

动态高压微射流协同美拉德反应对 α -乳白蛋白结构和功能性质的影响

Effects of dynamic high pressure microfluidization combined with Maillard reaction on structural changes and properties of α -lactalbumin

杨萍^{1,2} 涂宗财^{1,2,3} 刘俊^{1,2} 邵艳红^{1,2}

YANG Ping^{1,2} TU Zong-cai^{1,2,3} LIU Jun^{1,2} SHAO Yan-hong^{1,2}

谢雅雯^{1,2} 沙小梅^{1,2} 张露^{1,2}

XIE Ya-wen^{1,2} SHA Xiao-mei^{1,2} ZHANG Lu^{1,2}

(1. 江西师范大学功能有机小分子教育部重点实验室, 江西南昌 330022; 2. 江西师范大学生命科学学院, 江西南昌 330022; 3. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

(1. Key Laboratory of Functional Small Organic Molecule, Ministry of Education, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China; 2. College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China)

摘要:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、光谱学等方法,研究动态高压微射流(DHPM)预处理结合美拉德反应对 α -乳白蛋白(α -LA)结构和功能性质的影响。结果表明,DHPM预处理使 α -LA的内源性荧光强度、表面疏水性增大,且呈先增后降的趋势,在处理压力为110 MPa时,达到最大值。经乳糖美拉德反应后, α -LA的内源性荧光强度降低,表面疏水性增大,乳化性、抗氧化活性增强,表明DHPM预处理改变了 α -LA的三级结构,从而促进美拉德反应、提高美拉德反应产物的乳化性能和抗氧化活性。DHPM预处理协同美拉德反应是一种有效改善蛋白质功能性质的方法。

关键词:动态高压微射流; α -乳白蛋白;美拉德反应;乳化性;抗氧化活性

Abstract: The Effects of dynamic high pressure microfluidization (DHPM) combined with Maillard reaction on structure and properties of α -lactalbumin (α -LA) were investigated by SDS-PAGE and spectroscopy. The results demonstrated that the fluorescence intensity and surface hydrophobicity (H_0) of α -LA treated by DHPM firstly increased then decreased, with the maximum values at

110 MPa. After Maillard reaction (MR) with lactose, the fluorescence intensity of α -LA was declined. However, H_0 , emulsibility and anti-oxidation activity of α -LA was improved. These results illustrated that tertiary structure of α -LA was changed due to DHPM pretreatment, thereby promoting MR, emulsibility and anti-oxidation activity of Maillard reaction products. DHPM pretreatment combined with MR was an effect method for protein modification.

Keywords: dynamic high pressure microfluidization; α -lactalbumin; Maillard reaction; emulsibility; anti-oxidation activity

α -乳白蛋白(α -lactalbumin, α -LA)属于溶菌酶家族,结构呈球形,其单体由123个氨基酸组成,分子量约为14.2 kDa。 α -LA是乳清蛋白中唯一能结合钙离子的蛋白,且4个天冬氨酸残基均能结合钙离子,其独特的氨基酸序列和三维结构赋予 α -LA突出的功能特性和生物学活性,使其在食品、医药、化妆品等行业广泛应用^[1]。在临床领域, α -LA具有抗氧化、降血压、抗癌、降血脂、抗病毒、抗菌、螯合金属等作用^[2]。

目前,许多改性方法如辐照^[3]、美拉德^[4]、热处理^[5]等,用于提高 α -LA的功能性质。而动态高压微射流(Dynamic high pressure microfluidization, DHPM)是一种集高速碰撞、高频振荡、瞬时压力降、强剪切、气穴作用和超高压作用为一体的新兴高压加工技术,被广泛用于生物大分子的改性^[6]。研究发现DHPM预处理能诱导牛血清白蛋白(BSA)的结构发生去折叠,从而促进蛋白质的美拉德反应,提高BSA的美

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(编号:31360374);江西省科技支撑项目(编号:2014BBF60043);江西省科学基金项目(编号:20142BAB213016)

作者简介:杨萍,女,江西师范大学在读硕士研究生。

通信作者:涂宗财(1965—),男,江西师范大学教授,博士。

E-mail: tuzc_mail@aliyun.com

收稿日期:2017-12-11

拉德反应程度^[7]。此外美拉德反应是一种蛋白质的游离氨基和还原糖的羧基之间的化学反应,能改善蛋白质的功能性,如卵清蛋白经美拉德反应修饰后,其乳化性、起泡性得到显著改善^[8]。然而,对 DHPM 结合美拉德反应改性 α -LA 的研究较少。

