

雞蛋白之酵母菌發酵液對巨噬細胞免疫反應之研究⁽¹⁾

陳怡兆^{(2) (5)} 張勝善⁽³⁾ 王政騰⁽⁴⁾

收件日期：96年8月30日；接受日期：97年3月20日

摘要

本試驗以巨噬細胞株的細胞模式，評估 24-72 小時不同發酵時程之 *Saccharomyces cerevisiae* 雞蛋白發酵液（fermented chicken egg white, FCEW）的免疫調節活性。結果顯示，各試驗菌株發酵 48 小時之 FCEW，其胜肽含量均呈顯著增加，其中以 BCRC21443 處理組之胜肽含量增加達 17% 以上。在激活巨噬細胞的試驗中，各試驗菌株之 48 小時 FCEW 對巨噬細胞分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 的刺激達於高峰，而後維持平穩；同樣地，所有試驗菌株 24 小時之 FCEW 均可顯著刺激巨噬細胞產生 IL-6，而 BCRC21443 及 BCRC21811 之 48 小時 FCEW 激活巨噬細胞所產生 IL-6 較未激活者增加可達 7 倍以上。在 NO 測定上，24 小時之 FCEW 即有明顯刺激巨噬細胞產生 NO 的作用。綜觀而言，雞蛋白液經酵母菌發酵 48 小時之發酵液具有較佳的蛋白質水解程度，且其激活巨噬細胞產生 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、NO 的作用亦達高峰，顯示具有激活巨噬細胞的效果。此外，由結果獲知，於試驗菌株中以 BCRC21443 具有最佳的雞蛋白利用性，且其發酵液亦有較佳激活巨噬細胞的能力。

關鍵詞：雞蛋白、發酵、酵母菌、免疫反應。

緒言

許多發酵產品的科學報導均指出，發酵所使用的菌體或其發酵液對促進健康有益（O'sullivan *et al.*, 1992），其中以調節免疫或抑制腫瘤生長的研究最受到重視（Yasui and Ohwaki, 1991；De Simone *et al.*, 1993），而刺激巨噬細胞產生 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-2、IL-6 等細胞激素及 NO、 H_2O_2 等為評估免疫調節的重要指標（Laffineur *et al.*, 1996；Marin *et al.*, 1997；So *et al.*, 1999）。Araki *et*

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1432號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所加工組。

(3) 國立中興大學動物科學系。

(4) 行政院農業委員會副主任委員室。

(5) 通訊作者，E-mail：ycchen@mail.tlri.gov.tw。

al. (1992) 以酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 發酵的雞蛋白製成蛋粉後餵飼小鼠、仔牛、犬、豬等，而發現有加強非特定之宿主防禦 (non-specific host defense) 能力，其作用機制推測是發酵雞蛋白中的某些雙胜肽 (dipeptides) 刺激促使嗜中性球 (neutrophil) 和巨噬細胞 (macrophage) 活化，並增強其功能所致 (Nakagawa *et al.*, 1993 ; Kimura *et al.*, 1994 ; Kimura *et al.*, 1995)，顯示雞蛋白可被 *S. cerevisiae* 所利用分解，且其發酵液具有免疫調節的功能。

然而有關 *S. cerevisiae* 對雞蛋白的發酵資料闕如，且對於具活性發酵雞蛋白的產製亦毫無所悉，故本試驗擬測定雞蛋白 (chicken egg white) 經 *S. cerevisiae* 發酵時，在不同發酵時間之發酵液對刺激巨噬細胞產生細胞活素之變化，以初步了解雞蛋白發酵液之體外免疫調節能力，做為進一步研製機能性蛋品的基礎，俾提昇蛋品利用價值。

材料與方法

I. 試驗材料

- (i) 雞蛋白液：試驗雞蛋產自行政院農委會畜產試驗所產業組試驗牧場。將雞蛋黃及繫帶去除，收集雞蛋白約 600 ml，以 90 秒、3000 rpm 低速均質，經均質後之蛋白液冷藏備用。
- (ii) 發酵菌株：購自食品工業發展研究所之 *S. cerevisiae* BCRC21443、BCRC21445、BCRC21468、BCRC21469、BCRC21798、BCRC21811、BCRC22223 等七株酵母菌為供試菌株。

