

物理法结合酶法脱除坚果类过敏原的技术研究

Study on removal allergen technology of physical method combining enzymatic of on nuts

赵 晶¹ 张爱琳² 何新益² 范建涛²

ZHAO Jing¹ ZHANG Ai-lin² HE Xin-yi² FAN Jian-tao²

(1. 天津市宁河县产品质量监督检验所, 天津 301500; 2. 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300384)

(1. Ninghe County of Tianjin Product Quality Supervision and Inspection, Tianjin 301500, China;

2. Food Science and Biological Engineering College of Tianjin Agriculture University, Tianjin 300384, China)

摘要: 分别对 4 种坚果中的过敏蛋白进行分离提取, 研究其蛋白特性, 运用物理方法如高温、高压和微波超声波结合酶法作用于坚果过敏蛋白, 探索脱除坚果类蛋白致敏性的最佳方法。结果表明: 腰果、杏仁、核桃等坚果蛋白都使人产生过敏反应, 经过高温、高压、超声波—微波联合萃取及蛋白酶处理后, 均能使其致敏性明显降低。其中超声波—微波与酶法联合处理, 超声波开启, 作用温度 90 ℃、时间 240 s、微波功率 700 W、0.25% 胰蛋白酶处理 5 min 能完全脱除坚果类过敏蛋白, 是最佳脱敏方法。

关键词: 坚果; 过敏蛋白; 脱敏; 酶法处理; 超声波—微波萃取; 免疫印迹

Abstract: The experiment is to do some research about features of nuts protein across extraction of some nuts. Using physical method such as high temperature and high pressure and microwave ultrasound combined with protein enzymatic processing nuts, explore the best method of removing nuts allergenic protein. Through experiment study found, cashew, almond, walnut protein lead to allergic reaction in body, but after high temperature and high pressure, ultrasonic - joint of microwave extraction and after protease treatment can reduce the allergenic obviously. The ultrasonic - microwave and enzymatic 90 ℃, 240 s, microwave power 700 W, 0.25% trypsin with 5 minutes can almost completely removing nuts allergen protein, is the best way to desensitization.

Keywords: nuts desensitization; enzymatic processing; ultrasonic wave, microwave extraction; western blotting

近年来, 全球食物过敏的发生率已呈上升趋势, 已经严重地影响了部分人群的生活质量甚至危及生命, 引起了各国尤其是发达国家的高度关注^[1]。全球过敏症受累人群超过

25%, 在西方发达国家, 成年人食物过敏症发生率超过 1%; 而婴幼儿和儿童发生率达到了 5%~10%^[2]; 在中国, 北京协和医院变态反应科对就诊患者的调查显示, 每年约有 1.5 万患者为食物过敏^[3]。据统计^[4], 170 多种食物能够引起过敏反应, 其中, 90% 以上过敏反应是由八大类高致敏性食物引起, 包括牛乳、蛋类、花生、大豆、小麦、坚果、鱼和水生贝壳类动物。为了防止消费者误食过敏性食物, 美国、日本和欧盟都颁布了食物标签法, 要求对食品中的 8 大类食物过敏原进行标注^[5]。华南理工大学、中国农业大学、江南大学、中国海洋大学、集美大学、南昌大学^[6-10]等关于大米、虾、牛奶、花生等的过敏源检测及脱敏技术研究已见报道, 但对坚果过敏原的脱敏方法还未见报道。本研究拟通过 SDS—PAGE 电泳技术及 Western-blotting 免疫印迹技术分析坚果蛋白的大致分子量及致敏性; 采用高温、高压、超声波—微波协同萃取技术等物理手段和蛋白酶处理坚果过敏蛋白, 通过双夹心抗体 ELISA 酶联免疫试验方法检测坚果过敏蛋白的致敏效价, 探索降低或脱除坚果过敏蛋白的最佳方法和途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

坚果过敏阳性血清: 从致敏模型阳性试验小鼠采集, 免疫 IgE 浓度为 100 g/L;

核桃: 产自天津蓟县;

黑芝麻: 产自辽宁省丹东市;

开心果: 产自蔚县黄梅乡;

腰果: 产自伊朗;

HRP 标记山羊抗人 IgE 抗体(进口): 艾美捷科技有限公司;

坚果过敏病人阳性血清(7 人混合): 天津市总医院;

