酶解制备高溶解性蛋清蛋白粉工艺优化及其免疫调节活性研究

彭琦，马美湖，金永国

（华中农业大学食品科技学院，国家蛋品加工技术研发分中心，湖北武汉 430070）

摘要：鸡蛋清中的蛋白质种类丰富、生物效价高且具有多种生物活性，为充分利用高品质蛋清蛋白质资源，本实验在单因素实验的基础上选取酶解时间、酶解温度、酶解 pH 和加酶量四个因素进行四因素四水平的正交试验，以蛋清蛋白粉的溶解度和分散性为评价指标，优化了酶解工艺。实验得出用中性蛋白酶和木瓜蛋白酶以 1:2 的比例，加酶量 800 U/g，酶解温度 53.5 ℃，酶解 pH 5.5，酶解时间 90 min 时，能使溶解度达到 96.61%，分散时间达到 39.62 s。同时通过细胞实验，得出高溶解性蛋清粉模拟胃肠道消化后作用于 RAW264.7 细胞，细胞内酸性磷酸酶、溶菌酶含量显著增多，且 RAW264.7 巨噬细胞增殖指数达到 1.28，并显著提高了细胞因子等的分泌，具有免疫调节活性。该研究为开发溶解性好、品质高、功能效果明显的禽蛋蛋白质类产品提供了重要参考。

关键词：蛋清蛋白质；酶解；蛋白质粉；溶解度；免疫调节活性

文章篇号：1673-9078(2018)04-129-136 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.021

Optimization of Enzymolysis Parameters of Highly Soluble Egg White Protein Powder and Its Application in Immunoregulation *in Vitro*

PENG Qi, MA Mei-hu, JIN Yong-guo

(National Research and Development Center for Egg Processing, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Egg white is rich in proteins and has high biological values and biological activities, which has been served as an excellent food resource. However, the egg white protein products have not yet been fully developed. Here, orthogonal experiment was designed by selecting four factors, including hydrolysis time, hydrolysis temperature, pH and enzyme dosage based on single factor experiments. The solubility and dispersibility of egg white protein powder were traced as evaluation indicators for optimizing enzymatic process. The results showed that the optimal solubility and dispersion time of egg white protein powder reached 96.6% and 39.6 s, respectively when the ratio of neutral protease to papain, the enzyme amount , the hydrolysis temperature , enzymatic hydrolysis time and pH being of 1:2, 800 U/g, 53.5 ℃, 90 min and 5.5, respectively. Furthermore, the effects of simulate gastrointestinal digestion products (SGDP) derived from highly soluble egg white protein powder on the RAW264.7 macrophages was studied by cell experiment. The results showed that SGDP significantly increased the level of acid phosphatase (ACP) and lysozyme (LZM) intracellular. Meanwhile, the role of SGDP in immunoregulation was confirmed by the enhanced proliferation potential (proliferation index 1.28) and cytokine release. This study can provide an important reference for the development of egg protein products with highly soluble and function.

Key words: egg white protein; enzymolysis; protein powder; solubility; immunoregulation

随着人民生活水平的提升，人们对自身健康越来越关注，保健品市场潜力巨大。蛋白质作为人体必需营养素之一，是生命活动的主要承担者，而孕妇、老人、小孩以及体质较弱的成年人往往都缺乏蛋白质，所以各式各样的蛋白质类保健品应运而生，越来越受到消费者的喜爱并逐渐走进消费者家庭。

鸡蛋中的蛋白质是鸡胚发育的主要结构和功能物质，其中蛋清含有 11%~13%的蛋白质，主要包括卵白蛋白、卵转铁蛋白、卵类粘蛋白、卵黏蛋白和溶菌酶等[1]。这些蛋白质必需氨基酸与总氨基酸比接近 0.4，必需氨基酸与非必需氨基酸比接近 0.7，是优质蛋白质源[2]；而且具有多种生物活性，如卵转铁蛋白的免疫

收稿日期：2017-11-14

基金项目：国家自然科学基金项目（31571784）；现代农业产业体系（CARS-40-K24）

作者简介：彭琦（1993-），女，硕士研究生，研究方向：畜产品科学与技术

通讯作者：马美湖（1957-），男，博士，教授，研究方向：肉类蛋品科学研究

增强活性[3,4]，溶菌酶的抑菌活性[5,6]等。有研究报道胰蛋白酶水解卵转铁蛋白的产物可以促进抗原呈递细胞小鼠骨髓源性树突状细胞的成熟[7]，水解蛋清蛋白可以调节人类外周血细胞中加重的免疫反应[8]。

蛋清蛋白质因其良好的起泡性[9~11]，凝胶性[12,13]被广泛用于食品生产加工中。但是鲜蛋壳蛋存在保质期短，运输、使用不方便的问题，为了提高蛋白质的保质期，方便储存和运输，将蛋清制成蛋清粉是目前人们对鸡蛋清的主要加工方式[14~16]。但是，现有工艺加工成的蛋清粉存在溶解性差的问题，严重制约蛋清粉在食品领域的应用。为此，研究提高蛋清粉的溶解性的工艺是蛋清粉加工急需解决的技术问题。现有的提高蛋白质溶解性的方法主要有物理法、化学法和酶法等[17]，在这些方法中，生物酶法由于绿色无毒、安全可控等优势应用广泛。齐宝坤等人将超声技术与酶解技术相结合，作用于制备豆乳粉工艺上，比未经处理的豆乳粉溶解度提高了近 10%[18]；而马志良通过几种酶的筛选然后分段酶解得到了高溶解度的花生蛋白[19]。故本实验用酶法对蛋清蛋白进行水解来提高其溶解性，并对筛选得到的高溶解性蛋白粉进行模拟胃肠道消化，探究消化产物的免疫调节活性，为以后开发为蛋白质类保健产品提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

