

胰脂肪酶特异性卵黄抗体 对胰脂肪酶活性的抑制作用研究

刘 帅,曹立民,林 洪,隋建新*

(中国海洋大学食品安全实验室,山东青岛 266003)

摘要:肥胖对人类的健康构成了极大的危害,胰脂肪酶抑制剂由于可以有效地预防和治疗肥胖而受到了人们的广泛关注。本研究首次以胰脂肪酶为抗原制备了胰脂肪酶特异性卵黄抗体(L-IgY),并分析了其对胰脂肪酶活性的抑制效果。结果表明,L-IgY可通过与胰脂肪酶的非竞争性结合发挥显著的酶活抑制作用($p < 0.05$),计算得出其表观半抑制浓度(IC_{50})为 $168.62 \mu\text{g/mL}$ 。模拟胃液消化环境中 10 min,L-IgY 的活性几乎完全丧失,但是在模拟肠液中 2 h,L-IgY 的免疫活性仅下降了约 20%,表明其有望作为一种潜在的胰脂肪酶抑制剂应用于肥胖的预防和治疗。

关键词:卵黄抗体,胰脂肪酶,抑制,肥胖

Inhibitory effect of the specific chicken egg yolk antibody on pancreatic lipase *in vitro*

LIU Shuai, CAO Li-min, LIN Hong, SUI Jian-xin*

(Food Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China,)

Abstract: Obesity is one of the most serious risks for human health, and the development of pancreatic lipase inhibitors is attracting increasing attention as a useful approach for the prevention and treatment of obesity. Egg yolk antibody (L-IgY) against pancreatic lipase was raised by the immunization of chicken successfully for the first time. Results showed that the specific IgY was a non-competitive pattern inhibitor with the IC_{50} value calculated as $168.62 \mu\text{g/mL}$. The IgY would be degraded in the gastric digestion in 10 min, but was stable in simulated intestinal conditions activity decreased about 20% in 2 h, which suggested the IgY was a safe, novel and promising candidate for the prevention and treatment of obesity.

Key words: egg yolk antibody; pancreatic lipase; inhibition; obesity

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)11-0350-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.11.064

肥胖会引发很多病理性疾病,严重威胁人类健康^[1-2]。由于摄入多余脂肪会导致肥胖,因此抑制脂肪的消化吸收可有效阻止肥胖发生^[3]。

胰脂肪酶(PL, EC 3.1.1.3)可水解 50%~70% 的膳食脂肪,是参与脂肪消化吸收的关键酶^[4]。大量的 PL 抑制剂已被研究报道用以减少脂肪的消化吸收,大致可以分为三类:化学合成物质、微生物代谢产物和天然产物提取物^[5-6]。一些化学合成的物质和微生物代谢产物,如奥利司他,已经表现出良好的胰脂肪酶抑制效果并作为药物上市生产。但是,近来文献报道指出服用奥利司他会产生很大的副作用甚至造成肝脏损伤^[7]。因此,天然 PL 抑制剂因其良好的安全性而得到极大关注,很多皂苷类、多酚类和萜烯类天然产物用于治疗肥胖已有报道,但是这些天然

产物抑制活性相对较低,阻碍了其进一步成为功能性食品或药物^[8-9]。

目前,卵黄抗体(IgY)因其与抗原物质结合后会有效抑制抗原物质的活性,因此在医药和食品行业受到广泛关注。作为从鸡蛋中提取出来的天然无毒物质,IgY 已被美国食品药品监督管理局列为“一般公认安全物质”范畴^[10-11]。此外,IgY 的诸多优点都通过大量的研究得到了验证,如特异性和高抑制活性^[12-16],良好的温度和 pH 稳定性^[17],不违反动物福利,易于提取^[18],产量高^[16],制备程序简单成本低^[19]。近年来,IgY 已被广泛用于多种感染性疾病的预防和治疗^[20-21]。也有相关研究表明,酪氨酸酶特异性 IgY 能使酪氨酸酶的活性显著降低,可作为一种潜在的新型生物保鲜剂应用于食品领域^[22-23]。

