

## 不同热加工方式对刀额新对虾过敏原活性的影响

郑礼娜<sup>1</sup>, 林洪<sup>1</sup>, 刘一璇<sup>1</sup>, 李钰金<sup>2</sup>, 李振兴<sup>1\*</sup>

(1. 中国海洋大学食品安全实验室, 山东 青岛 266003;

2. 泰祥集团, 山东省海洋食品营养研究院, 山东 荣成 264309)

**摘要:** 选取煮(100 ℃)、蒸(100 ℃)、高压(121 ℃, 0.1 MPa)这3种常见热加工方法, 分别处理刀额新对虾不同的时间, 通过检测总可溶性蛋白、主要过敏原含量和免疫活性的变化, 分析3种热加工方式对虾类过敏原免疫活性的影响, 并通过质地剖面分析, 研究虾肉经过处理后组织结构的变化。经过3种热处理后, 分子量为36 ku的主要过敏原蛋白仍然存在, 免疫印迹的结果显示其免疫活性有不同程度的下降, 高压对免疫活性的降低程度最大, 30 min时免疫活性降低了97%; 在25~35 ku区域出现一条新的IgE结合蛋白。质构分析结果显示, 经过高压热处理后, 虾肉的硬度和咀嚼度都有很大程度的降低, 口感变差。结果表明: 热高压处理在降低虾过敏活性的同时, 对其口感也有一定的影响, 有必要通过优化高温高压处理工艺, 在保持虾口感及营养的基础上, 降低其过敏活性。

**关键词:** 刀额新对虾; 热加工方式; 过敏原; 免疫活性; 质地剖面分析

**中图分类号:** S 985.2<sup>+1</sup>

**文献标识码:** A

随着现代社会的发展以及人们饮食结构的变化, 与食物直接相关的过敏疾病发病率日益增高, 食物过敏已成为世界各地普遍存在的一个严重食品安全问题, 引起了人们的广泛关注<sup>[1-3]</sup>。据世界粮农组织(FAO)报告, 90%以上的食物过敏是由牛奶、蛋、鱼、甲壳类水产动物、花生、大豆、坚果类和小麦引起的<sup>[4]</sup>。在我国, 近年来虾类及其制品的消费量逐年升高, 然而因此引发的过敏问题却严重影响了人们的生活质量<sup>[5]</sup>。寻找一种安全、方便地降低虾过敏原免疫活性的方法, 对于保障消费者的身体健康具有重要的意义。

研究表明, 食品热加工过程会对一些食物过敏原的活性产生影响<sup>[6-7]</sup>。虾类主要过敏原是肌肉中的原肌球蛋白<sup>[8]</sup>。虾过敏原属于热稳定性蛋白, 经过一般的热加工后其活性不会完全丧失<sup>[9-11]</sup>。但是热处理过程中, 过敏原与其他成分发生的反应是十分复杂的, 因此有必要对各种加热条件下过敏原的变化情况进行分析, 特别是其他方式与热联合作用时, 虾过敏原活性的变化有

待于深入研究。另外, 目前针对加工方式对过敏原活性的影响研究, 均追求对免疫活性的最大化降低, 却忽略了加工过程对虾肉质地和食用性的影响情况。

为此, 实验选取煮、蒸和高压加热这3种常见的热加工方法处理刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*), 通过检测虾过敏原含量和免疫活性的变化, 研究了这3种热加工方法对虾类过敏原免疫活性的影响, 并且探讨了经过处理后虾肉的质构变化情况, 为开发低过敏原甚至无过敏性的可食用虾类食品提供一些基础依据。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 实验材料与仪器

**实验材料** 刀额新对虾(购于青岛市南山水产品市场, 活品); PVDF膜(0.45 μm, Solarbio公司); Pierce ECL蛋白印迹底物(Thermo Scientific公司); 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 青岛福林生物化学公司); 二硫苏糖醇(DTT, Solarbio公

收稿日期:2010-11-02 修回日期:2010-12-18

资助项目:国家自然科学基金项目(30800859)

