

动态高压微射流对蛋清蛋白致敏性及体外消化的影响

迟玉杰 李胤楠 赵英

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为研究动态高压微射流(Dynamic high-pressure microfluidization, DHPM)处理对蛋清蛋白(Egg white protein, EWP)致敏性、消化性的影响,分别选取40、80、120、160、200 MPa压力对EWP进行处理,通过模拟体内消化过程,测定EWP的水解度和消化率,采用ELISA法测定EWP的致敏性,采用SDS-PAGE、圆二色谱和荧光光谱等技术方法测定EWP结构特性的改变,同时分析EWP表面巯基含量变化。结果表明,80~200 MPa的DHPM处理均可明显降低EWP的致敏性,尤其在120 MPa条件下,EWP的Ig E结合率降低了63.7%,消化后水解产物的Ig E结合率降低了93.5%。同时,EWP的消化水解效率及蛋白质消化率明显提高($P < 0.05$)。在结构特性方面,经DHPM处理(80~200 MPa)的EWP分子量没有明显变化,而其表面疏水性和表面巯基含量明显提高($P < 0.05$),荧光强度增强, α -螺旋向 β -折叠转化,表明EWP的致敏性降低及消化性的升高与DHPM处理改变蛋白质原有二级、三级和四级结构特性相关。综上可知,DHPM处理可以作为一种降低EWP致敏性及提高其消化效率的技术手段。

关键词: 蛋清蛋白; 致敏性; 体外消化; 动态高压微射流

中图分类号: TS253 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2017)06-0312-07

Effect of Dynamic High-pressure Microfluidization on Egg White Protein Allergenicity and Digestibility

CHI Yujie LI Yinnan ZHAO Ying

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Aiming to investigate the effects of DHPM treatment on allergenicity, digestibility and structures of EWP, EWP was processed under a continuous pressure array of 40 MPa, 80 MPa, 120 MPa, 160 MPa and 200 MPa. After DHPM treatment, the degree of hydrolysis and digestibility of EWP was evaluated by in vitro digestion test, the allergenicity was measured by ELISA assay, and changes in molecular weight and conformational structure of EWP were characterized by SDS-PAGE, circular dichroism spectrum and fluorescence spectra. The results showed that DHPM treatment with pressure ranging from 80 MPa to 200 MPa could significantly reduce the allergenicity of EWP, especially at 120 MPa. The Ig E-binding of DHPM treated EWP and its hydrolysates were reduced by 63.7% and 93.5%, respectively. Meanwhile, the molecular weight distributions of DHPM treated EWP were not changed. However, the DHPM treatment contributed to an increase in relative fluorescence intensity, but the spectral peaks shift was not observed. At the same time, the surface hydrophobicity and free sulfhydryl group content of EWP were significantly increased after DHPM treatment (80~200 MPa) compared with native EWP, and some α -helices were destroyed and converted to β -sheets and random coils, indicating that the secondary and tertiary structures of EWP were changed. It was found that the reduction of antigenicity was correlated with the changes in the structure and epitopes of the allergenic protein. Thus the content of α -helices was decreased with the reduction in antigenicity, suggesting that Ig E-binding epitopes might be located in the α -helices structure of EWP. Moreover, hydrolysis efficiency and digestibility in vitro of EWP were markedly increased through the DHPM treatment (80~200 MPa). These results suggested that DHPM can be adopted as an important physical modification method for EWP of hypoallergenic and improving digestibility. The research can provide theoretical basis for the development of low sensitivity egg white products and their applications in food industry.

Key words: egg white protein; allergenicity; in vitro digestion; dynamic high-pressure microfluidization

引言

蛋清蛋白(Egg white protein, EWP)含有人体所需的8种必需氨基酸,氨基酸组成平衡,是优质的动物蛋白来源。EWP因其丰富的营养价值、易消化吸收的特性以及独特的功能性质,被广泛应用于肉肠类、鱼糜类及焙烤等食品加工领域^[1-2]。但是,EWP的应用仍存在一个关键的限制因素——致敏性。鸡蛋已被联合国粮农组织(FAO)认定为八大类主要过敏食物之一,其过敏发生率为1.6%~3.2%,尤其以儿童及婴幼儿过敏居多。鸡蛋过敏会导致腹痛、痉挛、哮喘,严重时甚至危及生命^[3]。已有文献证实EWP是鸡蛋中的主要过敏原,包括卵类黏蛋白(OVM, Gal d1)、卵白蛋白(OVA, Gal d2)、卵转铁蛋白(OVT, Gal d3)和溶菌酶(Lys, Gal d4)等^[4]。因此,针对EWP,在维持其良好消化性的同时,寻找合适的技术方法,降低或消除其致敏性,开发低致敏及无致敏的产品具有实际意义。

