

# 猪血浆酶解肽的制备工艺及免疫调节功能的初步研究\*

吴 涵, 潘风光\*\*, 李洪山, 赵娅娅, 刘 婧, 张 杰

吉林大学军需科技学院, 长春 130062

**摘 要:** 采用酶解和活性炭相结合的方法对猪血浆的脱色条件进行优化,并对脱色酶解物喷雾干燥后得到的产品功能进行初步动物试验评价。结果表明:采用酶解与活性炭相结合的方法对猪血浆进行脱色,脱色率达90.60%,同时还可以将血浆蛋白分解成多肽,且此多肽对兔的细胞因子(IL-1、IL-6、IFN- $\gamma$ 、INF- $\gamma$ )的调节起着良好的作用。

**关键词:** 猪血浆; 酶解; 脱色; 功能

**中图分类号:** TS201      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-5684(2010)03-0349-06

## Preliminary Study on Porcine Plasma Protein Proteolysis Decolourization Methods and its Peptide Functional Properties

WU Han, PAN Feng-guang, LI Hong-shan, ZHAO Ya-ya, LIU Jing, ZHANG Jie

College of Quartermaster Technology, Jilin University, Changchun 130062, China

**Abstract:** Porcine plasma was decoloured using proteolysis and activated carbon combination methods and its conditions were optimized in this experiment. Meanwhile, preliminary functional assessment was applied after its decoloured hydrolysate was sprayed dry. The results showed that proteolysis and activated carbon combination methods were useful to decolour porcine plasma. At the same time, porcine plasma was hydrolyzed into polypeptides and these polypeptides played an important regulatory role for body cytokines level.

**Key words:** porcine plasma; enzymolysis; decolorization; function

目前,我国年出栏生猪约5亿头,居世界第一位。由屠宰生猪而产生的副产物猪血大约有150万t,其蛋白结合量相当于200万t猪肉或250万t全蛋。猪血的营养价值很高,素有“液态肉”之称。猪血含有人体所必需的8种氨基酸在内的18种氨基酸,特别是赖氨酸、亮氨酸和铁的含量较高。以猪血为蛋白源的生物活性肽开发利用已成为国内外研究的热点。

我国利用猪血资源开发的产品比较单一,除

一小部分被加工成血粉或发酵血粉作为饲料添加剂及用于生化制药生产血红素、超氧化物歧化酶、蛋白胨外,其余均作为废弃物排出,这既污染了环境,又浪费了宝贵的蛋白资源。在法国、日本等发达国家,猪血的利用率已达50%以上,主要是用于开发肽类试剂、肽类药物以及功能食品和食品添加剂。

本试验运用酶解和活性炭相结合的脱色方法对猪血浆蛋白进行脱色,酶解后的产物进行喷雾

\* 基金项目:吉林省科技发展计划项目(20090230),吉林大学大学生创新计划项目(2009A83082)

作者简介:吴 涵,男,本科,研究方向:功能性食品加工与安全检测。

收稿日期:2009-07-24      修回日期:2009-12-25

\*\* 通讯作者

干燥,初步探讨酶解猪血浆多肽对兔血清中 IL-1、IL-6、IFN- $\gamma$ 、INF- $\gamma$  细胞因子的浓度变化的影响,为进一步开发利用猪血浆资源提供有价值的参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与设备

猪血浆是对猪全血进行离心后浓缩得到的血浆(猪血采自吉林华正农牧业开发股份有限公司);家兔血清 ELISA IL-1、IL-6、IFN- $\gamma$  和 INF- $\gamma$  试剂盒购自尚柏生物医学技术(北京)有限公司。

高速离心喷雾干燥机(DIS-5,无锡市富超喷雾干燥机械厂),752型紫外—可见光分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),酶标仪(上海雷勃分析仪器有限公司)。

### 1.2 猪血浆酶解工艺参数的研究

用酶活性 > 20 000 单位的碱性蛋白酶水解离心后的血浆,过滤,去除残渣,得猪血浆酶解液。用 3% NaOH 调 pH 至 8.0,加入 5% 碱性蛋白酶,45℃ 保温水解 12 h。

