

超高压联合酶解对大豆球蛋白抗原性和结构特性的影响

赵青青, 李梦瑶, 布冠好, 汪 畔, 谢一敬

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要:旨在为开发低敏性大豆蛋白产品提供理论基础,以大豆中主要致敏蛋白大豆球蛋白(11S)为原料,采用不同超高压(100~600 MPa)预处理后用复合蛋白酶水解,对其抗原性、水解度、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、Tricine-SDS-PAGE、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、紫外光谱、荧光光谱进行分析,探究处理前后 11S 抗原性及结构的变化规律。结果表明:超高压联合酶解处理对 11S 的抗原抑制率和水解度均有影响,其中 600 MPa 超高压联合酶解处理 11S 的抗原抑制率最低,水解度最高,分别为 36.69% 和 8.98%;600 MPa 超高压联合酶解处理对 11S 结构的影响最大,11S 中酸、碱性亚基明显被降解,11S 二级结构中 α -螺旋含量显著升高, β -折叠含量显著降低,11S 三级结构发生明显变化,紫外最大吸收强度和荧光强度均显著降低,并伴随紫外光谱蓝移,荧光光谱红移。综上,超高压联合酶解处理能够改变 11S 的构象,进而显著降低其抗原性。

关键词:大豆球蛋白;超高压联合酶解;抗原性;结构特性

中图分类号:TS229;TS201.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)09-0075-08

Effects of high hydrostatic pressure combined with enzymatic hydrolysis on the antigenicity and structural properties of glycinin

ZHAO Qingqing, LI Mengyao, BU Guanhao, WANG Yang, XIE Yijing

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

Abstract: To provide a theoretical basis for the development of hypoallergenic soybean protein products, glycinin (11S), the major allergenic protein in soybeans, was used as the raw material, and it was pretreated with different high hydrostatic pressure (HHP) levels (100–600 MPa) and subsequently hydrolyzed using a compound protease. The antigenicity, degree of hydrolysis, SDS-PAGE, Tricine-SDS-PAGE, FT-IR, UV spectroscopy, and fluorescence spectroscopy were analyzed to investigate the changes in antigenicity and structural characteristics of 11S before and after treatment. The results showed that HHP combined with enzymatic hydrolysis affected the antigenicity and degree of hydrolysis of 11S.

收稿日期:2024-07-02;修回日期:2025-05-20

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);河南工业大学国家自然科学基金培育项目支持计划(2024PYJH003);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:赵青青(2000),女,在读硕士,研究方向为蛋白质资源开发及利用(E-mail)z18737351720@163.com。

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

The treatment of 600 MPa HHP combined with enzymatic hydrolysis resulted in the lowest antigen inhibition rate and the highest degree of hydrolysis of 11S at 36.69% and 8.98%, respectively. The combined treatment at 600 MPa had the most significant impact on the structure of 11S, and the acidic and basic subunits of 11S significantly degraded, the α -helix content in the secondary structure increased markedly, while the β -sheet content decreased significantly under the condition. Moreover, the tertiary structure of 11S underwent

notable changes, with significant reductions in UV maximum absorption intensity and fluorescence intensity, accompanied by a blue shift in the UV spectrum and a red shift in the fluorescence spectrum. In conclusion, HHP combined with enzymatic hydrolysis can alter the conformation of 11S, thereby significantly reducing its antigenicity.

Key words: glycinin; high hydrostatic pressure combined with enzymatic hydrolysis; antigenicity; structural property

大豆是常见的优质植物蛋白质来源,同时也是公认的主要食物过敏原之一^[1]。据报道,全球约2.7%的儿童和0.27%的成年人对大豆过敏^[2],其中大豆球蛋白(11S)是大豆中存在的关键致敏蛋白之一,占大豆总蛋白质含量的40%左右^[3]。11S是由5种不同类型亚基组成的六聚体蛋白,每个亚基由酸性肽链(A)和碱性肽链(B)组成,引起患者过敏反应的主要是酸性链(A1a、A1b、A2、A3、A4)^[4]。11S结构非常稳定,在自然状态下不易被破坏^[5],因此选择性加工处理是降低其致敏性的有效途径。

