卵蛋白源胰脂肪酶抑制肽的制备及其对小鼠体质量控制效果

王 璐， 武雅珍， 焦明雅， 李志成*
（西北农林科技大学 食品科学与工程学院，陕西 杨凌 712100）

摘要： 采用响应面法对卵蛋白源胰脂肪酶抑制肽（PLIPA）的制备工艺进行了研究，经模拟胃肠道消化研究 PLIPA 的稳定性。C57BL/6J 小鼠饲喂高脂饲料 40 d 后成功建立肥胖模型，灌胃 PLIPA 28 d 后处死，检测相关指标，研究 PLIPA 对营养型肥胖小鼠体质量和体形的控制效果。结果表明，卵蛋白质量浓度 80 g/L，加入 2 240 U/g 的碱性蛋白酶，在 pH 9.0、55 ℃水解 4 h，制备的 PLIPA 对胰脂肪酶的抑制率最高，为（56.06±2.64）%。经模拟胃液、胃液加肠液消化后，每毫克 PLIPA 对胰脂肪酶的抑制率分别为 0.53%和 0.46%，整体抑制率仍较高，稳定性较好。小鼠实验表明，PLIPA 复合组的体质量和 Lee′s 指数显著低于肥胖模型组（$P<0.05$），处理组的腹部脂肪系数、甘油三酯（TG）、总胆固醇（TC）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）与高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）等指标均低于肥胖模型组，表明 PLIPA 对于肥胖小鼠具有减轻体质量和降脂作用，其中 PLIPA 复合组控制体质量和体形效果最好。

关键词： 卵蛋白；卵蛋白源胰脂肪酶抑制肽；小鼠；体质量；肥胖
中图分类号：TS 253.9　**文章编号：**1673-1689（2021）03-0081-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.03.010

Preparation of Pancreatic Lipase-Inhibiting Peptides from Ovalbumin and Its Effect on Body Weight Control in Mice

WANG Lu, *WU Yazhen*, *JIAO Mingya*, *LI Zhicheng**
（College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China）

Abstract: The preparation of pancreatic lipase-inhibiting peptide from ovalbumin (PLIPA) was studied by response surface method, and the stability of PLIPA was studied by simulated gastrointestinal digestion. C57BL/6J mice obesity model was successfully established after feeding high fat diet for 40 days. After 28 d of intragastric administration of PLIPA, the mice were killed and the related indexes were detected to study the control effect of PLIPA on body weight and body shape of nutritional obese mice. The results showed that when the concentration of ovalbumin and alkaline protease were 80 g/L and 2 240 U/g, respectively, the highest inhibitory rate of PLIPA was (56.06±2.64)% after hydrolyzed at 55 ℃, pH 9.0 for 4 h. After digestion of simulated gastric solution and simulated gastric and intestinal solution, the inhibitory rate of PLIPA per milligram of pancreatic lipase were 0.53% and 0.46%, respectively. The overall inhibition rate was still high and the stability

收稿日期： 2019-11-29
基金项目： 陕西省重点产业创新（群）项目（2021ZDLNY02-10）；西安市农业科技创新工程计划项目（20193037YF025NS025）；杨凌示范区科技计划项目（2016NY-30）。
* **通信作者：** 李志成（1966—），男，博士，副教授，博士研究生导师，主要从事畜产食品研究。E-mail：957976900@163.com

was good. The body weight and Lee's index of PLIPA complex group were significantly lower than those of model group (P<0.05). The indexes of abdominal fat coefficient, triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in the treatment groups were lower than those in model group, indicating that PLIPA could reduce body weight and fat in obese mice, and PLIPA complex group showed the best effect on controlling body weight and body shape.

Keywords: ovalbumin, pancreatic lipase-inhibiting peptide from albumin, mice, body weight, obesity

近年来,肥胖发生率呈快速上升趋势。据统计,全球肥胖患者的增长速度为每 5 年翻一番,每年因肥胖引起的直接或间接死亡人数已达 30 万,肥胖已成为仅次于吸烟之后的第二个健康危险因素[1],肥胖也是继癌症和心脑血管疾病之后威胁人类健康的第三大疾病[2]。肥胖和饮食密切相关,当人体摄入食物的热量大于消耗量时,多余的热量会转变为脂肪,在体内积聚形成肥胖[3],食物脂肪的过量摄入会增加发生肥胖的风险。因此,控制饮食中脂肪的摄入和机体对于脂肪的吸收对改善肥胖有重要作用[4-5]。

机体摄食后,胰脂肪酶将膳食脂肪水解为单酰甘油和游离脂肪酸[6],在肠道内再吸收,合成新的脂肪[7]。胰脂肪酶抑制剂可有效抑制胰脂肪酶活性,降低胰脂肪酶对脂肪的分解作用,减少脂肪再合成,抑制机体内脂肪过度堆积,发挥控制、治疗肥胖的作用[8]。目前,奥利司他(Orlistat)是市场上被广泛认同和购买使用的胰脂肪酶抑制剂类减肥药物,但具有失眠、乏力、增加心率,甚至心律失常、心力衰竭、猝死等副作用[9]。因此,研发具有减肥作用的药物和辅助减肥的功能性食品已成为食品生物技术界、营养学界研究的热点。