通讯作者:李振兴, Tel:0532-82032389, E-mail:lizhenxing@ouc.edu.cn

司);十二烷基硫酸钠(SDS,山东爱博科技贸易公司);兔抗虾多克隆抗体(由本实验室前期自行制备、纯化);羊抗兔 IgG(中杉金桥)。其他试剂如无特殊说明均为分析纯。

**实验仪器** 数字型酸度计(211型,上海伟业仪器厂);酶标仪(Mutiskan MK3, Thermo LabSystems 公司);紫外可见分光光度计(TU1810,北京普析仪器有限公司);涡旋振荡器(Minishaker,广州仪科实验室技术有限公司);高压灭菌锅(MLS-3750, SANYO 公司);组织捣碎机(DS-1,上海标本模型厂);离心机(BR4i, Jouan 公司);电泳仪(DYY-12,北京六一仪器厂);半干式碳板转印仪(DYCP-40C,北京六一仪器厂);质构分析仪(TMS-PRO, Food Technology 公司)。

## 1.2 实验方法

**虾的不同热加工处理** 将新鲜的刀额新对虾去头、壳和肠线后,进行称重,分为 12 组,每组 300 g。为了防止后续热处理过程中蛋白的流失,采用了耐高温食品包装袋对虾肉样品进行真空包装处理后再进行热加工处理。具体方法为 A. 煮处理:水 100 °C 沸腾后,1~4 组样品分别煮沸煮 5、10、20、30 min。B. 蒸处理:水 100 °C 沸腾后,5~8 组样品分别蒸 5、10、20、30 min。C. 高压热处理:9~12 组样品分别放入高压灭菌锅中,在温度为 121 °C,压力为 0.1 MPa 的条件下分别热处理 5、10、20、30 min。

**虾过敏原的提取** 将热处理后 12 组虾肉连同其蒸煮液一起分别称重,按照 1 g/mL 的比例加入 0.9% 的氯化钠(NaCl)溶液后,匀浆得到肌肉匀浆液。然后参考文献[12]的方法按照体积比 1:4 的比例加入冷丙酮,4 °C 搅动 30 min 后离心,沉淀重复冷丙酮处理 2 次,自然晾干。然后分别研磨成丙酮粉。各组分别称取相同量(2 g)的丙酮粉,用 30 mL 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH 7.4)4 °C 摇晃抽提 12 h;8 000 r/min 离心 30 min 后取上清,重复离心一次以彻底除去不溶性蛋白。采用考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白浓度后,分装在 -20 °C 冰箱保存。

**蛋白质电泳** 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对各组热处理后的虾肉可溶性总蛋白组分进行比较分析。电泳分离胶浓度为 15% (W/V),浓缩胶浓度为 5% (W/V),蛋白质样品稀释为 1 mg/mL 并经样品缓冲

液处理。电泳完毕,用考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后收集图像。

**免疫印迹对过敏原免疫活性的定性检测** 参照文献[13]的方法改进,经热处理后的虾总蛋白经 SDS-PAGE 后,采用半干式碳板转印仪,横流 30 mA 转印 3 h,将凝胶上的蛋白条带电转移到 PVDF 膜上。转印完毕后,用丽春红 S 对 PVDF 膜进行染色,检测蛋白条带是否转移成功,采用 PBST 脱色。将膜浸泡在封闭液(5% 脱脂奶粉/PBST)中 2 h,然后用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min,下面的洗涤方法相同。一抗采用兔抗虾多克隆抗体/50% 封闭液,室温下过夜孵育后洗涤。二抗采用羊抗兔 IgG/50% 封闭液,37 °C 孵育 1 h,洗涤。然后将 PVDF 膜浸没在 ECL 蛋白印迹底物中孵育 1 min,取出拭去膜上残余底物溶液,将膜置于暗盒中,避免气泡。在暗室中,采用胶片覆盖于膜上,曝光 1 min,显影定影后成像。

