

# 挤压膨化温度对大豆分离蛋白抗原性及结构的影响

常永锋<sup>1</sup>, 陈屹轩<sup>1</sup>, 布冠好<sup>1</sup>, 高雪丽<sup>2</sup>, 赵青青<sup>1</sup>, 罗琼<sup>1</sup>

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001; 2. 许昌学院食品与药学院, 河南许昌 461000)

**摘要:**旨在为开发大豆蛋白的脱敏技术提供参考, 对大豆分离蛋白(SPI)进行挤压膨化处理, 对不同挤压膨化温度下SPI的抗原性、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、氨基酸组成、溶解度、紫外吸收光谱、内源荧光光谱及表面疏水性进行分析。结果表明:随着挤压膨化温度的升高, SPI抗原性呈现先降低再升高的趋势, 145℃时SPI的抗原性下降最为显著; SPI中抗原蛋白 $\beta$ -伴大豆球蛋白的 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$ 亚基以及大豆球蛋白的酸性亚基和碱性亚基均发生明显降解; SPI的氨基酸组成、必需氨基酸含量与氨基酸总量比值无明显变化, 营养性保持良好; SPI溶解度降低; 氢键、二硫键、疏水相互作用均是维持SPI空间结构的分子作用力, 其中氢键起主要作用; SPI的紫外光谱和内源荧光光谱均出现不同程度的红移, 紫外吸收强度及荧光强度发生变化, 表面疏水性显著下降, SPI的三级结构发生改变。综上, 挤压膨化能够在一定程度上降低SPI的抗原性, 并影响其空间结构。

**关键词:**大豆分离蛋白; 挤压膨化; 抗原性; 蛋白质结构

中图分类号: TS229; O656.4

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2024)12-0013-07

## Effect of extrusion temperature on antigenicity and structure of soybean protein isolate

CHANG Yongfeng<sup>1</sup>, CHEN Yixuan<sup>1</sup>, BU Guanhao<sup>1</sup>, GAO Xueli<sup>2</sup>, ZHAO Qingqing<sup>1</sup>, LUO Qiong<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. School of Food and Pharmacy, Xuchang University, Xuchang 461000, Henan, China)

**Abstract:** In order to provide reference for the development of desensitization technology of soybean protein, the antigenicity, SDS-PAGE, amino acid composition, solubility, UV absorption spectra, endogenous fluorescence spectra and surface hydrophobicity of the soybean protein isolate (SPI) extruded at different extrusion temperatures. The results showed that the antigenicity of SPI decreased first and

收稿日期: 2023-05-22; 修回日期: 2024-06-27

基金项目: 河南省自然科学基金面上项目(242300421317); 国家自然科学基金项目(32472289, 31871748); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划(2019GGJS084); 河南工业大学青年骨干教师培育计划(21420064); 郑州市科技协同创新专项(21ZZXTCX17); 中国博士后科学基金面上项目(2021M701112); 河南工业大学创新基金支持计划专项资助(2021ZKCJ03)

作者简介: 常永锋(1998), 男, 在读硕士, 研究方向为蛋白质资源开发及利用(E-mail) 13525512035@163.com。

通信作者: 布冠好, 教授, 博士(E-mail) buguanhao2008@126.com。

then increased with the increase of extrusion temperature, and the antigenicity of SPI decreased most significantly at 145℃. The  $\alpha$ ,  $\alpha'$  and  $\beta$  subunits of the antigen protein  $\beta$ -conglycinin and the acidic and basic subunits of glycinin in SPI were significantly degraded. The amino acid composition and the ratio of essential amino acids to total amino acids of SPI had no obvious change, and the nutritional characteristics of SPI remained good. After extrusion, the solubility of SPI decreased, and hydrogen bond, disulfide bond and hydrophobic interaction were the

molecular forces that maintained SPI spatial structure, in which hydrogen bond played the main role. The UV and endogenous fluorescence spectra of SPI extruded showed different degrees of redshift, the UV absorption intensity and fluorescence intensity changed, the surface hydrophobicity decreased significantly, and the tertiary structure of SPI changed. In conclusion, extrusion can reduce the antigenicity of SPI to a certain extent and affect its spatial structure.

