

低温等离子体关键活性粒子对大豆球蛋白结构及致敏性的影响

彭开锋¹, 周迎雪², 李晓娟¹, 刘志伟^{2*}

(1. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南株洲 412000) (2. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 该文通过构建单独活性粒子 ($\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2) 氧化体系和基于低温等离子体技术 (CP) 的活性粒子屏蔽体系 (屏蔽 $\cdot\text{OH}$: 叔丁醇; 屏蔽 H_2O_2 : MnO_2) 的对比研究, 探究 CP 活性粒子 ($\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2) 对大豆球蛋白结构及致敏性影响的特异性。结果表明: 单独 $\cdot\text{OH}$ 氧化体系, 大豆球蛋白与 IgG/IgE 结合能力均随 $\cdot\text{OH}$ 含量增加而逐渐降低至 69.00% (20 mmol/L); CP+叔丁醇的 $\cdot\text{OH}$ 屏蔽氧化体系中, 结合能力由 59.45% (IgG)、52.50% (IgE) (40 kV、2 min), 分别增加至 67.95% (IgG) (100 mmol/L) 和 73.77% (IgE) (300 mmol/L)。单独 H_2O_2 氧化体系, 大豆球蛋白与 IgG/IgE 结合能力均随 H_2O_2 含量增加而降至 65.65% (IgG)、30.84% (IgE) (2.0 mmol/L), 基于 CP+ MnO_2 的 H_2O_2 屏蔽体系中, 随着 MnO_2 添加量的增加, 结合能力分别增加至 91.22% (IgG)、73.90% (IgE) (25 mmol/L)。利用 SDS-PAGE 和内源荧光光谱分别表征蛋白一级结构和三级结构变化, 结果表明, $\cdot\text{OH}$ 通过改变大豆球蛋白一级和三级结构, 而 H_2O_2 改变蛋白三级结构达到消减大豆球蛋白致敏性目的。该研究证实 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 作为具有氧化作用的活性粒子参与 CP 处理对蛋白结构的氧化修饰。

关键词: 低温等离子体; 大豆球蛋白; 活性粒子; 致敏性

文章编号: 1673-9078(2024)03-163-171

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0304

Effects of the Free Radicals in Cold Plasma Treatment on the Structure and Allergenicity of Glycinin

PENG Kaifeng¹, ZHOU Yingxue², LI Xiaojuan¹, LIU Zhiwei^{2*}

(1. Qianjin Pharmaceutical Co. Ltd., Zhuzhou 412000, China)

(2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: A comparative investigation was performed using oxidation systems comprising single active particles, namely $\cdot\text{OH}$ and H_2O_2 , and free radical scavenging systems based on cold plasma (CP) ($\cdot\text{OH}$ scavenging: CP + tertiary butanol; H_2O_2 scavenging: CP + MnO_2) to explore the specificity of different active particles in CP treatment ($\cdot\text{OH}$ and H_2O_2) on the structure and antigenicity of glycinin. The IgG/IgE binding abilities of glycinin were found to gradually decrease

引文格式:

彭开锋, 周迎雪, 李晓娟, 等. 低温等离子体关键活性粒子对大豆球蛋白结构及致敏性的影响[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 163-171.

PENG Kaifeng, ZHOU Yingxue, LI Xiaojuan, et al. Effects of the free radicals in cold plasma treatment on the structure and allergenicity of glycinin [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 163-171.

收稿日期: 2023-03-13

基金项目: 湖南省高新技术产业科技创新引领计划项目 (2022GK4014); 湖南省教育厅优秀青年项目 (277109)

作者简介: 彭开锋 (1984-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: 28450073@qq.com; 共同第一作者: 周迎雪 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品蛋白改性, E-mail: 2789346314@qq.com

通讯作者: 刘志伟 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品非热加工技术, E-mail: zwliu@hunau.edu.cn

to 69.00% as the $\cdot\text{OH}$ concentration increased up to 20 mmol/L in the $\cdot\text{OH}$ oxidation system. In the CP + tertiary butanol oxidation system without $\cdot\text{OH}$, the IgG/IgE binding abilities of glycinin increased from 59.45% (IgG) and 52.50% (IgE) with CP treatment (40 kV, 2 min) alone to 67.95% (IgG) (100 mmol/L tertiary butanol) and 73.77% (IgE) (300 mmol/L tertiary butanol), respectively. Similarly, the IgG /IgE binding abilities of glycinin decreased to 65.65% (IgG) and 30.84% (IgE) as the H_2O_2 concentration increased to 2.0 mmol/L in the H_2O_2 oxidation system. In the CP + MnO_2 oxidation system without H_2O_2 , the binding abilities of glycinin increased to 91.22% (IgG) and 73.90% (IgE) as the MnO_2 concentration increased to 25 mmol/L. Structural analysis based on SDS-PAGE and fluorescence spectra indicate that the $\cdot\text{OH}$ -induced primary and tertiary structure changes of glycinin are directly related to the reduction of the antigenicity of glycinin. Meanwhile, only the tertiary structure of glycinin was modified by H_2O_2 . Therefore, $\cdot\text{OH}$ and H_2O_2 are key active particles in CP treatment for the oxidative modification of protein structures and its related antigenicity elimination.

Key words: cold plasma; glycinin; free radicals; allergenicity

低温等离子体技术 (Cold Plasma, CP) 作为一种利用高能活性氧氮粒子 (RONS) 实现处理基质物性修饰的手段, 因其具有绿色、非热、无化学残留等优势, 近年来在食品加工领域的应用引起极大关注^[1,2]。室温条件下, 气体经高能电场电离产生多种活性粒子 (O 、 O_3 、 $\cdot\text{OH}$ 、 HO_2 、 O_2^- 、 NO 和 ONOO), 形成复杂的 RONS 等离子体氧化体系^[3]。这些活性粒子介导的氧化效应作用于食品基质, 从而实现食品杀菌保鲜以及大分子 (蛋白、淀粉等) 改性修饰等, 尤其是蛋白的改性修饰、消减致敏性及改善其功能特性方面具有良好应用前景^[4,5]。

