

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.04.004

基于美拉德反应的鳕鱼过敏蛋白消减技术研究

Study on subtractive technology of allergic protein in cod

周丹 郑建仙 邓雯婷

ZHOU Dan ZHENG Jian-xian DENG Wen-ting

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510640)

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

摘要:以小清蛋白粗提物为试验对象,利用美拉德反应,研究不同还原糖(葡萄糖、木糖、果糖)、热处理温度(60, 85, 100, 121, 170 °C)以及加工方式(注射加工、腌制加工)对脱除小清蛋白效果的影响。结果表明:当还原糖种类为木糖,热处理温度为100 °C,注射加工条件下,美拉德反应产物中小清蛋白含量可降低80%,产物呈棕黄色且具有酱香味,将该试验条件运用于鳕鱼鱼干的生产工艺中,可得到小清蛋白含量更低的鳕鱼产品。

关键词:鳕鱼;小清蛋白;美拉德反应;低致敏性;过敏原;糖基化反应

Abstract: The effects of different reducing sugars, heat treatment temperatures, and processing methods on the removal of parvalbumin from the crud extrarts were studied by using Maillard reaction. The results showed that the content of parvalbumin in Maillard reaction products (MRPs) was significantly reduced when injecting the xylose solution into the fish at 100 °C. Moreover, the MRPs had brownish yellow color and sauce flavor. Applying the experimental conditions to the production process of cod dried fish, a cod product with a lower parvalbumin content could be obtained.

Keywords: cod; parvalbumin; Maillard reaction; hypoallergenic; allergen; glycosylation

鳕鱼是常见的可食用海水鱼类之一,其鱼肉雪白,肉质嫩滑且营养丰富^[1]。研究^[2-3]表明,疑似食物过敏儿童患者鳕鱼IgG抗体检测阳性率仅次于牛奶和鸡蛋,食物过敏患者鳕鱼IgG抗体检测阳性率仅次于蟹、虾和鸡蛋。鱼类过敏会引发不同程度的反应,如口腔过敏、腹痛、腹泻、呕吐、过敏性休克等症状^[4]。鳕鱼的主要过敏

原为小清蛋白(PV),其分子量为10~12 kDa,稳定性极强^[5-6]。

目前,食品过敏原消除技术主要有热处理^[7]、蛋白酶水解^[8]、超高压^[9]等。Sletten等^[10]利用腌制、烟熏等化学处理方法,降低了鱼过敏原的IgE结合能力,但会产生具有IgE结合能力的新蛋白和亚硝胺等有害物质。李振兴等^[11]研究表明,经热蒸加工后,大菱鲆鱼蛋白质与IgE结合能力减弱,但会出现一个新的8 kDa的蛋白与IgE结合。董晓颖等^[12]发现用风味蛋白酶和中性蛋白酶处理后的虾过敏原其致敏性几乎消失,但会破坏水产品性状,产品应用面窄,难以大范围推广。陆海霞等^[13]发现超高压可以使鲑鱼肌动蛋白、肌球蛋白重链等聚集交联,但这种交联也有可能暴露IgE结合位点;此外,超高压技术只能改变蛋白质空间结构,不能改变一级结构,而且运行成本昂贵。

美拉德反应通过糖基修饰过敏原,改变或破坏过敏原的抗原表位,进而降低其致敏性^[14-15]。李庆丽等^[16]发现麦芽糖可使虾过敏原的免疫活性降低60%。李铮^[17]用还原糖和纯化后草鱼小清蛋白反应,发现小清蛋白致敏活性也显著降低。美拉德反应是少数可以在生产中实现的海水鱼过敏原消除技术,目前尚未见利用美拉德反应消除鳕鱼中过敏原的报道。美拉德反应会产生大量成色物质,使产品感官变差^[18]。

试验拟以鳕鱼为试验对象,探究不同还原糖、热处理温度以及加工方式对脱除小清蛋白效果的影响,并应用于鳕鱼的低致敏性加工工艺中,以期对低致敏性的、健康的海水鱼食品的工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

鳕鱼:市售;

Maker:无锡浮云生物技术有限公司;

作者简介:周丹,女,华南理工大学在读硕士研究生。

通信作者:郑建仙(1966—),男,华南理工大学教授,博士。

E-mail: fedwtmeng@mail.scut.edu.cn

收稿日期:2019-09-25

明胶:西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙烯酰胺:国药集团化学试剂有限公司;