我国鸡蛋生产总量超过了世界生产总量的 1/3,但目前关于鸡蛋的深加工较少,鸡蛋的综合利用率较低[10-12]。作者以卵蛋白为原料,采用酶工程技术制备卵蛋白源胰脂肪酶抑制肽(Pancreatic lipase inhibitory peptide from albumin, PLIPA),研究其对猪胰脂肪酶的抑制作用,并通过建立营养型肥胖小鼠模型,研究 PLIPA 对肥胖小鼠的体质量控制效果,为研发减肥功能食品提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜鸡蛋:购于陕西省杨凌示范区主要超市。

胰蛋白酶:北京索莱宝科技有限公司产品;碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶:西安热默尔生物科技有限公司产品;猪胰脂肪酶、对硝基苯酚棕榈酸酯:上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;奥利司他:萨恩化学技术有限公司产品;茶多酚:北京赛多利斯仪器系统有限公司产品;*L*-阿拉伯糖:山东福田药业有限公司产品;原花青素:上海文森生物科技有限公司产品;茶多酚:山东福瑞达医药集团有限公司产品;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)等试剂盒:南京建成生物工程研究所有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物及饲料

7 周龄 C57BL/6J 小鼠,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,经中国食品药品鉴定研究院检测质量合格,实验动物使用证号为 SCXK (京)2016-0002。

高脂饲料组分(质量分数):猪油 10%,胆固醇 1%,胆酸钠 0.5%,蔗糖 10%,基础饲料 78.5%。

1.3 仪器与设备

UV-1700 双光束紫外光分光光度计:日本岛津公司产品;LGJ-25C 真空冷冻干燥机:北京四环仪器厂制造;JA3003 型电子天平:北京赛多利斯科学仪器有限公司产品;Z216MK 台式高速冷冻离心机:德国 Hermle 公司产品;Victor X3 多功能酶标仪:美国 PE 公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 PLIPA 的制备

1)制备卵蛋白粉 将新鲜鸡蛋洗净,消毒后分离蛋清,真空冷冻干燥成粉,保存备用。采用 GB/T 5009.5—2010 凯氏定氮法[13]测定其粗蛋白质质量分数为 80.85%。

2)筛选水解卵蛋白粉最佳蛋白酶 参照刘爽的

方法进行水解[14],将卵蛋白粉配成蛋白质质量浓度80 g/L溶液,沸水浴20 min使蛋白质变性,冷却至反应温度后放入水浴锅,调节pH至最适条件(见表1),加入蛋白酶水解3 h,煮沸10 min灭活,冷却至室温,5 000 r/min离心20 min,取上清液(PLIPA)测定对胰脂肪酶活性的抑制率或在-20 ℃冷冻保存,根据抑制率的高低筛选出最佳蛋白酶。

表1 5种蛋白酶适宜水解参数

Table 1 Optimum hydrolysis parameters of five proteases

酶的种类	温度/℃	pH	加酶量/(U/g)
碱性蛋白酶	60	9.0	2 000
中性蛋白酶	50	7.0	2 000
木瓜蛋白酶	60	6.5	2 000
胰蛋白酶	40	7.5	2 000
胃蛋白酶	37	2.0	2 000

3)优化制备PLIPA 以PLIPA对胰脂肪酶活性的抑制率为指标,分别研究最佳蛋白酶在最适pH条件下水解时间(酶解时间)、加酶量和水解温度(酶解温度)等工艺参数对其水解效果的影响,以获得具有较高抑制脂肪酶活性作用的PLIPA。通过单因素实验筛选各个因素的水平范围值,采用响应面方法和利用Desigh-Expert软件进行三因素三水平Box-Behnken Desigh(BBD)中心组合实验设计[15-17],优化制备PLIPA的最佳工艺参数。

4)卵蛋白源活性肽对胰脂肪酶的抑制率测定参照Zheng和雷启义的方法测定[18-19]。经测定,对硝基苯酚标准曲线方程为y=4.641 3x-0.024 9,R^2=0.999 3。

参照Gómez-ruiz[20]方法进行模拟胃肠液消化实验。参照鲁伟[21]的方法测定多肽含量,将Gly-Gly-Tyr-Arg四肽修改为氧化型谷胱甘肽(GSSG),经测定,GSSG质量浓度与吸光度的标准曲线方程为y=8.481 1x,其中R^2=0.997 9。

1.4.2 PLIPA对肥胖小鼠的体质量控制效果

1)实验分组 48只C57BL/6J小鼠用基础饲料适应性饲喂3 d后按体质量分为6组:正常对照组,肥胖模型对照组,阳性药物组,PLIPA低、高剂量组和复合组。除正常组给予基础饲料喂养外,其余5组以高脂饲料饲喂(高脂组),以所有高脂组体质量均值>(正常组均值+2×标准误差)来判断造模是否成功[22]。造模成功后,各组饲料维持不变,每天同一时间灌胃给药10 μL/g(以体质量计),正常组、肥胖模型组灌胃等体积生理盐水;阳性药物组(奥利司他),PLIPA低、高剂量组分别给药剂量60、400、800 mg/(kg·d),复合组剂量400 mg/(kg·d)(复合组中m(茶多酚):m(PLIPA):m(原花青素):m(*L*-阿拉伯糖)=4:3:2:1)。实验期间,小鼠自由摄食饮水,每5 d称一次体质量,连续给药28 d后取血、解剖。

