

腰果寡肽的制备及体外抗过敏效应

Preparation and anti-allergic effect inhibition in vitro of cashew oligopeptide

陈笛 姜珂 周鑫 曹献英

CHEN Di JIANG Ke ZHOU Xin CAO Xian-ying

(海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228)

(School of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

摘要:以水解度(DH)和多肽得率(TCA-YSP)为指标,筛选碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和复合蛋白酶等,采用超滤、Sephadex-G15、Sephadex-G50和半制备液相色谱等对腰果粗寡肽进行分离纯化。通过分析型液相色谱和红外光谱鉴定腰果寡肽的纯度和结构。结果显示:碱性蛋白酶得到的酶解液DH和TCA-YSP为 $(17.06 \pm 1.52)\%$ 、 $(26.28 \pm 0.13)\%$,均明显高于其他蛋白酶的,为最适蛋白酶;经分离纯化得到纯度高的腰果寡肽,其氨基酸序列为Ile-Ile-Ala-Ile-Pro-Ala-Gly-Val-Ala-His(IIAIPAGVAH);肥大细胞脱颗粒程度测定结果表明,200 $\mu\text{g/mL}$ 的腰果寡肽具有显著抑制肥大细胞组胺和 β -氨基己糖苷酶(β -HEX)释放及磷脂酰丝氨酸外翻的作用,显示腰果寡肽具有优异的抗过敏效应。

关键词:腰果;寡肽;酶解;分离纯化;结构鉴定;抗过敏效应

Abstract: The proteases such as alkaline protease, neutral protease, papain, bromelain, and complex protease were screened using the degree of hydrolysis (DH) and peptide yield (TCA-YSP) as indicators. The crude oligopeptide of cashew nut was isolated by ultrafiltration, Sephadex-G15, Sephadex-G50 and semi-preparative liquid chromatography. The purity and structure of cashew nut oligopeptide were identified through analytical liquid chromatography and infrared spectra. The results showed that DH and TCA-YSP were $(17.06 \pm 1.52)\%$ and $(26.28 \pm 0.13)\%$ respectively, which were significantly higher than those of other proteases. Therefore, alkaline protease was the most suitable protease. The sequence of cashew nut oligopeptide was Ile-Ile-

Ala-Pro-Ala-Val-Ala-His (IIAIPAGVAH). The result of anti-allergic effect of cashew nut oligopeptide showed cashew oligopeptide at 200 $\mu\text{g/mL}$ significantly inhibited the release of histamine, the expression of β -aminohexose glycosylase (β -HEX), and phosphatidylserine eversion in mast cell, indicating that cashew oligopeptide extracted from cashew nut owned outstanding anti-allergic effect.

Keywords: cashew; oligopeptide; enzymolysis; isolation and purification; structural identification; anti-allergic effect

IgE介导变态反应又称过敏反应,是由包括某些食物、灰尘、螨虫和花粉等许多过敏原引发的炎症反应。这些过敏原与肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面的IgE抗体特异性结合,从而激活肥大细胞或嗜碱性粒细胞,使其释放具有生物学活性的介质,如颗粒相关介质、细胞因子和炎性脂质,导致过敏性炎症反应^[1-2]。IgE介导变态反应包括湿疹、过敏性鼻炎或特应性皮炎等,严重情况下会造成虚脱和休克,甚至危及生命^[3]。目前常采用的治疗方法是药物控制,抗过敏药物虽然起效快,但副作用大,容易产生耐药性。开发具有抗过敏效应的保健食品,弥补传统药物疗法不足显得尤其重要^[4]。抗过敏保健食品主要来源植物提取物,其有效成分包括黄酮类、萜类、醌类和生物碱等,近几年,许多研究^[5-6]还报道益生菌、海藻多糖和食源性寡肽等也具有抗过敏效应。

作为一种热带特色食物,腰果因其富含脂质(45%~50%)和蛋白质(21%)的高营养品质而被重视。目前关于腰果的研究主要集中在腰果酚和腰果油^[7],对腰果蛋白研究主要停留在研究其结构特性,未见有探究腰果寡肽的功能作用的报道。腰果蛋白是具有高营养价值的优质蛋白质,是获得功能性肽的潜在资源^[8]。纯化鉴定腰果寡肽不仅可以为深度开发腰果资源提供理论数据,还可以延长腰果深加工产业链。试验拟以腰果蛋白为原料,通过酶解法制备腰果粗寡肽,采用葡聚糖凝胶柱

基金项目:海南自然科学基金创新研究团队项目(编号:2017CXTD001)

作者简介:陈笛,女,海南大学在读硕士研究生。

通信作者:曹献英(1962—),女,海南大学教授,博士。

E-mail: cxying_02@163.com

收稿日期:2020-03-16

和 C₁₈ 柱连续分离纯化获得腰果寡肽,探讨其抗过敏效应,以期开发具有抗过敏效应的保健食品提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

腰果蛋白:实验室自制;

P815 小鼠肥大细胞瘤细胞:中国典型培养物保藏中心;

透明质酸酶和透明质酸钠:上海阿拉丁生化有限公司;

anti-DNP-IgE:美国 Sigma 公司;

