

# 高静压协同酶法处理对白果蛋白抗原性的影响

周昊<sup>1</sup>, 王成章<sup>1</sup>, 曹福亮<sup>2</sup>, 叶建中<sup>1</sup>, 李文君<sup>1</sup>, 陈虹霞<sup>1</sup>, 陶冉<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 江苏南京 210042) (2. 南京林业大学林学院, 江苏南京 210037)

**摘要:** 本文研究了高静压结合酶解处理对白果蛋白抗原性的影响, 分别采用 4 种蛋白酶水解白果蛋白, 水解前分别采用不同压力的高静压对白果蛋白进行预处理, 酶解产物水解率和分子量采用 OPA 法和 SDS-PAGE 测定, 致敏性采用 western-blotting 和 ELISA 法测定。结果表明, 木瓜蛋白酶, 碱性蛋白酶或胃蛋白酶为水解酶时, 高静压能显著提高白果蛋白的水解率和降低其致敏性; 而中性蛋白酶为水解酶时, 白果蛋白的水解和脱敏效果很差, 即使高压处理也未见明显提高。木瓜蛋白酶或碱性蛋白酶在处理压力为 300 MPa 时, 而胃蛋白酶在 400 MPa 时, 其水解和脱敏效果最好, 在此条件下白果蛋白能被水解为分子量小于 15 ku 的多肽, 95% 以上的白果蛋白致敏性能被消除, 酶解产物中致敏蛋白条带全部消失。因此, 高静压处理能明显提高蛋白酶对白果蛋白的水解效率和脱敏效果, 但是取决于选择的蛋白酶种类和处理压力的大小。

**关键词:** 白果蛋白; 酶解; 高静压处理; 抗原性

文章编号: 1673-9078(2016)8-219-224

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.033

## Effects of Enzymatic Hydrolysis Assisted by High Hydrostatic Pressure

### Processing on the Allergenicity of Proteins from Ginkgo Seeds

ZHOU Hao<sup>1</sup>, WANG Cheng-zhang<sup>1</sup>, CAO Fu-Liang<sup>2</sup>, YE Jian-zhong<sup>1</sup>, LI Wen-jun<sup>1</sup>, CHEN Hong-xia<sup>1</sup>, TAO Ran<sup>1</sup>

(1. Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF, Nanjing, 210042, China)

(2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** The purpose of this paper was to study the combined effect of high hydrostatic pressure (HHP) and enzymatic hydrolysis treatments on the allergenicity of ginkgo seed proteins (GSP). Four food-grade proteases (papain, alcalase, pepsin, and neutrase) were used to hydrolyze GSP after pre-treatment with HHP (200, 300, or 400 MPa). The extent of hydrolysis and molecular weights of the hydrolysates were measured by the *o*-phthaldialdehyde (OPA) method and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the allergenicity was assessed by western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that HHP could significantly improve the extent of proteolysis and reduce the antigenicity of GSP when the hydrolase was papain, alcalase, or pepsin, whereas neutrase showed a low degree of proteolysis and poor anti-allergenicity on GSP, and no significant improvement was observed upon high-pressure treatment. The highest degree of proteolysis and the optimal anti-allergenicity were obtained with papain or alcalase hydrolysis combined with HHP treatment at 300 MPa or with pepsin hydrolysis combined with HHP treatment at 400 MPa. Under the above conditions, GSP could be hydrolyzed into polypeptides with molecular weights lower than 15 ku, the antigenicity was reduced over 95%, and all immunoreactive bands disappeared in the hydrolysates obtained. These results suggest that HHP can improve the degree of hydrolysis of GSP and reduce the residual antigenicity of hydrolysates, but the effects are dependent on the protease used and the magnitude of processing pressure.

**Key words:** proteins from ginkgo seed; enzymatic hydrolysis; high hydrostatic pressure processing; allergenicity

白果是中国特有古老树种银杏的果实, 我国的白果资源丰富, 产量占全世界的 70%。白果中含有丰

收稿日期: 2015-11-12

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20141073); 江苏省林业三新工程项目 (LYSX[2015]25); “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD21B04)