本研究拟以 α -LA 为研究对象,采用 DHPM 结合美拉德反应对 α -LA 进行复合改性,研究改性后的结构、乳化特性和抗氧化活性,为拓宽 α -LA 在食品工业中的应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

牛乳 α -LA: L-6010, 美国 Sigma-Aldrich 公司;

乳糖、邻苯二甲醛(OPA)、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、十二烷基磺酸钠、 β -巯基乙醇: 分析纯, 索莱宝试剂有限公司;

大豆油: 市售;

碘化钾、甲醇: 分析纯, 西陇科学股份有限公司;

硼砂: 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂;

乳糖: 分析纯, 阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

紫外可见分光光度计: U-3200 型, 日本日立公司;

荧光分光光度计: F-7000 型, 日本日立公司;

纳米超高压均质机: NCJJ-0.007/200 型, 廊坊通用机械有限公司;

圆二色谱仪: MOS 450 型, 法国 Bio-Logic 公司;

冷冻干燥机: LGJ-1D-80 型, 北京亚泰科隆仪器技术有限公司;

旋涡混合仪: WH-866 型, 上海骥辉科学分析仪器有限公司;

酶标仪: SynergyH1 型, 美国 Bio Tek 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 称取一定质量的 α -LA, 溶于磷酸盐缓冲溶液(PBS), 配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液。经微射流均质机处理, 均质压力分别为 0, 80, 110, 140 MPa, 常温下处理 3 次, 收集溶液, 取其中一部分溶液加入等质量的乳糖, 混匀, 分装冻干, 分别记为 LA-0-Lac、LA-80-Lac、LA-110-Lac、LA-140-Lac, 余下溶液不加糖, 分别记 N-LA、LA-80、LA-110、LA-140, 分装冻干冷藏备用。将冻干后的样品置于培养箱中, 在 55 °C, 相对湿度 65% 的条件下反应 8 h, 反应结束后将离心管置于冰浴中终止反应。4 °C 储存备用。

1.2.2 SDS-PAGE 根据文献^[9]。

1.2.3 接枝度的测定 根据文献^[10]。用相同的方法, 以赖氨酸代替样品做标准曲线, 以吸光度为纵坐标(y), 游离氨基含量为横坐标(x), 绘制标准曲线方程为 $y = 1.287x + 0.007$ 。

1.2.4 内源荧光性测定 根据文献^[11]。

1.2.5 表面疏水性测定 根据文献^[12]。

1.2.6 圆二色谱分析 根据文献^[11]。

1.2.7 乳化性测定 根据文献^[13]。

1.2.8 ABTS⁺·清除能力 根据文献^[14]。

1.3 数据处理

本试验均重复 3 次, 所得试验数据采用 SPSS17.0 软件进行显著性分析($P < 0.05$), Origin 8.6 软件作图。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE

图 1 为 DHPM 预处理结合美拉德改性对 α -LA 分子量的影响。由图 1 可知, α -LA 的分子量在 14.4 kDa 左右, 与 N-LA 相比, LA-80、LA-110 和 LA-140 的电泳条带均无明显变化。 α -LA 与乳糖混合样品的条带均上移, 说明 α -LA 与乳糖发生了共价结合, 分子量增加; 然而, LA-0-Lac、LA-80-Lac、LA-110-Lac 和 LA-140-Lac 条带之间没有显著差别。此外所有的样品在 31 kDa 附近出现明显条带, 这是因为 α -LA 在美拉德反应过程中分子之间发生了聚合, 形成了二聚体^[15]。

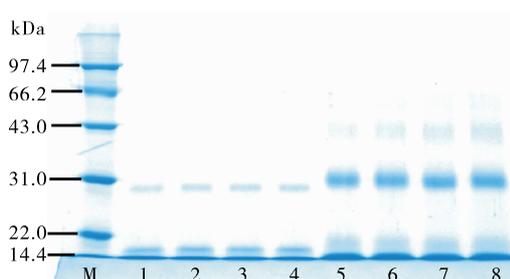


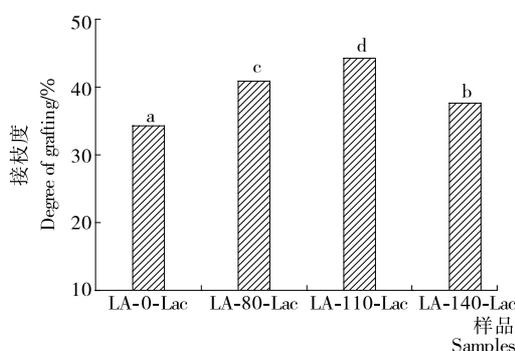
Figure 1 SDS-PAGE of α -LA treated by DHPM pretreatment combined with Maillard reaction