新鲜鸡蛋，采购于九峰山养鸡场。

RAW264.7 细胞，购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

木瓜蛋白酶(最适 pH 为 6~7，最适温度为 60 ℃)、碱性蛋白酶（最适 pH 为 8.5，最适温度为 55 ℃）、中性蛋白酶（最适 pH 为 7，最适温度为 55 ℃）、风味蛋白酶（最适 pH 为 7，最适温度为 50 ℃），上海源叶生物有限公司；面包酵母，食品级，安琪酵母股份有限公司；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等均为分析纯，国药集团试剂有限公司；胃酶、胰酶、脂多糖（LPS），美国 Sigma 公司；CCK-8 试剂盒，北京庄盟生物科技有限公司；NO 试剂盒，南京建成生物科技有限公司；IL-1βElisa 试剂盒，欣博盛生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Sigma3-30K 高速冷冻离心机，美国 Sigma 公司；K9840 半自动凯氏定氮仪，济南华舜仪器有限公司；HH-4 数显电子恒温水浴锅，巩义市予华仪器有限责任公司；HYP-308 消化炉，上海纤检仪器有限公司；SP-1500 喷雾干燥机，上海顺仪实验设备有限公司；HERAcell 150I 二氧化碳培养箱，德国 Thermo Scientific 公司；synergy HT 多功能酶标仪，美国 Biotek 公司。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程

鲜蛋→清洗→打蛋→搅拌→过滤→酵母脱糖→酶解→喷雾干燥→模拟胃肠道消化→免疫调节活性评价

1.3.2 单因素实验

1.3.2.1 酶的筛选

选择中性蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行酶解。所有蛋白酶均在其最适的酶解温度和 pH 环境条件下酶解，中性蛋白酶采用 pH 为 7 的磷酸盐缓冲液溶解，酶解温度 55 ℃；风味蛋白酶采用 pH 为 7 的磷酸盐缓冲液溶解，酶解温度 50 ℃；碱性蛋白酶采用 pH 为 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液溶解，酶解温度 55 ℃；木瓜蛋白酶采用 pH 为 6.5 的的磷酸盐缓冲液溶解，酶解温度 60 ℃。酶解时间为 30 min，加酶量为 500 U/g。分别制成粉，测定其溶解度和分散性，选出两种酶进行复配。

1.3.2.2 酶配比

在确定两种较佳复配酶的种类的基础上，以不同的比例（1:1、1:2、2:1、3:1、1:3、2:3、3:2）进行酶的复配，固定酶浓度为 500 U/g，酶解时间为 30 min，酶解温度为 57 ℃，pH 为 7，分别制成粉，测定其溶解度和分散性，选出最优复配酶的比例。

1.3.2.3 酶解时间

在确定最优复配酶比例的情况下，将酶解温度、pH 和加酶量固定为 57 ℃、7 和 500 U/g，改变酶解时间为 30、60、90、120 和 150 min 进行酶解，分别测定其溶解度和分散性。

1.3.2.4 加酶量

在确定最优复配酶比例的情况下，将酶解温度、pH 和酶解时间固定为 57 ℃、7 和 30 min，改变加酶量为 500、600、700、800、900、1000 和 1100 U/g 进行酶解，分别测定其溶解度和分散性。

1.3.3 蛋白质溶解度的测定

采用氮分散性作为蛋白质溶解度指标，氮分散性=可溶性氮/总氮

总氮采用凯氏定氮的方法：对于可溶性氮，首先配置 1%的蛋白粉溶液，用磁力搅拌器搅拌 1 h，然后定容至 100 mL，静置 5 min，取一定体积的溶液于 50 mL 离心管，以 1500 r/min 速度离心 10 min，取上清液用凯氏定氮法测得可溶性氮，实验做三次平行。

1.3.4 分散性的测定

参照文献[20]的方法并有所改动。取 2 g 样品加入 50 mL 蒸馏水，用磁力搅拌器以一定速度进行搅拌，待所有结块都散开时记录所用时间即为分散时间，实验做三次平行。

1.3.5 模拟胃肠道消化

根据文献[21]的方法，将溶解度最好的蛋清蛋白粉以 4%的比例溶解于蒸馏水中，搅拌均匀，用盐酸调节 pH 到 2，以 1:80 的酶底比加入胃酶，于 37 ℃下反应 2 h，立即用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.5，以 1:50 的酶底比加入胰酶，与 37 ℃下反应 4 h，反应结束后置于沸水浴中 10 min 使酶灭活，然后在 4000 r/min 的转速下离心 10 min，收集上清液冻干待用。