DNP-BSA:美国 Biosearch 公司;

4-硝基苯-*N*-乙酰- β -氨基葡萄糖苷:上海源叶生物科技有限公司;

组胺试剂盒:长沙达尔锋生物科技有限公司;

其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

半制备型液相:LC-20AP 型,日本岛津公司;

高效液相色谱仪:1260 型,配全波长紫外检测器,美国安捷伦科技公司;

流式细胞仪:CytoFLEX 型,美国贝克曼库尔特生物科技有限公司;

二氧化碳培养箱:MCD-175 型,日本三洋公司;

倒置显微镜:CKX31 型,日本奥林巴斯有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1FD 型,苏净安泰设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 蛋白酶的筛选 根据杨雪等^[9]的酶解法制备腰果粗寡肽。分别用碱性蛋白酶(丝氨酸蛋白酶,pH 10.0, 60 °C)、中性蛋白酶(沙雷肽酶,pH 7.0, 50 °C)、木瓜蛋白酶(pH 7.0, 50 °C)、菠萝蛋白酶(pH 8.0, 55 °C)和复合蛋白酶(pH 7.0, 50 °C)酶解腰果蛋白。水解度(DH)采用甲醛滴定法^[10]检测,多肽得率(TCA-YSP)根据潘进权等^[11]的方法测定。

1.3.2 腰果寡肽的分离纯化 用截留分子量为 10 kDa 和 3 kDa 超滤离心管在 4 °C 条件下离心,分别收集滤过和未滤过溶液,得到 3 种不同分子量范围的腰果粗寡肽。样品经 Sephadex-G15 和 Sephadex-G50 纯化,凝胶填料的玻璃层析柱(1.6 cm × 50 cm),样品用超纯水配制为 100 mg/mL,取 1 mL 加入已平衡的层析柱,检测波长为 220 nm。半制备色谱条件:

① 上样条件:样品用含 0.1% 三氟乙酸的超纯水配制为 100 mg/mL,取 1 mL 加入色谱柱;

② 色谱柱:ODS HYPERSIL 制备柱(Φ 250 mm × 10 mm, 5 μ m);

③ 紫外检测器:检测波长 220 nm;

④ 流动相:A 为含 0.05% TFA 的乙腈,B 为含 0.05% TFA 的超纯水;

⑤ 梯度洗脱:0~15 min, 0%~30% 的流动相 A、15~25 min, 30%~35% 的流动相 A、25~40 min, 35%~40% 的流动相 A。

1.3.3 腰果寡肽纯度和结构鉴定 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定纯度。RP-HPLC 的样品用含 0.1% 三氟乙酸的超纯水溶解,上样浓度为 100 mg/mL, 0.45 μ m 滤膜过滤。色谱柱为 Symmetry C₁₈ 色谱柱(Φ 250 mm × 4.6 mm, 5 μ m),柱温 25 °C,其他色谱条件同 1.3.2。

利用傅里叶变换红外光谱仪对样品定性分析,样品在 500~4 000 cm⁻¹ 范围内进行红外光谱扫描。质谱分析使用 SCIEX 公司的 TripleTOF 5600 液质联用系统进行。肽段样品通过自动进样器吸入后结合至 C₁₈ 捕获柱(5 μ m, 5 mm × 0.3 mm),接着被洗脱至分析柱(75 μ m × 150 mm, 3 μ m 径, 10 nm 孔径)进行分离。利用两个流动相(流动相 A:水+0.1% 甲酸;流动相 B:乙腈+0.1% 甲酸)建立 30 min 的分析梯度(0 min 5% B; 15 min 5%~35% B; 1 min 35%~80% B; 5 min 80% B; 0.1 min 80%~5% B; 8.9 min 5% B)。液相的流速设置为 300 nL/min。质谱 IDA 模式分析时,每个扫描循环中包含一个 MS 全扫描(m/z 范围是 350~1 500,离子累积时间 250 ms),以及随后跟着的 40 个 MS/MS 扫描(m/z 范围是 100~1 500,离子累积时间 50 ms)。MS/MS 采集的条件设置为母离子信号 > 120 cps,电荷数为 +2~+5。离子重复采集的排除时间设置为 18 s。

1.3.4 透明质酸酶抑制率测定 采用 Elson-Morgan 改良法^[12]。

1.3.5 细胞脱颗粒测定

(1) 敏化细胞:调整 P815 细胞密度为 2 × 10⁵ 个/mL,取 48 孔板,每孔加 190 μ L 细胞悬液和 10 μ L 终浓度为 0.5 μ g/mL anti-DNP-IgE,培养箱(37 °C, 5% CO₂)孵育过夜^[13]。

(2) 刺激细胞:次日弃培养液,用 PBS 洗涤敏化后的细胞 3 遍,空白对照组和模型组每孔加 190 μ L Tyrode's 缓冲液,试验组每孔加 190 μ L 溶于 Tyrode's 缓冲液的样品溶液,样品终浓度为 50, 200, 500 μ g/mL,继续培养 1 h。样品孵育 1 h 后,空白对照组加 10 μ L Tyrode's 缓冲液,模型组和试验组加 10 μ L 终浓度为 0.5 μ g/mL DNP-BSA 刺激敏化细胞 1 h,收集细胞上清液于 1.5 mL EP 管中。