收稿日期:2015-12-10

作者简介:刘帅(1990-),男,硕士研究生,研究方向:食品安全,E-mail:liu888shuai888@126.com。

*通讯作者:隋建新(1981-),男,博士,副教授,研究方向:食品安全,E-mail:suijianxin@ouc.edu.cn。

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(201413061)。

然而关于 IgY 对人体消化酶活性的抑制作用的研究尚属空白,本研究首次以胰脂肪酶为抗原免疫蛋鸡,从蛋黄中制备分离了胰脂肪酶的特异性 IgY,并对其抑制脂肪酶活性的效果和影响因素进行初步分析,以期为进一步动物实验验证肥胖抑制效果,开发相应的功能性药物提供前期工作基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胰脂肪酶 VI-S 型、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂 Sigma 公司;胰脂肪酶 II 型、牛血清白蛋白(BSA) 北京索莱宝公司;辅脂酶(7000 U/mg) Roche 公司;奥利司他 重庆华森制药有限公司;莱亨蛋鸡 青岛市城阳区万盛源养殖场。

Z36HK 高速冷冻离心机 德国 Hermal 公司;Multiskan MK3 酶标仪 Thermo Labsystems;Starter3100 pH 计 奥豪斯仪器(上海)有限公司;HH-1 恒温水浴锅 国华电器有限公司。

1.2 卵黄抗体的制备

动物实验的各个操作步骤严格按照中国海洋大学食品科学与工程学院实验动物伦理委员会的指导规范进行。将 12 只蛋鸡随机平均分成两组,实验组取 0.2 mg/mL 胰脂肪酶和弗氏完全佐剂以体积比 1:1 混合后充分乳化,在鸡的胸前皮下散点注射(1 mL/只)。然后分别在第 3、5、7、10 周更换为弗氏不完全佐剂进行强化免疫。空白组注射相同剂量的生理盐水作为阴性对照。从第 3 周起,收集蛋鸡所产鸡蛋,以每周为一个计量周期,进行特异性卵黄抗体的分离提取。

特异性卵黄抗体的分离提取参照党昕的方法^[23]进行:以水稀释法对蛋黄进行预分离,硫酸铵两步沉淀法提取特异性卵黄抗体,冻干后储存于 4 ℃ 备用。提取得到的实验组 IgY 和阴性对照组 IgY 分别记作 L-IgY 和 N-IgY。

1.3 蛋白含量和纯度测定

以 BSA 为标准蛋白建立标准曲线,用考马斯亮蓝染色法测定 IgY 的蛋白质含量^[24]。SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定抗体纯度^[24]。

1.4 胰脂肪酶活力的测定

通过测定游离脂肪酸从乳液释放的量计算胰脂肪酶活力,测定方法在前人的基础上有所改进^[25]。

反应缓冲液(pH8.0): 25 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 4 mmol/L 猪胆盐。

胰脂肪酶溶液:胰脂肪酶溶于反应缓冲液中至终浓度为 1 mg/mL, 5000 r/min 离心 5 min, 收集上清液后用反应缓冲液稀释至 0.2 mg/mL。

辅脂肪酶溶液:辅脂肪酶溶于反应缓冲液中至终浓度为 20 μg/mL。

底物溶液:含 1% 三油酸甘油酯的 95% 乙醇溶液用反应缓冲液稀释(v/v, 1:4.25)。

反应过程:将 50 μL 胰脂肪酶溶液、50 μL 的辅脂酶溶液和 50 μL 的反应缓冲液加入到 96 孔板中, 37 ℃ 孵育 30 min 后,加入 50 μL 三油酸甘油酯溶液,

365 nm 处测其吸光度值变化。

胰脂肪酶活力单位定义为:在 37 ℃, pH 为 8.0 条件下,胰脂肪酶每分钟水解三油酸甘油酯生成 1 μmol 游离脂肪酸(FFA)所需的酶量为 1 个活力单位(1 U = 1 μmol FFA/min)。

1.5 胰脂肪酶活性抑制率的测定

L-IgY 用反应缓冲液溶解至终浓度为 2.5 mg/mL, 将 50 μL 的胰脂肪酶溶液、50 μL 的辅脂酶溶液和 50 μL L-IgY 的溶液加入到 96 孔板中,如前述操作测定胰脂肪酶的活力。阴性对照采用同样的方法测定,用相同浓度的 N-IgY 替换 L-IgY。抑制率计算公式如下:

抑制率(%) = 空白组酶活力 - 实验组酶活力 / 空白组酶活力 × 100

为了确定 L-IgY 对胰脂肪酶的半抑制浓度(IC₅₀),测定不同浓度 L-IgY (0.0625、0.125、0.25、0.5、1 mg/mL) 对胰脂肪酶的抑制率,相同浓度的 N-IgY 作阴性对照。奥利司他作阳性对照,测定其不同浓度(0.1、0.5、1、5、20 μg/mL) 对胰脂肪酶的抑制活性。分别计算 L-IgY 和奥利司他的 IC₅₀^[26]。