1.3.6 酶解鸡蛋蛋白粉消化产物对 RAW264.7 细胞增殖的影响

将对数生长期的 RAW264.7 巨噬细胞按 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板中，贴壁 4 h 后，吸出培养液，加入终浓度为 25、50、100 μg/mL 的含有 1.3.5 节所得样品的培养液 100 μL，阳性对照为终浓度为 100 ng/mL 的 LPS，空白对照为不给药的培养基，每个浓度设 5 个复孔。将 96 孔板放置于恒湿恒温培养箱中培养 24 h。取出培养板更换正常培养液，再向每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，置于培养箱中反应 2 h，使用酶标仪在 450 nm 波长下测 OD 值，实验做 3 次平行。

$$细胞增殖活力(\%)=\frac{给药组OD_{450nm}-空白组OD_{450nm}}{对照组OD_{450nm}-空白组OD_{450nm}}\times100\%$$

1.3.7 酶解鸡蛋蛋白粉消化产物对 RAW264.7 细胞 NO 释放和分泌 IL-1β 的影响

取对数生长期的细胞以 1×10^6 每孔接种于 12 孔板中，贴壁 4 h，吸出培养液，加入终浓度为 25、50、100 μg/mL 的含有 1.3.5 节所得样品的培养液 1 mL，阳性对照为终浓度为 100 ng/mL 的 LPS，空白对照为不给药的培养基，每个浓度设 3 个复孔。将 12 孔板放置于恒湿恒温培养箱中培养 24 h。收集上清，按照 NO 和 L-1β 试剂盒上的操作测定 NO 和 IL-1β 的含量。

1.3.8 酶解鸡蛋蛋白粉消化产物对 RAW264.7 细胞胞内酶的影响

细胞处理同 1.3.7 节。细胞在恒温恒湿培养箱中培养 24 h 之后，吸出上清液，用 PBS 清洗两遍，收集细胞，在室温下以 1000 r/min 的转速离心 10 min，弃上清，用 PBS 重悬，再次离心 10 min，重复 1~2 次，弃上清，用细胞破碎仪在冰水浴条件下以 300 W 的功率，每次超声 3~5 s，间隔 30 s，重复 4~5 次将细胞破碎。按照酸性磷酸酶（ACP）试剂盒说明书取 4 μL 进行 ACP 的测定，按照溶菌酶（LZM）试剂盒说明书取 200 μL 的进行 LZM 的测定。

1.3.9 数据分析

所有实验进行 3 次重复，单因素实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行 One-way ANOVA 分析，平均值之间用 Duncan's multiple range test 进行多重比较。正交实验结果采用极差分析法进行分析。

2 结果与分析

2.1 酶种类对蛋清蛋白粉溶解度和分散性的影响

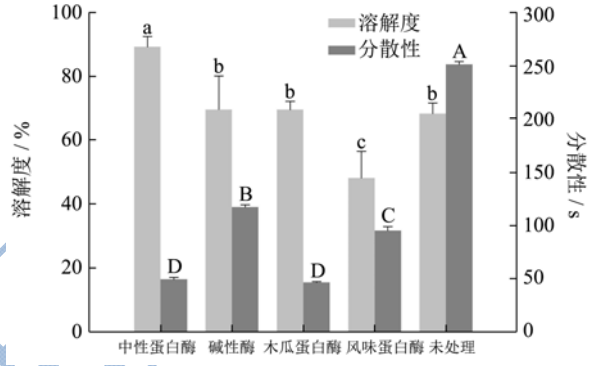

图 1 不同种类的酶对酶解产物溶解性和分散性的影响

Fig.1 Effects of different kinds of enzymes on the solubility and dispersibility of enzymatic hydrolyzates

注：表中小写字母表示溶解度数据之间的差异性；大写字母表示分散性数据之间的差异性；字母相同表示差异不显著(p>0.05)；字母不同表示差异显著(p<0.05)。

如图 1 所示，四种酶中，中性蛋白酶酶解之后的溶解度显著升高（p<0.05），为 89.25±3.22%。经木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶酶解 30 min 之后的蛋清蛋白粉溶解度变化不显著（p>0.05），但风味蛋白酶酶解之后的溶解度显著降低（p<0.05），可能是因为风味蛋白酶属于外切酶，对于完整的蛋白大分子几乎没有作用[22]。在酶解初期风味蛋白酶作用于相对分子质量较小的蛋白质使一些疏水性基团暴露，导致蛋白粉溶解度降低。分散性为蛋白粉在一定量水中完全分散的时间，从图中可以看到，溶解度高的蛋白粉其分散时间相对较短，这是因为溶解度高的蛋白粉颗粒表面可以迅速与水分子结合、溶解、扩散，进而分散开来，这与孙临政[23]的实验结果相一致。

结合溶解度和分散性指标来看，溶解度最高的中性蛋白酶解产物分散性也较好，碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶溶解度相近，但是木瓜蛋白酶酶解产物的分散性较好，所以综合溶解度和分散性，选择了中性蛋白酶和木瓜蛋白酶按比例进行复配进行后面的实验。钟振

生等人[24]在研究中性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究中，得出两者复合比单一酶效果要好，并且两种酶同时加入的酶解效果比分步酶解的果好。