2)指标测定 给药结束后,禁食12 h,称体质量,眼眶采血。血液室温放置1 h,在4 ℃冰箱放置30 min,3 000 r/min离心10 min,收集血清,参照试剂盒说明测定TG、TC、HDL-C及LDL-C含量。采用颈椎脱臼处死小鼠,将小鼠平摊仰卧,用直尺准确测量小鼠鼻尖至肛门的长度为体长。解剖后,观察小鼠体内脏器变化及脂肪沉着情况,取腹部与皮下脂肪和肝脏,称质量,计算Lee's指数、腹部与皮下脂肪系数、肝指数[23-24],计算公式分别如下:

$$I_1=(\sqrt[3]{M})\times10^3/L \quad (1)$$

$$I_2=M_a/M\times10\% \quad (2)$$

$$I_3=M_S/M\times10\% \quad (3)$$

$$I_4=M_1/M\times10\% \quad (4)$$

式中:I_1为Lee's指数;I_2为腹部脂肪系数;I_3为皮下脂肪系数;I_4为肝指数;M为小鼠体质量,g;L为体长,cm;M_a为腹部脂肪湿质量,g;M_S为皮下脂肪湿质量,g;M_1为肝脏湿质量,g。

1.4.3 数据处理与统计分析

体外每组实验做3个重复,结果以"平均值±标准偏差($\bar{X}$±SD)"的形式表示,使用Origin 8.5软件进行数据统计和图表绘制,采用SPSS 20.0统计软件对有关数据进行显著性分析,必要时结合最小显著差数检验(LSD.test)进行分析,P<0.05认为统计学差异显著。

2 结果与分析

2.1 卵蛋白水解酶的筛选

卵蛋白中所含多种特定生物活性肽的序列,能否被释放出来并表现其生物活性,关键在于所选酶的种类、水解时间、加酶量及温度[25]。经测定未被水解的卵蛋白(空白组)对胰脂肪酶的抑制率为(13.60±0.43)%,5种蛋白酶的卵蛋白源活性肽对胰脂肪酶的活性均表现出抑制作用(见表2)。除胃蛋白酶外,各蛋白酶的PLIPA对胰脂肪酶的抑制率均高于未被水解的卵蛋白对胰脂肪酶的抑制率,经差异显著

性分析，中性蛋白酶、碱性蛋白酶和胃蛋白酶的PLIPA对胰脂肪酶的抑制率与未被水解的卵蛋白对胰脂肪酶的抑制率存在显著性差异(P<0.05)，碱性蛋白酶的PLIPA对胰脂肪酶的抑制率显著高于其他酶(P<0.05)，为(49.77±0.10)%，胃蛋白酶的PLIPA对胰脂肪酶的抑制率最小，仅为(6.46±6.79)%。可能是不同的酶对卵蛋白的作用位点不同，胃蛋白酶主要倾向于剪切氨基端或羧基端芳香族氨基酸或亮氨酸的肽键[26]。胰蛋白酶与木瓜蛋白酶主要的水解位点相似，为精氨酸或赖氨酸的羧基端，因此其对胰脂肪酶的抑制率也接近[27]。中性蛋白酶催化位点多，特异性较差，以水解芳香族疏水性氨基酸残基作为羧基端肽键为主[28]。碱性蛋白酶作用范围较广，作用位点倾向于羧基侧具有芳香烃或疏水性的氨基酸，比中性蛋白酶具有更大的水解能力和耐碱力，有较强的耐热性且具有一定的酯酶活力[28]，最终选用碱性蛋白酶水解卵蛋白制备PLIPA。

表 2　5 种蛋白酶的卵蛋白源活性肽对胰脂肪酶的抑制效果

Table 2　Inhibitory effect of active peptides from ovalbumin hydrolyzed by five proteases on pancreatic lipase

酶的种类	温度/℃	pH	加酶量/(U/g)	抑制率/%
空白组	—	—	—	13.60 ± 0.43^{c}
胰蛋白酶	40	7.5	2 000	17.89 ± 4.18^{bc}
中性蛋白酶	50	7.0	2 000	20.45 ± 1.87^{b}
碱性蛋白酶	60	9.0	2 000	49.77 ± 0.10^{a}
木瓜蛋白酶	60	6.5	2 000	15.61 ± 2.52^{bc}
胃蛋白酶	37	2.0	2 000	6.46 ± 6.79^{d}

注：不同字母表示差异显著(P<0.05)。

2.2　碱性蛋白酶水解卵蛋白单因素实验

2.2.1　水解时间　由图 1 可知，PLIPA对胰脂肪酶的抑制率随水解时间先增大后减小，在 3 h 时，抑制率最大，随后呈下降趋势。其原因可能是随着水解时间的延长，水解液中具有抑制胰脂肪酶功能的肽类被降解，致使其对胰脂肪酶的抑制率下降。初步选取水解时间为 3 h 进行下一步实验。

