

热处理大豆球蛋白的体外消化稳定性

李英英, 席俊, 陈慧彬, 尚阿晨, 王一超

(河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要: 为了有效评估大豆球蛋白抗原性变化, 对热处理后的大豆球蛋白进行体外模拟消化实验, 考察其体外消化稳定性。首先采用碱溶酸沉法从脱脂大豆粉中提取大豆球蛋白, 然后将其经 400 MPa 超高静压处理 15 min 后进行加热 (70、90、110、130 °C) 处理 20 min, 然后进行体外模拟消化实验, 采用 SDS-PAGE、邻苯二甲醛 (OPA) 法和间接竞争酶联免疫 (ELISA) 法研究消化过程中大豆球蛋白的蛋白质分子质量、水解度和抗原性的变化。结果表明: 经体外模拟消化实验后, 与未处理样品相比, 不同温度热处理后大豆球蛋白的蛋白质条带逐渐变浅, 生成更多的小分子蛋白; 在胃消化过程中, 未处理和热处理大豆球蛋白的水解度逐渐增强, 在肠消化过程中, 经过 90、110、130 °C 热处理的大豆球蛋白水解度总体先增加后降低; 与未处理的大豆球蛋白相比, 热处理大豆球蛋白经过胃肠消化后抗原抑制率显著下降, 最低可从 87% 降至 4%。大豆球蛋白经过热处理, 通过胃肠消化后可显著降低其抗原性。

关键词: 大豆球蛋白; 热处理; 体外模拟胃肠消化; 过敏原; 消化稳定性

中图分类号: Q51; TS229

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2022)10-0018-07

In vitro digestion stability of soybean globulin after heating treatment

LI Yingying, XI Jun, CHEN Huibin, SHANG Achen, WANG Yichao

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to effectively evaluate the changes of antigenicity of soybean globulin, in vitro simulated digestion experiments on heating treated soybean globulin were carried out and its in vitro digestion stability was investigated. Soybean globulin was extracted from defatted soybean powder by alkali-soluble and acid-precipitation method. It was treated with ultra-high static pressure of 400 MPa for 15 min and then heated (70, 90, 110, 130 °C) for 20 min for in vitro simulated digestion experiment. The changes of molecular weight, degree of hydrolysis and antigenicity during digestion were studied by SDS-PAGE, *o*-phthalaldehyde (OPA) method and indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that after the in vitro simulated digestion experiment, compared with the untreated samples, the protein bands treated at different temperatures gradually became shallower and more small molecule proteins were generated. In the process of gastric digestion, the degree of hydrolysis of protein before and after treatment gradually increased, and in the process of intestinal digestion, the degree of hydrolysis of protein treated at 90, 110, 130 °C increased first and then decreased. Compared with the untreated protein, the antigen inhibition rate of heat treated soybean

globulin decreased from 87% to 4% after digestion, which significantly reduced its antigenicity. After heating treatment of soybean globulin, its antigenicity was reduced significantly through gastrointestinal digestion.

Key words: soybean globulin; heating treatment; in vitro simulated gastrointestinal digestion; allergen; digestive stability

收稿日期: 2021-08-17; 修回日期: 2022-04-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32172310); 河南工业大学青年骨干教师 (21420043); 河南工业大学创新基金支持计划专项资助 (2020zkcj19)

作者简介: 李英英 (1994), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全 (E-mail) xijunhnu@163.com。

通信作者: 席俊, 副教授 (E-mail) xijunhnu@163.com。

大豆作为八大过敏原之一,会导致大豆过敏群体产生严重的过敏反应^[1]。在欧洲,已知大豆过敏的86%是由大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白引起的,这两种蛋白被用作诊断严重大豆过敏的潜在指标^[2],目前在临床上并无有效预防和根除大豆过敏的方法,避免接触过敏原是唯一的途径^[3]。

模拟消化实验是食物过敏原潜在致敏性评价的有效手段^[4]。Mandalari等^[5-6]在模拟牛的乳球蛋白胃肠消化过程中发现,磷脂酰胆碱可以抗胃肠消化,使乳球蛋白在消化过程中有很好的消化稳定性,当加入的酶量增大时,磷脂酰胆碱的保护作用降低。Prodic等^[7]发现,消化后的花生蛋白能够保持较好的稳定性,花生蛋白内部的抗消化肽起主要致敏作用。赵鑫等^[8]发现,Pea 1蛋白经胃消化后,降解为较稳定的蛋白质小片段,仍具有过敏性。研究表明,消化反应中的过敏原体和表位不仅在人体内会被蛋白质破坏或掩埋,还会使蛋白质暴露或产生一种新的过敏原体和表位,使蛋白质的消化和过敏原特性发生改变^[9]。