**Key words:** soybean protein isolate; extrusion; antigenicity; protein structure

大豆具有较高的营养价值,其中的蛋白质可以作为一种良好的蛋白质补充剂来满足人类及动物的日常需求。美国食品药品监督管理局(FDA)批准了一项健康声明,即每天食用少量大豆蛋白可以降低患心脏病的风险<sup>[1]</sup>。大豆蛋白在食品行业应用广泛,传统的豆制品有豆浆、豆花、豆腐、豆干、豆腐皮等<sup>[2]</sup>,衍生出的产品有植物肉、婴儿配方奶粉和豆乳制品等<sup>[3]</sup>。然而根据世界卫生组织(WHO)报道,大豆是一种重要的食物过敏原,可引起食物过敏反应。相关统计显示,儿童中大豆过敏的患病率高达13%<sup>[4]</sup>。目前已经从大豆中确认了38种具有抗原性的蛋白,其中大豆储藏蛋白中的 $\beta$ -伴大豆球蛋白和 $\alpha$ -伴大豆球蛋白是主要的抗原性蛋白<sup>[5]</sup>。 $\beta$ -伴大豆球蛋白由 $\alpha'$ (71 kDa)、 $\alpha$ (67 kDa)、 $\beta$ (50 kDa)3个亚基组成,而 $\alpha$ -伴大豆球蛋白由5个亚基组成<sup>[6]</sup>,研究发现 $\beta$ -伴大豆球蛋白的致敏性高于 $\alpha$ -伴大豆球蛋白<sup>[7]</sup>。

大豆过敏表现为多种症状,比较轻的症状有荨麻疹、血管性水肿、鼻结膜炎、呼吸窘迫、胃肠功能紊乱以及消化不良,严重的可能会导致休克甚至死亡<sup>[8-10]</sup>。目前国内外尚无从根本上解决大豆过敏的方法,仅能通过避免摄入大豆制品来防止食物过敏反应的发生<sup>[11]</sup>。近年来,利用不同的食品加工方法来降低大豆致敏性的研究受到越来越多的关注<sup>[12]</sup>。挤压膨化是集混合、搅拌、破碎、加热、蒸煮、杀菌、膨化及塑型为一体的食品加工技术<sup>[13]</sup>。Chen等<sup>[14]</sup>利用免疫印迹法在未挤压花生粉中发现了4个强免疫球蛋白E(IgE)结合带,而用双螺杆挤压机处理后的挤出物中并未发现IgE结合带。Faisal等<sup>[15]</sup>研究了添加转谷氨酰胺酶的高水分挤压对花生过敏原水平的影响,结果发现,花生主要过敏原Arah1、Arah2、Arah3、Arah6的含量分别减少了91%、61%、55%、60%。Ohishi等<sup>[16]</sup>研究了双螺杆挤压技术对大豆粉抗原性的影响,发现挤压膨化后大豆粉抗原性降低至原活性的0.1%,电泳结果表明抗原性的降低是由于大豆蛋白分子结构的降解,尤其是超过40 kDa的蛋白质。但目前关于挤压膨化对

大豆分离蛋白过敏原影响的研究仍相对较少。

本文主要通过调控挤压膨化温度来研究大豆蛋白抗原性、营养特性以及致敏蛋白溶解度的变化规律,通过结构特性的变化探究挤压膨化影响大豆过敏原的作用机制,为挤压膨化降低大豆过敏原水平提供理论依据,为低敏性大豆蛋白产品的开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

大豆分离蛋白(SPI)(蛋白质含量85.5%),山东禹王生态食业有限公司; $\beta$ -伴大豆球蛋白(C5868)及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊-抗兔IgG(A6154),美国Sigma公司;牛血清蛋白(BSA)、TMB单组分显色液,北京Solarbio科技有限公司;凝胶电泳试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS),上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

CLETRAL Ev025型双螺杆挤压机,法国克莱斯特罗集团公司;LRH-150F型恒温生化培养箱,上海一恒科技有限公司;FE177型粉碎机,北京市永光明医疗仪器有限公司;TDL-5-A型离心机,上海安亭科学仪器厂;DYY-6D型电泳仪,北京六一仪器厂;Multiskan FC型酶标仪,美国赛默飞世尔仪器有限公司;TU-1901型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Cary Eclipse荧光分光光度计,美国Varian公司;Sykam S433D型氨基酸分析仪,德国塞卡姆公司;K1100型凯氏定氮仪,济南海能仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 SPI挤压膨化处理

采用双螺杆挤压机在螺杆转速200 r/min,喂料速度2.4 kg/h,进水速度1.0 kg/h,挤压膨化温度分别为135、140、145、150、155、160℃下对SPI进行挤压膨化处理。将挤压膨化的SPI样品于40℃烘干、粉碎后先过0.425 mm(40目)筛,再过0.180 mm

(80目)筛,将筛选后的样品存放于自封袋内,置于-20℃的冰箱内保存,以备后续实验。以未经过挤压膨化的SPI作为对照。

### 1.2.2 抗原性的测定

参考文献[17]制备兔抗 $\beta$ -伴大豆球蛋白血清。选取2只雄性纯种新西兰大白兔,饲养于郑州大学实验动物中心。喂养一段时间观察无异样后,进行免疫处理。取等量的1 mg/mL的 $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原与弗氏佐剂混合,充分乳化后注射于兔子颈背部,共免疫6次。最后一次免疫仅为 $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原,耳缘静脉注射,3 d后心脏取血,分离血清得兔抗 $\beta$ -伴大豆球蛋白血清,于-20℃保存。采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定兔抗 $\beta$ -伴大豆球蛋白血清最高效价达到1:10 000。免疫前,于兔子的耳缘静脉采血,分离血清,作为阴性对照。

