

# 加热联合酶解大豆 7S 蛋白的分子结构 及抗原性研究

朱 丽,孔祥珍,华欲飞

(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

**摘要:** 选用不同加热预处理条件、不同蛋白酶处理大豆 7S 蛋白, SDS-PAGE 考察酶解后大豆 7S 蛋白的降解情况, 间接竞争 ELISA 法考察酶解物的抗原性。结果表明: 加热预处理联合酶解可显著增大  $\beta$ -伴大豆球蛋白的降解程度,  $\beta$  亚基消化程度得到极大提升,  $\alpha$  亚基、 $\alpha'$  亚基几乎完全被降解, 在相同酶解时间下, 胰蛋白酶的酶解速度快于胃蛋白酶; 加热预处理联合酶解大幅降低了  $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性, 胰蛋白酶的效果优于胃蛋白酶, 经 80 °C 加热 10 min 预处理再经胰蛋白酶处理, 大豆 7S 蛋白的抗原性降低了 79.99%, 而胃蛋白酶最优条件下最多仅降低 50.4%; SDS-PAGE 结果表明, 胃蛋白酶、胰蛋白酶酶解物中出现了抗消化肽段, 经过质谱鉴定, 均来自于  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\alpha$  亚基。

**关键词:** 大豆 7S 蛋白; 加热; 酶解; 抗原性;  $\beta$ -伴大豆球蛋白;  $\alpha$  亚基

中图分类号: TS229; Q51

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2020)09-0043-07

## Molecular structure and antigenicity analysis of enzymatic hydrolysates from soybean 7S globulin by heating and protease treatment

ZHU Li, KONG Xiangzhen, HUA Yufei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** Soybean 7S globulin was hydrolyzed with different proteases under different heating pretreatment conditions. SDS-PAGE was used to investigate the degradation of soybean 7S globulin after enzymatic hydrolysis. Indirect competitive ELISA was used to detect the antigenicity of the hydrolysates. The results showed that the heating pretreatment combined with enzymatic hydrolysis could significantly increase the degradation of  $\beta$ -conglycinin. The digestibility of the  $\beta$  subunit was greatly improved and the  $\alpha$  subunit and the  $\alpha'$  subunit were almost completely degraded. The enzymatic hydrolysis rate of trypsin was faster than that of pepsin at the same enzymatic hydrolysis time. Heating pretreatment combined with enzymatic hydrolysis could significantly reduce the antigenicity of  $\beta$ -conglycinin and the effect of trypsin was better than that of pepsin. Meanwhile, heating at 80 °C for 10 min followed by trypsin hydrolysis treatment could decrease the antigenicity of soybean 7S globulin by 79.99%, while pepsin only could decrease by 50.4% under the optimal condition. SDS-PAGE results showed that the antidigestible fragments derived from the hydrolysates by pepsin and trypsin were derived from the  $\alpha$  subunit of  $\beta$ -conglycinin, which was identified by mass spectrometry.

**Key words:** soybean 7S globulin; heating; enzymatic hydrolysis; antigenicity;  $\beta$ -conglycinin;  $\alpha$  subunit

收稿日期: 2020-01-02; 修回日期: 2020-05-22

作者简介: 朱 丽(1995), 女, 在读硕士, 研究方向为油脂与植物蛋白工程(E-mail) 1179391095@qq.com。

通信作者: 孔祥珍, 副教授, 博士(E-mail) xzkong@jiangnan.edu.cn。

大豆是一种营养价值较高的家庭用或工业加工用食品材料, 应用性极广<sup>[1]</sup>。但大豆作为八大食物致敏原之一, 轻者可出现过敏性皮炎、腹痛腹泻、恶心呕吐等过敏反应, 严重者会休克甚至死亡<sup>[2-3]</sup>。

大豆中的过敏成分主要来源于大豆球蛋白和 $\beta$ -伴大豆球蛋白, $\beta$ -伴大豆球蛋白是伴大豆球蛋白(7S)的主要存在形式,且后者比前者更易引起过敏反应<sup>[4]</sup>,研究发现组成 $\beta$ -伴大豆球蛋白的3种亚基—— $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及 $\beta$ 亚基都具有致敏性<sup>[5]</sup>。