研究表明超高压联合热处理后的大豆球蛋白的抗原性显著降低^[10],但是热处理后的大豆球蛋白经过机体消化后的抗原性怎样变化尚无研究。因此,本研究采用体外模拟消化实验对不同温度热处理后的大豆球蛋白在消化过程中蛋白质的分子质量、水解度与抗原性的变化进行分析,旨在为食物中过敏原在消化前后含量、结构等变化的进一步检测提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

脱脂大豆粉,昆华生物技术有限公司。低相对分子质量 Marker 蛋白和羊抗兔二抗,北京索莱宝科技有限公司;胃蛋白酶、胰蛋白酶、胆汁提取物,上海源叶生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS);碳酸盐缓冲液(CBS)。

CTFD-10S型冷冻干燥机,青岛永和和创新电子科技有限公司;LGJ-18型高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;Multiskan FC型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;HPP-600 MPa/5L型超高压处理装备,包头科发高压科技有限责任公司;恒温水浴锅;EPS-30型电泳仪,上海天能科技有限公司;Nanodrop ND-2000超微量核酸蛋白测定仪,美国 Thermo 公司;电热恒温鼓风干燥机,上海齐欣科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆球蛋白的提取

按照 Liu 等^[11]的方法提取大豆球蛋白。取 100

g 脱脂大豆粉加入 1 500 mL 蒸馏水,边搅拌边调 pH 至 8 后静置 1 h,以 4 500 r/min 离心 30 min,取上清,加 1.47 g NaHSO₃,将溶液 pH 调至 6.4,4℃ 冰箱过夜,以 7 000 r/min 离心 20 min,取沉淀,冷冻干燥,即得大豆球蛋白粉末。

1.2.2 加热处理

将 40 mg 大豆球蛋白粉末溶解在 4 mL PBS 中,配成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液,置于无菌均质袋中,经过 400 MPa 超高压处理 15 min 后分别在 70、90、110、130℃ 下加热 20 min,冻干成粉末。

1.2.3 体外模拟消化实验

按照 Amigo - Benavent^[12]、Li^[13] 的方法并稍作修改。

模拟胃消化:分别将 10 mg 未处理大豆球蛋白、不同温度处理的大豆球蛋白样品悬浮在 4 mL 120 mmol/L NaCl (pH 2) 中,室温放置 15 min,使样品充分溶解。然后用 120 mmol/L NaCl (pH 2) 溶液和 0.1 mL 胃蛋白酶溶液(将 5 mg 胃蛋白酶溶解在 2.5 mL NaCl 溶液中)将体积调至 5 mL(酶底比值为 0.02),37℃ 恒温水浴中分别消化 0.3、1、5、15、30、60、120 min 后等量取出,于 90℃ 水浴 10 min 灭酶。

模拟肠消化:将 1 mL 质量浓度为 10 mg/mL 的蛋白经过胃消化 60 min 后加入 3 mL 120 mmol/L NaCl 溶液 (pH 7.5) 中,将溶液的 pH 调至 7.5,用 1 mol/L NaHCO₃ 和 0.5 mL 质量浓度为 0.5 mg/mL 的胰蛋白酶和 15 mg 胆汁提取物混合调至 5 mL(酶底比值为 0.025),在 37℃ 下分别消化 0.3、1、5、15、30、60、120 min 后等量取出,于 90℃ 水浴 10 min 灭酶。

将得到的消化溶液置于 -20℃ 保存。

1.2.4 SDS - PAGE 分析

按照 Mizutani 等^[14]的方法并稍作修改。使用 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。将样品用 PBS 配成质量浓度为 2 mg/mL 的溶液,加入相同体积 2× 上样缓冲液,沸水中加热 5 min,上样。电泳过程结束后,考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h,蒸馏水漂洗后,于脱色液中脱色直到电泳条带变得清晰。

1.2.5 水解度的测定

采用邻苯二甲醛(OPA)法测定水解度^[15]。

丝氨酸标准液:取 10 mg L-丝氨酸标准品,加入 100 mL 去离子水。

OPA 溶液:①将 80 mg OPA 用 2 mL 无水乙醇溶解;②将 1.906 8 g 四硼酸钠、0.1 g SDS 和 88 mg 二硫代苏糖醇(DTT)加水溶解;将①②混合后定容至 100 mL。

1.2.5.1 波长选择

将 400 μL 丝氨酸标准液加入 3 mL OPA 溶液, 反应 2 min 后, 用紫外分光光度计在 300 ~ 400 nm 范围内进行紫外光谱扫描, 最大波长即为测水解度的波长。

