

降低牛乳中 β -乳球蛋白致敏性方法的研究进展

杨晶晶, 赵树静, 刘甜甜, 李艳艳, 李红娟, 李洪波

(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要:牛乳过敏(CMA)是婴幼儿中一种常见的食物过敏,严重危害婴幼儿的身体健康。 β -乳球蛋白(β -LG)是牛乳中重要营养物质,但却是引起牛乳蛋白过敏的主要过敏原。目前,降低牛乳中 β -LG致敏性已经成为国内外研究热点之一。对CMA机制进行了介绍,综述了降低 β -LG致敏性的常用方法,包括物理改性如热处理、高压处理、超声波处理,化学改性如糖基化、 β -LG与脂肪酸结合、 β -LG与多酚结合,酶法改性以及联合改性如物理改性联合酶水解改性、动态高压微射流技术联合脂肪酸处理、酶水解联合糖基化处理,旨在为生产低致敏性食品提供一定的理论依据。

关键词: β -乳球蛋白;致敏性;物理改性;化学改性;酶法改性;联合改性

中图分类号:TS201.1;TS252.1 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)05-0075-07

Progress in methods of reducing the allergenicity of β -lactoglobulin in cow's milk

YANG Jingjing, ZHAO Shujing, LIU Tiantian, LI Yanyan,
LI Hongjuan, LI Hongbo

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Cow's milk allergy (CMA) is a common food allergy in infants and young children, which seriously harms the health of infants and young children. β -lactoglobulin (β -LG) is an important nutrient in cow's milk, but it is the main allergen of causing cow's milk protein allergy. Currently, reducing the allergenicity of β -LG has become one of the research hotspots. The mechanism of CMA and common methods to reduce the allergenicity of β -LG, including physical modification (heat treatment, high pressure treatment, ultrasonic treatment), chemical modification (glycosylation, fatty acid binding, polyphenol binding), enzymatic modification and combined modification methods were reviewed. The purpose was to provide a theoretical basis for the production of low allergenic food.

Key words: β -lactoglobulin; allergenicity; physical modification; chemical modification; enzymatic modification; combined modification

牛乳营养物质丰富,含有母乳中的大部分蛋白成分,如酪蛋白(CN)、 α -乳白蛋白(α -LA)、牛血清白蛋白(BAS)、免疫球蛋白、乳铁蛋白、乳过氧化物酶、溶菌酶等^[1]。对婴幼儿而言,牛乳是母乳的

最佳替代品。但牛乳蛋白过敏是常见的儿童食物过敏,其不同国家的发生率存在显著差异,如我国儿童过敏的发生率为0.3%~7.5%,成年人则小于1%^[2],而某些欧洲国家,婴幼儿的过敏率为2%~5%^[3]。研究表明, β -乳球蛋白(β -LG)、CN和 α -LA是牛乳过敏原中含量最多、致敏性最强的蛋白组分^[4],其中不存在于母乳中的 β -LG属于强过敏性家族,同时该蛋白耐胃酸、胃蛋白酶水解,消化后还会存在完整的 β -LG或致敏肽段,易引起过敏反应。因此, β -LG被认为是牛乳中主要的过敏原组分。

收稿日期:2020-07-11;修回日期:2021-01-21

基金项目:国家重点研发计划(2017YFE0131800);天津市教委科研计划项目(2018KJ092);天津市教育科学“十三五”规划课题青年专项(HEYP5015)

作者简介:杨晶晶(1994),女,硕士研究生,研究方向为乳与乳制品(E-mail)1757407574@qq.com。

通信作者:李洪波,讲师,博士(E-mail)hljbobo@tust.edu.cn。

目前,国内外有许多降低 β -LG致敏性的研究。一般是通过破坏 β -LG的二、三级结构,暴露出更多酶切位点和疏水性氨基酸残基,使致敏蛋白构象变得松散,抗原表位被掩盖或暴露后被破坏,从而减弱其被IgG/IgE抗体识别的能力^[5-6]。这样不仅可以降低牛乳的致敏性,还可以在不改变牛乳成分和营养价值的同时提高蛋白的保水性、乳化性及抗氧化特性^[7-8]。本文对牛乳过敏机制进行了介绍,综述了物理改性、化学改性、酶法改性以及联合改性等方法降低 β -LG致敏性的研究,探究 β -LG致敏性的变化,为生产低致敏性食物提供一定的理论依据。