猪血浆酶解液中有色物质最大吸收波长的确定参照文献[1]。由于难以确定猪血浆酶解液中有色成分最大吸收峰,所以要将猪血酶解液稀释一定的浓度,用紫外—可见光分光光度计,在可见光波长范围测定光密度值,绘制图表,找出酶解液中有色物质的最大吸收峰。

### 1.3 活性炭脱色的单因素试验

猪血浆酶解液呈现浅红色,利用活性炭将血浆酶解液脱色,脱色液过滤后测定其光密度值。选取酶解液脱色过程的主要影响因素参数(活性炭用量、脱色时间、脱色温度)进行单因素试验。取 20.00 g 酶解液,加入活性炭的量分别设定为血浆量的 1%、2%、3%、4%、5%,脱色时间分别设定为 10、15、20、25、30、35 min,脱色温度分别设定为 30、40、50、60、70℃。先固定其中 2 个因素,改变 1 个因素,对酶解液进行脱色试验,过滤,滤液在最大吸收波长下测定光密度值<sup>[2]</sup>。

### 1.4 活性炭脱色的正交试验

根据单因素试验的结果,选择活性炭用量、脱色温度、脱色时间按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 设计正交试验(表 1),得到脱色工艺的最优组合。

表 1 活性炭脱色试验因素水平

Table 1. Orthogonal experiment of decolorization by activated carbon

水平 Level	因素 Factor		
	活性炭用量 A/ Activated carbon content A	脱色时间 B/ Decoloured time B	脱色温度 C/ Decoloured temperature C
1	2	25	45
2	3	30	55
3	4	35	60

### 1.5 活性炭脱色

根据正交试验结果所确定的最佳脱色工艺条件,对酶解液进行脱色处理,抽滤,收集滤液。

脱色率 = [(脱色前吸光度 - 脱色后吸光度) / 脱色前吸光度] × 100%<sup>[3]</sup>

### 1.6 喷雾干燥工艺参数的选定

1.6.1 进风温度对喷雾干燥效果的影响 当粉粒粒度一定时,进风温度越高,干燥速度越快;当温度过高时,粉粒表面会过度干燥形成硬壳,如此时粉粒内部水分含量高、蒸汽压力大,会使粉粒发生开裂现象,水分外逸,则粉粒回潮;当温度较低时,粉粒会因内部水分未完全蒸发而回潮,粉粒来不及干燥也会影响制品的品质<sup>[4]</sup>。因此确定恰当的进风温度对于干燥质量至关重要。

通过试验确定进风温度的范围:固定出风温度 80℃,分别设定 7 个进风温度为 140、170、200、230、260、290、320℃。固定压缩空气压力为 0.6 MPa,以 3 L 浓缩血浆匀速进料。干燥完毕,直接观察干燥塔是否有粘壁现象。收集集料筒粉末,以酶解多肽干物质为基准,计算产率。

1.6.2 出风温度对干燥效果的影响 固定进风温度为 200℃,分别设定 5 个出风温度为 60、70、80、90、100℃,测定方法同本文“1.6.1”。

1.6.3 喷雾干燥试验设计与操作 设 3 个进风温度和 3 个出风温度,进行 3 × 3 共 9 次不同温度组合的喷雾干燥试验。3 个进风温度为 200、230、260℃,3 个出风温度为 80、90、100℃。进风温度通过调节电加热频率控制,出风温度则是动态调节。每组试验取 2 L 酶解多肽液,分别喷雾干燥。取喷雾干燥样品测试各项指标,每组取 2 个样本测试。同时以血浆中干物质为基准,计算产品得率。

### 1.7 检测指标

经过上述 9 种处理,得到样品。分别测定其水分、水溶性蛋白质质量浓度及水溶性酶解蛋白得率。

水分测定方法参见 T5009.3 - 2003,水溶性蛋白质质量浓度采用考马斯亮蓝法<sup>[5]</sup>测定。

得率 = (水溶性酶解多肽干物质/水溶性蛋白酶解多肽液) × 100 %。

### 1.8 酶解肽对家兔血清中几种细胞因子的影响测定

将所得的酶解液进行超滤,截留相对分子量小于 10 kD 的多肽混合物(10 kD 以上的多肽再次酶解),将其真空冷冻干燥制成干粉,加水配成 2 % 的底物溶液,将所得水解物以 3 种方式(a. 口服, b. 腹腔注射, c. 耳静脉注射)对家兔给药。在给药 3 h 后,用 ELISA 试剂盒测定兔血清中 IL-1、IL-6、IFN- $\gamma$ 、INF- $\gamma$  细胞因子的浓度变化情况<sup>[6,7]</sup>。用 Graphpad Prism 统计软件进行数据分析处理,结果以平均值表示,  $P < 0.05$  为差异有显著意义。