2.2.2　加酶量　由图 2 可知，PLIPA对胰脂肪酶的抑制率随加酶量的增加先增加后减小，在加酶量 2 000 U/g 时，卵蛋白源活性肽对胰脂肪酶的抑制率显著高于其他加酶量(P<0.05)，在加酶量小于 2 000 U/g 时，酶相对于底物含量较少，随着加酶量增加，促进底物水解，产生更多对胰脂肪酶具有抑制作用的活性肽，使抑制率增大；当加酶量高于 2 000 U/g

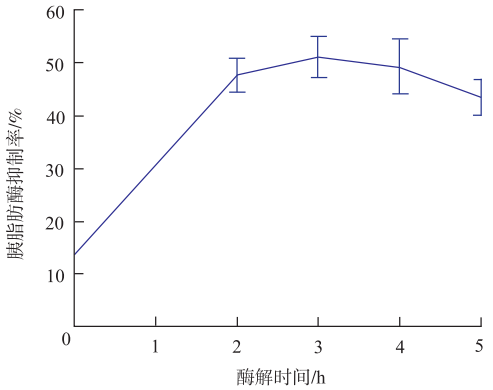


图 1　水解时间对卵蛋白源活性肽抑制胰脂肪酶效果的影响

Fig. 1　Effect of hydrolysis time on pancreatic lipase inhibitory rate of active peptides from ovalbumin

时，高含量的酶对底物存在竞争作用，使水解程度降低，水解产物中对胰脂肪酶具有抑制作用的活性肽含量减少，抑制率降低[29]。因此，加酶量初步确定为 2 000 U/g。

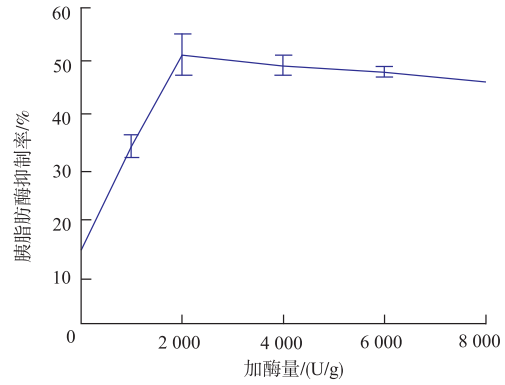


图 2　加酶量对卵蛋白源活性肽抑制胰脂肪酶效果的影响

Fig. 2　Effect of additive amount on pancreatic lipase inhibitory rate of active peptides from ovalbumin

2.2.3　水解温度　由图 3 可以看出，PLIPA对胰脂肪酶的抑制率随水解温度的升高呈现先增大后减小的趋势，在 60 ℃时，抑制率达到最大值，且与其他温度具有显著差异(P<0.05)；在 45~60 ℃范围内，温度升高，分子间运动加剧，酶与底物间的接触机会增加，水解产生活性肽的速率增大；当温度高于 60 ℃时，酶的活性因高温逐渐降低，底物水解水平降低，产生活性肽的速率减小，对胰脂肪酶的抑制率随之降低。初步确定卵蛋白的水解温度为 60 ℃。

2.3　卵蛋白水解工艺的响应面优化实验

根据单因素结果，设计响应面实验(见表 3)。用自变量 X_1、X_2、X_3 分别表示水解时间、加酶量、水解

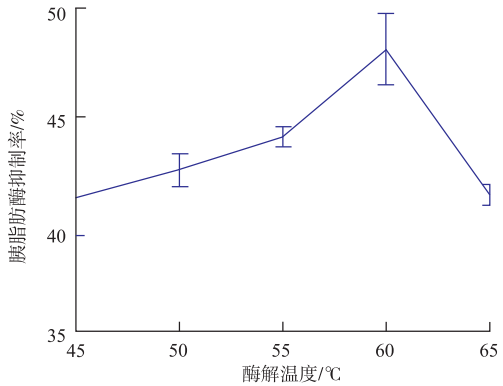


图 3 水解温度对卵蛋白源活性肽抑制胰脂肪酶效果的影响

Fig. 3 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on pancreatic lipase inhibitory rate of active peptides from ovalbumin

温度,以PLIPA 对胰脂肪酶的抑制率为响应值 Y,结果见表 4。

表 3 响应面实验因素与水平设计

Table 3 Factors and level design for response surface experiment

水平	因素		
	水解时间/h	加酶量/(U/g)	水解温度/℃
−1	2	1 500	55
0	3	2 000	60
1	4	2 500	65

将表 4 中的数据进行多元回归拟合,得到回归方程:$Y=51.79+2.55X_1+0.79X_2+3.19X_3+1.74X_1X_2+1.02X_1X_3+0.63X_2X_3+1.54X_1^2-1.99X_2^2+0.53X_3^2$。由表 5 知,该回归方程模型的 $P=0.008\ 4<0.01$,模型极显著,失拟项 $P=0.241\ 7>0.05$,差异不显著,说明模型可靠。各因素对 PLIPA 抑制胰脂肪酶的效果影响大小为水解温度>水解时间>加酶量。一次项中水解温度、时间对PLIPA 抑制胰脂肪酶的效果极显著($P<0.01$),加酶量影响不显著,交互项均不显著;二次项中仅加酶量显著。可知水解温度对 PLIPA 抑制胰脂肪酶的效果影响最大,控制好水解温度对获得具有高胰脂肪酶抑制活性的 PLIPA 至关重要。

