

加工方式对刀额新对虾主要过敏原免疫原性的影响

刘一璇¹, 林洪¹, 吴丽莎¹, 陈瑜¹, 王国英², 李振兴^{1*}

(1. 中国海洋大学食品安全实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛大学医学院, 山东 青岛 266071)

摘要: 选取冻干、烘干、虾丸化以及油炸4种加工方式处理刀额新对虾,通过检测可溶性蛋白、主要过敏原含量和免疫活性的变化以及体外模拟胃液消化实验,分析加工方式对虾类过敏原免疫活性及抗酶解能力的影响。结果表明经过不同的加工处理后,分子量为35 ku左右的主要过敏原蛋白仍然存在,免疫印迹显示其免疫活性有不同程度的下降,其中虾丸化处理对免疫活性的降低程度最大,达87%,冻干处理的影响最小,仅达6.8%;而主要过敏原蛋白抗酶解能力变化不明显。结论:不同的加工方式对虾过敏原活性的降低有比较大的差异,但对于抗酶解能力影响不大。

关键词: 刀额新对虾; 加工; 过敏原; 过敏活性

中图分类号: TS 254.1

文献标志码: A

随着人们生活水平的提高,由于食物引发的过敏反应日益增加,食物过敏已经成为一个严重的食品安全隐患^[1-4]。食物过敏是IgE介导的食物蛋白的不耐受反应,能引起人体过敏的食物蛋白质被称为食物过敏原。过敏原的活性位点可能是一级结构中氨基酸组成的线性表位,也可能是三级结构构成的构象表位,构象表位比线性表位更容易受到加工的影响而被破坏^[5-6]。许多研究表明,食品加工过程会对一些食物过敏原的活性产生影响^[7-8]。早在1992年,BBERNHIEL-BROADBENT等^[9]就发现罐装的金枪鱼和鲱鱼较生鲜及蒸煮的产品的过敏原活性低。

虾类作为八大类主要的食物过敏原之一,其主要过敏原是肌肉中的原肌球蛋白^[10]。以刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)为研究对象,采用4种加工方式对其进行加工处理,对比不同加工处理后刀额新对虾的可溶性蛋白分布、主要过敏原含量、免疫活性和抗酶解能力的变化,研究加工方式对刀额新对虾过敏原蛋白的影响,为食物过敏的研究提供理论基础。

1 材料与方法

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); 二巯苏糖醇(DTT, Solarbio公司); 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; 羊抗兔IgG(中杉金桥); 虾过敏患者血清(青岛大学医学院附属医院); 抗人IgE(Sigma公司); 胃蛋白酶(Sigma公司)。其他试剂如无特殊说明均为分析纯。

实验仪器 酶标仪(Mutiskan MK3, Thermo Labsystems公司); 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); 冷冻干燥机(FD-1C-80, 北京博医康实验仪器有限公司); 天能凝胶成像仪(Tanon 4200, 上海天能科技有限公司)。

收稿日期:2011-01-05 修回日期:2011-02-21

资助项目:国家自然科学基金项目(30800859); 青岛市公共领域科技支撑计划项目(09-1-1-6-nsh)

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

1.2 实验方法

虾的加工处理 将新鲜的刀额新对虾去头、壳和肠线后,生理盐水洗净,进行称重,分为5组,每组200 g。采用冻干、烘干、凝胶化、油炸4种加工方式,处理刀额新对虾。

具体方法为(1)冻干处理:将虾肉整齐地摆入盘中,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻,放入冷冻干燥机中冻干。(2)烘干处理:放入 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘烤2 h(测定水分含量[GB/T 5009.3-2003])。(3)虾丸处理:虾肉用研钵捣至松软,分别加入1.1%的食盐和1%的淀粉进行搅打,冰冻1 h后取出,将虾肉制成丸子,放入 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 清水里煮4 min,然后用旺火将水煮沸至丸子漂起,捞出。(4)油炸处理:虾肉放在干净滤纸包起,挤去多余水分,于 $150\sim 160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的花生油油锅中炸至熟,约为3 min。