2.2 酶配比对蛋清蛋白粉溶解度和分散性的影响

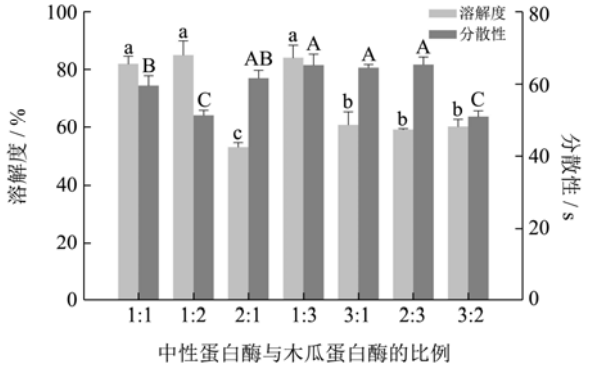

图 2 不同酶配比对酶解产物溶解度和分散性的影响

Fig.2 Effect of different ratio of enzyme on the solubility and dispersibility of enzymatic hydrolysates

注：表中小写字母表示溶解度数据之间的差异性；大写字母表示分散性数据之间的差异性；字母相同表示差异不显著(p>0.05)；字母不同表示差异显著(p<0.05)。

本实验将筛选出来的中性蛋白酶与木瓜蛋白酶以 1:1、1:2、2:1、1:3、3:1、2:3 和 3:2 的配比加入进行实验，酶解温度为 57 ℃，酶解时间 30 min，加酶量为 500 U/g，pH 为 7，结果如图 2 所示。

可以看到，以不同比例酶解之后，溶解度最高为 84.97±4.92%，不如单酶酶解的高，这是因为复合酶共同酶解的最适条件还需进一步摸索。七种比例中，中性蛋白酶与木瓜蛋白酶的比例为 1:1、1:2、1:3 的时候溶解度没有显著性差异（p>0.05），相对较高，说明中性蛋白酶与木瓜蛋白酶共同酶解，当木瓜蛋白酶与中性蛋白酶占比相当或者更多时，酶解所得蛋清粉溶解度较高。而在这三种比例中，中性蛋白酶与木瓜蛋白酶的比例为 1:2 的时候得到产物的分散性最佳，为 51.24±1.38 s，所以选择中性蛋白酶与木瓜蛋白酶 1:2 的比例进行复合酶酶解条件优化实验。

2.3 酶解时间对蛋清蛋白粉溶解度和分散性的影响

图 3 是复合酶酶解时间对酶解产物溶解度和分散性的影响。可以看出酶解 30 min 和 60 min 时，酶解产物的溶解度没有显著性差异（p>0.05），在酶解 90 min 时溶解度达到最高，为 91.71±0.61%，在酶解时间超过 90 min 之后，溶解度就急剧下降。由此可知，用中性蛋白酶与木瓜蛋白酶以 1:2 的比例酶解，在 90 min 时酶解产物的溶解度最高，时间过短酶解程度不够，而酶解时间过长时，一方面因为过度酶解导致疏水性基团的暴露，另一方面，长时间加热会使蛋清蛋白质发生交联、聚集，导致酶解产物的溶解性降低[25]。

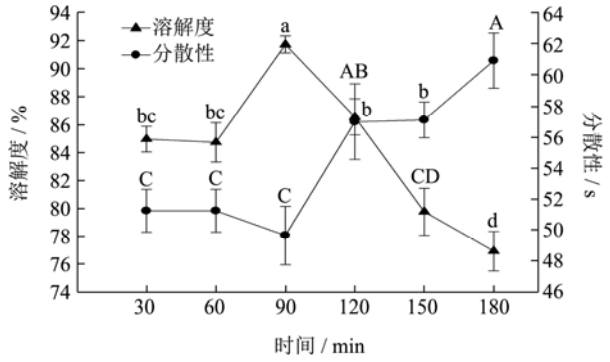

图 3 酶解时间对酶解产物溶解度和分散性的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis time on the solubility and dispersibility of enzymatic hydrolysates

注：表中小写字母表示溶解度数据之间的差异性；大写字母表示分散性数据之间的差异性；字母相同表示差异不显著(p>0.05)；字母不同表示差异显著(p<0.05)。

2.4 加酶量对蛋清蛋白粉溶解度和分散性的影响

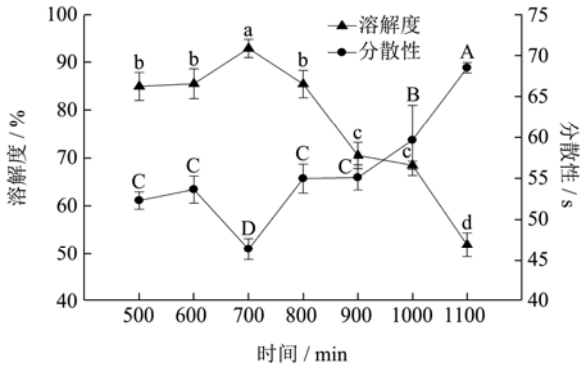

图 4 不同加酶量对酶解产物溶解度和分散性的影响

Fig.4 Effect of enzyme usage on the solubility and dispersibility of enzymatic hydrolysates