采用间接竞争ELISA法测定挤压膨化后大豆蛋白中 $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性<sup>[18-19]</sup>。将 $\beta$ -伴大豆球蛋白稀释至一定浓度后用碳酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH 9.6)包被于96孔酶标板,每孔100  $\mu$ L。将挤压膨化处理的SPI样品与兔抗 $\beta$ -伴大豆球蛋白血清(效价1:6 400)等体积混合,4℃过夜。后续实验流程与席冠鹏等<sup>[20]</sup>的实验步骤一致,待反应完成后用酶标仪在450 nm和620 nm处测定吸光度,计算二者差值( $A$ )( $A = A_{450} - A_{620}$ )。样品抗原性大小用抗原抑制率表示,两者呈正比例关系。抗原抑制率( $Y$ )计算见式(1)。

$$Y = (1 - A/A_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中: $A_0$ 为不含SPI体系的吸光度差值。

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

参照Wang等<sup>[21]</sup>的方法,并进行适当修改。准确称取5 mg样品于离心管内,加入2.5 mL去离子水充分溶解后,5 000 r/min离心10 min,取100  $\mu$ L上清液与样品缓冲液以体积比1:1充分混合后,95℃水浴10 min后备用。SDS-PAGE分析条件:12%的分离胶和5%的浓缩胶,样品上样量10  $\mu$ L,浓缩胶恒流20 mA,分离胶恒流40 mA。电泳完毕后对凝胶进行固定、染色、脱色,之后将凝胶置于凝胶成像仪内进行拍照分析。

### 1.2.4 氨基酸组成和含量测定

氨基酸组成和含量参照GB 5009.124—2016测定。

### 1.2.5 分子间作用力的测定

参考安红周等<sup>[22]</sup>的方法测定样品的分子间作用力。分别配制0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲液(P)、8.0 mol/L尿素溶液(U)(破坏氢键)、

1.5 g/100 mL SDS溶液(S)(破坏疏水相互作用)、0.1 mol/L  $\beta$ -巯基乙醇(M)(破坏二硫键)4种溶液,按等体积进一步组合得到P+U、P+S、P+M、P+U+S、P+U+M、P+S+M、P+U+S+M 7种组合液,测定SPI在8种浸提液(P和7种组合液)中的溶解度,以此表征挤压膨化对SPI分子间作用力的影响。准确称取0.2 g样品于15 mL离心管中,分别加入10 mL不同浸提液,旋涡振荡后于振荡器水平振荡2 h,5 000 r/min离心10 min,使用Bradford法测定上清液中蛋白质含量。按式(2)计算溶解度( $S$ )。

$$S = B_1/B_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: $B_1$ 为上清液中蛋白质含量,mg/g; $B_0$ 为样品中蛋白质含量,mg/g。

### 1.2.6 紫外吸收光谱分析

根据Pi等<sup>[1]</sup>的方法并进行适当修改,将样品配制成质量浓度为0.2 mg/mL的溶液,使用紫外可见分光光度计分析样品的紫外吸收光谱。分析条件:扫描范围200~400 nm,狭缝宽度2 nm,波长间隔1 nm。

### 1.2.7 内源荧光光谱分析

将样品配制成质量浓度为0.2 mg/mL的溶液,采用荧光分光光度计测定样品的内源荧光光谱<sup>[23]</sup>。分析条件:激发波长290 nm,扫描范围300~500 nm,激发狭缝和发射狭缝均为5 nm。

### 1.2.8 外源荧光光谱分析

采用ANS荧光探针法测定样品的表面疏水性<sup>[24]</sup>。用1.5 mL 10.0 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.0)配制10.0 mg/mL样品溶液,以此为母液,再稀释至质量浓度分别为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL的稀释液。向4.0 mL稀释液中加入20  $\mu$ L 80 mmol/L的ANS溶液,旋涡振荡后测定样品的荧光强度,绘制荧光强度与样品质量浓度的拟合曲线,以拟合曲线的初始斜率表示样品的表面疏水性。分析条件:激发波长390 nm,扫描范围400~600 nm,发射波长470 nm,狭缝宽度5 nm。

