



不同脱脂方法对高脂肪型复杂食物基质中牛乳过敏原检测的影响

胡巍^{1,2,3}, 杨帆^{1,2,3}, 熊子奕^{1,2,3}, 高金燕^{2,3}, 陈红兵^{1,3,4}, 李欣^{1,2,3,*}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047;

2. 南昌大学食品学院, 江西南昌 330047;

3. 江西省食物过敏重点实验室, 江西南昌 330047;

4. 南昌大学中德联合研究院, 江西南昌 330047)

摘要: 脂肪作为食品的常见成分,会与牛乳过敏原蛋白之间发生相互作用从而影响过敏原蛋白的提取效果和检测准确性。然而,有关高脂肪型复杂食物基质的脱脂方法仍鲜有研究。以含有牛乳过敏原的巧克力模拟高脂肪型复杂基质,分别测定了正己烷、异丙醇、乙酸乙酯和脂肪酶脱脂处理后模拟基质的脱脂率和蛋白损失率,比较了脱脂前后蛋白结构、粒度、脂肪分布和微观结构的变化,同时利用间接 ELISA 测定脱脂前后从模拟基质中提取主要牛乳过敏原的浓度。结果表明:正己烷的脱脂率最高且蛋白损失率最低,分别为 87.87% 和 6.86%,脱脂会改变蛋白质的空间结构,整体由紧凑变为松散,其中正己烷组和乙酸乙酯组的变化较小。粒径在脱脂后略微降低,但异丙醇处理会使蛋白聚集成较大的颗粒,粒径由 297.9 nm 升高至 445.1 nm。正己烷和乙酸乙酯脱脂后模拟基质的脂肪分布更为均一且液滴变小,表面面貌由致密光滑的块状变为疏松多孔结构,而异丙醇组和脂肪酶组仍然存在部分结块。间接 ELISA 结果表明:酪蛋白在乙酸乙酯组中的提取率提升了 61.53%, α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白在正己烷处理后的提取浓度最高,分别为 0.73 mg/mL 和 1.89 mg/mL。正己烷脱脂处理可以明显改善高脂肪复杂基质中过敏原的提取效果,希望研究结果可为实现高脂肪型复杂基质食物中过敏原的准确检测提供参考。

关键词: 过敏原检测; 复杂食物基质; 牛乳过敏原; 脱脂处理; 高脂肪型食物

中图分类号: TS201.6 **文献标志码:** A

牛乳是八大类过敏食物之一,其营养丰富,是婴幼儿最早接触的过敏食物^[1]。牛乳中含有 30 多种潜在的过敏原蛋白,其中酪蛋白、 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白是牛乳中的主要过敏原^[2]。尽管过敏原

标签的使用有效地提高了消费者获取过敏原信息的便利性,但是现行的标签法规仍不能消除食品中隐藏的过敏原所引起的潜在危险。因此,实现食物过敏原的准确检测是保障食用安全的重要前提。

收稿日期: 2022-08-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31872887)。

Foundation: National Natural Science Foundation of China (31872887).

第一作者: 胡巍,女,硕士研究生,研究方向为食物过敏。

* 通信作者: 李欣,女,教授,博士,博士生导师,主要从事食物过敏方面的研究。

食物样品的前处理方法是过敏原检测的重要环节,采用不同方法直接影响到检测的准确性,并与过敏原的丰度、含量和免疫反应性有关^[3]。食物基质成分易于与过敏原形成共价键、离子键、氢键或疏水相互作用从而影响其检测结果^[4]。巧克力是相对复杂的食品基质之一,原料乳粉中包含的乳蛋白是其主要的过敏物质,其中含有的大量脂肪可能会在调温期间影响产品的结晶从而掩蔽部分过敏原表位^[5]。此外,样品制备过程中脂肪的存在会阻碍过敏原蛋白的分离提取或影响抗原抗体反应从而降低检测的准确度^[6]。因此,开发适用于高脂肪型食物脱脂的前处理方法迫在眉睫。然而直至目前,这类研究仍鲜有报道。

化学溶剂法和脂肪酶法作为食物中常见的脱脂方法,被广泛应用于样品的前处理中^[7-8]。溶剂法常使用烷烃、醇和酯类等有机试剂溶解并分离脂肪^[9],脂肪酶法通过使酯键水解断裂,将脂肪转化成较易于从蛋白质中分离出来的脂肪酸和甘油^[10]。然而,溶剂和酶均可能改变蛋白质的结构和性质,导致过敏原的制敏性发生变化。崔岩岩等^[11]使用溶剂法对椰子粕进行脱脂处理,发现脱脂溶剂破坏了椰子分离蛋白亚基的二硫键,同时通过破坏蛋白分子间的疏水键使其三级结构展开。耿勤等^[12]发现脂肪酶脱脂会改变米渣蛋白的三级结构并使其溶解性降低。蛋白质结构影响着过敏原的致敏性,结构变化的过程中其表位的含量和暴露情况也可能随之变化。因此,脱脂效果好、过敏原提取率高且对过敏原结构影响较小的脱脂方法是目前高脂肪型复杂食物基质前处理的研发重点。

本研究选用含有牛乳过敏原的巧克力作为高脂肪型食物基质模型,分别利用正己烷、异丙醇和乙酸乙酯等脱脂剂和脂肪酶酶对样品进行脱脂处理,比较了不同脱脂方法对样品脱脂率、蛋白损失率、粒度、蛋白结构、脂肪分布情况和微观结构的影响。此外,利用间接 ELISA 定量脱脂前后样品中主要牛乳过敏原的浓度,依据实验结果为 3 种牛乳过敏原分别确定一种较优的脱脂方法,以期有效提升高脂肪型复杂基质中牛乳过敏原的提取效果,最终达到提升检测准确度的目的。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳粉,恒天然商贸上海有限公司(由纯牛乳喷