作者简介: 周昊 (1982-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物化学加工与利用

通讯作者: 王成章 (1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生物质提取物加工与应用

富的蛋白质, 含量达到 10~15%, 其氨基酸组成丰富、合理, 必需氨基酸接近 WHO/FAO 推荐模式, 属于优质蛋白<sup>[1]</sup>。研究表明, 白果具有抗氧化、延缓衰老、抗肿瘤和抗菌等多种生理活性, 极具营养和医疗价值, 其作为食疗、滋补、保健食品已有 1000 多年的历史<sup>[2]</sup>。但是生食白果会引起过敏反应甚至死亡, 即使熟制的白果也不能过多食用, 儿童对白果更为敏感<sup>[3]</sup>。已有研究证实, 白果中致敏蛋白是引起过敏反应的主要物质, 目前对如何降低和消除白果蛋白过敏性的研究还

处于空白,从而限制了白果的食用和低敏性白果产品的开发。

目前食物蛋白脱敏方法主要是利用酶法或物理手段破坏蛋白质的空间构象,或断裂一些化学键从而破坏过敏蛋白的抗原表位,使之与抗体结合受到影响,致敏性降低或消除<sup>[4]</sup>。酶解法是破坏过敏蛋白线性表位最为有效的方法,具有作用温和、高效和特异性强等特点,其在牛奶、大豆、鸡蛋、虾、花生和小麦蛋白的脱敏已得到很好的应用<sup>[5]</sup>。蛋白经过酶解后,不仅致敏性降低,且酶解生成的多肽通常具有更好的性能和生物活性,在体内更易消化吸收。高静压处理是一种新兴发展的非热食品加工技术,其可破坏过敏蛋白的构象表位,从而降低其致敏性<sup>[6]</sup>。近年来,高静压结合酶解技术被广泛应用于制备低敏性和性能优异的食物蛋白,研究表明,高静压处理不仅可以破坏抗原构象表位,而且其可加快蛋白酶的水解速度,提高酶的水解率,此外高压可使蛋白的结构展开,暴露其内部的抗原表位,这样可使蛋白酶和内部抗原接触更充分,水解更完全,从而提高脱敏效果<sup>[7]</sup>。如在乳清蛋白脱敏中,在高压条件下采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶和复合蛋白酶进行水解,相比常压水解,蛋白水解程度提高了50%,水解时间快了8倍,致敏性完全消失,脱敏效率提高了40%<sup>[8]</sup>。因此高静压技术不仅可提高蛋白酶的脱敏效果,其与酶解法配合使用,可同时破坏过敏蛋白的线性和构象表位,可以最大程度降低食物致敏性。

目前国内外还没有将高静压和蛋白酶解技术应用与白果蛋白脱敏方面的研究报道。本试验用酶解联合高静压处理技术对白果蛋白进行处理,对其水解度、分子量及抗原性进行研究,以期脱敏白果蛋白的研究和应用提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

白果购自江苏泰兴,由南京中医药大学吴启南教授鉴定为大佛指品种;白果蛋白过敏小鼠血清由南京中医药大学药理实验室提供,血清置于-25℃冰箱冻存;胃蛋白酶(E.C.3.4.23.1)、中性蛋白酶(E.C.3.4.24.28)、碱性蛋白酶(E.C.3.4.21.62)、木瓜蛋白酶(E.C.3.4.22.2)、HRP标记的羊抗鼠IgE抗体、预染的蛋白Marker(5~170 ku)、SDS-PAGE凝胶电泳所用试剂,均购自美国Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UHPF-750型超高压设备:包头科发高压科技有限

责任公司;UV-1601紫外-可见分光光度计:日本岛津公司;Sartorius PB-10 pH计:德国赛得利斯有限公司;TGL-20M冷冻离心机:湖南湘仪离心机仪器有限公司;BIO-RAD电泳自动成像仪和BIO-RAD半干式转印仪:美国BIO-RAD生化科技有限公司;Thermo 354型酶标仪和96孔酶标板:美国热电公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 白果蛋白的制备

取白果1 kg,冷冻干燥后,研磨过筛,然后用石油醚脱脂至脱脂完全为止,待石油醚完全挥发后,以1:15(m/V)的比例加入Tris-HCl溶液(TBS, pH 7.4、0.2 mol/L)进行蛋白提取,4℃下磁力搅拌24 h,5000 r/min冷冻离心15 min,上清液分别通过40和80 g/100 mL饱和度的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>进行分级沉淀,5000 r/min冷冻离心30 min,沉淀用少量TBS(pH 8.0、0.01 mol/L)溶解,置于截留分子量为3.5 ku的透析袋中用相同的TBS进行透析。透析液冻干即为白果蛋白粗提物,4℃贮藏备用。