### 1.2.9 数据处理

所有实验均重复3次,结果用“平均值 $\pm$ 标准差”表示,采用IBM SPSS Statistics 26和Origin 2023软件进行统计分析及作图。

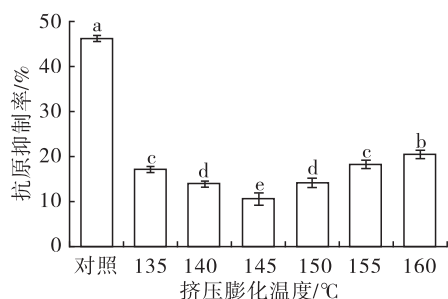
## 2 结果分析

### 2.1 不同挤压膨化温度下SPI的抗原性分析

不同挤压膨化温度下 $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原抑制率见图1。

由图1可知,与对照相比,经不同挤压膨化温度

处理后 SPI 的抗原性均显著下降,这与 Zheng 等<sup>[25]</sup>的研究结果一致。挤压膨化后大豆蛋白抗原性显著下降,但并未完全消除,可能是挤压膨化处理主要破坏了 SPI 的构象表位,而线性表位仍然存在。随着挤压膨化温度的升高, SPI 抗原性呈现先降低后升高的趋势,其中,145 °C 下  $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原抑制率最低,为 10.8%,比对照的抗原抑制率(46.1%)降低了 76.6%。这可能是高温环境导致蛋白质变性,抗原表位被掩盖或破坏,抗原性下降;而温度超过一定值后,蛋白质空间结构进一步发生变化,使得一部分被掩盖的抗原表位暴露,抗原性上升。



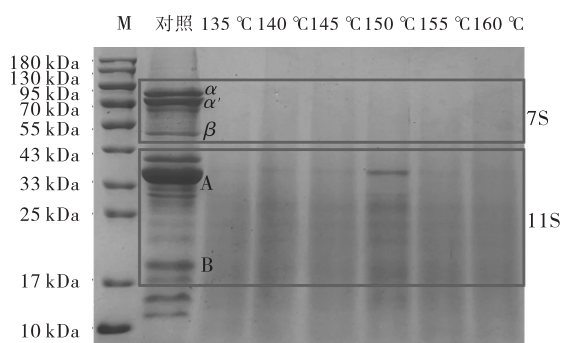
注:不同字母表示具有显著差异( $p < 0.05$ )。下同

Note: Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). The same below

图1 不同挤压膨化温度下 SPI 的抗原性

Fig. 1 Antigenicity of SPI at different extrusion temperatures

2.2 不同挤压膨化温度下 SPI 的 SDS-PAGE 分析  
 $\beta$ -伴大豆球蛋白(7S)和大豆球蛋白(11S)是 SPI 中的主要致敏成分<sup>[26]</sup>。不同挤压膨化温度下 SPI 的 SDS-PAGE 分析结果如图 2 所示。



注:A. 大豆球蛋白的酸性亚基;B. 大豆球蛋白的碱性亚基;M. Marker

Note: A. Acid subunits of glycinin in SPI; B. Basic subunits of glycinin in SPI; M. Marker

图2 不同挤压膨化温度下 SPI 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE pattern of SPI at different extrusion temperatures

由图 2 可知,高温挤压膨化后  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$  亚基以及大豆球蛋白的酸性、碱性亚基

均出现不同程度的降解。与对照相比,挤压膨化后  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\alpha$ 、 $\alpha'$  亚基的条带几乎消失不见,而  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\beta$  亚基和大豆球蛋白的酸性、碱性亚基条带变淡。推测原因是挤压机内的高温、高压、高剪切力混合作用使得大豆蛋白发生解离,肽链发生断裂,大分子致敏性蛋白质解聚为小分子片段,部分  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\alpha$ 、 $\alpha'$  以及  $\beta$  亚基和大豆球蛋白的酸性亚基及碱性亚基降解,进而导致其条带变淡。结合 2.1 抗原性的测定结果分析, SPI 抗原性的降低可能是因为双螺杆挤压机的强作用力使致敏蛋白裂解,破坏了蛋白质表面的抗原表位<sup>[25,27]</sup>。

### 2.3 不同挤压膨化温度下 SPI 的氨基酸组成及含量

不同挤压膨化温度下 SPI 的氨基酸组成及含量如表 1 所示。

表 1 不同挤压膨化温度下 SPI 的氨基酸组成及含量

Table 1 Amino acid composition and content of SPI at different extrusion temperatures