雾干燥获得,蛋白质质量分数 24%);可可粉,太古糖业(中国)有限公司;可可脂,可可百利;正己烷、异丙醇、乙酸乙酯均为色谱纯,德国 Meker 公司;食品脂肪酶(活力值 50 000 U),安徽绿微康生物科技有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA);预染大分子蛋白质 Marker,美国 Sigma 公司;尼罗红染色剂,北京索莱宝科技有限公司;考马斯亮蓝 R250、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、8-苯胺-1-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt, ANS)、羊抗兔 IgG 抗体,美国 Sigma 公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB),欣博盛生物科技有限公司;兔抗 α -乳白蛋白、兔抗 β -乳球蛋白和兔抗酪蛋白血清为实验室自制,其他常用生化试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SZC-101S1 型脂肪测定仪,上海纤检仪器有限公司;XCell4 SureLock 中型胶电泳槽,美国 BIO-RAD 公司;TU-1901 型紫外分光光度计,北京普析通用仪器公司;F-4600 型荧光分光光度计,日本 HITACHI 公司;Varioskan LUX 型多功能酶标仪,美国 Thermo 公司;BI-200SM 型动静态光散射仪,美国 Brookhaven 公司;Leica TCS SP8 型激光共聚焦显微镜,德国 Leica 公司;Regulus 8100 型冷场发射扫描电镜,日本 HITACHI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 模拟高脂肪型复杂食物基质的制备

巧克力食品模型较多,研究为了保障配方的稳定性,参考 Khuda 等^[13]的基础模型并进行调整得出最终模型,乳粉 60 g,可可脂 70 g,白砂糖 20 g。原材料混合均匀后在 60 °C 下融化并搅拌,然后于 45 °C 精炼 1 h,随后在 27 ~ 29 °C 之间进行调温,最后放入冰箱 4 °C 冷却凝固 2 h。

1.3.2 脱脂处理方法

溶剂法。将样品和脱脂剂加入离心管中,恒温 37 °C 磁力搅拌 2 h,获得的处理液在 8 000 g 下离心 10 min,弃去上清,于通风橱内干燥并挥发溶剂,收集粉末状样品备用。

酶法。向磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中加入脂肪酶以获得质量浓度为 0.3 g/L 的脱脂酶液,样品预热后加入酶液进行水解,于 50 °C 下搅拌 90 min。之后采用 95 °C 水浴加热处理 10 min 使酶灭活,于冷水浴中迅速冷却,冻干成粉末状。

1.3.3 脱脂率的测定

参考罗舜菁等^[14]的方法并进行一定的修改。称取 2 g 左右样品,转入在底部已塞脱脂棉的滤纸筒内,再用脱脂棉塞入上部压住试样,放入专用铝杯中,于脂肪测定仪中进行脂肪量的测定。

设置浸泡、抽提、回收、烘干 4 个阶段的温度和时间,浸泡 55 ℃ 1.5 h,抽提 75 ℃ 1.5 h,溶剂回收 85 ℃ 15 min,烘干阶段设为 110 ℃ 45 min。称量测定前后铝杯的质量差以获得脂肪质量,脱脂率的计算见式(1)。

$$\text{脱脂率} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, W_0 为脱脂前样品脂肪体积分数, g/100g; W_1 为脱脂后样品脂肪体积分数, g/100g。

1.3.4 蛋白损失率的测定

采用 Bradford 考马斯亮蓝法测定脱脂处理后模拟基质中蛋白质的损失率。本研究将 BSA 设置为标准蛋白,配制不同浓度的标准蛋白溶液。向 96 孔酶标板中每孔加入 20 μ L 待测样品和 200 μ L 考马斯亮蓝 G-250 溶液混匀,避光放置 10 min,于 595 nm 处测定其吸光度值,绘制蛋白质浓度标准曲线,从而计算出样液的蛋白质浓度,蛋白损失率的计算见式(2)。

$$\text{蛋白损失率} = \left(1 - \frac{M_1}{M_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, M_0 为脱脂处理前蛋白浓度, mg/mL; M_1 为脱脂处理后蛋白浓度, mg/mL。

1.3.5 蛋白质分子质量的测定

采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)对脱脂处理后模拟基质中的蛋白质分子质量进行鉴定分析。分离胶、夹层胶和浓缩胶的浓度分别为,每孔上样 8 μ L。电泳条件设置为:12 mA(浓缩胶)和 24 mA(分离胶)。考马斯亮蓝 R-250 染色 15 min,染色结束用冰醋酸-甲醇溶液进行脱色。

1.3.6 蛋白质结构的测定

1.3.6.1 圆二色谱分析

参考操强等^[15]的研究方法采用圆二色谱仪测定蛋白质的二级结构变化。比色皿厚度为 1 mm,波长范围为 190 ~ 240 nm,速度为 100 nm/min,在室温下,连续吹入氮气条件下检测,样品扫描 3 次取其平均值,通过差减除去空白基线信号值,再使用

Dichroweb 网站计算蛋白二级结构含量。

1.3.6.2 内源性荧光光谱分析

参考 Gao 等^[16]的研究方法采用荧光分光光度计测定蛋白质的三级结构变化。设定荧光分光光度计的条件为:激发波长为 280 nm,发射波长为 300 ~ 450 nm,光步 5 nm,测试时间为 200 ms,狭缝宽度为 5.0 nm,对样品的荧光强度进行扫描。