虾过敏原的提取 将加工处理后的虾肉进行称重,各取100 g,按照1 g/mL的比例加入0.9% NaCl溶液后,匀浆得到肌肉匀浆液。然后参照文献[11]制作丙酮粉。各取2 g丙酮粉按照1:10的比例用1 mol/L KCl 0.05% DTT抽提液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下过夜抽提,10 000 r/min离心15 min取上清,沉淀再按照上法重新抽提4 h,离心,合并上清进行透析,并冷冻干燥后于干燥器中储存。采用BRADFORD的方法^[12]测定蛋白质浓度。

蛋白质电泳 采用LAEMMLI^[13]建立的不连续电泳体系,其中分离胶质量体积比为15%,浓缩胶质量体积比为5%。蛋白质样品稀释为1 mg/mL,上样量为10 μL ,经样品缓冲液处理。电泳完毕,考马斯亮蓝R250染色,脱色收集图像。

虾过敏原免疫活性的免疫印迹分析 参照文献[14]方法改进,SDS-PAGE按LAEMMLI^[13]的方法进行,电泳结束后,将蛋白质标准用考马斯亮蓝R250染色,待测样品进行免疫检测。采用半干式碳板转印仪,横流35 mA转印3.5 h,将凝胶上的蛋白条带转移到PVDF膜上。转印后,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,将硝酸纤维膜置于封闭液(5%脱脂奶/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1:50或者是1:2 500的兔抗凡纳滨对虾多克隆抗体,室温下预孵育1 h, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育膜过夜,洗涤,用50%封闭液稀释100倍的羊抗人IgE

或稀释1 000倍的羊抗兔IgE作为二抗,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,洗涤,化学发光底物孵育膜,倾去化学发光物溶液,用天能凝胶成像仪(Tanon 4200)进行成像。

间接酶联免疫(indirect ELISA)对过敏原免疫活性的定量检测 用包被缓冲液将加工处理后的虾蛋白稀释到10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔包被100 μL ,然后参考文献[15]利用兔抗凡纳滨对虾多克隆抗体作为一抗,羊抗兔IgE为二抗进行间接ELISA实验,以450 nm的吸光值表示虾过敏原免疫活性的变化。

体外模拟胃液消化实验 按照Sigma公司提供的测定方法进行胃蛋白酶酶活测定,参考文献[16]的方法,以4 mg/mL的虾样品抽提液作为底物,按照10 U:1 μg 蛋白的比例,在 $(37\pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,进行虾过敏原的抗酶解能力测定。

2 结果与讨论

2.1 过敏原含量的变化

不同加工方式所得的虾蛋白聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)结果为图1。所选的蛋白质分子量为低分子量蛋白标准,介于14.4~116.0 ku。从图1中可见,116~40 ku大分子蛋白经过烘干、虾丸、油炸处理后明显缺失,而国内外报道的虾类普遍存在的过敏原为35 ku的原肌球蛋白,通过不同的加工处理后,虽然其在虾蛋白中的分布有所改变,但是依然存在,这与先前报道^[7]的虾过敏原具有热稳定性相符,冻干处理对虾蛋白几乎没有影响,这也证明了冻干处理能够较完整的保持物质的构象,烘干、虾丸及油炸后的虾蛋白条带明显由高分子量向低分子量迁移,烘干处理的虾蛋白大多降解为22 ku,虾丸、油炸处理的虾样品在25~30 ku左右皆出现了新的蛋白条带,说明这几种加工方式对虾蛋白具有破坏作用,可能会引起蛋白质的构象变化及过敏原的免疫活性变化。烘干处理的虾样品的SDS电泳条带仅为35、20 ku左右,且根据灰度值可见其蛋白含量较少,这可能与蛋白未完全抽提有关。

2.2 免疫印迹

分别利用人血清(IgE)和兔抗凡纳滨对虾多克隆抗体(IgG)作为一抗,通过聚丙烯酰胺/免疫印迹方法检测加工处理后刀额新对虾的过敏原免疫活性的情况,结果如图2。可以看出,不同加工