双倒数作图法分析 L-IgY 对胰脂肪酶的抑制类型,不同浓度的 L-IgY (0、0.5、1 mg/mL) 在不同三油酸甘油酯浓度下(1.129、2.259、4.518、6.776、9.035 mmol/L 测定胰脂肪酶活性,以酶反应速率的倒数为纵坐标,底物浓度的倒数为横坐标作图^[27]。

1.6 L-IgY 稳定性的测定

将 L-IgY 溶解至 5 mg/mL (以 L-IgY 提取物蛋白含量计) 分别于 30、40、50、60、70、80、90 ℃ 水浴中孵育 30 min 以测定其热稳定性^[24]。各孵育溶液冷却至室温后,分别测定其对胰脂肪酶的抑制率。

将 L-IgY 分别用 pH1~14 的磷酸盐缓冲液(PBS)溶解至 5 mg/mL (蛋白含量),于 4 ℃ 孵育 60 min,测定其 pH 稳定性^[24]。将各溶液 pH 调至中性并稀释至 1 mg/mL 测其抑制率。

对于胃蛋白酶稳定性的测定,将 L-IgY 溶解在模拟胃液(SGF)中至终浓度为 5 mg/mL,于 37 ℃ 进行酶解^[28]。分别在酶解的第 1、2、5、10、15、30、60、90、120 min 时各取出 1 mL 溶液加入 0.5 mL 0.1 mol/L 碳酸钠缓冲液(pH9.6)以使胃蛋白酶失活,分别进行 SDS-PAGE 电泳分析和抑制率测定^[24]。

对于胰蛋白酶稳定性的测定,将 L-IgY 溶解在模拟肠液(SIF)中至终浓度为 5 mg/mL,于 37 ℃ 进行反应^[29]。分别在反应的第 1、2、5、10、15、30、60、90、120 min 时取出 1 mL 溶液置于冰盒中 5 min 以使胰蛋白酶失活,分别测其抑制率和 SDS-PAGE 电泳分析^[24]。

2 结果

2.1 特异性 IgY 的制备及性质

首次免疫后第八周的蛋黄提取物对胰脂肪酶活性显示出显著的抑制效应,表明免疫蛋鸡成功产生了胰脂肪酶特异性 IgY。随着免疫时间的增加, L-IgY 的抑制活性不断增强,并在第 13 周达到最大(约 95%)且持续保持稳定至第 16 周(图 1);而阴性

对照组 IgY (N-IgY) 也表现出对较低的胰脂肪酶的抑制活性 (小于 8%), 其原因可能是提取的蛋白质组分中的一些非特异性成分干扰了酶与底物之间的相互作用, 如空间位阻和电子特性的变化等。

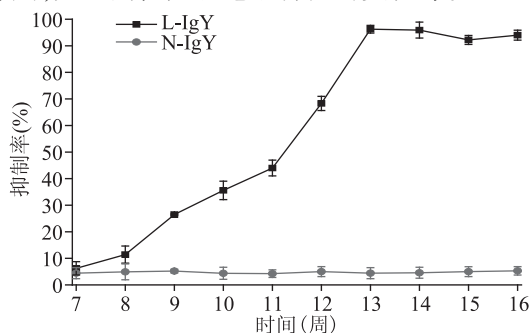


图1 免疫周期内的抑制率

Fig.1 Inhibition rate during immunisation period

考马斯亮蓝染色法测得的标准曲线方程为 $y = 5.7971x + 0.4309$, 相关系数 $R^2 = 0.9993$ 。SDS-PAGE 结果显示 (图 2), 所得的特异性 IgY 纯度较高, 除在 66.2 ku 和 25.0 ku 左右处分别出现抗体的重链和轻链外, 仅在 35.0 ku 左右处出现一条未知的蛋白条带。在本研究中, 此未知条带并未对胰脂肪酶特异性 IgY 的活性评价产生显著影响, 这与前人的研究一致^[30]。