图 1 DHPM 预处理结合美拉德改性前后 α -LA 的 SDS-PAGE 电泳图

Figure 1 SDS-PAGE of α -LA treated by DHPM pretreatment combined with Maillard reaction

2.2 接枝度的测定

游离氨基含量能够用来评价美拉德反应的程度^[16], 并以接枝度的形式表示。如图 2 所示, LA-80-Lac、LA-110-Lac 和 LA-140-Lac 的接枝度均大于 LA-0-Lac, 且随着处理压力的增大, 样品的接枝度显著增加($P < 0.05$)。表明 DHPM 预处理能够促进美拉德反应, 原因是高压作用改变了 α -LA 的



不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Figure 2 Effect of DHPM pretreatment combined with Maillard reaction on the degree of grafting of α -LA

空间构象,暴露出更多的反应位点,提高了美拉德反应程度^[7]。当压力达到 110 MPa 时,LA-110-Lac 的接枝度达到最大,说明美拉德反应程度达到最大。但当处理压力大于 110 MPa 时,LA-140-Lac 的接枝度显著降低($P < 0.05$),可能是过大的压力作用使 α -LA 空间结构发生改变,且美拉德反应促进了蛋白质的聚合反应,掩盖了部分反应基团^[17],降低其接枝度。

2.3 内源性荧光测定

内源性荧光是检测蛋白质三级结构常用的方法。图 3 为不同处理压力结合美拉德反应对 α -LA 内源性荧光的影响。经 DHPM 处理后, α -LA 的荧光强度先升高后降低。这是因为 DHPM 的高速碰撞、高频振荡、强剪切、气穴作用等,破坏了 α -LA 的空间结构,导致隐藏在蛋白质分子内部的 Trp 更多地暴露在极性环境中,从而增加 α -LA 荧光强度。当压力超过 110 MPa,LA-140 荧光强度降低,与 Maresca 等^[18]的研究结果类似。经乳糖美拉德反应后,LA-Lac 体系的荧光强度显著降低,可能是因为 α -LA 与乳糖的结合对部分色氨酸起到了屏蔽作用。且随处理压力的增大,荧光强度先增后减,LA-110-Lac 的荧光强度达最低,可能是 LA-110-Lac 的美拉德反应程度最大,结合的乳糖最多,对色氨酸产生了更强的屏蔽效应。

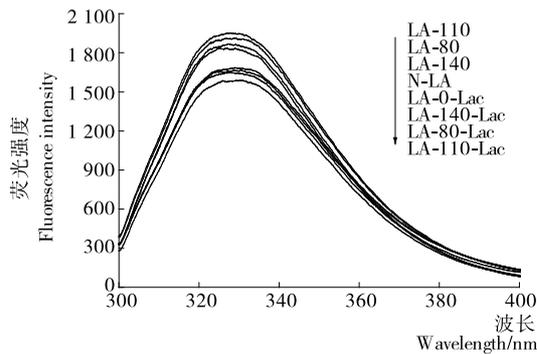
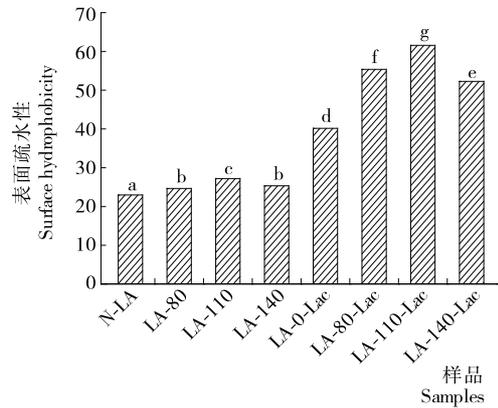


图 3 DHPM 预处理结合美拉德反应对 α -LA 内源性荧光的影响

Figure 3 Effect of DHPM pretreatment combined with Maillard reaction on the intrinsic fluorescence intensity of α -LA