热处理是食品加工中最常用的工序之一。加热处理能够引起蛋白质的变性,由于分子相互作用发生聚集和/或二硫键重排等导致蛋白质构象表位的破坏,在某些情况下大豆致敏性可因此被降低<sup>[6]</sup>,但之后的研究发现新暴露出的IgE的结合位点会导致大豆致敏性增加<sup>[7]</sup>。所以,加热处理对于大豆致敏性的降低并不是很理想。蛋白酶酶解常用于降低抗原蛋白的致敏性,其通过使肽段断裂,从而最大程度地破坏蛋白的线性表位及构象表位。Keum等<sup>[8]</sup>研究发现,大豆7S蛋白经过胃蛋白酶酶解,其抗原性降低了50%以上。黄婷等<sup>[9]</sup>用碱性蛋白酶处理 $\beta$ -伴大豆球蛋白40 min, $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原抑制率为33.48%。Wang等<sup>[10]</sup>用胰蛋白酶酶解豆粕12 min, $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原性残留率约为30%,但碱性蛋白酶酶解10 min,抗原性残留率仅为4%。目前关于大豆蛋白经加热预处理后,再进行蛋白酶酶解对其分子结构及抗原性的影响方面报道较少。

本研究采用不同的加热条件联合不同的酶解方式考察大豆7S蛋白分子结构及抗原性的变化。采用SDS-PAGE考察酶解后大豆7S蛋白的降解情况,采用间接竞争ELISA法考察酶解物的抗原性,并通过质谱鉴定抗消化肽段的蛋白来源,旨在为脱敏食品的加工处理提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

低温脱脂豆粕,山东禹王生态食业有限公司;胃蛋白酶( $\geq 1\ 200$  U/g)、胰蛋白酶(1:250)、氢氧化钠、浓盐酸、浓硫酸、亚硫酸氢钠、氯化钠、氯化钾、五水硫酸铜、过硫酸铵、甘氨酸、乙酸、甲醇、十二烷基磺酸钠(SDS)、2,4-二巯苏糖醇(DTT)、考马斯亮蓝R-250、三氯乙酸(TCA),国药集团化学试剂有限公司;丙烯酰胺(Acr),北京百灵威科技有限公司; $\beta$ -伴大豆球蛋白定量检测试剂盒,上海酶联生物技术公司。

Himac CR21 GII 冷冻离心机,日本日立公司;K9840 半自动凯氏定氮仪;酶标仪,Thermo Scientific 公司;SC-15 智能节能恒温槽;pH计,梅特勒-托利多公司;垂直电泳仪、凝胶成像仪,伯乐生命医学产品有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 大豆7S蛋白的提取

参照Nagano等<sup>[11]</sup>的方法并做适当修改。将低温脱脂豆粕与10倍体积去离子水室温低速搅拌混合1 h,两层纱布过滤去除残渣,上清液在4℃下15 800 g离心30 min,加入亚硫酸氢钠溶液使其质量浓度为0.98 g/L,然后调节pH至6.4,静置过夜,4℃下12 000 g离心20 min,收集上清液。在上清液中加入氯化钠使其浓度为0.25 mol/L,调节pH至5.0,4℃下15 800 g离心30 min,再次收集上清液,加入等体积4℃预冷去离子水,调pH至4.8,4℃下12 000 g离心20 min,收集沉淀,调pH至7.0,浓缩干燥,得大豆7S蛋白,4℃储藏备用。

#### 1.2.2 蛋白质含量的测定

按照GB 5009.5—2016中凯氏定氮法进行蛋白质含量测定。

#### 1.2.3 加热处理

配制3%的大豆7S蛋白溶液,于70、80、90℃恒温水浴中分别加热10、20 min,加热完毕后置于冰水浴中迅速冷却,4℃保存待用。

#### 1.2.4 蛋白酶酶解

配制大豆7S蛋白溶液,调节各蛋白酶酶解最适温度和pH,按照酶底比1:50加入蛋白酶,酶解过程中保持pH稳定。反应10~120 min分别取样,调pH至7.0,95℃水浴10 min灭酶,冰水冷却,待用。

#### 1.2.5 热处理联合胰蛋白酶酶解

将1.2.3中加热后的大豆7S蛋白溶液调节pH至7.5,温度37℃,按照酶底比1:50加入胰蛋白酶,酶解过程中保持pH稳定。分别在反应10、20、30、60、120 min时取样,调节pH至7.0,95℃水浴10 min灭酶,冰水冷却,待用。

#### 1.2.6 热处理联合胃蛋白酶酶解

将1.2.3中加热后的大豆7S蛋白溶液调节pH至1.5,温度37℃,按照酶底比1:50加入胃蛋白酶,酶解过程中保持pH稳定<sup>[12]</sup>。分别在反应30、60、120 min时取样,调节pH至7.0,95℃水浴10 min灭酶,冰水冷却,待用。

#### 1.2.7 SDS-PAGE

将大豆7S蛋白和酶解后的大豆7S蛋白酶解液分别用纯水稀释至蛋白质含量0.4%,与等量的蛋白质溶解液、0.1%溴酚蓝、0.3% DTT混合,于100℃加热10 min。凝胶电泳以电压260 V、电流13 mA运行2 h,取出胶条,浸泡于固定液(7%乙酸,40%甲醇)中1 h,用考马斯亮蓝R-250染色至少