大豆蛋白作为植物蛋白的重要来源, 因其良好的功能性被广泛应用于植物基蛋白食品加工中^[6]。但作为“八大”过敏原之一, 影响其在食品加工中的应用。大豆球蛋白 (11S) 作为大豆蛋白主要成分, 是抗原性最强的因子之一, 常用于表征大豆蛋白致敏性变化^[7]。借助不同物理、化学及生物技术手段改性蛋白, 从而改变其构象表位和线性表位, 达到消减蛋白致敏性目的是目前研究热点。本课题组前期的研究表明, CP 氧化对蛋白结构的修饰具有消减致敏性的效果, CP 处理 5 min 对大豆球蛋白致敏性消减达到 91.64% (IgG) 和 81.49% (IgE)^[8,9]。另外, Ng 等^[10]报道 CP 对牛奶中的酪蛋白和乳白蛋白的致敏性有显著的消减作用。Ekezie 等^[11]研究表明, CP 处理能有效降低虾原肌球蛋白的致敏性, 抗体的结合能力分别下降 17.60% (IgE) 和 26.87% (IgG)。因 CP 与水溶液相互作用形成 CP 氧化体系过程中, 呈现多场耦合下复杂的化学反应, 导致产生的活性粒子 ($\cdot\text{OH}$ 、 O_3 、 N_xO_y 、 H_2O_2 等) 复杂多样^[12,13]。然而, 关于 CP 氧化体系中对蛋白结构起修饰作用的主要作用粒子, 及不同活性粒子对蛋

白分子结构修饰的特异性还不清楚。因此, 本文以大豆球蛋白为对象, 构建基于 CP 的不同活性粒子屏蔽体系 (屏蔽 $\cdot\text{OH}$: 叔丁醇; 屏蔽 H_2O_2 : MnO_2) 和单独的氧化体系 ($\cdot\text{OH}$, H_2O_2) 的进行对比研究, 通过蛋白氧化程度, 结构及致敏性变化, 探明 CP 氧化体系中活性粒子大豆球蛋白致敏性及结构影响主要活性粒子及消减致敏性的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脱脂豆粕, 山东禹王实业有限公司; SDS-PAGE 凝胶试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 上样缓冲液、分子量指示 Marker、考马斯亮蓝 R250、ECL 超灵敏发光液, 索莱宝生物有限公司科技; 兔抗大豆球蛋白血清, 实验室自制; 大豆过敏患者血清, 湖南省益阳市中心医院; 辣根过氧化酶标记 (HRP) 的羊抗兔 IgG、辣根过氧化酶标记 (HRP) 的羊抗人 IgE, 生工生物工程股份有限公司; ELISA 酶标板, JET BIOFIL; 二氧化锰、叔丁醇, 国药集团化学试剂有限公司; 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

CTP-2000K 等离子体装置, 南京苏曼等离子体科技有限公司; Wix-multipro2 垂直凝胶电泳装置, 威克斯科技有限公司; UV-1800 紫外分光光度计, 日本岛津; F-7000 荧光分光光度计, 日本岛津。

1.3 方法

1.3.1 大豆球蛋白提取与纯化

大豆球蛋白提取方法参照姚利利^[14], 并稍作改动。脱脂豆粕与 Tris HCl 缓冲液 (30 mmol/L, pH

值 8.0, 含 10 mmol/L β - 巯基乙醇) 以 1:15 (m/V) 的比例混合, 并在磁力搅拌器中搅拌 4 h。将混合物在 9 000 \times g 下离心 30 min, 加入亚硫酸氢钠 (0.98 g/L) 至上清液, 用 2 mol/L HCl 调整 pH 值至 6.4。在 4 $^{\circ}$ C 下保存过夜。9 000 \times g 离心 30 min, 用 400 mL 磷酸盐缓冲液 (2.6 mmol/L KH_2PO_4 , 32.5 mmol/L K_2HPO_4 , 0.4 mol/L NaCl, 10 mmol/L β - 巯基乙醇, pH 值 7.6) 溶解沉淀, 加入硫酸铵至 51% 饱和度, 9 000 \times g 离心 30 min, 收集上清液, 加入硫酸铵至 66% 饱和度, 9 000 \times g 下离心 30 min。150 mL 蒸馏水溶解沉淀, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱透析 48 h, 每 8 h 更换一次蒸馏水。透析完成收集样品冻干, 于 -18 $^{\circ}$ C 保存, 用于后续分析。

1.3.2 不同氧化体系的构建

(1) CP 处理: 将大豆球蛋白 (2 mg/mL) 分散于去离子水中, 室温搅拌 30 min, 充分水化。将大豆球蛋白样品 (5 mL) 装入石英容器, 40 kV、12 kHz 下 CP 处理 2 min, 处理后, 使用 2 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0, 4 $^{\circ}$ C 储藏备用。

(2) 活性粒子屏蔽体系: 方法参照吴京蔚^[15]。将大豆球蛋白 (2 mg/mL) 分散于去离子水中, 室温搅拌 30 min, 充分水化。分别加入自由基屏蔽剂叔丁醇 (100、200、300 mmol/L)、二氧化锰 (25、50、100 mmol/L), 震荡均匀, 取 5 mL 装入石英容器, 40 kV、12 kHz 下 CP 处理 2 min, 使用 2 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0, 4 $^{\circ}$ C 储藏备用。

(3) 羟基氧化体系构建: 采用 $\text{FeCl}_3/\text{Vc}/\text{H}_2\text{O}_2$ (芬顿体系) 构建羟基自由基氧化体系^[16], (反应过程: $\text{Vc} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$, $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+}$) 其中 FeCl_3 浓度为 0.1 mmol/L, Vc 浓度为 0.1 mmol/L, H_2O_2 浓度分别为 0、0.5、5、10 和 20 mmol/L, 将大豆球蛋白 (2 mg/mL, m/V) 分散于上述氧化体系, 室温搅拌 30 min, 充分水化, 共计反应 2h, 用 1 mmol/L EDTA 终止, 使用 2 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0, 4 $^{\circ}$ C 储藏备用。

(4) 过氧化氢氧化体系构建: 配制 0、0.25、0.5、1.0、2.0 mmol/L 的过氧化氢氧化体系, 将大豆球蛋白分散于上述氧化体系, 室温搅拌 30 min, 充分水化, 反应 2 h, 用 1 mmol/L 硫代硫酸钠终止, 2 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0, 4 $^{\circ}$ C 储藏备用。

1.3.3 巯基含量测定

0.5 mL 大豆球蛋白溶液 (2 mg/mL) 与 0.5 mL 的含有 10 mmol/L 2,4- 二硝基苯肼的 2 mol/L HCl 混合, 室温孵育 40 min。另取 0.5 mL 大豆球蛋白溶液

(2 mg/mL) 与 0.5 mL 的不含有 2,4- 二硝基苯肼的 2 mol/L HCl 混合, 室温孵育 40 min, 作为空白对照。每个试管中加入 0.5 mL 20% 的三氯乙酸, 震荡混匀后静置 10 min, 离心 (12 000 r/min, 5 min, 10 $^{\circ}$ C)。弃去上清液, 用 1.0 mL 的乙醇 - 乙酸乙酯溶液 (1:1, V/V) 洗涤沉淀 3 次后, 用 1.0 mL 6 mol/L 盐酸胍溶液溶解蛋白, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。利用分光光度计于 370 nm 测定吸光值, 记录数值, 盐酸胍溶液调零。

$$B = \frac{(A_0 - A_1) \times V_2}{\epsilon \times d \times C_1 \times V_1} \quad (1)$$