动态高压微射流(Dynamic high-pressure microfluidization, DHPM)是一种新兴的高压均质技术,通过高速冲击、高频振动、强烈剪切、空穴爆炸、短时处理及连续操作等综合作用使大分子结构改变,尤其是蛋白质构象的改变,从而改变蛋白的原有特性,如致敏性及消化性^[5-7]。ZHONG等^[8]研究表明采用DHPM处理 β -乳球蛋白,当压力高于80 MPa时其致敏性明显降低;HU等^[9]研究发现,在180 MPa DHPM处理条件下,花生蛋白结构展开,疏水区域暴露, α -螺旋向 β -折叠转化,二硫键含量减少,进而致敏性降低。还有学者研究表明DHPM处理后EWP的功能性质得以改善,溶液平均粒度减小,表观黏度明显提高^[10-11]。然而,目前国内外关于DHPM处理对EWP致敏性及体外消化的相关报道还很少。因此,本文以EWP为研究对象,通过DHPM对EWP进行物理改性,研究不同压力对EWP致敏性及体外消化的影响,为拓展蛋清加工领域的应用与发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与仪器

新鲜鸡蛋,市售;Ig E和Ig G ELISA试剂盒(辣根过氧化物酶(Horse radish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔Ig G和Ig E抗体)、胃蛋白酶(酶活力400 U/mg以上)、胰蛋白酶(酶活力250 U/mg以上)、OPA(邻苯二甲醛)、DTNB(5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸))、ANS(8-苯胺-1-萘磺酸),均购自Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。

M-110L型微射流高压均质机,美国Microfluidics公司;TU-1810型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;J-815型圆二色光谱仪,日本JASCO公司;SHA-B型水浴恒温振荡器,常州亿通分析仪器制造有限公司;凯氏定氮仪,上海纤检仪器有限公司;680型酶标仪,美国BIO-RAD公司;F-4500型荧光分光光度计,日本日立公司。

1.2 样品处理及制备

将鸡蛋经过清洗后打蛋分离蛋清,搅拌20 min,然后用2层纱布过滤得到蛋清液。取80 mL蛋清液在室温(20℃)下进行微射流均质处理,处理压力分别为40、80、120、160、200 MPa。处理后的样品于4℃保存以备用。

1.3 模拟体内消化试验

1.3.1 模拟体内消化的过程

参照FERRANTI等^[12]和MA等^[13]的方法并略作修改。取50 mL不同处理的EWP溶液置于三角瓶中,在37℃水浴中振荡预热10 min,加入80 mL消化缓冲液(含120 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl和6 mmol/L CaCl₂),具体消化过程如图1所示。收集胃消化0 h和1 h以及肠消化2 h样品,存于-20℃以备用,用来进行EWP水解度和蛋白质消化率的测定。

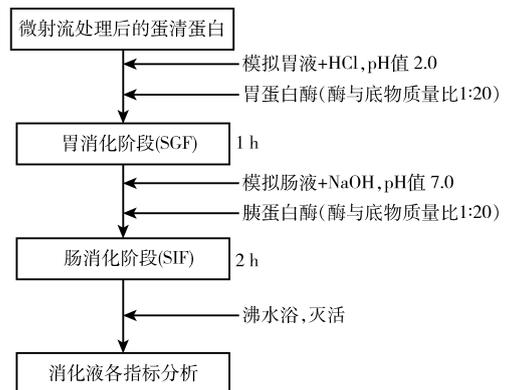


图1 EWP模拟体内消化方案图

Fig.1 Scheme of simulating digestion in vitro on EWP

1.3.2 水解度测定

根据PENAS等^[14]的邻苯二甲醛法(OPA)并略作修改。400 μ L样品酶解液加入3 mL OPA试剂,迅速混匀,避光反应2 min,同时以未水解样做空白对照试验,于340 nm下测定吸光度,水解度计算公式为

$$H = \frac{1.8114 \Delta A d}{c} \times 100\% \quad (1)$$

式中 ΔA ——水解样品的吸光度与未水解样品吸光度的差值

d ——稀释倍数

c ——蛋白质量浓度, g/L

1.3.3 体外消化率测定

采用 TCA-NSI(三氯乙酸氮溶指数)法^[15],取 10 mL 消化液,加入等体积的 10% TCA(三氯乙酸)沉淀蛋白,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用凯氏定氮法测其中氮的含量,其中空白试验以蒸馏水代替样品消化液,蛋白质消化率计算公式为

$$D = \frac{6.25(m_1 - m_0)}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中 m_1 ——样品上清液中氮的质量, g