2 h, 然后于去离子水中脱色至背景清晰<sup>[13-14]</sup>。

### 1.2.8 质谱鉴定抗消化肽段

采用 MALDI-TOF/TOF 质谱联用技术对大豆 7S 蛋白酶解物中的抗消化肽段进行鉴定。用串联飞行时间质谱仪 (AB SCIEX 5800 MALDI-TOF/TOF) 进行测试, Flex Analysis 和 Bio tools 软件进行分析。肽段由 NCBI 数据库匹配<sup>[15]</sup>。

### 1.2.9 ELISA 法分析抗原性

按照  $\beta$ -伴大豆球蛋白定量检测试剂盒的使用说明书进行实验。根据试剂盒提供的线性范围, 将处理好的样品用样品稀释液稀释一定的倍数, 96 孔酶标板加入 50  $\mu\text{L}$ /孔稀释样, 再加入 50  $\mu\text{L}$ /孔的抗体工作液, 轻轻晃动, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min; 弃液, 加洗涤液 300  $\mu\text{L}$ /孔, 保持 10 s, 洗涤 4 次, 用吸水纸拍干; 加入 HPR 标记二抗 100  $\mu\text{L}$ /孔, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min; 同上洗涤、拍干后, 加入混好的显色液 100  $\mu\text{L}$ /孔,

37  $^{\circ}\text{C}$  温育 15 min, 最后加入终止液 50  $\mu\text{L}$ /孔, 轻晃混匀后, 立即于酶标仪 450/630 nm 读取 OD 值, 根据标准曲线计算过敏原含量。以抗原性降低率表示各处理方法降低抗原的效果, 按下式计算。