1 牛乳过敏(CMA)机制

食物过敏也称食物变态反应或消化系统变态反应、过敏性胃肠炎等,根据食物过敏的临床特征、食物特异性IgE测定、食物激发结果和其他辅助试验(如斑贴试验和内镜检查),食物过敏大致分为IgE介导(速发I型超敏反应)、非IgE介导(T细胞介导迟发IV型超敏反应)和涉及嗜酸性粒细胞和其他细胞成分的混合型过敏反应。其中:混合型过敏反应常常表现出IgE介导和非IgE介导重叠的临床特征^[9];常见的速发型超敏反应临床症状一般为急性胃肠道反应,包括出血性胃肠道反应、腹泻和荨麻疹;而迟发型超敏反应以皮肤、呼吸和胃肠道症状为特征,包括过敏性皮炎、哮喘、慢性腹泻和胃食管反流病等^[1,10]。

CMA主要是由IgE引起的I型超敏反应,主要受免疫机制调节^[11]。当患者首次食用牛乳后,过敏蛋白通过皮肤、肠道或呼吸系统产生特异性IgE抗体,随后IgE抗体与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的IgE受体结合。当过敏原再次暴露后,效应细胞脱颗粒,同时释放前列腺素、白三烯、嗜酸性粒细胞趋化因子等其他介质。这些介质具有诱导血管扩张、黏液分泌、平滑肌收缩和其他炎症细胞涌入等功能,在几分钟到1h内迅速触发一系列I型超敏反应炎症^[12]。一些牛乳过敏患者由于B细胞和T细胞因子的存在不发生乳蛋白与IgE的特异性结合,而是在摄入乳蛋白后的1h到几天发生迟发型超敏反应^[13]。目前,牛奶过敏的诊断和预防主要依据全球临床实践。通过评估临床病史,医生可根据特异性IgE临界点、皮肤点刺试验直径和/或特异性斑贴试验估计CMA的概率^[14]。

2 降低 β -LG致敏性的方法

2.1 物理改性

通过热处理法、高压处理法、超声波处理法等破

坏 β -LG的空间结构,使其构象发生折叠或聚合等变化,从而诱导 β -LG抗原性或致敏性的改变。物理改性具有操作方便、不改变牛乳营养成分等优点,但其缺点也很明显,如处理温度和时间不当以及过酸、过碱都可能影响 β -LG的性质及结构。

2.1.1 热处理

热处理是食品加工中最常用的加工手段,通过共价键或非共价键使蛋白质相互作用,生成聚合物。这种热诱导的聚合物在一定程度上将致敏蛋白的抗原表位掩盖,从而降低其致敏性。Taheri-Kafrani等^[15]研究了 β -LG在65、75、85、95℃处理20min后对牛乳过敏患者血清IgE识别能力的影响。结果表明,天然 β -LG的IC₅₀值为0.34 μg/mL,随着温度的升高,IC₅₀值逐渐增大,在85℃和95℃时达到最大值,分别为11.74 μg/mL和11.63 μg/mL。IC₅₀值反映了抗体与过敏原的结合能力,较高的IC₅₀意味着较低的结合能力。这表明来自CMA的IgE对热处理 β -LG的识别率低于天然 β -LG,并且这种效应随着温度的升高而逐渐增强。这可能是因为65℃时 β -LG主要以单体形式存在,当温度高于70℃时,由于二硫键的形成而引起热诱导变性和聚集,使二聚体的比例增加,并且出现较大的聚合物(三聚物、四聚物等)。随着温度的进一步升高,聚合物增多导致构象表位消失,从而导致 β -LG与IgE结合减少。对于 β -LG而言,环境因素,如pH、剪切力、离子强度等也是影响其热变性的重要因素。Rahaman等^[16]研究了pH(3、5、7)、温度(80、100、120℃)和剪切力(100、500、1 000 s⁻¹)对 β -LG构象变化及抗原性的影响。结果表明,在pH 3下加热会导致蛋白质的去折叠和部分酸水解,从而暴露出一些隐藏的表位,提高抗原性。在pH 5和pH 7下加热由于共价键合分子聚合和聚集,破坏或掩盖了某些表位从而降低了过敏反应。在剪切力为100~1 000 s⁻¹、pH为5时,将 β -LG溶液加热到120℃的抗原性最小。总的来说,通过热变性或二硫醚或硫醇介导的相互作用对 β -LG进行结构修饰,可以增强或降低其抗原性。热处理不可能完全消除IgE结合表位,而且随着温度的进一步升高(100℃以上),可能导致牛乳蛋白消化特性的改变或美拉德反应的发生^[17],从而形成新的表位。因此,如何通过热处理有效地降低牛乳蛋白致敏性仍然是一个有待解决的问题。