m_0 ——空白上清液中氮的质量, g

m_2 ——样品中蛋白质的质量, g

1.4 致敏性测定

参照 JIN 等^[16]的方法,采用间接酶联免疫吸附法(ELISA)。将 DHPM 处理后的 EWP 溶液及体外消化液稀释至 50 μ g/mL(0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS), pH 值 7.4),取样品加到 100 μ L/孔的 96 孔酶标板中,于 4 $^{\circ}$ C 静置 12 h;用 PBST(含吐温-20 的磷酸盐缓冲液)洗涤 3 次,拍干;在酶标板孔内加入含有 50 mL/L 脱脂牛奶的 PBS 封闭液,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 2 h,同上洗涤;将兔抗蛋清蛋白血清(按 1:400 稀释)加入板孔,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 2 h,同上洗涤;加入 HRP 标记的羊抗兔 IgE-OVA(1:1 000 稀释)或 HRP 标记的羊抗兔 IgG-OVA(1:15 000 稀释),100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 2 h,同上洗涤;再加现配制的 OPD(邻苯二胺)底物显色液,37 $^{\circ}$ C 避光显色 20 min;加入 50 μ L 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止液,用酶标仪于 450 nm 处,以空白对照孔调零后测定各孔的光密度值(OD 值)。

1.5 SDS-PAGE

参照 YANG 等^[17]的方法,略作调整。凝胶制备:分离胶质量分数为 12%,浓缩胶质量分数为 3%。样品处理:将各样品(蛋白质量浓度 1 g/L)或 Marker 与 0.01 mol/L 上样缓冲液以 1:1 的体积比混合,沸水加热 5 min 备用。取 20 μ L 样品上样,先 70 V 电泳 30 min,然后 120 V 稳压电泳 50 min。用考马斯亮蓝 R-250 染色液(50% 甲醇和 10% 冰醋酸)染色,然后用脱色液(10% 甲醇和 7% 冰醋酸)脱色。脱色完成后,置于凝胶成像系统中拍照并进行分析。

1.6 圆二色谱分析

用 JASCO-815 型旋光仪测定 EWP 的远紫外圆二色谱变化。将处理后的 EWP 溶液注入 0.1 cm 厚的椭圆形比色皿中,在 25 $^{\circ}$ C 和连续充氮的条件下,进行远紫外区域(190~250 nm)扫描,速度为 50 nm/min,光谱间隔 0.1 nm,3 次累积。由仪器提供的 Yang 氏参照 CD 光谱估算 EWP 的二级结构中

α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲所占的比率。

1.7 表面巯基含量测定

1 mL EWP 溶液(1 mg/mL)加入 4 mL 缓冲液 A(每升溶液含 10.4 g Tris,6.9 g 甘氨酸,1.2 g EDTA, pH 值 8.0),再加入 0.1 mL Ellman's 试剂(含 4 mg/mL DTNB 的甘氨酸缓冲溶液)混匀。于室温避光放置 30 min,取上清液在 412 nm 处测定吸光度,缓冲液为对照。巯基含量的计算以吸光度除以摩尔消光系数 13 600 L/(mol·cm),并以 μ mol/g 的蛋白表示。

1.8 荧光强度和表面疏水性测定

参照马爽^[18]和迟玉杰等^[19]的方法稍做修改,用 0.02 mol/L pH 值 7.0 磷酸盐缓冲液稀释蛋白溶液质量浓度为 0.1 g/L,使用荧光分光光度计测定其荧光强度。其中激发波长 350 nm,发射波长为 360~680 nm,狭缝宽度 5 nm。取 4 mL 上述蛋白浓度样品加入 20 μ L 的 ANS(8 mmol/L)溶液混合均匀作为荧光探针,立即采用荧光分光光度计在 370 nm 的激发波长和 470 nm 的发射波长下测定样品的荧光强度,狭缝为 5 nm 条件下扫描其荧光强度。以荧光强度对蛋白质浓度作曲线,曲线斜率即为蛋白质分子的表面疏水性。

1.9 数据分析

试验中所有结果都是 3 次测定的平均值,计算标准偏差。采用 Origin 8.6 软件对数据进行分析与制图,采用 SPSS 20.0 软件进行方差分析和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 DHPM 对 EWP 体外消化水解度及消化率的影响

消化率是评价食物营养价值的重要指标之一。如图 2 所示,SGF 消化 1 h 后,与未处理组相比,DHPM 处理总体上均提高了 EWP 的水解度,且随着压力的升高先增大后降低。经 SIF 消化 2 h 后,与未处理组相比,DHPM 处理后明显提高了 EWP 的水解度。且在 120 MPa 和 160 MPa 条件下,其水解度优于其他处理组。从图 2 可知,在 SGF 和 SIF 消化阶段,DHPM 处理的 EWP 消化率与未处理组相比均有显著提高,其中 120 MPa 和 160 MPa 处理后 EWP 消化率提高最多,最终分别提高了 19.4% 和 16.5%。PLANCKEN 等^[20]研究高压处理(500 MPa,10 $^{\circ}$ C)蛋清液(10%)后进行胃肠模拟消化,结果发现蛋清液的消化性明显增加。MIGUEL 等^[21]对卵白蛋白(OVA)进行上述相似处理后,OVA 的水解度得以提高,同时还释放了活性肽,尤其在胃蛋白酶消化阶