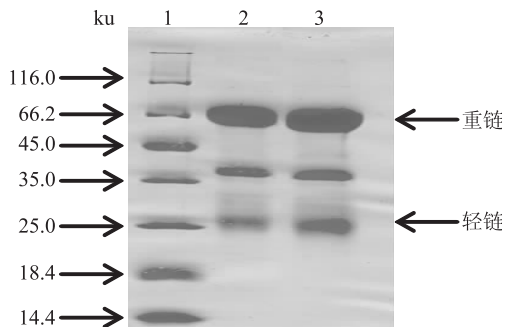


图2 L-IgY 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE patterns of

L-IgY purified from egg yolk

注: 1: marker; 2: N-IgY; 3: L-IgY。

2.2 L-IgY 对胰脂肪酶的体外抑制率

L-IgY 对胰脂肪酶活性的体外抑制效应显示, L-IgY 抗体的抑制率表现为浓度依赖性, 抑制率随浓度增大而升高, 并在 1 mg/mL 浓度下显示出最大抑制率 ($92.5\% \pm 0.5\%$) (图 3), 计算得其 IC_{50} 为 $168.62 \mu\text{g/mL}$ 。而阳性对照奥利司他在 $5 \mu\text{g/mL}$ 的浓度下抑制率达到 $102.6\% \pm 3.2\%$, 其 IC_{50} 计算得 $0.41 \mu\text{g/mL}$ (图 4)。

为进一步探究 L-IgY 对胰脂肪酶活性的抑制类型, 测定了在不同浓度底物溶液中不同 L-IgY 浓度的抑制率, 并且用双倒数法作图。如图 5 所示, 随着 L-IgY 浓度的升高, 胰脂肪酶的反应速率 $V_{\max}$ 值下降, 但 K_m 值保持不变, 这与非竞争性抑制作用的特点相符, 说明 L-IgY 是胰脂肪酶的非竞争性抑制剂^[31]。

2.3 L-IgY 的温度、pH、胃蛋白酶、胰蛋白酶稳定性

如图 6 所示, L-IgY 对胰脂肪酶活性在 30~60 °C

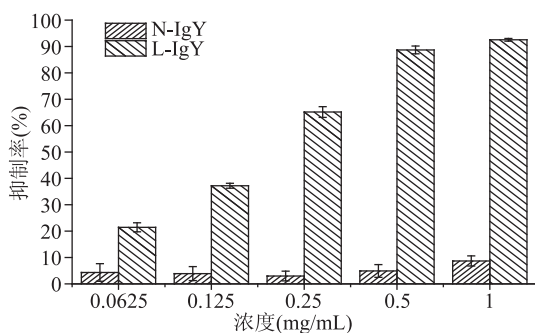


图3 不同浓度下 L-IgY 和 N-IgY 的抑制率

Fig.3 Inhibition activity of L-IgY

and N-IgY at different concentrations

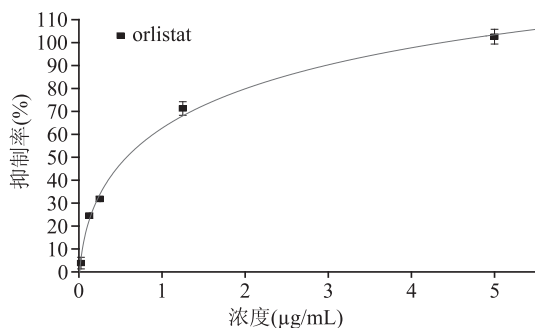


图4 Orlistat 的剂量反应曲线

Fig.4 Dose-response curves of orlistat

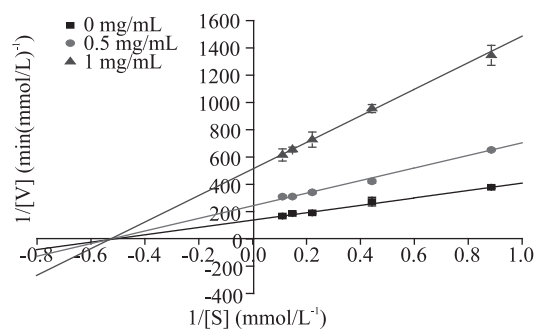


图5 L-IgY 的 Lineweaver-Burk 图

Fig.5 Lineweaver-Burk plot of the reaction of

lipase in the presence of L-IgY

的范围内保持稳定, 但是当温度升高至 70 °C 以上时活性丧失了约 80% 以上。L-IgY 在 pH4~12 的范围内也有良好的稳定性; 但当 pH 低于 4 或高于 12 时, 活性急剧下降 (图 6)。这些结果表明 L-IgY 具有良好的温度和酸碱稳定性, 可以适应人体肠道内的温度和 pH^[11,17,24]。