IgG 抗蛙小清蛋白单克隆抗体(PARV-19)、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体:自制;

其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器与设备

冻干机:GIPP-5000FDA 型,美国 Labconco 公司;

电泳仪:DYY-6C 型,北京市六一仪器厂;

分光光度计:UV-2100 型,上海尤尼柯仪器有限公司;

凝胶成像仪:Gel Doc XR+型,南京溯远基因科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小清蛋白(PV)的热提取 称取 20 g 鳕鱼于烧杯中,加入 180 mL PBS 溶液,电动搅拌 15 min,100 °C 水浴 10 min,冷却,离心,上清液倒于培养皿,用扎有一定密度小孔的保鲜膜封住,冷冻干燥 12~24 h,得小清蛋白粗提取物,从培养皿内刮取备用^[19-20]。

1.2.2 还原糖种类优化 参考蔡秋凤等^[19]的方法修改如下:准确称量质量比为 1:1:1 的葡萄糖、木糖和果糖溶解于 2 mL 水中(还原糖质量为 12.5 mg)备用。准确称取 50 mg 热提粗蛋白,加入 2 mL 水溶解,加糖溶液,100 °C 水浴 30 min,得美拉德反应产物(MRPs),测定其 PV 含量。

1.2.3 美拉德反应温度优化 参考杨汝晴^[20]的研究方法修改如下:准确称取 1.2.2 中消除效果最好的还原糖 12.5 mg 溶于 1 mL 温水中,备用;准确称取蛋白粗提取物 50 mg 溶解,完全溶解后加糖溶液,控制样品体积为 4 mL。于 60,85,100,121,170 °C 下恒温反应,得不同反应条件下的 MRPs,测定其 PV 含量。

1.2.4 还原糖加入方式优化

(1) 注射法:取长、宽、高分别约为 5,2,3 cm 块状鱼肉 20 g,取 1.2.2 中消除效果最好的还原糖 0.5 g 配成 1 mL 的糖溶液,用微量注射器在鱼肉的长、宽表面上每 3 cm³ 注射一次,放置 2 h,使用最优温度恒温反应 30 min,得美拉德反应产物。参照 1.2.1 提取小清蛋白,并测定其含量。

(2) 腌制法:操作步骤同(1),将还原糖的添加方式由注射改成“直接添加,腌制 2 h”。

1.2.5 美拉德反应消除小清蛋白的应用

(1) 改良工艺:鱼去鳞、去内脏,洗净,晾干。取鱼肉 500 g,加入花椒 50 g、辣椒粉 65 g、酱油 50 g、盐 300 g。取 1.2.2 筛选的还原糖 2.5 g 配成溶液,使用最优加工方式加入,腌制 6 h 后洗净,最优温度处理 2 d,即得鱼干,提取小鱼干的小清蛋白,并测定其含量。

(2) 传统工艺:不加入糖溶液直接温度处理,其他操作步骤同 1.2.5(1)。

1.2.6 PV 含量分析

(1) SDS-PAGE 电泳:对 MRPs 进行电泳,通过 Image J 软件分析电泳条带,可得小清蛋白的相对含量。

(2) ELISA 酶联反应:用标准小清蛋白进行酶联反应,显色后测定吸光度,绘图得标准曲线。对美拉德反应产物进行 ELISA 酶联反应,显色后测定吸光度,平行试验数据代入标准曲线,得 MRPs 中小清蛋白绝对含量^[21-22]。

(3) 美拉德反应程度:取 MRPs 稀释 5 倍,测定 420 nm 处吸光度。

(4) 感官评价:由 10 人组成的感官评定小组,按表 1 对 MRPs 的色泽、气味进行评分。

表 1 感官评定对应指标参考词汇

Table 1 Sensory evaluation related indicators reference vocabulary

| 指标 | 标准 | 评分 |
|----|------|----|
| 色泽 | 浅黄 | 10 |
| | 黄色 | 20 |
| | 棕黄 | 50 |
| | 棕色 | 20 |
| | 红褐色 | 10 |
| 气味 | 腻干甜味 | 10 |
| | 海鲜味 | 20 |
| | 酱香味 | 30 |
| | 烤肉味 | 20 |
| | 焦味 | 10 |