处理方法对刀额新对虾的过敏原免疫活性的影响不同,但是均有一定程度的降低。

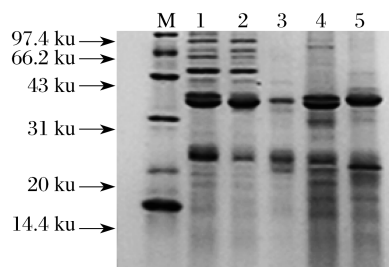


图1 不同加工处理刀额新对虾蛋白质电泳图分析

M. 标准蛋白; 1. 对照; 2. 冻干; 3. 105 °C 烘干; 4. 虾丸; 5. 油炸 3 min。

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

M. marker; 1. raw shrimps; 2. lyophilizing; 3. 105 °C drying; 4. gelation; 5. frying 3 min.

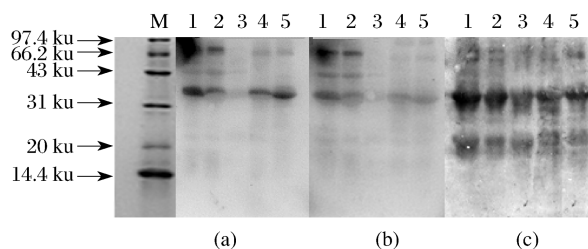


图2 不同加工处理刀额新对虾总蛋白的免疫印迹分析

M. 标准蛋白; 1. 对照; 2. 冻干; 3. 105 °C 烘干; 4. 虾丸; 5. 油炸 3 min。

(a), (b) 为人血清免疫印迹图, (c) 为兔多抗免疫印迹图。

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

M. Marker; 1. raw shrimps; 2. lyophilizing; 3. 105 °C drying; 4. gelation; 5. frying 3 min.

(a), (b) Western-blotting with human serum, (c) Western-blotting with pAbs.

冻干处理的虾样品在体外 IgE 和 IgG 免疫反应中,阳性反应条带与未经处理的对照样品是一致的,但是主要的过敏原 35 ku 的灰度值较未经处理的小,说明其免疫活性有所下降。烘干处理的虾样品其蛋白条带很少,在 IgE 反应中显示出微弱的活性,其主要的致敏条带依然是 35 ku。虾丸处理的虾样品,在 IgG 免疫反应中于 66 ku 和 31 ku 左右出现了一条新的阳性反应条带。油炸处理的虾样品在体外免疫反应中,主要过敏原依然显示了较强的活性,表示虽然油炸处理造成了大部分的蛋白遗失,但 35 ku 主要过敏原的具有一定的稳定性。

由图 2-a,b,c 3 个图对照可见,体外 IgE 免疫反应较 IgG 免疫反应的特异性强,不同人体内的特异性抗体 IgE 的量也是不同的,从而导致不同人的过敏阈值差异。由 2-a,b,c 3 个图综合可见,经过加工处理后 35 ku 的条带依然呈阳性反应,但是其灰度值要明显较未处理的样品值低,说明加工处理后刀额新对虾的免疫活性有一定程度的降低。

2.3 间接酶联免疫实验(indirect ELISA)

利用间接酶联免疫实验对免疫活性定量分析进一步评价加工方式对过敏原活性的影响,结果如图 3。可以看出,不同的加工方式对刀额新对虾过敏活性影响的差异,其中对虾丸的影响最大,其免疫活性降低了 87%,可能是因为组织捣碎过程中,虾肉中的酶降解蛋白的机会增加,食盐的添加导致盐溶性的蛋白部分流失,据报道,虾主要的过敏原蛋白原肌球蛋白是一种盐溶性蛋白。烘干处理后的虾免疫活性降低了 85%,可能是因为干热处理更容易导致蛋白质构象变化,通过电泳图谱的对照,烘干处理的虾蛋白主要过敏原 35 ku 的含量少,在 20 ku 左右出现了一条新的蛋白条带,有文献报道^[17],虾肌球蛋白的轻链 20 ku 为一种过敏原蛋白。油炸处理后,其免疫活性下降了 56%,虽然油炸处理后,蛋白质的分布减少,但是其主要的过敏原 35 ku 蛋白在总蛋白中所占的比例较高,且在免疫印迹中显示了较强的免疫活性。蛋白质冻干处理对过敏原活性的影响最小,因此制备纯化过敏原时,可以先将产品进行冻干处理,既可以延长样品的储藏时间,又可以保持良好的过敏原活性。

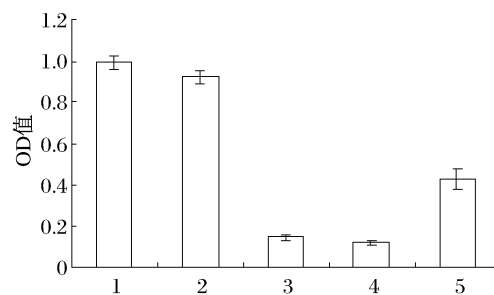


图3 不同加工处理方式对刀额新对虾免疫活性的影响

1. 对照; 2. 冻干; 3. 105 °C 烘干; 4. 虾丸; 5. 油炸 3 min。

Fig. 3 Immunocompetence changes of *M. ensis* after different processings

1. raw shrimps; 2. lyophilizing; 3. 105 °C drying; 4. gelation; 5. frying 3 min.