为了探究 L-IgY 经口服方式进入人体肠道发挥功能的可能性, 对 L-IgY 在模拟胃肠条件下的稳定性进行了研究。在模拟胃液中 37 °C 孵育后, 其活性随着孵育时间增加迅速降低, 2 min 内活性丧失约 80%, 10 min 后几乎完全丧失 (图 8)。SDS-PAGE 电泳图显示其重链和轻链在反应 2 min 后逐渐降解成小片段 (图 9), 这与其活性迅速降低的结果相符, 说明其在模拟胃液环境下的稳定性差, 极易被胃蛋白酶水解。不过, 在模拟肠道条件下结果是完全不同的: 37 °C 温育 2 h 后 L-IgY 的重链和轻链均保持较

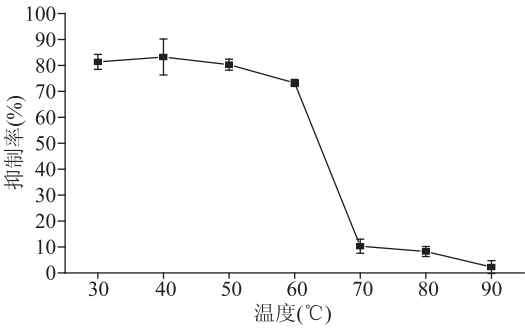


图6 不同温度条件下 L-IgY 对胰脂肪酶抑制作用的影响

Fig.6 Effect of temperature on the inhibition ability of L-IgY against pancreatic lipase

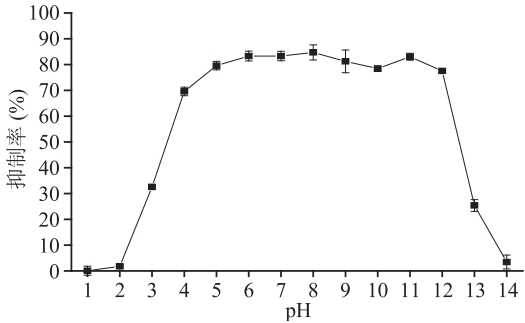


图7 不同 pH 条件下 L-IgY 对胰脂肪酶抑制作用的影响

Fig.7 Effect of pH on the inhibition ability of L-IgY against pancreatic lipase

为完好,只有部分水解(图10),抑制活性也只是在前20 min 内略有下降(约20%),此后基本保持不变(图11)。

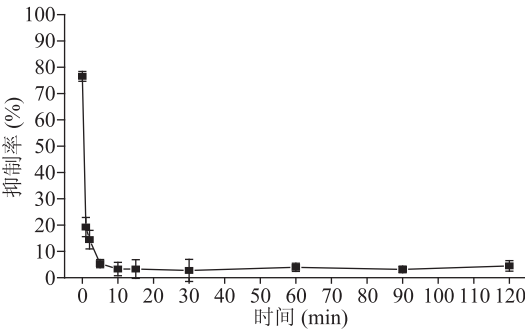


图8 L-IgY 在模拟胃液中反应不同时间的抑制率

Fig.8 Inhibition rate of L-IgY treated in simulated gastric fluid for different time

3 讨论

对比 L-IgY 和其他天然产物对胰脂肪酶的抑制率可以发现,L-IgY 的 IC_{50} (168.62 $\mu\text{g/mL}$) 比其他的植物来源天然产物胰脂肪酶抑制剂低很多,如从荷叶中提取的多酚类物质的 IC_{50} 值为 460 $\mu\text{g/mL}$ ^[32],从无梗五加中提取的皂苷类物质的 IC_{50} 值的为 750 $\mu\text{g/mL}$ ^[33],从猕猴桃中提取的萜烯类化合物的 IC_{50} 值为 614 $\mu\text{g/mL}$ ^[34]。值得注意的是,硫酸铵沉淀法提取的特异性 IgY 仅为全部提取物的 25%,在这 25% 的特异性 IgY 中又仅有 20% 为 L-IgY^[11,35-36]。照此计算,L-IgY 对胰脂肪

