試驗經元培科技大學人體試驗委員會審核同意。招募 20 名志願者，全部受試者年齡範圍限定 20-40 歲。試驗共進行兩次，間隔一週才進行下一次實驗，提供相同熱量之餐食，差別在於實驗組餐包有添加小分子大豆蛋白，對照組則未添加。於不同時段抽取受試者血液進行 CCK 濃度的分析，採單盲前後對照方式來瞭解攝食小分子大豆蛋白在短時間內血液中 CCK 濃度的變化情形。另以問卷方式，由受試者在不同時間點評估當時的飽足狀態。兩組受試者 CCK 的檢驗數值，在飯前(11:30AM)均無顯著差異。於午餐後 13:00PM 時，兩組 CCK 數值均上升達高峰後隨之下降，食用小分子大豆蛋白之實驗組較未食用小分子大豆蛋白對照組之血液中 CCK 數值有顯著較高的趨勢，實驗組高峰時 CCK

*Corresponding author



值為 0.30 ± 0.17 ng/ml；對照組為 0.19 ± 0.13 ng/ml，兩組統計達顯著差異($p=0.0333$)。同樣地，自我飽足感覺評分部分，於午餐後 13:00PM 兩組飽足感值亦隨之上升達高峰後緩慢下降，於 13:00PM 和 14:00PM 時實驗組飽足感值較對照組顯著增加，具統計顯著差異。由以上結果顯示，食用含小分子大豆蛋白能於餐後 1-2 小時短時間誘發 CCK 釋放，對飽足感有延遲的效益。

關鍵詞：膽囊收縮素、大豆蛋白、飽足感

Abstract: A Low-Molecule Soy Protein (LMSP) was produced with koji fermentation. The LMSP was formulated into buns to be consumed before lunch so as to study their cholecystokinin (CCK) induction effect. Twenty volunteers, aged between 20~40, were recruited and were provided buns with or without LMSP before lunch. The volunteers were asked to consume buns at 11:30AM and take lunch at 12:00PM. Satiety of the volunteers was evaluated with visual analog scales (VAS) and serum CCK concentrations were measured. Results showed that serum CCK concentration reached the highest point at 13:00PM and then declined. Volunteers took buns with or without LMSP showed average serum CCK value at 13:00PM was 0.30 ± 0.17 and 0.19 ± 0.13 ng/ml, respectively. The values showed statistical difference ($p=0.0333$). Satiety sensation was also evaluated and volunteers felt more satiety at 13:00 and 14:00PM after taking buns with LMSP before lunch. Summarized current study showed the LMSP could stimulate CCK secretion in human body and help raise satiety sensation at least 1 ~ 2 hr after meals.

Key words : Cholecystokinin, Soy protein, Satiety

壹、前言

減重不易，藉由一些工具來達成目的是必須的，工具可以是心理、生理或是外力刺激。許多藥廠和保健食品公司均汲汲於開發輔助的產品，希望能藉由調控人體內能量代謝相關的途徑，來達到協助減重的目的。抗肥胖藥物依作用機轉，可以大致分為以下三類：作用在中樞神經系統的藥物、腸胃道藥物、增加周邊新陳代謝或產熱效應的藥物，但這些藥物均會產生副作用或甚至引起死亡，例如：Sibutramine、Rimonabant、Avalide；原本在美國及唯一在臺灣核准上市的減肥藥物 Sibutramine (meridian, reductil, 諾美婷)，因被發現會提高心血管疾病風險甚至導致死亡引發爭議，已於 2010 年 10 月下市，減重門診使用諾美婷來減重的比率高達七、八成，醫生現正面臨無藥可開，正在服藥的民眾面臨無藥可用或被迫換藥的困擾。

許多的文獻指出大豆水解胜肽擁有多種生理活性，其中包括刺激膽囊收縮素(CCK)產生、促進飽足感等。已證實食物中的蛋白質能夠藉由抑制腸道中胰蛋白酶的活性而刺激分泌 CCK¹。CCK 是腸道內分泌 I 細胞所分泌。內生性的 CCK 擁有多種重要的生理活性，包括促進飽



足感產生、抑制胃排空速率和降低攝食量等²。許多食物蛋白，如酪蛋白、小麥麩質蛋白、卵白蛋白及大豆蛋白...等蛋白質的水解物，可以不經抑制胰蛋白酶的作用機制而直接刺激腸道內分泌細胞分泌 CCK。其中，大豆蛋白水解物刺激 CCK 分泌的效果最好³。