(3) 检测 β -氨基己糖苷酶(β -HEX)释放率:参照 Bansod 等^[14]的方法,按式(1)计算 β -HEX 释放率。

$$c = \frac{m_1}{m_1 + m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c —— β -HEX 释放率, %;

m_1 ——上清液中 β -HEX 的 OD 值;

m_2 ——细胞裂解液中 β -HEX 的 OD 值。

(4) 检测上清液中组胺释放量:按 1.3.5(1)和 1.3.5(2)的方法处理细胞,收集上清液,根据组胺试剂盒说明书,检测上清液中组胺的含量。

(5) 磷脂酰丝氨酸外翻测定:收集 2×10^5 个细胞,用 $500 \mu\text{L}$ 结合液重悬,加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温避光孵育 10 min,采用流式细胞仪检测。

1.4 统计学分析

利用 SPSS 22.0 统计分析软件,采用单因素方差分析,比较结果间的差异性($P < 0.05$ 差异显著; $P < 0.01$ 差异极显著),采用 Graphpad Prism7.0 完成绘图。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶的酶解能力比较

如表 1 所示,碱性蛋白酶酶解液的 DH 和 TCA-YSP 明显高于其他蛋白酶,分别为 $(17.06 \pm 1.52)\%$, $(26.28 \pm 0.13)\%$,说明碱性蛋白酶是 5 种蛋白酶中分解效率较高的蛋白酶,此结果与 He 等^[15]的研究结果一致。DH 和 TCA-YSP 与酶切位点和底物溶解性有关,蛋白酶的酶切位点越广泛和底物溶解度越高可获得更高 DH 和 TCA-YSP^[16]。碱性蛋白酶具有众多的酶切位点且腰果蛋白在其最适 pH 范围内溶解度最高,因此,后续研究均选择碱性蛋白酶为水解酶。

表 1 不同酶制备的酶解液水解度(DH)和多肽得率(TCA-YSP)[†]

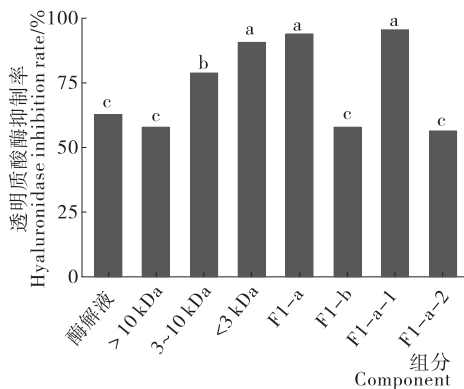
Table 1 Degree of hydrolysis (DH) and TCA-soluble peptide yield (TCA-YSP) of hydrolysates prepared by different enzyme ($n=6$) %

蛋白酶	DH	TCA-YSP
碱性蛋白酶	26.28 ± 0.14^a	17.06 ± 1.5^a
复合蛋白酶	21.76 ± 0.47^c	7.16 ± 0.71^c
中性蛋白酶	23.47 ± 0.47^b	5.29 ± 0.56^d
木瓜蛋白酶	13.18 ± 0.34^c	2.96 ± 0.27^e
菠萝蛋白酶	21.94 ± 0.61^d	9.39 ± 0.65^b

[†] 同列小写字母不同表示不同蛋白酶的 DH 和 TCA-YSP 之间具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 腰果寡肽的分离纯化

由图 1 可知,分子量 $< 3 \text{ kDa}$ 组分的透明质酸酶抑制率显著高于分子量 $> 10 \text{ kDa}$ 和 $3 \sim 10 \text{ kDa}$ 的组分($P < 0.05$),说明具有抗过敏效应的成分主要集中在分子量 $< 3 \text{ kDa}$ 的组分中。F1-a 组分的透明质酸酶抑制率为 $(93.93 \pm 0.38)\%$,显著($P < 0.05$)高于 F1-b 组分,说明 F1 组分中主要是 F1-a 起作用。



字母不同表示不同组分之间具有显著性差异($P < 0.05$)

图 1 各组分的透明质酸酶抑制率

Figure 1 Hyaluronidase inhibition rate of each component

图 2 表示分子量 $< 3 \text{ kDa}$ 的组分经 Sephadex-G15 层析柱脱盐处理得 F1 组分, F1 组分经 Sephadex-G50 层析柱得到两个组分 F1-a 和 F1-b(如图 3 所示)。

从 F1-a 的柱层析分离谱图的峰形和峰强来看, F1-a 组分在分子量 $< 3 \text{ kDa}$ 组分中含量较高,且纯度高于 F1-b

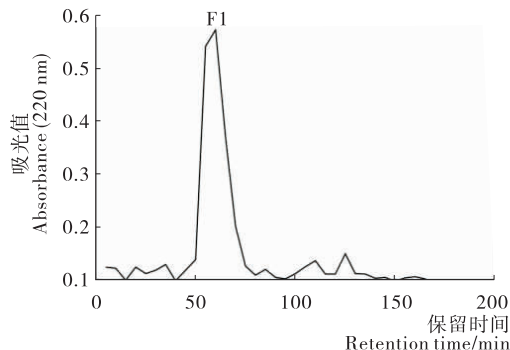


图 2 腰果粗寡肽经 Sephadex G-15 凝胶柱层析分离谱图
Figure 2 Chromatography spectrum of cashew nut crude oligopeptides separated on sephadex G-15 gel column