**间接酶联免疫(ELISA)对过敏原免疫活性的定量检测** 用包被缓冲液将各组热处理后的虾蛋白稀释到 10 µg/mL,然后参考文献[14]进行间接 ELISA 实验,检测虾过敏原免疫活性的变化。

**不同热处理后虾肉的质地剖面分析** 将经过热处理后的 12 组刀额新对虾,利用质构仪模拟口腔咀嚼运动,进行质地剖面分析(TPA),得到相应的质地参数。根据相应的质地参数来分析刀额新对虾的硬度、弹性和咀嚼性的变化趋势,比较不同热处理方法对虾肉口感的影响。使用直径 3 mm 的圆柱形探头,压缩、恢复速度相同,均为 0.5 mm/s;压缩程度为 50%;停留间隔 5 s;重复平行测定次数为 10 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 过敏原含量的变化

采用 SDS-PAGE 对经过热处理后的刀额新对虾蛋白质组分进行分析,结果如图 1 所示。经过 3 种热处理后的虾总蛋白量明显减少,尤其在 45~116 ku 中蛋白大部分缺失。但是每一组仍然存在 36 ku 蛋白。根据实验室前期的研究,分子量 36 ku 的蛋白就是刀额新对虾过敏原蛋白,由此可见煮、蒸和高压这 3 种热加工方式都不能使虾过敏原蛋白条带丧失;但是高压热处理能使该条带减弱,说明高压可以降低主要过敏原的含量。

另外,经过热处理后过敏蛋白占总蛋白的比例有很大的提高,表明虾过敏蛋白相对于其他蛋白而言对热稳定。从图中还可以看出,所有经过

热处理的虾样品,在 25 ~ 35 ku 分子量范围内出现一条新的蛋白条带。

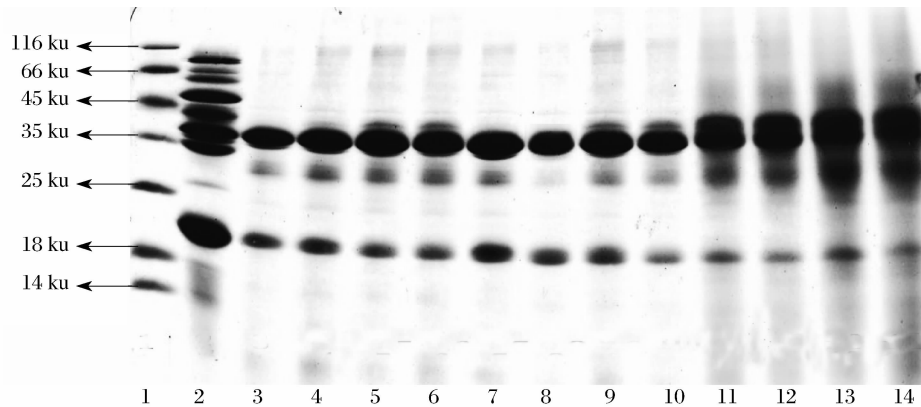


图1 刀额新对虾总蛋白的电泳分析

1. 蛋白分子量标准; 2. 未加工; 3. 煮 5 min; 4. 煮 10 min; 5. 煮 20 min; 6. 煮 30 min; 7. 蒸 5 min; 8. 蒸 10 min; 9. 蒸 20 min; 10. 蒸 30 min; 11. 高压 5 min; 12. 高压 10 min; 13. 高压 20 min; 14. 高压 30 min。

Fig. 1 SDS-PAGE pattern of total proteins of *M. ensis*

1. Marker; 2. raw shrimps; 3-6. shrimps boiled for 5, 10, 20, 30 minutes respectively; 7-10. shrimps steamed for 5, 10, 20, 30 minutes respectively; 11-14. shrimps autoclaved for 5, 10, 20, 30 minutes respectively

另外,随着热处理时间的增加,对于煮和蒸两种方式而言,过敏蛋白含量未见明显的变化;但对于高压热处理,过敏蛋白含量随着时间的增加而呈递减的趋势。再次说明高压在一定程度上对虾 36 ku 过敏原含量有降低的影响作用。