注：表中小写字母表示溶解度数据之间的差异性；大写字母表示分散性数据之间的差异性；字母相同表示差异不显著(p>0.05)；字母不同表示差异显著(p<0.05)。

从图 4 中可以看出，随着加酶量的增加，酶解产物的溶解度先增加后降低。在加酶量从 500 U/g 增加到到 700 U/g 时，酶解产物溶解度逐渐增加，在 700 U/g 的时候溶解度达到最高，为 92.92±1.94%。继续增加加酶量，溶解度逐渐降低。由此可知，用中性蛋白酶

与木瓜蛋白酶以 1:2 的比例酶解，加酶量在 700 U/g 时，溶解度最高。这是因为适度酶解会增加肽水解产物的氨基酸残基中氨基和羧基的电离，亲水性增加，从而增加疏水性肽和水解物中完整蛋白质的相互作用，使蛋白质表面疏水性降低从而增加溶解性。而酶添加量过多时，水解物中疏水性基团进一步增多[26]，从而降低了蛋清蛋白粉的溶解度。

2.5 正交实验确定最佳酶解条件

2.5.1 正交实验

由于中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的最适温度都为 50~60 ℃，蛋清中主要蛋白质如卵白蛋白在超过 60 ℃时会变性而发生聚集；且四种蛋白酶最适 pH 在 6~7 左右，所以在单因素实验过程中没有进行酶解温度和酶解 pH 的实验，而是在正交试验中分别设了 4 个梯度。在单因素实验的基础上，根据所用酶的最适温度和 pH，以酶解温度、酶解 pH、酶解时间和加酶量四个因素，进行四因素四水平的正交试验。正交因素水平表见表 1。

表 1 正交设计实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal design

水平	因素			
	A 温度/℃	B pH 值	C 时间/min	D 加酶量/min
1	50	5.5	30	500
2	53.5	6	60	600
3	57	6.5	90	700
4	60.5	7	120	800

2.5.2 综合评分法进行正交试验结果分析

综合评分法是根据各个指标的重要程度，对得出的实验结果进行分析，给每一个试验评出一个分数作为这个试验的总指标。本实验中根据溶解度与分散性的重要性，规定综合分=0.55×溶解度隶属度+0.45×分散性隶属度。

$$\text{分散性隶属度}=\frac{\text{指标最大值}-\text{指标值}}{\text{指标最大值}-\text{指标最小值}}$$

$$\text{溶解度隶属度}=\frac{\text{指标值}-\text{指标最小值}}{\text{指标最大值}-\text{指标最小值}}$$

表 2 正交试验设计与结果

Table 2 Results of orthogonal array experiment

试验号	A	空列	B	C	D	溶解度/%	分散性/s	综合分
1	1	1	1	1	1	0.906	49.05	0.661
2	1	2	2	2	2	0.852	53.63	0.456
3	1	3	3	3	3	0.953	50.72	0.729
4	1	4	4	4	4	0.794	47.54	0.452
5	2	1	2	3	4	0.891	39.65	0.815
6	2	2	1	4	3	0.873	43.98	0.690
7	2	3	4	1	2	0.922	51.66	0.644
8	2	4	3	2	1	0.880	57.09	0.447
9	3	1	3	4	2	0.838	37.00	0.754
10	3	2	4	3	1	0.814	38.70	0.668
11	3	3	1	2	4	0.870	40.82	0.747
12	3	4	2	1	3	0.834	54.36	0.402
13	4	1	4	2	3	0.815	47.05	0.505
14	4	2	3	1	4	0.823	44.92	0.565
15	4	3	2	4	1	0.696	59.79	0.000
16	4	4	1	3	2	0.904	46.44	0.709
k_1	0.575	0.684	0.702	0.568	0.444			
k_2	0.649	0.595	0.418	0.539	0.641			
k_3	0.643	0.530	0.624	0.730	0.582			
k_4	0.445	0.503	0.567	0.474	0.645			
极差 R	0.204	0.181	0.284	0.256	0.201			
因素主次			B C A D					
优方案			$B_1C_3A_2D_4$					

表 2 是正交试验的极差分析表，通过极差分析，得出四个因素的重要程度排序为 B>C>A>D，即酶解 pH>酶解温度>酶解时间>加酶量。对最优组进行验证实验得到，在优化出来的最优条件下，即酶解温度 53.5 ℃、酶解 pH 5.5、酶解时间 90 min、加酶量为 800 U/g 时，溶解度为 96.61%，分散性为 39.62 s，都达到了较好的水平，说明此次正交优化实验是有效的。

