

乳清蛋白-低聚异麦芽糖模拟胃液消化过程中抗原性的变化

李 铮, 郑 喆, 罗永康*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: **目的** 研究乳清蛋白-低聚异麦芽糖和乳清蛋白在模拟胃液消化过程中抗原性及游离氨基酸的变化。**方法** 乳清蛋白(WPI)-低聚异麦芽糖制备后, 对 WPI-低聚异麦芽糖及 WPI 模拟胃液消化过程中的抗原性变化和游离氨基酸含量进行分析。**结果** 糖基化后乳清蛋白中精氨酸、酪氨酸、胱氨酸和赖氨酸的含量显著降低。经过模拟胃液消化, 乳清蛋白和乳清蛋白-低聚异麦芽糖中 α -乳白蛋白的抗原性降低到 1 $\mu\text{g/mL}$ 以下, 乳清蛋白中 β -乳球蛋白抗原性降低到 42.83 $\mu\text{g/mL}$, 乳清蛋白-低聚异麦芽糖中 β -乳球蛋白抗原性降低到 15.66 $\mu\text{g/mL}$ 。**结论** 经过模拟胃消化, 乳清蛋白-低聚异麦芽糖中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的抗原性比乳清蛋白中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的抗原性低; 在模拟胃液消化过程中, 乳清蛋白-低聚异麦芽糖比乳清蛋白更容易受到胃蛋白酶酶解。

关键词: 乳清蛋白; 低聚异麦芽糖; 模拟胃液消化; 抗原性

Changes of antigenicity of whey protein-oligoisomaltose during simulated gastric digestion

LI Zheng, ZHENG Zhe, LUO Yong-Kang*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT: Objective To study the changes of antigenicity and free amino acids of whey protein-oligoisomaltose and whey protein in a simulated gastric digestion. **Methods** The changes of antigenicity and free amino acids of whey protein-oligoisomaltose and whey protein during a simulated gastric digestion were analysed after the preparation of whey protein-oligoisomaltose. **Results** The contents of arginine, tyrosine, cystine, and lysine in whey protein decreased after the glycation. After the simulated gastric digestion, the antigenicity of α -lactalbumin in whey protein and whey protein-oligoisomaltose were all less than 1 $\mu\text{g/mL}$. At the same time, the antigenicity of β -lactoglobulin in whey protein decreased to 42.83 $\mu\text{g/mL}$, and the antigenicity of β -lactoglobulin in whey protein-oligoisomaltose decreased to 15.66 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** After simulated gastric digestion, the antigenicity of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein-oligoisomaltose were lower than that in whey protein. Compared with natural whey protein, whey protein-oligoisomaltose was more susceptible to pepsin hydrolysis during the simulated gastric digestion.

KEY WORDS: whey protein; oligoisomaltose; simulated gastric digestion; antigenicity

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471224; 30871817); 中国农业大学研究生科研创新专项(2012YJ078)

*通讯作者: 罗永康, 教授, 主要从事畜水产品加工技术研究。E-mail: luoyongkang@263.net

1 引言

牛乳是主要的食物过敏原之一,乳清蛋白中的 β -乳球蛋白(β -LG)和 α -乳白蛋白(α -LA)是牛乳的主要过敏原^[1]。目前关于牛乳主要过敏原蛋白改性的研究很多,包括热处理、高压^[2]、酶解^[3]、糖基化、发酵^[4]等,其中糖基化是一种有效地降低牛乳主要过敏原蛋白抗原性的方法。布冠好^[5,6]等将葡萄糖通过糖基化反应结合到乳清蛋白上,有效地降低了 β -LG和 α -LA的抗原性。据报道将麦芽糖通过糖基化反应引入到乳清蛋白上,也能有效地降低 β -LG和 α -LA的抗原性^[7]。

目前关于糖基化产物在模拟胃液消化过程中抗原性变化的研究很少,本研究在之前的研究基础上,研究了糖基化对乳清蛋白氨基酸组成的影响,分析了乳清蛋白-低聚异麦芽糖在模拟胃液消化过程中抗原性和游离氨基酸含量的变化。

2 实验材料与方法

2.1 材料与仪器

乳清分离蛋白(Amresco);低聚异麦芽糖(山东保龄宝生物工程有限公司); α -乳白蛋白(sigma); β -乳球蛋白(sigma);胃蛋白酶(Amresco);其他试剂均为分析纯。