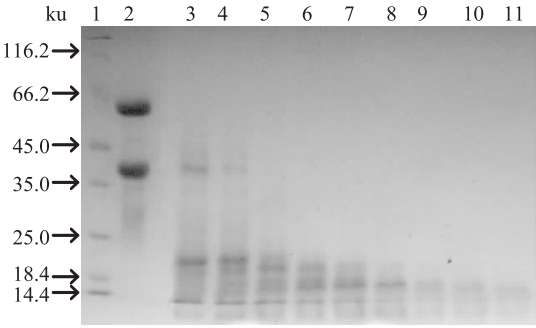


图9 L-IgY 在模拟胃液中反应不同时间的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.9 SDS-PAGE patterns of L-IgY treated in simulated gastric fluid for different time

注:1:marker;2~11:反应时间 1,2,5,10,15,30,60,90,120 min,图10 同。

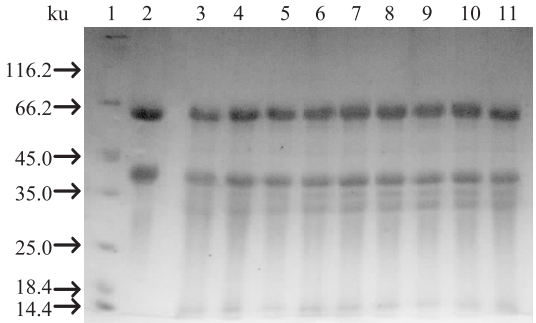


图10 L-IgY 在模拟肠液中反应不同时间的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.10 SDS-PAGE patterns of L-IgY treated in simulated intestinal fluid for different time

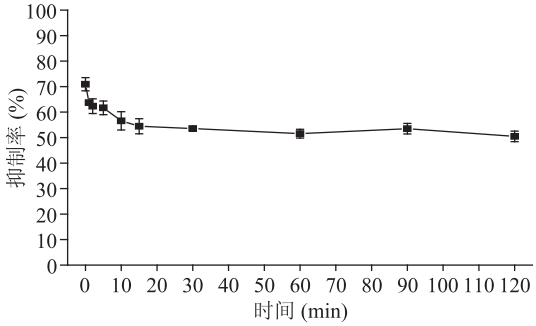


图11 L-IgY 在模拟肠液中反应不同时间的抑制率

Fig.11 Inhibition rate of L-IgY treated in simulated intestinal fluid for different time

酶的实际 IC_{50} 值约为 8.43 $\mu\text{g/mL}$;虽然这样的抑制活性仍比奥利司他的 IC_{50} 值(0.41 $\mu\text{g/mL}$) 高很多,但比目前报道的一些天然产物提取物具有显著优势,也表明其具备成为一种新型安全的抗肥胖功能因子的潜力。

L-IgY 对胰脂肪酶的抑制类型为非竞争性抑制,表明 L-IgY 不会结合至胰脂肪酶的活性位点组氨酸-263,天冬氨酸-176 和丝氨酸-152 三元组^[37],而是与酶-底物复合物结合形成酶-底物-抑制剂三元复合物(ESI)。因此与一些天然产物的竞争性抑制类型不同,L-IgY 的抑制作用不会随底物的增加而降

低和消除,这为 L-IgY 成为胰脂肪酶抑制剂加以有效利用提供了有利的理论依据。

L-IgY 在的胃肠道条件下保持稳定是其通过口服方式在体内发挥实际功能的关键点。虽然胃液构成了 L-IgY 发挥作用的屏障,但是,肠道条件对 L-IgY 的结构和活性的影响不大,可以保持很好的活性。为了有效地防止 L-IgY 在胃液中的降解,保证其在肠道内正常发挥作用,可以使用胶囊、微胶囊、多重乳液、脂质体包埋等技术手段加以解决^[38],我们将在下一步研究中进行探讨。

4 结论

本研究首次从蛋黄中分离提取了针对胰脂肪酶的特异性 L-IgY,并对 L-IgY 对胰脂肪酶活性的抑制效果进行了系统研究,结果表明特异性 L-IgY 是胰脂肪酶的一种非竞争性抑制剂,表观 IC_{50} 值为 $168.62 \mu\text{g/mL}$,实际 IC_{50} 值为 $8.43 \mu\text{g/mL}$,对酶活的抑制效果显著高于许多从植物中提取的天然产物。稳定性实验结果显示 L-IgY 具有良好的温度和 pH 稳定性,在模拟胃液环境中会因降解而丧失活性,但在模拟肠液条件下显示出良好的稳定性。这些结果表明,只要通过有效的屏障保护避免 L-IgY 在胃液中的降解,L-IgY 可有望作为一种新型、天然、安全的脂肪酶抑制剂,用于肥胖症的预防和治疗。