2.6 酶解鸡蛋蛋白粉消化产物对 RAW264.7 细胞中酶的影响

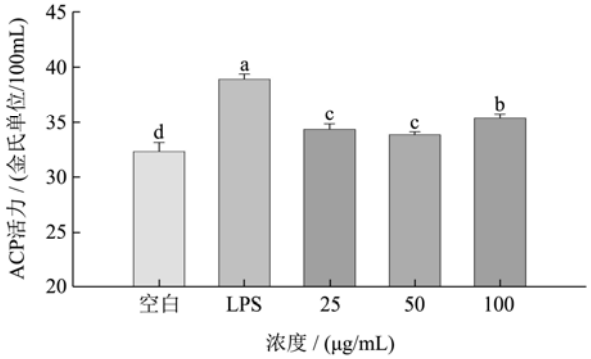

图 5 酶解蛋清粉消化产物对 RAW264.7 细胞内 ACP 的影响

Fig.5 Effect of SGDP on ACP in RAW264.7

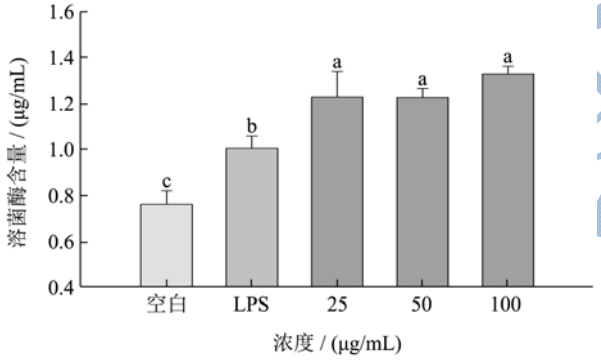

图 6 酶解蛋清粉消化产物对 RAW264.7 细胞内 LZM 的影响

Fig.6 Effect of SGDP on the LZM in RAW264.7

注：字母相同表示差异不显著(p>0.05)；字母不同表示差异显著(p<0.05)。

BALB/c 小鼠经 Abelson 鼠白血病病毒诱导会产生肿瘤，肿瘤产生之后，收集小鼠的腹水单核样巨噬细胞得到 RAW264.7 细胞株，RAW264.7 巨噬细胞具有多种功能，包括吞噬作用、抗原呈递和多种细胞因子的分泌[27,28]。RAW264.7 巨噬细胞受到刺激时被激活，致使细胞中酶的分泌及活性增加，细胞代谢提高，而奠定了巨噬细胞活化的基础，也是实现各种功能的基础。巨噬细胞内具有多种胞内和胞外酶，也可分泌一些可溶性因子，这些物质在一定程度上可反映该细胞的功能状态[29]。

酸性磷酸酶是巨噬细胞的标志酶，活性高低反应了巨噬细胞被激活的程度。溶菌酶是巨噬细胞的一种胞外酶，可在体外溶解细菌。由图 5 可知，经过样品处理后，RAW264.7 产生的 ACP 显著增多（p<0.05），且随着浓度的升高，有上升的趋势。由图 6 可知，相比于空白对照，经过样品处理之后，RAW264.7 产生的溶菌酶含量显著上升（p<0.05），但是各浓度之间的差异不显著（p>0.05）。

综上可知，在巨噬细胞经过样品处理之后，巨噬细胞活化的标志酶酸性磷酸酶含量显著上升，说明巨噬细胞被激活，溶菌酶的含量也显著上升，这些酶都与巨噬细胞的功能有关，本实验结果预示了样品有增强免疫调节功能的效果。

2.7 酶解鸡蛋蛋白粉消化产物对 RAW264.7 细胞增殖、分泌 NO 和 IL-1β 的影响

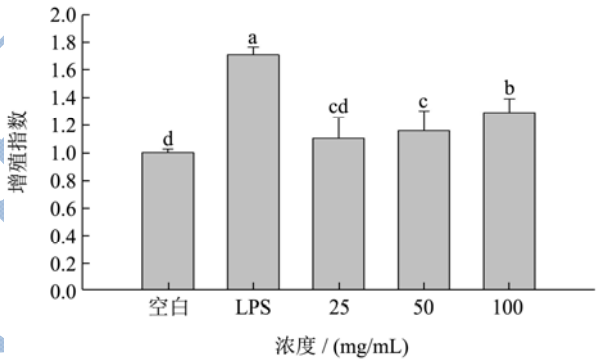

图 7 酶解蛋清粉消化产物对 RAW264.7 增殖的影响

Fig.7 Effect of SGDP on the RAW264.7 cell proliferation

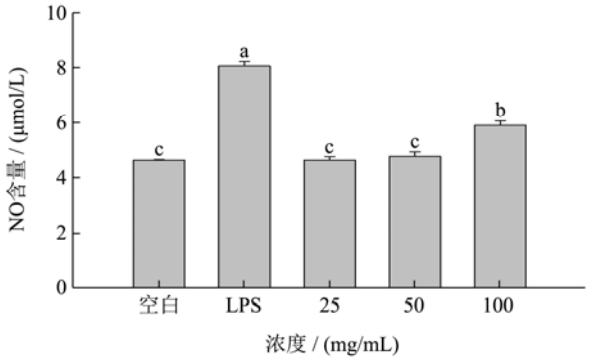

图 8 酶解蛋清粉消化产物对 RAW264.7 释放 NO 的影响

Fig.8 Effect of SGDP on the NO releasing in RAW264.7

在机体受到病原体入侵时，巨噬细胞增殖速率会增加，且会通过释放出更多的免疫相关的细胞因子起到免疫调节作用。

由图 7 可知，与空白对照相比，阳性对照与浓度为 50 mg/mL 和 100 mg/mL 组显著增加巨噬细胞的增殖能力（p<0.05），说明样品在一定的浓度下可以有效