1.2.5.2 标准曲线的绘制

分别取 100、200、300、400 μL 丝氨酸标准液于离心管, 不足 400 μL 的用去离子水补足, 加入 3 mL OPA 溶液, 去离子水为对照, 反应 2 min 后, 用紫外分光光度计在确定的最大波长处测定不同质量浓度 (x) 丝氨酸标准液的吸光度 (y), 绘制标准曲线并得到标准曲线方程: $y = 0.1143 + 7.3246x$, 相关系数为 0.9996。

1.2.5.3 样品水解度的测定

将消化后的蛋白样品的质量浓度调为 0.5 mg/mL, 加至 3 mL OPA 溶液中, 反应 2 min 后, 在最大波长处测定吸光度, 代入标准曲线方程, 得到丝氨酸质量浓度, 重复测定 3 次。按下式计算水解度^[16]。

$$W = C \times \frac{V \times N}{X \times P} \quad (1)$$

$$h = \frac{W - \beta}{\alpha} \quad (2)$$

$$D_{\text{H}} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \quad (3)$$

式中: W 为每克蛋白质中含有丝氨酸 - NH_2 的量, mmol/g; C 为丝氨酸的浓度, mmol/L; V 为水解液体积, L; N 为稀释倍数; X 为样品质量, g; P 为样品中所含蛋白质的质量分数; α 和 β 代表解离度, 此处分别取 0.97 和 0.342; h 为每克蛋白质中断裂的肽键数, mmol/g; h_{tot} 为大豆球蛋白总肽键数, 取 7.8 mmol/g。

1.2.6 抗原性测定

根据 Kamath 等^[17]的方法并略有改动, 采用间接竞争酶联免疫 (ELISA) 法测定抗原性。用 CBS 分别将未处理、不同温度处理蛋白及消化后样品的质量浓度稀释至 10、10、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔 100 μL 包被在酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。分别将无竞争的蛋白质 (PBS 缓冲液) 与稀释后的多抗 (1:6400) 等体积混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 得到抗原抗体反应液, PBST 洗 5 次, 每次 5 min, 拍干。每孔加 100 μL 的 PBST (PBS + 0.5% Tween 20) 稀释的 5% 牛血清蛋白 (BSA), 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 90 min, 洗板。每孔加入 100 μL 的抗原抗体反应液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗板。每孔加入 100 μL 羊抗兔二抗 (用封闭液稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗板。每孔加入 100 μL 四甲基联苯胺 (TMB) 单组分显色液, 显色 15 min 后加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 测定 450 nm 下的吸光度。按下式计算抗原抑制率 (Y)。大豆球蛋白的抗原抑制率越低, 则其抗原性越低, 被破坏的过敏原表位越多。