## 2.2 免疫印迹对过敏原活性的检测

采用免疫印迹对经过热处理后虾蛋白组分的

活性进行定性分析,结果如图 2 所示。可以看出,未经过热处理的虾样品中只有虾主要过敏原(36 ku)和分子量在 116 ku 以上的两条呈阳性反应的蛋白,而经过热处理后的虾样品中却显现出更多的阳性蛋白条带,这说明热处理后虾肉中能够与兔抗虾多克隆抗体结合的蛋白组分明显增多。

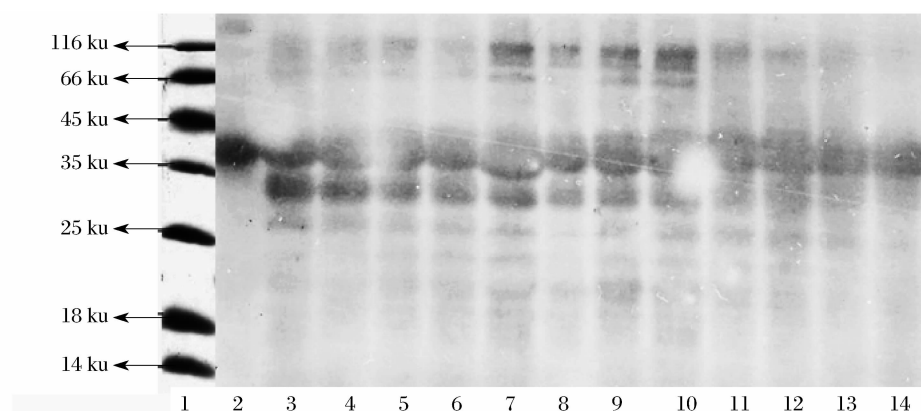


图2 不同处理刀额新对虾总蛋白的免疫印迹分析

1. 蛋白分子量标准; 2. 未加工; 3. 煮 5 min; 4. 煮 10 min; 5. 煮 20 min; 6. 煮 30 min; 7. 蒸 5 min; 8. 蒸 10 min; 9. 蒸 20 min; 10. 蒸 30 min; 11. 高压 5 min; 12. 高压 10 min; 13. 高压 20 min; 14. 高压 30 min。

Fig. 2 Western-blotting pattern of total proteins of *M. ensis*

1. Marker; 2. raw shrimps; 3-6. shrimps boiled for 5, 10, 20, 30 minutes respectively; 7-10. shrimps steamed for 5, 10, 20, 30 minutes respectively; 11-14. shrimps autoclaved for 5, 10, 20, 30 minutes respectively.

经过热处理后,分子量在 116 ku 以上的阳性蛋白条带消失,而在 116 ~ 66 ku 区域中出现多条阳性条带,25 ~ 35 ku 区域出现 1 条阳性条带,它在未经过热处理的虾样品中是缺失的,但是在经过热处理的虾样品中却全部存在(图 1),这预示着 3 种热处理方式造成了新致敏蛋白的产生。

另外,从图 2 中可以看出,所有经过热处理后的虾样品中 36 ku 蛋白仍然呈阳性反应,但其条带的颜色均低于未经过热处理的,说明热加工后其免疫活性有一定程度的降低,但是仍然存在不

能完全丧失,这与 DUAL 等<sup>[9]</sup>的研究结论相符合。尤其是针对高压热处理,36 ku 蛋白条带的颜色最浅,并且新增加的阳性蛋白条带也少于煮和蒸这两种热处理方式,这表明高压热处理相对于其他两种热处理方式来讲,更利于虾过敏原蛋白活性的降低。