式中:

B ——巯基含量, $\mu\text{mol/g}$;

A_0 ——样品吸光度;

A_1 ——空白对照吸光度;

V_2 ——最终体积, 1 mL;

ϵ ——消光系数, 22 000 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

d ——比色皿厚度, 1 cm;

C_1 ——蛋白质量浓度, 2 mg/mL;

V_1 ——样品体积, 0.5 mL。

1.3.4 SDS-PAGE凝胶电泳

于 0.5 mL 离心管中按 4:1 (V/V) 的比例加入 80 μL 大豆球蛋白样品 (1 mg/mL) 和 20 μL 还原型 Loading buffer, 震荡混匀后, 在 90 $^{\circ}$ C 的金属加热器加热 10 min, 凝胶电泳参数: 上样量: 10 μL , 电压: 75 V, 时间: 1 h, 染色: 40 min, 脱色 (具体的脱色液), 拍照。

1.3.5 内源荧光光谱

内源荧光光谱测定: 使用 0.1 mol/L, pH 值 7.0 磷酸缓冲液将大豆球蛋白样品 (2 mg/mL) 稀释至 0.1 mg/mL。激发波长: 280 nm, 激发和发射狭缝宽度: 2.5 nm, 发射波长: 300~400 nm, 扫描、记录数据。

1.3.6 ELISA

利用酶联免疫吸附法测定大豆球蛋白抗原性。大豆球蛋白样品 (2 mg/mL) 用包被液 (0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 值 7.4) 稀释至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 取 100 μL 样品加入 96 孔酶标板, 封板膜覆盖平板, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置过夜。TBST 缓冲液洗涤 3 次后拍干 (每孔 400 μL), 每孔加入 250 μL 封闭液 ($m=5\%$ 脱脂牛奶蛋白) 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次后拍干, 每孔加入 100 μL 一抗 (IgG、IgE), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次后拍干, 每孔加入 100 μL 二抗 (IgG、IgE), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次后拍干, 加入 100 μL TMB 显色液 37 $^{\circ}$ C, 避光

反应 15 min。每孔加入 50 μL H_2SO_4 (2 mol/L) 终止液终止反应。用酶标仪于 450 nm 测定样品吸光度。

$$E = \frac{A - A_{kb}}{A_2 - A_{kb}} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

E —IgG/IgE 结合能力, %;

A —处理样品在 450 nm 处的吸光度;

A_2 —未处理样品在 450 nm 处的吸光度;

A_{kb} —空白孔吸光度。

1.3.7 统计分析

所有数据采用单因素方差分析法 (ANOVA) 进行显著性分析, 并以平均 \pm 标准差表示, 用 Origin 2019 进行作图。

2 结果与分析

2.1 羟基自由基对大豆球蛋白结构及致敏性影响

2.1.1 大豆球蛋白羰基含量变化

羰基是氨基酸氧化中间产物, 为衡量蛋白氧化程度的重要指标。构建的不同浓度 $\cdot\text{OH}$ 芬顿体系对大豆球蛋白氧化程度的影响结果如图 1 所示, 羰基含量随着 $\cdot\text{OH}$ 浓度的增加而逐渐增加, 从 1.33 (未处理) 增加到 3.37 $\mu\text{mol/g}$ (5.0 mmol/L), 最终达到最大值 5.27 $\mu\text{mol/g}$ (20 mmol/L), 该结果与卢岩^[17]研究中大豆分离蛋白的羰基含量随 $\cdot\text{OH}$ 浓度增加的变化趋势相一致, 章银良等^[18]研究表明 $\cdot\text{OH}$ 进攻氨基酸分子的 NH/NH_2 生成了羰基及其衍生物, 由此证明 $\cdot\text{OH}$ 对蛋白具有一定氧化作用, 并且氧化强度与 $\cdot\text{OH}$ 含量呈正相关。叔丁醇是公认的最有效的 $\cdot\text{OH}$ 屏蔽剂之一, 其通过 $-\text{CH}_3$ 基脱氢与 $\cdot\text{OH}$ 生成 H_2O 方式消耗周围环境中 $\cdot\text{OH}$, 其过程为: $(\text{CH}_3)_3\text{COH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$, 研究证实叔丁醇对 $\cdot\text{OH}$ 的淬灭迅速且稳定, 淬灭率可达 70.8%^[19-21]。图 1b 考察了叔丁醇添加量对 CP 氧化体系中 $\cdot\text{OH}$ 的屏蔽效果, 大豆球蛋白样品经 CP 处理 2 min 羰基含量从 1.50 (未处理) 增加到 7.53 $\mu\text{mol/g}$ ($P < 0.05$), 但随着叔丁醇的添加, 羰基含量下降至 6.80 $\mu\text{mol/g}$ (200 mmol/L), 表明等离子氧化体系对蛋白氧化作用降低, 这一现象与戴慧旺^[19]研究不同醇浓度对 UV-Fenton 体系降解染料橙 II 速率的变化一致, 随淬灭剂叔丁醇浓度的增大橙 II 降解速率下降, 主要是由于单位时间内争夺羟基自由基的淬灭剂数量增加, 使环境中 $\cdot\text{OH}$ 的氧化作用被抑制;

当叔丁醇浓度增大至 300 mmol/L, 羰基含量增加至 12.30 $\mu\text{mol/g}$, 其变化与叔丁醇较高浓度导致蛋白变性有关, 该趋势同样出现在蔡燕等^[22]探究不同粗酶液与叔丁醇比例对脂氧酶分配的影响研究中, 随着叔丁醇比例高于 1:2.5, 脂肪氧合酶蛋白变性增加, 使酶纯度和回收活力下降。综上所述, $\cdot\text{OH}$ 具有氧化作用, 且在 CP 介导的氧化体系中发挥作用, 当体系中存在 $\cdot\text{OH}$ 屏蔽剂时, 其氧化作用受到抑制, 从而表现为整个体系氧化能力的轻微减弱。