### 1.3.2 高静压处理方法

配置50 mg/mL浓度的白果蛋白溶液,将其密封于双层聚乙烯塑料袋中,抽真空密封后,置于高压设备中,于室温下进行高静压处理,设定处理压力分别为200 MPa、300 MPa、400 MPa,处理时间均为20 min,升压、降压均在2 min内完成。

### 1.3.3 白果蛋白的酶解反应

在常压条件下分别对未经高压处理的原蛋白及经过不同压力处理过的蛋白样品进行酶解,蛋白样品用4种蛋白酶(碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶)分别酶解。酶解前,蛋白溶液于90℃热处理5 min,以充分杀死其中的致病菌同时有利于蛋白酶充分作用,并用1 mol/L HCl或1 mol/L NaOH调溶液的pH至各种酶最适宜的水解条件以活化该酶。酶解时酶与底物的质量比为1:200。水解2 h后,在95℃下灭酶活10 min,各组水解液在-40℃冷冻后干燥。各种酶最适宜的水解条件见表1。

表1 各种酶的最适水解条件

Table 1 Optimum hydrolysis conditions for different enzymes

酶	温度/℃	最适pH值
碱性蛋白酶	45	8.0
木瓜蛋白酶	55	6.5
胃蛋白酶	40	1.5
中性蛋白酶	45	7.0

### 1.3.4 酶解白果蛋白水解度的测定

水解度测定采用OPA法<sup>[9]</sup>。OPA试剂的配制:取40 mg的OPA溶于1 mL甲醇中,然后将上述OPA溶液与25

mL浓度为100 mmol/L的四硼酸钠溶液、2.5 mL浓度为20%的SDS溶液和100  $\mu$ L二硫苏糖醇混合,并用去离子水定容到50 mL即得到OPA试剂。分别取不同酶解蛋白溶液50  $\mu$ L,加入OPA试剂1 mL,混合均匀,在室温下放置2 min,然后在340 nm下测其吸光度。

### 1.3.5 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

蛋白样品用TBS溶解配成浓度为1 mg/mL的溶液,样品处理液为含2.5% SDS、5% $\beta$ -巯基乙醇、20%甘油、0.5%溴酚蓝的Tris-HCl溶液(0.01 mol/L、pH 8.0溶液)。白果蛋白样品或Marker与样品处理液以1:1的比例混合,沸水煮5 min备用。处理好的样品取20  $\mu$ L上样,70 V电泳30 min后,然后120 v稳压电泳45~60 min。电泳完成后,用考马斯亮蓝R-250染色液(甲醇:冰醋酸:水,5:5:2)染色30 min,后用脱色液(甲醇:冰醋酸:水,1:1:8)脱色。脱色完全后,置于凝胶成像系统中拍照并进行分析。

### 1.3.6 免疫印记(western-blotting)检测

蛋白样品电泳结束后取下凝胶,然后进行电转印至PVDF膜,转移结束后,PVDF膜先用PBST溶液(0.01 mol/L磷酸盐缓冲液,pH 7.0,含有0.15 mol/L NaCl和0.05%吐温-20)洗涤5 min,共3次,然后用含有2%脱脂牛奶的PBST溶液在37  $^{\circ}$ C条件下封闭过夜,平稳摇动;倒掉封闭液后,用PBST溶液轻洗3次,每次5 min;倒掉PBST溶液,加入小鼠抗白果蛋白血清(一抗,按1:100稀释),液体完全覆盖PVDF膜,摇床摇动,设阴性对照,37  $^{\circ}$ C下孵化2 h;倒掉小鼠血清溶液,用PBST溶液洗膜3次,每次5 min;去掉PBST溶液,加入羊抗小鼠Ig E-HRP(二抗,按1:500稀释),摇床摇动,37  $^{\circ}$ C下孵育2 h;去掉二抗溶液,PBST溶液漂洗5 min,共3次。最后加入新鲜配置的显色液、 $H_2O_2$ ,避光至出现条带时放入水中终止反应,结果拍照保存。