### 2.3 间接 ELISA 对过敏原免疫活性的分析

采用免疫印迹定性分析出虾蛋白免疫活性的变化后,再利用间接 ELISA 对虾过敏原的免疫活性进行定量分析,结果如图 3 所示。

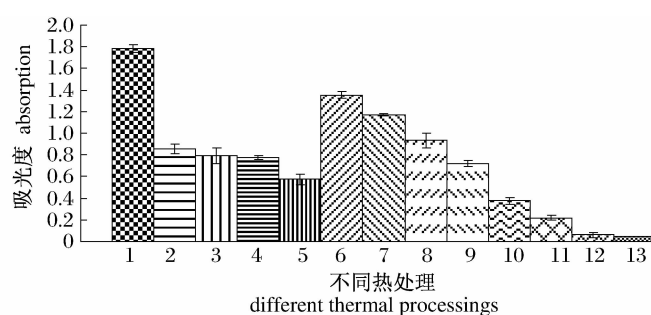


图 3 热处理对虾蛋白致敏活性的影响

1. 未加工; 2. 煮 5 min; 3. 煮 10 min; 4. 煮 20 min; 5. 煮 30 min; 6. 蒸 5 min; 7. 蒸 10 min; 8. 蒸 20 min; 9. 蒸 30 min; 10. 高压 5 min; 11. 高压 10 min; 12. 高压 20 min; 13. 高压 30 min。

Fig. 3 Immunocompetence changes of shrimp after three thermal processings

1. raw shrimps; 2-5. shrimps boiled for 5, 10, 20, 30 minutes respectively; 6-9. shrimps steamed for 5, 10, 20, 30 minutes respectively; 10-13. shrimps autoclaved for 5, 10, 20, 30 minutes respectively.

经过热处理后虾样品的过敏原免疫活性均有一定程度的降低,但是不同的热加工方法对过敏原活性的影响并不相同,其中高压对免疫活性的降低效果最为明显。高压 5 min, 免疫活性已经降低了 78%; 而同样时间内煮和蒸处理后的免疫活性降低了 53% 和 23%。高压 30 min 时, 过敏原的免疫活性已经降低了 97% 左右。可见高压热处理对于虾过敏原免疫活性的降低效果最好, 而蒸热处理的效果最差, 这同免疫印迹的结果也相对应(蒸处理后

新增阳性蛋白条带最多)。另外,随着每种热处理时间的延长,过敏原的免疫活性呈递减趋势,但是幅度不大,表明热处理时间对过敏原免疫活性的影响并不如方法对其的影响剧烈。

### 2.4 质构分析

为了比较经过不同热处理后,虾肉的组织结构以及口感的变化情况,采用质构仪对各组虾肉样品进行了 TPA 分析。如图 4 所示,煮和蒸处理对虾肉的硬度影响情况比较类似,而高压热处理却使硬

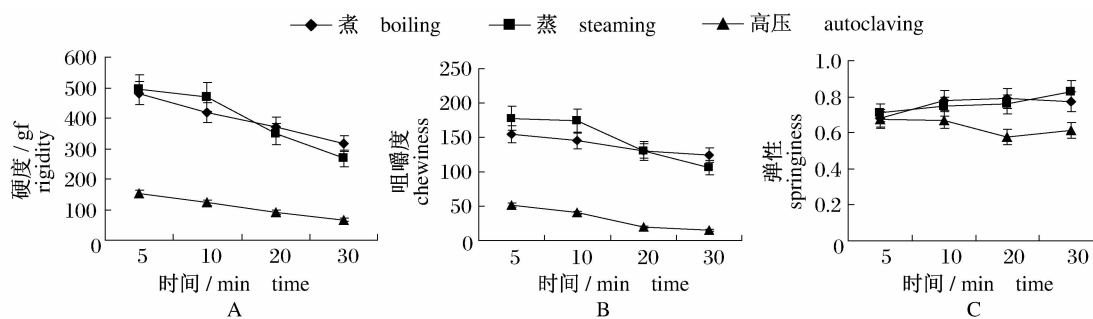


图 4 热处理后虾样品的硬度、咀嚼度和弹性变化情况

Fig. 4 Rigidity, chewiness and springiness changes of shrimp after three thermal processings