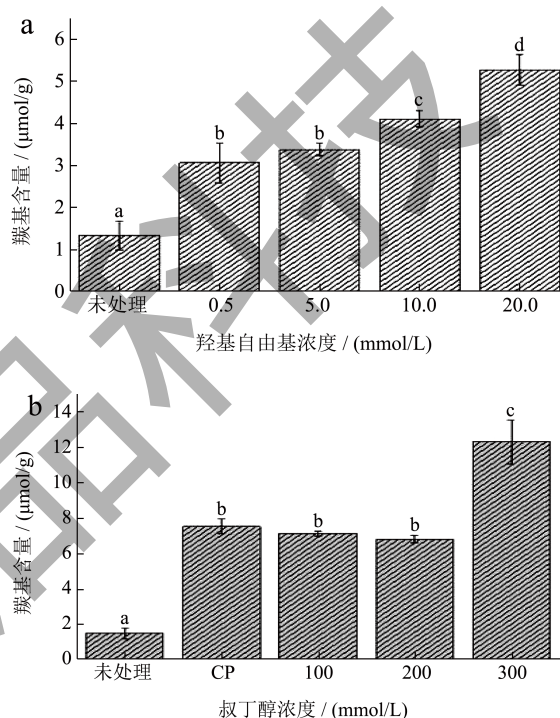


图 1 不同氧化体系对大豆球蛋白羰基含量的影响

Fig.1 The effect of different oxidation systems on carbonyls content of glycinin

注: (a) $\cdot\text{OH}$ 氧化体系; (b) $\cdot\text{OH}$ 粒子屏蔽体系。小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 1~4 同。

2.1.2 SDS-PAGE

通过 SDS-PAGE 研究不同处理对大豆球蛋白一级结构影响。大豆球蛋白是一种六聚体蛋白 (320~360 ku), 由酸性链和碱性链组成, 如图 2 所示, 观察到的 3 条特定蛋白条带, 分别为酸性链 (35 ku 左右) 和碱性链 (15 ku 左右)。图 2a 中, 蛋白条带强度变化随 $\cdot\text{OH}$ 浓度增加呈下降趋势, 当 $\cdot\text{OH}$ 浓度为 0.5~10 mmol/L, 条带变化不显著; 浓度增加 20 mmol/L, 条带强度显著减弱, 该结果表明, $\cdot\text{OH}$ 改变大豆球蛋白一级结构, 使氨基酸链断开, 形成小分子肽。图 2b 中, 与对照相比, CP+ 叔丁醇的 $\cdot\text{OH}$ 屏蔽体系中蛋白条带强度均出

现减弱。另外,与CP处理2 min相比, $\cdot\text{OH}$ 屏蔽体系中蛋白条带出现先增强后减弱的现象,当叔丁醇添加量为100 mmol/L时样品蛋白条带增强,而浓度增加至300 mmol/L条带强度再次降低,该趋势与羰基含量变化保持一致,即叔丁醇的加入抑制 $\cdot\text{OH}$ 活性使氧化作用减弱,而叔丁醇不断累积导致蛋白变性程度增加。

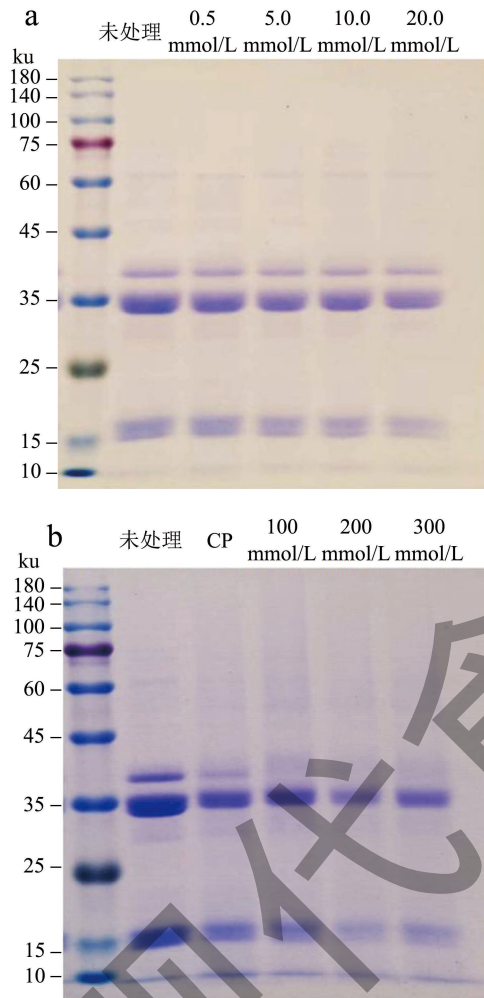


图2 不同氧化体系对大豆球蛋白一级结构的影响

Fig.2 The effect of different oxidation systems on primary structure of glycinin

2.1.3 大豆球蛋白三级结构变化

通过内源荧光光谱表征大豆球蛋白三级结构的变化,结果如图3所示。 $\cdot\text{OH}$ 氧化体系中,未处理样品在335 nm附近出现最大荧光强度(FI_{\max}),且随 $\cdot\text{OH}$ 浓度增加 FI_{\max} 逐渐下降(图3a)。 $\cdot\text{OH}$ 屏蔽体系中,与未处理相比,不同处理下样品的 FI_{\max} 均显著降低,同时伴随明显的 λ_{\max} 蓝移,其中CP处理2 min荧光强度最低,随着叔丁醇添加量的增加样品荧光强度逐渐增加(图3b),这一变化与吴

伟^[23]研究中大豆蛋白经氧化后变化相一致。研究表明蛋白内源荧光决定于芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸), λ_{\max} 与色氨酸残基所处微环境的有关, λ_{\max} 大于330 nm则表明色氨酸残基位于蛋白质分子外部的极性环境,此外Wang等^[24]研究表明色氨酸易被CP处理过程中产生的活性物质氧化而发生荧光淬灭,Takai等^[25]通过高分辨率质谱仪发现,色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸经 $\cdot\text{OH}$ 处理后氨基酸中的苯环被氧化,发生羟基化及硝化^[26]。由此可推断,本实验中荧光强度的显著变化源于不同氧化体系对蛋白三级结构的改变,使处于蛋白表面极性环境中的芳香族疏水氨基酸(色氨酸)被活性物质氧化产生荧光淬灭; $\cdot\text{OH}$ 积累对三级结构产生影响,表现为荧光强度下降,但与 $\cdot\text{OH}$ 处理的样品相比较,单独 $\cdot\text{OH}$ 的氧化作用较弱;此外CP处理之前添加叔丁醇, $\cdot\text{OH}$ 含量下降,CP处理介导的氧化作用随之减弱,最终表现为荧光强度的增加,这与羰基含量变化保持一致,再次证明 $\cdot\text{OH}$ 在CP处理过程中发挥作用。