$$Y = (1 - O_{\text{D}}/O_{\text{D}_0}) \times 100\% \quad (4)$$

式中: O_{D} 为样品的吸光度; O_{D_0} 为无竞争样品的吸光度。

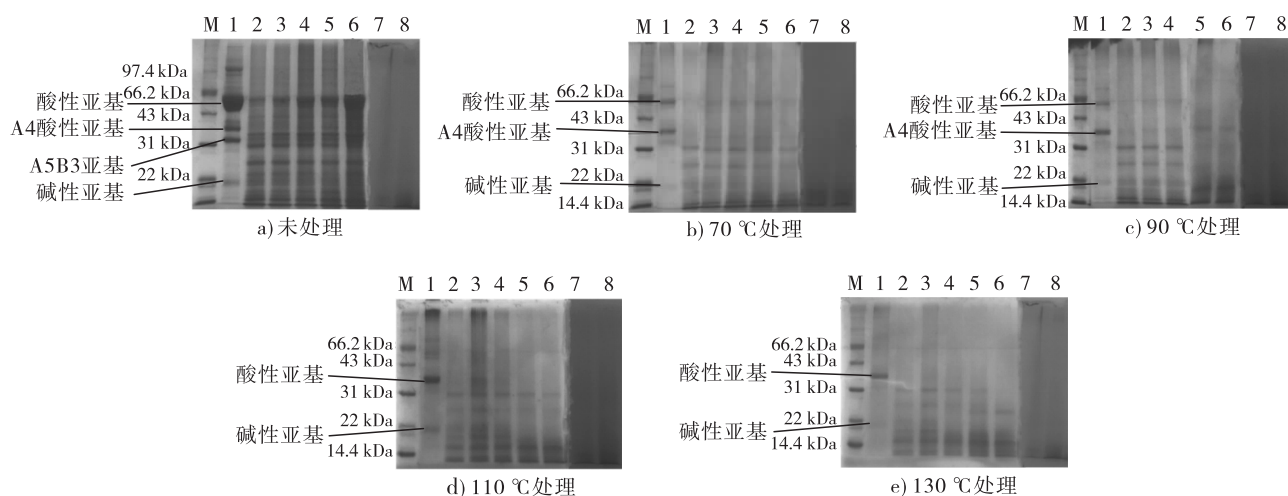
1.2.7 数据处理

使用 SPSS 20.0 软件分析数据, 当 $p < 0.05$ 时, 代表有显著差异。使用 Origin 2018 绘图。

2 结果与分析

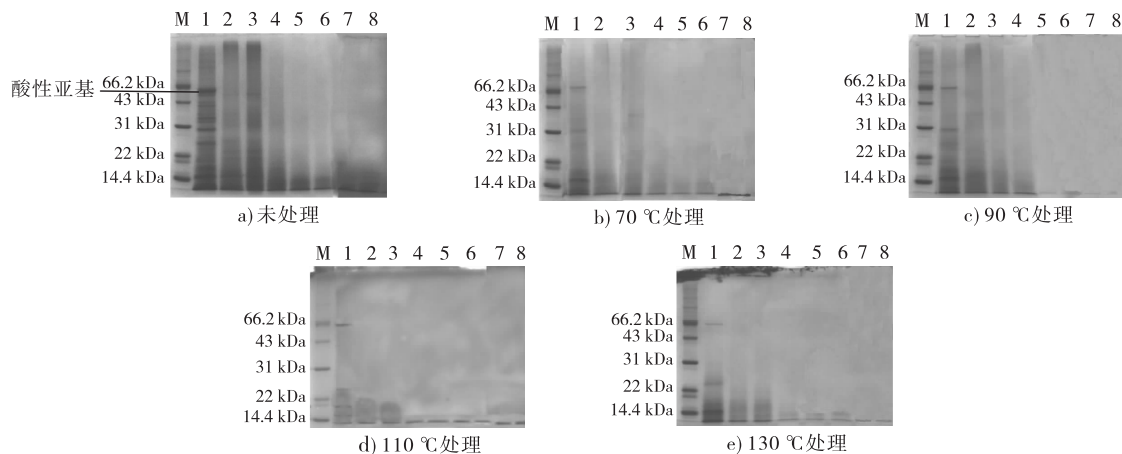
2.1 热处理大豆球蛋白体外消化过程中分子质量的变化

图 1、图 2 分别为不同热处理大豆球蛋白胃、肠消化后的 SDS-PAGE 图。



注: M. Marker; 1. 胃消化 0 min; 2. 胃消化 0.3 min; 3. 胃消化 1 min; 4. 胃消化 5 min; 5. 胃消化 15 min; 6. 胃消化 30 min; 7. 胃消化 60 min; 8. 胃消化 120 min

图 1 不同热处理大豆球蛋白经胃消化后的 SDS-PAGE 图



注: M. Marker; 1. 肠消化 0 min; 2. 肠消化 0.3 min; 3. 肠消化 1 min; 4. 肠消化 5 min; 5. 肠消化 15 min; 6. 肠消化 30 min; 7. 肠消化 60 min; 8. 肠消化 120 min