目前常见的降低大豆致敏性的技术可分为热处理法、非热处理法、化学法和生物法。其中,非热处理技术在降低大豆蛋白抗原性方面显示出巨大的潜力,例如超高压处理、低温等离子体和超声波处理等^[6]。超高压处理是常用的绿色非热处理技术,可以破坏蛋白质分子中的非共价键,导致其结构发生重大变化^[7]。赵益非等^[8]研究表明,11S经500 MPa超高压处理20 min后其抗原性降低了35.65%,空间结构发生显著变化。李堂昊等^[9]研究表明,400 MPa超高压处理可最大程度上降低 β -伴大豆球蛋白的免疫活性,从而削弱其抗原性并降低致敏风险。超高压处理虽然不能完全消除蛋白的致敏性,但能够改变蛋白质的构象型表位,增加蛋白酶的作用位点,有效促进蛋白质的水解,从而降低免疫球蛋白E(IgE)结合能力,最终实现抗原性和致敏性的双重降低^[10]。此外,化学法中的酶解处理也常被用于改变蛋白质结构和功能性质,其可以破坏蛋白质分子内部的一些肽键,部分或完全消除连续抗原表位,有效降低抗原性^[11],从而显著降低抗原的致敏性。然而研究表明,即使经过长时间的酶解,蛋白的抗原性也不能被完全消除且会产生更多苦味肽^[12-13]。因此,有学者采用酶解与其他方法联合处理的方式来降低蛋白的抗原性,以期降低其潜在的致敏性。目前已有研究将超高压联合酶解技术用于处理食物过敏原的研究中。Lee等^[14]研究发现,荞麦蛋白经600 MPa超高压处理30 min后再用碱性蛋白酶水

解,其IgE结合率降低了83.8%~100%。江连洲等^[15]研究发现,超高压协同限制性酶解处理可显著降低豆乳粉的致敏性,在最优工艺条件下致敏性降低率为88.09%。Meinlschmidt等^[16]利用超高压(400 MPa和500 MPa)协同风味蛋白酶处理大豆分离蛋白,采用间接竞争酶联免疫吸附(ic-ELISA)法检测 β -伴大豆球蛋白的免疫活性,结果发现,一组抗体识别的表位在水解过程中被充分破坏,抗原性几乎被完全抑制,而另一组抗体识别的表位仅略有下降。目前关于超高压联合酶解处理对11S抗原性和结构的影响尚不清楚。

本文利用超高压对11S进行预处理,随后用复合蛋白酶进行水解,考察超高压联合酶解对11S抗原性、水解度及结构特性的影响,探究超高压联合酶解对11S影响的作用机制,以期为大豆蛋白过敏原脱敏技术的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

低温脱脂豆粕(蛋白质含量42.72%、水分含量7.41%、脂肪含量1.45%、灰分含量5.61%),山东禹王生态食品有限公司;HRP-标记的羊抗兔IgG(A6154),美国Sigma公司;牛血清蛋白(BSA)、3、3'、5、5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液、凝胶电泳试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;复合蛋白酶(120 U/mg)、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

HPP-L2-600/10型超高压设备,天津华泰森森生物有限公司;LRH-150F型恒温生化培养箱,上海一恒科技有限公司;TDL-5A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;WQF-510傅里叶变换红外光谱仪,北京瑞丽分析仪器有限公司;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 11S 的制备

参考彭开锋等^[17]的方法,并稍作修改。将脱脂豆粕与 0.03 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)按料液比 1:15 混合,于室温下搅拌 4 h,随后在 4℃ 下以 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液,按 1 g/L 加入 NaHSO₃,搅拌均匀,用 2 mol/L HCl 溶液调整 pH 至 6.4,于 4℃ 下保存过夜,然后以 10 000 r/min 离心 20 min,取沉淀并溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)中,分别采用 50%、65% 硫酸铵对溶液进行分级沉淀,将沉淀透析、冻干后得 11S,于 -18℃ 保存备用。经凯氏定氮法测得 11S 中蛋白质含量为 92.79%,BandScan 软件分析 11S 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)图谱发现 11S 样品的纯度为 97.20%,可用于后续实验分析。

1.2.2 超高压联合酶解处理 11S

将 1.2.1 得到的 11S 用 pH 7.4、0.01 mol/L PBS 稀释至 2 mg/mL,并置于真空袋中包装,于室温条件下分别采用 100、200、300、400、500、600 MPa 压力处理 25 min,冻干后得到超高压处理样品,分别命名为 H100、H200、H300、H400、H500、H600。将上述不同超高压处理后的 11S 用蒸馏水稀释至 25 mg/mL,在 50℃、pH 7.5 下采用复合蛋白酶(加酶量为 1 000 U/g)分别对其水解 2 h,冻干后得到超高压联合酶解处理样品,分别命名为 H100-E、H200-E、H300-E、H400-E、H500-E、H600-E。以未经超高压和酶解处理的 11S(11S)和只进行酶解处理的 11S(E)样品作为对照组。