邻苯二胺: 分析纯, 天津大学科威公司;

作者简介: 赵晶(1977—), 女, 宁河县产品质量监督检验所工程师。
E-mail: zhaojing1235@126.com

通讯作者: 张爱琳

收稿日期: 2014-12-11

牛血清白蛋白:标准品,北京智杰方运有限公司;
胰蛋白酶:比活力>2 500 NFU/mg,上海鹤善实业有限公司;
胃蛋白酶:比活力 3 800 NFU/mg,上海雅心生物技术有限公司。

1.2 试验仪器

电泳系统:Mini-PROTEAN 型,美国 BIO-rad 公司;
微波超声波联合萃取仪: CW-2000 型,江苏荣华仪器有限公司;
凝胶成像系统:GL2200PRO 型,美国 Kodach 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白质的粗提取

(1) 粉碎:各类坚果去壳及膜质内种皮后,置于(30±1)℃烘箱中干燥 48 h,烘干后的坚果于冰浴中研磨成分,过 40 目筛,备用。
(2) 去脂:坚果粉与石油醚以 1 : 10(*m* : *V*)的比例充分混合后置于 4℃,每隔 1 h 搅拌 1 次,6~8 h 后更换石油醚,重复 3~4 次后,直到坚果粉呈白色为止,于 4℃下放置,直至石油醚挥发完全。
(3) 坚果蛋白的提取:称取脱脂后的坚果粉与 Tris—HCl 缓冲液(TBS,0.2 mol/L、pH 7.4)以 1 : 10(*m* : *V*)的比例充分混合均匀,然后于 4℃浸提 24 h,期间每隔 1~2 h 搅拌一次,之后在 4℃、5 000 r/min 离心 15 min,最后收集的上清液为坚果蛋白的 Tris—HCl 提取液。
(4) 坚果蛋白提取物的硫酸铵分级沉淀:首先通过饱和度和差值为 20%的硫酸铵进行分段沉淀。硫酸铵研磨成粉末,4℃冷却备用。量取 50 mL 蛋白粗提液在离心管中,先加入硫酸铵使硫酸铵饱和度为 40%,充分溶解后 4℃静置 1 h,之后在 5 000 r/min、4℃离心 30 min,然后弃去沉淀,收集上清液备用;上清液中再加入适量硫酸铵粉末,使硫酸铵饱和度达 80%,同上操作,得沉淀。
(5) 透析:沉淀分别用少量 TBS(0.01 mol/L、pH 8.0)

溶解,置于透析袋(截留分子量 8 kDa)中,用相同的 TBS 4℃透析,BaCl₂ 检测至无硫酸铵为止。透析液置于冷冻干燥机中冻干即为坚果蛋白粗提物,4℃贮藏备用。
1.3.2 考马斯亮蓝法测蛋白浓度及标准曲线绘制 参照文献[6]。

1.3.3 蛋白质的处理方法

(1) 高温高压处理:取浓度约为 1.0 mg/mL 的 4 种坚果蛋白各 2 mL,置于压力为 102.9 kPa,温度为 121℃的高压锅内处理 20 min,处理时管塞切勿塞得过紧,以免蛋白溶液喷射出来。处理后于冰箱内冷冻保存。
(2) 微波—超声波联合处理:根据前期单因素试验结果,分别取 4 种坚果蛋白溶液在 CW-2000 微波超声联合萃取仪进行如表 1 的正交处理。由于蛋白样品有限,处理时选取 100 mL 的玻璃瓶,清洗时勿使底部铁块沾到水。处理后的蛋白冷冻保存。

表 1 正交试验设计			
Table 1 The design of orthogonal experiment			
条件	A 作用时间/s	B 微波功率/W	C 作用温度/℃
1	180	500	90
2	240	600	105
3	300	700	120

(3) 酶处理:分别取经高温高压和微波超声联合处理后的蛋白溶液各 1 mL,于 37℃ pH 7.8 的条件下用活力单位为 2 000 U,稀释浓度为 0.25%胰蛋白酶处理 5 min,pH 2.0 的条件下用活力单位为 2 800 U,稀释浓度为 0.7 μg/mL 胃蛋白酶处理 5 min,处理后冷冻保存。
1.3.4 免疫印迹方法鉴定过敏原

(1) SDS—PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳配置方案:凝胶配置比例见表 2。
(2) 转膜:① 胶的处理:胶切成适当大小,放于负极缓冲