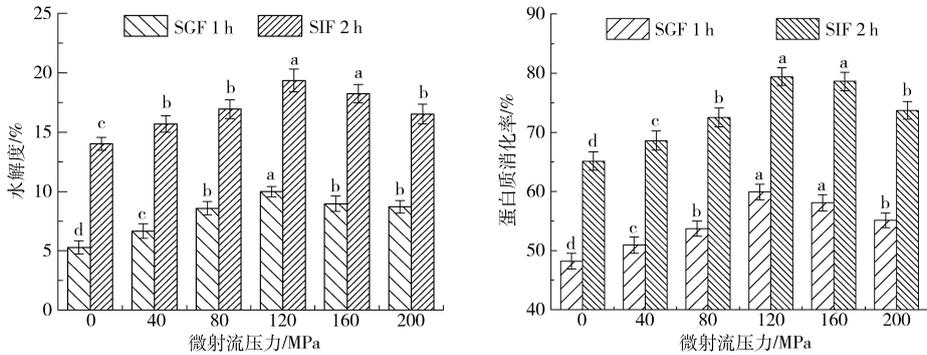


图 2 DHPM 对 EWP 体外消化水解度及消化率的影响

Fig. 2 Effect of DHPM on hydrolysis degree and digestibility of EWP

段。而当压力升高至 160 MPa 和 200 MPa, EWP 的水解度和消化率略有下降, 表明过高的压力使 EWP 暴露的疏水基团发生再聚集或聚合形成更稳定的结构。

胃蛋白酶是一种肽链内切酶, 能水解芳香族氨基酸或部分其它疏水性氨基酸的肽链; 胰蛋白酶可水解精氨酸和赖氨酸羧基组成的肽键, 能消化溶解变性蛋白质。研究表明, DHPM 处理可明显提高 EWP 的水解效率及消化率, 这说明微射流均质过程中剧烈处理条件破坏了蛋白聚集体及蛋白分子的高级结构, 使被包埋的酶解位点暴露, 提高蛋白的酶解敏感性进而增强其水解效率, 因此 EWP 的消化率得以提高。已有报道压力处理可通过使蛋白变性、解折叠或化学键破坏而增强蛋白酶与蛋白结合位点的易接近性^[22]。

2.2 DHPM 对 EWP 致敏性的影响

本试验采用 ELISA 法测定 DHPM 处理后 EWP 的 Ig G 和 Ig E 结合能力进而测定其致敏性。由表 1 可知, 与原蛋清蛋白相比, DHPM 处理后 EWP 的 Ig G 致敏性减少, 且在 120 MPa 条件下其致敏性达到最低。SGF 和 SIF 消化后水解产物的 Ig G 结合能

力也进一步说明了 DHPM 处理提高了 EWP 消化性。在高于 80 MPa 条件下, SGF 和 SIF 消化后水解产物的致敏反应显著降低, 且在 120 MPa 和 160 MPa, 其 Ig G 反应最低。Ig E 结合反应的变化趋势与 Ig G 相一致, 表明 DHPM 处理(80 MPa 以上)可减少能引起过敏的 EWP 组分, 尤其在 120 MPa, EWP 及消化后水解产物的 Ig E 结合能力与空白组相比分别下降了 63.7%、89.5% 和 93.5%。本研究中 DHPM 处理(80 MPa 以上)可明显降低 EWP 致敏性, 研究表明 DHPM 处理可以破坏 EWP 的空间结构进而破坏其蛋白的构象表位, 使其不能与 Ig G 或 Ig E 结合, 达到致敏性的效果, 本研究结果与 ZHONG 等^[8]研究结论一致。但当压力达到 160 MPa 和 200 MPa 时, EWP 的致敏性又略有升高。SATHE 等^[23]报道当大豆蛋白的处理压力高到一定程度, 其致敏性也略有增加, 原因可能是过高的压力会破坏维持蛋白构象的作用力, 使得原本隐藏在蛋白结构内部的抗原表位暴露, 增加了与 Ig G 或 Ig E 结合的几率, 进而增加蛋白的抗原性。此外, 体外消化结束后, 水解产物的致敏性仍没有完全消除, 表明消化后的某些肽片段仍具有抗原表位的残余。

表 1 DHPM 处理下 EWP 及其体外消化水解液的致敏性 (OD 值)

Tab. 1 Allergenicity of hydrolysates of EWP under DHPM treatment (OD value)