2.4 表面疏水性测定

图 4 为 α -LA 的表面疏水性指数,经 DHPM 改性后,LA-80、LA-110 和 LA-140 的 H_0 较 N-LA 显著增大($P < 0.05$)。这和 Ruan 等^[17]的研究结果一致,可能是压力作用使 α -LA 构象发生变化,内部疏水性基团部分暴露, H_0 增大。但经 140 MPa 处理后, H_0 相较 110 MPa 处理有所下降,可能是蛋白质分子之间存在疏水作用,当暴露的疏水基团较多时,会通过疏水作用重新聚合^[19]。处理后的 α -LA 与乳糖发生美拉德反应后,LA-Lac 的 H_0 较 LA 的显著增加($P < 0.05$),且随着压力的逐渐增加, H_0 先显著增加后降低($P < 0.05$)。这可能是 α -LA 与乳糖发生接枝反应, α -LA 结构发生改变,暴露了蛋白质分子内部的疏水性基团^[20],掩盖了周围的亲水性基团^[21],增加了 H_0 。当压力达到 110 MPa,LA-110-Lac 的 H_0 达到最大值。



不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

图 4 DHPM 预处理结合美拉德反应对 α -LA 表面疏水性的影响

Figure 4 Effect of DHPM pretreatment combined with Maillard reaction on the surface hydrophobicity of α -LA

2.5 圆二色光谱分析

采用圆二色光谱分析 α -LA 二级结构中各组分的含量。由图 5 可知,DHPM 预处理对 α -LA 二级结构中各组分的含量没有显著影响,与 Subirade 等^[22]的结论相似;这也可能是 α -LA 结合钙离子,使其二级结构更加稳定^[23]。美拉德反应后的结果见图 6 和表 1, α -LA 的 α -螺旋含量升高、转角和无

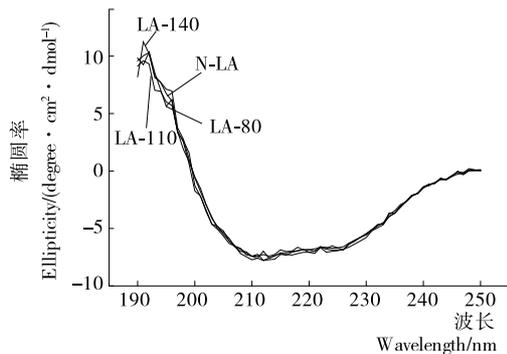


图 5 DHPM 处理对 α -LA 二级结构的影响

Figure 5 Effect of DHPM treatment on the secondary structure of α -LA

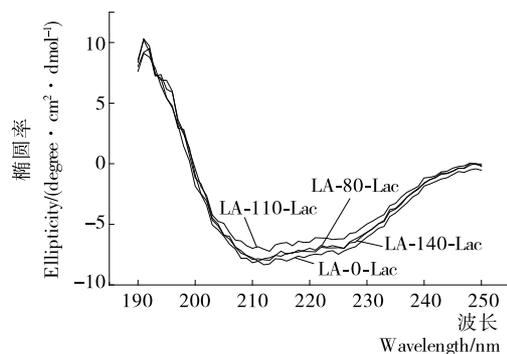


图 6 DHPM 预处理结合美拉德反应对 α -LA 二级结构的影响

Figure 6 Effect of DHPM pretreatment combined with Maillard reaction on the secondary structure of α -LA

表1 DHPM 预处理结合美拉德反应对 α -LA 二级结构含量的影响[†]

Table 1 Effect of DHPM pretreatment combined with Maillard reaction on the secondary structure content of α -LA