### 1.9 数据处理

用 SPSS 13.0 软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 猪血浆酶解液中有色物质最大吸收波长

取 5 mL 酶解液稀释至 50 mL,用紫外—可见分光光度计,在可见光波长范围内测定其 OD 值。由图 1 可见,猪血浆酶解液中有色物质在 415 nm 处有最大吸收峰,其 OD 值为 0.92,因此可采用分光光度法考察活性炭脱色效果。

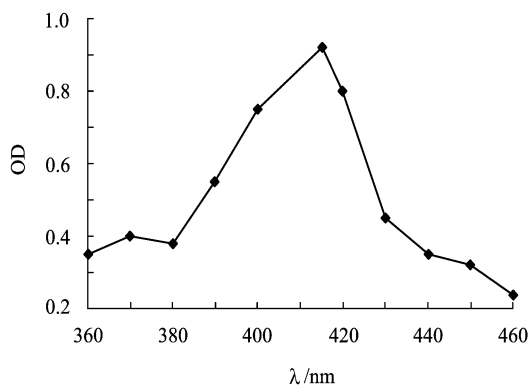


图 1 猪血浆酶解液在 360 ~ 460 nm 处的扫描曲线

Fig. 1. Scanning curve (wavelength 360—460 nm) of porcine plasma protein proteolysis

### 2.2 单因素试验结果

2.2.1 活性炭用量对脱色效果的影响 准确称取 6 份 50.00 g 猪血浆酶解液,加入活性炭的量分别为酶解液的 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %。在 55 °C 恒温水浴锅中脱色 30 min,不断用玻璃棒搅拌,取出,抽滤。取滤液 5 mL 稀释至 50 mL,在 415 nm 处测定其吸光值。由图 2 可见,随着活性炭用量的增大,猪血浆酶解液的 OD 值下降。当活性炭用量在 2 % ~ 3 % 时,OD 值下降缓慢。因此,选用活性炭用量约为 2 %。

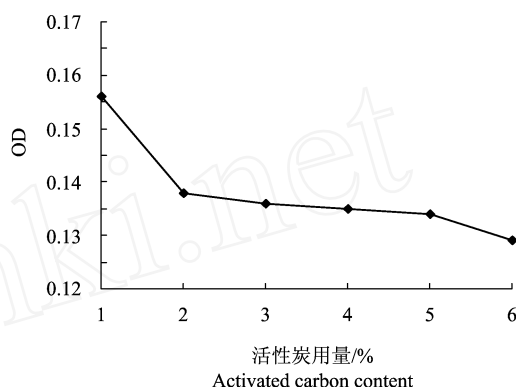


图 2 活性炭用量对猪血浆酶解液脱色效果的影响

Fig. 2. Effect of activated carbon content on decoloured hydrolysate

2.2.2 脱色时间对脱色效果的影响 准确称取 6 份 50.00 g 猪血浆酶解液,加入 3 % 活性炭,放入 55 °C 恒温水浴锅,脱色时间分别为 10、15、20、25、30、35 min。抽滤,取 5 mL 滤液稀释至 50 mL,在 415 nm 处测定其吸光值。由图 3 可见,不同的脱色时间其溶液的 OD 值不同。当活性炭与溶液接触 25 min 时,溶液的 OD 值变化明显缓慢。由此,选择最适脱色时间约为 25 min。