压力/ MPa	Ig G 结合			Ig E 结合		
	EWP	EWP - SGF	EWP - SIF	EWP	EWP - SGF	EWP - SIF
0	1.69 ± 0.09 ^a	1.35 ± 0.06 ^a	0.78 ± 0.02 ^a	1.24 ± 0.08 ^a	0.98 ± 0.06 ^a	0.80 ± 0.04 ^a
40	1.66 ± 0.05 ^a	1.28 ± 0.05 ^a	0.73 ± 0.03 ^a	1.20 ± 0.07 ^a	0.90 ± 0.05 ^a	0.74 ± 0.05 ^a
80	1.52 ± 0.04 ^b	1.05 ± 0.09 ^b	0.61 ± 0.03 ^b	0.89 ± 0.04 ^b	0.58 ± 0.04 ^b	0.40 ± 0.02 ^b
120	1.19 ± 0.02 ^d	0.73 ± 0.03 ^d	0.35 ± 0.02 ^d	0.45 ± 0.02 ^c	0.13 ± 0.01 ^d	0.08 ± 0.02 ^c
160	1.28 ± 0.03 ^c	0.80 ± 0.04 ^d	0.41 ± 0.02 ^d	0.60 ± 0.03 ^d	0.25 ± 0.02 ^c	0.16 ± 0.03 ^d
200	1.33 ± 0.02 ^c	0.93 ± 0.02 ^c	0.54 ± 0.01 ^c	0.69 ± 0.04 ^c	0.31 ± 0.03 ^c	0.23 ± 0.02 ^c

注: 同列数据之间的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

2.3 DHPM 对 EWP 分子量的影响

如图 3 所示, 图中 0 表示蛋白 Marker, 1 表示未经处理的 EWP, 2 ~ 6 表示不同压力 (40、80、120、

160、200 MPa) DHPM 处理的 EWP。DHPM 处理后 EWP 的电泳行为与原蛋清蛋白相比没有显著变化。DHPM 处理后并没有使 EWP 发生大分子聚集或裂

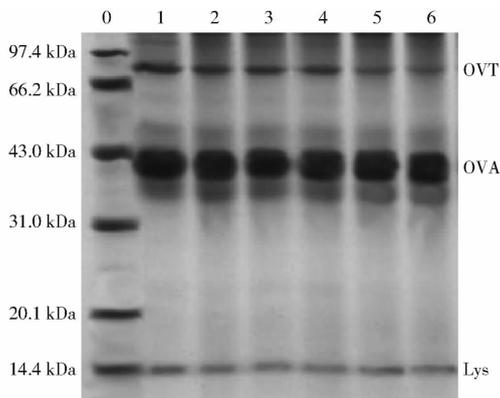


图3 DHPM处理后EWP的分子量分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of DHPM treated EWP

解成小分子,这表明EWP的分子量没有变化,这与黄群等^[24]研究的超高压处理后S-卵白蛋白的分子量分布结果相一致。ZHONG等^[8]和LI等^[25]研究高压处理植物铁蛋白和大豆分离蛋白后发现,尽管蛋白的三级结构发生改变,但电泳行为与本研究观察到的结果相似。CHEN等^[26]研究结果表明DHPM处理没有引起大豆蛋白的降解,而是暴露了水解位点及提高了酶解敏感性。

2.4 DHPM对EWP二级结构的影响

将CD图谱与Yang氏参照CD光谱拟合后估算出EWP二级结构中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲所占的百分比,如表2所示。随着处理强度的增大, α -螺旋含量先下降后上升,而 β -折叠含量先上升后下降。但与原蛋清蛋白对比,DHPM处理的EWP α -螺旋含量减少而 β -折叠含量增多。比如,当压力处理为120 MPa时,EWP的 α -螺旋含量从44.5%降低到31.5% ($P < 0.05$),而 β -折叠含量从10.9%增加至18.6% ($P < 0.05$)。

表2 DHPM处理后EWP二级结构所占百分比

Tab. 2 Content of secondary structure on DHPM treated EWP %

压力/ MPa	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
0	44.5 ± 1.51 ^a	10.9 ± 1.02 ^c	18.5 ± 0.99 ^a	26.1 ± 1.17 ^d
40	42.8 ± 1.63 ^a	12.4 ± 1.09 ^d	17.9 ± 0.87 ^{ab}	26.9 ± 1.67 ^d
80	38.5 ± 1.59 ^b	14.4 ± 1.02 ^c	17.6 ± 0.67 ^{ab}	29.5 ± 1.83 ^c
120	31.5 ± 1.65 ^d	18.6 ± 1.05 ^a	17.3 ± 0.86 ^b	32.6 ± 1.65 ^a
160	33.2 ± 1.62 ^d	16.9 ± 1.09 ^b	18.4 ± 0.65 ^a	31.5 ± 1.79 ^b
200	35.3 ± 1.59 ^c	15.4 ± 1.07 ^c	18.5 ± 0.72 ^a	31.0 ± 1.86 ^{bc}