表 2 凝胶配置比例							
Table 2 The ratio of Gel allocation							mL
凝胶	水	30% Arc/Bis	1.0 mol/L Tris—HCl	1.5 mol/L Tris—HCl	10% SDS	10% AP	TEMED
分离胶	6.68	8.00	0.00	5.00	0.20	0.10	0.01
浓缩胶	6.80	1.70	1.25	0.00	0.10	0.10	0.01

液中平衡 15 min;② 膜的处理:膜 PVDF 切成与胶相同大小,在甲醇中浸泡 15 s 再放于 bufferⅡ中至少 5 min;③ 贴膜顺序:按照阳极、两层滤纸(于 bufferⅠ中浸泡)、1 层滤纸(于 buffer 中浸泡)、PVDF 膜、胶、3 层滤纸(浸泡于负极缓冲液)、负极的顺序叠加;④ 转膜完毕后,用 TBST+5%的脱脂奶粉于 4℃封闭过夜。

(3) 免疫反应:① 将封闭过夜的 PVDF 膜用 PBS 清洗 5 次,每次 10 min。洗完后用 TBST 洗膜 5 次,每次 10 min;② 将膜置于过敏者血清中,按照 1 : 2 000 的比例用 TBST 稀释,于 37℃温育 1 h,然后弃一抗,用 TBST 洗膜 5 次,每次 10 min;③ 洗膜后,将膜置于 1 : 5 000 稀释的二抗中温育 1 h,震荡。然后用 TBST 洗膜 5 次,每次 10 min;④ ECL

显色;稳定剂与增强型发光剂按 1 : 1 混合,均匀滴到膜上,显色 1 min。

1.3.5 数据统计及图形分析 用 Excel 2003 统计分析所有数据,计算误差并制图。

2 结果与分析

2.1 蛋白质标准曲线的绘制

采用考马斯亮蓝法配制标准蛋白后测得的标准蛋白曲线见图 1。

由图 1 可知,蛋白质含量的标准曲线方程为 $y = 0.533\ 8x + 0.014\ 4$, $R^2 = 0.997\ 4$,方程呈线性相关。

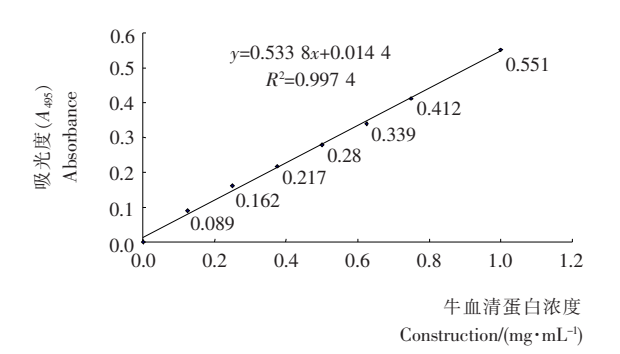


图 1 蛋白质标准曲线

Figure 1 The standard curves of BCA

2.2 蛋白得率测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法测定各坚果蛋白含量,根据标准曲线方程,计算出蛋白得率(样品平行测定 3 组,取平均值),结果见图 2。

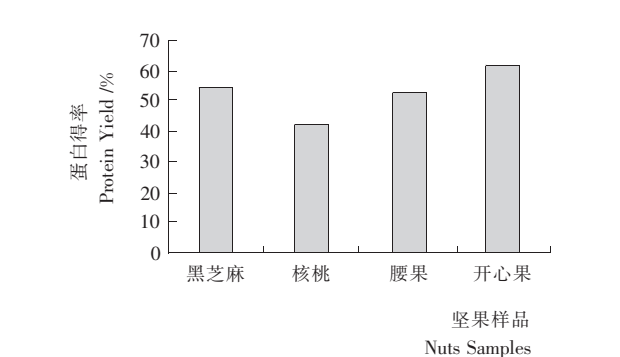


图 2 蛋白得率

Figure 2 Protein yield of the nuts

由图 2 可知,蛋白质得率效果最高的是开心果样品,提取得率最低的是核桃样品,蛋白得率为 42.1%,综合各坚果的特性,本提取方法对 4 种坚果样品均有较好的提取效果。