氨基酸	含量/(g/100 g)						
	对照	135 °C	140 °C	145 °C	150 °C	155 °C	160 °C
天冬氨酸	9.70	9.64	9.30	8.60	8.90	9.60	9.60
苏氨酸*	3.20	3.16	3.00	2.80	2.90	3.10	3.15
丝氨酸	4.30	4.28	4.20	3.90	4.00	4.30	4.25
谷氨酸	15.35	15.39	15.00	13.90	14.25	15.45	15.25
甘氨酸	3.45	3.45	3.40	3.15	3.20	3.35	3.50
丙氨酸	3.55	3.55	3.50	3.20	3.30	3.45	3.60
胱氨酸	0.70	0.58	0.40	0.50	0.40	0.40	0.25
缬氨酸*	3.60	3.60	3.50	3.25	3.35	3.65	3.60
蛋氨酸*	1.10	1.10	0.80	0.30	1.05	1.05	1.10
异亮氨酸*	3.70	3.66	3.60	3.30	3.40	3.70	3.70
亮氨酸*	6.10	6.10	6.00	5.60	5.85	6.25	6.15
酪氨酸	2.90	2.90	2.85	2.75	2.75	2.85	2.90
苯丙氨酸*	4.20	4.18	4.10	3.90	4.00	4.25	4.20
组氨酸	2.70	2.60	2.50	2.25	2.40	2.35	2.45
赖氨酸*	5.05	4.95	4.70	4.45	4.50	4.80	4.85
精氨酸	5.50	5.48	5.50	5.05	5.10	5.50	5.60
脯氨酸	3.40	3.44	3.30	2.85	3.10	3.95	3.60
氨基酸总量	78.50	78.06	75.65	69.75	72.45	78.00	77.75
必需氨基酸	26.95	26.75	25.70	23.60	25.05	26.80	26.75

注:\*表示必需氨基酸

Note: \*. Essential amino acid

由表 1 可知,各样品中氨基酸组成无变化,均含有 17 种主要氨基酸,其中包括苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸以及缬氨酸 7 种必需氨基酸。SPI 的氨基酸总量为 69.75 ~ 78.50 g/100 g,必需氨基酸的含量为 23.60 ~ 26.95 g/100 g。不同挤压膨化温度下 SPI 的必需氨基酸含量与氨基酸总

量比值基本保持不变,约为0.34,说明SPI营养性保持良好<sup>[28]</sup>。但随着挤压膨化温度的升高,SPI中氨基酸总量呈现先降低后升高的趋势,降低的原因可能是大豆蛋白与其中残留的糖类物质发生美拉德反应,从而造成氨基酸的损失<sup>[29-30]</sup>,而145℃下SPI中的氨基酸总量最少,推测原因是145℃时SPI中氨基酸暴露的最多,消耗最多,与2.1的145℃时致敏蛋白破坏最为严重,SPI抗原性最低的结果相对应。温度继续升高会导致蛋白质进一步折叠聚合,其中的氨基酸不易暴露,被破坏的氨基酸减少<sup>[31]</sup>。

#### 2.4 不同挤压膨化温度下SPI分子间作用力

不同挤压膨化温度下SPI在不同浸提液中的溶解度如图3所示。

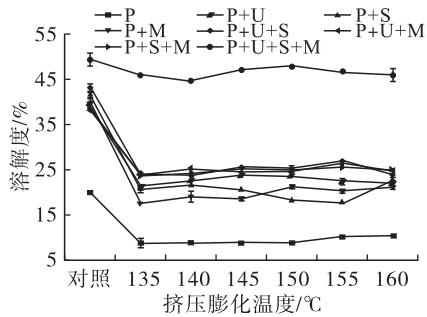


图3 不同挤压膨化温度下SPI在不同浸提液中的溶解度

Fig. 3 Solubility of SPI in different solutions at different extrusion temperatures

蛋白质分子的变性程度以及分子间作用力能够通过蛋白质在不同浸提液中的溶解度反映,溶解度越高,说明该浸提液所破坏的分子间作用力在维持蛋白质结构中的作用越强<sup>[22]</sup>。由图3可知,与对照相比,挤压膨化后SPI的溶解度明显下降。与单独P相比,其他7种浸提液中SPI的溶解度均大幅度提升,其中P+U+S+M使SPI溶解度提升到47%左右,而另外6种浸提液使SPI溶解度集中在23%左右,表明氢键、二硫键、疏水相互作用均是影响蛋白质溶解度的原因<sup>[32]</sup>。由图3还可以看出,P+U、P+S及P+M3种浸提液中,P+U浸提液中SPI溶解度相对较高,P+U破坏的是蛋白质中的氢键,表明氢键是维持SPI分子间作用的主要作用力,这与安红周等<sup>[22]</sup>的研究结果一致。

#### 2.5 不同挤压膨化温度下SPI的紫外吸收光谱

紫外吸收光谱可以反映蛋白质三级结构的变化<sup>[33]</sup>。SPI具有酪氨酸、色氨酸以及苯丙氨酸等特征性吸收紫外光的侧链基团<sup>[34]</sup>。不同挤压膨化温度下SPI的紫外吸收光谱图如图4所示。