### 1.3.7 酶联免疫吸附检测(ELISA)

白果蛋白样品配成浓度为50  $\mu$ g/mL的溶液(含0.015 mol/L  $Na_2CO_3$ 和0.035 mol/L  $NaHCO_3$ ,pH 9.6),取样品溶液加到96孔酶标板,100  $\mu$ L/孔,4  $^{\circ}$ C过夜;次日用PBST液洗涤3次,拍干;将酶标板孔内加入含有50 mL/L脱脂牛奶的PBS封闭液,200  $\mu$ L/孔,37  $^{\circ}$ C恒温箱中孵育2 h,同上洗涤;将小鼠抗白果蛋白血清(一抗,按1:400稀释)加入板孔,100  $\mu$ L/孔,37  $^{\circ}$ C恒温箱中孵育2 h,同上洗涤;加入羊抗小鼠Ig E-HRP(二抗,按1:1000稀释),100  $\mu$ L/孔,37  $^{\circ}$ C恒温箱中孵育2 h,同上洗涤;再加现配制的OPD底物显色液,37  $^{\circ}$ C避光显色30 min;加入2 mol/L的 $H_2SO_4$ 终止液,每孔50  $\mu$ L,用酶标仪于490 nm处,以空白对照孔调零后测定各孔的光密度值

(OD)。

## 1.4 统计分析

实验数据采用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,用DPS 7.55统计软件进行方差分析,以 $p < 0.05$ 为显著性检验标准。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高静压协同酶解处理后白果蛋白水解度的测定结果

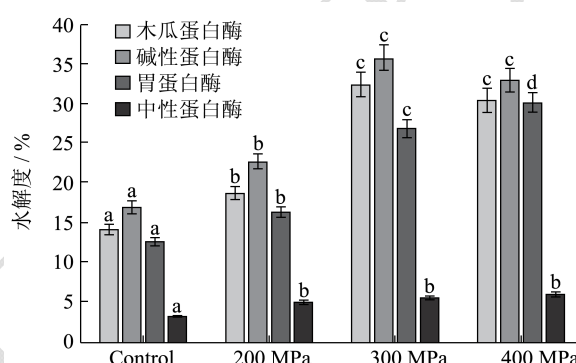


图1 常压(0.1 MPa)或不同高压(200, 300或400 MPa)处理条件下各种蛋白酶(碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶)解产物的水解率大小

Fig.1 Degree of hydrolysis of untreated GSP (control) and GSP treated with HHP (200, 300, or 400 MPa) prior to hydrolysis with various enzymes

注:同一种水解酶的柱状图上,不同的小写字母表示在 $P \leq 0.05$ 水平时具有的显著性水平。

由图1中可以看出,同0.1 MPa的对照组相比,当水解酶为木瓜蛋白酶,碱性蛋白酶或胃蛋白酶时,高静压明显地促进了白果蛋白的水解( $p \leq 0.05$ ),并且随着压力的升高其水解度也呈升高趋势,当压力升高到300 MPa或400 MPa时白果蛋白的水解度显著高于200 MPa时的水解度( $p \leq 0.05$ )。此外,木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶组的白果蛋白的最高水解度出现在处理压力为300 MPa;而胃蛋白酶组的白果蛋白的最高水解度出现在处理压力为400 MPa。值得注意的是对于木瓜蛋白酶或碱性蛋白酶组当处理压力为400 MPa时,白果蛋白的水解度略低于300 MPa时的水解度,但是两者之间的差异并不显著。另外,当水解酶为中性蛋白酶时,白果蛋白的水解率非常低,明显低于其它三种蛋白酶的水解效果,即使采用高压处理,中性蛋白酶组的白果蛋白水解度也未有提高,说明中性蛋白酶不适合用于白果蛋白的水解。

本实验采用四种蛋白酶用于白果蛋白的水解,不同蛋白酶的专一性和作用位点都不一样,研究表明酶作用位点广泛,其水解效率高,反之酶作用位点要求严格,其水解效率低<sup>[10]</sup>。碱性蛋白酶是一种肽链内切酶,具有广泛的作用位点,能水解所有羧基侧具有芳香族或疏水性氨基酸的肽键;木瓜蛋白酶是一种巯基肽链内切酶,能水解大部分羧基侧具有芳香族或疏水性氨基酸的肽键;胃蛋白酶也是一种肽链内切酶,能水解羧基端为 Tyr, Trp 和 Phe 的芳香族氨基酸或部分其它疏水性氨基酸的肽键;中性蛋白酶是一种金属肽链内切酶,它只能水解羧基端是 Lys 和 Arg 的肽键<sup>[11]</sup>。研究结果表明,碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶或胃蛋白酶可以很好的水解白果蛋白,而中性蛋白酶对白果蛋白的水解效果较差,其原因可能与白果蛋白的氨基酸组成和含量有关,另外更重要的是与不同蛋白酶具有不同的作用位点和活性有关。此外,研究结果显示高压处理可明显增强白果蛋白的水解效率,已有大量研究报告表示 高压处理可通过使食物蛋白变性、解折叠或化学键破坏从而增强蛋白酶和食物蛋白结合位点的易接近性<sup>[12]</sup>。