2.1.2 高压处理

高压技术是目前食品加工中常用的非加热技术之一。超高压会影响 β -LG的非共价键如氢键、离

子键、疏水键等,破坏蛋白质的二级结构^[18]。动态高压微射流技术(DHPM)是一种高效的超微细化技术,其以超高压理论、流体力学理论、撞击流理论为基础,集输送、混合、超微粉碎、加压、膨化等多种单元操作于一体,能有效改善蛋白质的溶解性、稳定性、起泡性、乳化性和致敏性等,已被广泛用于脂肪替代品的生产、奶酪的制备、牛奶质量的改善等^[19]方面。洪启通^[19]研究0.1、80.0 MPa和160.0 MPa的DHPM处理对 β -LG致敏性的影响时发现,随着DHPM处理压力的升高, β -LG的 α -螺旋和 β -折叠含量减少,致敏性逐渐降低。白雨鑫^[20]在研究0~200 MPa静高压处理 β -LG对致敏性的影响时也获得了相同的结果。而Meng等^[21]通过抗 β -LG的兔抗体间接竞争酶联免疫吸附试验和牛奶过敏患者血清测定高压(100、200、300、400、500 MPa)处理后 β -LG致敏性的变化。酶联免疫吸附试验结果表明,与未处理的 β -LG相比,100 MPa或200 MPa处理的 β -LG样品IgE结合强度较低,在200 MPa下IgE结合强度下降最大,达到15.2%。然而,血清IgE与高压处理的 β -LG结合强度从200 MPa开始逐渐增加,在400 MPa达到最大值,比未处理的 β -LG样品增加了10.8%。综上所述,高压处理 β -LG的潜在致敏性随压力不同而变化。此外,温度、pH都是影响高压处理 β -LG效果的重要参数。

2.1.3 超声波处理

超声波处理作为乳品工业中一种高效的食品加工技术,能够利用其空化作用和空穴效应破坏或改变蛋白质的三、四级结构,释放出小分子亚基或肽,目前已经成功地用于乳状液的均质和功能特性的改善^[22-23]。李雪^[24]研究了超声波处理对 β -LG结构和抗原性的影响。结果表明,随着超声波功率的增大, β -LG的 β -折叠含量和表面疏水性呈先升高后降低的趋势。在400 W处理25 min时, β -LG的高级结构展开程度达到最大,其内部的致敏表位暴露,导致抗原性达到最大。当超声波功率达到550 W时, β -LG发生部分折叠,致敏表位被掩盖, β -LG抗原性开始下降。因此, β -LG抗原性的高低与其结构的改变密切相关。Shao等^[25]采用光谱法、色谱法和ELISA法研究超声波预处理对 β -LG体外消化过程中结构、抗氧化活性和IgG/IgE结合能力的影响。结果表明,经胃液消化后, β -LG的IgG/IgE结合能力增强,但在随后的肠道消化中, β -LG呈现完全相反的结果。其原因可能是超声波处理增加了 β -LG对胃蛋白酶水解的敏感性,导致水解初期大量疏水性肽(1~5 kDa)的积累。但超

声波处理却促进了胰蛋白酶对 β -LG的水解,产生了更多的小肽(<1 kDa),导致IgG/IgE结合能力较弱。在该项研究中,以120 W超声功率处理 β -LG时,小肽含量显著增加, β -LG与IgG/IgE的结合能力最低。目前采用超声波技术控制食物过敏原的研究已经很多,该技术对过敏原蛋白结构的影响值得更深层面的探讨。

2.2 化学改性

β -LG作为脂蛋白家族中的一员,具有对疏水性配体的高亲和力^[26]及结合、运输亲脂营养物质(如视黄醇、脂肪酸和维生素D)的能力^[27-29]。 β -LG在与配体结合和释放过程中可能发生某种蛋白质重排,使致敏性发生变化。目前,已有许多关于 β -LG结合碳水化合物、脂肪酸、多酚等的研究。该方法不改变蛋白质性质,还能增强蛋白质的功能特性,但存在处理过程复杂,可能改变原有风味以及结合部位还需进一步确定等缺点。

2.2.1 糖基化

糖基化是通过美拉德反应对蛋白质进行修饰的一种方法,此过程能够掩饰或破坏 β -LG的致敏表位,从而改变其致敏性。Zhong等^[30]研究表明, β -LG与低聚果糖(FOS)结合后,其抗原性降低,这与其构象变化有关。为了进一步揭示 β -LG构象和抗原性变化的关系,该课题组利用从FOS提取的蔗果四糖(GF₃)和蔗果五糖(GF₄)研究 β -LG构象与抗原性之间的关系。结果表明,与GF₃和GF₄结合后, β -LG的抗原性分别从143.4 μ g/mL降至29.5 μ g/mL和31.6 μ g/mL^[31]。这一变化与 β -LG糖基化后荧光强度降低,荧光光谱红移,—SH含量增加密切相关。目前,已经有很多关于糖基化修饰 β -LG的研究,同时还探讨了 β -LG在修饰过程中的结构变化以及抗原性等功能特性的变化。如Yang等^[32]研究了超声波预处理联合干态糖基化对 β -LG结合IgG/IgE的影响。结果表明,在0、200、400、600 W的超声波功率下,糖基化 β -LG的IC₅₀值分别为7.89、11.86、20.07、14.82 μ g/mL,是对照组(2.67 μ g/mL)的2.95、4.44、7.52和5.55倍。因此,糖基化显著降低了 β -LG与IgG/IgE的结合能力,可能是由于氨基酸残基和还原糖共价连接而屏蔽了一些致敏表位所致。