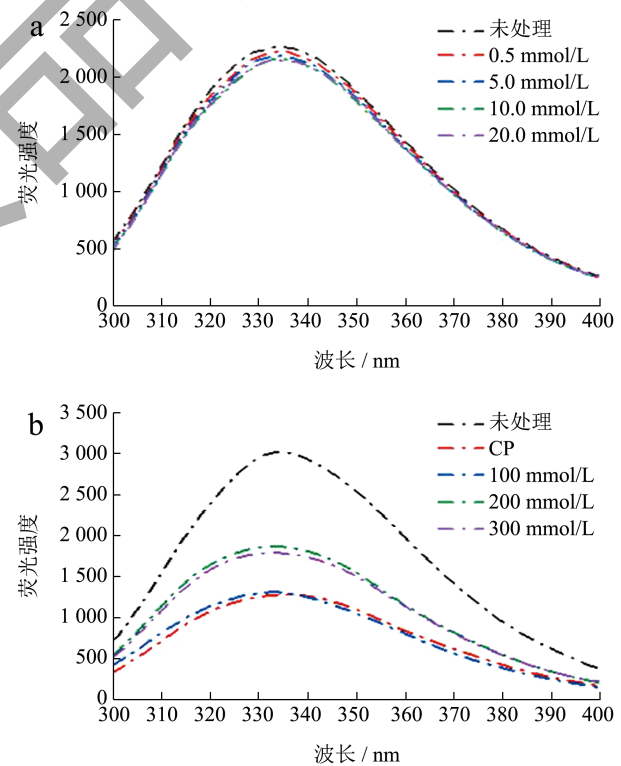


图3 不同氧化体系对大豆球蛋白三级结构的影响

Fig.3 The effect of different oxidation systems on tertiary structure of glycinin

2.1.4 大豆球蛋白与IgG、IgE结合能力变化

抗原蛋白与IgG/IgE的结合能力反映了蛋白的致敏性,ELISA作为定量表征蛋白与抗体结合能力

的手段, 常用来评估不同加工手段对蛋白致敏性消减。图4展示了不同氧化体系下大豆球蛋白致敏性变化。 $\cdot\text{OH}$ 氧化体系中, 大豆球蛋白与IgG/IgE结合能力均随 $\cdot\text{OH}$ 含量增加而逐渐下降, 当 $\cdot\text{OH}$ 的浓度为20 mmol/L时, IgG/IgE均降至约69.00% ($P < 0.05$) (图4a)。CP+叔丁醇的 $\cdot\text{OH}$ 屏蔽体系中, 经CP处理2 min, 大豆球蛋白与IgG/IgE结合能力分别下降至59.45% (IgG)、52.50% (IgE), 该结果与本团队^[8]先前研究CP处理消减大豆球蛋白致敏性变化保持一致。随着叔丁醇的加入, 大豆球蛋白与IgG/IgE结合能力分别增加至67.95% (IgG)、55.37% (100 mmol/L) (IgE), 且与IgE结合能力增大至73.77% (300 mmol/L), 结合羰基含量变化可知, 叔丁醇的加入抑制了羟基粒子的氧化作用从而表现为CP处理对消减蛋白致敏能力的轻微下降, 而IgG结合能力随叔丁醇浓度增加持续下降, 则与叔丁醇含量过度导致蛋白变性有关。通过比较两种体系可知, $\cdot\text{OH}$ 的氧化作用改变蛋白一级结构和三级结构, 一定程度上破坏了抗原蛋白的构象表位与线性表位, 导致大豆球蛋白致敏性降低, 另外, 通过 $\cdot\text{OH}$ 屏蔽体系的研究证明 $\cdot\text{OH}$ 作为主要的活性粒子参与了CP对蛋白的氧化修饰作用。

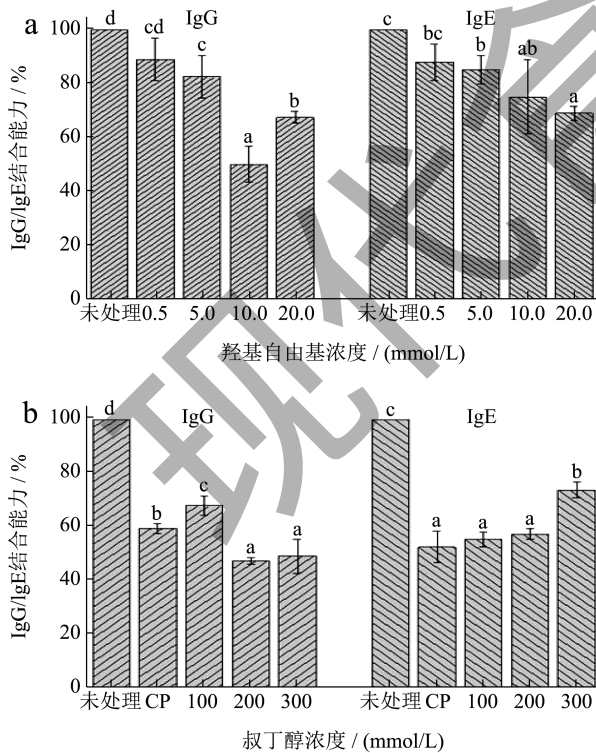


图4 不同氧化体系对大豆球蛋白IgG/IgE结合能力的影响
Fig.4 The effect of different oxidation systems on the IgG/IgE binding capacity of glycinin