## 2.2 SDS-PAGE 分析结果

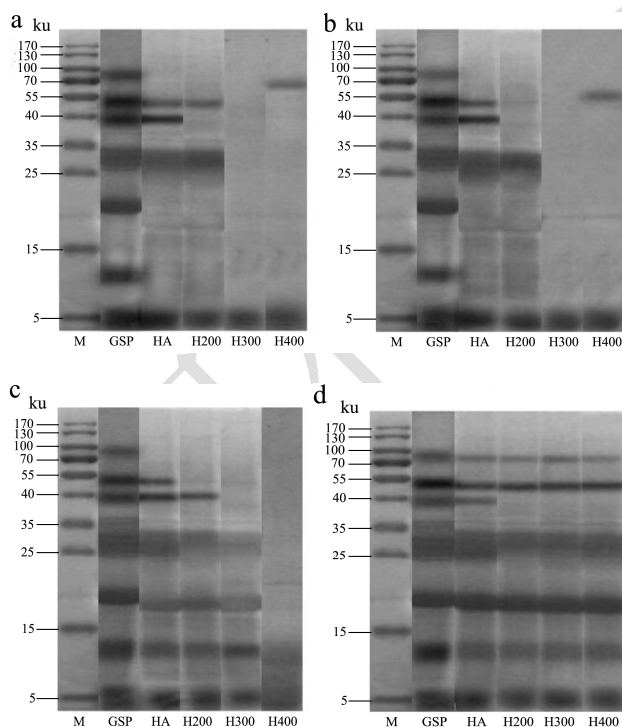


图2 原白果蛋白及其不同压力处理后不同蛋白酶解产物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE images of native GSP and the hydrolysates obtained by hydrolysis

注: a 为木瓜蛋白酶、b 为碱性蛋白酶、c 为胃蛋白酶、d

为中性蛋白酶; M 代表标准分子量蛋白, GSP 代表原白果蛋白, HA 代表常压下水解蛋白, H200 代表 200 MPa 处理后酶解蛋白, H300 代表 300 MPa 处理后酶解蛋白, H400 代表 400 MPa 处理后酶解蛋白。

由图 2 中可见, 原白果蛋白的分子量主要集中在 5 到 100 ku 之间, 其主要的蛋白条带包括 5, 10, 22, 30, 39, 46 和 90 ku。水解后的白果蛋白的电泳图证实了高压处理过的白果蛋白的水解效率明显高于常压下水解的蛋白样品。当使用碱性蛋白酶或木瓜蛋白酶作为水解酶时, 在常压条件下水解, 仅含量较低的分子量为 10、22 和 90 ku 的蛋白条带消失; 而高压条件下, 经过 200 MPa 高压处理过酶解白果蛋白样品仅显示分子量为 5、30 和 46 ku 的蛋白条带, 当处理压力达到 300 MPa 时, 白果蛋白都被水解为分子量小于 10 ku 的多肽, 原白果蛋白的条带都消失了, 但是当处理压力达到 400 MPa 时, 与 300 MPa 处理过的水解蛋白相比, 碱性蛋白酶解产物新出现了 57 ku 的蛋白条带, 而木瓜蛋白酶解产物新出现了 78 ku 的蛋白条带, 表明这些新增的蛋白条带是 400 MPa 高压下形成的。Peñas 等人在研究牛奶蛋白高压水解过程中也发现当压力高到一定程度, 会出现一些新的蛋白条带, 其原因可能是高压会导致蛋白结构展开并出现一些自由 SH-基团, 在一定压力范围内这些 SH-基团是稳定的, 但是当压力超出一定范围, 部分 SH-基团将会聚合或重组, 从而进行 SH-和 S-S 的交互反应形成新的大分子物质<sup>[13]</sup>。

当水解酶是胃蛋白酶时, 在常压条件下水解, 仅分子量为 90 ku 的蛋白条带消失; 而高压条件下, 经过 200 MPa 或 300 MPa 高压处理过酶解白果蛋白样品显示分子量为 5、10、22、30 和 39 ku 的蛋白条带, 且其中部分蛋白条带变浅了, 当处理压力达到 400 MPa 时, 白果蛋白都被水解为分子量小于 15 ku 的多肽。结果表明, 木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶组的白果蛋白在处理压力为 300 MPa 时水解效率最高; 而胃蛋白酶组的白果蛋白在处理压力为 400 MPa 时水解效率最高。此外, 当水解酶为中性蛋白酶时, 在常压条件下水解, 原白果蛋白的所有蛋白条带仍然存在, 而在 200、300 或 400 MPa 高压处理条件下, 仅有分子量为 39 ku 的蛋白条带消失或变浅。以上这些研究结果与 OPA 法测定的水解度结果是一致的。