前人已證實從細胞及動物實驗模式可觀察到大豆水解胜肽產品的確能有效促進腸道細胞分泌 CCK 並且降低大鼠的飼料攝食量⁴。後因為考量成本及適口性，又發展出『小分子大豆蛋白』，是以微生物發酵方式達到生產蛋白水解酵素，再將脫脂大豆粉進行初步的水解。此法不但省去使用商業蛋白水解酵素的成本，產品也不具有胜肽的特殊苦味。根據實驗⁵結果顯示，利用體外模擬腸道酵素消化系統及體外腸道細胞培養實驗，證明小分子大豆蛋白確實能透過腸道酵素的消化作用釋放出誘發腸道細胞分泌 CCK 的活性胜肽片段，可刺激腸道細胞分泌近乎 3 倍濃度之 CCK。另外，在大鼠的實驗模式中也顯示大豆胜肽前驅物能夠有效促進體內 CCK 的分泌達 2.9 倍；提供同樣熱量及份量的低熱量餐盒，以問卷方式比較大豆胜肽前驅物混合白飯的主食與單獨只有白飯的主食，於食後 4 小時內飢餓感的差異，結果也說明大豆胜肽前驅物在低熱量的攝食情況下能提供較高的飽足感^{5,6}。

控制飲食的觀點已成為目前肥胖相關研究的主要方向，但少吃多運動往往知易行難，通常不易持續的主因都是因為吃的少，缺乏飽足感而放棄。本研究的主要目的即是探討『小分子大豆蛋白』此具飽足感、體脂調整的保健食品素材添加到食材中，製成低熱量減重餐，探討其在短時間內血液中 CCK 濃度的變化，以期『小分子大豆蛋白』具刺激體內分泌 CCK 的生理功效，能有效促進、維持飽足感，減少因低熱量餐無法提供飽足感的缺點，以飲食調控的方向降低因肥胖衍生的健康問題及社會成本，達到健康減重的目的。

貳、研究方法

一、小分子大豆蛋白之製備

以脫脂大豆粉為基質，利用 0.25% CH₃COONa/0.25% NaHSO₃ 溶液調整水分至 55%(w/v) 後，接種 0.017%(w/w) 試驗麴菌(*Aspergillus sojae*)，於 25~30°C、相對濕度 95% 以上之環境培養 2 天後出麴產物即為脫脂大豆麴。將固態發酵之脫脂大豆麴加入 2 倍重量的蒸餾水於 45°C 水解 6 小時，加熱至 90°C 維持 10 分鐘以抑制酵素活性完成水解，水解物經壓榨乾燥後得小分子大豆蛋白。該小分子大豆蛋白以 Adler-Nissen 的方法⁷ 測定其水解率(degree of hydrolysis) 為 11.9%，平均胜肽鏈長為 8.34 個胺基酸殘基。

二、餐包製作

依照一般西式餐包的製作方法烘焙而成，試驗組餐包以每個餐包中含 2 克上述之小分子大豆蛋白粉末的配方，取代所使用的高筋麵粉。製作所得的餐包，不論試驗組或對照組，每個餐包之重量約 50 克，熱量 118 大卡/個。每餐提供 5 個餐包，由受試者依其可以接受的程度任意攝食 1 至 5 個餐包，但每個受試者攝食試驗組餐包和控制組餐包的數量是一樣的。



三、受試對象

以海報方式徵求受試者，徵求對象條件年齡 20~40 歲，無肝、腎、心臟、糖尿病、高尿酸血症、痛風等慢性疾病者。受試者採單盲前後對照方式進行。

四、實驗方法

實驗期間，受試者除提供的餐點外，要求避免吃其他的食物。試驗共進行兩次，為避免早餐的攝食份量及熱量影響中午的攝食量，試驗當天提供相同的早餐，要求受試者於指定的時間食用完畢。於上午 11:30AM 抽血（當作起始點），12:00PM 發放午餐餐包及一杯 50 大卡的濃湯進食，並要求受試者於半小時後食用完畢。第一週吃含小分子大豆蛋白的餐包（實驗組），給予 5 個餐包，由受試者任食，受試者依其可以接受的程度任意攝食 1 至 5 個餐包，但濃湯則必須喝完。於下午 13:00PM、14:00PM 及 16:00PM 分別抽血，每次抽取 3cc 的血液。第二週提供與前週相同份量的早餐，同樣於上午 11:30AM 進行第一次抽血，12:00AM 發放午餐餐包及濃湯進食，但餐包為不含小分子大豆蛋白的對照組，受試者必須攝食與上週相同份量的餐包並喝完濃湯，同樣於下午 13:00PM、14:00PM 及 16:00PM 分別抽血，自體比較兩週的血液中 CCK 濃度之變化，藉此瞭解血中 CCK 濃度與飽足感之關係。每次抽血前先量血壓。本試驗經元培科技大學人體試驗委員會審查通過(1001129-017-2)。