1.3.6.3 三维荧光分析

采用荧光分光光度计测定蛋白质的高级结构变化。当激发波长范围为 200 ~ 400 nm,发射波长范围为 200 ~ 600 nm 时,两者都以 5 nm 为间距增加,采集荧光信号得到激发发射矩阵荧光光谱,即三维荧光光谱。

1.3.7 蛋白质表面疏水性的测定

本研究以 ANS 荧光探针法测定蛋白质的表面疏水性差异^[17]。室温下以 1:50 的比例向样品中加入 5 mmol/L ANS 溶液,避光反应 1 h 后使用荧光分光光度计检测荧光强度,激发波长为 390 nm,发射波长范围为 400 ~ 600 nm,扫描速度为 1 200 nm/min,狭缝宽度为 5.0 nm。

1.3.8 脂肪分布的测定

使用激光共聚焦显微镜观察测定模拟基质的脂肪分布,参考谢安琪等^[18]的方法并进行一定的修改。取 1 mL 样品加入 20 μ L 质量浓度为 0.01 g/L 的尼罗红染料并混合均匀,避光放置 30 min。将样品均匀涂布于载玻片上并固定在激光共聚焦显微镜载物台上,20 倍物镜,设置激发波长为 488 nm,并采集荧光图像。

1.3.9 模拟基质粒度的测定

参考 Xie 等^[19]的研究方法,采用动静态光散射表征模拟基质的平均粒径大小并比较粒径分布的情况。

1.3.10 模拟基质微观结构的测定

参考步营等^[20]的方法测定模拟基质的微观结构。沾取少量脱脂前后的样品粉末均匀涂布于导电胶上,并将导电胶贴在置物台上,将附有样品的置物台放在冷场发射扫描电镜下进行观察,电压设置为 5 kV。

1.3.11 牛乳过敏原浓度的测定

参考本团队先前建立的间接 ELISA 方法^[21]并进行一定的修改,测定模拟基质中牛乳过敏原的浓度。分别以 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、酪蛋白和稀释一定倍数的待测样品作为包被抗原,兔多克

隆抗体作为一抗,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔 IgG 作为二抗。 α -乳白蛋白:将 α -乳白蛋白用 PBS 梯度稀释至 0.031 25、0.062 5、0.125、0.25、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行抗原包被,兔抗 α -乳白蛋白血清稀释倍数为 1:160 000,绘制 α -乳白蛋白的定量标准曲线。 β -乳球蛋白:将 β -乳球蛋白用 PBS 梯度稀释至 0.156 25、0.312 5、0.625、1.25、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行抗原包被,兔抗 β -乳球蛋白血清稀释倍数为 1:160 000。酪蛋白:将酪蛋白用 PBS 梯度稀释至 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行抗原包被,兔抗酪蛋白血清稀释倍数为 1:10 000。

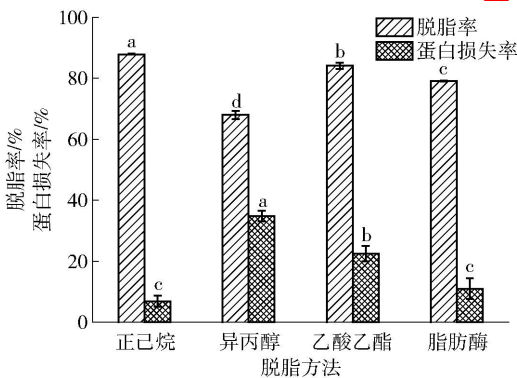
1.4 数据处理

每组实验重复 3 次并取平均值,采用 SPSS 24.0 进行差异显著性分析,认为 $P < 0.05$ 时为具有显著性差异,采用 Origin 9.0 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 脱脂方法对模拟基质脱脂率和蛋白损失率的影响

不同脱脂方法处理后样品的脱脂率和蛋白损失率见图 1。由图 1 可知,4 种脱脂方法的脱脂率由优到差依次为正己烷、乙酸乙酯、脂肪酶、异丙醇。正己烷和乙酸乙酯的脱脂率均超过 80%,其中正己烷脱脂率高达 87.87%。此外,脱脂处理后模拟基质中的蛋白质均出现不同程度的损失,其中正己烷对蛋白质含量的影响最小,损失率为 6.86%,异丙醇影响最大,损失率超过 30%。



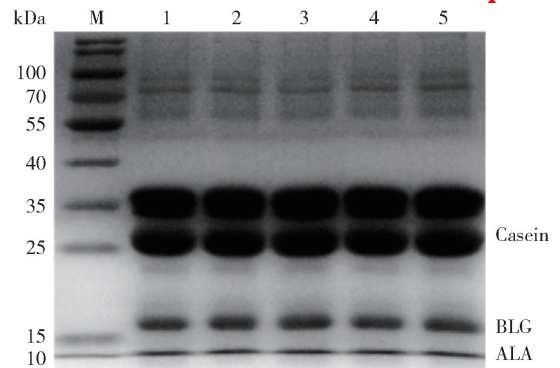
对照组为未经脱脂处理的巧克力样品,不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图 1 脱脂方法处理后模拟基质的脱脂率和蛋白损失率

Fig. 1 Degreasing rate and protein loss rate of simulated matrix treated with different degreasing methods

2.2 脱脂方法对模拟基质中蛋白质分子质量的影响

不同脱脂方法处理后模拟基质中乳蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果见图 2。由图 2 可知,样品主要存在 4 条蛋白条带,分子质量依次位于 35、25、15、10 kDa 左右。这与预测的结果一致,巧克力中只含有乳蛋白,在 25 ~ 35 kDa 之间的是牛乳中含量最高的酪蛋白,分别位于 15 kDa 和 10 kDa 附近上方的是分子质量为 18.3 kDa 的 β -乳球蛋白和 14.2 kDa 的 α -乳白蛋白。脱脂前后样品中蛋白的组分和分子质量大小无显著变化,表明 4 种脱脂处理方法对样品中主要的牛乳过敏原蛋白的一级结构。