抗原性降低率 = (对照组的过敏原含量 - 酶解物中的过敏原含量) / 对照组中的过敏原含量  $\times 100\%$

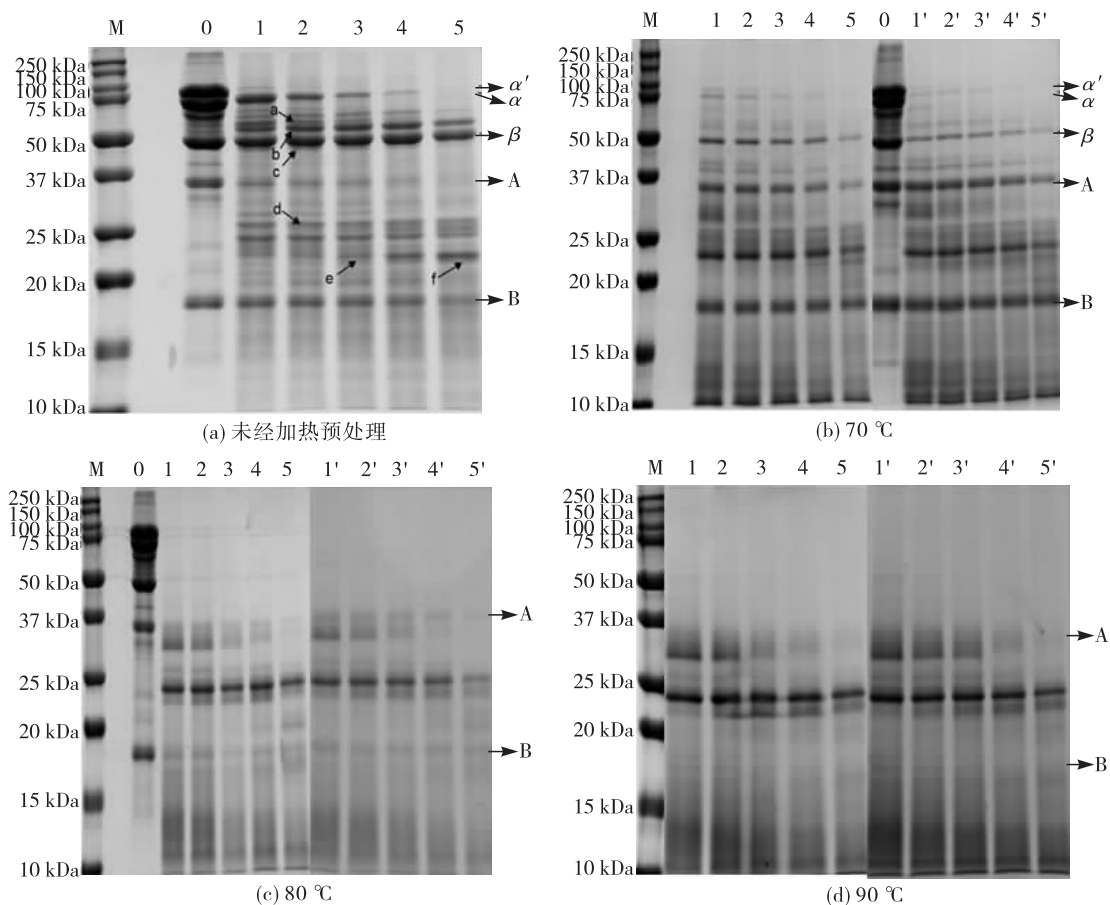
### 1.2.10 数据处理

采用 Image Lab 软件分析 SDS-PAGE 图谱; 实验数据均取 3 次测得的平均值, 采用 SPSS 软件分析其差异性,  $P < 0.05$  表示差异显著; 采用 Excel、Origin8.5 软件作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胰蛋白酶酶解大豆 7S 蛋白的相对分子质量分布及抗原性变化

#### 2.1.1 胰蛋白酶酶解大豆 7S 蛋白的 SDS-PAGE 分析 (见图 1)



注: M 为 Marker; 0 为未经任何处理的大豆 7S 蛋白; 图 (a) 的 1~5 为未经加热预处理的大豆 7S 蛋白分别酶解 10、20、30、60、120 min; 图 (b)、(c)、(d) 中 1~5 为加热预处理 10 min 后再分别酶解 10、20、30、60、120 min; 1'~5' 为加热预处理 20 min 后再分别酶解 10、20、30、60、120 min。

图 1 不同酶解条件下制备的大豆 7S 蛋白胰蛋白酶酶解物的 SDS-PAGE 谱图

实验室制备的大豆 7S 蛋白的蛋白质含量为 91.18%。由图 1(a) 可知, 条带 0 经 Image Lab 分析可得大豆 7S/11S 蛋白的比值为 2.97, 与吴超<sup>[16]</sup>的

结果一致。胰蛋白酶能专一性地酶解由精氨酸、赖氨酸的羧基端形成的肽键。随着胰蛋白酶酶解, 未经加热预处理的大豆 7S 蛋白的  $\alpha'$  亚基快速降解,  $\alpha$

亚基呈规律性地被降解,直至 120 min 时完全消失,而  $\beta$  亚基则表现出较高的消化稳定性,这与王锦欣等<sup>[17]</sup>的结论基本一致。此时产生的新条带质谱鉴定结果如表 1 所示。由表 1 可知,在 50 ~ 75 kDa 之间产生的一些新条带主要来自  $\alpha'$  亚基和  $\alpha$  亚基,在 20 ~ 25 kDa 之间产生的一些新的条带主要为 sucrose-binding protein-like(d)、 $\alpha'$  亚基(e)及  $\beta$  亚基(f),且在  $\beta$  亚基位置出现降解的  $\alpha$  亚基(c)。

从图 1(b)可知,与图 1(a)相比, $\alpha'$  亚基依然很快被降解至消失,而  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基的降解程度均加大,且主要产生 20 ~ 25 kDa 间的条带,以及 15 kDa 下

的小分子肽段。70 °C 加热预处理 10 min 和 20 min 再酶解的电泳图谱差异不大,说明两种预处理方式导致的蛋白结构展开程度相近。由图 1(c)可知,由于大豆 7S 蛋白变性温度接近 80 °C<sup>[18]</sup>,当酶解 10 min 时, $\alpha'$ 、 $\alpha$  及  $\beta$  亚基基本都被降解,只产生约 25 kDa 的新条带。由图 1(d)可知,蛋白降解情况与图 1(c)基本一致,且在酶解 60、120 min 时,靠近 25 kDa 的新条带灰度有所减弱,逐渐出现相对分子质量约 20 kDa 的新条带,大量酶解小肽都集中在 15 kDa 以下。