的刺激巨噬细胞增殖。一氧化氮 NO 是一种具有强活性的自由基，在生物体内具有许多作用，如可以介导免疫调节作用，参与学习和记忆等等，是机体免疫过程中非常重要的一种中间物质[30]。由图 8 可知，浓度为 100 mg/mL 组跟对照组相比 NO 释放量显著增加（p<0.05），但是浓度为 25 mg/mL 和 50 mg/mL 时，样品对 RAW264.7 细胞释放 NO 没有显著影响（p>0.05）。IL-1β 属于白细胞介素，能够激活 T 细胞及巨噬细胞，在免疫调节过程中发挥重要作用。由图 9 可知，50 mg/mL 和 100 mg/mL 组和空白对照组相比，显著增加了 RAW264.7 细胞分泌 IL-1β 的量（p<0.05），且存在着剂量效应关系。

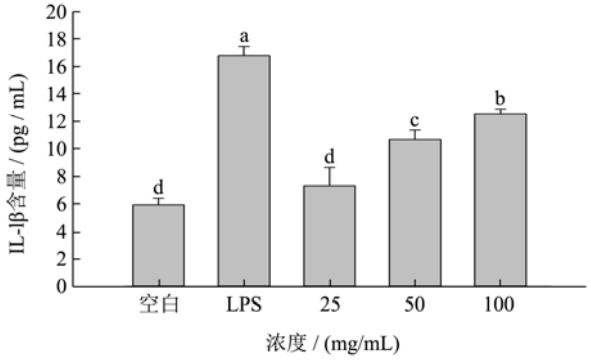

图 9 酶解蛋清粉消化产物对 RAW264. 7 分泌 IL-1 β 的影响

Fig.9 Effect of SGDP on the IL-1β secretion in RAW264.7

注：字母相同表示差异不显著(p>0.05)；字母不同表示差异显著(p<0.05)。

3 结论

鸡蛋蛋清是一种优质蛋白质源，但其喷雾干燥所得的蛋清蛋白粉溶解性能不佳。本研究以绿色安全高效的生物酶解的方法，通过单因素实验和正交试验，优化了酶解条件，即用中性蛋白酶和木瓜蛋白酶以 1:2 的比例进行酶解，酶解温度、酶解时间、酶解 pH 分别为 53.5 ℃、90 min、5.5，加酶量为 800 U/g。在这种酶解条件下得到的酶解蛋清蛋白粉溶解度达到 96.61%，分散性达到 39.62 s，具有不错的溶解性能。本研究对优化得出的高溶解性酶解蛋清粉进行模拟胃肠道消化，使消化产物作用于巨噬细胞 RAW264.7，消化产物作用之后，巨噬细胞内酸性磷酸酶和溶菌酶含量显著增多，说明巨噬细胞被激活，为提高机体免疫调节作用奠定了基础；同时，噬细胞增殖指数增加到 1.28，且巨噬细胞释放 NO 和分泌 IL-1β 与空白对照相比也显著增加（p<0.05）。综上，本实验以复合酶解的方法，通过酶解条件优化得到了高溶解性的鸡蛋蛋白粉，且优化得到的鸡蛋蛋白粉具有免疫调节活性。本研究为将蛋清蛋白开发为保健食品提供了理论基础。

参考文献

[1] 马美湖.禽蛋蛋白质[M].北京:科学出版社,2016
MA Mei-hu. Egg proteins [M]. Beijing: Science Press, 2016

[2] 江潇潇,叶宇飞,章豪,等.鸡蛋清、鸡蛋黄中 17 种氨基酸成分比较[J].浙江农业科学,2015,56(9):1498-1499
JIANG Xiao-xiao, YE Yu-fei, ZHANG Hao, et al. Comperation of 17 kinds of amino acids in egg white and egg yolk [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2015, 56(9): 1498-1499

[3] Xie Hang, Huff Gerry R, Huff William E, et al. Effects of ovotransferrin on chicken macrophages and heterophil-granulocytes [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2002, 26(9): 805-815

[4] 汤群,徐明生,林日新,等.卵转铁蛋白的免疫调节作用评价[J].食品研究与开发,2013,34(24):247-250
TANG Qun, XU Ming-sheng, LIN Ri-xin, et al. Evaluation on immune-enhancement effect of ovotransterrin [J]. Food Research and Development, 2013, 34(24): 247-250

[5] Zhang Z, Wang Y, Zheng F, et al. Ultrasensitive SERS assay of lysozyme using a novel and unique four-way helical junction molecule probe for signal amplification [J]. Chemical Communications, 2015, 51(5): 907-910

[6] 刘益丽,邓霄禹,江明锋.溶菌酶抑菌活性及检测方法研究进展[J].中国畜牧兽医,2013,40(8):189-194
LIU Yi-li, DENG Xiao-yu, JIANG Ming-feng. Research progress on function of non-structural proteins of classical swine fever virus [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 40(8): 189-194

[7] Liu L, Xu M, Tu Y, et al. Immunomodulatory effect of protease hydrolysates from ovotransferrin [J]. Food & Function, 2017, 8(4): 1452-1459

[8] Lozano-Ojalvo D, Molina E, López-Fandiño R. Regulation of exacerbated immune responses in human peripheral blood cells by hydrolysed egg white proteins [J]. PloS One, 2016, 11(3): e0151813

[9] Yang X, Foegeding E A. Effects of sucrose on egg white protein and whey protein isolate foams: factors determining properties of wet and dry foams (cakes) [J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(2): 227-238