2.4 体外模拟胃液消化实验

利用体外模拟酶消化实验,对4种加工处理的刀额新对虾可溶性蛋白抗酶解能力进行评价(图4),由图4-c可见,烘干处理后的样品在酶解0.5 min时,其所含的35 ku和22 ku的蛋白质已经开始降解成20 ku蛋白,这可能是由于烘干处理的虾样品,其抽提所得的蛋白质较少,降解生成20 ku蛋白在10 min时产量最大,直至60 min其依然没有完全降解,说明20 ku蛋白抗酶解能力

较强。由图4-a,b,d,e可见,在酶解开始0.5 min时,大分子和小分子的蛋白迅速降解,从2 min开始主要过敏原35 ku的蛋白质开始逐渐降解为20 ku的蛋白,30 min时几乎降解完全,此时20 ku的蛋白开始有降解的趋势。这说明刀额新对虾的主要过敏原35 ku蛋白具有一定的抗酶解能力。本实验所采用的冻干、虾丸、油炸加工处理方法对刀额新对虾可溶性蛋白抗酶解能力没有影响。

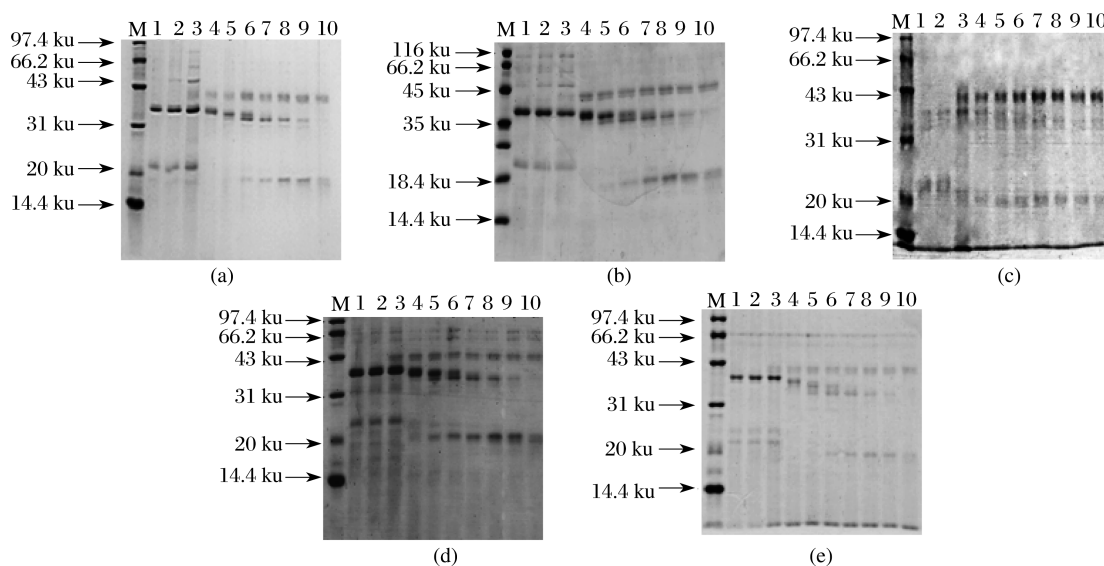


图4 不同加工处理方式对刀额新对虾抗酶解能力的影响

(a) 对照; (b) 冻干; (c) 105 °C烘干; (d) 虾丸; (e) 油炸3 min。

M. Marker; 1. 对照0 min; 2. 对照60 min; 3. 酶解0 min; 4. 酶解0.5 min; 5. 酶解2 min; 6. 酶解5 min; 7. 酶解10 min; 8. 酶解20 min; 9. 酶解30 min; 10. 酶解60 min。

Fig. 4 Ability of anti-enzyme changes of *M. ensis* after different processings

(a) raw shrimps; (b) lyophilizing; (c) 105 °C drying; (d) gelation; (e) frying 3 min.