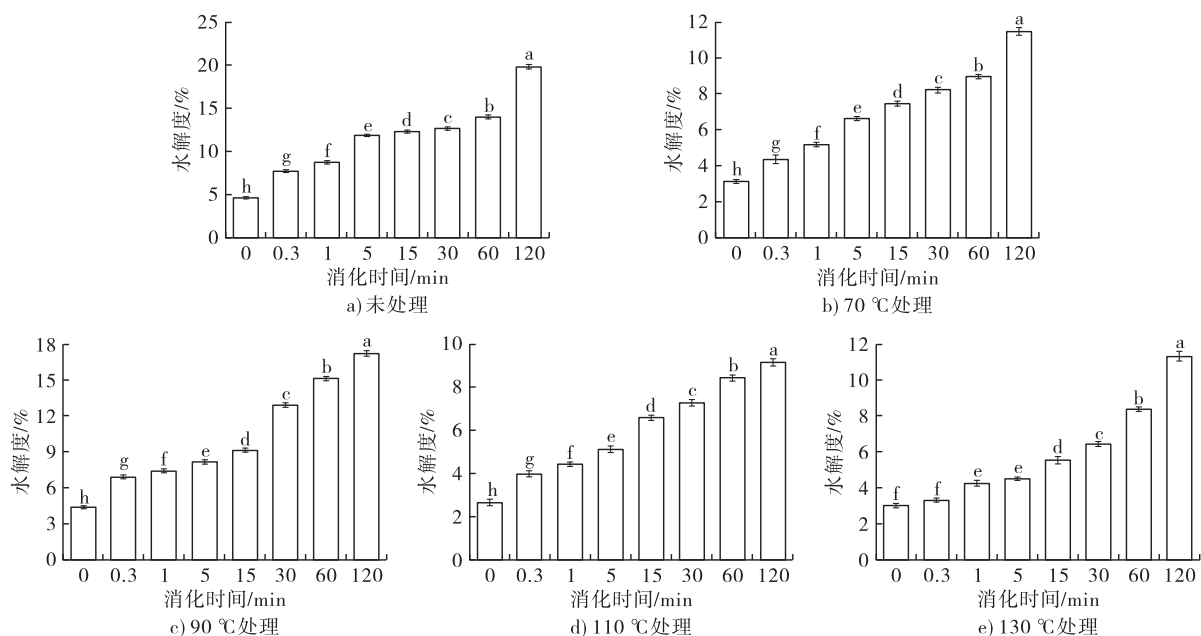
图2 不同热处理大豆球蛋白经肠消化后的 SDS-PAGE 图

在胃肠消化过程中,随着消化的进行,蛋白质的大分子亚基逐渐降解,小分子条带逐渐产生,消化酶破坏氨基酸之间的肽键,生成更小的蛋白质条带,蛋白质的一级结构被破坏。由图1可以看出,随着消化的进行,大豆球蛋白的酸性肽链和碱性肽链被水解为更多的小分子物质,在消化时间为 0.3 min 时,蛋白质条带迅速变浅,说明大豆球蛋白容易降解,在胃消化 60 min 后,各个不同分子质量的蛋白质条带逐渐消失,在热处理温度为 110 °C 和 130 °C 的条件下,在胃消化 60 min 后已经无明显条带,这可能是由于大豆球蛋白被消化酶降解成低分子质量蛋白,此结果与赵城彬^[18]、Cucu^[19]等的研究结果一致。与未处理相比,在胃消化 0.3~60 min 时,经过不同温度热处理后样品的酸性亚基和碱性亚基条带颜色更浅,含量降低。

由图2可知,经过肠消化后,蛋白质被彻底降解。随着消化时间的延长,酸性亚基条带完全消失,这是因为,消化酶与更多的受体结合,破坏了蛋白质的空间结构,使维持结构的肽键断裂,将大分子蛋白降解为分子质量很小的肽段和氨基酸。与未处理相比,热处理后样品在肠消化过程中大分子质量蛋白降解为小分子肽段和氨基酸的速度更快。

2.2 热处理大豆球蛋白体外消化过程中水解度的变化

按 1.2.5.1 方法用丝氨酸标准液在 300~400 nm 范围进行光谱扫描,结果在 334.5 nm 下有最大吸收波长。因此,在 334.5 nm 处测定吸光度,进行标准曲线的绘制,计算未处理和热处理大豆球蛋白分别在胃肠消化过程中的水解度,结果分别见图3、图4。