## 2.3 免疫印记检测结果

由图 3 的免疫印迹结果可以看出, 原白果蛋白的主要致敏蛋白条带共有 4 条, 分别为分子量为 22, 30, 46 和 90 ku 的蛋白。白果蛋白经过高压结合酶解处理



后,其具有 I g E 反应活性的蛋白条带明显减少。当碱性蛋白酶或木瓜蛋白酶作为水解酶时,在常压条件下水解,分子量为 30 和 46 ku 的致敏蛋白条带仍然存在;当在 200 MPa 高压条件下酶解,木瓜蛋白酶解产物仍显示分子量为 30 和 46 ku 致敏蛋白条带,但是致敏蛋白条带明显变浅,而碱性蛋白酶解产物仅显示分子量为 30 ku 致敏蛋白条带;当处理压力达到 300 或 400 MPa 时,白果蛋白的致敏蛋白条带全部都消失了。当水解酶是胃蛋白酶时,在常压条件下水解,分子量为 22、30 和 46 ku 的主要致敏蛋白条带仍然存在;而高压条件下,经过 200 MPa 高压处理过酶解白果蛋白样品仅显示分子量为 22 和 30 ku 的致敏蛋白条带,经过 300 MPa 高压处理过酶解白果蛋白样品仍然显示分子量为 22 和 30 ku 的致敏蛋白条带但是其蛋白条带明显变浅了,当处理压力达到 400 MPa 时,白果蛋白的致敏蛋白条带全部都消失了。然而,当水解酶为中性蛋白酶时,无论是在常压或高压条件下水解,所有致敏蛋白条带都存在,只是在高压条件下水解部分蛋白条带变浅了。

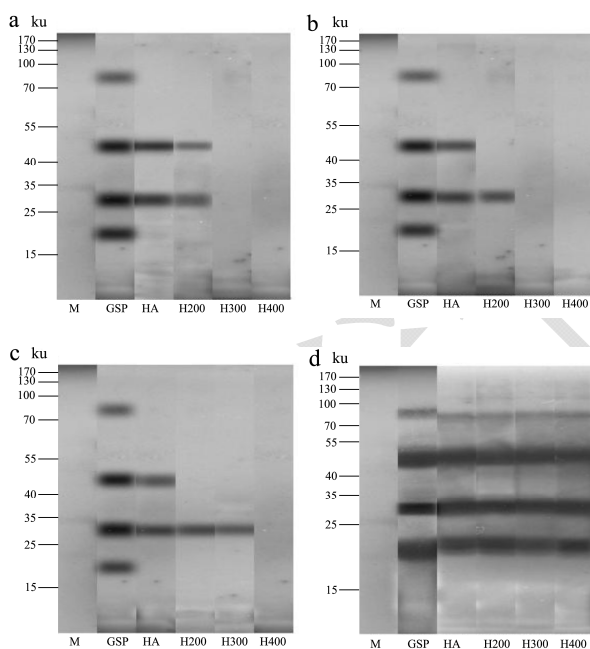


图3 原白果蛋白及其不同压力处理后不同蛋白酶解产物的免疫印迹图谱

Fig.3 Western blotting of untreated GSP and the hydrolysates obtained by hydrolysis

注: a 为木瓜蛋白酶、b 为碱性蛋白酶、c 为胃蛋白酶、d 为中性蛋白酶; M 代表标准分子量蛋白, GSP 代表原白果蛋白, HA 代表常压下水解蛋白, H200 代表 200 MPa 处理后酶解蛋白, H300 代表 300 MPa 处理后酶解蛋白, H400 代表 400 MPa 处理后酶解蛋白。