表 4 响应面分析方案及实验结果

Table 4 Analysis scheme and experimental results for response surface

标准序	运行序	X_1 水解时间/h	X_2 加酶量/(U/g)	X_3 水解温度/℃	Y 胰脂肪酶抑制率/%
14	1	0	0	0	53.31
13	2	0	0	0	51.07
4	3	1	1	0	57.74
17	4	0	0	0	52.59
7	5	−1	0	1	48.11
2	6	1	−1	0	52.47
8	7	1	0	1	52.83
9	8	0	−1	−1	53.27
15	9	0	0	0	52.21
16	10	0	0	0	49.77
11	11	0	−1	0	46.03
3	12	−1	1	0	46.72
6	13	1	0	−1	57.57
10	14	0	1	−1	53.37
12	15	0	1	1	48.65
1	16	−1	−1	0	48.42

由图 4 可知,PLIPA 对胰脂肪酶的抑制率随水解时间的增大而增大,随水解温度的升高而减小,随加酶量的增加先增大后减少。结合回归模型,利用 Design-Expert.V 8.0.6 软件得出制备 PLIPA 的最佳工艺条件为:水解时间 4 h,加酶量 2 240 U/g,温

表 5 回归模型方差分析

Table 5 Analysis of variance of regression model

变异来源	自由度	平方和	MS	F	P	显著性
模型	9	182.96	20.33	7.13	0.008 4	**
X_1	1	52.12	52.13	18.29	0.003 7	**
X_2	1	4.95	4.95	1.74	0.229 2	
X_3	1	81.47	81.47	28.59	0.001 1	**
X_1X_2	1	12.15	12.15	4.26	0.077 9	
X_1X_3	1	4.18	4.18	1.47	0.265 1	
X_2X_3	1	1.59	1.59	0.56	0.479 8	
X_1^2	1	9.99	9.99	3.50	0.103 4	
X_2^2	1	16.72	16.72	5.87	0.046 0	*
X_3^2	1	1.19	1.19	0.42	0.538 1	
残差误差	7	19.95	2.85			
失拟	3	12.33	4.07	2.11	0.241 7	
纯误差	4	7.73	1.93			
总和	16	202.91				

注:* 差异显著($P<0.05$);** 差异极显著($P<0.01$)。

度 55 ℃,此时对胰脂肪酶抑制率预测值为 59.04%。经 3 次平行实验测得对胰脂肪酶抑制率为 (56.06±2.64)%,与预测值接近,说明建立模型准确可靠,在最优水解条件下,可制备 PLIPA。

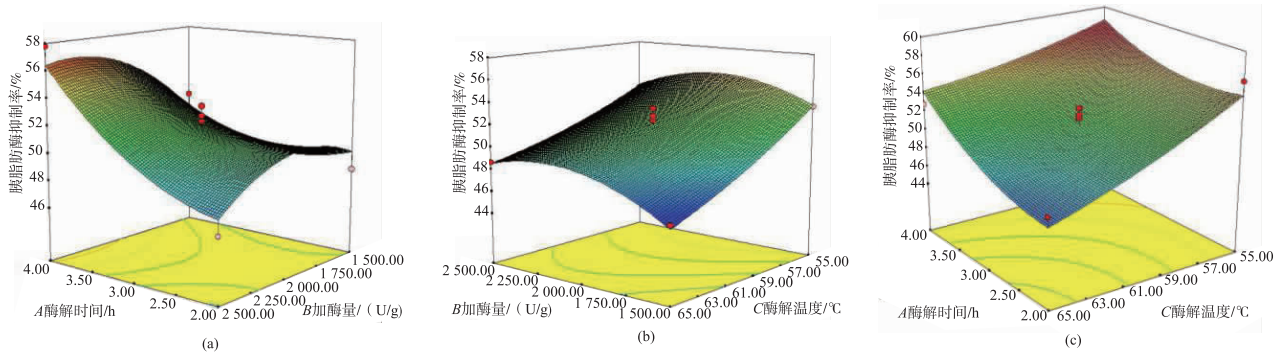


图 4 各因素交互作用对胰脂肪酶抑制率的影响

Fig. 4 Interactive effects of various factors on the pancreatic lipase inhibitory rate

2.4 PLIPA 模拟胃肠液消化实验

PLIPA 经模拟胃液消化后,对胰脂肪酶的抑制率差异不显著(P>0.05);经模拟胃液消化再经过模拟肠液消化后,其每毫克肽对胰脂肪酶的抑制率显著降至 0.46%(P<0.05),但胰脂肪酶抑制率为(43.38±0.02)%(见表 6),达到预期效果,说明 PLIPA 在模拟胃肠道消化后仍具有较高的胰脂肪酶抑制活性。

表 6 PLIPA 模拟胃肠液消化后对胰脂肪酶的抑制率

Table 6 Pancreatic lipase inhibitory rate of PLIPA after simulate gastrointestinal digestion