2.3 超声波—微波正交处理结果

选取腰果蛋白进行超声波—微波联合处理正交试验,并测定处理后的蛋白含量,见表 3。

表 3 腰果蛋白超声波—微波正交处理结果

Table 3 The orthogonal processing results of ultrasonic - microwave on Cashew protein

试验号	A 时间	B 功率	C 温度	D 空列	蛋白质含量/ (mg · mL ⁻¹)
1	1	1	1	1	0.784 2
2	1	2	2	2	0.792 1
3	1	3	3	3	0.756 3
4	2	1	2	3	0.645 8
5	2	2	3	1	0.721 4
6	2	3	1	2	0.685 4
7	3	1	3	2	0.773 1
8	3	2	1	3	0.662 1
9	3	3	2	1	0.705 3
k_1	0.777 5	0.734 4	0.710 6	0.737 0	
k_2	0.684 2	0.725 2	0.714 4	0.750 2	
k_3	0.713 5	0.715 7	0.750 3	0.688 1	
R	0.093 3	0.018 7	0.039 7	0.062 1	

由表 3 可知:各试验因素主次顺序为: $B > C > A$,最优工艺组合为 $B_3C_1A_2$,即 240 s、90 ℃、700 W。同时,通过对各影响因素与空列组 R 值的比较,发现 B、C 两因素的 R 值低于空列组,说明微波处理中选择合适的温度和功率对脱敏效果有较大的影响,而因素 A 的 R 值高于空列组,说明微波处理的时间对脱敏效果影响不明显。对脱敏效果有影响的其他因素如压力、超声波频率或样品的破碎程度等还没有进行分析,对此,课题组还将在后期进一步增加正交试验的影响因素,并结合免疫印迹及 SDS—PAGE 电泳加以分析验证。

2.4 坚果过敏蛋白分离纯化 SDS—PAGE 电泳分析和蛋白粗提液免疫印迹结果

取 3 种坚果蛋白分别用上样缓冲液稀释到 1 mg/mL 后上样,进行电泳,结果见图 4。采用对坚果类食品过敏者阳性混合血清为一抗,HRP 标记山羊抗人 IgE 抗体为二抗,ECL 显色法进行显色对 3 种坚果蛋白的过敏原进行了免疫印迹分析,在暗室中根据结果调整曝光时间以得到最佳结果,见图 3。

由图 3 可知,各坚果样品都含有多种蛋白成分。最富集的各样品条带分别为腰果 23 kU 和 13 kU、杏仁 15 kU 和 25 kU、核桃 13 kU 和 24 kU。由免疫印迹图可以看出,每种坚果蛋白都能使阳性血清产生致敏性,腰果有两个过敏条带,在 32 kU 和 42 kU 附近,42 kU 附近的条带为主要过敏原。核桃只有一个过敏条带,在 35 kU 附近。杏仁也只有一个过敏条带,在 42 kU 附近。