表 1 胰蛋白酶酶解物的质谱鉴定结果

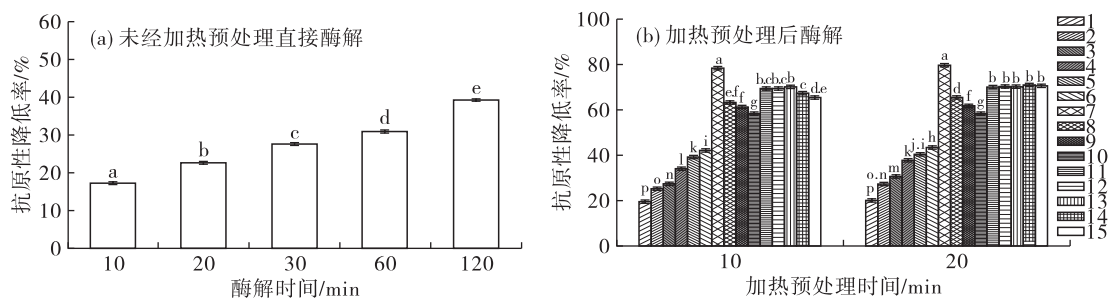
蛋白条带	鉴定结果	登录号(NCBI)	蛋白质得分	等电点	相对分子质量/Da	序列覆盖率/%
a	<i>alpha'</i> subunit of <i>beta</i> - conglycinin [ <i>Glycine max</i> ]	gi19967361	144	5.23	65 160	7
b	<i>beta</i> - conglycinin, <i>alpha</i> chain [ <i>Glycine max</i> ]	gi1121281	251	5.07	70 535	9
c	<i>beta</i> - conglycinin, <i>alpha</i> chain [ <i>Glycine max</i> ]	gi1121281	310	5.07	70 535	8
	<i>beta</i> - conglycinin, <i>beta</i> subunit [ <i>Glycine max</i> ]	gi1121282	179	5.88	50 578	8
d	sucrose - binding protein - like [ <i>Glycine max</i> ]	gi1356536206	69	6.08	58 353	4
e	<i>alpha'</i> subunit of <i>beta</i> - conglycinin [ <i>Glycine max</i> ]	gi19967361	89	5.23	65 160	3
f	<i>beta</i> - conglycinin, <i>beta</i> subunit [ <i>Glycine max</i> ]	gi163852207	205	5.67	48 358	15
	<i>alpha'</i> subunit of <i>beta</i> - conglycinin [ <i>Glycine max</i> ]	gi19967361	134	5.23	65 160	3

### 2.1.2 胰蛋白酶酶解大豆 7S 蛋白的抗原性变化 (见图 2)

由图 2(a)可知,随着酶解时间的延长, $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性显著降低( $P < 0.05$ ),在酶解 120 min 后,抗原性降低率约为 40%。从电泳图上看,可能与残留的  $\beta$  亚基以及产生的来源于  $\alpha'$ 、 $\alpha$  亚基的酶解肽链有关。

与未经加热预处理的样品相比,70 °C 加热预处理

后,随着胰蛋白酶酶解时间的延长,尽管电泳谱图中图 1(a)和图 1(b)相差较大,但对于抗原性的影响趋势及降低率相似。由图 2(b)可知,样品经过 80 °C 或 90 °C 加热预处理后,再进行胰蛋白酶酶解,其抗原性降低程度显著增大( $P < 0.05$ ),最高可达 79.99%。推测可能是加热导致蛋白结构展开,暴露更多内部的酶催化位点,故酶解效果较好,同时导致部分暴露的抗原表位被破坏。



注:图(b)中 1~5 为 70 °C 加热预处理后,分别酶解 10、20、30、60、120 min;6~10 为 80 °C 加热预处理后,分别酶解 10、20、30、60、120 min;11~15 为 90 °C 加热预处理后,分别酶解 10、20、30、60、120 min。图中不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