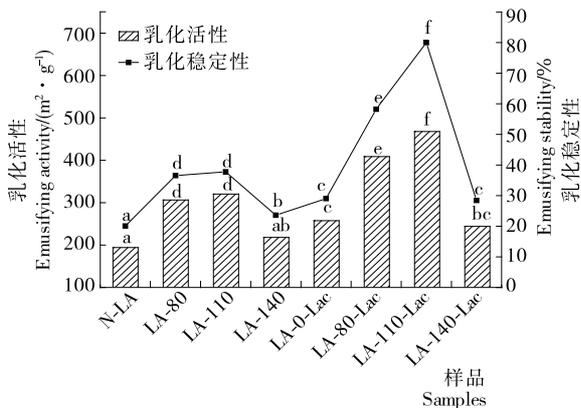
样品	α -螺旋	β -折叠	转角	无规卷曲
N-LA	22.3±0.1 ^a	24.2±0.3 ^a	25.5±0.1 ^a	28.0±0.2 ^b
LA-80	22.3±1.7 ^a	24.9±1.0 ^a	25.1±1.1 ^a	27.7±0.4 ^{ab}
LA-110	23.2±1.3 ^{ab}	23.9±0.9 ^a	24.5±0.5 ^a	28.4±0.1 ^b
LA-140	23.2±1.5 ^{ab}	25.1±1.7 ^a	25.2±2.1 ^a	26.5±2.4 ^{ab}
LA-0-Lac	25.3±0.4 ^{bc}	23.8±0.5 ^a	24.1±0.3 ^a	26.6±0.3 ^{ab}
LA-80-Lac	27.9±1.1 ^d	23.8±1.2 ^a	23.5±0.3 ^a	25.3±0.7 ^a
LA-110-Lac	26.0±0.3 ^{cd}	23.8±0.4 ^a	23.7±0.1 ^a	26.5±0.5 ^{ab}
LA-140-Lac	25.4±0.5 ^{bc}	24.5±0.2 ^a	24.4±0.0 ^a	26.4±0.3 ^{ab}

[†] 同列上标字母不同表示差异显著(P<0.05)。

规卷曲的含量降低,但样品 LA-0-Lac、LA-80-Lac、LA-110-Lac 和 LA-140-Lac 二级结构各组分之间没有明显差别,可能是因为不同的压力处理方式对 α -LA 的二级结构影响不大。此外 Liu 等^[24]研究发现蛋白质二级结构组分变化与还原糖的分子量、蛋白质和还原糖的质量比、美拉德反应的时间长短有关。说明 LA-0-Lac、LA-80-Lac、LA-110-Lac 和 LA-140-Lac 的二级结构变化不明显可能是样品发生美拉德反应的条件一样。

2.6 乳化性测定

食品中蛋白质的乳化性一般通过乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)来评价。图7为DHPM预处理结合美拉德反应对 α -LA 乳化性的影响。经DHPM预处理后, α -LA 的EAI和ESI呈先升后降的趋势,当处理压力达到110 MPa, LA-110 的乳化性最大。这可能是DHPM的瞬时高压作用,使得蛋白质空间结构发生变化,极性侧链的水合作用增强,亲水性提高;与此同时一些原先被包埋在分子内部的疏水性基团暴露出来,亲油性增强,两者达到较好的平衡,乳化性能增强^[25]。但当压力高于110 MPa时, α -LA 形成分子聚集体,表面疏水性减弱,油水平衡能力减弱,乳化能力下降。经



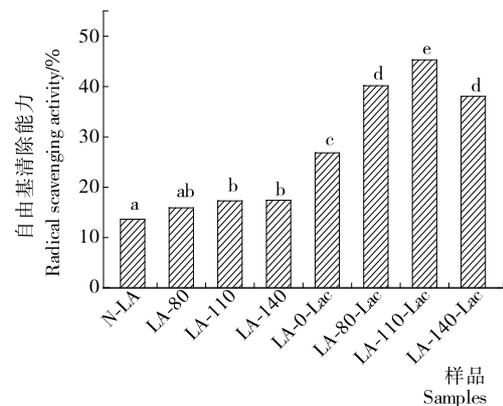
不同字母表示差异显著(P<0.05)

图7 DHPM 预处理结合美拉德反应对 α -LA 乳化性的影响
Figure 7 Effect of DHPM pretreatment combined with Maillard reaction on the emulsibility properties of α -LA

乳糖美拉德后, α -LA 的乳化性显著增大(P<0.05),可能是 α -LA 与乳糖产生高分子量的糖结合物,它能与疏水性蛋白质共轭结合,并牢固地吸附在水-油界面,同时亲水性的糖类物质可以高度溶解于水相介质,从而提高蛋白质的乳化性质^[26]。当DHPM处理压力达到110 MPa时,LA-110-Lac 的EAI和ESI最大。这可能是110 MPa时,美拉德反应程度最大,蛋白质接枝上更多的糖类,生成更多的美拉德产物。当压力超过110 MPa,美拉德反应程度降低,产生较少的蛋白质-糖结合物,EAI和ESI值降低。