注:图中不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著。下同

图3 不同热处理大豆球蛋白经胃消化后水解度的变化

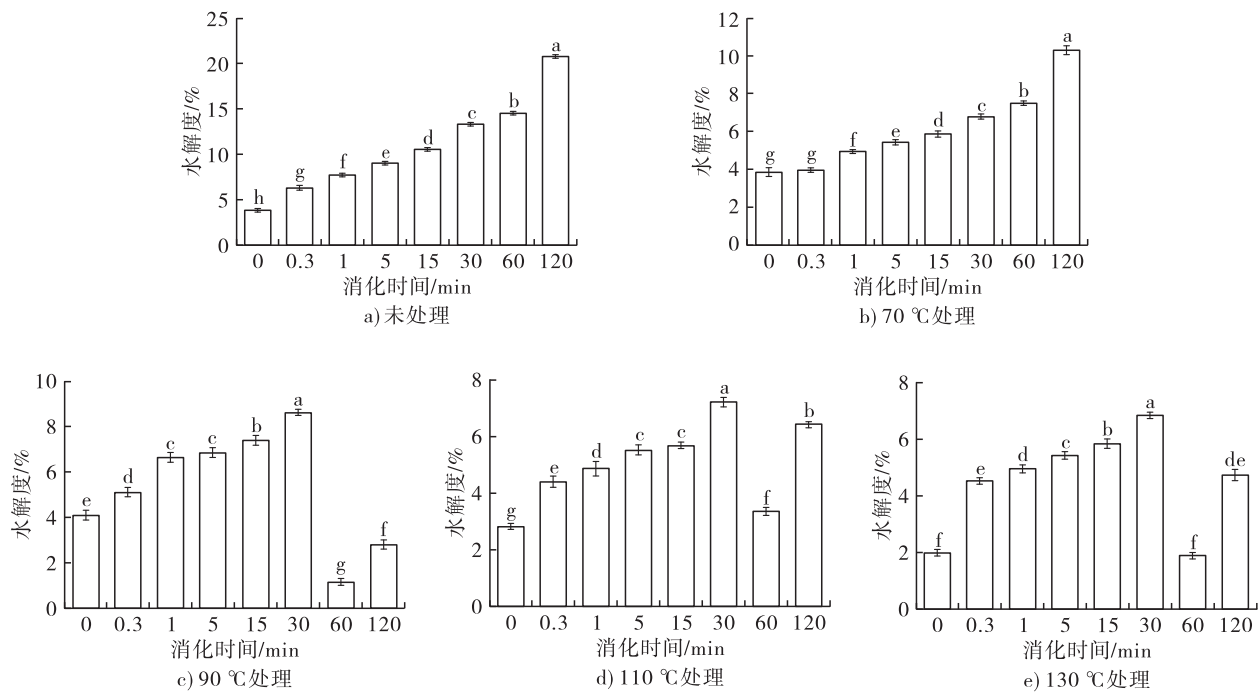


图4 不同热处理大豆球蛋白经肠消化后水解度的变化

由图3可知,在胃消化过程中,随着消化时间的延长,蛋白样品的水解度逐渐增加,在胃消化120 min时水解度达到最高,结合SDS-PAGE图可知胃消化120 min没有出现条带,说明已将蛋白质水解为分子量小于14.4 kDa的物质,在热处理温度为70~130 °C时,随着热处理温度的升高,水解度总体呈先升高后降低趋势,在90 °C时达到最高。