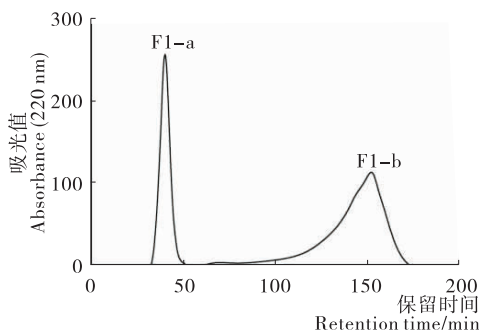


图 3 腰果粗寡肽经 Sephadex G-50 凝胶柱层析分离谱图
Figure 3 Separex G-50 gel column chromatography spectrum of cashew nut crude oligopeptides

组分。因此,后续将 F1-a 组分应用到半制备液相。

F1-a 组分经制备型 C_{18} 柱分离后得到一个组分 F1-a-1 (如图 4 所示)。F1-a-1 峰强较高,说明其在 F1-a 组分含量占比高,且 F1-a-1 组分对透明质酸酶抑制率为 $(95.53 \pm 2.75)\%$,因此,将 F1-a-1 组分用于进一步探究其抗过敏效应及机制。

2.3 腰果寡肽的纯度和结构特性

图 5、6 分别为 F1-a-1 组分的 RP-HPLC 图谱和傅里叶红外光谱图。

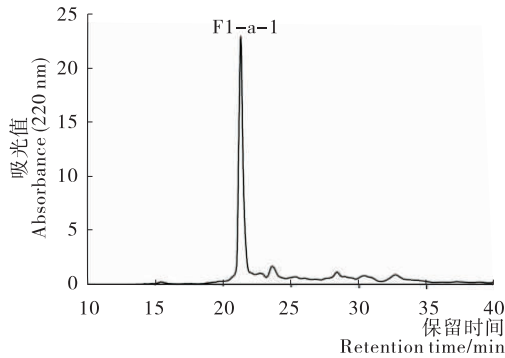


图 4 F1-a 组分经半制备型液相分离图谱

Figure 4 Spectrum of F1-a components separated by semi-preparative liquid phase

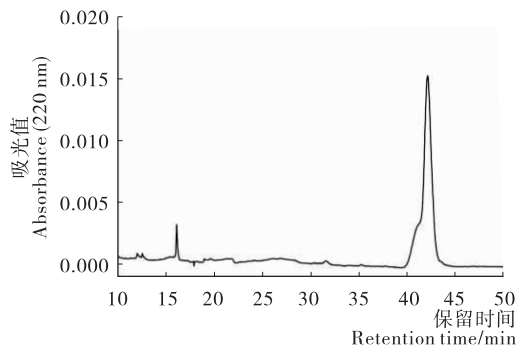


图 5 F1-a-1 组分的 RP-HPLC 图谱

Figure 5 RP-HPLC spectrum of the F1-a-1 component

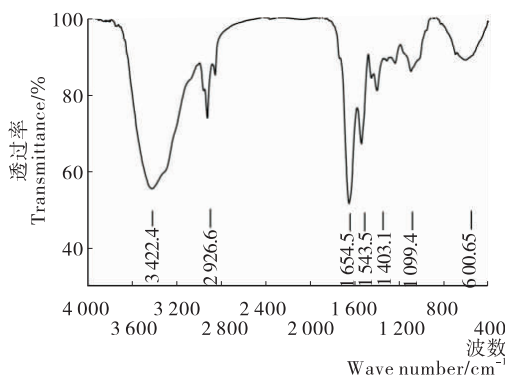


图 6 F1-a-1 组分的红外光谱图

Figure 6 Infrared spectrum of the F1-a-1 component

由图 5 可知,F1-a-1 组分杂峰较少,说明 F1-a-1 组分纯度较高。图 6 表明,F1-a-1 组分在 $1\ 654.5 \sim 1\ 403.1\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为酰胺键的特征吸收,这是蛋白质的典型特征^[17]。 $3\ 422.4\ \text{cm}^{-1}$ 处可能是 N—H 和 O—H 的吸收, $2\ 926.6\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰可能是—CH₃ 的伸缩振动, $1\ 099.4\ \text{cm}^{-1}$ 和 $600.6\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收可能是—NH₂ 的伸缩振动^[18]。酰胺 I 带($1\ 700 \sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$)是蛋白质骨架的最突出和最敏感的振动带,与蛋白质的二级结构有关。波数在 $1\ 660 \sim 1\ 695\ \text{cm}^{-1}$ 范围为 β -转角, $1\ 650 \sim 1\ 658\ \text{cm}^{-1}$ 范围为 α -螺旋, $1\ 640 \sim 1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 范围为无规则卷曲, $1\ 610 \sim 1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 范围为 β -折叠^[19]。图 6 中 F1-a-1 组分在 $1\ 654.5\ \text{cm}^{-1}$ 有伸缩振动,说明该组分中含有 α -螺旋。