1.2.3 抗原性测定

参照 Fu 等^[18]的方法,采用间接竞争酶联免疫吸附法(ic-ELISA)测定 11S 的抗原性。用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将 11S 样品稀释至 0.4 μg/mL 后包被于 96 孔酶标板(100 μL/孔),于 4℃ 下过夜。同时,另取 11S 样品用 PBS 稀释至 0.1 mg/mL,然后与效价为 1:25 600 的兔抗 11S 血清等体积混合,于 4℃ 下过夜,得预混液。取出孵育过夜的酶标板,弃液,用含有 0.05% 吐温-20 的 PBS(PBST)洗涤后于 37℃ 下使用 1% BSA 封闭 2 h。PBST 洗涤,加入预混液(100 μL/孔),同时设置无竞争体系(只加血清),37℃ 孵育 1 h。PBS 重复洗涤 3 次后加入 HRP 标记的效价为 1:20 000 的酶标二抗(100 μL/孔),37℃ 反应 1 h,PBS 洗涤后加入 TMB 显色液(100 μL/孔),避光反应 10 min。最后,

加入 2 mol/L 稀硫酸(50 μL/孔)终止反应。用酶标仪分别在 450 nm 和 620 nm 处测得样品吸光度。样品抗原性以抗原抑制率表示,抗原抑制率与抗原性成正比,抗原抑制率(Y)计算公式如式(1)所示。

$$Y = [1 - (A_{450} - A_{620})/A_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_{450} 为样品在 450 nm 处的吸光度; A_{620} 为样品在 620 nm 处的吸光度; A_0 为无竞争体系在 450 nm 处的吸光度与其在 620 nm 处的吸光度的差值。

1.2.4 水解度测定

参考 Xiong 等^[19]的方法,采用邻苯二甲醛(OPA)法对 11S 酶解液进行水解度测定。将 0.1 g 十二烷基硫酸钠(SDS)、3.8 g 硼砂、80 mg OPA(纯度 97%)、88 mg 二硫苏糖醇(纯度 99%)溶解于蒸馏水中,加入 4 mL 乙醇,并用蒸馏水定容至 100 mL,制得 OPA 溶液。取 800 μL 11S 酶解液与 6 mL OPA 溶液混合,旋涡 5 s,避光反应 2 min,使用紫外可见分光光度计测定其在 340 nm 处的吸光度(OD_{340})。以丝氨酸为标准品,配制系列浓度(0、0.237 9、0.475 8、0.713 7、0.951 6 mmol/L)标准溶液,于 340 nm 处测定吸光度,以丝氨酸浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,拟合得标准曲线方程 $y = 0.760 8x - 0.002 2$ ($R^2 = 0.999 9$)。水解度(D)计算公式如式(2)所示。

$$D = (C \times N \times V/m - \beta) / (\alpha \times h_{\text{tot}}) \times 100\% \quad (2)$$

式中: C 为样品吸光度代入标准曲线方程所得的浓度,mmol/L; N 为酶解液稀释倍数; V 为样品体积,L; m 为通过考马斯亮蓝法测得的样品中蛋白质的质量,g; h_{tot} 为大豆蛋白总肽键数,取 7.8 mmol/g; α 和 β 为经验校正系数,用于修正测定中氨基含量与吸光度之间的差异,分别取常数 0.970 和 0.342。

1.2.5 SDS-PAGE 和 Tricine-SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析:参照 Yu 等^[20]的方法并稍作修改。用样品缓冲液将样品稀释至蛋白质质量浓度为 1 mg/mL,沸水浴 5 min 后离心,取上清液进行 SDS-PAGE 分析,电泳时使用分子质量 10~180 kDa 蛋白质标准品作为对照。分析条件:上样量 10 μL/孔;12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶;恒流电泳时浓缩胶电流 20 mA,分离胶电流 40 mA。电泳完毕后,凝胶固定 30 min,染色 40 min,脱色后拍照分析。

Tricine-SDS-PAGE 分析:参考 Mei 等^[21]方法并稍作修改分析样品中分子质量 10 kDa 以下的小分子肽分布。将样品与还原性样品缓冲液混合,在 100℃ 下煮沸 5 min,离心取上清液,待 Tricine-SDS-PAGE 分析,使用分子质量 3.3~31 kDa 的蛋

白质标准品作为对照。分析条件:分离胶 16.5%, 夹层胶 10%, 浓缩胶 4%; 上样量 10 μL /孔; 分析时间 6~8 h; 恒流电泳时浓缩胶及夹层胶电流 20 mA, 分离胶电流 40 mA。电泳结束后凝胶固定和染色各 30 min, 在脱色液中脱色 24 h 后拍照分析。