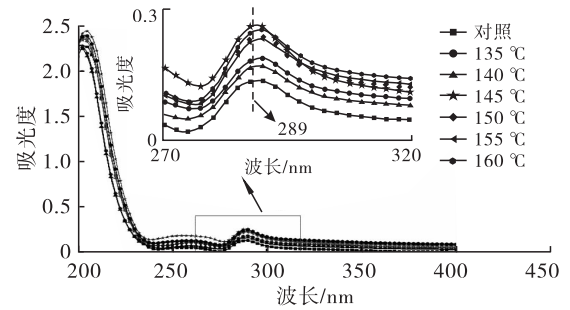


图4 不同挤压膨化温度下SPI的紫外吸收光谱图

Fig. 4 UV absorption spectra of SPI at different extrusion temperatures

由图4可知,挤压膨化后SPI的紫外吸光度增大,对照的最大吸收波长在289 nm处,而挤压膨化后SPI的最大吸收峰出现轻微红移。在145℃时SPI吸光度增幅最为明显,且最大吸收波长红移至290 nm处,说明经过挤压膨化后SPI的三级结构发生解折叠,导致具有紫外吸收的氨基酸暴露于蛋白质表面,这与2.1中145℃挤压膨化处理后SPI的抗原性显著降低的结果一致。

#### 2.6 不同挤压膨化温度下SPI的内源荧光光谱

不同挤压膨化温度下SPI的内源荧光光谱图如图5所示。

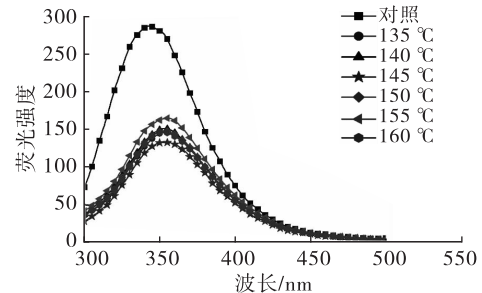


图5 不同挤压膨化温度下SPI的内源荧光光谱图

Fig. 5 Endogenous fluorescence spectra of SPI at different extrusion temperatures

由图5可知,对照的最大吸收波长在345 nm左右,而挤压膨化后SPI的最大吸收峰出现在355 nm左右,最大吸收峰出现明显红移,表明挤压膨化处理使SPI内更多具有荧光发射基团的氨基酸残基的局部微环境由非极性向极性转变<sup>[35]</sup>,更多的氨基酸暴露于蛋白质表面。经过挤压膨化处理后SPI的荧光强度均出现大幅度降低,145℃时SPI的荧光强度下降最为明显,说明挤压膨化后SPI的内源荧光发生了荧光猝灭,原因可能是在高温环境下引入了分子氧,使蛋白质中的色氨酸发生氧化,内源荧光强度随之降低<sup>[36]</sup>,与张晗<sup>[37]</sup>的挤压膨化处理后小米蛋白荧光强度下降的研究结果一致。

## 2.7 不同挤压膨化温度下 SPI 的表面疏水性

蛋白质疏水基团的暴露程度影响蛋白质的表面疏水性,可以通过表面疏水性的变化评价蛋白质三级结构的变化<sup>[38]</sup>。不同挤压膨化温度下 SPI 的表面疏水性如图 6 所示。

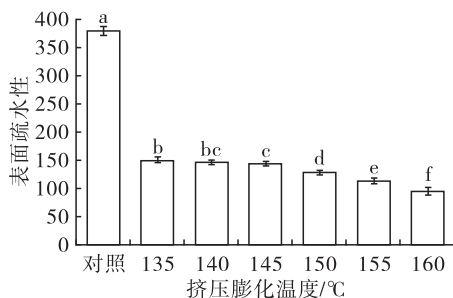


图 6 不同挤压膨化温度下 SPI 的表面疏水性

Fig. 6 Surface hydrophobicity of SPI at different extrusion temperatures

由图 6 可以看出,随着挤压膨化温度的升高, SPI 的表面疏水性呈现逐渐下降的趋势,与张恺容等<sup>[39]</sup>的研究结果一致。推测原因可能是挤压机内的高温、高压、高剪切力的相互作用导致蛋白质表面的疏水性基团被掩埋<sup>[40]</sup>。此外,挤压膨化后 SPI 的内源荧光强度出现了明显下降(图 5),而色氨酸是内源荧光的主要来源,同时色氨酸也是疏水性氨基酸,因此结合图 5、图 6 推测经过挤压后蛋白质表面的色氨酸含量降低。结合 2.1 抗原性的测定结果,推测抗原表位部分存在于疏水区域,挤压膨化处理使疏水区域被掩埋, IgG 无法识别部分抗原表位<sup>[41]</sup>,进而导致 SPI 抗原性降低。