1.3 数据处理

所有试验平行测定 3 次,采用 Excel 2016 软件进行数据处理,结果以平均值±标准偏差表示。使用 SPSS 22.0 软件进行显著性分析。利用 Image J 软件进行图像处理分析。

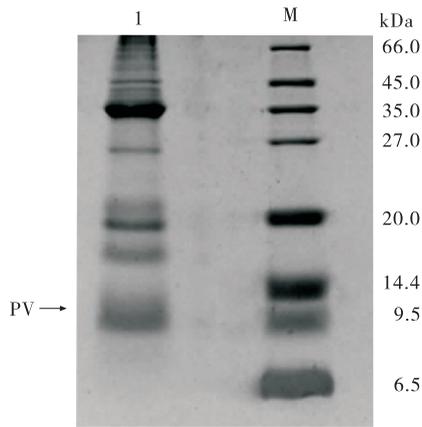
2 结果与分析

2.1 小清蛋白粗提物的 SDS-PAGE 电泳

由图 1 可知,小清蛋白分子量为 10~12 kDa,其在粗提取物中的相对含量为 29.71%。小清蛋白热稳定较好,热提取对其性质无影响,但会使部分其他蛋白质变性。

2.2 还原糖种类筛选

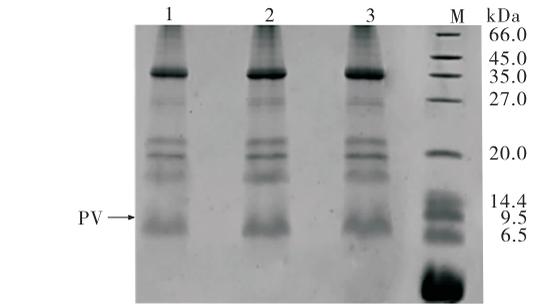
2.2.1 小清蛋白相对含量 由图 2 可知,各泳道内的蛋白质种类较图 1 的少,除小清蛋白质外,其他蛋白质种类依然较多,且小清蛋白条带并未消失,热提取并不能完全消除小清蛋白,但能使部分其他蛋白变性。木糖、葡萄



1. 小清蛋白粗提物 M. 标准蛋白 Maker
图 1 小清蛋白粗提物电泳图

Figure 1 Electrophoresis of parvalbumin crude extract
糖、果糖美拉德反应产物中的小清蛋白相对含量分别为 19.6%, 25.5%, 21.3%, 进一步表明相对应的还原糖对小清蛋白的消除能力大小为木糖>果糖>葡萄糖。

2.2.2 小清蛋白绝对含量及其他指标 由表 2 可知,美拉德反应越剧烈,其反应产物颜色越深,吸光度值越大;



1. 木糖与小清蛋白 MRPs 2. 葡萄糖与小清蛋白 MRPs 3. 果糖与小清蛋白 MRPs M. 标准蛋白 Maker
图 2 还原糖与小清蛋白反应产物电泳图

Figure 2 Electrophoresis of MRPs of reducing sugars and parvalbumin

还原糖的反应程度次序为木糖>果糖>葡萄糖,对应的 MRPs 感官评分为 60, 30, 30。轻度美拉德反应会产生适量成色物质及浓郁芳香,木糖与小清蛋白反应强度最高,其 MRPs 棕黄,感官评分最高。木糖、葡萄糖、果糖 MRPs 小清蛋白绝对含量分别为 263, 345, 289 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 进一步表明相对应的糖类的消除效果为木糖>果糖>葡萄糖。

表 2 还原糖与小清蛋白反应的各项指标[†]

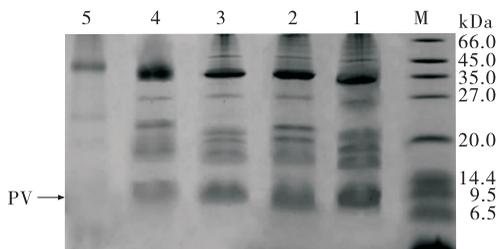
Table 2 Various indicators of MRPs of reducing sugars and parvalbumin

| 种类 | 吸光度 | 感官评定 | | | 小清蛋白 | |
|-----|---------------------|------|----|----|--|--------------------|
| | | 色泽 | 气味 | 总分 | 绝对含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ | 相对含量/% |
| 木糖 | 0.833 ± 0.002^a | 50 | 10 | 60 | 263 ± 6^a | 19.62 ± 0.01^a |
| 葡萄糖 | 0.611 ± 0.003^b | 20 | 10 | 30 | 345 ± 5^b | 25.53 ± 0.01^b |
| 果糖 | 0.433 ± 0.005^c | 10 | 10 | 20 | 289 ± 1^c | 21.37 ± 0.02^c |