2.5 物理法结合酶法处理后蛋白的免疫印迹结果对比分析

由图 4 可知,坚果的过敏原主要是分子量在 0.7 ~

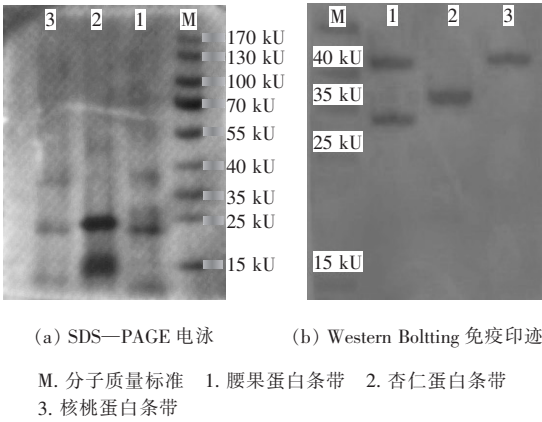


图 3 腰果、杏仁、核桃粗提液蛋白 SDS—PAGE 结果
坚果提取过敏原蛋白免疫印迹结果

Figure 3 Result of SDS—PAGE testwestern-blotting test
and on the protein of nuts

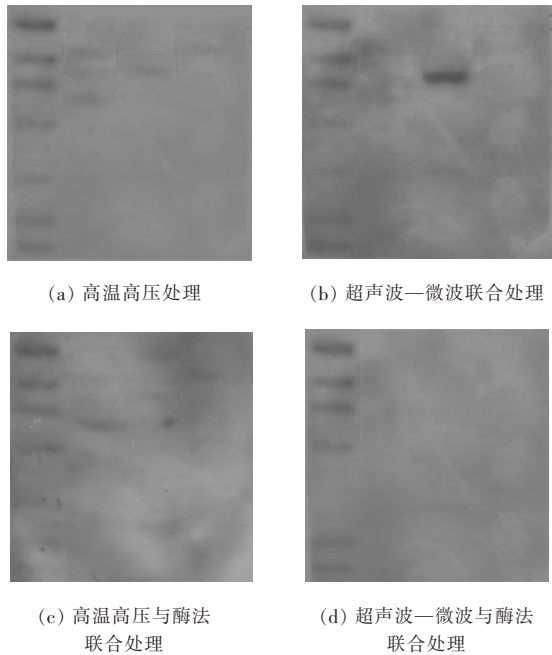


图 4 物理法及结合酶法处理对坚果过敏性的影响
Figure 4 The effect on the treatment of physical method
and combined with enzyme about nut allergic

100 kU 的高度糖基化蛋白质，它们分别属于不同的蛋白质家族。其中 Ara h1、Ara h2 和 Ara h3 是主要的致敏蛋白，90% 的病人血清都能识别他们。Ara h1 具有热稳定性强、耐酶解、不易消化等特性。超声波—微波联合处理能使这些肽键的作用力弱化，空间构象发生改变，致敏抗原性降低。高温高压与酶法联合处理，该方法几乎能完全脱除坚果类过敏原蛋白的致敏性，但对腰果的致敏蛋白脱除效果不彻底。蛋白酶可通过引起 Ara h1 和 Ara h2 的聚合反应来降低坚果蛋白的致敏性。由于坚果过敏蛋白 Ara h1、Ara h2、Ara h3 中抗原决定簇多含有丝氨酸，而蛋白酶能使丝氨酸连键断裂，

使其抗原性降低。

3 结论

(1) 本研究结果表明超声波—微波协同处理结合特殊蛋白酶能够使坚果过敏蛋白变性失活，在作用温度为 90 ℃、处理时间 240 s、微波功率 700 W 结合 0.25% 胰蛋白酶处理 5 min 能使其致敏性几乎完全脱除，是脱除坚果过敏原的有效方法。

(2) 超声波—微波结合蛋白酶处理能够脱除坚果过敏原，使结合肽键的作用力弱化，空间构象发生改变，致敏抗原性降低，比热力脱除过敏原效果更好，更加节约成本。

(3) 本研究的不足之处是没有对失去致敏活性的蛋白结构及营养成分进行分析，后期需要继续研究。

参考文献

- 1 Merima Bublin, Heimo Breiteneder. Cross-reactivity of peanut allergens[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2014, 14(1): 426~453.
- 2 张爱琳, 王昌禄, 胡云峰, 等. 坚果类过敏原的分离及免疫印迹分析[J]. 现代食品科技, 2014, 30(3): 99~102.
- 3 李生平. 银杏种子萌发过程中贮藏物质代谢机理的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- 4 向钱, 李宁. 食品致敏性研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2006, 33(6): 376~380.
- 5 Joseph P, Strain G, Ebel F. Application regarding ginkgo biloba [J]. Journal of the American Dietetic Association, 2007, 107(9): 1 492~1 492.
- 6 Björn M Hausen. The sensitizing capacity of ginkgolic acids in guinea pigs[J]. American Journal of Contact Dermatitis, 1998, 9 (3): 146~148.
- 7 李欣, 高金燕, 陈红兵. 水牛奶中 β -乳球蛋白过敏原表位定位的初步研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 360~363.
- 8 杜若源, 谢晶, 王婷, 等. 超声波辅助提取银杏叶总黄酮的工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 167~170
- 9 De Luis Ruth, Mata Luis, Estopan Gloria. Evaluation of indirect competitive and double antibody sandwich ELISA tests to determine-lactoglobulin and ovomucoid in model processed foods [J]. Food and Agricultural Immunilgy, 2008(19): 339~350.
- 10 Hamid Reza Nouri, Danial Afsharzadeh, Abdolreza Varasteh. Diagnosis of Chenopodium album allergy with a cocktail of recombinant allergens as a tool for component-resolved diagnosis [J]. Mol Biol Rep, 2012(39): 3 169~3 178.