II. 試驗方法

- (i) 發酵雞蛋白水解液試製：

將購自食品工業發展研究所之 7 株 *S. cerevisiae* 菌株經活化後接種於 YM (Yeast Medium) broth 中培養 2 天，其菌液於 4℃ 中經 3000 rpm、20 分鐘離心，倒掉上層液，再重覆加入 0.89% 生理食鹽水混合及離心，以清洗菌液三次，吸取沉澱之菌體接種於 20 ml 之雞蛋白液，接種菌體量約為 4×10^8 cfu，並置於 24℃ 中培養 1~3 天，其發酵液亦經 3000 rpm、20 分鐘離心處理，取上層液即為酵母菌雞蛋白發酵液，冷藏備用。

- (ii) 胜肽測定：

依Nielsen *et. al.* (2001) 之OPA (o- phthaldialdehyde) 方法測定之。OPA 試劑：秤取 3.81g sodium tetraborate 及 100 mg 之 SDS 溶於 70ml 的蒸餾水中，另取 OPA 80mg 溶於 2 ml 的乙醇中及 dithiothreitol 88 mg 溶於蒸餾水中，再將上述溶液混合，並定量至 100 ml。取 50 μ l 水解液樣品加入 1 ml OPA 試劑混合均勻，靜置 2 分鐘後，以光電比色計 (Shimadzu UV-160, Japan) 於 340 nm 下測定其吸光值。

- (iii) 巨噬細胞培養：

1. 購自食品工業發展研究所之細胞株 (RAW264.7 cell line, BCRC60001)，依 Freshney (2000) 之方法進行細胞培養。RAW264.7 巨噬細胞株加入 DMEM 培養基 (含 10% fetal bovine serum 及 1% penicilline-streptomycine)，於 37℃、5%CO₂ 條件下培養，經數次繼代培養，待細胞穩定生長後，即為供試細胞株。
2. 分裝培養：活化之巨噬細胞每 ml 加入 5 mg Trysin-EDTA (Gibco BRL, USA) 作用 5 分鐘，再加入 DMEM 及等量 Trypan blue (Sigma, USA)，使死細胞呈藍色，且於血球計數板上計算活細胞數，並以 DMEM 培養基調整活細胞數為 5×10^5 cell/ml。取 200 μ l 細胞懸浮液注入 96 孔平底微量盤 (96 well microtiter plate)，於相同條件下培養 24 小

時。

3. 巨噬細胞激活：上述之巨噬細胞，除去舊有培養基，加入 190 μ l 新鮮不含抗生素之 DMEM 培養基，再將酵母菌雞蛋白發酵液 10 μ l 加入培養盤之孔洞內，並輕輕以抽吸方式混合均勻，於相同條件下培養 24 小時。

(iv) 免疫活性因子分析：

1. TNF- α 、IL-6：取激活巨噬細胞經 24 小時培養後之培養基，以酵素連結免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 測定培養基中產生的 TNF- α 、IL-6 之濃度。Anti-mouse TNF- α (Cat.#BAF410) 及 Anti-mouse IL-6 (Cat.#BAF406) 購自 R&D System, Inc. (USA)，並依該公司所提供之標準步驟進行分析，測定光電比色計在 450 nm 波長下之吸光值。
2. NO：取激活巨噬細胞 24 小時培養後之培養基，以酵素連結免疫分析法測定培養基中產生的 NO 濃度。取待測樣品 50 μ l 於檢測套組 (Cat #917-010, Assay Designs, Inc., USA) 中，並於室溫下反應 10 分鐘後，移至光電比色計在 570 nm 波長下測定吸光值。