由图4可知,随着热处理温度的升高,经过肠消

化120 min的蛋白样品水解度总体下降,在90、110 °C和130 °C加热处理下蛋白样品水解度随着消化时间的延长总体呈先升高后降低趋势。

2.3 热处理大豆球蛋白体外消化过程中抗原性变化

不同热处理的大豆球蛋白经胃、肠消化后的抗原抑制率变化分别见图5、图6。

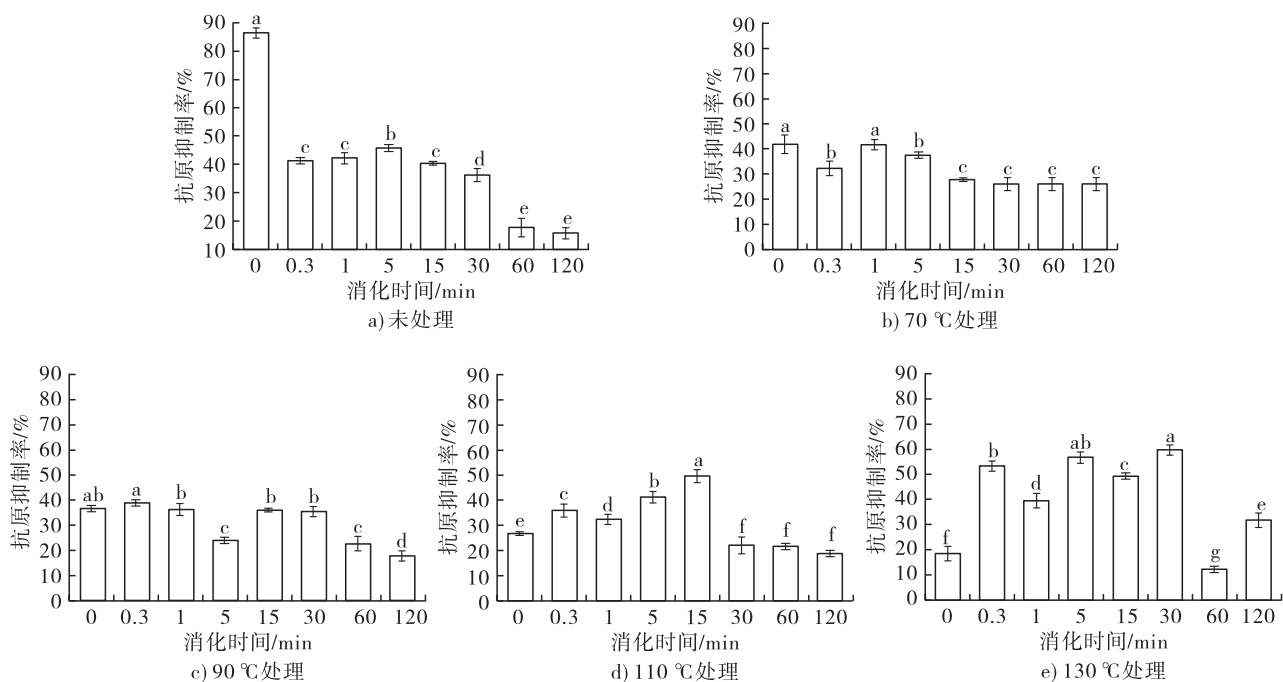


图5 不同热处理大豆球蛋白经胃消化后抗原抑制率的变化

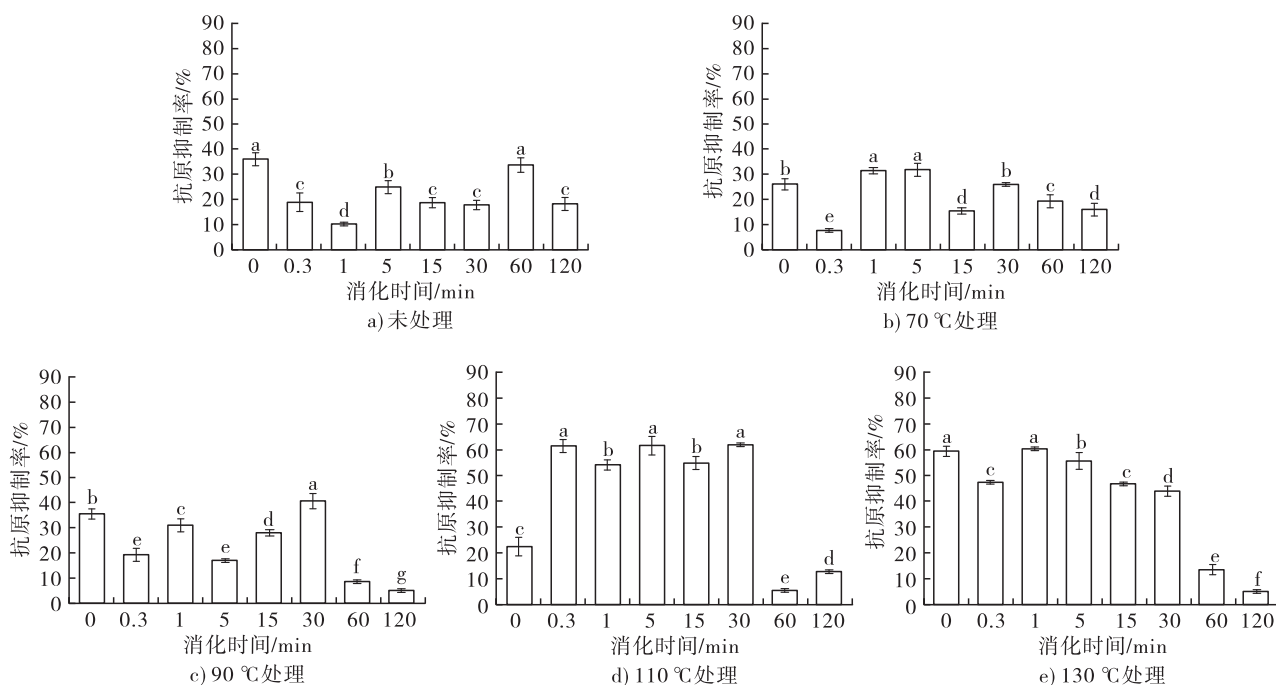


图6 不同热处理大豆球蛋白经肠消化后抗原抑制率的变化

由图5和图6可知,未处理的大豆球蛋白抗原抑制率为87%,热处理后的大豆球蛋白的抗原抑制率总体显著降低,热处理后经胃肠消化大豆球蛋白的抗原性降低。未处理的大豆球蛋白抗原抑制率随着消化时间的延长显著下降,并在肠消化1 min后达到最低;之后随着消化时间的进一步延长,之前被掩埋的或产生的抗原表位少量暴露抗原抑制率增加,说明在一定的条件下,蛋白质的部分基团对抗原表位有一定的保护作用^[20]。而在特定温度处理的大豆球蛋白经过胃肠消化后蛋白质的抗原性显著降低,如在90℃和130℃下肠消化120 min和110℃下肠消化60 min,大豆球蛋白的抗原抑制率均可降至4%左右。另外,可以发现在胃肠消化过程中不同热处理大豆球蛋白的抗原抑制率有所升高,可能是因为热处理后蛋白质严重变性,可溶性蛋白质减少,打破了表位蛋白质之间的空间位阻,使小分子肽结合成更大的抗原表位。经过消化后,抗水解肽和表位氨基酸被释放,使抗原表位得到活化,从而提高了抗原性。另外,消化过程中水解程度的增加可能导致蛋白质内的表位暴露或形成新的表位^[21],使抗原性增加。但经过胃肠消化后,总体上抗原抑制率呈下降趋势。