[†] 同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 温度对消除小清蛋白的影响

2.3.1 小清蛋白相对含量 由图 3 可知, 60, 85, 100, 121, 170 $^{\circ}\text{C}$ 美拉德反应产物中小清蛋白相对含量分别为 22.2%, 21.4%, 19.1%, 16.5%, 11.2%。小清蛋白含量随温度的升高逐渐降低, 且 100 $^{\circ}\text{C}$ 以下小清蛋白含量的减



1. 60 $^{\circ}\text{C}$ 2. 85 $^{\circ}\text{C}$ 3. 100 $^{\circ}\text{C}$ 4. 121 $^{\circ}\text{C}$ 5. 170 $^{\circ}\text{C}$ M. 标准蛋白质 Maker
图 3 不同温度下木糖与小清蛋白美拉德反应产物电泳图

Figure 3 Electrophoresis of MRPs of xylose and parvalbumin at different temperatures

少幅度小于 100 $^{\circ}\text{C}$ 以上的, 说明 100 $^{\circ}\text{C}$ 以下进行的美拉德反应更温和、缓慢。

2.3.2 小清蛋白绝对含量及其他指标 由表 3 可知, 随着温度的升高, MRPs 吸光度逐渐升高, 美拉德反应越剧烈。60, 85, 100, 121, 170 $^{\circ}\text{C}$ 下的美拉德反应产物感官评分分别为 10, 10, 60, 40, 30。随着温度的升高, 产物颜色呈现比较诱人的黄色, 气味转变为肉酱味, 但温度升高至一定程度后, MRPs 颜色偏棕色, 气味开始变焦, 当温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ 时感官评分最高。MRPs 中小清蛋白的绝对含量分别为 302, 291, 223, 185, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 说明随着温度的增加, 小清蛋白残余量减少。综上, 当温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ 时, 木糖与小清蛋白的反应产物感官较好且小清蛋白含量较低。

2.4 加工方式对消除小清蛋白的影响

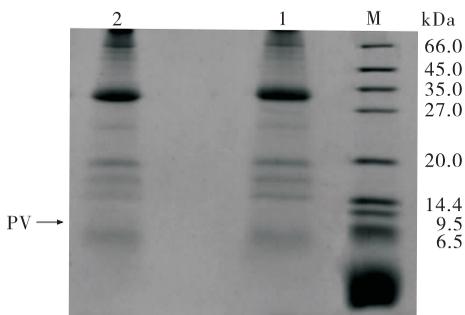
2.4.1 小清蛋白相对含量 由图 4 可知, 注射加工和腌制加工的 MRPs 中小清蛋白相对含量分别为 9.9%, 16.2%, 说明注射加工方式能使木糖和鱼肉反应得更加充

表 3 不同温度下木糖与血清蛋白美拉德反应产物的各项指标[†]

Table 3 Various indicators of MRPs of xylose and parvalbumin at different temperatures

| 温度/°C | 吸光度 | 感官评定 | | | 血清蛋白 | |
|-------|--------------------------|------|----|----|---|-------------------------|
| | | 色泽 | 气味 | 总分 | 绝对含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 相对含量/% |
| 60 | 0.000±0.001 ^a | 0 | 10 | 10 | 302±2 ^a | 22.26±0.01 ^a |
| 85 | 0.116±0.002 ^b | 0 | 10 | 10 | 291±5 ^b | 21.43±0.01 ^b |
| 100 | 0.827±0.003 ^c | 30 | 30 | 60 | 223±3 ^c | 19.11±0.04 ^c |
| 121 | 1.121±0.001 ^d | 20 | 20 | 40 | 185±4 ^d | 16.58±0.03 ^d |
| 170 | 1.325±0.003 ^e | 20 | 10 | 30 | 50±4 ^e | 11.21±0.06 ^e |