高压液相色谱仪(LC-10A Tseries, Shimadzu); Venusil-AA 氨基酸分析专用柱(100 Å, 4.6 mm×250 mm, 5 μm, 北京吉瑞森科技有限责任公司);酶标仪(Thermo Multiskan MK3, Thermo Electron)。

2.2 实验方法

2.2.1 WPI-低聚异麦芽糖的制备

根据之前的研究^[8],以 β -LG的抗原性为响应值,通过三因素五水平正交组合设计优化WPI和低聚异麦芽糖糖基化的反应条件,优化出的制备低抗原性糖蛋白的最优反应条件为:低聚异麦芽糖和WPI的质量比为4.7,反应温度为68.4℃,反应时间为29.0 h。将低聚异麦芽糖和WPI按照质量比4.7溶解于去离子水中,溶液最终浓度为100 g/L。将溶液于-60℃中预冻6 h后,在真空冷冻干燥机中冷冻干燥24 h左右。将冷冻干燥制得的冻干粉放入底部盛有饱和KBr(相对湿度79%)的干燥器中,68.4℃反应29.0 h,所得WPI-低聚异麦芽糖复合物溶解于去离子水中,

溶液最终浓度为100 g/L,再次冷冻干燥,得到的冻干粉于-20℃冰箱中贮存。

2.2.2 乳清蛋白-低聚异麦芽糖抗原性的测定

参照布冠好^[9]建立的间接竞争ELISA的方法并做部分调整。建立的实验条件为: α -LA的包被浓度为0.5 μg/mL,抗 α -LA血清稀释倍数为256000倍。 β -LG的包被浓度为1 μg/mL,抗 β -LG血清稀释倍数为128000倍。

2.2.3 氨基酸分析

采用酸水解法水解样品,将水解液全部转移到50 mL容量瓶内,用超纯水定容,混匀,供衍生使用。量取样品溶液200 μL衍生,加入20 μL正亮氨酸内标溶液,用氮吹仪吹干后,加入220 μL 0.1 mol/L盐酸溶解,加入三乙胺乙腈溶液100 μL,异硫氰酸苯酯乙腈溶液100 μL,混匀,室温放置1小时,然后加入正己烷400 μL,振摇后放置10 min,取下层溶液,用0.45 μm滤膜过滤。另准确量取混合氨基酸标准溶液200 μL,按样品衍生方法衍生。在以下HPLC条件下分析:色谱柱: Venusil-AA 氨基酸分析专用柱(100 Å, 4.6 mm×250 mm, 5 μm);检测波长:254 nm;柱温:40℃;流动相A:称取15.2 g无水醋酸钠,加水1850 mL,溶解后用冰醋酸调pH至6.5,然后加乙腈140 mL,混匀,用0.45 μm滤膜过滤;流动相B:80%(V/V)乙腈溶液;进样量:2 μL;流速:1 mL/min,梯度洗脱。

样品溶液中各种氨基酸浓度(μg/mL) = $f_1/f_2 \times C$

其中: f_1 = 样品溶液中各氨基酸峰面积/内标峰面积

f_2 = 混合氨基酸标准溶液中各氨基酸峰面积/内标峰面积

C = 氨基酸对照品浓度(μg/mL)

样品中总氨基酸含量(%) = 样品溶液中所有氨基酸浓度总和(μg/mL) × $V \times 10^{-6} \times 100/W$

其中: V = 样品溶液的定容体积(mL)

W = 样品质量(g)

2.2.4 模拟胃液消化

模拟胃液消化参照Moreno^[10]的方法并作一些改动。模拟胃液含0.15 mol/L NaCl,用1 mol/L的HCl调pH值至2.5。将WPI及WPI-低聚异麦芽糖以3 mg/mL浓度溶解于模拟胃液中,保温15 min,按酶与底物的质量比1:20加入酶,首先将酶以0.32%的浓度溶解于模拟胃液中。模拟胃液消化在37℃进行,在0、2.5、5、10、20、30、60、120 min取样进行进