## 3 结论

本文研究了不同挤压膨化温度对 SPI 抗原性及其结构的影响。结果表明:不同挤压膨化温度下 SPI 的抗原性均出现显著下降,其中 145 °C 时最低,降敏效果最为显著;抗原蛋白  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$  亚基以及大豆球蛋白的酸性亚基和碱性亚基均出现了不同程度的降解;挤压膨化后 SPI 的氨基酸组成及必需氨基酸含量与总氨基酸含量的比值几乎不变, SPI 营养性保持良好;氢键、二硫键、疏水相互作用均是维持 SPI 空间结构的分子作用力,其中氢键起主要作用;挤压膨化后 SPI 的紫外光谱和内源荧光光谱均出现不同程度的红移,且紫外吸收强度及荧光强度发生变化,表面疏水性显著下降, SPI 的三级结构发生改变。综上,挤压膨化能够在一定程度上降低 SPI 的抗原性,并影响其空间结构。本研究可为开发大豆蛋白的脱敏技术提供参考,为开发低敏性或无致敏性大豆产品提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] PI X W, LIU J F, SUN Y X, et al. Protein modification, IgE binding capacity, and functional properties of soybean protein upon conjugation with polyphenols [J/OL]. Food Chem, 2023, 405 (Pt A): 134820 [2023 - 05 - 22]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134820>.
- [2] 曲敏, 陈红丽, 王宇, 等. 传统豆制品腐败菌污染及抑制研究进展 [J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(3): 167 - 178.
- [3] WALTER J, GREENBERG Y, SRIRAMARAO P, et al. Limited hydrolysis combined with controlled Maillard - induced glycation does not reduce immunoreactivity of soy protein for all sera tested [J]. Food Chem, 2016, 213: 742 - 752.
- [4] SAEED H, GAGNON C, COBER E, et al. Using patient serum to epitope map soybean glycinins reveals common epitopes shared with many legumes and tree nuts [J]. Mol Immunol, 2016, 70: 125 - 133.
- [5] KRISHNAN H B, KIM W S, JANG S C, et al. All three subunits of soybean  $\beta$  - conglycinin are potential food allergens [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(3): 938 - 943.
- [6] PRAK K, NAKA M, TANDANG - SILVAS M R G, et al. Polypeptide modification: An improved proglycinin design to stabilise oil - in - water emulsions [J]. Protein Eng Des Sel, 2015, 28(9): 281 - 291.
- [7] 邢玉飞, 布冠好, 陈复生, 等. 大豆主要致敏蛋白及其检测技术研究进展 [J]. 食品科学, 2023, 44(15): 261 - 268.
- [8] SHARMA H P, BANSIL S, UYGUNGIL B. Signs and symptoms of food allergy and food - induced anaphylaxis [J]. Pediatr Clin North Am, 2015, 62(6): 1377 - 1392.
- [9] BROUGH H A, LIU A H, SICHERER S, et al. Atopic dermatitis increases the effect of exposure to peanut antigen in dust on peanut sensitization and likely peanut allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(1): 164 - 170.
- [10] GALAND C, LEYVA - CASTILLO J M, YOON J, et al. IL - 33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(5): 1356 - 1366.
- [11] 李英英, 席俊, 陈慧彬, 等. 热处理大豆球蛋白的体外消化稳定性 [J]. 中国油脂, 2022, 47(10): 18 - 24.
- [12] HU C Q, CHEN H B, GAO J Y, et al. High - pressure microfluidisation - induced changes in the antigenicity and conformation of allergen Arah 2 purified from Chinese peanut [J]. J Sci Food Agric, 2011, 91(7): 1304 - 1309.
- [13] CHEN F L, WEI Y M, ZHANG B. Chemical cross - linking and molecular aggregation of soybean protein during extrusion cooking at low and high moisture content [J].