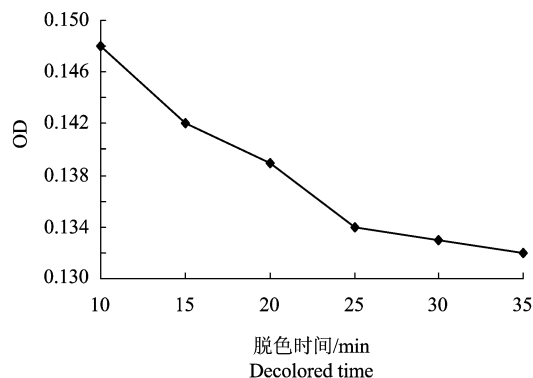


图 3 脱色时间对猪血浆酶解液脱色效果的影响

Fig. 3. Effect of decoloured time on decoloured hydrolysate

2.2.3 脱色温度对脱色效果的影响 准确称取5份50.00 g猪血浆酶解液,加入3%活性炭,分别在温度为30,40,50,60,70的水浴锅中脱色30 min。抽滤,取5 mL滤液稀释至50 mL,在415 nm处测定其吸光值。由图4可见,猪血浆酶解液的OD值随着脱色温度的升高而降低。当脱色温度高于60时,血浆酶解液中的蛋白成分会发生变性而有少许絮状沉淀产生。因此,脱色温度应控制在55左右。

2.3 正交试验结果

在单因素试验的基础上,猪血浆酶解液在415 nm处初始吸光度即OD值为0.915的条件下,对活性炭用量(A)、脱色时间(B)和脱色温度(C)3个因素进行正交试验,每个因素选3个水

平,以OD值为考察指标,确定猪血浆酶解液的最佳脱色工艺条件,结果见表2。

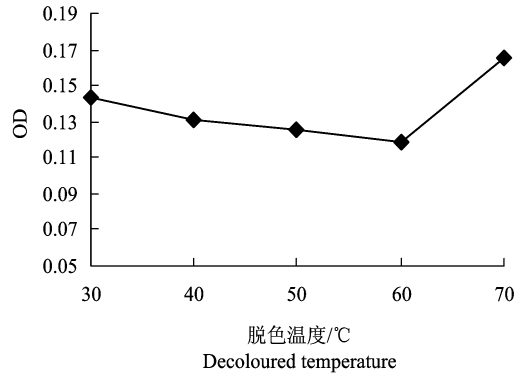


图4 脱色温度对猪血浆酶解液脱色效果的影响  
Fig. 4. Effect of decoloured temperature on decoloured hydrolysate

表2 活性炭脱色血浆酶解液正交试验结果

Table 2. Results and analysis of orthogonal experiment of activated carbon decoloration

编号 Number	A	B	C	D (空白/Control)	OD
1	1	1	1	1	0.142
2	1	2	2	2	0.018
3	1	3	3	3	0.135
4	2	1	2	2	0.036
5	2	2	3	1	0.144
6	2	3	1	3	0.140
7	3	1	3	2	0.160
8	3	2	1	3	0.126
9	3	3	2	1	0.079
$K_1$	0.295	0.338	0.365	0.365	
$K_2$	0.320	0.288	0.133	0.214	
$K_3$	0.365	0.354	0.439	0.401	
$k_1$	0.098	0.113	0.122	0.122	
$k_2$	0.107	0.096	0.044	0.071	
$k_3$	0.122	0.118	0.146	0.134	
极差 R	0.070	0.066	0.309	0.187	

由表2方差分析可见,脱色温度对血浆酶解液脱色效果的影响达到了  $P < 0.05$  显著水平,活性炭用量和脱色时间对脱色效果均无显著影响。对脱色效果的影响大小顺序为脱色温度 > 活性炭用量 > 脱色时间。综合比较,得出脱色的理论最佳工艺条件为  $A_3B_3C_3$ ,即活性炭用量为4%,脱色时间为35 min,脱色温度为60。由OD值得出最佳组合为  $A_3B_1C_3$ ,即活性炭用量为4%,脱色时间为25 min,脱色温度为60。最后做验证性试验,最佳组合为  $A_3B_1C_3$ ,即活性炭用量为4%,脱色时间为25 min,脱色温度为60,在此条件下得