处理措施	胰脂肪酶抑制率/%	多肽质量浓度/(mg/mL)	每毫克肽对胰脂肪酶抑制率/%
PLIPA 未经消化	56.06±2.64^{a}	101.29	0.55±0.02^{a}
模拟胃消化液消化	49.51±1.90^{a}	92.66	0.53±0.02^{a}
模拟胃肠消化液消化	43.38±0.02^{b}	94.00	0.46±0.00^{b}

注:不同字母表示差异显著(P<0.05)。

2.5 PLIPA 对肥胖小鼠的影响

2.5.1 PLIPA 对小鼠体质量和 Lee's 指数的影响

实验开始前小鼠平均体质量(19.00±2.00) g,组间差异不显著(P>0.05)。建模 40 d,高脂饲料喂养组体质量均值 27.04 g>(正常对照组均值+2×标准误差)20.00 g,且高脂组均显著高于正常组(P<0.01),说明建模成功。小鼠初始体质量、给药初与给药 28 d 后小鼠体质量平均值和 Lee's 指数变化结果如表 7。

经统计学分析,各处理组与肥胖模型组在摄食量方面差异不显著(P>0.05),表明灌胃操作对小鼠摄食量影响不大。由表 7 可知,建模成功后,高脂饲料喂养小鼠体质量均显著高于正常组(P<0.05)。给药28 d 后,与肥胖模型组相比,各处理组体质量均有下降,表明灌胃 PLIPA 对减轻小鼠体质量有一定控制作用,其中 PLIPA 复合组的体质量显著低于肥胖模型组(P<0.05)。徐方旭等[30]研究原花青素对肥胖小鼠的脂解作用,结果表明,不同剂量的原花青素均能降低肥胖昆明小鼠的体质量,150 mg/(kg·d)原花青素在降低小鼠体质量方面效果最佳,小鼠体

表 7 PLIPA 对小鼠体质量及 Lee's 指数影响

Table 7 Effects of PLIPA on body weight and Lee's index in mice

组别	初始体质量/g	给药初体质量/g	给药 28 d 后体质量/g	Lee's 指数
正常对照组	18.63 ±0.92	24.46±1.29$^{\#\#}$	24.39 ±0.67$^{\#\#}$	296.863±8.295
肥胖模型组	19.00± 0.76	27.22 ±1.85**	28.34 ±2.58**	302.411±6.976
阳性药物组	18.86 ± 0.69	26.99±0.72**	26.82 ± 0.85	306.199±1.054*
PLIPA 低剂量组	19.14 ± 0.68	27.06 ±1.00**	26.52±1.62	298.581±3.804
PLIPA 高剂量组	18.86 ± 0.69	27.16 ±1.94**	26.96 ± 2.11	303.721±2.708
PLIPA 复合组	18.86 ± 0.70	26.94±0.65**	26.27 ± 1.82$^{\#}$	289.439±12.464$^{\#\#}$

注:表中 * 表示与正常对照组相比,P<0.05 差异显著,** 表示 P<0.01 差异极显著;$^{\#}$ 表示与肥胖模型对照组相比,P<0.05 差异显著,$^{\#\#}$ 表示 P<0.01 差异极显著。

质量降低量为 4.0 g。吴建章等[31]研究了 *L*-阿拉伯糖对营养型大鼠的减肥效果,发现给药 *L*-阿拉伯糖低、高剂量组(给药剂量分别为 1.5、3 g/(kg·d)),饲养 20、40 d 后,体质量均明显降低,低剂量组给药 20、40 d 体质量分别降低 72.8、81.5 g,高剂量组给药 20、40 d 分别降低 132.8、161.5 g。连丽娜等[32]以昆明种小白鼠为研究对象,研究茶多酚对小鼠营养性肥胖的预防及减肥作用,减肥组分低、中、高剂量组,给药剂量分别为 200、400、600 mg/(kg·d),给药茶多酚第45 天,经与肥胖模型组相比,发现低、中、高剂量组小鼠体质量差异不显著,给药第 90 天,中、高剂量组显著降低,体质量分别降低 10.7、11.8 g,而本研究中PLIPA 低、高剂量组差异不显著,可能是给药剂量偏低或给药时间偏短导致。另外,PLIPA 复合组 Lee′s 指数相对于肥胖模型组显著降低(P<0.01),表明 PLIPA 复合物对塑造高脂小鼠良好体形作用显著。PLIPA 低、高剂量及复合组与阳性药物组无显著差异性,表明给药PLIPA 可达到与阳性药物同样的效果,甚至较奥利司他控制体质量效果更好。

2.5.2 PLIPA 对小鼠脂肪系数和肝指数的影响 与正常组小鼠相比,高脂喂养的小鼠腹部脂肪湿质量、腹部与皮下脂肪系数和肝指数均升高(见表 8),其中 PLIPA 复合组脂肪湿质量较肥胖模型组显著降低(P<0.05)。与肥胖模型组相比,PLIPA 处理组、复合物组与阳性药物组的腹部脂肪系数降低,表明 PLIPA 及其复合物对高脂喂养小鼠的腹部脂肪具有控制作用。与正常组相比,阳性药物组及 PLIPA 低、高剂量组、复合物组的皮下脂肪系数显著升高(P<0.05),表明高脂饮食可使小鼠皮下脂肪堆积。与肥胖模型组相比,PLIPA 低、高剂量组及复合组肝指数有所降低,其中,PLIPA 高剂量组肝指数存在极显著差异 (P<0.01),PLIPA 高剂量可控制因肥胖导致肝指数的异常,且与阳性药物效果相当,说明 PLIPA 可一定程度抑制小鼠体内的脂肪堆积,对体质量有控制作用。