一步分析。

2.2.5 游离氨基酸含量测定

游离氨基含量: 采用三硝基苯磺酸(Trinitro-benzene sulfonic acid, TNBS)法^[11]。

3 结果与讨论

3.1 乳清蛋白-低聚异麦芽糖氨基酸组成分析

根据 2.2.1 的方法制备 WPI-低聚异麦芽糖, WPI 及 WPI-低聚异麦芽糖复合物的氨基酸图谱如图 1、图 2 所示。其中天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、胱氨酸(Cy2)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)的含量如表 1 所示。WPI 中精氨酸、酪氨酸、胱氨酸及赖氨酸含量分别为 2.55%、2.56%、7.65%、9.06%, WPI 与低聚异麦芽糖反应后, WPI 中精氨酸、酪氨酸、胱氨酸、赖氨酸含量分别减少为 1.74%、1.95%、2.02%、4.80%。在糖基化反应过程中, 主要是精氨酸、酪氨酸、胱氨酸和赖氨酸与低聚异麦芽糖发生了反应。其中胱氨酸和赖氨酸含量变化最大。

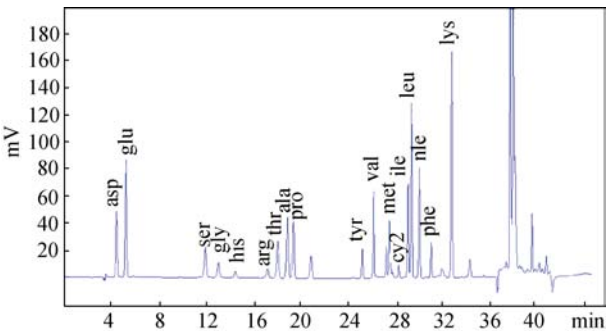


图 1 WPI 氨基酸含量图谱
Fig. 1 Amino acids contents of WPI

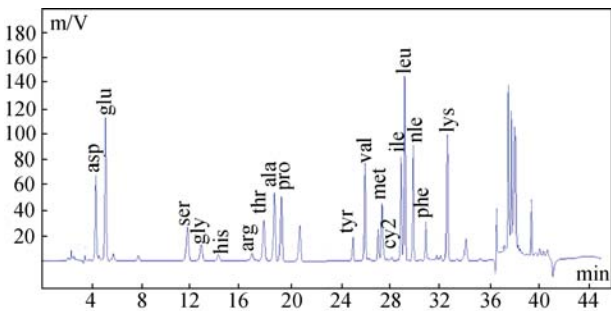


图 2 WPI-低聚异麦芽糖氨基酸含量图谱
Fig. 2 Amino acids contents of WPI-oligoisomaltose

表 1 WPI 及 WPI-低聚异麦芽糖复合物中各氨基酸含量
Table 1 Contents of amino acids in WPI and WPI-oligoisomaltose

氨基酸	氨基酸含量(%) [*]	
	WPI	WPI-低聚异麦芽糖
Asp	13.14	14.65
Glu	22.81	25.00
Ser	4.76	5.15
Gly	1.12	1.22
His	1.48	1.39
Arg	2.55	1.74
Thr	8.34	8.53
Ala	6.20	6.65
Pro	4.32	4.67
Tyr	2.56	1.95
Val	5.38	5.40
Met	2.26	4.92
Cy2	7.65	2.02
Ile	5.27	5.69
Leu	10.50	10.87
Phe	2.42	2.40
Lys	9.06	4.80