(v) 統計分析：

試驗所得資料以 SAS (1988) 套裝軟體採一般線性模式，進行變方分析及鄧肯氏多變域顯著性測驗。

結果與討論

I. 發酵液之蛋白分解測定

OPA 測定法是利用 OPA (o-phathaldialdehyde) 試劑可與胺基酸、胜肽 (peptide) 及含初級胺 (primary amine) 的蛋白質結合，而在 340 nm 波長下有很強的吸光值，據此特性來表示蛋白質被水解為較小分子結構的程度 (Church *et al.*, 1983)。表 1 顯示雞蛋白液經酵母菌發酵至 48 小時，各試驗菌株之發酵液的胜肽含量始呈顯著的增加，其中 BCRC21443 之胜肽含量可增加約 17%，且具有較佳的蛋白分解能力，而發酵 48 至 72 小時之發酵液的胜肽含量則無顯著差異 ($P>0.05$)。*S. cerevisiae* 的代謝利用是以醣類為基質，對蛋白質的利用性較差，而雞蛋白是以蛋白質為主要成分，含量約有 10.5% 左右，碳水化合物則僅約 1%，且有約一半是結合醣 (binding form)，此對於 *S. cerevisiae* 在雞蛋白的發酵作用中是不利的因素。在本試驗中，最初 24 小時 *S. cerevisiae* 仍以醣類為利用基質，而對蛋白質的分解並不顯著，發酵至 24-48 小時可能因雞蛋白中的醣類已被耗盡，迫使轉向利用蛋白質，而使發酵液中的胜肽含量增加；發酵至 72 小時可能因 *S. cerevisiae* 無法繼續利用蛋白質而死滅，或其利用蛋白質能力已達高峰，而使發酵液的胜肽含量趨於平緩。

表 1. 不同酵母菌株於蛋白發酵期間之胜肽含量變化

Table 1. The peptides contents of FCEW⁽¹⁾ with various *S. cerevisiae* strains during 24-72 hours fermentation

Strain	Fermentation time (hours)			
	0	24	48	72
	----- $\mu\text{g/ml}$ -----			
BCRC 21443	133.3 ^{cw}	129.5 ^{dy}	156.6 ^{ax}	152.1 ^{bw}
BCRC 21445	133.1 ^{bw}	133.5 ^{bx}	145.1 ^{az}	145.6 ^{ay}
BCRC 21468	135.3 ^{bw}	135.1 ^{bx}	150.3 ^{ay}	151.6 ^{aw}
BCRC 21469	134.2 ^{bw}	138.2 ^{bw}	142.1 ^{az}	141.3 ^{az}
BCRC 21798	132.5 ^{cw}	138.6 ^{bw}	145.1 ^{bz}	148.2 ^{ax}
BCRC 21811	132.6 ^{bw}	132.1 ^{bx}	150.4 ^{by}	152.5 ^{aw}
BCRC 22223	133.6 ^{cw}	136.5 ^{bw}	151.2 ^{ay}	150.1 ^{awx}

^{a-d} Means within same row with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

^{w-z} Means within same row with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

⁽¹⁾ FCEW : fermented chicken egg white.

II. 發酵液刺激巨噬細胞產生TNF- α 的影響

TNF- α (tumor necrosis factor- α) 為引起發炎反應的細胞激素之一，主要由活化的巨噬細胞、T細胞、自然殺手細胞 (natural killer cell) 及肥大細胞 (mast cell) 等所產生，其可誘發血管上皮細胞表現黏附蛋白，選擇性的結合嗜中性白血球、單核球等。在循環中藉著辨識這些黏附蛋白使白血球由血液中移行到組織中，產生清除病原的發炎反應 (Goldsby *et al.*, 2001)。巨噬細胞未被活化時 TNF- α 產量極少 (Beutler *et al.*, 1986)，因此TNF- α 常作為巨噬細胞被活化的指標之一。

在 24-72 小時的雞蛋白液發酵試驗中，各試驗菌株之 24 小時發酵液對刺激巨噬細胞分泌TNF- α 較未刺激者 (控制組) 即呈顯著的增加，至 48 小時發酵液刺激巨噬細胞分泌TNF- α 達於高峰，而後維持平緩，其中以 BCRC21443 刺激巨噬細胞產生 TNF- α 的效果較強，BCRC21811 次之，BCRC21469 為最弱 (圖1)。

革蘭氏陰性菌細胞壁的主要成分 LPS (lipopolysaccharide) 能對巨噬細胞產生刺激而引起發炎反應，由實驗發現被激活的巨噬細胞所產生之 TNF- α 可高於未被激活細胞的 100 倍 (Balkwill, 2000)。Marin *et al.* (1997) 亦利用 *Bifidobacterium sp* 菌體刺激巨噬細胞，結果產生 21-870 倍之高量 TNF- α 。本實驗中激活能力最強者亦僅為未激活者之 1.7 倍左右，推測雞蛋白發酵液未能造成巨噬細胞引發發炎反應，但已能提升其活性。