F1-a-1 组分经质谱鉴定为氨基酸序列 Ile-Ile-Ala-Ile-Pro-Ala-Gly-Val-Ala-His (IIAIPAGVAH) 的腰果寡肽 (图 7)。

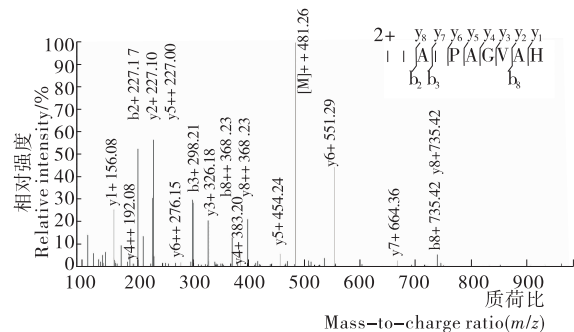


图 7 F1-a-1 组分的二级质谱图

Figure 7 Tandem mass spectrum of the F1-a-1 component

腰果寡肽含有多个异亮氨酸,表明其具有 α -螺旋结构倾向^[20],与其红外图谱结果一致。该寡肽中不含芳香族氨基酸(如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)、亮氨酸、赖氨酸和精氨酸等胃蛋白酶和胰蛋白酶的酶切位点,且寡肽中的脯氨酸残基可能会在肽链上赋予独特的构象约束,可防止其在胃肠消化中被分解,保留活性^[21]。在腰果寡肽纯化过程中,从 $1\ 000\ \text{g}$ 脱脂腰果粉可制备 $29.17\ \text{g}$ 腰果酶解产物,经纯化后可获得 $0.10\ \text{g}$ 腰果寡肽,由此可知,腰果寡肽得率为 0.01% 。在 BIOPEP、PDB (the protein databank) 和 Uniprot 数据库中搜索了该序列,但未找到相应的寡肽,提示试验中获得的腰果寡肽之前未被发现。

腰果寡肽的分子量为 $960.5\ \text{Da}$,分子量低的肽段可改善其在肠道中吸收并使其加速通过肠道屏障,产生生理效应^[22]。另外研究^[23]表明,只有多肽的分子量 $\geq 3.5\ \text{kDa}$ 才能与肥大细胞上 IgE 抗体交联引起过敏反应,分子量小的寡肽与 IgE 的交联能力低,甚至可以竞争性占据过敏原的结合位点,产生抗过敏效应。根据上述结

果,将腰果寡肽用于后续试验。

2.4 腰果寡肽的抗过敏效应

2.4.1 对 P815 细胞脱颗粒的影响 由图 8(a)可知,空白对照组 P815 细胞上清液中组胺浓度为 (0.20 ± 0.01) ng/mL; DNP-BSA 刺激后上清液中组胺浓度为 (0.89 ± 0.05) ng/mL,显著高于空白对照组 ($P < 0.01$); 200, 500 $\mu\text{g/mL}$ 腰果寡肽和 DNP-BSA 共同孵育后,上清液中组胺浓度分别为 (0.55 ± 0.02) , (0.51 ± 0.07) ng/mL,显著低于仅用 DNP-BSA 刺激后上清液中的组胺浓度。组胺是由组氨酸脱羧酶脱羧形成,储存在正常肥大细胞中的分泌颗粒中,主要通过特异性组胺受体发挥其生物学效应,当肥大细胞受过敏原刺激后,随着脱颗粒分泌到胞外,引发过敏反应^[24]。组胺仅存在于嗜碱性粒细胞和肥大细胞中,可将组胺释放量作为衡量肥大细胞脱颗粒强弱的重要标志物^[25]。组胺虽为脱颗粒反应最典型的标志物,但它是一

种极不稳定物质,半衰期短,要求迅速采集样品并且快速检测,因此,还需要结合其他指标做综合判断。

如图 8(b)所示,DNP-BSA 刺激后,P815 细胞 β -氨基己糖苷酶释放率为 $(45.23 \pm 3.42)\%$,显著高于空白对照组的 $[(7.73 \pm 0.96)\%]$,而 200, 500 $\mu\text{g/mL}$ 腰果寡肽和 DNP-BSA 共同孵育后, β -氨基己糖苷酶释放率显著降低 ($P < 0.01$)。综上所述,腰果寡肽显著抑制 P815 细胞中组胺和 β -氨基己糖苷酶分泌,且浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 达到显著抑制。

β -氨基己糖苷酶是一种类胰蛋白酶,储存在肥大细胞分泌颗粒中^[24]。正常情况下人体血液中几乎不含有 β -氨基己糖苷酶,当肥大细胞接触过敏原后, β -氨基己糖苷酶释放程度增加,其释放量与细胞脱颗粒程度存在量效关系。目前常用此指标作为肥大细胞活化脱颗粒的标志^[26]。