DHPM处理后EWP的一些 α -螺旋结构被破坏转向 β -折叠结构,表明EWP的二级结构改变,且改变量与压力有关,这与HU等^[9]研究的DHPM对花生蛋白二级结构的影响和周昊等^[27]通过高压处理后白果蛋白的二级结构变化的结论一致。此外,研

究结果显示二级结构的变化与致敏性降低的趋势相一致,即致敏性随 α -螺旋含量的减少而降低,表明抗原表位很可能主要位于EWP的 α -螺旋结构内^[9]。

2.5 DHPM对EWP表面巯基(-SH)含量的影响

DHPM处理的EWP表面-SH含量变化如图4所示。通常,二硫键对维持EWP的二级和三级结构起着很重要的作用。有研究报道DHPM处理可使蛋白质的二硫键裂解转变成-SH,使得表面巯基含量增加及致敏性降低^[9]。本研究中,未经DHPM处理的EWP表面-SH质量摩尔浓度为2.29 $\mu\text{mol/g}$,随着压力增加至120 MPa,其表面-SH含量一直明显增加,说明二硫键的破裂导致新的表面-SH的形成。当压力为160 MPa和200 MPa时,其表面-SH含量略有下降但不显著,这可能是因部分新产生的表面巯基不稳定,易相互反应重新形成二硫键。

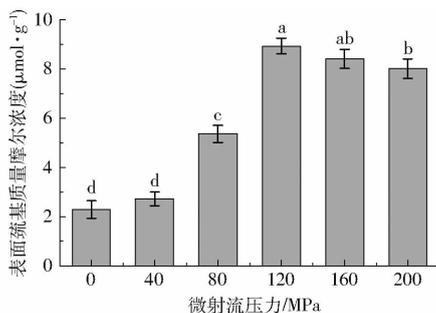


图4 DHPM对EWP表面巯基含量的影响

Fig. 4 Effect of DHPM on free sulfhydryl group content of EWP

此外,二硫键对蛋白的IgE或IgG结合表位的完整性也起着很重要的作用,这与EWP的致敏性关系密切^[28]。DHPM处理后EWP的二硫键减少并且其致敏性降低,因为含抗原表位的部分是很难被水解的,但是当二硫键破坏后这些抗原表位易被胃蛋白酶及胰蛋白酶快速水解消化,进而导致整体致敏性的降低,关于Ara h2(花生蛋白)^[9]和 β -乳球蛋白^[29]的致敏性报道也得到相似的结论。同时,还有一些相关研究报道二硫键对维持IgE或IgG结合表位的构象很重要^[28,30]。因此,可以推测DHPM处理通过改变EWP的构象来降低其致敏性。

2.6 DHPM对EWP荧光强度和表面疏水性的影响

由图5可知,与未经DHPM处理的EWP比较,其荧光的最大吸收波长 λ_{max} 为490 nm,并没有随着压力的变化而发生移动,但随着压力的增大,EWP的荧光强度明显增强。当压力上升至120 MPa时,荧光强度达到最大,但是经更高压力处理后,荧光强度有所下降。ZHONG等^[8]报道了DHPM处理导致

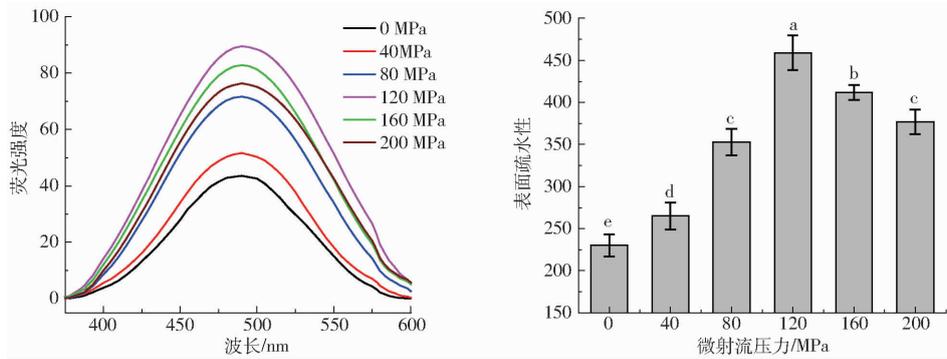


图5 DHPM对EWP荧光强度和表面疏水性的影响

Fig. 5 Effect of DHPM on fluorescence intensity and hydrophobicity of EWP

β -乳球蛋白相对荧光强度增强,而最大谱峰也没有发生移动。DHPM处理后EWP的荧光强度增强表明蛋白质结构展开,更多疏水区域暴露,进而EWP疏水性增强,这表明DHPM处理改变了EWP的三级和四级结构。当压力为160 MPa和200 MPa, EWP相对荧光强度有所减弱,表明暴露的疏水基团再聚集形成更稳定的结构。