参考文献

- [1] Kumar A, Chauhan G S. Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(2): 454-459.
- [2] Kazmi I, Afzal M, Rahman S, et al. Antiobesity potential of ursolic acid stearyl glucoside by inhibiting pancreatic lipase[J]. European Journal of Pharmacology, 2013, 709(1-3): 28-36.
- [3] Mendes A A, Oliveira P C, Castro H F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase[J]. Journal of Molecular Catalysis b-enzymatic 2012, 78: 119-34.
- [4] Mukherjee M. Human digestive and metabolic lipases—a brief review[J]. Journal of Molecular Catalysis b-enzymatic, 2003, 22(5-6): 369-376.
- [5] Wang S H, Dong S Z, Zhang R, et al. Effects of proanthocyanidins on porcine pancreatic lipase: Conformation, activity, kinetics and thermodynamics[J]. Process Biochemistry, 2013, 49(2): 237-243.
- [6] Carrière F, Renou C, Ransac S, et al. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers[J]. American Journal of Physiology—heart and Circulatory Physiology, 2001, 281(1): G16-G28.
- [7] Filippatos T D, Derdemezis C S, Gazi I F, et al. Orlistat—associated adverse effects and drug interactions; a critical review[J]. Drug Safety, 2008, 31(1): 53-65.
- [8] Birari R B, Bhutani K K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential[J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(19-20): 19-20.
- [9] Keller M A, Stiehler E R. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 13(4): 602-614.
- [10] Kollberg H, Carlander D, Olesen H, et al. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent Pseudomonas aeruginosa infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study [J]. Pediatric Pulmonology, 2003, 35(6): 433-440.
- [11] Xu Y F, Lin H, Sui J X, et al. Effects of specific egg yolk antibody (IgY) on the quality and shelf life of refrigerated Paralichthys olivaceus [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(6): 1267-72.
- [12] Svendsen B, Hau J. Chicken eggs in polyclonal antibody production [J]. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, 1996, 23: 85-91.
- [13] Hodge D, Anbrosius H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins—IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA [J]. Molecular Immunology, 1984, 21(8): 699-707.
- [14] Horton J, Holden C, Ward P, et al. Exploitation of phylogenetic distance in cell surface immune labeling: studies with beta 2-microglobulin [J]. Journal of Investigative Dermatology, 1984, 85: 96-99.
- [15] Song C S, Yu J H, Bay D H, et al. Antibodies to the alpha-subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens [J]. The Journal of Immunology, 1985, 135(5): 3354-3359.
- [16] Donga D, Liu H, Xiao Q, et al. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins (IgY) with a stable synthetic ligand [J]. Journal of Chromatography B, 2008, 870(1): 51-54.
- [17] 杨严俊, 周建新. 蛋黄免疫球蛋白的功能性研究与开发 [J]. 中国食品添加剂, 1999, 2: 1-7.
- [18] Akita E M, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain [J]. Journal of Immunological Methods, 1993, 160(2): 207-214.
- [19] Xu Y P, Li X Y, Jin L J. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review [J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 860-868.
- [20] Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, et al. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken [J]. Biotechnology Agronomy Society and Environment, 2009, 13(3): 295-308.
- [21] Tsukamoto M, Hiroi Adachi S K. Antibodies against swine influenza virus neutralize the pandemic influenza virus A/H1N1 [J]. Molecular Medicine Reports, 2011, 4(2): 209-214.
- [22] 张雪, 丁一民, 林洪, 等. 特异性卵黄抗体及其复配因子对南美白对虾的保鲜效果 [J]. 中国渔业质量与标准, 2014, 4(2): 32-38.
- [23] 党昕. 多酚氧化酶卵黄抗体的制备及其抑制虾类黑变效果研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [24] 隋建新, 林洪, 曹立民, 等. 单增李斯特菌 (Listeria monocytogens) 鸡卵黄抗体的制备及其抑菌活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 1-6.