1.2.6 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分析

参照 Wang 等^[22]的方法, 将 2 mg 样品和 150 mg KBr 混合后研磨并压成薄片, 待 FT-IR 测定。测定条件: 扫描范围 4 000~400 cm^{-1} , 扫描次数 64 次, 分辨率 4 cm^{-1} 。使用 Peak Fit 4.12 软件, 通过基线校正、去卷积、二阶导数处理和高斯拟合计算样品蛋白质二级结构含量。

1.2.7 紫外光谱分析

利用 PBS 将样品稀释至蛋白质质量浓度为 1 mg/mL, 进行紫外光谱扫描。分析条件: 波长范围 200~400 nm, 狭缝宽度 2 nm, 波长间隔 1 nm。

1.2.8 荧光光谱分析

参考 Ye 等^[1]方法, 将样品溶解于 PBS 中配制质量浓度为 0.2 mg/mL 的样品蛋白溶液, 取 4 mL 蛋白溶液与 20 μL ANS 溶液(10 mmol/L)混匀后, 采用荧光分光光度计采集样品荧光光谱。分析条件: 激发波长 390 nm, 发射波长 400~700 nm, 扫描速度 600 nm/min, 狭缝宽度 5 nm。

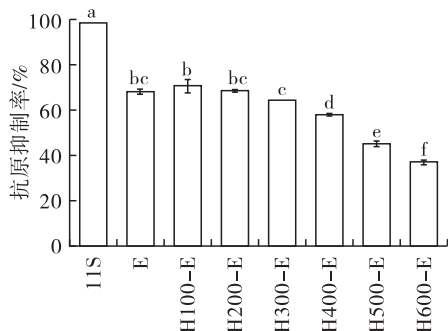
1.2.9 数据处理

所有数据均水平测定 3 次, 结果用“平均值 $\pm$ 标准误差”表示。采用 BandScan 软件分析 SDS-PAGE 图谱, 使用 IBM SPSS 25 和 Origin 2023 软件对数据进行统计分析和作图。

2 结果与分析

2.1 超高压联合酶解对 11S 抗原性的影响

超高压联合酶解对 11S 抗原性的影响见图 1。



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 超高压联合酶解对 11S 抗原性的影响

Fig.1 Effects of high hydrostatic pressure combined with enzymatic hydrolysis on the antigenicity of 11S

由图 1 可知, 与未处理 11S 相比, 单一酶解处理以及超高压联合酶解处理的 11S 抗原性均显著降低。单一酶解时, 11S 的抗原抑制率相比未处理 11S 仅降低了 30.31 百分点, 这可能是由于 11S 中的线性表位相对稳定, 不易被酶水解。超高压联合酶解处理时, 当压力大于 300 MPa 后, 11S 抗原性随着压力的升高显著降低, 尤其是 600 MPa 时, 其抗原抑制率降至最低, 为 36.69%, 相比未处理和单一酶解处理分别降低了 61.66 百分点和 31.35 百分点。这与 Meinschmidt 等^[16]的研究结果趋势一致, 其报道了在 300 MPa 以上超高压联合酶解处理下, 大豆蛋白抗原性呈现明显的下降趋势。这可能是因为当压力超过 300 MPa 时, 超高压通过破坏疏水作用和静电相互作用引起 11S 结构变化, 肽链得到伸展, 紧密结构变得松散, 使抗原表位易于受到蛋白酶的影响, 更多的抗原表位被酶解作用破坏或掩埋, 从而有效降低了 11S 的抗原性。

2.2 超高压联合酶解对 11S 水解度的影响

水解度是衡量 11S 酶解程度的重要指标。超高压联合酶解对 11S 水解度的影响见图 2。

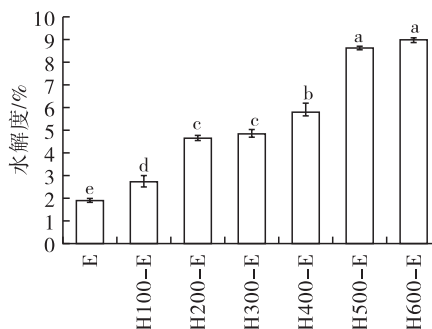


图 2 超高压联合酶解对 11S 水解度的影响

Fig.2 Effects of high hydrostatic pressure combined with enzymatic hydrolysis on the degree of hydrolysis of 11S