从图5可以看出,EWP的表面疏水性变化与荧光强度变化相一致。随着处理压力的增加,EWP的表面疏水性先上升后下降。关于高压处理导致其他蛋白的表面疏水性增加的报告也很多,结构紧实及含有分子内二硫键的球蛋白偏多,比如大豆球蛋白^[31]和卵白蛋白^[32]等。本研究结果证实EWP结构的改变是因为DHPM与天然EWP结构构造有关。同时,EWP三级结构的改变进一步解释DHPM处理降低了其致敏性。据报道高压处理降低了其他致敏蛋白(大豆分离蛋白^[25]和 α -淀粉酶抑制剂^[33])的IgE结合活性,主要是由蛋白质三级结构改变引起的。

3 结束语

不同的加工处理方式影响食物蛋白的理化性质,相应地影响蛋白的消化性、生物活性和致敏性。本研究的DHPM处理(80~200 MPa)可明显提高EWP体外水解度及蛋白质消化率,同时EWP致敏性明显降低,说明DHPM处理明显提高了EWP的水解效率和脱敏效果,但主要取决于选择的处理压力。通过DHPM处理后,EWP的分子量没有变化,但随着压力的增加,其表面疏基含量和表面疏水性整体上高于天然蛋清蛋白,而 α -螺旋含量降低,且 α -螺旋向 β -折叠转化,这说明DHPM处理使EWP的二级、三级及四级结构发生改变,这些结构的改变与EWP致敏性的降低有着密切关系,即通过破坏蛋白的构象表位使其致敏性降低。因此,DHPM技术可以作为一种降低EWP致敏性及提高消化性的物理改性手段,推荐的适宜压力为120 MPa左右。本研究为开发低致敏性蛋清蛋白产品,拓宽其应用前景提供了理论基础。

参 考 文 献

- 迟玉杰. 蛋制品加工技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2011:34-39.
- 刘静波, 于志鹏, 赵文竹, 等. 蛋清肽酶解工艺及血管紧张素转化酶抑制活性研究[J]. 农业机械学报, 2010, 41(7): 147-152. LIU Jingbo, YU Zhipeng, ZHAO Wenzhu, et al. Enzymatic hydrolysis technology for ACE-inhibitory peptides from egg white[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(7): 147-152. (in Chinese)
- 龙彩云, 熊江花, 简珊, 等. 酶解法在鸡蛋脱敏中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 340-344. LONG Caiyun, XIONG Jianghua, JIAN Shan, et al. Application of enzymatic hydrolysis in hypoallergenic egg products[J]. Food Science, 2013, 34(1): 340-344. (in Chinese)
- TONG P, GAO J, CHEN H, et al. Effect of heat treatment on the potential allergenicity and conformational structure of egg allergen ovomucoidin[J]. Food Chemistry, 2012, 131(2): 603-610.
- OBOROCEANU D, WANG L Z, KROES-NIJBOER A, et al. The effect of high pressure microfluidization on the structure and length distribution of whey protein fibrils[J]. International Dairy Journal, 2011, 21(10): 823-830.
- SHEN L, TANG C H. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate[J]. Food Research International, 2012, 48(1): 108-118.
- RAHAMAN T, VASILJEVIC T, RAMCHANDRAN L. Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 49: 24-34.
- ZHONG J, LIU C, LIU W, et al. Effect of dynamic high-pressure microfluidization at different temperatures on the antigenic response of bovine β -lactoglobulin[J]. European Food Research & Technology, 2011, 233(1): 95-102.
- HU C Q, CHEN H B, GAO J Y, et al. High-pressure microfluidization-induced changes in the antigenicity and conformation of allergen Ara h2 purified from Chinese peanut[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2011, 91(7): 1304-1309.
- 涂宗财, 王辉, 刘成梅, 等. 动态超高压均质对蛋清蛋白溶液的粒度和流变性影响[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 27-29.