研究表明,食物蛋白过敏原具有特殊的化学基团,

即抗原决定簇。在食物过敏反应中,蛋白过敏原并不是通过它的完整分子来发挥作用,而是通过抗原决定簇直接与抗体进行反应;抗原决定簇的结构包括线性表位和构象性表位,线性表位是由连续的氨基酸组成,而构象性表位是由不同区段氨基酸在结构上相互接近并形成构象性表位,蛋白过敏性的消除需要通过破坏线性表位或构象表位来实现<sup>[14]</sup>。酶解法可通过断裂或消除氨基酸残基从而破坏抗原决定簇的线性表位来降低过敏性,在本实验中,使用木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶或胃蛋白酶水解白果蛋白,均能有效降低或消除白果蛋白的致敏性,而使用中性蛋白酶水解白果蛋白,对降低白果蛋白致敏性的效果却很差,其原因在于不同蛋白酶的作用位点不一样,该作用位点是否与抗原决定簇有关是决定蛋白酶脱敏能力大小的关键。此外,本实验研究结果表明,与常压酶解相比,采用高压酶解其对白果蛋白的脱敏能力显著提高,且可以完全消除白果蛋白的致敏性。研究表明,高静压不仅可以破坏蛋白二级、三级和四级结构,从而可破坏蛋白的构象表位,且高压处理使蛋白结构伸展,较多的抗原决定簇暴露,增大了蛋白酶与其接触的几率,从而增强脱敏效果<sup>[13]</sup>。

## 2.4 酶联免疫吸附(ELISA)测试结果

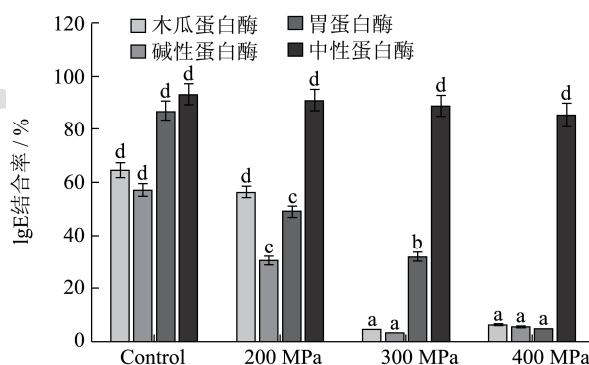


图4 常压(0.1 MPa)或不同高压(200, 300, 400 MPa)处理条件下各种蛋白酶(碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶)解产物的与 I g E 结合率的大小

Fig.4 IgE-binding activities of untreated GSP (control) and GSP treated with HHP (200, 300, or 400 MPa) prior to hydrolysis with various enzymes

注: 同一种水解酶的柱状图上,不同的小写字母表示在  $p \leq 0.05$  水平时具有的显著性水平。

临床研究表明,食物蛋白过敏原引起的过敏反应绝大部分是 I g E 介导的过敏反应,因此本实验进一步采用 ELISA 法测定白果蛋白水解产物的 I g E 结合能力从而测定其抗原性大小。由图 4 的结果可以看出,相比较原白果蛋白,经过高压结合酶解后的蛋白的抗

原性明显降低。当使用碱性蛋白酶或木瓜蛋白酶作为水解酶时, 酶解产物抗原性的最低值出现在处理压力为 300 MPa, 此时碱性蛋白酶解产物致敏性降低 95.5%, 而木瓜蛋白酶解产物致敏性降低 96.8%, 但是当木瓜蛋白酶或碱性蛋白酶组处理压力为 400 MPa 时, 白果蛋白水解产物的致敏性却略有升高, 但是与 300 MPa 时的酶解产物相比, 两者之间的差异并不显著。Sathe 等人在研究大豆蛋白高压水解过程中也发现, 当压力高到一定程度, 会导致过敏性略有增加, 其原因可能是高压会破坏维持蛋白构象的作用力, 使其结构伸展, 较多的疏水性和芳香族氨基酸残基暴露, 使得本来隐藏在蛋白结构内部的抗原表位暴露到蛋白结构表面上, 增加了抗原表位与 IgE 接触的机会, 从而会增加蛋白的抗原性<sup>[15]</sup>。

当水解酶是胃蛋白酶时, 随着处理压力的增大, 水解产物的抗原性也不断减小, 胃蛋白酶解产物抗原性的最低值出现在处理压力为 400 MPa, 此时酶解产物致敏性降低 95.2%。此外, 当水解酶为中性蛋白酶时, 白果蛋白的抗原性降低率非常低, 明显低于其它三种蛋白酶的脱敏效果, 即使采用高压处理, 中性蛋白酶组的白果蛋白致敏性降低也很少, 说明中性蛋白酶不适合用于白果蛋白的脱敏。以上这些研究结果与免疫印迹的测定结果是一致的。