2.2.2 β -LG与脂肪酸结合

1948年,Mcmeekin等^[33]首次发现了 β -LG和十二烷基硫酸钠(SDS)结合的晶体结构,随后大量的研究进一步证实了 β -LG能特异性结合脂肪酸

等疏水性配体。Kurpiewska 等^[34]研究了在 550 MPa 的高压下肉豆蔻酸与 β -LG 结合对 β -LG 抗原表位的影响,发现有脂肪酸存在时,压力可以潜在地识别 β -LG 中最敏感的致敏片段,从而降低其致敏性。与这些发现相反,孟轩夷^[35]研究油酸、亚油酸、共轭亚油酸、 α -亚麻酸和 γ -亚麻酸 5 种 C18 不饱和脂肪酸依次分别与 α -LA 和 β -LG 的结合反应,并检测复合物与 IgG/IgE 的结合能力。结果表明,结合不饱和脂肪酸后 α -LA 和 β -LG 的二、三级结构被破坏,表面疏水性增强,蛋白质向无序结构转变,并且随着脂肪酸不饱和程度的增加,复合物与 IgG/IgE 的结合能力增强。这可能是由于脂肪酸与两种乳蛋白相互作用后,蛋白质结构逐渐展开致使内部的 IgG/IgE 表位暴露,因此与脂肪酸结合可以增强 α -LA 和 β -LG 表面疏水性以及与 IgG/IgE 的结合能力。 β -LG 与脂肪酸的结合位点还需进一步精确,以避免 β -LG 内部的 IgG/IgE 表位暴露,使致敏性增强。

2.2.3 β -LG 与多酚结合

β -LG 被认为是膳食多酚与球状蛋白结合的理想模型,两者可以通过共价或非共价结合,改变复合物的结构、功能和营养特性,从而增加该蛋白的潜在应用。目前,大部分研究表明膳食多酚与 β -LG 呈现较强的非共价相互作用^[36]。Wu 等^[37]研究 β -LG 与表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和绿原酸(CA)结合时发现, β -LG 与 EGCG 和 CA 通过亲核加成等共价相互作用结合,通过 ELISA 法测得 β -LG-EGCG 和 β -LG-CA 复合物的 IgE 抑制曲线均低于 β -LG 对照组,这是由于结合后 β -LG 的二级结构增多,酪氨酸残基转移到更亲水的环境,屏蔽了一些致敏表位。同时,该研究证明 β -LG 与多酚偶联物保持了视黄醇结合活性,具有较高的热稳定性和抗氧化活性。但是,大部分多酚能够被氧化成相应的醌和半醌,并进一步与蛋白质上的大量亲核物质(如半胱氨酸或赖氨酸)发生共价结合^[38],从而影响蛋白质的性质。因此,为了更好地掌握 β -LG 与多酚共价结合时 IgE 结合减少的机制,需要进一步确定结合位点。

2.3 酶法改性

酶水解是一种常用的蛋白质改性方法,能够有效降低蛋白质的致敏性。无论是用单一酶水解还是多种酶复合水解,都会使蛋白质的结构发生变化,从而影响牛乳蛋白的致敏性。目前,常用于水解牛乳蛋白的酶主要是商业性的消化酶制剂如胰蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶,蔬菜水果来源的木瓜蛋白酶、

菠萝蛋白酶,以及微生物来源的中性蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶等^[39]。

国内外有许多关于酶法水解牛乳蛋白的报道,目前的研究热点主要集中在新型酶的挖掘及复合酶的水解。Dbrowska 等^[40]用解脂酵母培养制备的丝氨酸蛋白酶分别水解乳清蛋白 1、5 h 和 24 h,测定其水解产物的免疫反应。结果表明,在所用酶制剂的最高质量浓度(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时,与未水解组相比,水解 1 h 和 24 h 的水解物与 IgE 抗体结合的反应抑制率分别为 87.38% 和 67.72%。相比之下,5 h 的水解液在 5~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的酶质量浓度范围内表现出更高的免疫反应。酶水解降低乳清蛋白免疫反应的能力是不同的,并且取决于水解反应的时间。最近,Feng 等^[41]研究了新型 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 磁性纳米花固定木瓜蛋白酶(PCMNs)水解牛乳蛋白。结果表明,PCMNs 比游离碱性木瓜蛋白酶活性高 1 556%。此外,通过 SDS-PAGE 分析表明,PCMNs 能将牛乳中的 β -LG、 α -LA 和 BSA 完全水解,甚至会水解部分酪蛋白。PCMNs 具有载体成本低、催化活性高、稳定性好、分离速度快等优点,为生产低致敏、易消化牛乳提供了一种新的方法。相比单一酶水解牛乳蛋白,多种酶联合以及与其他工艺(如热处理或加压)联合使用能更大程度降低 β -LG 的致敏性。