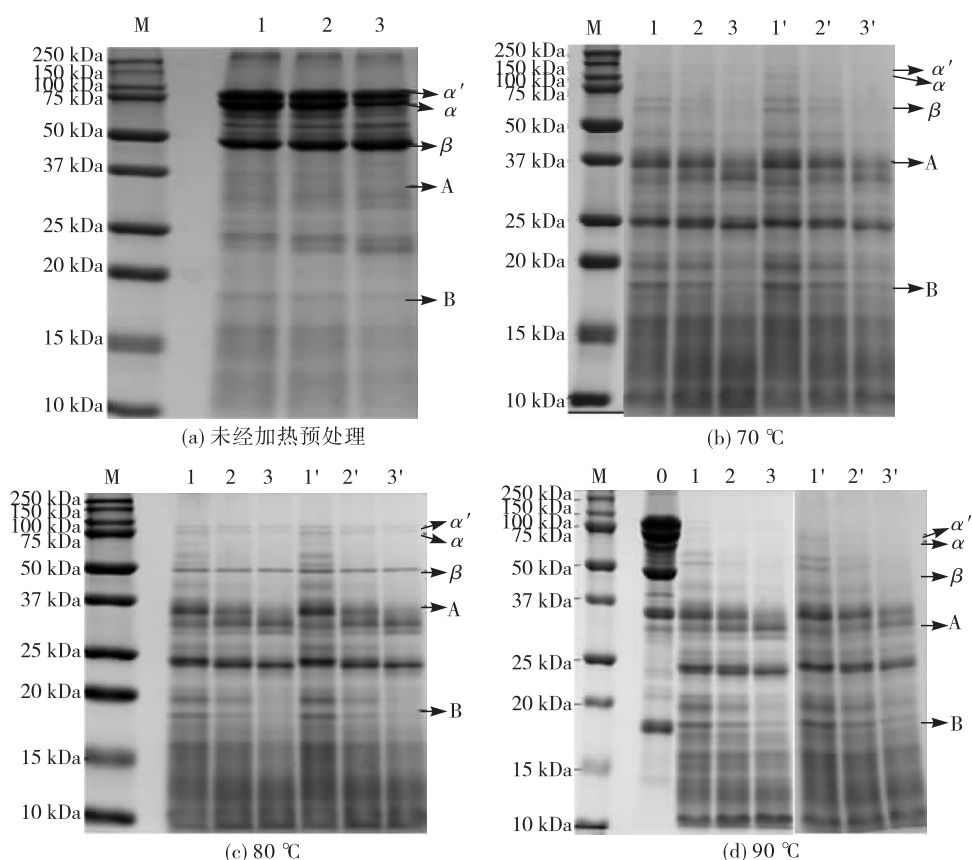
图 2 不同酶解条件下制备的大豆 7S 蛋白胰蛋白酶酶解物的抗原性降低率

## 2.2 胃蛋白酶酶解大豆7S蛋白的相对分子质量分布及抗原性变化

### 2.2.1 胃蛋白酶酶解大豆7S蛋白的SDS-PAGE分析(见图3)

与胰蛋白酶的酶解位点不同,胃蛋白酶主要酶解由芳香族氨基酸及其他疏水性氨基酸形成的肽键。通过预实验,确定胃蛋白酶酶解大豆7S蛋白的酶解时间分别选取30、60 min和120 min进行考察。由图3(a)可知,未经加热预处理大豆7S蛋白经胃蛋白酶酶解30~120 min后, $\alpha'$ 、 $\alpha$ 亚基略微被降解,而 $\beta$ 亚基的灰度逐渐增加,且50~75 kDa之间也产生一条逐渐加深的新条带,同时大豆7S蛋白中含有

的11S的A、B肽链优先被酶解,这与赵谋明<sup>[12]</sup>、刘晓毅<sup>[19]</sup>等的研究结果一致。由图3(b)可知,在70℃下加热10 min及20 min后再酶解, $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及 $\beta$ 亚基均大幅度降低,且与胰蛋白酶酶解情况相同的是均产生25 kDa附近的新条带;同样,由图3(c)、(d)可知,在80、90℃下酶解60 min后, $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及 $\beta$ 亚基基本消失,且均产生位置集中在20 kDa以下的小分子肽段。综上所述,经过加热预处理后,采用胃蛋白酶酶解,大豆7S蛋白的3种亚基在电泳谱图中的条带很快消失,同时在37 kDa以下出现大量不同相对分子质量的肽链,这些肽链主要为致敏条带 $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及 $\beta$ 亚基的酶解产物。



注:M为Marker;0为未经任何处理的大豆7S蛋白;图(a)的1~3为未经加热预处理的大豆7S蛋白分别酶解30、60、120 min;图(b)、(c)、(d)1~3为加热预处理10 min后再分别酶解30、60、120 min;1'~3'为加热预处理20 min后再分别酶解30、60、120 min。

图3 不同酶解条件下制备的大豆7S蛋白胃蛋白酶酶解物的SDS-PAGE谱图

### 2.2.2 胃蛋白酶酶解大豆7S蛋白的抗原性变化(见图4)

由图4(a)可知,胃蛋白酶酶解物的抗原性降低率随着酶解时间的延长而增加,抗原性降低率为3.8%~4.5%。因为其主要致敏蛋白 $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及 $\beta$ 亚基降解程度不大,导致还存在大量的抗原表位。

由图4(b)可知,在相同酶解条件下,不同的加热预处理时间(10、20 min)对酶解物的抗原性的影

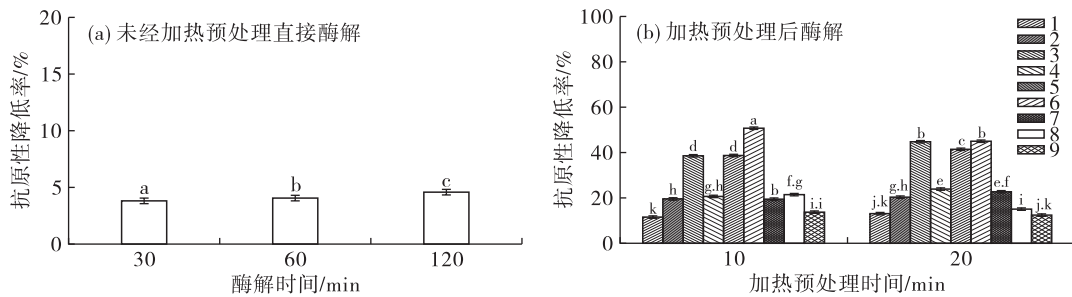
响较小;同时,结合图3发现酶解物中肽链组成基本一致。在相同的加热预处理时间下,随着加热预处理温度升高,酶解物的抗原性降低率总体呈现先增大后降低的趋势。70℃加热预处理10 min后,随着酶解时间的延长,其抗原性降低率从10%逐渐增大到37%左右,结合相应电泳谱图,推测可能是 $\alpha'$ 、 $\alpha$ 及 $\beta$ 亚基大幅度降解导致的。80℃加热预处理条件下,抗原性降低率从20%显著增加到约50%