由图 2 可知, 相比单一酶解处理, 超高压联合酶解处理显著提高了 11S 的水解度, 当压力为 600 MPa 时 11S 的水解度达到最大, 为 8.98%, 说明超高压联合酶解有效提高了 11S 的水解效率。Lee 等^[14]研究表明, 超高压可以改变蛋白质结构, 导致蛋白酶的水解位点增加, 进而水解度升高, 最终降低蛋白质的抗原性。但水解度并不是越高越好, 水解度过高时会产生苦味肽, 影响产品风味, 因此需要根据实际情况来监测水解程度, 在保证蛋白产品品质的同时降低其抗原性。

2.3 超高压联合酶解对 11S 分子质量分布的影响

通过 SDS-PAGE 图谱可以观察不同处理后 11S 亚基的变化。经 SDS 和 β -巯基乙醇处理后, 11S 及其酶解物的二级和三级结构被改变, 分子间

和分子内的二硫键被破坏,11S 及其酶解物的电泳迁移率仅受分子质量的影响^[23]。不同处理下 11S 样品的 SDS - PAGE 图谱见图 3。

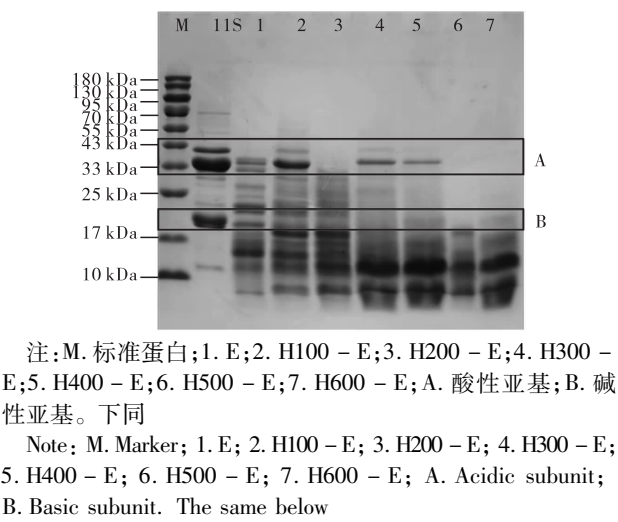


图 3 不同处理下 11S 的 SDS - PAGE 图谱

Fig. 3 SDS - PAGE profiles of 11S under different treatments

由图 3 可知,与未处理的 11S 相比,单一酶解和超高压联合酶解处理后 11S 的酸、碱性亚基均发生了不同程度的降解,且随着压力的升高其降解程度不断增加。尤其是经 500、600 MPa 超高压联合酶解处理后,11S 的酸、碱性亚基的条带几乎完全消失,且在分子质量小于 10 kDa 处出现了明显条带,说明超高压处理有效诱导了 11S 的酶解。

由于 SDS - PAGE 不能准确显示酶解后小分子肽的分布,因此采用 Tricine - SDS - PAGE 对超高压联合酶解处理后的 11S 进行进一步分析,结果如图 4 所示。

由图 4 可知,所有 11S 酶解物均形成了 6.5 kDa 左右的小分子亚基和多肽,但没有出现 3.3 kDa 以

下的小分子肽,表明 11S 被部分水解^[24]。

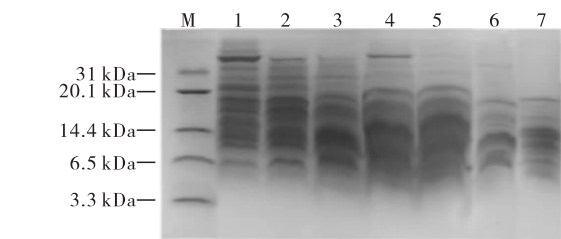


图 4 不同处理下 11S 的 Tricine - SDS - PAGE 图谱

Fig. 4 Tricine - SDS - PAGE profiles of 11S under different treatments

2.4 超高压联合酶解对 11S 二级结构的影响

上述抗原性、水解度和电泳结果表明,600 MPa 超高压联合酶解处理在结构破坏与降敏效果方面最为显著,具有代表性。因此,选取了未处理 11S、单一酶解处理 11S、600 MPa 超高压及其联合酶解处理 11S 进行 FT - IR 分析,结果见图 5。