对照组为未经脱脂处理的巧克力样品。泳道 M:蛋白 Marker;泳道 1:对照组;泳道 2~5:正己烷组、异丙醇组、乙酸乙酯组和脂肪酶组。Casein,酪蛋白;ALA: α -乳白蛋白;BLG: β -乳球蛋白。

图 2 脱脂方法处理后模拟基质中蛋白质的 SDS-PAGE

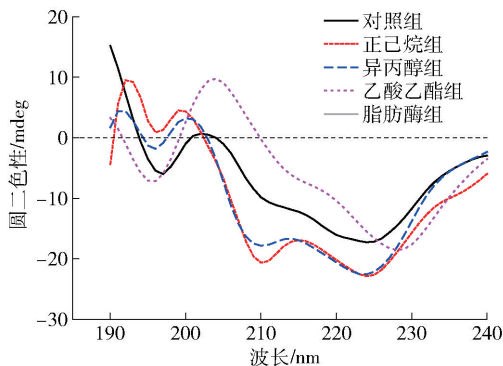
Fig. 2 SDS-PAGE of proteins in simulated matrix treated with different degreasing methods

2.3 脱脂方法对模拟基质中蛋白质结构的影响

2.3.1 圆二色谱

圆二色性光谱广泛应用于蛋白质构象研究领域。对不同脱脂方法处理前后蛋白质的圆二色性光谱进行分析,结果见图 3 和表 1。由图 3 和表 1 可知,在 190 ~ 240 nm 的波长范围内,190 nm 处的正峰和 208、220 nm 处的负峰是 α -螺旋的特征峰,而 195 nm 左右的正峰和 217 nm 左右的负峰是 β -折叠的特征峰。整体来看,脱脂处理改变了蛋白质的二级结构。和对照组相比,溶剂法脱脂处理后样品蛋白的 α -螺旋含量均降低,正己烷、异丙醇和乙酸乙酯组分别降低了 56.8%、88.1% 和 34.7%。异丙醇组 β -转角含量降低 41.8%, β -折叠和无规则卷曲含量分别升高了 2.3 和 1.5 倍。研究发现,氢键与二级结构含量的变化密切相关^[22],脱脂溶剂中大多含有羟基、酯键、大量的氧原子和氢原子,可能与蛋白质发生相互作用从而改变了二级结构中氢键的顺序

和排列模式,出现了大量反平行 β -折叠聚集体^[23]。此外,正己烷组 β -转角含量升高了 1.6 倍, β -折叠含量降低了 31.6%,无规则卷曲含量降低了 92.4%。可能是因为 α -螺旋结构被破坏,脯氨酸更加暴露于蛋白表面,促进了 β -转角的形成^[24]。乙酸乙酯组除 α -螺旋降低外,其他结构含量均略微升高,但整体而言变化最小。脂肪酶处理后 α -螺旋含量升高 36%, β -转角含量降低 82.1%。这可能是由于脂肪酶处理后基质中与蛋白质结合的脂肪被去除,部分疏水区域暴露与蛋白质表面,由于疏水相互作用而出现蛋白质聚集。



对照组为未经脱脂处理的巧克力样品。

图 3 脱脂方法处理后模拟基质中蛋白质的圆二色谱

Fig. 3 Circular dichroism spectrum of proteins in simulated matrix treated with different degreasing methods

表 1 脱脂方法处理后模拟基质中蛋白质的二级结构含量

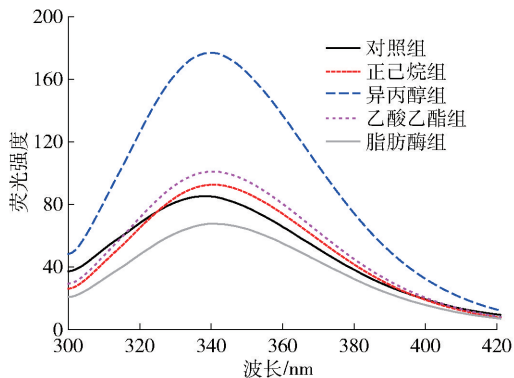
Tab. 1 Secondary structure contents of proteins in simulated matrix treated with different degreasing methods

结构/%	对照	正己烷	异丙醇	乙酸乙酯	脂肪酶
α -螺旋	46.1	19.9	5.5	30.1	62.7
β -折叠	19.6	13.4	66.5	36.6	22.9
β -转角	25.1	65.9	14.6	19.1	4.5
无规则卷曲	9.3	0.7	23.4	14.2	10

2.3.2 内源性荧光光谱

蛋白质的 3 种荧光氨基酸成分为色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸,色氨酸含量最多,酪氨酸的荧光通常会被淬灭,苯丙氨酸对蛋白质固有荧光的贡献由于其吸收率过低而通常忽略不计。因此,色氨酸通常被认为是蛋白质内源荧光光谱中 340 nm 处吸收峰的主要来源^[25]。不同脱脂方法处理后蛋白质的内源性荧光光谱结果见图 4。由图 4 可知,3 种溶剂脱脂后模拟基质中蛋白质的内源性荧光强度均有不同程度的增强,而脂肪酶组的荧光强度略微降低。荧

光增强可能是因为脂肪被脱除后蛋白质出现空穴结构,三级结构更为松散,色氨酸微环境的极性降低。脂肪酶因为特异性较强,相对来说对蛋白质的结构影响最小,但荧光强度有略微降低,可能是因为在脂肪酶脱脂之后,蛋白质结构先部分展开,但紧接着蛋白质之间产生新的疏水键,导致色氨酸和酪氨酸残基被进一步掩蔽。