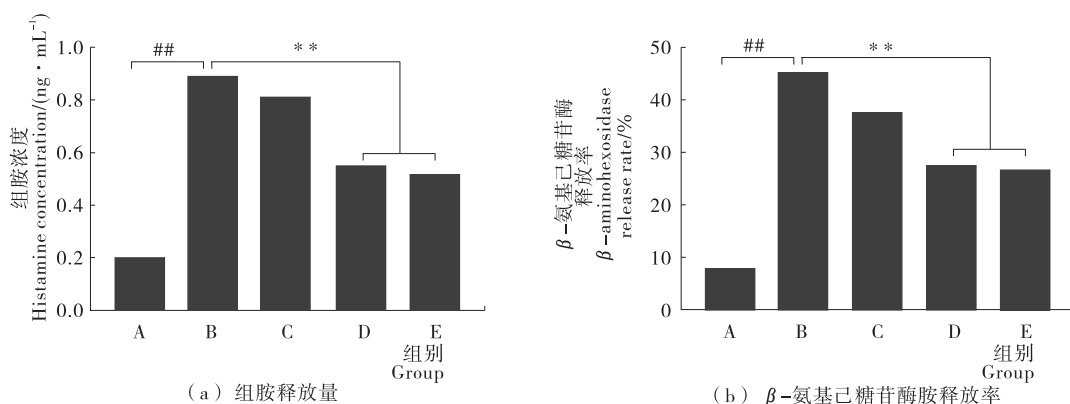


Figure 8 Effect of cashew nut oligopeptide on histamine and β -aminohexosidase amine release of P815 cells stimulated by IgE-antigen complex ($n=6$)

Figure 8 腰果寡肽对 IgE-抗原复合物刺激的 P815 细胞组胺释放量和 β -氨基己糖苷酶胺释放率的影响

Figure 8 Effect of cashew nut oligopeptide on histamine and β -aminohexosidase amine release of P815 cells stimulated by IgE-antigen complex ($n=6$)

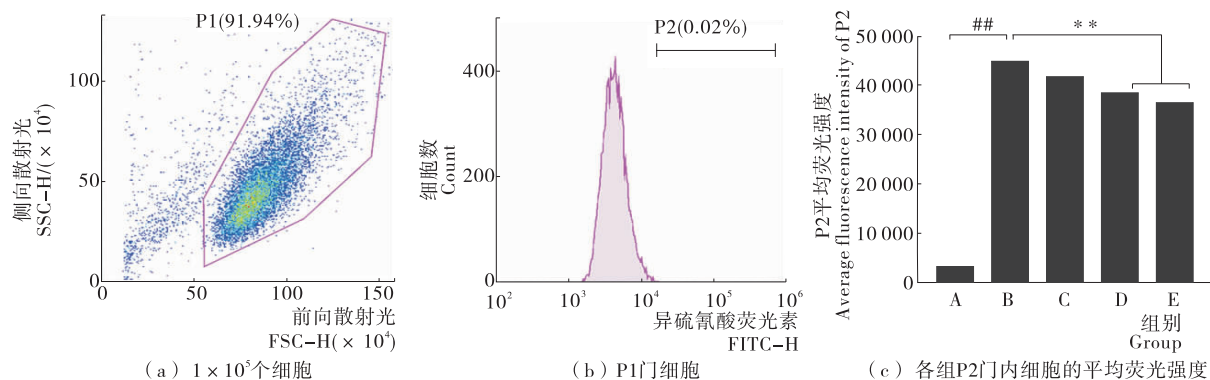


Figure 9 Effect of F1-a-1 components on phosphatidylserine eversion of P815 cells stimulated by IgE-antigen complex ($n=6$)

Figure 9 F1-a-1 组分对 IgE-抗原复合物刺激的 P815 细胞磷脂酰丝氨酸外翻的影响

Figure 9 Effect of F1-a-1 components on phosphatidylserine eversion of P815 cells stimulated by IgE-antigen complex ($n=6$)

2.4.2 腰果寡肽对磷脂酰丝氨酸外翻的影响 通过图 9(a)画出 P1 门,即具有完整形态细胞的区域。基于 P1 门,得到 P2 门,即含有荧光探针细胞的区域,如图 9(b)所示。各组 P2 门的平均荧光强度如图 9(c)所示,与模型组相比,200 $\mu\text{g/mL}$ 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 腰果寡肽孵育后的细胞平均荧光强度显著降低($P<0.01$),说明腰果寡肽可抑制 P815 细胞脱颗粒,具有抗过敏效应。

肥大细胞脱颗粒的过程是通过胞吐作用将颗粒内的活性物质释放到胞外,荧光标记的 Annexin V 抗体可特异性地与脱颗粒过程中细胞膜上外翻的磷脂酰丝氨酸结合,可用流式细胞仪测定,平均荧光强度越强,磷脂酰丝氨酸外翻程度越强,即细胞脱颗粒程度越强。有研究^[27]显示,Annexin V 可以和细胞表面分泌颗粒发生特异性结合,结合程度与 β -氨基己糖苷酶释放呈正比。