† 同列字母不同表示差异显著(P<0.05)。



1. 腌制加工 2. 注射加工 M. 标准蛋白质 Maker
图 4 不同加工方式下木糖与鱼肉美拉德反应产物电泳图

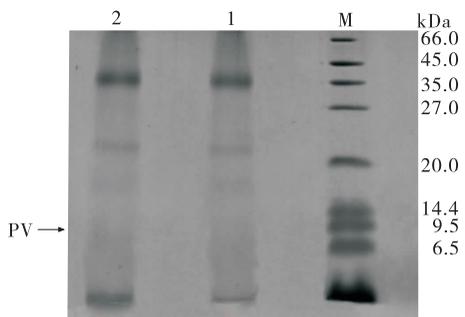
Figure 4 Electrophoresis of MRPs of xylose and fish under different processing methods

表 4 不同加工方式下木糖与鱼肉美拉德反应产物的各项指标[†]

Table 4 Various indicators of MRPs of xylose and fish under different processing methods

| 方式 | 吸光度 | 感官评定 | | | 血清蛋白 | |
|------|--------------------------|------|----|----|---|-------------------------|
| | | 色泽 | 气味 | 总分 | 绝对含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 相对含量/% |
| 注射加工 | 0.402±0.002 ^a | 20 | 20 | 40 | 134±4 ^a | 9.94±0.02 ^a |
| 腌制加工 | 0.539±0.005 ^b | 20 | 20 | 40 | 212±5 ^b | 16.20±0.03 ^b |

† 同列字母不同表示差异显著(P<0.05)。



1. 传统工艺 2. 改进工艺 M. 标准蛋白质 Maker
图 5 不同工艺下木糖与鱼肉美拉德反应产物电泳图

Figure 5 Electrophoresis of MRPs of xylose and fish using different techniques

分。注射处理的小清蛋白残余量低于腌制处理的,其MRPs血清蛋白的电泳条带更淡。

2.4.2 血清蛋白绝对含量及其他指标 由表 4 可知,注射加工的血清蛋白与木糖反应程度低于腌制加工的,两种反应产物的感官评分均为 40;经注射加工和腌制加工的反应产物中小清蛋白残余量分别为 134,212 $\mu\text{g}/\text{mL}$,说明注射加工的血清蛋白残余量明显少于腌制加工的。

2.5 血清蛋白消除技术对鱼干致敏性的影响

2.5.1 血清蛋白相对含量 由图 5 可知,泳道 1,2 的条带数目无明显差别,说明两种工艺条件下小鱼干的蛋白质类别均较少。传统工艺和改进工艺的小鱼干血清蛋白相对含量分别为 6.08%,5.78%,说明传统工艺的小鱼干中小清蛋白较少,但经改良工艺的血清蛋白残余量低于传统工艺的。

2.5.2 血清蛋白绝对含量及其他指标 由表 5 可知,改良工艺的美拉德反应程度低于传统工艺的,二者的感官评分无明显区别。传统工艺和改良工艺下木糖与血清蛋白 MRPs 中小清蛋白的绝对含量分别为 81,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$,说明改良工艺的小鱼干蛋白提取物中的血清蛋白残余量少于传统工艺的。

3 结论

利用美拉德反应,探究了还原糖种类、反应温度、还原糖添加方式等因素对消除血清蛋白效果的影响。结果表明,还原糖对血清蛋白的消除效果为木糖>果糖>葡萄糖;随着反应温度的升高,感官评分先增加后降低,血清蛋白残余量越来越少;注射加入还原糖的血清蛋白消除效果优于腌制的。低致敏性、健康的海水鱼食品生产

表5 不同工艺下木糖与鱼肉美拉德反应的各项指标[†]

Table 5 Various indicators of MRPs of xylose and fish MRPs using different techniques

| 工艺 | 吸光度 | 感官评定 | | | 小清蛋白 | |
|------|--------------------------------|------|----|----|---|------------------------------|
| | | 色泽 | 气味 | 总分 | 绝对含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 相对含量/% |
| 传统工艺 | 1.111 \pm 0.002 ^a | 50 | 20 | 70 | 81 \pm 4 ^a | 6.08 \pm 0.01 ^a |
| 改进工艺 | 1.301 \pm 0.001 ^b | 50 | 20 | 70 | 75 \pm 3 ^b | 5.78 \pm 0.02 ^b |