2.7 ABTS⁺ · 清除能力

ABTS⁺ · 清除能力可以反映美拉德产物的抗氧化活性。不同DHPM处理压力结合美拉德反应对 α -LA 的ABTS⁺ · 清除能力影响见图8。经DHPM预处理后, α -LA 的ABTS⁺ · 清除能力没有显著性差异(P>0.05),说明DHPM对 α -LA 的ABTS⁺ · 清除能力没有显著影响。而经乳糖美拉德后 α -LA 的ABTS⁺ · 清除能力显著提高(P<0.05),可能是 α -LA 与乳糖产生的美拉德产物和ABTS⁺ · 反应,使得 α -LA 体系的正离子自由基含量减少,导致蛋白质



不同字母表示差异显著(P<0.05)

图8 DHPM 预处理结合美拉德反应对 α -LA 抗氧化活性的影响
Figure 8 Effect of DHPM pretreatment combined with Maillard reaction on the antioxidative activity of α -LA

的抗氧化能力增加^[27]。随着 DHPM 压力的增加, ABTS⁺ · 清除能力先增加后降低, 处理压力为 110 MPa 时, LA-110-Lac 的自由基清除率达到最大, 这是由于 DHPM 促进了 α -LA 与乳糖的美拉德反应, 生成更多的美拉德产物。当处理压力为 140 MPa, 美拉德反应程度降低, 生成的美拉德产物含量减少, 且文献报道色氨酸具有自由基清除能力^[28], 因此 LA-140-Lac 的自由基清除率降低。

3 结论

DHPM 预处理对 α -LA 的一级和二级结构无显著影响, 而对其三级结构有显著影响。经 DHPM 预处理后 α -LA 的内源性荧光强度和表面疏水性增大, 且呈先升后降的趋势, 在处理压力为 110 MPa 的条件下达到最大。说明 DHPM 能改变 α -LA 的三级结构, 诱导蛋白质内部的疏水性基团暴露, 使其乳化性增强。相对 N-LA, DHPM 预处理结合乳糖美拉德改性后的 α -LA, 其乳化性和抗氧化活性增强, 且随着处理压力的增大, 呈先升高后降低的趋势, 在处理压力为 110 MPa 时, 乳化性和抗氧化活性最大。DHPM 的作用使 α -LA 结构松弛, 更易与乳糖结合, 促进了美拉德反应, 生成更多的美拉德产物, 能更加牢固地吸附在水-油界面, 增强乳化性; 能和 ABTS⁺ · 反应, 减少正离子自由基, 增强抗氧化活性。DHPM 预处理结合乳糖美拉德反应可以改变 α -LA 结构并提高其乳化性能和抗氧化活性, 可以为 α -LA 改性提供一种新的方法。