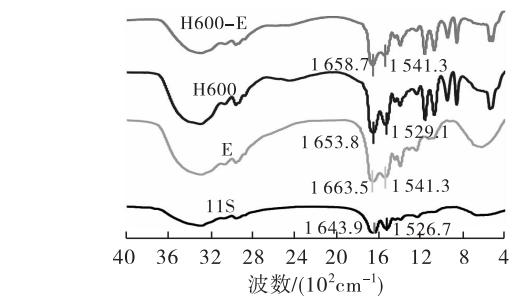


图 5 不同处理下 11S 的 FT - IR 图谱

Fig. 5 FT - IR spectra of 11S under different treatments

由图 5 可知,不同样品在酰胺 I 区(1 700 ~ 1 600 cm⁻¹)的特征吸收峰有所区别,表明不同处理 11S 蛋白质结构发生了变化,反映了蛋白质中二级结构相对含量的变化。不同处理下 11S 二级结构相对含量见表 1。

表 1 不同处理下 11S 二级结构相对含量				%
Table 1 Relative content of secondary structures in 11S under different treatments				
样品	α - 螺旋	β - 折叠	β - 转角	无规卷曲
11S	22.14 $\pm$ 0.10 ^c	35.34 $\pm$ 0.06 ^a	15.49 $\pm$ 0.03 ^c	27.03 $\pm$ 0.24 ^a
H600	18.74 $\pm$ 0.02 ^d	15.73 $\pm$ 0.10 ^b	47.56 $\pm$ 0.37 ^a	17.97 $\pm$ 0.15 ^d
E	28.60 $\pm$ 0.15 ^b	13.62 $\pm$ 0.16 ^c	33.57 $\pm$ 0.09 ^b	24.21 $\pm$ 0.02 ^c
H600 - E	31.56 $\pm$ 0.02 ^a	10.41 $\pm$ 0.07 ^d	33.35 $\pm$ 0.33 ^b	24.68 $\pm$ 0.03 ^b

注: 同列不同字母表示具有显著差异($p < 0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

由表 1 可知,未处理的 11S 中 α - 螺旋、 β - 折叠、 β - 转角、无规卷曲的含量分别为 (22.14 $\pm$ 0.10)%、(35.34 $\pm$ 0.06)%、(15.49 $\pm$ 0.03)%、(27.03 $\pm$ 0.24)%,表明 β - 折叠是 11S 的主要构型。这与 Xi 等^[25]的研究结果一致,其研究中 β - 折

叠的相对含量为 (49.98 $\pm$ 0.22)%,同样为 11S 二级结构的主要类型。相比未处理 11S,经 600 MPa 超高压处理的 11S 中 α - 螺旋、 β - 折叠和无规卷曲含量显著降低, β - 转角含量显著增加。通常,蛋白质的 β - 折叠结构是由肽链间的氢键支撑^[26], α -

螺旋位于多肽链内部,是紧密结合的空间结构, β -折叠和 α -螺旋含量的降低说明超高压处理打乱了11S有序的折叠结构,蛋白质构象变得更为伸展,肽链的排列更加无序。而相对于单一的超高压处理,600 MPa超高压联合酶解处理的11S中 α -螺旋和无规卷曲含量显著升高, β -折叠含量显著降低,表明11S构象整体由有序向无序转变,空间结构发生重构,有助于抗原位点的暴露与降解,从而降低蛋白致敏性。类似地,李玉蝶等^[27]报道,经戊糖乳杆菌发酵处理后,花生蛋白中 β -折叠减少,并向 α -螺旋及无规卷曲等结构转化。这可能是由于在酶解过程中维系蛋白质二级结构稳定性的氢键被破坏,导

致多肽链解折叠,并伴随着一定程度的聚集^[28]。由于11S的抗原表位多位于 β -折叠和无规卷曲结构处^[29],经超高压联合酶解处理后11S的 β -折叠和无规卷曲含量显著降低,推测超高压联合酶解处理破坏或掩埋了11S的抗原表位,进而有效降低了11S的抗原性。

2.5 紫外光谱分析

蛋白质中存在芳香氨基酸,如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸,可以吸收185~320 nm范围内的紫外光。因此,当蛋白质被修饰时,紫外吸收光谱会有效反映出蛋白质三级结构的变化。超高压处理和超高压联合酶解处理下11S的紫外光谱图见图6。