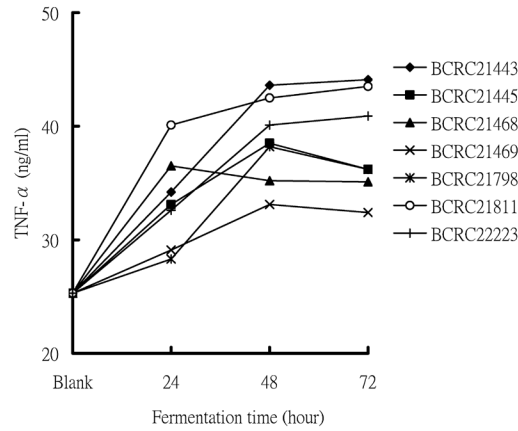


圖 1. 酵母菌發酵蛋白液對巨噬細胞產生TNF- α 的影響。

Fig. 1. Effect of FCEW with various *S. cerevisiae* on the production of TNF- α by activated macrophage cells.

*Blank: non-activated macrophage cells.

III. 發酵液刺激巨噬細胞產生 IL-6 的影響

圖 2 是雞蛋白發酵液刺激巨噬細胞分泌 IL-6 的變化。結果顯示，所有試驗菌株發酵至 24 小時，其發酵液即可顯著刺激巨噬細胞產生 IL-6，其中 BCRC21443、BCRC21811 在發酵至 48 小時之發酵液對激活巨噬細胞所產生 IL-6 之能力較未激活者增加可達 7 倍以上。

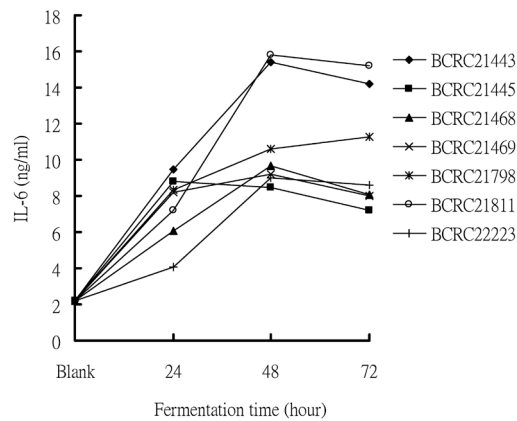


圖 2. 酵母菌發酵蛋白液對巨噬細胞產生IL-6的影響。

Fig. 2. Effect of FCEW with various *S. cerevisiae* on the production of IL-6 by activated macrophage cells.

*Blank: non-activated macrophage cells.

IL-6 是已分化的巨噬細胞、T細胞及肥大細胞等所產生的細胞激素，在巨噬細胞的激活作用中產生較晚，因此 IL-6 的產量也常作為估計巨噬細胞被激活的程度 (Abbas *et al.*, 2000)。Marin *et al.* (1997)，So *et al.* (1999) 以熱殺滅雙叉乳桿菌，再取其菌體刺激巨噬細胞產生 TNF- α 及 IL-6，結果顯示產生 TNF- α 之能力較 IL-6 劇烈。劉 (2003) 以乳酸菌菌體及去菌體發酵液激活巨噬細胞，亦顯示菌體刺激巨噬細胞產生 TNF- α 之能力較去菌體發酵液為佳。反之，刺激巨噬細胞產生 IL-6 之能力上，以去菌體發酵液較菌體為顯著。

本實驗所使用之刺激物為去菌體之發酵液，其刺激巨噬細胞產生 IL-6 之能力較 TNF- α 的效果為佳，此與 Marin *et al.* (1997)，So *et al.* (1999) 及劉 (2003) 等之研究有相同結論。菌體或可能其細胞壁能有效的激活巨噬細胞，菌體發酵的代謝產物在激活巨噬細胞的反應上不如菌體，但能較有效的刺激活化巨噬細胞產生 IL-6，進而刺激 B 細胞的生長及分化，以產生體液免疫。