[†] 同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

的最优工艺参数为使用注射加工方法,于 100 °C 时加入木糖,将该条件应用于鳕鱼鱼干的生产工艺中,可得到低致敏性产品。后续可探讨其他海水鱼类的脱敏技术。

参考文献

- [1] 尚可. 鳕鱼的真相[J]. 海洋世界, 2014(1): 38-43.
- [2] 张雪, 潘家华, 周浩泉, 等. 331 例儿童食物不耐受检测结果分析[J]. 安徽医学, 2014, 35(6): 745-748.
- [3] 卢玲玲, 郑国军, 董璐璐, 等. 食物过敏性疾病中血清特异性 IgG 与 IgE 抗体检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(4): 519-522.
- [4] 刘树兵, 李允瑜, 张敬中, 等. 抗结核治疗中食用鱼类引起过敏症状 28 例综合报告[J]. 中国防痨通讯, 1985(1): 30-31.
- [5] HOLZHAUSER T, WANGORSCH A, VIETHS S. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes[J]. European Food Research and Technology, 2000, 211(5): 360-365.
- [6] 漆定坤, 曹劲松, 唐传核. 食品脱敏技术研究的新进展[J]. 食品与发酵工业, 2006(7): 79-82.
- [7] SU Meng-na, VENKATACHALAM M, TEUBER S S, et al. Impact of gamma-irradiation and thermal processing on the antigenicity of almond, cashew nut and walnut proteins[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84(10): 1 119-1 125.
- [8] 程伟, 陈红兵, 高金燕. 酶改性对食物蛋白质过敏原性的影响[J]. 食品科学, 2010(23): 398-401.
- [9] 郭颖希, 王满生, 成军虎, 等. 非热加工技术消减食物过敏原研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 219-223, 230.
- [10] SLETTEN G, VAN DO T, LINDVIK H, et al. Effects of industrial processing on the immunogenicity of commonly ingested fish species[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2010, 151(3): 223-236.
- [11] 李振兴, 黄榕芳, 吴玟静, 等. 热蒸加工对大菱鲆过敏原免疫原性的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(4): 279-284.
- [12] 董晓颖, 高美须, 潘家荣, 等. 不同处理方法对虾过敏蛋白分子量及抗原性的影响[J]. 核农学报, 2010, 24(3): 548-554.
- [13] 陆海霞, 毛逸涛, 李学鹏, 等. 超高压技术及其在水产品保鲜杀菌中的应用[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(6): 111-113.
- [14] 史云凤, 陈沁. 美拉德反应对花生过敏原 Arah 1 致敏性的影响及机理研究[C]//上海市植物生理与植物分子生物学学会. 第七届长三角植物科学研讨会暨青年学术报告会摘要集. 上海: 上海市植物生理与植物分子生物学学会, 2018: 77.
- [15] 赵勇娟. 美拉德反应对鱼类小清蛋白免疫学性质及结构的影响[D]. 厦门: 集美大学, 2016: 38-45.
- [16] 李庆丽, 李振兴, 林洪, 等. 美拉德反应中麦芽糖、葡萄糖对虾过敏原活性影响的研究[J]. 食品工业科技, 2009(1): 79-81, 84.
- [17] 李铮. 草鱼主要过敏原小清蛋白亚型纯化鉴定及加工对过敏原影响的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014: 72.
- [18] 杨调调, 何志勇, 秦昉, 等. 美拉德反应对产品风味品质的影响及其衍生危害物研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(3): 854-861.
- [19] 蔡秋风, 刘光明, 王瑞芳, 等. 鱼类主要过敏原小清蛋白的检测[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(8): 716-720, 723.
- [20] 杨汝晴. 鱼类小清蛋白分离纯化、性质分析及磷酸化改性[D]. 厦门: 集美大学, 2018: 13-14.
- [21] 李晓辉. 水产品主要过敏原快速定量检测及过敏原性研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018: 35-36.
- [22] 孙登瑶. 淡水鱼过敏原 PV 的消减研究及低敏性食品的开发[D]. 上海: 上海师范大学, 2018: 32-34.