( $P < 0.05$ ), 此时  $\alpha'$ 、 $\alpha$  亚基基本消失, 导致内部部分抗原表位暴露, 从而被破坏, 进而抗原性大大降低。90℃ 加热预处理条件下, 条带的变化情况与 80℃ 类似, 但是 ELISA 的结果显示, 酶解 30 min 后抗原性降低率约为 20%, 而酶解 120 min 后抗原性降低率约为 10%。推测这可能与产生的新肽段的聚集有关, 即虽然线性表位被破坏, 但却出现新的构

象表位, 从而导致抗原性增加。

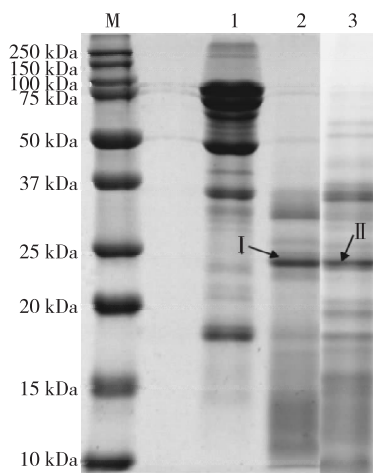
综上, 加热预处理可以促进蛋白酶对大豆 7S 蛋白的酶解, 且更大程度地降低抗原性; 经过 80℃ 或 90℃ 加热预处理后, 再进行胰蛋白酶酶解, 其抗原性降低程度明显增大, 最高可达 79.99%; 加热预处理后再经胃蛋白酶酶解, 其抗原性降低率最大可达 50.4%。



注: 图(b)中 1~3 为 70℃ 加热预处理后, 分别酶解 30、60、120 min; 4~6 为 80℃ 加热预处理后, 分别酶解 30、60、120 min; 7~9 为 90℃ 加热预处理后, 分别酶解 30、60、120 min。图中不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 4 不同酶解条件下制备的大豆 7S 蛋白蛋白酶酶解物的抗原性降低率

### 2.3 抗消化肽段的鉴定(见图 5)



注: M 为 Marker; 1 为大豆 7S 蛋白; 2 为 80℃ 加热预处理 10 min 后, 胰蛋白酶酶解 10 min; 3 为 80℃ 加热预处理 10 min 后, 胃蛋白酶酶解 10 min。

图 5 胰蛋白酶、胃蛋白酶的酶解物抗消化肽段的 SDS-PAGE 谱图

结合两种酶解方式的电泳结果以及抗原性来看, 胰蛋白酶酶解物和胃蛋白酶酶解物仍具有一定的抗原性, 虽然胰蛋白酶和胃蛋白酶的酶解位点不同, 但是均在加热预处理再酶解后产生相同位置的新条带, 推测可能是残留的抗消化肽段 (20~25 kDa) 引起的(图 5 中的 I、II)。为了确定这两种酶解条件下的新条带的相关信息, 采用质谱鉴定抗消化肽段, 结果见表 2。

由表 2 可知, 这两种酶解条件下的新条带均来源于  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\alpha$  亚基, 发现虽然两种酶酶解位点不同, 但产生的抗消化肽段来源相同, 且  $\alpha$  亚基是国际公认的致敏蛋白之一<sup>[20]</sup>, 这解释了为何酶解后还存在致敏性。大豆过敏属于 IgE 介导的 I 型超敏反应<sup>[21]</sup>, 致敏原要保持完整的抗原决定簇才有致敏的可能性。

表 2 抗消化肽段的质谱鉴定结果

蛋白条带	蛋白名称	登录号(NBCI)	蛋白得分	相对分子质量/Da	等电点	匹配的肽段数
I	<i>beta</i> -conglycinin, <i>alpha</i> subunit	gil121281	141	70 535	5.07	15
II	<i>beta</i> -conglycinin, <i>alpha</i> subunit	gil121281	122	70 535	5.07	11

### 3 结论

本研究表明, 加热和酶解联合处理能够显著增大  $\beta$ -伴大豆球蛋白的降解程度,  $\beta$  亚基消化程度得到极大提升,  $\alpha$  亚基、 $\alpha'$  亚基几乎完全被降解, 在相同酶解时间下, 胰蛋白酶的酶解速度快于胃蛋白酶。同时, 加热和酶解联合处理能够有效地降低大豆 7S