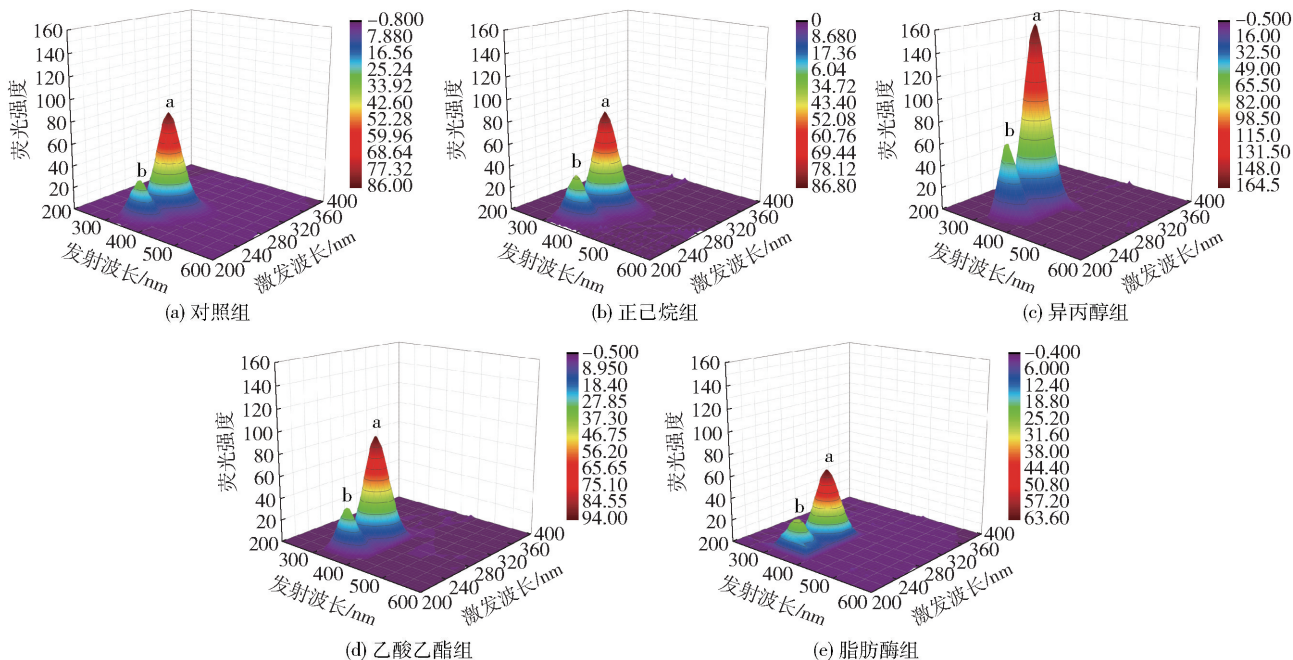
对照组为未经脱脂处理的巧克力样品。

图 4 脱脂方法处理后模拟基质中蛋白质的内源性荧光光谱

Fig. 4 Intrinsic fluorescence spectrum of proteins in simulated matrix treated with different degreasing methods

2.3.4 三维荧光

不同脱脂方法处理后蛋白质的三维荧光光谱结果见图 5 和表 2。由图 5 和表 2 可知,三维荧光图谱的结果与内源性荧光光谱基本一致。样品出现了两个明显的蛋白荧光特征峰,峰 a ($\lambda_{ex} = 280$ nm) 和峰 b ($\lambda_{ex} = 235$ nm) 分别是由酪氨酸、色氨酸残基的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和多肽链骨架的 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的特征峰,此外,色氨酸的吡咯基团被认为是蛋白质中约 280 nm 处紫外吸收最主要的来源,它们可以表征蛋白质的二级和三级结构^[26]。结果表明:脱脂处理前后峰 a 位置无变化,峰 b 从原来的 ($\lambda_{ex} = 230$ nm、 $\lambda_{em} = 335$ nm) 红移至 ($\lambda_{ex} = 235$ nm、 $\lambda_{em} = 335$ nm 或 $\lambda_{ex} = 235$ nm、 $\lambda_{em} = 340$ nm)。溶剂法脱脂处理后模拟基质中乳蛋白的三维荧光强度均升高,其中正己烷组对蛋白荧光强度影响最小,其次是乙酸乙酯。荧光增强可归因于脱脂溶剂中的羟基自由基或氧自由基具有优异的质子亲和能力,可能与芳香环中的氢质子结合,促使更多吡咯基团暴露^[27]。相比于对照组,异丙醇组的峰 a 荧光强度升高了 91.16%,同时峰 b 也升高了 102.47%。异丙醇带有羟基,易与蛋白质二级结构中的氨基酸残基作用^[28],破坏原有的 α 螺旋、 β 折叠含量和分布情况,使得蛋白质空间



对照组为未经脱脂处理的巧克力样品。

图5 脱脂方法处理后模拟基质中蛋白质的三维荧光光谱

Fig. 5 Three-dimensional fluorescence spectra of proteins in simulated matrix treated with different degreasing methods

结构整体呈现解折叠和展开的趋势,这与圆二色性光谱的结果一致。脂肪酶因为特异性较强,相对来说对蛋白质的结构影响较小,但荧光强度有略微降低,可能是因为在脂肪酶脱脂之后,原脂肪与蛋白质结合的位置形成了部分空穴结构,促使蛋白质分子之间产生一定的疏水相互作用而部分聚集。