2.4 联合改性

联合改性方法将物理、化学、酶法改性的优点联合使用,被认为是目前降低 β -LG 致敏性最有效的方法。

2.4.1 物理改性联合酶水解改性

离子液体由于其良好的溶解性、非挥发性、热稳定性和化学惰性,已逐渐应用于医药、化妆品和食品^[42-43]。当用离子液体对蛋白质进行预处理时,蛋白质的结构被拉伸并重新聚合,蛋白质聚集体变得松散,从而提高了酶水解过程中底物与蛋白酶的结合率,增加蛋白质水解。Zhang 等^[44]利用超声波与离子液体耦合对乳清蛋白进行预处理,酶水解后测定其水解物的抗原性变化。结果表明:经碱性蛋白酶水解后, α -LA 和 β -LG 的抗原性下降率分别为 82.82% 和 88.01%;经木瓜蛋白酶水解的抗原性下降率分别为 81.87% 和 88.46%;超声波耦合离子液体预处理后,乳清蛋白的相对分子质量变化不大,但酶解液中各组分的小相对分子质量比例明显增加,可以制备低致敏性的牛乳清蛋白。Zhong 等^[45]研究了 DHPM(0.1~80 MPa)处理后 β -LG 抗原性的变化。结果表明,未处理的 β -LG 的抗原性为 599 ng/mL,经

40 MPa 和 80 MPa 的 DHPM 处理后, β -LG 抗原性分别提高到 1 183 ng/mL 和 3 577 ng/mL。虽然在 40 MPa 和 80 MPa 条件下, DHPM 处理后 β -LG 抗原性有所提高, 但联合胰蛋白酶水解后 β -LG 的抗原性显著降低。DHPM (40 MPa) 处理后的 β -LG 经胰蛋白酶水解后抗原性仅为 1.9 ng/mL。虽然 DHPM 一定程度上可以提高 β -LG 的抗原性, 但在高压下 β -LG 消化率的提高导致了水解过程中其抗原性的降低。综上所述, 可以利用更多物理改性与酶水解结合的方式获得抗体结合能力极低的水解物。

2.4.2 DHPM 联合脂肪酸处理

俞宏达^[46]研究了 DHPM 处理下 β -LG 与油酸结合特性及分子结构的变化。结果表明, 天然 β -LG 的抗原性是 15.00 μ g/mL, 与油酸(OA)结合后, β -LG-OA (0.1 MPa) 的抗原性降低至 9.861 μ g/mL, β -LG-OA (80 MPa) 和 β -LG-OA (160 MPa) 的抗原性分别降低到 7.15 μ g/mL 和 6.01 μ g/mL。在 0~80 MPa 下 β -LG 暴露了自由巯基和疏水基团, 更易与油酸分子结合, 从而屏蔽了 β -LG 的抗原表位使其致敏性降低。而在 120~160 MPa 下蛋白质分子发生重聚集, 使得 β -LG 致敏性进一步降低。这些研究结果表明某些表位可能通过油酸掩盖或构象改变进行修饰, 从而导致 β -LG 分子的致敏性下降。Zhong 等^[47]研究了 β -LG 在 0.1、80 MPa 和 160 MPa 的 DHPM 处理后与油酸的相互作用, 也得到了致敏性降低的结果。

2.4.3 酶水解联合糖基化处理

酶技术发展迅速, 固定化酶已经广泛应用于食品行业, 其越来越受到广大研究者的关注。目前, Xu 等^[48]研究固定化胰蛋白酶和糜蛋白酶水解乳清分离蛋白(WPI)制备多肽, 并将所得乳清分离蛋白水解物(WPIH)与 10 kDa 右旋糖酐(DX)在 62 °C 的水溶液中糖化 24 h, 通过尺寸排阻色谱结合多角度激光散射测定分析 WPIH 及其相应的糖基化合物的相对分子质量以及与其 IgE 的结合能力。结果表明, WPIH-1(水解 1 h)至 WPIH-3(水解 4 h)的平均相对分子质量从原料的 11.15 kDa 分别下降到 9.46 kDa 和 7.57 kDa, 水解度分别为 22.5% 和 27.1%。经酶水解后平均相对分子质量降低, 产生了更多的糖基化基团, 提高了糖基化程度。与 WPI 或 WPIH 相比, WPIH-DX 显著降低了特异性 IgE 的结合能力, 降低率高达 99%。因此, WPI 水解后与 DX 进行糖基化, 可显著降低 WPI 的致敏性。由此可见, 水解度和所用酶的类型是影响蛋白质水解降低 IgE 结合能力的重要因素之一。固定化酶应用于水解牛乳