(下转第 361 页)

- [58] Yazdi M H, Mahdavi M, Setayesh N, et al. Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses *in vivo* and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer [J]. *Daru*, 2013, 21 (1):33.
- [59] Sánchez-Martínez M, da Silva E G P, Pérez-Corona T, et al. Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC-ICP-MS [J]. *Talanta*, 2012(88):272-276.
- [60] Zembruska J, Matusiewicz H, Polkowska-Motrenko H, et al. Simultaneous quantitation and identification of organic and inorganic selenium in diet supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *Food chemistry*, 2014(142):178-187.
- [61] Alzate A, Pérez-Conde M C, Gutiérrez A M, et al. Selenium-enriched fermented milk: a suitable dairy product to improve selenium intake in humans [J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(11):761-769.
- [62] Achanta K, Aryana K J, Boeneke C A. Fat free plain set yogurts fortified with various minerals [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2007, 40(3):424-429.
- [63] Belicová A, Křížková L, Dobias J, et al. Synergic activity of selenium and probiotic bacterium *Enterococcus faecium* M-74 against selected mutagens in *Salmonella* assay [J]. *Folia microbiologica*, 2004, 49(3):301-305.
- [64] Wang Q X, Wang J J, Xu G X. Therapeutic efficacy of *Bifidobacterium longum* carrying Interleukin-2 gene enriched with selenium in mice transplanted H 22 liver tumor [J]. *Chinese*

Journal of Microecology, 2011, 23(9).

- [65] Ibrahim H A M, Zhu Y, Wu C, et al. Selenium-enriched probiotics improves murine male fertility compromised by high fat diet [J]. *Biological Trace Element Research*, 2012, 147(1-3):251-260.
- [66] Hlivak P, Odraska J, Ferencik M, et al. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2005, 106(2):67-72.
- [67] Palomo M, Gutiérrez A M, Pérez-Conde M C, et al. Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt [J]. *Food Chemistry*, 2014(164):371-379.
- [68] Deng Y, Man C, Fan Y, et al. Preparation of elemental selenium-enriched fermented milk by newly isolated *Lactobacillus brevis* from kefir grains [J]. *International Dairy Journal*, 2015(44):31-36.
- [69] Costa A S G, Nunes M A, Almeida I M C, et al. Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 49(2):324-328.
- [70] Molan A L, Flanagan J, Wei W, et al. Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(3):829-835.
- [71] Vodnar D C, Socaciu C. Selenium enriched green tea increase stability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* in chitosan coated alginate microcapsules during exposure to simulated gastrointestinal and refrigerated conditions [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 57(1):406-411.

(上接第354页)

- [25] Sheng L, Qian Z, Zheng S, et al. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: Crocin inhibits pancreatic lipase [J]. *European journal of pharmacology*, 2006, 543(1-3):116-122.
- [26] Kalliokoski T, Kramer C, Vulpetti A, et al. Comparability of mixed IC₅₀ data - a statistical analysis [J]. *PLoS One* 2013, 8(4):e61007.
- [27] Thorsten A F, James J S. A simple statistical method for use in kinetic analysis based on Lineweaver-Burk plots [J]. *Analytical chemistry*, 1977, 80(1):224-238.
- [28] Li X Y, Jin L, Lu Y N, et al. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): effects of chitosan concentration [J]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2009, 159(3):778-787.
- [29] Mouécoucou J, Villaume C, Sanchez C, et al. Beta-lactoglobulin/polysaccharide interactions during *in vitro* gastric and pancreatic hydrolysis assessed in dialysis bags of different molecular weight cut-offs [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1670(2):105-112.
- [30] Shin J H, Nam S W. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2002, 9(5):1061-1066.
- [31] Wu X L, He W Y, Zhang H P, et al. Acteoside: A lipase inhibitor from the Chinese tea *Ligustrum purpurascens* kudingcha

[J]. *Food Chemistry*, 2014, 142(1):306-310.

- [32] Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, et al. Anti-obesity effect of nelumbo nucifera leaves extract in mice and rats [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 106(2):238-244.
- [33] Yoshizumi K, Hirano K, Ando H, et al. Lupane-type saponins from leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* and their inhibitory activity on pancreatic lipase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(2):335-341.
- [34] Kim J, Jang D S, Kim H, et al. Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia arguta* [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2009, 32(7):983-987.
- [35] Lee E N, Sunwoo H H, Menninen K, et al. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* [J]. *Poultry Science*, 2002, 81(5):632-641.
- [36] Sui J X, Cao L M, Lin H. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(11):1946-1950.
- [37] Winkler F K, Arcy A D, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase [J]. *Nature*, 1990, 343:771-774.
- [38] Kovacs-Nolan J, Mine Y. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y [J]. *Journal of immunological methods*, 2005, 296(1-2):199-209.