表2 脱脂方法处理后模拟基质中蛋白质的三维荧光光谱峰位置和峰强度

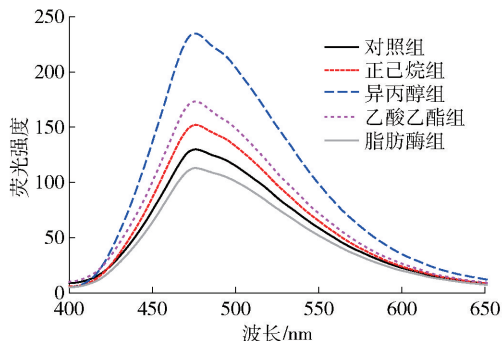
Tab.2 Peak position and peak intensity of three-dimensional fluorescence spectrum of proteins in simulated matrix treated with different degreasing methods

处理方式	峰a		峰b			
	峰位置	强度	峰位置	强度	变化/	变化/
	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ nm/nm	F_0	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ nm/nm	F_0	%	%
对照组	280/340	85.95	230/335	32.4	—	—
正己烷组	280/340	86.63	235/335	37.24	0.79	14.94
异丙醇组	280/340	164.3	235/340	65.6	91.16	102.47
乙酸乙酯组	280/340	93.9	235/335	36.67	9.25	13.18
脂肪酶组	280/340	63.49	235/340	27.11	26.13	16.33

2.4 脱脂方法对模拟基质中蛋白质表面疏水性的影响

ANS 可与蛋白质结构中的疏水位点结合,因而测量蛋白质的表面疏水性可采用此法^[29]。不同脱

脂方法处理后蛋白质的 ANS 荧光光谱结果见图 6。由图 6 可知,除脂肪酶组外,溶剂脱脂均使得蛋白的表面疏水性增强。其中,异丙醇组疏水性最强,脂肪酶组最弱且低于对照组。通常来说,蛋白质的带电基团和极性氨基酸残基通常位于外部,而非极性部分主要位于蛋白质折叠结构的内部^[30]。根据圆二色谱和内源性荧光光谱的结果可知,溶剂脱脂处理使得模拟基质中蛋白质结构发生了不同程度的解折叠和展开,这可能使得原本包裹在内部的疏水性空腔暴露于外部,从而为 ANS 提供了更多的结合位点。研究表明,在高脂肪食品中脂肪与蛋白质接触



对照组为未经脱脂处理的巧克力样品。

图6 脱脂方法处理后模拟基质中蛋白质的 ANS 荧光光谱
Fig.6 ANS fluorescence spectrum of proteins in simulated matrix treated with different degreasing methods

紧密,脂肪在水解过程中产生的超氧化物自由基会促使蛋白质也发生氧化,而蛋白质氧化会引发氨基酸侧链的碳化^[31]。因此,脂肪酶的水解作用可能使得乳蛋白表明疏水性侧链基团改变,导致 ANS 结合位点减少。

2.5 脱脂方法对模拟基质脂肪分布的影响

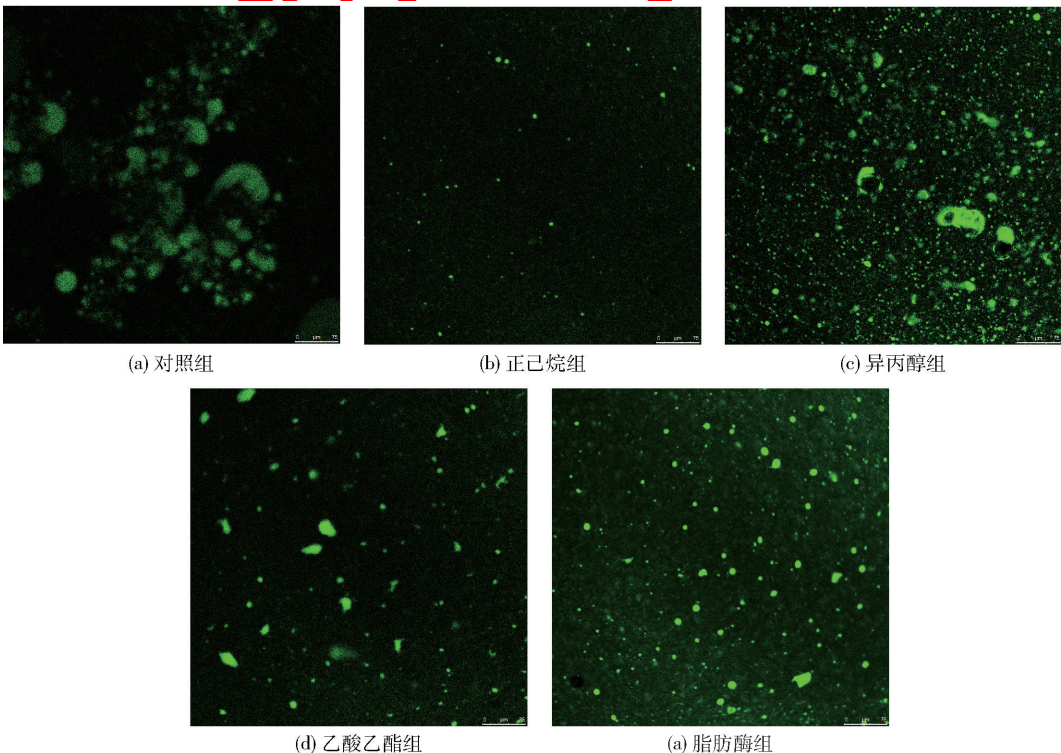
脂肪用 0.1% 尼罗红染色,并将信号设置为绿色,可以清晰直观地看到模拟基质中绿色脂肪液滴的大小和分布情况。不同脱脂方法处理前后模拟基质的共聚焦显微镜观察结果见图 7。由图 7 可知,未经处理的对照组中存在大量脂肪,脂肪液滴直径较大并呈现出大面积的聚集现象。经过不同脱脂方法处理后,脂肪液滴表现出不同程度的减小,整体分布由大量聚集变得更为分散和均匀。其中正己烷组的液滴最小且数量最少,其次是乙酸乙酯和脂肪酶。与脱脂率的结果一致,异丙醇组虽然未见明显的大脂肪块,但液滴分布仍然较为密集,去除的脂肪在 4 种脱脂方法中最少。根据相似相溶原理,结构相似的化合物更容易互相混溶,可能是因为异丙醇的极性比正己烷和乙酸乙酯的更强,脂肪在强极性环境中溶解性较差。相反,正己烷的极性最弱,更有利于脂肪的溶解和去除。