蛋白是近几年的研究热点, 因此可考虑固定化酶结合其他加工方法水解牛乳蛋白, 为以后研究酶水解途径提供新思路。

3 结束语

近几年, 随着研究的进一步的深入, 发现每种降低 β -LG 致敏性的方法都有一定的局限性。某些物理改性仅仅停留在对过敏原结构的影响, 化学改性的结合位点还需进一步确定, 新型酶的挖掘迫在眉睫。联合改性能最大程度降低 β -LG 的致敏性, 是目前最常应用于实际生产的方法之一。迄今为止, 我国还普遍存在婴幼儿、少部分成年人对牛乳过敏的情况, 过敏患者的安全饮食还有很多问题亟待解决, 而利用物理、化学、酶法及联合改性方法降低 β -LG 的致敏性, 将为生产低致敏性食物提供一条新的探索途径。

参考文献:

- [1] PEREIRA P C. Milk nutritional composition and its role in human health[J]. Nutrition, 2014, 30(6): 619-627.
- [2] 王佳蕊, 李朝旭, 李书国. 牛乳中主要过敏原致敏机理及其脱敏技术的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(6): 28-32.
- [3] BUNYAVANICH S, BERIN M C. Food allergy and the microbiome: current understandings and future directions[J]. J Allergy Clin Immunol, 2019, 144(6): 1468-1477.
- [4] MERRRAS-SALMIO L, KOLHO K L, PELKONEN A S, et al. Markers of gut mucosal inflammation and cow's milk specific immunoglobulins in non-IgE cow's milk allergy[J/OL]. Clin Transl Allergy, 2014, 4(1): 8[2020-07-11]. <https://doi.org/10.1186/2045-7022-4-8>.
- [5] MAUX S, BOUHALLAB S, GIBLIN L, et al. Bovine β -lactoglobulin/fatty acid complexes: binding, structural, and biological properties[J]. Dairy Sci Technol, 2014, 94: 409-426.
- [6] DONG X, WANG J, RAGHAVAN V. Critical reviews and recent advances of novel non-thermal processing techniques on the modification of food allergens[J/OL]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(2): 196-210[2020-07-11]. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722942>.
- [7] ULUKO H, ZHANG S W, LIU L, et al. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates[J]. J Funct Foods, 2015, 18: 1138-1146.
- [8] HIGUERA-BARRAZA O A, DEL TORO-SANCHEZ C L, RUIZ-CRUZ S, et al. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins[J]. Ultrason Sonochem, 2016, 31: 558-562.