[10] Huang T, Tu Z, Wang H, et al. Promotion of foam properties of egg white protein by subcritical water pre-treatment and fish scales gelatin [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2017, 512(1):

171-177

[11] Wang G, Troendle M, Reitmeier C A, et al. Using modified soy protein to enhance foaming of egg white protein [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(10): 2091-2097

[12] Van Den Berg M, Jara F L, Pilosof A M R. Performance of egg white and hydroxypropylmethylcellulose mixtures on gelation and foaming [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 48: 282-291

[13] 许亚彬,胥伟,黄迪.蛋清液与蛋清粉对鲢鱼鱼糜凝胶性的改良效果比较[J].中国家禽,2016,38(4):34-37
XU Ya-bin, XU Wei, HUANG Di. Comparison of improvement effect of egg white solution and egg white powder on gelling properties of silver carp surimi [J]. China Poultry, 2016, 38(4): 34-37

[14] Nishanthi M, Chandrapala J, Vasiljevic T. Properties of whey protein concentrate powders obtained by spray drying of sweet, salty and acid whey under varying storage conditions [J]. Journal of Food Engineering, 2017, 214: 137-146

[15] 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 and Bioprocess Technology, 2012, 5(6): 2342-2352

[16] 孙颜君,吕加平,刘振民.不同喷雾干燥温度对乳蛋白浓缩物加工性质的影响[J].食品科技,2014,39(1):42-47
SUN Yan-jun, LV Jia-ping, LIU Zhen-min. Effect of spray drying temperature on the functionality of milk protein concentrate [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(1): 42-47

[17] Rayo L M, E Carvalho L C, Sardá F A H, et al. Production of instant green banana flour (*Musa cavendischii*, *var. Nanicão*) by A pulsed-fluidized bed agglomeration [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 461-469

[18] 齐宝坤,隋晓楠,王中江,等.超声联合酶解法提高豆乳粉溶解性的工艺研究[J].食品工业科技,2016,37(4):283-287
QI Bao-kun, SUI Xiao-nan, WANG Zhong-jiang, et al. Study on improvement of solubility of soybean milk powder by a combination of ultrasound and enzymatic hydrolysis treatment [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(4): 283-287

[19] 马治良.花生蛋白的生物酶法制备及功能作用改善[D].泰安:山东农业大学,2014
MA Zhi-liang. Enzymatic preparation and funtion improvement of protein from hot-pressed peanut meal [J]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014

[20] 闫忠心,靳义超.喷雾干燥温度对牦牛乳粉溶解特性的影响[J].食品科学,2016,37(7):23-26
YAN Zhong-xin, JIN Yi-chao. Effect of spray drying temperature on solubility of yak milk powder [J]. Food Science, 2016, 37(7): 23-26

[21] Wang B, Li B. Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein-derived peptides by using caco-2 cell model [J]. Food Chemistry, 2017, 218: 1-8

[22] 万丽娜,熊星星,罗岩,等.风味蛋白酶修饰蛋清酶解液的研究[J].食品工业,2013,6:105-108
WAN Li-na, XIONG Xing-xing, LUO Yan, et al. Study on the flavourzyme embellish egg albumen hydrolysate [J]. The Food Industry, 2013, 6: 105-108

[23] 孙临政,迟玉杰,王欢,等.喷雾干燥条件对蛋清粉冲调效果的影响[J].中国家禽,2014,36(2):29-33
SUN Lin-zheng, CHI Yu-jie, WANG Huan, et al. Effect of condition of spray drying on egg white powder [J]. China Poultry, 2014, 36(2): 29-33

[24] 钟振声,陈钰,文锡莲.木瓜蛋白酶与中性蛋白酶水解大分离蛋白的研究[J].现代食品科技,2009,25(9): 1039-1042, 1079
ZHONG Zhen-sheng, CHEN Yu, WEN Xi-lian. Hydrolysis of soybean protein isolate by papain and neutral protease [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(9): 1039-1042, 1079

[25] Raikos V, Campbell L, Euston S R. Rheology and texture of hen's egg protein heat-set gels as affected by ph and the addition of sugar and/or salt [J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(2): 237-244

[26] Horax R, Vallecios M S, Hettiarachchy N, et al. Solubility, functional properties, ace-i inhibitory and dpph scavenging activities of alcalase hydrolysed soy protein hydrolysates [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(1): 196-204

[27] Lee S J, Lim K T. Phytoglycoprotein Inhibits Interleukin-1β and Interleukin-6 via p38 Mitogen-activated Protein Kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2008, 377(1): 45-54

[28] Zhang D, Wu M, Guo Y, et al. Purification of lactobacillus acidophilus surface-layer protein and its immunomodulatory effects on RAW264. 7 cells [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017

[29] 程安玮.甘草多糖的提取及对小鼠腹腔巨噬细胞的免疫调

节[D].无锡:江南大学,2008
CHENG An-wei. Extraction of polysaccharide from glycyrrhiza uralensis fish and its immunomodulatory activity in mice peritoncal macrophage [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008

[30] Malla B, Chang B Y, Kim S B, et al. Potential of the cnidium monnieri fruits as an immune enhancer in escherichia coli infection model [J]. Journal of Pharmacy & Pharmacology, 2016, 68(11): 1430-1439

现代食品科技