3 结论

研究以腰果蛋白为原料,依据不同蛋白酶的 DH 和 TCA-YSP,确定碱性蛋白酶为制备腰果粗寡肽的最佳用酶;利用超滤、分子筛及半制备液相,从腰果粗寡肽中分离出含有 α -螺旋且氨基酸序列为 Ile-Ile-Ala-Ile-Pro-Ala-Gly-Val-Ala-His(IIAIPAGVAH)的腰果寡肽。通过测定腰果寡肽对肥大细胞中组胺和 β -氨基己糖苷酶释放及磷脂酰丝氨酸外翻的影响,证明其有抗过敏效应。后续研究需进一步探究腰果寡肽在分子水平上的抗过敏机制。

参考文献

- [1] MWAKALUKWA R, ASHOUR A, AMEN Y, et al. Anti-allergic activity of polyphenolic compounds isolated from olive mill wastes[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 58: 207-217.
- [2] KO S C, LEE D S, PARK W, et al. Anti-allergic effects of a nonameric peptide isolated from the intestine gastrointestinal digests of abalone (*Haliotis discus hannai*) in activated HMC-1 human mast cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2015, 37: 243-250.
- [3] DHAKAL H, KIM S H, PARK P H, et al. Avenanthramide C from germinated oats exhibits anti-allergic inflammatory effects in mast cells[J]. Scientific Reports, 2019, 9(3): 1-10.
- [4] 连晨蕾, 丛慧, 吴雅清, 等. 抗过敏天然产物研究进展[J]. 中国药杂志, 2017, 52(12): 997-1 004.
- [5] 马涛, 林峰, 林单, 等. 食源性低聚肽抗过敏活性研究[J]. 食品科技, 2014(2): 27-30.
- [6] 徐莎莎. 耳突麒麟菜寡糖的抗食物过敏研究[D]. 宁波: 集美大学, 2017: 4-5.
- [7] 孟达. 腰果酚的综合利用 [D]. 北京: 北京化工大学, 2017: 5-6.
- [8] ZHAO Yi-qing, SUN Xin, MARQUIS C P, et al. Development of a sensitive sandwich ELISA specific to 2S albumin (Ana o 3) as a stable protein marker for cashew nut residue detection in pre-packaged food products[J]. Food Control, 2019, 96: 432-440.
- [9] 杨雪, 李云亮, 王禹程, 等. 酶解法制备菜籽多肽的工艺研究[J]. 中国饲料, 2017(2): 19-21.
- [10] 杨文博, 张英华. 蛋白质水解度的测定方法研究[J]. 中国调味品, 2014, 39(3): 88-90.
- [11] 潘进权, 蒋边, 张恩舒, 等. 复合蛋白酶水解黑豆粕制备多肽的工艺优化[J]. 中国油脂, 2019, 44(11): 75-81
- [12] AGYEI D, ONGKUDON C M, WEI Chan-yi, et al. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides[J]. Food and Bioprocess Processing, 2016, 98: 244-256.
- [13] HUANG Jing, ZHANG Tao, HAN Sheng-li, et al. The inhibitory effect of piperine from Fructus piperis extract on the degranulation of RBL-2H3 cells[J]. Fitoterapia, 2014, 99: 218-226.
- [14] BANSODE R R, PLUNDRICH N J, RANDOLPH P D, et al. Peanut flour aggregation with polyphenolic extracts derived from peanut skin inhibits IgE binding capacity and attenuates RBL-2H3 cells degranulation via MAPK signaling pathway[J]. Food Chemistry, 2018, 263: 307-314.
- [15] HE Wen-meng, YANG Rui-jin, ZHAO Wei. Effect of acid deamidation-alkalase hydrolysis induced modification on functional and bitter-masking properties of wheat gluten hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2019, 277: 655-663.
- [16] OSMAN A, GODA H A, ABDEL-HAMID M, et al. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 65: 480-486.
- [17] GUO Xiang-yu, HUANG Hong-liang, LIU Da-huan, et al. Improving particle dispersity and CO₂ separation performance of amine-functionalized CAU-1 based mixed matrix membranes with polyethyleneimine-grafting modification [J]. Chemical Engineering Science, 2018, 189: 277-285.
- [18] WANG Li-bo, LIU Fang-cheng, WANG Ao-xue, et al. Purification, characterization and bioactivity determination of a novel polysaccharide from pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 66: 357-364.
- [19] 莫加利, 陈季旺, 刘静泊, 等. 风干武昌鱼中鲜味肽的分离纯化及二级结构分析[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 23-28.
- [20] 王家俊. 非完美两亲性 α 螺旋肽的构效关系及其抗酶解活性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019: 88-89.
- [21] YU Wen-lin, FIELD C J, WU Jian-ping. Purification and identification of anti-inflammatory peptides from spent hen muscle proteins hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2018, 253: 101-107.