- [9] HO M, WONG W, CHANG C. Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2014, 46(3): 225–240.
- [10] PETERS R L, ALLEN K J. The role of hypoallergenic formula and dietary supplements in the prevention of early onset allergic disease [J]. Curr Pediatr Rep, 2016, 4(3): 101–109.
- [11] TIEMESSEN M M, HOFFEN E V, KNULST A C, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells are not functionally impaired in adult patients with IgE-mediated cow's milk allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 110(6): 934–936.
- [12] 许倩. 不同加工处理对牛乳蛋白抗原性及过敏原性的影响 [D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [13] HOCHWALLNER H. Infant milk formulas differ regarding their allergenic activity and induction of T-cell and cytokine responses [J]. Allergy, 2017, 72(3): 416–424.
- [14] DAHDAH L, ARASI S, VALLUZZI R L, et al. How guideline can shape clinical practice globally: the diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy experience [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2019, 19(2): 185–191.
- [15] TAHERI-KAFRANI A, GAUDIN J C, RABESONA H, et al. Effects of heating and glycation of β -lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(11): 4974–4982.
- [16] RAHAMAN T, VASILJEVIC T, RAMCHANDRAN L. Conformational changes of β -lactoglobulin induced by shear, heat, and pH-effects on antigenicity [J]. J Dairy Sci, 2015, 98(7): 4255–4265.
- [17] 姜竹茂, 刘晓, 张书文, 等. 热处理对生鲜乳及复原乳蛋白质体外消化特性的影响 [J]. 食品科学, 2018, 39(8): 33–38.
- [18] ALI A, LE P I, HUANG N, et al. Effect of high pressure homogenization on the structure and the interfacial and emulsifying properties of β -lactoglobulin [J]. Int J Pharm, 2018, 537(1/2): 111–121.
- [19] 洪启通. 不同构象下 β -乳球蛋白体外消化前后结构与过敏性的关系 [D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [20] 白雨鑫. 四种非热加工对牛乳 β -乳球蛋白结构和免疫特性的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [21] MENG X Y, BAI Y X, GAO J Y, et al. Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine β -lactoglobulin [J]. Food Chem, 2017, 219: 290–296.
- [22] TAN M C, CHIN N L, YUSOF Y A, et al. Effect of high power ultrasonic treatment on whey protein foaming quality [J]. Int J Food Sci Technol, 2016, 51(3): 617–624.
- [23] 崔强, 王琳, 周国卫, 等. 超声处理对大豆分离蛋白-乳清分离蛋白混合蛋白功能特性的影响 [J]. 食品科学, 2019, 40(23): 111–116.
- [24] 李雪. 超声波对 β -LG 结构、免疫特性和美拉德反应的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [25] SHAO Y H, ZHANG Y, LIU J, et al. Influence of ultrasonic pretreatment on the structure, antioxidant and IgG/IgE binding activity of β -lactoglobulin during digestion in vitro [J/OL]. Food Chem, 2020, 312: 126080 [2020-07-11]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126080>.
- [26] SIMION A M, APRODU I, DUMITRASCU L, et al. Exploring the heat-induced structural changes of β -lactoglobulin-linoleic acid complex by fluorescence spectroscopy and molecular modeling techniques [J]. Food Sci Technol, 2015, 52(12): 8095–8103.
- [27] AL-SHABIB N A, KHAN J M, MALIK A, et al. Molecular insight into binding behavior of polyphenol (rutin) with β -lactoglobulin: spectroscopic, molecular docking and MD simulation studies [J]. J Mol Liq, 2018, 269: 511–520.
- [28] CHEN X L, LIU J W, JIANG L, et al. Characterization, spectroscopic and crystallographic analyses of β -lactoglobulin and docosahexaenoic acid nanocomplexes [J/OL]. Food Chem, 2020, 330: 127145 [2020-07-11]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127145>.
- [29] PEDERSEN J N, FRISLEV H S, PEDERSEN J S, et al. Using protein-fatty acid complexes to improve vitamin D stability [J]. J Dairy Sci, 2016, 99(10): 7755–7767.
- [30] ZHONG J Z, XU Y J, LIU W, et al. Antigenicity and functional properties of β -lactoglobulin conjugated with fructo-oligosaccharides in relation to conformational changes [J]. J Dairy Sci, 2013, 96(5): 2808–2815.
- [31] ZHONG J Z, TU Y, LIU W, et al. Comparative study on the effects of nystose and fructofuranosyl nystose in the glycation reaction on the antigenicity and conformation of β -lactoglobulin [J]. Food Chem, 2015, 188: 658–663.
- [32] YANG W H, TU Z C, WANG H, et al. Mechanism of reduction in IgG and IgE binding of β -lactoglobulin induced by ultrasound pretreatment combined with dry-state glycation: a study using conventional spectrometry and high-resolution mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(36): 8018–8027.
- [33] MCMEEKIN T L, POLIS B D, DELAMONICA E S, et al. A crystalline compound of β -lactoglobulin with dodecyl sulfate [J]. J Am Oil Chem Soc, 1949, 71(11): 3606–3609.
- [34] KURPIEWSKA K, BIELA A, LOCH J I, et al. Towards understanding the effect of high pressure on food protein allergenicity: β -lactoglobulin structural studies [J]. Food Chem, 2019, 270: 315–321.
- [35] 孟轩夷. 十八碳不饱和脂肪酸对牛乳 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白致敏性的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [36] JIA J J, GAO X, HAO M H, et al. Comparison of binding