3 结论

本文采用体外模拟消化评估热处理后大豆球蛋白的消化稳定性,考察热处理对大豆球蛋白抗原性

的影响。结果表明:与未处理大豆球蛋白相比,不同热处理大豆球蛋白的酸性亚基(强致敏性)和碱性亚基条带变浅,经胃肠消化后,酸性亚基降解得更快;在胃消化过程中,水解度随着消化时间的延长而升高,在肠消化过程中,70℃加热处理的大豆球蛋白水解度与未处理的大豆球蛋白水解度变化相似,均持续增大,而90、110℃和130℃加热处理的大豆球蛋白,其水解度总体先升高后降低。与未处理相比,经过不同温度热处理的大豆球蛋白的抗原抑制率总体显著降低;在肠消化过程中,在90℃和130℃下消化120 min和110℃下消化60 min大豆球蛋白的抗原抑制率均为4%左右,与未处理的大豆球蛋白的抗原抑制率87%相比,抗原性显著降低。

大豆球蛋白经过加热处理,通过胃肠消化后可显著降低其抗原性,可以减少人或动物摄入大豆球蛋白后存在的致敏风险,本研究对今后开发过敏原的消减技术和低致敏性大豆制品具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and management[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 141(1):41-58.
- [2] LU M, JIN Y, CERNY R, et al. Combining 2-DE immunoblots and mass spectrometry to identify putative

- soybean (*Glycine max*) allergens[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 116:207 – 215.
- [3] 龚育清,杨安树,陈红兵,等. 基于生物技术控制大豆过敏原的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(10): 375 – 379.
- [4] 郭玉蔓,罗晨,鄧莉莉,等. 模拟消化方法在食物过敏原潜在致敏性评价中的应用进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(17): 397 – 404.
- [5] MANDALARI G, ADEL – PATIENT K, BARKHOLT V, et al. In vitro digestibility of β – casein and β – lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: a multi – laboratory evaluation [J]. *Regul Toxicol Pharm*, 2009, 55(3):372 – 381.
- [6] MANDALARI G, MACKIE A M, RIGBY N M, et al. Physiological phosphatidylcholine protects bovine β – lactoglobulin from simulated gastrointestinal proteolysis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(S1): S131 – S139.
- [7] PRODIC I, STANIC – VUCINIC D, APOSTOLOVIC D, et al. Influence of peanut matrix on stability of allergens in gastric – simulated digesta: 2S albumins are main contributors to the ige reactivity of short digestion – resistant peptides[J]. *Clin Exp Allergy*, 2018, 48(6): 731 – 740.
- [8] 赵鑫,高美须,牟慧,等. 模拟胃液对 Pen a1 及其抗原表位抗原性的影响[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(4): 769 – 777.
- [9] ZHU J, DENG H, YANG A S, et al. Effect of microbial transglutaminase cross – linking on the quality characteristics and potential allergenicity of tofu[J]. *Food Funct*, 2019, 10(9):5485 – 5497.
- [10] XI J, LI Y Y. The effects of ultra – high – pressure treatments combined with heat treatments on the antigenicity and structure of soy glycinin[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2021, 56(10): 5211 – 5219.
- [11] LIU C, WANG H, CUI Z, et al. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein[J]. *Food Chem*, 2007, 102(4):1310 – 1316.
- [12] AMIGO – BENAVENT M, CLEMENTE A, FERRANTI P, et al. Digestibility and immunoreactivity of soybean β – conglycinin and its deglycosylated form [J]. *Food Chem*, 2011, 129(4):1598 – 1605.
- [13] LI T H, BU G H, XI G P. Effects of heat treatment on the antigenicity, antigen epitopes, and structural properties of β – conglycinin[J/OL]. *Food Chem*, 2020, 346: 128962 [2021 – 08 – 01]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128962>.
- [14] MIZUTANI Y, SHIBATA M, YAMADA S, et al. Effects of heat treatment under low moisture conditions on the protein and oil in soybean seeds[J]. *Food Chem*, 2018, 275: 577 – 584.
- [15] 罗艳华,王全杰,陈沛海,等. 蛋白水解物水解度测定方法的研究[J]. *皮革与化工*, 2017, 34(2): 26 – 31.
- [16] 林虬,黄薇,宋永康,等. 棉籽蛋白水解物水解度 3 种测定方法的比较[J]. *福建农业学报*, 2011, 26(6): 1076 – 1080.
- [17] KAMATH S D, RAHMAN A M A, KOMODA T, et al. Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies [J]. *Food Chem*, 2013, 141(4):4031 – 4039.
- [18] 赵城彬,尹欢欢,鄢健楠,等. 不同热处理条件下大豆蛋白体外模拟消化产物结构和分子质量分布[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(5): 59 – 65.
- [19] CUCU T, PLATTEAU C, TAVERNIERS I, et al. Effect of partial hydrolysis on the hazelnut and soybean protein detectability by ELISA[J]. *Food Control*, 2013, 30(2): 497 – 503.
- [20] DUPONT D, MACKIE A R. Static and dynamic in vitro digestion models to study protein stability in the gastrointestinal tract[J]. *Drug Discov Today*, 2015, 17/18:23 – 27.
- [21] 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.