度有很大程度的降低,仅为其他两种处理方式的1/3左右。对于每种热加工方式,随着热处理时间的延长,虾肉的硬度均呈现出下降趋势。与硬度类似,煮和蒸处理对咀嚼度的影响情况比较缓和,但高压热处理却使咀嚼度下降剧烈;并且对于每一种热加工方式而言,随着热处理时间的延长,咀嚼度也是逐渐下降的。另外,3种热处理后的虾肉弹性相差不大;并且对于煮和蒸这两种方式而言,随着热处理时间的增加,虾肉弹性有一定程度的增高。

### 3 讨论

热处理是食品加工过程中常用的加工方式,一般认为热加工会破坏一些蛋白质的结构从而对其活性造成影响。近几年来针对虾过敏的研究发现,单纯的加热对虾过敏活性影响不是特别大<sup>[15]</sup>,但也有报道称一些联合的食品加工手段能够比较有效的降低虾过敏原的活性<sup>[16-17]</sup>。从本实验的结果看,煮、蒸这两种加热方式对虾过敏原活性有一定的降低作用;而高压热处理作为一种简单、方便的常用加热方法,依靠热以及压力进行作用,联合了两种加工手段,能够显著降低虾过敏原免疫活性。另外,在煮和蒸热处理过程中可以明显看到,虽然36 ku主要过敏原含量有所减少,但产生了新的分子量较小的阳性蛋白。新的阳性蛋白是否是主要过敏原蛋白分解的产物,与原蛋白的同源性数值,现在尚且未知。同时,高压热处理对虾过敏原蛋白起作用的机理以及过敏原决定簇在高压处理中的变化情况,这些都尚待进一步深入的研究分析。

另外,将热处理后各组的免疫活性与质构的结果结合来看,虽然高压热处理可以显著地减弱虾过敏原的免疫活性,但是经过该处理后虾肉的组织结构有很大变化,硬度和咀嚼度下降剧烈,弹性也有轻微的下降。当高压30 min时,免疫活性虽然降低了97%,但是虾肉的口感已经变得很差,在实际应用中可行性不高。所以有必要对高压热处理过程进行工艺参数的优化,使虾过敏活性降低的同时保持其良好的风味和口感。针对本实验的结果,从降低虾过敏原的免疫活性以及保持良好口感双方面考虑,煮处理相对于其他两种热处理方式而言更适合。

目前,热加工方式对虾过敏原活性的影响研究还处于起步阶段,在热加工过程中过敏原表位

序列及结构的变化情况尚且未知,需要继续深入地对虾过敏原及表位进行研究。只有通过全面地了解过敏原表位及表位在加工中的变化情况,最终才能找到剔除虾过敏原的有效方法,让人们吃到安全健康的虾类食品。

### 参考文献:

- [1] RENE C. Allergens: The European approach [J]. *Journal of Food Science*, 2004, 69(4): 343-346.
- [2] VIERK K, FALCI K, WOLYNIAC C, *et al.* Recalls of foods containing undeclared allergens reported to the US Food and Drug Administration, fiscal year 1999 [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2002, 109(6): 1022-1026.
- [3] KIMBER I, DEARMAN R J. Food allergy: what are the issues [J]. *Toxicology Letters*, 2001, 120: 165-170.
- [4] Report of the FAO technical committee on food allergies [R]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995: 13-14.
- [5] 吕相征, 刘秀梅, 杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查[J]. *中国食品卫生杂志*, 2005, 17(2): 119-121.
- [6] SATHE S K, TEUBER S S, ROUX K H. Effects of food processing on the stability of food allergens [J]. *Biotechnology Advances*, 2005, 23: 423-429.
- [7] WAL J M. Thermal processing and allergenicity of foods [J]. *Allergy*, 2003, 58: 727-729.
- [8] SHANTI K N, MARTIN B M, NAGPAL S, *et al.* Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its Ige-binding epitopes [J]. *The Journal of Immunology*, 1993, 151(10): 5354-5363.
- [9] DAUL C B, SLATTERY M, REESE G, *et al.* Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin [J]. *International Archives of Allergy & Applied Immunology*, 1994, 105: 49-55.
- [10] 王晓斐, 李振兴, 林洪, 等. 中国对虾主要过敏原的鉴定及理化性质 [J]. *水产学报*, 2008, 32(2): 273-278.
- [11] 李振兴, 林洪, 曹立民. 不同虾类的过敏原及其过敏原性 [J]. *水产学报*, 2006, 30(2): 281-284.
- [12] LIANG Y L, CAO M J, SU W J, *et al.* Identification and characterisation of the major allergen of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Food Chemistry*, 2008, 111: 998-1003.