2.2 H₂O₂粒子对大豆球蛋白致敏性及结构影响

2.2.1 大豆球蛋白羰基含量变化

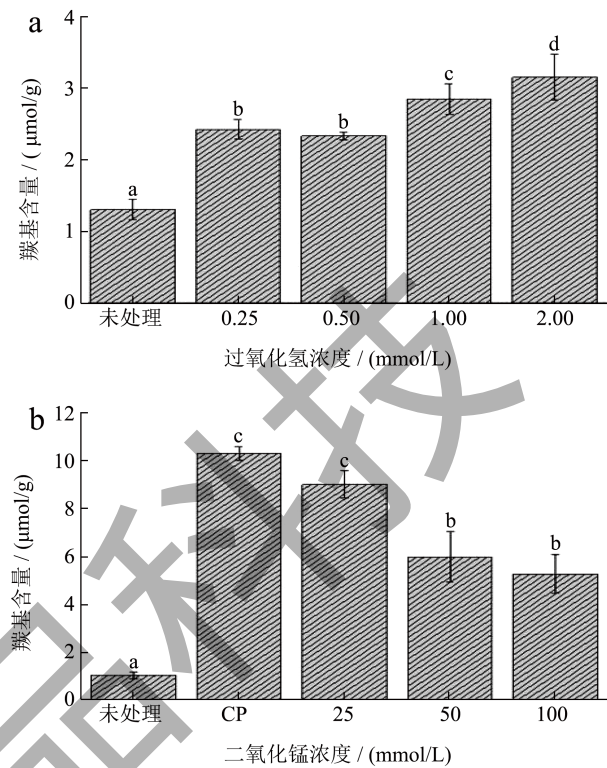


图5 不同氧化体系对大豆球蛋白羰基含量的影响

Fig.5 The effect of different oxidation systems on carbonyl content of glycinin

注: a: H₂O₂氧化体系; b: H₂O₂粒子屏蔽体系。小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图5a为不同浓度H₂O₂体系羰基含量变化, 其中羰基含量随H₂O₂浓度的增加从1.30 μmol/g (未处理) 增加到2.42 μmol/g (0.25 mmol/L), 最终达到最大值3.15 μmol/g (2.0 mmol/L), 该结果与赵冰等^[27]研究中肌原纤维蛋白的羰基含量随H₂O₂浓度增加的变化趋势一致, 表明H₂O₂对大豆球蛋白具有氧化作用, 且氧化强度与H₂O₂含量正相关。本实验采用MnO₂作为H₂O₂屏蔽剂, Bokare等^[28]证实MnO₂可促进H₂O₂分解, 张士豪^[29]推断MnO₂屏蔽H₂O₂过程为: $\text{MnO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Mn}(\text{OH})_2 + \text{O}_2$; $\text{Mn}(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Mn}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{MnO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ 。图5b展示了MnO₂添加量对CP氧化体系中H₂O₂的屏蔽效果, 经CP处理2 min, 大豆球蛋白样品的羰基含量从1.03 μmol/g (未处理) 增加到10.28 μmol/g, 加入MnO₂后羰基含量逐步下降至5.25 μmol/g (100 mmol/L)

($P < 0.05$), 表明 MnO_2 催化 H_2O_2 降低了 CP 处理对大豆球蛋白的氧化作用, 这一推断与张士豪^[29]添加 MnO_2 探究 H_2O_2 对壳聚糖降解作用的结论一致。综上可知, H_2O_2 对蛋白具有氧化作用, 且作用强度随粒子含量而增强; 此外 H_2O_2 参与 CP 介导的氧化体系, 当体系中存在 H_2O_2 屏蔽剂 CP 处理对大豆球蛋白的氧化效果大大削弱。

2.2.2 SDS-PAGE

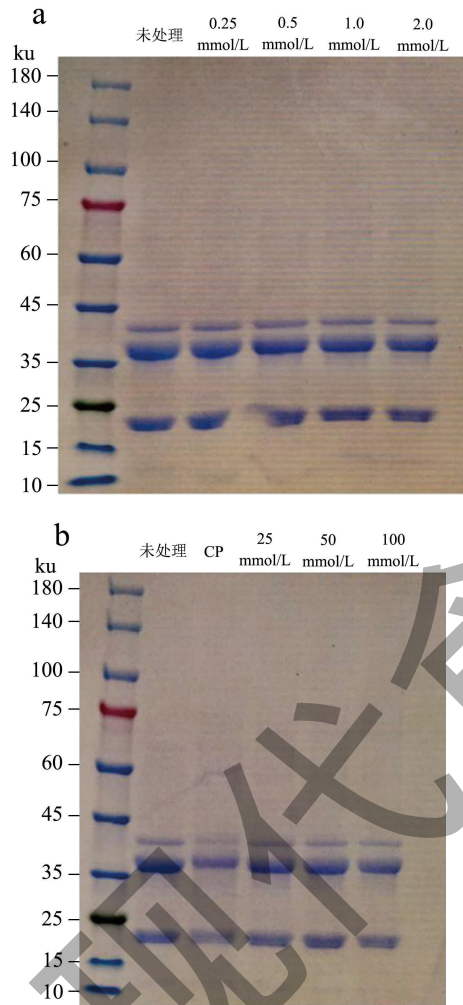


图 6 不同氧化体系对大豆球蛋白一级结构的影响

Fig.6 The effect of different oxidation systems on primary structure of glycinin

如图 6 所示, 每个样品均存在 3 条特定条带, 图 6a 中, 不同样品蛋白条带强度基本一致, 表明 H_2O_2 氧化体系未对大豆球蛋白一级结构产生影响, 相同氧化条件下 (粒子浓度 0.5 mmol/L) 两种氧化体系中羰基含量基本一致, 分别为 $3.06 \mu\text{mol/g}$ ($\cdot\text{OH}$)、 $2.33 \mu\text{mol/g}$ (H_2O_2), 但 $\cdot\text{OH}$ 粒子可改变蛋白一级结构, 表现为蛋白条带强度减弱。图 6b 中, CP+ MnO_2 的 H_2O_2 屏蔽体系中蛋白条带强度弱于对

照, 但强于 CP 处理 2 min 的样品, 表明 H_2O_2 粒子参与 CP 处理且在处理过程中对蛋白一级结构产生影响, CP 处理因与多种催化剂存在协同作用, 常被用于降解大气和液体中的污染物, 由此推测 CP 处理过程 H_2O_2 与其他粒子存在协同作用, 添加屏蔽剂后 H_2O_2 含量骤减协同作用减弱, 对蛋白一级结构的影响减弱表现为蛋白条带强度增强^[30-32]。此外 MnO_2 添加量不同样品间蛋白条带强度无显著差异, 结合张士豪^[29]研究中将壳聚糖降解粘度不随 MnO_2 添加量增加而变化的对应 MnO_2 浓度作为反应终点, 可推断 25 mmol/L 的 MnO_2 可将 CP 处理 2 min 产生的 H_2O_2 粒子基本清除。综上所述, H_2O_2 氧化体系对大豆球蛋白一级结构无影响; 但 H_2O_2 粒子参与 CP 处理介导的氧化作用, 且与 CP 处理过程中产生的其他粒子存在协同作用。

2.2.3 大豆球蛋白三级结构变化

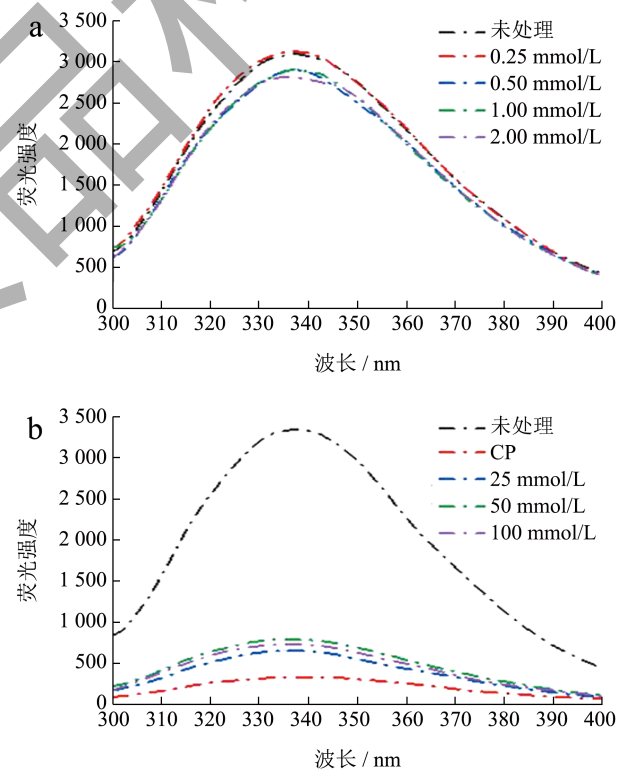


图 7 不同氧化体系对大豆球蛋白样品三级结构的影响

Fig.7 The effect of different oxidation systems on tertiary structure of glycinin