蛋白的抗原性。单独加热处理, 仅可使得蛋白结构松散, 更多的酶解位点得到暴露, 引起过敏反应的构象表位得到一定的破坏。而加热联合酶解处理能够大幅度降低  $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性, 蛋白展开的结构暴露的抗原表位更利于蛋白酶的破坏, 其中胰蛋白酶的酶解效果优于胃蛋白酶, 经 80℃ 加热预

处理 10 min 再经胰蛋白酶处理,大豆 7S 蛋白的抗原性降低了 79.99%,而胃蛋白酶酶解条件下最多只降低了 50.4%。另外,胰蛋白酶和胃蛋白酶经过加热预处理后再酶解,产生的相同相对分子质量位置的新条带,经蛋白鉴定后,均来自于  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\alpha$  亚基,为国际公认的致敏蛋白之一。此结果可为脱敏食品的研究提供一定的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] BUSINCO L, BRUNO G, GIAMPIETRO P G. Soy protein for the prevention and treatment of children with cow - milk allergy[J]. Am J Clin Nutr, 1999, 68(6): S1447 - S1452.
- [2] WANG T, QIN G X, SUN Z W, et al. Advances of research on glycinin and  $\beta$ -conglycinin: a review of two major soybean allergenic proteins[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014, 54(7): 850 - 862.
- [3] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(2): S470 - S475.
- [4] 张楠, 布冠好, 陈复生, 等. 三种主要食物过敏原蛋白及其结构分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 397 - 400.
- [5] 李爽, 席俊, 贺梦雪, 等. 大豆致敏原  $\beta$ -伴大豆球蛋白  $\alpha'$  亚基的分段与克隆鉴定[J]. 食品科技, 2018(3): 25 - 28.
- [6] 孙泽威, 秦贵信, 张庆华. 蒸汽热处理对全脂大豆中主要抗原蛋白免疫原性的影响[J]. 营养学报, 2006(6): 72 - 75.
- [7] SHRIVER S K, YANG W W. Thermal and nonthermal methods for food allergen control[J]. Food Eng Rev, 2011, 3(1): 26 - 43.
- [8] KEUM E H, LEE S I. Effect of enzymatic hydrolysis of 7S globulin, a soybean protein, on its allergenicity and identification of its allergenic hydrolyzed fragments using SDS - PAGE[J]. Food Sci Biotechnol, 2006, 15(1): 128 - 132.
- [9] 黄婷, 布冠好, 陈复生. 碱性蛋白酶对  $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原性的影响[J]. 粮食与油脂, 2018(2): 54 - 59.
- [10] WANG Z, LI L, YUAN D, et al. Reduction of the allergenic protein in soybean meal by enzymatic hydrolysis[J]. Food Agric Immunol, 2014, 25(3): 301 - 310.
- [11] NAGANO T, HIROTSUKA M, MORI H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40(6): 941 - 944.
- [12] 赵谋明, 张远红, 崔春, 等. 胃蛋白酶前处理对大豆蛋白酶解特性的影响[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2012(8): 114 - 119.
- [13] LAEMMI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680 - 685.
- [14] CHEN Y M, ONO T. The mechanisms for yuba formation and its stable lipid[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(10): 6485 - 6489.
- [15] MEGHA K, SHARMA M, GUPTA A, et al. Protein profiling of *Acanthamoeba* species using MALDI - TOF MS for specific identification of *Acanthamoeba* genotype[J]. Parasitol Res, 2018, 117(4): 1 - 8.
- [16] 吴超. 大豆蛋白凝胶结构与非网络蛋白扩散行为或网络蛋白性质关系的研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2017.
- [17] 王锦欣, 秦贵信, 龙国徽, 等.  $\beta$ -伴大豆球蛋白酶解物的抗消化性及免疫活性变化的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2014(9): 45 - 49.
- [18] 李丹, 魏冬旭, 贾焯, 等. 大豆 7S 球蛋白结构特性与表面疏水性相关性研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(4): 93 - 98.
- [19] 刘晓毅, 薛文通, 胡小苹, 等. 酶解法专一性去除大豆 7S 球蛋白中的  $\alpha$  亚基[J]. 食品科技, 2005(8): 16 - 18.
- [20] KASERA R, SINGH A B, LAVASA S, et al. Enzymatic hydrolysis: a method in alleviating legume allergenicity[J]. Food Chem Toxicol, 2015, 76: 54 - 60.
- [21] WU Y M, GUAN R X, LIU Z X, et al. Synthesis and degradation of the major allergens in developing and germinating soybean seed[J]. J Integr Plant Biol, 2012, 54(1): 4 - 14.