- [13] MOTOYAMA K, SUMA Y, ISHIZAKI S, *et al.* Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of Crustaceans[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55 ( 3 ): 985 – 991.
- [14] 张轶群,李振兴,林洪,等. 果糖和木糖在美拉德反应中对虾类过敏原活性影响的研究[J]. *食品科学*,2009,30(29):11 – 14.
- [15] BESLER M, STEINHART H, PASCHKE A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods[J]. *Journal of Chromatography B*, 2001,756:207 – 228.
- [16] LI Z X, LIN H, CAO L M, *et al.* Reduction of allergenic properties of shrimp (*Penaeus vannamei*) allergens by high intensity ultrasound[J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 223 ( 5 ): 639 – 644.
- [17] LI Z X, LIN H, CAO L M, *et al.* The influence of gamma irradiation on the allergenicity of shrimp (*Penaeus vannamei*) [ J ]. *Journal of Food Engineering*,2007,79:945 – 949.

## Study on effects of different thermal processings on immunocompetence of shrimp (*Metapenaeus ensis*) allergen

ZHENG Li-na<sup>1</sup>, LIN Hong<sup>1</sup>, LIU Yi-xuan<sup>1</sup>, LI Yu-jin<sup>2</sup>, LI Zhen-xing<sup>1\*</sup>

(1. Food Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Taixiang Group, Shandong Institute of Marine Food Nutrition, Rongcheng 264309, China)

**Abstract:** Shrimp proteins have been recognized as an important source of food allergens. The objective of this study was to analyze the immunocompetence and texture changes of shrimp allergen after different thermal processings. In this study, three heat methods were chosen to investigate their impacts on the immunocompetence of shrimp allergen, which included boiling, steaming, and autoclaving. After four different heating time, the total proteins and content of the major allergen were profiled by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The changes of immunocompetence of shrimp allergen were determined by Western-blotting and ELISA. In the meantime, texture profile analysis (TPA) was adopted to compare the quality changes of the processed shrimps. The results showed that the major allergen protein was still present in all of the total proteins of shrimps. Moreover, there was a new protein with molecular weight of 25 – 35 ku, which took on high immunocompetence. However, based on the results of Western-blotting and ELISA, the immunocompetence of the allergen protein was all reduced after the three thermal processings. In addition, different processings had different impact on the immunocompetence. Among the three methods, autoclaving had the best reducing effect towards immunocompetence of shrimp allergen. Cooking 5 min with autoclave could reduce 78% of the immunocompetence, while boiling and steaming for the same period could reduce 53% and 23% of the immunocompetence respectively. Moreover, when the autoclaving time was extended to 30 min, 97% of the immunocompetence was lost. Nevertheless, the results of TPA showed that the quality of shrimp had been destroyed during the autoclaving. The rigidity and chewiness of the shrimp was greatly reduced after the autoclave processing. It is concluded that autoclave can greatly reduce the immunocompetence of shrimp major allergen protein at the expense of destroying the texture. The parameters of the autoclave are suggested to be optimized to reduce the immunocompetence and keep good texture and nutrition.

**Key words:** *Metapenaeus ensis*; thermal processing; allergen; immunocompetence; texture profile analysis

**Corresponding author:** LI Zhen-xing. E-mail: lizhenxing@ouc.edu.cn