五、飽足感評估

以問卷方式進行 VAS (Visual Analogue Scale) 評估，由受試者根據自己之感覺，在分數標記尺規上標記飽足感，比較小分子大豆蛋白對飽足感延遲效果。飽足感分數：1-10 分，1 分代表非常飢餓，10 分代表非常飽。

六、測量項目

CCK 分析：血液經離心後（3000 rpm，5 分鐘）取血漿。取 1ml 血漿填注至 SPE C18 管柱，以 20ml 二次水清洗後，再以 3 ml 之 50% acetonitril 水溶液沖提，沖提液經冷凍真空乾燥得純化後樣品。乾燥樣品回溶成 100 μ l，利用市售 CCK EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA) 分析 CCK 濃度。最終血液 CCK 濃度以樣品 CCK 濃度/樣品蛋白質濃度 (ng/mg protein) 表示。

七、統計分析

受試者採單盲前後對照方式，並以成對 t 檢定進行統計分析，但兩組間變化差值以獨立樣本之 t 檢定，其中*代表 $p < 0.05$ ，具有統計上顯著差異。



參、結果與討論

一、飽足感自覺比較

減重過程中通常都需配合飲食控制，而低熱量的飲食往往無法提供減重者足夠的飽足感而成為減重失敗的最大原因。因此，我們的實驗設計便是以小分子大豆蛋白添加在餐食中，觀察受試者於餐後飽足感的變化，以期小分子大豆蛋白所提供的飽足感，可以減少攝食量，進而達到健康減重的目的⁸。

本實驗有效樣本計有 17 位受試者，分別是 12 名女性、5 名男性。平均身高 162.25 ± 9.08 公分，平均體重 58.85 ± 10.86 公斤。

受試者分別於 11:30AM、13:00PM、14:00PM、16:00PM，自覺飽足感之程度，給予分數。以 17 位受試者的回收問卷進行統計分析。攝食實驗組餐包的四個時間點平均飽足感分數分別為 5.68 ± 2.25 、 9.00 ± 0.90 、 7.89 ± 1.10 、 4.94 ± 2.14 ；而攝食對照組餐包時的平均飽足感分數為 6.03 ± 2.24 、 8.71 ± 0.88 、 7.15 ± 1.16 、 4.56 ± 1.94 。顯示攝食含有小分子大豆蛋白的餐包時，受試者自覺有較為飽足的感覺。

兩週均提供相同的早餐，兩組在 11:30AM (午餐前) 的飽足感分數無統計上顯著差異；12:00PM 提供午餐，提供 5 個餐包，由受試者自行決定吃的份量，紀錄之，下星期進行對照組時，也請受試者吃相等份量的餐包；13:00PM 進行第二點的抽血及自評飽足感，結果兩組均於此時之飽足感值達最高，之後逐漸下降，這與一般的生理反應相同，亦即吃飽後，飽足感最強烈，隨著時間之經過，飽足的感覺亦隨之遞減。實驗組與對照組兩組間於 13:00PM 及 14:00PM 時具顯著統計差異，分別為 $p=0.0430$ 與 $p=0.0014$ ，顯示吃小分子大豆蛋白對於飽足感的提升具有一定程度的貢獻，到 16:00PM 時，兩組的飽足感數據無統計上差異，但還是以實驗組的分數較高 (表 1)。

表 1. 攝食小分子大豆蛋白前後之受試者(n=17)自覺飽足感之比較

Time	Score			
	11:30	13:00	14:00	16:00
實驗組	5.62 ± 2.25	9.00 ± 0.90	7.89 ± 1.10	4.97 ± 2.14
對照組	6.03 ± 2.24	8.71 ± 0.88	7.15 ± 1.16	4.56 ± 1.94
P value	0.2430	0.0430*	0.0014*	0.2039

食用小分子大豆蛋白混和的餐食，所產生的飽足感明顯比單純的餐包來的高，且在餐後的四小時內均能維持較高的飽足程度。此結果顯示，以小分子大豆蛋白此具有飽足感的保健素材來開發產品，在低熱量的攝食狀態下能夠提供較高的餐後飽足感，對於必須藉飲食控制減重的肥胖者而言應為一良好的輔助產品。