2.6 脱脂方法对模拟基质粒度的影响

脱脂处理后模拟基质的粒度测定结果见图 8。由图 8 可知,从粒度分布情况来看,对照组颗粒大小均一且呈现单峰分布,正己烷组和乙酸乙酯组的变化较小,同样呈现单峰分布。异丙醇组和脂肪酶组由单峰分布变为双峰分布,说明模拟基质中产生了大颗粒聚集体。从平均粒径来看,正己烷组和乙酸乙酯组的粒径略微降低,这可能是因为脱脂处理后脂肪分子从蛋白质-脂肪复合物上脱去,溶液体系粒径随之降低。相反的是,异丙醇组粒径显著升高,由 297.9 nm 升高至 445.1 nm,可能是因为异丙醇显著改变了蛋白质的空间结构,使其过度变性,形成了更大的聚集体。同时,异丙醇组的脱脂率最低,体系内残留的脂肪易与蛋白质的疏水侧链重新结合形成新的复合物。

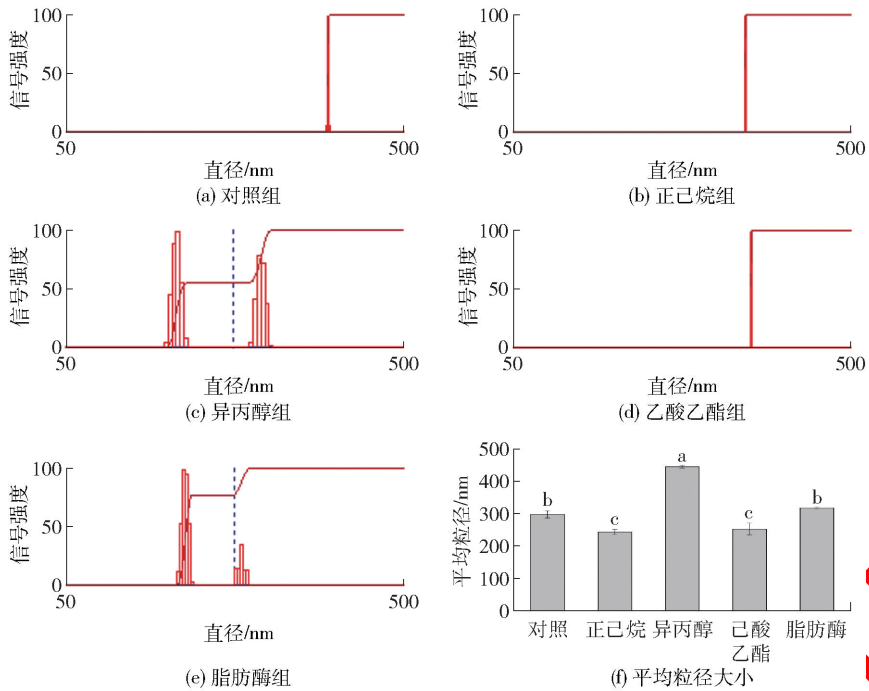
2.7 脱脂方法对模拟基质微观结构的影响

在放大倍数为 5 000 倍下使用扫描电镜观察不同方法脱脂前后模拟基质的微观结构变化,结果见图 9。由图 9 可知,脱脂处理后表面形貌发生了明显的改变。由图 9(a)可知,未处理的模拟基质表面光滑,内部结构紧凑,视野内可见大范围的致密平滑结构,可能是因为基质中的脂肪与蛋白质发生相互