(下转第 55 页)

- [2] PEARCE K L, ROSENVOLD K, ANDERSEN H J, et al. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes: A review[J]. Meat Science, 2011, 89(2): 111-124.
- [3] LI Peng, WANG Hong-ti, SUN Jing-xin, et al. Effects of pressure-transform tumbling assisted by ultrasound on protein structure and water content of chicken[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2017, 33(16): 308-314.
- [4] 陈惠, 刘焱, 李志鹏, 等. 热加工对草鱼鱼肉品质及风味成分的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(9): 53-68.
- [5] 邓丽, 李岩, 董秀萍, 等. 热加工过程中鲍鱼腹足蛋白间作用力及其质构特性[J]. 农业工程学报, 2014, 30(18): 307-316.
- [6] 周兵兵. 微波技术在食品加工中的应用[J]. 现代食品, 2017, 4(13): 1-2.
- [7] 陈琳莉, 李侠, 张春晖, 等. 低场核磁共振法测定五种肉类中不同状态水分含量[J]. 分析科学学报, 2015, 31(1): 90-94.
- [8] WANG Xue-jiao, BERTRAND M, WANG Xing-wei, et al. Comparison between microwave and traditional water bath cooking on saltiness perception, water distribution and microstructure of grass carp meat[J]. Food research international, 2019, 125(1): 1-9.
- [9] 盛利斌, 刘书来, 吕飞, 等. 热煮对丁香鱼肌肉特性及质构的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 5-8.
- [10] YOU Juan, LOU Yong-kang, SHEN Hui-xing, et al. Effect of substrate ratios and temperatures on development of Maillard reaction and antioxidant activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein hydrolysate-glucose system[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2009, 46(12): 2 467-2 474.
- [11] 潘薇娜. 微波对冷冻预油炸面拖食品脆性影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005: 31-37.
- [12] LI Miao-yun, WANG Hai-biao, ZHAO Gai-ming, et al. Determining the drying degree and quality of chicken jerky by LF-NMR[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 139(1): 43-49.
- [13] 章杰, 何航, 熊子标. 烹饪方式对猪肉品质及营养成分的影响[J]. 食品与机械, 2018, 34(6): 21-29.
- [14] 杨宏旭, 刘大松, 李珺珂, 等. 低温贮藏条件下青鱼肉中蛋白和组织结构的变化对鱼肉品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(8): 208-213.
- [15] 姜启兴. 鲮鱼肉热加工特性及其机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015: 29-46.
- [16] CHRISTENSEN L B, HOVDA M B, RODE T M. Quality changes in high pressure processed cod, salmon and mackerel during storage[J]. Food Control, 2017, 72(1): 90-96.
- [17] 郁二蒙, 谢骏, 卢炳国, 等. 脆肉鲩与普通草鱼肌肉显微结构观察[J]. 南方农业学报, 2014, 45(4): 671-675.
- [18] 章银良, 安巧云, 杨慧, 等. 脂肪氧化诱导鱼蛋白聚集变性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(11): 161-164.
- [19] KONG Bao-hua, SUN Yan, JIANG Lin-zhou, et al. The effectiveness of butylated hydroxyanisole and α -tocopherol in inhibiting oxidant-induced chemical and structural changes of whey protein[J]. International Journal of Dairy Technology, 2012, 65(3): 353-359.
- [20] HUANG You-ru, HUA Yu-fei, QIU Ai-yong. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation[J]. Food research international, 2006, 39(2): 240-249.
- [21] ZHANG Xiang-lun, LU Peng, XUE Wen-yue, et al. An evaluation of heat on protein oxidation of soy protein isolate or soy protein isolate mixed with soybean oil in vitro and its consequences on redox status of broilers at early age[J]. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 2017, 30(8): 1 135-1 142.
- [22] CAI Lu-yun, FENG Jian-hui, CAO Ai-ling, et al. Denaturation kinetics and aggregation mechanism of the sarcoplasmic and myofibril proteins from grass carp during microwave processing[J]. Food & Bioprocess Technology, 2018, 11(2): 417-426.
- [23] GEORGE D F, BILEK M M, MCKENZIE D R. Non-thermal effects in the microwave induced unfolding of proteins observed by chaperone binding [J]. Bioelectromagnetics, 2008, 29(4): 324-330.

(上接第 31 页)

- [22] WANG Bo, LI Bo. Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein-derived peptides by using Caco-2 cell model[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 1-8.
- [23] 刘晓宇, 李荔, 刘志刚. 食物过敏原介导食物过敏机制研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(4): 235-239.
- [24] FUKUIISHI N, MURAKAMI S, OHNO A, et al. Does β -hexosaminidase function only as a degranulation Indicator in mast cells? The primary role of β -hexosaminidase in mast cell granules[J]. Journal of Immunology, 2014, 193(4): 1 886-1 894.
- [25] KAWAI J, MORI K, HIRASAWA N. Grifola frondosa extract and ergosterol reduce allergic reactions in an allergy mouse model by suppressing the degranulation of mast cells[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2019, 83(12): 2 280-2 287.
- [26] FU Shui-lian, NI Sai-hong, WANG Dan-ni, et al. Berberine suppresses mast cell-mediated allergic responses via regulating Fc ϵ RI-mediated and MAPK signaling[J]. International Immunopharmacology, 2019, 71: 1-6.
- [27] DEMO S, MASUDA E, ROSSI A B, et al. Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric annexin-V binding assay[J]. Cytometry, 1999, 36: 340-348.