图 7a 中不同蛋白样品的 λ_{max} 均在 335 nm 附近, 经 H_2O_2 氧化体系处理的样品 FI_{max} 随 H_2O_2 浓度增加逐渐下降, 图 7b 为 H_2O_2 粒子屏蔽体系, 与对照相比, 经 CP 处理 2 min 样品荧光强度降至最低, CP+ MnO_2 体系样品 FI_{max} 随 MnO_2 添加量增加而增

强, 结合 2.1.3 讨论可知, 荧光强度的变化可表征蛋白三级结构的改变, 表明 H_2O_2 氧化体系以及 CP 处理均对大豆球蛋白三级结构产生影响, 使蛋白样品中的色氨酸产生荧光猝灭; 而添加 MnO_2 导致 H_2O_2 含量下降, CP 处理介导的氧化强度减弱, 表现为样品荧光强度的增加。这与 CP+ MnO_2 氧化体系的羰基含量及蛋白一级结构变化保持一致, 证明 H_2O_2 在 CP 处理过程中发挥作用。

2.2.4 大豆球蛋白与 IgG、IgE 结合能力变化

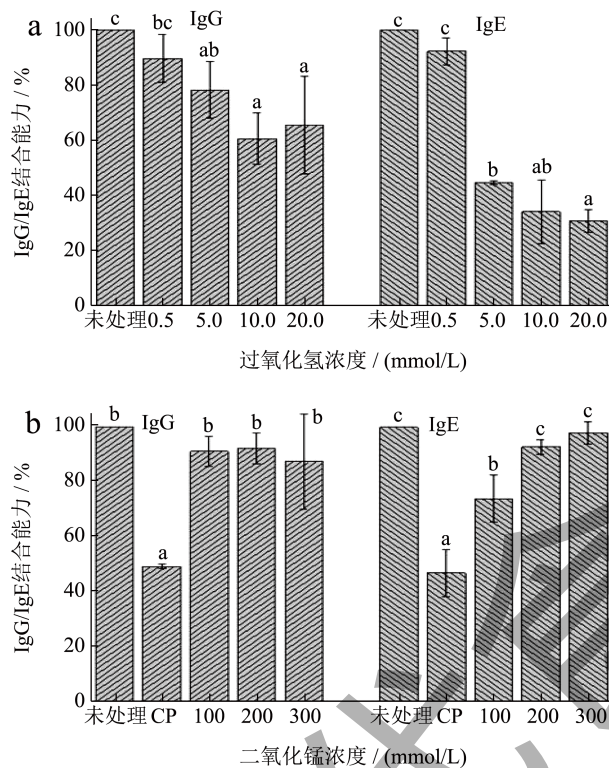


图 8 不同氧化体系对大豆球蛋白 IgG/IgE 结合能力的影响
Fig.8 The effect of different oxidation systems on the IgG/IgE binding capacity of glycinin

H_2O_2 氧化体系下大豆球蛋白与 IgG/IgE 结合能力变化如图 8a 所示, 随 H_2O_2 含量增加下降至 65.65% (IgG)、30.84% (IgE) (2.0 mmol/L) ($P < 0.05$), 与邓倩莹等^[33] 研究中 H_2O_2 含量增加导致壳聚糖降解能力提高的变化趋势相一致。由图 8b CP+ H_2O_2 的 MnO_2 屏蔽体系可知, 经 CP 处理 2 min, 大豆球蛋白与 IgG/IgE 结合能力分别下降至 49.32% (IgG)、46.90% (IgE), 表明 CP 处理可消减大豆球蛋白致敏性, 随着 MnO_2 的加入, 大豆球蛋白与 IgG/IgE 结合能力分别增加至 91.22% (IgG)、73.90% (IgE) (25 mmol/L) ($P < 0.05$), 且与 IgE 结合能力增大至 97.92% (100 mmol/L), 与吴京蔚^[15] 研究中添加 MnO_2 后 H_2O_2 对黑木耳多糖降解作用减弱相一

致, 结合羰基含量变化可知, MnO_2 的加入导致体系中 H_2O_2 含量大幅下降, 抑制 CP 处理的氧化作用最终表现为 CP 处理消减蛋白致敏能力的显著下降。通过比较 H_2O_2 氧化体系和 H_2O_2 粒子屏蔽体系可知, H_2O_2 氧化体系通过改变蛋白三级结构破坏抗原蛋白构象表位, 导致大豆球蛋白致敏性降低, 此外 CP+ MnO_2 屏蔽体系证明 H_2O_2 粒子参与 CP 对大豆球蛋白的氧化修饰, 并通过与其他粒子的协同作用改变蛋白一级和三级结构。

3 结论

本研究通过构建不同氧化体系探究了 CP 处理过程中 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 的对大豆球蛋白结构影响的特异性其结论如下:

(1) $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 均参与 CP 处理对大豆球蛋白的氧化修饰, 且对蛋白结构影响存在特异性, $\cdot\text{OH}$ 粒子在 CP 处理过程中可直接改变大豆球蛋白一级和三级结构, 而 H_2O_2 粒子仅改变蛋白三级结构, 其对一级结构的改变通过与 CP 处理产生的其他粒子协同作用而实现。

(2) 对大豆球蛋白不同样品与 IgG/IgE 结合能力的分析可知: $\cdot\text{OH}$ 通过氧化修饰蛋白一级结构和三级结构, 同时破坏抗原蛋白线性表位和构象表位消减蛋白致敏性, 而 H_2O_2 主要通过氧化蛋白三级结构, 破坏抗原蛋白构象表位发挥作用, 氧化作用未涉及一级结构的变化。

研究的不足, CP 所涉及的粒子及中间产物复杂多样, 而且存在不同粒子间协同作用, 因此, 关于 CP 处理过程中活性粒子对蛋白结构的修饰, 及其在处理过程中的动态变化还有待进步深入研究。