M. mark; 1. control 0 min; 2. control 60 min; 3. digestion 0 min; 4. digestion 0.5 min; 5. digestion 2 min; 6. digestion 5 min; 7. digestion 10 min; 8. digestion 20 min; 9. digestion 30 min; 10. digestion 60 min.

3 结论

本研究选取冻干、烘干、虾丸及油炸4种常见的加工处理方法,分别处理刀额新对虾,通过检测不同加工处理的刀额新对虾过敏原蛋白含量、免疫活性以及抗酶解能力的变化,研究加工方法对虾类过敏原免疫活性的影响。结果发现经过不同加工处理后,虽然主要过敏原蛋白仍然存在,但是其免疫活性均有一定程度的下降,这预示着加工处理可能会导致蛋白质的构象的改变。其中,经过虾丸处理对虾过敏原免疫活性影响最大,可达87%。但是加工处理后,主要过敏原蛋白的抗酶

解能力几乎没有差异,因此有关加工对过敏原活性的影响尚需要进一步的验证。

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] 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,2005,17(2): 119 - 121.
- [5] SANCHEZ C, FRMONT S. Consequences of heat treatment and processing of food on the structure and allergenicity of component proteins [J]. *Revue Franaise d' Allergologie et d' Immunologie Clinique*, 2003,43(1):13 - 20.
- [6] MARZBAN G, HERNDL A, PIETROZOTTO S, *et al.* Conformational changes of Mal d 2, a thaumatin-like apple allergen, induced by food processing[J]. *Food Chemistry*,2009,112:803 - 811
- [7] 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.
- [8] WAL J M. Thermal processing and allergenicity of foods[J]. *Allergy*,2003,58:727 - 729.
- [9] BERNHISEL-BROADBENT J, SRAUSE D, SAMPSON H A. Fish hypersensitivity: clinical prevalence of altered fish allergenicity caused by various preparation methods[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*,1992,90:622 - 629.
- [10] 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]. *Journal of Immunology*, 1993, 151 (10):5354 - 5363.
- [11] YU C J, LIN Y F, CHIANG B L, *et al.* Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m2 [J]. *Journal of Immunology*,2003, 170:445 - 453.
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*,1976,72:248 - 254
- [13] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*,1970,227:680 - 685.
- [14] 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.
- [15] 李振兴,林洪,李明华,等. 不同虾类的过敏原及其过敏原性[J]. 水产学报,2006,30(2):281 - 284.
- [16] HUANG Y Y, LIU G M, CAI Q F, *et al.* Stability of major allergen tropomyosin and other food proteins of mud crab (*Scylla serrata*) by *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. *Food and Chemical Toxicology*,2010,48(5):1196 - 1201.
- [17] AYUSO R, GRISHINA G, BARDINA L, *et al.* Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3 [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008,122(4):795 - 802.

Study on effects of different processings on immunogenicity of shrimp(*Metapenaeus ensis*) allergen

LIU Yi-xuan¹, LIN Hong¹, WU Li-sha¹, CHEN Yu¹, WANG Guo-ying², LI Zhen-xing^{1*}

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

2. Medical College, Qingdao University, Qingdao 266071, 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 digestion stability of shrimp allergen after different processings. In this study, four processing methods were chosen to investigate their impacts on the immunocompetence of shrimp allergen, which included lyophilizing, drying, frying and gelation. After four different processings, 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, vitro enzymatic digestion was adopted to compare the ability of anti-enzyme changes of the processed shrimps. The results showed that the major allergen protein was still present in all of the total proteins of shrimps. However, based on the results of Western-blotting and ELISA, the immunocompetence of the allergen protein was all reduced after the four processings. In addition, different processings had different impact on the immunocompetence. Among these four methods, shrimp gelation had the best reducing effect towards immunocompetence of shrimp allergen, which could reduce 87% of the immunocompetence, while frying and drying could reduce 56% and 85% of the immunocompetence respectively. Nevertheless, lyophilizing has little effect on reducing the immunocompetence. The results of vitro enzymatic digestion showed that the ability of anti-enzyme had zero difference during processing. It is concluded that the reduction of immunological competence after different processings varies widely, but the ability of anti-enzyme had zero difference.

Key words: *Metapenaeus ensis*; processing; allergen; allergenicity

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