IV. 發酵液刺激巨噬細胞產生 NO 的影響

巨噬細胞殺死或抑制腫瘤、細菌、真菌或寄生蟲的方式，可約略分為兩種：其一為藉由吞噬作用，在巨噬細胞內形成噬菌體 (phagosome)，再與溶菌體 (lysosome) 結合，利用酵素作用將病原分解為無害的小片斷；另一種方式為產生 NO 或 H_2O_2 等活性氧直接破壞病原 (Abbas *et al.*, 2000)。被激活的巨噬細胞，其吞噬能力及殺死微生物的能力都明顯提升，此為巨噬細胞被活化的重要指標。

雞蛋白液經所有試驗菌株發酵至 24 小時之發酵液，其刺激巨噬細胞產生 NO 的作用即有明顯增加 (圖3)；發酵 48 小時之雞蛋白發酵液，除 BCRC21468 之菌株處理組外，其刺激巨噬細胞產生 NO 的作用持續增加，其中 BCRC21443、BCRC21811 較未刺激者可增加約兩倍左右；發酵 72 小時之雞蛋白發酵液，其刺激作用則趨於平穩，且與發酵 48 小時者相較無明顯差異。此結果與刺激巨噬細胞產生 TNF- α 的趨勢頗為一致，表示巨噬細胞被激活時，其殺菌能力亦同時提升。

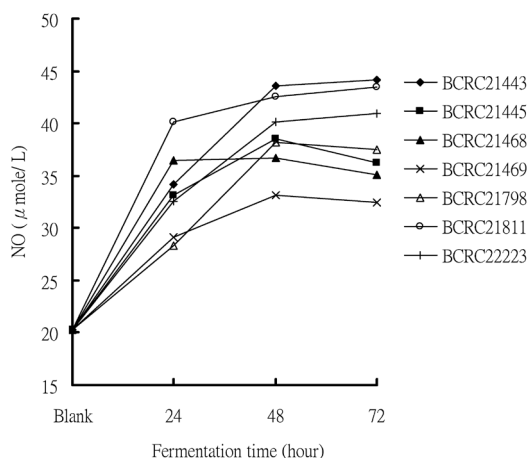


圖 3. 酵母菌發酵蛋白液對巨噬細胞產生 NO 的影響。

Fig. 3. Effect of FCEW with various *S. cerevisiae* on the production of NO by activated macrophage cells.

*Blank: non-activated macrophage cells.

結論

本試驗是利用 *S. cerevisiae* 發酵雞蛋白，並測定其發酵液免疫反應的初步嘗試。結果顯示，雞蛋白經 *S. cerevisiae* 發酵的最佳時程為 48 小時，此時之發酵液的胜肽含量較高，且用以激活巨噬細胞亦產生較高含量 TNF- α 、IL-6 及 NO 等細胞活素，其間存在一正相關，表示雞蛋白被 *S. cerevisiae* 水解所產生的胜肽具有激活巨噬細胞的能力。

增加 *S. cerevisiae* 對雞蛋白發酵的水解程度，提高胜肽含量，應可增加其免疫反應的效果，但由於 *S. cerevisiae* 是以醣類為利用基質，而在改以蛋白質為主的雞蛋白基質的發酵作用中，自然受到限制，但可以延長發酵時間，以提高水解率，若如此操作則須降低發酵溫度，以防止其它雜菌的繁殖污染，而低溫會使發酵菌株代謝變慢，發酵水解效率亦會下降，或是添加少許醣類，以提供 *S. cerevisiae* 做為能量，藉以提昇發酵水解效率等，均須再進一步之試驗探討，而尋求最佳的發酵條件。