- LWT - Food Sci Technol, 2011, 44(4): 957 - 962.
- [14] CHEN L, PHILLIPS R D. Effects of twin - screw extrusion of peanut flour on *in vitro* digestion of potentially allergenic peanut proteins [J]. J Food Prot, 2005, 68 (8): 1712 - 1719.
- [15] FAISAL S, ZHANG J, MENG S, et al. Effect of high - moisture extrusion and addition of transglutaminase on major peanut allergens content extracted by three step sequential method [J/OL]. Food Chem, 2022, 385: 132569 [2023 - 05 - 22]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132569>.
- [16] OHISHI A, WATANABE K, URUSHIBATA M, et al. Detection of soybean antigenicity and reduction by twin - screw extrusion [J]. J Am Oil Chem Soc, 1994, 71 (12): 1391 - 1396.
- [17] 郭鑫. 动物免疫学实验教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.
- [18] 张楠, 布冠好, 朱婷伟, 等. 糖基化反应对大豆蛋白 - 乳糖复合物抗原性及结构的影响 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(8): 117 - 121, 272.
- [19] 冯挺财, 邵谱, 胡珩, 等. 牛乳铁蛋白直接竞争 ELISA 检测法的建立 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18): 7650 - 7652, 7761.
- [20] 席冠鹏, 布冠好, 常永锋, 等. 反式肉桂酸对  $\beta$  - 伴大豆球蛋白抗原性及结构的影响 [J]. 食品研究与开发, 2022, 43(19): 44 - 51.
- [21] WANG Z C, LI L J, YUAN D Q, et al. Reduction of the allergenic protein in soybean meal by enzymatic hydrolysis [J]. Food Agric Immunol, 2014, 25(3): 301 - 310.
- [22] 安红周, 黄山, 郭益廷, 等. 磷酸盐对高水分挤压组织化植物蛋白产品品质的影响 [J]. 中国粮油学报, 2023, 38(9): 115 - 124.
- [23] 朱秀清, 杜晓倩, 胡淼, 等. 大豆分离蛋白 - 葡聚糖非共价聚合物结构及功能性研究 [J]. 农业机械学报, 2022, 53(1): 398 - 405.
- [24] 李堂昊, 布冠好, 赵益菲, 等. 超高压处理对  $\beta$  - 伴大豆球蛋白抗原性及结构的影响 [J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2020, 41(2): 1 - 7.
- [25] ZHENG H, YAN G, LEE Y, et al. Effect of the extrusion process on allergen reduction and the texture change of soybean protein isolate - corn and soybean flour - corn mixtures [J/OL]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2020, 64: 102421 [2023 - 05 - 22]. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102421>.
- [26] OGAWA T, BANDO N, TSUJI H, et al. Investigation of the IgE - binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean - sensitive patients with atopic dermatitis [J]. J Nutr Sci Vitaminol, 1991, 37(6): 555 - 565.
- [27] 郑鑫. 挤压膨化大豆 7S 蛋白在幼鲤饲料中应用研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2020.
- [28] 赵莹, 王玮, 刘存卫, 等. 不同加工精度的小麦粉氨基酸组成分析及营养评价 [J]. 中国卫生检验杂志, 2023, 33(7): 793 - 798.
- [29] 岐婉, 乔嘉玮, 李涌泉, 等. 挤压膨化处理对酶解小米粉蛋白结构和功能特性的影响 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 59 - 67.
- [30] DA SILVA E M M, ASCHERI J L R, ASCHERI D P R. Quality assessment of gluten - free pasta prepared with a brown rice and corn meal blend via thermoplastic extrusion [J]. LWT - Food Sci Technol, 2016, 68: 698 - 706.
- [31] 张浩嘉, 朱秀清, 孙莹. 挤出参数控制对大豆蛋白微观构象的影响 [J]. 食品科学, 2023, 44(15): 103 - 112.
- [32] LIU K, ZHENG J, CHEN F. Effect of domestic cooking on rice protein digestibility [J]. Food Sci Nutr, 2019, 7 (2): 608 - 616.
- [33] WANG S, YANG J, SHAO G, et al. pH - induced conformational changes and interfacial dilatational rheology of soy protein isolated/soy hull polysaccharide complex and its effects on emulsion stabilization [J/OL]. Food Hydrocolloid, 2020, 109: 106075 [2023 - 05 - 22]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106075>.
- [34] 皇甫云鹏, 包怡红, 赵鑫磊, 等. 大豆分离蛋白 - 单宁酸 - 多糖三元复合物的功能特性及结构表征 [J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(6): 37 - 51.
- [35] WANG Y Q, ZHANG H M, ZHANG G C, et al. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study [J]. J Lumin, 2007, 126(1): 211 - 218.
- [36] 陈阳. 基于干热大豆分离蛋白研究杂环胺的生成及抑制 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2021.
- [37] 张晗. 挤压膨化对小米淀粉性能的影响 [D]. 天津: 天津商业大学, 2021.
- [38] AKHARUME F, SANTRA D, ADEDEJI A. Physicochemical and functional properties of proso millet storage protein fractions [J/OL]. Food Hydrocolloid, 2020, 108: 105497 [2023 - 05 - 22]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105497>.
- [39] 张恺容. 豆粕在挤压加工中的变化及对反刍动物消化性影响的研究 [D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2021.
- [40] 吴海波, 齐宝坤, 江连洲, 等. 挤压膨化及添加粗酶对水相制取大豆油和蛋白质的影响 [J]. 中国食品学报, 2017, 17(10): 71 - 79.
- [41] SUN X, SHAN X, YAN Z, et al. Prediction and characterization of the linear IgE epitopes for the major soybean allergen  $\beta$  - conglycinin using immunoinformatics tools [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 56: 254 - 260.