2.5.3 PLIPA 对小鼠血液指标的影响 与正常组相比,各高脂组小鼠血脂 4 项指标 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 均升高(见表 9)。给药阳性药物、PLIPA 及复合物的处理组,4 项指标相比肥胖模型组均降低,表明给药 PLIPA 可以控制高脂小鼠血脂指标的上升,其中,PLIPA 复合组对 LDL-C 指标的控制存在显著作用(P<0.05)。

表 8 PLIPA 对小鼠脂肪湿重及脂肪系数、肝系数的影响

Table 8 Effects of PLIPA on fat wet weight, fat and liver coefficient in mice

组别	腹部脂肪湿质量/g	腹部脂肪系数	皮下脂肪系数	肝指数
正常对照组	0.264±0.042$^{\#}$	1.144±0.202	0.209±0.117$^{\#}$	3.934±0.384$^{\#\#}$
肥胖模型组	0.413±0.079*	1.528±0.359	0.446±0.131*	4.968±0.355**
阳性药物组	0.374±0.076	1.427±0.288	0.442±0.138*	4.253±0.386$^{\#\#}$
PLIPA 低剂量组	0.363±0.072	1.420±0.294	0.530±0.194**	4.820±0.238**
PLIPA 高剂量组	0.317±0.137	1.266±0.542	0.507±0.197**	4.293±0.245$^{\#\#}$
PLIPA 复合组	0.307±0.041$^{\#}$	1.178±0.140	0.596±0.172**	4.679±0.367**

注:表中 * 表示与正常对照组相比,P<0.05 差异显著,** 表示 P<0.01 差异极显著;$^{\#}$ 表示与肥胖模型对照组相比,P<0.05 差异显著,$^{\#\#}$ 表示 P<0.01 差异极显著。

表 9 PLIPA 对小鼠血液指标影响

Table 9 Effects of PLIPA on serum indexes in mice

组别	总胆固醇浓度 TC/(mmol/L)	甘油三酯浓度 TG/(mmol/L)	高密度脂蛋白胆固醇浓度 HDL-C/(mmol/L)	低密度脂蛋白胆固醇浓度 LDL-C/(mmol/L)
正常对照组	1.444±0.739	0.225±0.108	1.202±0.480	0.774±0.800
肥胖模型组	4.173±1.010**	0.324±0.147	1.604±0.129*	2.467±0.998**
阳性药物组	3.621±0.858**	0.231±0.060	1.514±0.223	1.283±0.205$^{\#}$
PLIPA 低剂量组	3.966±0.836**	0.308±0.161	1.485±0.229	1.820±0.986*
PLIPA 高剂量组	3.883±0.782**	0.284±0.073	1.527±0.209	1.687±0.270*
PLIPA 复合组	4.070±0.709**	0.314±0.128	1.536±0.312*	1.467±0.733$^{\#}$

注:表中 * 表示与正常对照组相比,P<0.05 差异显著,** 表示 P<0.01 差异极显著;$^{\#}$ 表示与肥胖模型对照组相比,P<0.05 差异显著,$^{\#\#}$ 表示 P<0.01 差异极显著。

3 结 语

制备卵蛋白源胰脂肪酶抑制肽(PLIPA)的最佳蛋白酶是碱性蛋白酶,最佳工艺条件是在底物质量浓度 80 g/L 的卵蛋白,加入碱性蛋白酶 2 240 U/g,55 ℃、pH 9.0 条件下酶解 4 h,PLIPA 对胰脂肪酶抑

制率达(56.06±2.64)%。PLIPA 经胃肠液消化后,对胰脂肪酶的抑制率有所降低但仍可达到预期。小鼠动物实验表明,PLIPA 低、高剂量及复合组均不同程度控制体质量增长以及脂肪的堆积,达到控制小鼠体形和体质量的目的, 且随着给药剂量的增大,控制体质量的作用更为明显。另外,与 PLIPA 低、高剂量组相比,PLIPA 与 *L*-阿拉伯糖、茶多酚、原花青素复合组对小鼠体质量、体形控制效果最佳。需注意的是 PLIPA 黏性较大,容易堵塞分离柱,未能鉴定出具有抑制脂肪酶酶活的活性肽的结构,需待进一步研究。

参考文献:

[1] 王翠,韦福起. 中青年急性心肌梗死危险因素分析[J]. 西南军医,2008,10(4):74-75.
[2] MALENA M, KENYA N, ALBERTO P, et al. Obesityand excessmortality among the elderly in the United States and Mexico [J]. **Demography**, 2010, 47(1):79-96.
[3] CHIESI M, HUPPERTZ C, HOFBAUER K G. Pharmacotherapy of obesity:targets and perspectives[J]. **Trends in Pharmacological Sciences**,2001,22(5):247-254.
[4] NICKLAS T A,RARANOWSKI T,CNLLEN K W,et al.Fating patterns,dietary quality and obesitys[J]. **Journal of the American College of Nutrition**,2011,20(6):599-608.
[5] PUTNAM J,ALLSHOUSE J,KANTOR L S. US per capita food supply trends:more calories,refined carbohydrates,and fats[J]. **Food Review**,2002,25(3):2-15.
[6] WILCOX M D,BROWNLEE I A,RICHARDSON J C,et al. The modulation of pancreatic lipase activity by alginates[J]. **Food Chemistry**,2014,146:479-484.
[7] MORA L,REIG M,TOLDRA F. Bioactive peptides generated from meat industry by products[J]. **Food Research International**,2014,65:344-349.
[8] YUN J W. Possible anti-obesity therapeutics from nature-a review[J]. **Phytochemistry**,2010,71(14):1625-1641.
[9] BRAY G A ,TARTAGLIA L A . Medicinal strategies in the treatment of obesity[J]. **Nature**,2000,404(6778):672-677.
[10] RAO Q C,ROCCA-SMITH J R,LABUZA T P. Storage stability of hen egg white powders in three protein/water dough model systems[J]. **Food Chemistry**,2013,138(2/3):1087-1094.
[11] CHEN C,CHI Y J,XU W. Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate[J]. **Food & Bioprocess Technology**,2012,5(6):2342-2352.
[12] YOSHINORI M. Egg proteins and peptides in human health-chemistry,bioactivity and production[J]. **Current Pharmaceutical Design**,2007,13(9):875-884.
[13] 国家市场监督管理总局,国家卫生健康委员会. GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
[14] 刘爽,夏杨毅,尚永彪. 鸡蛋蛋清蛋白酶解产物的研究进展[J]. 食品科学,2013,34(15):409-414.
[15] 周丽丽,吴跃梅,王素英. 响应面法优化酶解藻蓝蛋白制备抗肥胖肽[J]. 中国食品学报,2017,17(5):99-107.
[16] 王磊,袁芳,高彦祥. 响应面法优化酶法提取椪柑渣中可溶性膳食纤维工艺[J]. 中国食品学报,2014,14(10):171-178.
[17] 黄薇,宋永康,余华,等. 酶法制备玉米抗氧化肽[J]. 中国食品学报,2014,14(8):69-76.
[18] ZHENG C D,DUAN Y Q,GAO J M,et al. Screening for anti-lipase properties of 37 traditional chinese medicinal herbs[J]. **Journal of the Chinese Medical Association**,2010,73(6):319-324.
[19] 雷启义,邹凯,周江菊,等. 脂肪酶活力测定方法及其比较[J]. 凯里学院学报,2011,29(6):43-45.
[20] GOMEZ-RUIZ J A,RAMOS M,RECIO I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from manchego cheese. stability under simulated gastrointestinal digestion[J]. **International Dairy Journal**,2004,14(12):1075-1080.
[21] 鲁伟,任国谱,宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学,2005,26(7):169-171.
[22] 买买提·依斯热依力,艾克拜尔·艾力,艾热夏提·吐洪江,等. 高脂饮食诱导小鼠肥胖模型的建立[J]. 健康周刊,2018,3(3):1-2.
[23] 李璇,杨蕾,王娟飞,等. 番石榴叶提取物对高脂性肥胖小鼠的减肥降脂作用的研究[J]. 现代生物医学进展,2012,12(31):6001-6005.
[24]王茹,魏玉芬,马雷,等.*β*-壳寡糖对营养性肥胖大鼠的减肥作用研究[J]. 数理医药学杂志,2009,22(2):216-218.
[25] 蔡成岗,沙如意,朱瑞瑜,等. 蛋清粉酶解制备蛋清肽工艺优化研究[J]. 食品与发酵科技,2015,51(5):43-46.
[26] 姜太玲,吴红洋,王微,等. 响应面法优化胃蛋白酶制备花椒籽蛋白抗菌肽的研究[J]. 食品工业科技,2014,35(20):226-231.
[27] 熊华. 木瓜蛋白酶应用研究进展[J]. 保鲜与加工,2006(1):7-8.
[28] 方海红,胡好远,黄红英,等. 微生物碱性蛋白酶的研究进展[J]. 微生物学通报,2002,29(2):57-59.
[29] 庞广昌,潘葳,陈庆森. 不同蛋白酶水解酪蛋白类大分子底物的规律研究[J]. 食品科学,2004,25(3):36-43.
[30] 徐方旭,徐杰,朱天奕,等. 原花青素对肥胖小鼠的脂解作用研究[J]. 河南农业,2017(3):57.
[31] 吴建璋,杨子明,颜小捷,等. *L*- 阿拉伯糖对营养性肥胖大鼠的减肥作用研究[J]. 食品研究与开发,2012,33(5):181-183.
[32] 连丽娜,孟宪军,刘燕,等. 茶多酚对小鼠营养性肥胖的预防及减肥作用研究[J]. 现代农业科技,2006(6):75-76.