參考文獻

- 劉雨如。2003。益生菌與其發酵乳抗氧化能力和免疫功能之探討。國立中興大學畜產系碩士論文。台中。
- Abbas, A. K., A. H. Lichtman and J. S. Pober. 2000. Cellular and molecular immunology. pp.196-197, 281-302. W. B. Saunders Company, New York.
- Araki, S., M. Suzuki and M. Fujimoto. 1992. Enhanced resistance to bacterial infections in mice by oral administration of an active egg white product. J. Vet. Med. Sci. 54:1055-1056.
- Balkwill, F. 2000. Cytokine cell biology (3 Ed.) . pp.20-75. Oxford, UK.
- Beutler, B., D. Greenwald and J. D. Hulmes. 1986. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage secreted factor cachectin. Nature 316:552-554.
- Church, F. C., H. E. Swaisgood, D. H. Porter and G. L. Catignani. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J. Dairy Sci. 66 : 1219-1227.
- De Simone, C., R. Vesely, B. Bianchi Salvadori and E. Jirillo. 1993. The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals. Int. immuother 9:23-28.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt and B. A. Osborne. 2001. Immunology. pp. 14-24. W. H. Freeman and Company, New York.
- Kimura, M., M. Suzuki and S. Araki. 1995. Effect of oral administration of fermented egg white powder on experimental *Escherichia coli* infection in immunosuppressant — treated mice. Anim. Sci. Technol. 66: 770-772.
- Kimura, M., S. Araki and M. Suzuki. 1994. Effect of oral administration of fermented egg white powder on peritoneal and alveolar macrophage function in mice. Anim. Sci. Technol. 65:49-52.
- Laffineur, E., N. Genetet and J. Leonil. 1996. Immunomodulatory activity of β -casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 79:2112-2120.
- Marin, M. L., J. H. Lee, J. Murtha, Z. Ustunol and J. J. Pestka. 1997. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell line culture with Bifidobacteria. J. Dairy Sci. 80:2713-2720.
- Nakagawa, J., S. Osame, S. Ichijo, S. Araki and M. Kimura. 1993. Effects of active egg white product on

- neutrophil function in calves. J. Vet. Med. Sci. 55:259-263.
- Nielsen, P. M., D. Petersen and C. Dammann. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J. Food Sci. 66:642-646.
- O'sullivan, M. G., G Thornton, G. C. O'sullivan and J. K. Collins. 1992. Probiotic bacteria : myth or reality ? Trends Food Sci. Technol. 3:309-300.
- SAS. User's Guide: Statistics.1988. SAS institute Inc., Cary, NC, U.S.A.
- So, Y. P., J. E. Geun, T. K. Young, K. J. Hoo, Z. Ustunol and J. J. Pestka. 1999. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cells exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. Int. J. Food Microbiol. 46:231-241.
- Yasui, H. and M. Ohwaki. 1991. Enhancement of immune response in peyers' patch cells culture with *Bifidobacterium breve*. J. Dairy Sci. 74:1187-1195.

Immunity reaction of macrophage cell by fermented chicken egg white with *Saccharomyces cerevisiae* ⁽¹⁾

Yi-Chao Chen⁽²⁾⁽⁵⁾ His-Shan Chang⁽³⁾ and Cheng-Taung Wang⁽⁴⁾

Received : Aug. 30, 2007 ; Accepted : Mar. 20, 2008

Abstract

In this study, we used the macrophage cells model to evaluate the immunomodulating activity of fermented chicken egg white (FCEW) with *S. cerevisiae* for 24-72 hours fermentation. Results showed that the peptides content increased significantly on all test strains for 48 hours fermentation, of which FCEW with BCRC21443 was up to 17%. Moreover, the TNF- α secretion reached a peak by FCEW with all test strains for 48 hours by activated macrophage cells, and then kept on steady. Similarly, IL-6 secretion increased significantly by FCEW with all test strains for 24 hours by activated macrophage cells, of which FCEW with BCRC21443, BCRC21811 for 48 hours were more 7-fold higher than those of inactivated cells. On the measurement of NO production, the NO production increased significantly by FCEW with all test strains for 24 hours by activated macrophage cells. In conclusion, fermented chicken egg white with *S. cerevisiae* for 48 hours fermentation had better efficiency of protein utilization. Meanwhile, TNF- α , IL-6 and NO production reach the peaks by those of FCEW activated macrophage cells. It revealed that FCEW with *S. cerevisiae* was able to activate macrophage cells. The results indicated that BCRC21443 had both the best efficiency of protein utilization and the ability of its FCEW to activate macrophage cells.

Key words : Chicken egg white, Fermentation, Yeast, Immunity reaction.

(1) Contribution No. 1432 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Animal products processing Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Department of animal science, National Chung-Hsing University, Taichung 402, Taiwan, R.O.C.

(4) Deputy minister, COA Executive Yuan, Taipei 10014, Taiwan, R.O.C.

(5) Corresponding author, E-mail : ycchen@mail.tlri.gov.tw.