参考文献

- [1] OLATUNDE O O, SHIEKH K A, BENJAKUL S. Pros and cons of cold plasma technology as an alternative non-thermal processing technology in seafood industry [J]. Trends in Food Science Technology, 2021, 111: 617-627.
- [2] SUN X, SALEH A S, SUN Z, et al. Modification of multi-scale structure, physicochemical properties, and digestibility of rice starch via microwave and cold plasma treatments [J]. LWT, 2022, 153: 112483.
- [3] VOLKOV A G, BOOKAL A, HAIRSTON J S, et al. Mechanisms of multielectron reactions at the plasma/water interface: Interfacial catalysis, RONS, nitrogen fixation, and plasma activated water [J]. Electrochimica Acta, 2021, 385: 138441.
- [4] 侯新磊, 赵楠, 葛黎红, 等. 低温等离子体对低盐泡菜生

- 花腐败的抑制及贮藏期品质的影响[J].食品科学,2022,43(21):282-290.
- [5] ZHU H, HAN Z, CHENG J H, et al. Modification of cellulose from sugarcane (*Saccharum officinarum*) bagasse pulp by cold plasma: Dissolution, structure and surface chemistry analysis [J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131675.
- [6] ZHAO Q, XIE T, HONG X, et al. Modification of functional properties of perilla protein isolate by high-intensity ultrasonic treatment and the stability of o/w emulsion [J]. Food Chemistry, 2022, 368: 130848.
- [7] DE JONG N W, VAN SPLUNTER M E, EMONS J A, et al. Introduction of heated cow's milk protein in challenge-proven cow's milk allergic children: The iAGE study [J]. Nutrients, 2022, 14(3): 629.
- [8] LIU ZW, ZHOU YX, WANG F, et al. Oxidation induced by dielectric barrier discharge (DBD) plasma treatment reduces IgG/IgE binding capacity and improves the functionality of glycinin [J]. Food Chemistry, 2021, 363: 130300.
- [9] LIU ZW, LIU LJ, ZHOU YX, et al. Dielectric-barrier discharge (DBD) plasma treatment reduces IgG binding capacity of β -lactoglobulin by inducing structural changes [J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129821.
- [10] NG S W, LU P, RULIKOWSKA A, et al. The effect of atmospheric cold plasma treatment on the antigenic properties of bovine milk casein and whey proteins [J]. Food Chemistry, 2021, 342: 128283.
- [11] EKEZIE FG C, SUN DW, CHENG JH. Altering the IgE binding capacity of king prawn (*Litopenaeus vannamei*) tropomyosin through conformational changes induced by cold argon-plasma jet [J]. Food Chemistry, 2019, 300: 125143.
- [12] DONG X, WANG J, RAGHAVAN V. Critical reviews and recent advances of novel non-thermal processing techniques on the modification of food allergens [J]. Critical Reviews in Food Science Nutrition, 2021, 61(2): 196-210.
- [13] SRUTHI N, JOSNA K, PANDISELVAM R, et al. Impacts of cold plasma treatment on physicochemical, functional, bioactive, textural, and sensory attributes of food: A comprehensive review [J]. Food Chemistry, 2022, 368: 130809.
- [14] 姚利利.热加工后大豆球蛋白抗原性变化DAS-ELISA检测方法的建立[D].郑州:河南工业大学,2021.
- [15] 吴京蔚.等离子体与H₂O₂协同降解黑木耳多糖及其作用机理研究 [D].沈阳:沈阳农业大学,2018.
- [16] 方海砚,苑歆,刘友明,等.羟自由基氧化对鲢鱼肌原纤维蛋白结构的影响 [J].食品工业科技,2020,41(4):6-12.
- [17] 卢岩,耿蕊,孔保华,等.羟自由基氧化对大豆分离蛋白理化
- 和乳化特性的影响[J].食品工业科技,2014,35(23):63-67.
- [18] 章银良,杨慧,安巧云.羟自由基诱导蛋白质氧化损伤的研究[J].食品与生物技术学报,2014,31(3):313-318.
- [19] 戴慧旺,陈建新,苗笑增,等.醇类对UV-Fenton体系羟基自由基淬灭效率的影响[J].中国环境科学,2018,38(1):202-209.
- [20] PELLER J, WIEST O, KAMAT P V. Sonolysis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in aqueous solutions. Evidence for ·OH-radical-mediated degradation [J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2001, 105(13): 3176-3181.
- [21] MONTEAGUDO J, DURÁN A, SAN MARTÍN I, et al. Roles of different intermediate active species in the mineralization reactions of phenolic pollutants under a UV-A/C photo-Fenton process [J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2011, 106(1-2): 242-249.
- [22] 蔡燕,田丹,严鑫,等.一步法快速从脱脂豆粉中三相分离脂肪氧合酶[J].食品与发酵工业,2021,47(9):149-153.
- [23] 吴伟.蛋白质氧化对大豆蛋白结构和凝胶性质的影响[D].无锡:江南大学,2010.
- [24] WANG K, SUN DW, PU H, et al. Principles and applications of spectroscopic techniques for evaluating food protein conformational changes: A review [J]. Trends in Food Science Technology, 2017, 67: 207-219.
- [25] TAKAI E, KITAMURA T, KUWABARA J, et al. Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution [J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2014, 47(28): 285403.
- [26] LEFEVRE F, FAUCONNEAU B, THOMPSON J W, et al. Thermal denaturation and aggregation properties of Atlantic salmon myofibrils and myosin from white and red muscles [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2007, 55(12): 4761-4770.
- [27] 赵冰,李素,张顺亮,等.蛋白氧化对肌原纤维蛋白凝胶构效关系的影响[J].食品科学,2018,39(3):55-61.
- [28] BOKARE A D, CHOI W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes [J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 275: 121-135.
- [29] 张士豪.自由基屏蔽剂调控等离子体降解对壳聚糖流变行为、结构表征的影响及降解机理初步分析[D].沈阳:沈阳农业大学,2020.
- [30] 马可可,周律,白昱,等.低温等离子体协同催化氧化水处理技术的研究进展[J].应用化工,2021,50(10):2775-2779.
- [31] 李长英.低温等离子体协同催化降解甲苯实验研究[D].淮南:安徽理工大学,2016.
- [32] 陈鹏,陶雷,谢怡冰,等.低温等离子体协同催化降解挥发性有机物的研究进展[J].化工进展,2019,38(9):4284-4294.
- [33] 邓倩莹,李立华,李毅群,等.溶菌酶,过氧化氢对壳聚糖降解性能的影响[J].化学世界,2005,46(6):338-340.