- interaction between β - lactoglobulin and three common polyphenols using multi - spectroscopy and modeling methods[J]. Food Chem, 2017, 228: 143 - 151.
- [37] WU X L, LU Y Q, XU H X, et al. Reducing the allergenic capacity of β - lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols [J]. Food Chem, 2018, 256: 427 - 434.
- [38] ROHN S. Possibilities and limitations in the analysis of covalent interactions between phenolic compounds and proteins[J]. Food Res Int, 2014, 65: 13 - 19.
- [39] ZHANG Y, HE S D, SIMPSON B K. Enzymes in food bioprocessing: novel food enzymes, applications, and related techniques[J]. Curr Opin Food Sci, 2018, 19: 30 - 35.
- [40] DBROWSKA A, BAJZERT J, BABIJK, et al. Reduced IgE and IgG antigenic response to milk proteins hydrolysates obtained with the use of non - commercial serine protease from *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. Food Chem, 2019, 302: 125350 [2020 - 07 - 11]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125350>.
- [41] FENG N, ZHANG H Y, LI Y, et al. A novel catalytic material for hydrolyzing cow's milk allergenic proteins: papain - $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - magnetic nanoflowers [J/OL]. Food Chem, 2019, 311: 125911 [2020 - 07 - 11]. <https://doi.org/j.foodchem.2019.125911>.
- [42] EKEZIE F G, CHENG J H, SUN D W. Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens; a review of recent research advances[J]. Trends Food Sci Tech, 2018, 74: 12 - 25.
- [43] PANCHAL B, CHANG T, QIN S T, et al. Optimization and kinetics of tung nut oil transesterification with methanol using novel solid acidic ionic liquid polymer as catalyst for methyl ester synthesis [J]. Renew Energ, 2020, 151: 796 - 804.
- [44] ZHANG Q, CHEN Q H, HE G Q. Effect of ultrasonic - ionic liquid pretreatment on the hydrolysis degree and antigenicity of enzymatic hydrolysates from whey protein [J/OL]. Ultrason Sonochem, 2020, 63: 104926 [2020 - 07 - 11]. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104926>.
- [45] ZHONG J, LUO S, LIU C, et al. Steady - state kinetics of tryptic hydrolysis of β - lactoglobulin after dynamic high - pressure microfluidization treatment in relation to antigenicity[J]. Eur Food Res Technol, 2014, 239(3): 525 - 531.
- [46] 俞宏达. DHPM 处理对 β - 乳球蛋白与油酸复合物的形成机制、致敏性和功能性质的影响[D]. 南昌:南昌大学, 2016.
- [47] ZHONG J Z, FU S L, YU H D, et al. Antigenicity of β - lactoglobulin reduced by combining with oleic acid during dynamic high - pressure microfluidization: multi - spectroscopy and molecule dynamics simulation analysis [J]. J Dairy Sci, 2019, 102(1): 145 - 154.
- [48] XU L, GONG Y S, GERN J E, et al. Influence of whey protein hydrolysis in combination with dextran glycation on immunoglobulin E binding capacity with blood sera obtained from patients with a cow milk protein allergy[J]. J Dairy Sci, 2020, 103(2): 1141 - 1150.

(上接第 74 页)

由表 5 可知,各因素对榛子蛋白纯度影响的主要顺序为 $A > C > B$,即反应温度 $>$ 复溶 pH $>$ 液料比,最优组合为 $A_3B_2C_3$,即反应温度 50°C ,液料比 $5:1$,复溶 pH 11。在最佳条件下,进行 3 次平行试验,榛子蛋白纯度平均值为 95.23%。

3 结论

采用碱性蛋白酶酶解辅助碱溶酸沉法提取榛子蛋白,采用单因素试验和响应面试验对提取过程中的酶解工艺条件进行优化,得到最优酶解工艺条件为:酶解温度 46°C ,pH 8,酶解时间 3.7 h。在最优酶解工艺条件下,榛子蛋白提取率达到 53.16%。对得到的粗蛋白碱液复溶后再次碱性蛋白酶酶解、酸沉纯化榛子蛋白,经单因素试验和正交试验优化得到的最佳纯化工艺条件为反应温度 50°C 、液料比 $5:1$ 、复溶 pH 11。在最佳纯化工艺条件下,榛子蛋白纯度为 95.23%。

参考文献:

- [1] 李杨,江连洲,王胜男,等.水酶法提取榛子蛋白工艺优

化[J].食品科学,2012,33(2):143 - 148.

- [2] 时德通,吕佼,王旭旭,等.榛子蛋白提取工艺及性能研究进展[J].食品工业,2018,39(10):279 - 282.
- [3] 关紫峰,姜波,王英坡.榛子脂肪酸组成的比较研究[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),2003,26(3):284 - 285.
- [4] 吕春茂,魏雅静,孟宪军,等.平欧榛子蛋白分离及功能特性分析[J].食品与发酵工业,2013,39(12):85 - 89.
- [5] 马勇,周佩.榛子粉的主要成分和功能特性研究[J].食品与发酵工业,2008,34(11):72 - 75.
- [6] 全梦卓,赵文恩.榛子的综合利用[J].广州化工,2013,41(21):28 - 30.
- [8] 李桂英,袁永俊.水酶法提取菜籽油的研究[J].中国油脂,2005,30(10):33 - 35.
- [9] 杨波,杨光,张静.水酶法提取花生蛋白工艺的研究[J].食品科学,2006,27(11):253 - 256.
- [10] 宋玉卿,于殿宇,王谨,等.水酶法提取榛子油工艺条件研究[J].食品科学,2008,29(8):261 - 264.
- [11] ZHANG S B, WANG Z, XU S Y. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates[J]. J Am Oil Chem Soc, 2007, 84(1): 97 - 105.