二、小分子大豆蛋白對血液中 CCK 濃度之誘發效果

兩組受試者的血液 CCK 檢驗數值，在 11:30AM 時實驗組為 0.12 ± 0.08 ng/ml；對照組為 0.13 ± 0.10 ng/ml，並無顯著差異。於午餐後兩組均很快地上升於 13:00PM 達最高值後隨之而下降；實驗組於 13:00PM 時之 CCK 值為 0.30 ± 0.17 ng/ml，對照組為 0.19 ± 0.13 ng/ml，兩組達統計上顯著差異 ($p = 0.0333$)，顯示食用小分子大豆蛋白之實驗組較未食用之對照組，血液中 CCK 濃度有顯著增加趨勢；而至 14:00PM 及 16:00PM 時，兩組的血液 CCK 數值，幾乎又降回至未攝食前的情形，且兩組間亦無統計上之差異 (表 2)。由以上結果顯示，小分子大豆蛋白能在餐後短時間刺激 CCK 釋放至血液中，有益提升受試者之飽足感。此結果與 Nishi 等人³的結果非常相似，他們比較了酪蛋白、小麥麩質蛋白、卵白蛋白及大豆蛋白等的水解物，發現在處理大鼠小腸黏膜細胞後的 30 至 60 分鐘時，可以有較大的促進 CCK 分泌的效果，其中又以大豆蛋白水解物的效果最好。Nishi 等人⁹進一步對大豆蛋白水解物進行區分，發現主要刺激 CCK 分泌的大豆胜肽片段，來自於大豆蛋白的 β -conglycinin 上。這種大豆蛋白水解物或大豆胜肽促進 CCK 分泌的情形，若以相同胺基酸組成的混合液來培養大鼠小腸黏膜細胞，則其促進 CCK 分泌的效果並不好，顯示胜肽片段的鏈長也是決定其促進 CCK 分泌的因素。CCK 是透過腸道的 I 細胞來分泌的，一般均認為和其細胞表面上的受器有關，而適當鏈長的胜肽片段應該較容易和 I 細胞的表面受器結合，而促進 CCK 的分泌¹⁰。本試驗的小分子大豆蛋白平均胜肽鏈長為 8.34 個胺基酸殘基，可能因此而得以刺激 CCK 的分泌。

表 2. 小分子大豆蛋白對攝食前後不同時間點的血液中 CCK 濃度變化之影響

	Concentration (ng/mL)			
	11:30	13:00	14:00	16:00
實驗組	0.12 ± 0.08	0.30 ± 0.17	0.14 ± 0.14	0.11 ± 0.15
對照組	0.13 ± 0.10	0.19 ± 0.13	0.17 ± 0.08	0.16 ± 0.09
P value	0.0742	0.0333*	0.1617	0.1021

肆、結 論

由以上的結果可知，小分子大豆蛋白確實能增加人體 CCK 的釋放，增加飽足感，若能夠搭配低熱量餐食，預期能夠有效促進及維持飽足感的產生進而減少攝食量，未來有機會運用在減重產品的開發上。



伍、誌 謝

感謝經濟部之計畫(100-EC-17-A-03-04-0332)經費支持，及元培科技大學對人體試驗計畫之審查。

參考文獻

1. Green, G. M. and Nasset, E. S., "Role of dietary protein in rat pancreatic enzyme secretory response to a meal," *Journal of Nutrition*, Vol. 113, 1983, pp. 2245-2252.
2. Moran, T. H. and Kinzig, K. P., "Gastrointestinal satiety signals. II. Cholecystokinin," *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, Vol. 286, 2004, pp. G183-G188.
3. Nishi, T., Hara, H., Hira, T., and Tomita, F., "Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal cells," *Experimental Biology and Medicine*, Vol. 226, 2001, pp. 1031-1036.
4. Chen, Y.-H., Lai, H.-L., Chuang, S.-C., and Chen, C.-C., "Effects of peptides on the secretion of cholecystokinin *in vivo* and diet intake of rats," *Report of Food Industry Research and Development Institute*, No. 94-2872, 2005.
5. 賴祥玲、錢阜甯、張建棣、洪銘育、劉毓蕙、程竹青，「應用營養胜肽及飽足感胜肽於減重計畫之功效（II）」，財團法人食品工業發展研究所研究報告第 97-4065 號，2008。
6. 賴祥玲、錢阜甯、陳怡宏、程竹青，「大豆胜肽前驅物對於誘發體內產生 CCK 及飽足感效應評估」，財團法人食品工業發展研究所研究報告第 98-4455 號，2009。
7. Adler-Nissen, J., "Enzymetic hydrolysis of food proteins," *Elsevier Applied Science Publishers Ltd*, 1986, pp. 12-24.
8. 賴祥玲、錢阜甯、陳怡宏、程竹青，「大豆胜肽前驅物與米飯搭配低熱量餐對於誘發體內產生飽足感效應及減重功效評估」，財團法人食品工業發展研究所研究報告第 99-4812 號，2010。
9. Nishi, T., Hara, H., Asano, K., and Tomita, F., "The soybean β -conglycinin β 51-63 fragment suppresses appetite by stimulating cholecystokinin release in rats," *Journal of Nutrition*, Vol. 133, 2003, pp. 2537-2542.
10. Strader, A. D., and Woods, S. C., "Gastrointestinal hormones and food intake," *Gastroenterology*, Vol. 128, 2005, pp. 175-191.