- TU Zongcai, WANG Hui, LIU Chengmei, et al. Effects of microfluidization on particle size and rheological properties of egg white proteins solution[J]. Food Science, 2007, 28(6): 27-29. (in Chinese)
- 11 涂宗财, 迟海霞, 刘成梅, 等. 动态超高压微射流对卵清蛋白功能性质的影响[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(3): 4-6. TU Zongcai, CHI Haixia, LIU Chengmei, et al. Effect of dynamic high-pressure microfluidization on functional properties of ovalbumin[J]. Food Research and Development, 2010, 31(3): 4-6. (in Chinese)
- 12 FERRANTI P, NITRIDE C, NICOLAI M A, et al. In vitro digestion of Bresola proteins and release of potential bioactive peptides[J]. Food Research International, 2014, 63: 157-169.
- 13 MA X, LOZANO-OJALVO D, CHEN H, et al. Effect of high pressure-assisted crosslinking of ovalbumin and egg white by transglutaminase on their potential allergenicity[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 29: 143-150.
- 14 PENAS E, PRÉSTAMO G, GOMEZ R. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins[J]. Food Chemistry, 2004, 85(4): 641-648.
- 15 范冬雪, 李静洁, 杨金芹, 等. 热处理对小米蛋白体外消化率的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(2): 56-61. FAN Dongxue, LI Jingjie, YANG Jinqin, et al. Effects of heat treatments on the in vitro digestibility of millet protein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016 16(2): 56-61. (in Chinese)
- 16 JIN Y, DENG Y, QIAN B, et al. Allergenic response to squid (*Todarodes pacificus*) tropomyosin Tod p1 structure modifications induced by high hydrostatic pressure[J]. Food & Chemical Toxicology, 2014, 76: 86-93.
- 17 YANG J T, WU C E, LI Y Y, et al. Identification and purification of an allergic glycoprotein from Ginkgo biloba Kernel[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(4): 631-641.
- 18 马爽. 蛋粉冲调特性及复合型功能蛋粉的研究与开发[D]. 长春: 吉林大学, 2012. MA Shuang. Research and development of fast dissolvability and compound functional egg powder[D]. Changchun: Jilin University, 2012. (in Chinese)
- 19 迟玉杰, 范森. 高凝胶性大豆球蛋白制备工艺优化[J/OL]. 农业机械学报, 2012, 43(10): 124-130. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20121023&flag=1. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2012.10.023. CHI Yujie, FAN Miao. Preparation technology of glycinin with high gel strength[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(10): 124-130. (in Chinese)
- 20 PLANCKEN I V D, AND A V L, HENDRICKX M E G. Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(14): 5726-5733.
- 21 MIGUEL M, MANSO M, ALEIXANDRE A, et al. Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg white[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(26): 10615-10621.
- 22 DONG X, ZHAO M, SHI J, et al. Effects of combined high-pressure homogenization and enzymatic treatment on extraction yield, hydrolysis and function properties of peanut proteins[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12(4): 478-483.
- 23 SATHE S K, TEUBER S S, ROUX K H. Effects of food processing on the stability of food allergens[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(6): 423-429.
- 24 黄群, 金永国, 马美湖, 等. 超高压处理对S-卵白蛋白构象与功能特性的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2013, 44(3): 161-166. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20130330&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2013.03.030. HUANG Qun, JIN Yongguo, MA Meihu, et al. Effect of ultra high pressure on conformation and functional properties of S-ovalbumin[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(3): 161-166. (in Chinese)
- 25 LI H, ZHU K, ZHOU H, et al. Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula[J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 808-814.
- 26 CHEN L, CHEN J, YU L, et al. Improved emulsifying capabilities of hydrolysates of soy protein isolate pretreated with high pressure microfluidization[J]. LWT—Food Science and Technology, 2016, 69: 1-8.
- 27 周昊, 王成章, 叶建中, 等. 高静压处理改善白果蛋白致敏性和功能特性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(8): 292-298. ZHOU Hao, WANG Chengzhang, YE Jianzhong, et al. Improvement of allergenicity and functional properties of proteins from ginkgo seeds by high hydrostatic pressure treatment[J]. Transactions of the CSAE, 2016, 32(8): 292-298. (in Chinese)
- 28 MARZBAN G, HERNDL A, PIETROZOTTO S, et al. Conformational changes of Mal d2, a thaumatin-like apple allergen, induced by food processing[J]. Food Chemistry, 2009, 112(4): 803-811.
- 29 ZHONG J, TU Y, LIU W, et al. Antigenicity and conformational changes of β -lactoglobulin by dynamic high pressure microfluidization combining with glycation treatment[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(8): 4695-4702.
- 30 GEKKO K, KIMOTO A, KAMIYAMA T. Effects of disulfide bonds on compactness of protein molecules revealed by volume, compressibility, and expansibility changes during reduction[J]. Biochemistry, 2003, 42(46): 13746-13753.
- 31 ZHANG H, LI L, TATSUMI E, et al. Influence of high pressure on conformational changes of soybean glycinin[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2003, 4(3): 269-275.
- 32 QUIRÓS A, CHICHÓN R, RECIO I, et al. The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin[J]. Food Chemistry, 2007, 104(4): 1734-1739.
- 33 YAMAMOTO S, TAKANOHASHI K, HARA T, et al. Effects of a high-pressure treatment on the wheat alpha-amylase inhibitor and its relationship to elimination of allergenicity[C]. Journal of Physics: Conference Series, 2010, 215(1): 012170.