参考文献

- [1] FANG B, ZHANG M, FAN X, et al. The targeted proteins in tumor cells treated with the α -lactalbumin-oleic acid complex examined by descriptive and quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(8): 5 991-6 004.
- [2] KERI Marshall. Therapeutic applications of whey protein[J]. *Alternative Medicine Review*, 2004, 9(2): 136.
- [3] MENG Xuan-yi, LI Xin, WANG Xin-kang, et al. Potential allergenicity response to structural modification of irradiated bovine α -lactalbumin[J]. *Food & Function*, 2016, 7(7): 3 102.
- [4] JIANG Zhan-mei, BRODKORBB A. Structure and antioxidant activity of Maillard reaction products from α -lactalbumin and β -lactoglobulin with ribose in an aqueous model system[J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(3): 960-968.
- [5] RICKY S H Lam, MICHAEL T Nickerson. The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin [J]. *Food Chemistry*, 2015, 173(15): 163-170.
- [6] LIU Wei, LIU Jian-hua, XIE Min-yong, et al. Characterization and high-pressure microfluidization-induced activation of polyphenoloxidase from Chinese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai)[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2009, 57(12): 5 376-5 380.
- [7] HUANG Xiao-qin, TU Zong-cai, WANG Hui, et al. Glycation promoted by dynamic high pressure microfluidisation pretreatment revealed by high resolution mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 3 250-3 259.
- [8] 段邓乐, 涂宗财, 王辉, 等. 微波固相合成糖基化卵清蛋白及其理化功能特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(11): 48-52.
- [9] ZHANG Qiu-ting, TU Zong-cai, XIAO Hui, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. *Food & Bioprocesses*, 2014, 92(1): 30-37.
- [10] 穆利霞. 大豆蛋白-糖接枝改性及其结构与功能特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010: 30.
- [11] LUCIA De La Hoz, FLAVIA M Netto. Structural modifications of β -lactoglobulin subjected to gamma radiation[J]. *International Dairy Journal*, 2008, 18(12): 1 126-1 132.
- [12] SHEN Lan, TANG Chuan-he. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate[J]. *Food Research International*, 2012, 48(1): 108-118.
- [13] JAMDAR S N, RAJALAKSHMI V, PEDNEKAR M D, et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 178-184.
- [14] LIU Qian, NIU Hai-li, ZHAO Ju-yang, et al. Effect of the reactant ratio on the characteristics and antioxidant activities of maillard reaction products in a porcine plasma protein hydrolysate-galactose model system[J]. *International Journal of Food Properties*, 2016, 19(1): 99-110.
- [15] ZHANG Ming, ZHENG Jun-yan, GE Ke-shan, et al. Glycation of α -lactalbumin with different size saccharides: Effect on protein structure and antigenicity[J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34(2): 220-228.
- [16] DELPHINE Laroque, CLAUDE Inisan, CÉLINE Berger, et al. Kinetic study on the Maillard reaction: Consideration of sugar reactivity[J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(4): 1 032-1 042.
- [17] TU Zong-cai, WANG Hui, LIU Cheng-mei, et al. Dynamic high pressure micro-fluidization effects on structure and physico-chemical properties of egg white protein[J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2009, 25(3): 302-305.
- [18] PAOLA Maresca, GIOVANNA Ferrari, BRUNO Ricardo De Castro Leite Júnior, et al. Effect of dynamic high pressure on functional and structural properties of bovine serum albumin[J]. *Food Research International*, 2017, 99(Pt 1): 748.
- [19] 涂宗财, 王辉, 刘光宪, 等. 动态超高压微射流对卵清蛋白微观结构的影响[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(2): 495-498.
- [20] TANG Chuan-he, SUN Xin, EDWARD Allen Foegeding. Modulation of physicochemical and conformational properties of kidney bean vicilin (phaseolin) by glycation with glucose: implications for structure-function relationships of legume vicilins[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(18): 10 114-10 123.
- [21] LIU Chen-mei, ZHONG Jun-zhen, LIU Wei, et al. Relationship between functional properties and aggregation changes of whey protein induced by high pressure microfluidization[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(4): E341-E347.

糖能够诱导 I κ B α 蛋白的磷酸化,从而证明姬松茸多糖能够激活 NF- κ B 信号转导途径。

研究^[20]表明,iNOS 蛋白的表达、NO 的释放与 NF- κ B 信号转导通路的活化密切相关,NF- κ B/I κ B 途径在其中起重要作用,故由试验结果可推测姬松茸多糖能够通过激活巨噬细胞 NF- κ B 通路诱导其合成 iNOS 从而促进释放 NO。

3 结论

本试验以巨噬细胞释放 NO 的行为变化为靶点,检测姬松茸多糖的免疫调节作用并探究其机制。试验结果显示,姬松茸多糖作用于小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后,可通过激活 NF- κ B 信号转导通路上调 iNOS 蛋白的表达,进而促进 NO 释放,从而发挥免疫调节作用,作用效果显著且具有良好的时效和量效性。本文选用了 NF- κ B 信号转导通路探究姬松茸多糖对巨噬细胞的 NO 释放作用的影响机制,在后续的研究中,将对多糖的免疫活性及其他相关信号通路与机理等做进一步深入的探索。