### 3 结论

本研究采用高静压处理后再用蛋白酶对白果蛋白进行水解, 与常压酶解产物进行比较, 经过高压处理过的酶解产物水解率明显提高, 致敏性明显降低, 说明高静压处理能明显提高蛋白酶的水解效率和脱敏效果, 但是还取决于选择的蛋白酶种类和处理压力的大小。在本研究中, 木瓜蛋白酶, 碱性蛋白酶或胃蛋白酶在高压条件下均能将白果蛋白水解为分子量小于 15 ku 的多肽, 木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的最佳水解效果出现在处理压力为 300 MPa, 而胃蛋白酶的最佳水解效果出现在处理压力为 400 MPa; 然而当中性蛋白酶为水解酶时, 白果蛋白基本上不被水解, 即使使用不同的高压处理, 也不能提高中性蛋白酶对白果蛋白的水解效果。此外, 高压处理后的蛋白酶解产物的抗原性明显降低, 其降低效果同样与蛋白酶种类和处理压力大小有关, 本实验中, 木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶在处理压力为 300 MPa 时, 能基本消除白果蛋白致敏性, 而胃蛋白酶在处理压力为 400 MPa 时能基本消除白果蛋白致敏性, 然而中性蛋白酶对降低白果蛋白致敏性效果却很差, 高压处理条件其脱敏效果也未见提高。以上结果表明, 高静压结合蛋白酶解可以作为一

种降低白果蛋白致敏性的有效手段, 该研究可为制备低敏性白果蛋白产品及其应用于食品工业提供重要的理论基础。

### 参考文献

- [1] 张风梅,李三省,马小燕,等.银杏蛋白的提取及其功能性质研究[J].食品科技,2012,37(1):214-217  
ZHANG Feng-mei, LI San-sheng, MA Xiao-yan, et al. Separation of proteins from ginkgo seed and their functionality [J]. Food Science and Technology 2012, 37(1): 214-217
- [2] Deng Q C, Wang L, Wei F. Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from Ginkgo biloba seeds [J]. Food Chemistry, 2011, 124: 1458-1465
- [3] Yang J T, WU C E, LI Y Y. Identification and purification of an allergic glycoprotein from ginkgo biloba kernel [J]. Agricultural Sciences in China. 2011, 10: 631-641
- [4] 杨慧,陈红兵,程伟,等.大豆主要过敏原及其脱敏方法的研究进展[J].食品科学,2011,32(21):273-277  
YANG Hui, CHEN Hong-bing, CHENG Wei, et al. Research progress of soybean allergens and its desensitization methods [J]. Food Science, 2011, 32(21): 273-277
- [5] 毕井辉,汪何雅,钱和,等.酶解法脱除食品过敏原[J].食品工业科技,2011,32(8):432-439  
BI Jing-hui, WANG He-Ya, QIAN He. Reducing food allergen by enzyme hydrolysis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(8): 432-439
- [6] 王章存,徐贤.超高压处理对大豆蛋白酶解物的影响[J].中国酿造,2011,203(2):132-134  
WANG Zhang-cun, XU Xian. Effects of ultrahigh pressure on enzymolysis of soybean protein [J]. China Brewing, 2011, 203(2): 132-134
- [7] Toldrà M, Parés D, Sagner E, et al. Hemoglobin hydrolysates from porcine blood obtained through enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12: 435-442
- [8] Li H J, Zhu K X, Zhou H M, 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: 808-814
- [9] Church F C, Swaisgood H E, Porter D H, et al. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk

- proteins [J]. Journal Dairy Science, 1983, 66: 1219-1221
- [10] 朱海峰,班玉凤,赵惠.内切酶与端肽酶协同水解大豆蛋白的研究[J].食品科技,2004,4:29-32  
ZHU Hai-feng, BAN Yu-feng, ZHAO Hui. Study on hydrolysis of soybean protein with an exopeptidase and an endopeptidase [J]. Food Science and Technology, 2004, 4: 29-32
- [11] Sabadin I S, Villas-Boas M B, de Lima Zollner R., et al. Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with transglutaminase on  $\beta$ -lactoglobulin antigenicity [J]. European Food Research and Technology, 2012, 235: 801-809
- [12] 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: 478-483
- [13] Peñas E, Préstamo G, Baezac M L, et al. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins [J]. International Dairy Journal, 2006, 16: 831-839
- [14] Harrer A, Egger M, Gadermaier G. Characterization of plant food allergens: An overview on physicochemical and immunological techniques [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2010, 54: 93-112
- [15] Sathe S K, Teuber S S, Roux K H. Effects of food processing on the stability of food allergens [J]. Biotechnology Advances, 2005, 23:423-429