^{*}图 1、图 2 氨基酸图谱对应的氨基酸含量

3.2 模拟胃液消化过程中 WPI-低聚异麦芽糖及 WPI 游离氨基酸含量分析

在模拟胃液消化过程中, 由于胃蛋白酶的酶解作用, WPI 及 WPI 糖蛋白的游离氨基酸含量会发生变化。如表 2 所示, 游离氨基酸含量在 0~20 min 呈上升趋势, 在 20~120 min 变化缓慢。经过 120 min 模拟胃液消化, WPI 的游离氨基酸含量从 1.568 mmol/L 增加到 1.942 mmol/L, 增加了 0.374 mmol/L; WPI-低聚异麦芽糖的游离氨基酸从 0.573 mmol/L 增加到 0.996 mmol/L, 增加了 0.423 mmol/L。这说明 WPI-低聚异麦芽糖更容易受到胃蛋白酶酶解。但是 Chevalier^[12]的研究表明, 在模拟消化过程中, 未糖基化的 β -LG 比糖基化修饰的 β -LG 容易被消化, 这与本研究的结果不一致。Marciniak-Darmochwal^[13]的研究表明, 大豆蛋白提取物被胃蛋白酶酶解的程度会受到糖基化反应的影响, 大豆蛋白被胃蛋白酶酶解的程度低于大豆蛋白-果糖, 但是高于大豆蛋白-葡萄糖和大豆蛋白-乳糖, 这表明还原糖的种类影响糖基化产物被胃蛋白酶酶解的程度。本研究表明乳清蛋白与低聚异麦芽糖结合形成的糖蛋白比乳清蛋白更容易受到胃蛋白酶的酶解。

表 2 WPI 及 WPI-低聚异麦芽糖模拟胃液消化过程中游离氨基酸含量的变化(n=3)

时间(min)	游离氨基酸 (mmol/L)*	
	WPI	WPI-低聚异麦芽糖
0	1.568±0.136 ^c	0.573±0.032 ^f
2.5	1.569±0.016 ^c	0.707±0.010 ^c
5	1.618±0.017 ^{bc}	0.780±0.029 ^d
10	1.667±0.014 ^b	0.857±0.039 ^c
20	1.859±0.027 ^a	0.933±0.024 ^b
30	1.874±0.008 ^a	0.943±0.022 ^b
60	1.904±0.002 ^a	0.970±0.005 ^{ab}
120	1.943±0.038 ^a	0.996±0.014 ^a

*注: a-f 表示同一列有相同字母者差异不显著

3.3 模拟胃液消化过程中 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白抗原性的变化

在模拟胃液消化过程中, WPI 及 WPI-低聚异麦

芽糖中 α-LA 及 β-LG 抗原性变化如表 3 所示, WPI 中 α-LA 抗原性从 26.73 μg/mL 降低到 0.78 μg/mL, WPI-低聚异麦芽糖中 α-LA 抗原性几乎降低到零。经过模拟胃液消化, WPI 中 β-LG 抗原性显著降低, 但是抗原性仍然有 42.83 μg /mL, WPI-低聚异麦芽糖中 β-LG 抗原性降低到 15.66 μg /mL。糖基化能使 WPI 中 α-LA 和 β-LG 的抗原性在模拟胃液消化过程中降低到一个更低的值, 这说明 WPI 与低聚异麦芽糖糖基化是有效降低 WPI 致敏性的方法。在模拟胃液消化的前 20 min 内, 抗原性显著降低, 20~120 min 内, 抗原性变化不大, 这与游离氨基酸的变化规律相似, 说明在模拟胃液消化过程中, 蛋白被胃蛋白酶酶解, 使某些抗原表位被分解, 从而使抗原性降低。Maier^[14]研究表明, 发酵后的乳制品更容易被胃蛋白酶酶解, 且经过模拟胃液消化, 发酵后的乳制品的免疫原性显著低于未发酵的乳制品, 说明降低乳制品的胃蛋白酶耐受能力可能是一个有效降低其致敏力的方法。此结果与本文的研究结果相似。

表 3 WPI 及 WPI-低聚异麦芽糖模拟胃液消化过程中 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白抗原性的变化(n=3)
Table 3 Changes of antigenicity of α-LA and β-LG in WPI and WPI-oligoisomaltose during simulated gastric digestion (n=3)

时间(min)	β-LG 抗原性 (μg/mL)*		α-LA 抗原性 (μg/mL)*	
	WPI	WPI-低聚异麦芽糖	WPI	WPI-低聚异麦芽糖
0	241.68±6.83 ^a	36.55±0.04 ^a	26.73±1.54 ^a	4.71±0.9 ^a
2.5	106.88±1.85 ^b	33.84±0.20 ^b	25.37±0.07 ^b	2.22±0.25 ^b
5	82.28±3.95 ^c	25.49±1.85 ^c	23.83±0.31 ^c	1.92±0.14 ^b
10	61.77±1.15 ^d	20.84±1.42 ^d	14.29±0.91 ^d	0.72±0.09 ^c
20	52.61±2.82 ^c	19.68±0.05 ^d	2.87±0.04 ^c	0.16±0.04 ^{cd}
30	51.00±0.08 ^c	19.73±0.95 ^d	2.63±0.05 ^c	0.14±0.04 ^{cd}
60	49.85±1.70 ^c	17.08±1.17 ^c	2.30±0.09 ^c	0.14±0.03 ^{cd}
120	42.83±4.40 ^f	15.66±1.68 ^c	0.78±0.07 ^f	0.03±0.02 ^d