到最大脱色率为90.6%。

2.4 不同进出风温度对产品品质的影响

由表3可见,当进风温度为140,170时,由于干燥不充分,产品中水分含量较高,喷雾干燥时粘壁现象严重,影响产品收集,产率下降。当进风温度为290,320时,由于温度过高,粉粒表面会过度干燥形成硬壳,温度高时甚至形成焦糊,而内部水分含量高使粉粒膨胀水分外逸,粉粒回潮,导致水分含量仍然较高,使粘壁现象严重,产率下降。因此合适的进风温度为200~260。

表 3 不同进风温度对喷雾干燥品质的影响

Table 3. Effect of different intake airflow temperature on spray drying quality

项目 Item	温度/ Temperature						
	140	170	200	230	260	290	320
产率/ % Yield	54.2	65.3	85.6	88.7	91.6	77.5	64
产品状态 Product state	粘壁严重	粘壁严重	稍粘	稍粘	稍粘	焦糊粘壁	焦糊多,粘壁

由表 4 可见,当出风温度低于 70 时,产品的流动性很差,不利于收集,随温度升高,产品产率及粘壁程度均有所改善;当温度为 100 时,产

率反而下降。综合产率和干燥效果考虑,较优的出风温度应为 70~90。

表 4 不同出风温度对喷雾干燥品质的影响

Table 4. Effect of different exhaust airflow temperature on spray drying quality

项目 Item	温度/ Temperature				
	60	70	80	90	100
产率/ % Yield	69.4	83.3	84.1	85.7	74.4
产品状态 Product state	粘壁严重	稍粘	稍粘	稍粘	焦糊,粘壁多

由表 5 可见,每组的进风温度一定的条件下,随着出风温度的升高,水分和得率呈负相关,其中以进风温度 230 / 出风温度 90 的条件下,产品得率最高为 90.3%。当进风温度一定时,水分随

出风温度上升而下降 ( $P < 0.05$ )。虽然水分随进风温度上升也下降,但差异并不显著 ( $P > 0.05$ )。这表明出风温度对水分的影响大于进风温度。因此,对水分含量起决定作用的是出风温度。

表 5 不同进出风温度下产品品质

Table 5. Product quality of different intake and exhaust airflow temperature

项目 Item	200 *			230 *			260 *		
	70 #	80 #	90 #	70 #	80 #	90 #	70 #	80 #	90 #
水分 Moisture	10.85 ±0.36 <sup>a</sup>	9.63 ±0.28 <sup>d</sup>	7.67 ±0.11 <sup>c</sup>	10.49 ±0.41 <sup>a</sup>	8.42 ±0.09 <sup>d</sup>	7.45 ±0.08 <sup>c</sup>	9.95 ±0.36 <sup>ad</sup>	6.41 ±0.31 <sup>c</sup>	5.32 ±0.32 <sup>b</sup>
水溶性蛋白 % Water solubility protein content	78.29 ±0.58 <sup>a</sup>	79.87 ±0.51 <sup>a</sup>	82.05 ±0.32 <sup>b</sup>	78.77 ±0.88 <sup>a</sup>	81.76 ±0.68 <sup>b</sup>	82.19 ±0.57 <sup>b</sup>	80.62 ±0.45 <sup>b</sup>	82.74 ±0.50 <sup>b</sup>	81.63 ±0.58 <sup>b</sup>
得率 % Yield	78.4	83.2	81.1	80.4	88.2	90.3	81.3	83.2	84.8

\* 进风温度 Intake airflow temperature; # 出风温度 Exhaust airflow temperature

### 2.5 水溶性蛋白质量浓度测定

经考马斯亮蓝法测定,酶解后喷雾干燥样品中水溶性蛋白的含量为 78%~82%,较为稳定,平均值达 80.88% (表 5)。

在本次试验中,进风 230 / 出风 90 时蛋白得率最高,达 90.3%,其次是进风 230 / 出风

80 组合达 88.2%。当进风温度继续升高时,得率开始下降,可能与酶解多肽失去大量水分有关。

综合产品水分、水溶性蛋白质和得率的分析,可知当进风 230 / 出风 90 时是较为合适的血浆蛋白肽的干燥温度。

## 2.6 猪血浆酶解多肽对兔血清中几种细胞因子的影响

2.6.1 不同给药方式对兔血清中 IL-1 的影响  
腹腔注射和口服灌胃 2 种方式,兔血清中 IL-1 浓度均有下降,特别是腹腔注射组下降极其显著(表 6),说明蛋白酶解肽对 IL-1 的调节可能是通过肠黏膜系统发挥作用的,而静脉注射方式下稍有升高。