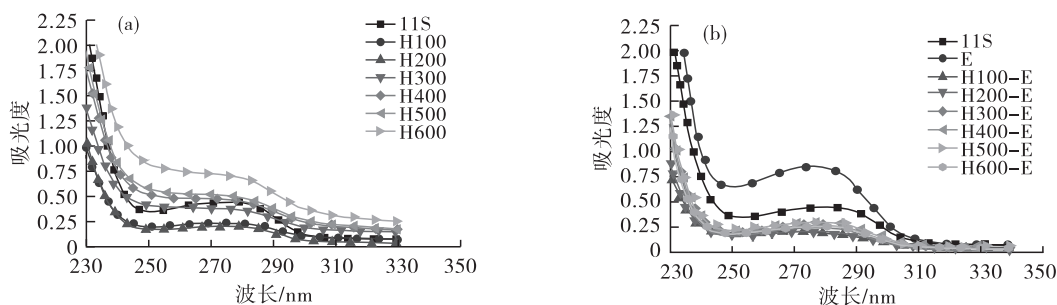


图6 超高压处理和超高压联合酶解处理下11S的紫外光谱图

Fig. 6 UV spectra of 11S under high hydrostatic pressure and high hydrostatic pressure combined with enzymatic hydrolysis treatments

由图6a可知,单一超高压处理的11S在约277 nm处均表现出特征吸收峰。在压力100~300 MPa范围内,单一超高压处理11S的紫外最大吸收峰吸光度相较于未处理11S的显著降低,这可能是由于较低压力下蛋白质发生了部分构象紧缩或分子间轻度聚集,导致芳香族残基进一步埋藏于疏水核心区域,从而降低了其对紫外光的吸收。随着压力升高至400 MPa以上,单独超高压处理11S的吸光度随着压力的升高而增大,说明此时高压已足以破坏蛋白质的紧密结构,促使内部芳香残基暴露,蛋白质构象发生显著变化,表明超高压在较高压力下对11S的解构作用更加显著。由图6b可知,较未处理的

11S,单一酶解处理11S的吸光度显著升高,说明酶解处理打开了11S的空间结构,更多的芳香氨基酸残基暴露于蛋白质表面^[30]。而经超高压联合酶解处理后,11S的吸光度却降低了,且样品的吸收峰均发生了不同程度的蓝移,这可能是超高压处理改变了蛋白质结构,增加了酶的可及性,水解作用破坏或掩盖了超高压处理过程中暴露的发色基团,最终导致吸光度降低^[31]。

2.6 荧光光谱分析

通过荧光光谱可进一步表征11S的三级结构变化。超高压处理和超高压联合酶解处理下11S的荧光光谱图见图7。

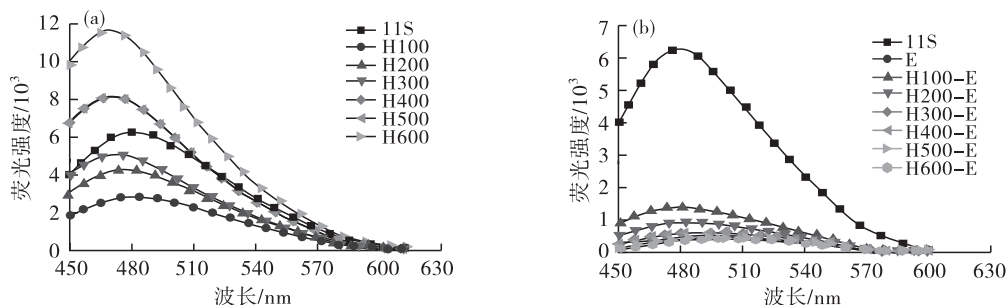


图7 超高压处理和超高压联合酶解处理条件下11S的荧光光谱图

Fig. 7 Fluorescence spectra of 11S under high hydrostatic pressure and high hydrostatic pressure combined with enzymatic hydrolysis treatments

蛋白质结构的改变会影响氨基酸微环境的极性,导致最大发射波长($\lambda_{\max}$)和荧光强度发生变化。由图 7a 可知,相较于未处理 11S,单一超高压处理 11S 的 $\lambda_{\max}$ 均出现了蓝移(3~10 nm),表明蛋白质结构发生了变化,暴露出更多的疏水性基团,其中 400、500、600 MPa 处理 11S 的荧光强度显著升高,600 MPa 时最高,表明超高压处理有效诱导了蛋白质结构展开,暴露出更多的色氨酸残基。由图 7b 可知,相较于未处理 11S,超高压联合酶解处理 11S 的荧光强度显著下降,600 MPa 超高压联合酶解 11S 的 $\lambda_{\max}$ (496 nm)相较于未处理 11S 的(479 nm)发生明显红移,这可能是由于超高压预处理增加了蛋白酶的作用位点,进一步改变了 11S 构象,使其在非极性微环境中埋藏的芳香族残基暴露于极性溶剂环境中^[32]。由此推测,11S 抗原性的降低可能是因为在超高压处理过程中,11S 的结构被打开,原本包埋在内部的疏水性基团暴露,更利于蛋白酶作用于抗原表位^[33],经酶解后,这些表位无法被 IgG 抗体有效识别,最终导致抗原性下降。