*注: a-f 表示同一列有相同字母者差异不显著

4 结 论

乳清蛋白中精氨酸、酪氨酸、胱氨酸和赖氨酸是与低聚异麦芽糖发生美拉德反应的主要氨基酸。经过模拟胃液消化, 乳清蛋白中 α-乳白蛋白抗原性从 26.73 μg/mL 降低到 0.78 μg/mL, 乳清蛋白-低聚异麦芽糖中 α-乳白蛋白抗原性几乎降低到零, 乳清蛋白和乳清蛋白-低聚异麦芽糖中 β-乳球蛋白抗原性分别降低为 42.83 μg /mL 和 15.66 μg /mL。在模拟胃液消化过程中, 乳清蛋白-低聚异麦芽糖比乳清蛋白更容易受到胃蛋白酶酶解。

参考文献

[1] Sharma S, Pravindra K, Betzel C, *et al.* Structure and function of proteins involved in milk allergies [J]. J Chromatogr B, 2001, 756: 183-187.

[2] Kleber N, Maier S, Hinrichs J. Antigenic response of bovineβ-lactoglobulin by ultra-high pressure treatment and temperature [J]. Innov Food Sci Emerg, 2007, 8: 39-45.

[3] Guadix A., Camacho F., Guadix E.M., *et al.* Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor[J]. J Food Eng, 2006, 72: 398-405.

[4] Kleber N, Weyrich U, Hinrichs J, *et al.* Screening for lactic acid

- bacteria with potential to reduce antigenic response of β -lactoglobulin in bovine skin milk and sweet whey [J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2006: 233–238.
- [5] Bu G, Lu J, Zheng Z, *et al.* Influence of Maillard reaction conditions on the antigenicity of bovine α -lactalbumin using response surface methodology [J]. *J Sci Food Agr*, 2009, 89: 2428–2434.
- [6] Bu G, Luo Y, Lu J, *et al.* Reduced antigenicity of β -lactoglobulin by conjugation with glucose through controlled Maillard reaction conditions [J]. *Food Agr Immunol*, 2010, 21: 143–156.
- [7] Li Z, Luo Y, Feng L, *et al.* Effects of Maillard reaction conditions on the antigenicity of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein conjugated with maltose [J]. *Eur Food Res Technol*, 2011, 233: 387–394.
- [8] Li Z, Luo Y, Feng L, *et al.* Effect of Maillard reaction conditions on antigenicity of β -lactoglobulin and the properties of glycosylated whey protein during simulated gastric digestion. DOI:10.1080/09540105.2012.712951
- [9] 布冠好, 郑喆, 郑海, 等. 牛乳过敏原 β -乳球蛋白间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国农业大学学报*, 2008, 13: 71–76.
- [10] Moreno FJ, Mellon FA, Wickham MSJ, *et al.* Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion [J]. *FEBS J*, 2005, 272: 341–352.
- [11] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. *J Agric Food Chem*, 1979, 27: 1256–1262.
- [12] Chevalier F, Chobert J M, Dalgalarrodo M, *et al.* Maillard glycosylation of β -lactoglobulin induces conformation changes [J]. *Food Nahrung*, 2002, 46: 58–63.
- [13] Marciniak-Darmochwal K, Kostyra H. Influence of nonenzymatic glycosylation (glycation) of pea proteins (*pisum sativum*) on their susceptibility to enzymatic hydrolysis [J]. *J Food Biochem*, 2009, 33: 506–521.
- [14] Maier I, Okun VM, Pittner F, *et al.* Changes in peptic digestibility of bovine β -lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 841: 160–167.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



李铮, 女, 博士研究生, 研究方向: 动物蛋白过敏。

E-mail: lizheng1986114@163.com

罗永康, 教授, 主要从事畜水产品加工技术研究。

E-mail: luoyongkang@263.net