参考文献

- [1] ZHANG Xiao-long, WANG Jing, XU Zhuo-zai, et al. The impact of rhubarb polysaccharides on Toll-like receptor 4-mediated activation of macrophages [J]. *International Immunopharmacology*, 2013, 17(4): 1 116-1 119.
- [2] 曹静, 刘高强, 王晓玲, 等. 可食真菌 β -葡聚糖的生物功能及检测技术[J]. *食品与机械*, 2014, 30(2): 247-268.
- [3] 李佳媚. 两种真菌多糖的体外生物活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2013: 27-65.
- [4] 王斌, 连宾. 食药真菌多糖的研究与应用[J]. *食品与机械*, 2005, 21(6): 96-100.
- [5] SUN Hong-xiang, ZHANG Juan, CHEN Feng-yang, et al. Activation of RAW264.7 macrophages by the polysaccharide from the roots of *Actinidia eriantha* and its molecular mechanisms[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 121: 388-402.
- [6] 汪名春, 聂陈志鹏, 朱培蕾, 等. 葛苳茎水溶性多糖的单糖组成及免疫调节活性研究[J]. *食品与机械*, 2016, 32(5): 148-151.
- [7] FANG Lei-lei, ZHANG Yan-qing, XIE Jun-bo, et al. Royal sun medical mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetidae), derived polysaccharides exert immunomodulatory activities *In Vitro and In Vivo* [J]. *International Journal of Medical Mushroom*, 2016, 18(2): 123-132.
- [8] FÖRLAND D T, JOHNSON E, TRYGGESTAD A M A, et al. An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei*, Murill stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production *in vitro* [J]. *Cytokine*, 2010, 49(3): 245-250.
- [9] 王丽娟, 张彦青, 王勇, 等. 姬松茸多糖增强免疫作用及急性毒性研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(13): 258-261.
- [10] CUI Li-ran, SUN Yong-xu, XU Hao, et al. A polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* Murill (ABP-AW1) as a potential Th1 immunity-stimulating adjuvant [J]. *Oncology Letters*, 2013, 6(4): 1 039-1 044.
- [11] 贾薇, 樊华. 姬松茸多糖组分对小鼠巨噬细胞作用研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(11): 277-280.
- [12] 云少君, 李晨光, 冯翠萍, 等. 巴氏蘑菇多糖对巨噬细胞 RAW264.7 免疫活性的影响[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(8): 32-36.
- [13] 石少华, 杨文涛, 王春风, 等. 巴西蘑菇活性成分的免疫调节作用研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(9): 1 290-1 293.
- [14] 赵肖通. 双孢蘑菇多糖的提取分离及其免疫调节作用研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2017: 29-32.
- [15] VOLMAN J J, HELSPER J P, WEI S, et al. Effects of mushroom-derived beta-glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor-kappaB transactivation in Caco-2 reporter cells; can effects be explained by structure? [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(2): 268-276.
- [16] 王慧. AEPS 对 RAW264.7 细胞的免疫调控作用及其机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010: 24-33.
- [17] 康峰. 灵芝多糖对长期运动大鼠巨噬细胞吞噬功能及 NO 和 IL-1 β 表达的影响[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(6): 61-65.
- [18] ZENG Zhao-jing, ZHAN Ling-ling, LIAO Hui, et al. Curcumin improves TNBS-induced colitis in rats by inhibiting IL-27 expression via the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Planta Medica*, 2012, 29(2): 102-109.
- [19] BEINKE S, LEY S C. Functions of NF- κ B 1 and NF- κ B 2 in immune cell biology[J]. *Biochemical Journal*, 2004, 382(2): 393-409.
- [20] 朱杰, 肖震, 沈月爽, 等. 黄芪多糖通过 NF- κ B 诱导巨噬细胞产生 NO 和 TNF- α [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(6): 511-515.
- [21] 豆玉新. 动态超高压微射流均质对卵清蛋白改性机理的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008: 58.
- [22] MUTIEL Subirade, FRANCK Loupil, ANNE Françoise Allain, et al. Effect of dynamic high pressure on the secondary structure of beta-lactoglobulin and on its conformational properties as determined by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *International Dairy Journal*, 1998, 8(2): 738-744.
- [23] EUGENE A Permyakov, LAWRENCE J Berliner. α -Lactalbumin: structure and function[J]. *FEBS Letters*, 2000, 473(3): 269-274.
- [24] LIU Jian-hua, RU Qiao-mei, DING Yu-ting. Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review[J]. *Food Research International*, 2012, 49(1): 170-183.
- [25] 豆玉新. 动态超高压微射流均质对卵清蛋白改性机理的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008: 58.
- [26] CHEN Lin, CHEN Jian-she, REN Jiao-yan, et al. Effects of Ultrasound Pretreatment on the Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolates and on the Emulsifying Properties of Hydrolysates[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2011, 59(6): 2 600-2 609.
- [27] SUN Yuan-xia, SHIGERU Hayakawa, SOMWIPA Puangmanee, et al. Chemical properties and antioxidative activity of glycosylated α -lactalbumin with a rare sugar, d-allose, by Maillard reaction[J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(3): 509-517.
- [28] YU Xiang-ying, ZHAO Ming-yue, HU Jun, et al. Correspondence analysis of antioxidant activity and UV-Vis absorbance of Maillard reaction products as related to reactants [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 46(1): 1-9.

(上接第 15 页)