3 结 论

本研究考察了不同超高压联合复合蛋白酶处理对 11S 抗原性、水解度和结构的影响。结果表明,经 300 MPa 以上压力预处理后再酶解可有效降低 11S 的抗原性,其中 600 MPa 超高压联合酶解处理 11S 的抗原性降低最为显著,且水解度达到最高,并有效降解了 11S 的酸、碱性亚基,同时 11S 的二级结构中 β -折叠和无规卷曲的含量显著减少。紫外光谱和荧光光谱结果表明,超高压联合酶解处理 11S 的三级结构发生改变。综上,超高压联合酶解处理可通过改变 11S 的构象进而影响其抗原表位,从而有效降低其抗原性。

参考文献:

[1] YE L, LÜ L, LIN X, et al. Effect of lipid peroxidation on the allergenicity and functional properties of soybean β -conglycinin (7S) and glycinin (11S)[J]. Food Sci Hum Wellness, 2023, 12(3): 895–902.

[2] PI X, SUN Y, FU G, et al. Effect of processing on soybean allergens and their allergenicity[J]. Trends Food Sci Technol, 2021, 118: 316–327.

[3] KANG Z L, YAO P L, XIE J J, et al. Effects of low-frequency magnetic field on solubility, structural and functional properties of soy 11S globulin[J]. J Sci Food Agric, 2024, 104(10): 5944–5954.

[4] SHUI T, FU Y, DUAN Y, et al. Localization of G1A1a allergenic domain destroyed by thermal processing[J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(17): 9947–9954.

[5] WANG L, SUN Z, XIE W, et al. 11S glycinin up-regulated NLRP-3-induced pyroptosis by triggering reactive oxygen species in porcine intestinal epithelial cells[J/OL]. Front Vet Sci, 2022, 9: 890978[2024-07-02]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.890978>.

[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]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(2): 196–210.

[7] WANG J, HE Z, RAGHAVAN V. Soybean allergy: Characteristics, mechanisms, detection and its reduction through novel food processing techniques[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63(23): 6182–6195.

[8] 赵益菲, 布冠好, 陈复生. 超高压对大豆球蛋白抗原性及结构的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 92–97.

[9] 李堂昊, 布冠好, 赵益菲, 等. 超高压处理对 β -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.

[10] ZENGİN K, OZEL B, OZTOP M H, et al. Effects of high hydrostatic pressure on the functional properties of soy protein isolate[J/OL]. J Food Process Eng, 2024, 47(3): e14578[2024-07-02]. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14578>.

[11] HU J, LIU Y, AN G, et al. Characteristics of molecular composition and its anti-nutrition of β -conglycinin during flavorzyme proteolysis[J/OL]. Food Biosci, 2021, 42: 101039[2024-07-02]. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101039>.

[12] HU J, YUAN L, AN G, et al. Antigenic activity and epitope analysis of β -conglycinin hydrolyzed by pepsin[J]. J Sci Food Agric, 2021, 101(4): 1396–1402.

[13] DING J, QI L, ZHONG L, et al. Conformation-activity mechanism of alcalase hydrolysis for reducing *in vitro* allergenicity of instant soy milk powder[J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(18): 10627–10639.

[14] LEE C, LEE W, HAN Y, et al. Effect of proteolysis with alkaline protease following high hydrostatic pressure treatment on IgE binding of buckwheat protein[J]. J Food Sci, 2017, 82(3): 834–839.

[15] 江连洲, 寻崇荣, 蔡玉曼, 等. 超高压-限制性酶解法降低豆乳粉致敏性工艺优化[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 268–275.

[16] MEINLSCHMIDT P, BRODE V, SEVENICH R, et al. High pressure processing assisted enzymatic hydrolysis: An innovative approach for the reduction of soy immunoreactivity[J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2017, 40: 58–67.

[17] 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

- [23] 曾佳, 张怀宝, 张建业, 等. 深共熔溶剂催化油酸豆甾醇酯合成工艺的优化[J]. 食品科技, 2019, 44(10): 276-282.
- [24] 马媛, 贾承胜, 张晓鸣, 等. 无溶剂直接酯化法合成亚油酸甾醇酯的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 285-289.
- [25] 郭涛, 姜元荣, 王勇, 等. 植物甾醇酯制备方法的研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(1): 53-56.
- [26] 陈茂彬. 植物甾醇酯的制备、生物活性及应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.