2.6.2 不同给药方式对兔血清中 IL-6 的影响  
腹腔注射方法对兔血清中 IL-6 下降效果相当显著(表 6),而口服灌胃组和静脉注射组没有明显

变化。说明,蛋白酶解肽对 IL-6 的调节可能是通过黏膜系统发挥作用。

2.6.3 不同给药方式对兔血清中 IFN- $\gamma$  的影响  
腹腔注射和静脉注射方式均显示出兔血清中 IFN- $\gamma$  浓度有一定程度的升高,口服灌胃使兔血清中 IFN- $\gamma$  浓度降低,3 种给药方式 IFN- $\gamma$  浓度变化均不显著(表 6)。

2.6.4 不同给药方式对兔血清中 INF- $\alpha$  的影响  
口服组和静脉注射组较各自对照组血清中 INF- $\alpha$  浓度有微量下调,腹腔注射方式使 INF- $\alpha$  在血清中的浓度较其对照组升高(表 6)。

表 6 3 种给药方式对兔血清中细胞因子的影响

Table 6. Effect of three kinds of administration methods on cell factor pg/mL

细胞因子 Cell factor	口服组 Oral group		腹腔注射组 Intraperitoneal injection		静脉注射组 Intravenous injection	
	盐水组 Isotonic Na chloride group	试验组 Experiment group	盐水组 Isotonic Na chloride group	试验组 Experiment group	盐水组 Isotonic Na chloride group	试验组 Experiment group
IL-1	82	78	108	50	50	56
IL-6	2 500	2 700	7 500	3 000	2 800	2 500
IFN- $\gamma$	188	178	158	186	138	156
INF- $\alpha$	88	76	44	78	106	88

注:表中数据均为平均值

Note: Date is general average in the table

## 3 结论

本试验采用碱性蛋白酶与粉末活性炭相结合对猪血浆酶解液进行脱色,起到了很好的脱色效果,脱色率达 90.60%。通过测定猪血浆酶解液的吸光度值,确定此脱色方法简单可行。活性炭脱色猪血浆酶解液的最佳工艺条件为粉末活性炭用量 4%,脱色温度 60,脱色时间 25 min。

在脱色的过程中将血浆酶解成多肽,一方面利于脱色,同时还完成了血浆的酶解过程,酶解后的多肽液根据水分含量、水溶性蛋白质和得率的分析,确定喷雾干燥的适宜条件为进风 230 / 出风 90。

动物试验结果显示,3 种给药方式中腹腔注射方式效果最好,其次是静脉注射,口服灌胃效果则相对较差,说明经过肠黏膜系统吸收或者直接作用于血液对细胞因子的调节效果要强于胃部消化吸收。因此,设法将该酶解肽直接通过肠黏膜

途径给药可能是最有效的给药方式。

## 参考文献:

- [1] 王文岭,陈秀兰,冉廷红,等. 活性炭对桃胶水解液的脱色研究[J]. 工艺技术,2006,12(10):104-106.
- [2] 向东,王国政,赖凤英,等. 活性炭对南瓜粗多糖液的脱色研究[J]. 河南科学,2004,22(6):780-782.
- [3] 杨云,田润涛,苗明三,等. 大枣渣多糖活性炭脱色工艺研究[J]. 河南中医学院报,2004,19(1):35-36.
- [4] 滕建文,黄正恩. 龙眼粉喷雾干燥的初步研究[J]. 广西园艺,2000,8(1):13-12.
- [5] 胡鸿钧,李夜光,耿亚红. 从一种富含藻胆蛋白的螺旋藻中大量提取和纯化藻蓝蛋白的研究[J]. 武汉植物学研究,2002,20(4):299-302.
- [6] 王延卓. 猪血中抗菌肽的提取及体外抗菌活性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2007.
- [7] Ledur A, Fitting L, David B, et al. Variable estimates of cytokine levels produced by commercial ELISA kits: results using international cytokine standards [J]. Immunol Methods, 2005, 186: 171-180.