对照组为未经脱脂处理的巧克力样品。

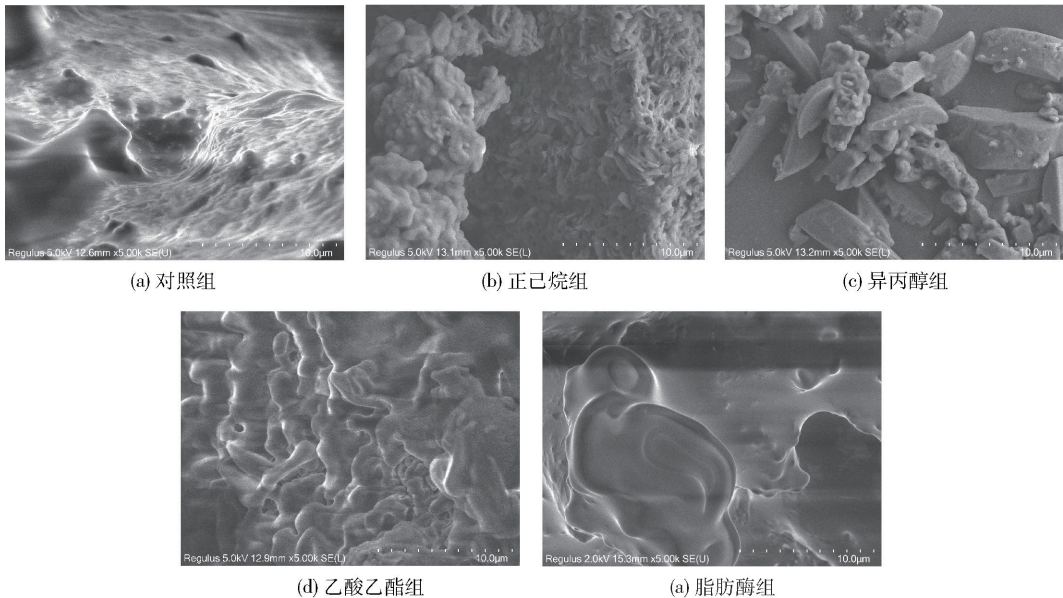
图 7 激光共聚焦显微镜下脱脂处理后模拟基质



对照组为未经脱脂处理的巧克力样品;图 8(a)至图 8(e)为不同脱脂方法处理后模拟基质的粒径大小分布情况,图 8(f)为平均粒径大小;不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图 8 脱脂处理后模拟基质的粒度

Fig. 8 Particle size of simulated matrix treated with different degreasing methods



对照组为未经脱脂处理的巧克力样品。

图 9 脱脂处理后模拟基质的扫描电镜照片

Fig. 9 Scanning electron microscopic images of simulated matrix treated with different degreasing methods

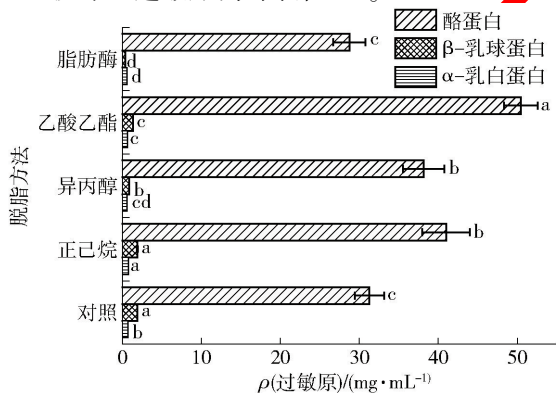
作用,致使颗粒之间大量聚集黏附。由图 9(b)可知,正己烷脱脂处理后基质呈现出了多孔疏松的立体网状结构,这是由于脂肪分子被脱去后基质颗粒粘连情况明显减少,蛋白质由大量聚集转变为均一

分散的状态,因而显示出更为清晰的骨架。乙酸乙酯脱脂后基质表面出现明显的裂解,产生明显的空腔,但其蛋白质微观结构不均且仍存在少量结块,这可能是由于乙酸乙酯破坏了部分蛋白质结构,导

致其整体骨架结构不明显^[32]。脂肪酶脱脂后基质表面虽然出现了少许直径较大的孔洞,但仍可看出其余部分存在明显的光滑平面和块状堆积。异丙醇组呈现出不规则大小的结块,一方面是因为脂肪残留较多,另一方面是因为异丙醇对蛋白质结构破坏最为显著,蛋白质之间发生了聚集现象,基质重新形成平滑致密的结构^[14]。

2.8 脱脂方法对牛乳过敏原提取浓度的影响

利用间接 ELISA 获得模拟基质中 3 种主要牛乳过敏原的浓度,结果见图 10。由图 10 可知,溶剂脱脂处理整体提高了模拟基质中过敏原的提取浓度。然而,在脂肪酶组中表现为降低的趋势,不利于过敏原的提取和定量检测。牛乳中蛋白质的含量为 3.0%~3.5%,其中酪蛋白占 80%,是牛乳中含量最高的过敏原。除脂肪酶之外,其他 3 种溶剂脱脂均提高了酪蛋白的提取率。其中,乙酸乙酯组的过敏原浓度最高,由对照组的 31.3 mg/mL 升高至 50.4 mg/mL,提升了 61.53%。尽管该方法整体的蛋白损失率高于正己烷,但结果显示它更适合于酪蛋白的提取。对于 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白,正己烷脱脂后两者的浓度最高,分别为 0.73 mg/mL 和 1.89 mg/mL。可能是因为正己烷的脱脂效果最佳,消除了脂肪基质对过敏原提取的阻碍作用。同时,该方法下的蛋白质损失量也最少,说明过敏原在该溶剂中的溶解度低,可以较好的保留下来。然而,异丙醇和乙酸乙酯处理后 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的浓度均有所降低,可能是因为它们对这两种过敏原蛋白结构影响较为显著,从而使得表位更为隐蔽,甚至破坏了过敏原内部表位^[33]。



对照组为未经脱脂处理的巧克力样品;不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图 10 脱脂前后模拟基质中主要牛乳过敏原的浓度

Fig. 10 Main milk allergens concentration in simulated matrix treated with different degreasing methods

3 结论

通过与过敏原发生相互作用,复杂食物基质中的脂肪会影响过敏原的提取和抗原抗体反应从而影响过敏原检测结果。本研究首次提出通过脱脂处理提升高脂肪复杂食物基质中牛乳过敏原检测前处理方法,利用正己烷、异丙醇、乙酸乙酯和脂肪酶对含有牛乳过敏原的高脂肪巧克力进行脱脂处理,发现脂肪酶组效果不理想,而脱脂剂可以提高牛乳过敏原的溶出率。正己烷的脱脂率最高且蛋白损失率最低,分别为 87.87% 和 6.86%。相比于未脱脂样品,酪蛋白在乙酸乙酯组中的提取率最高并提升了 61.53%。 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白在正己烷组中的提取浓度最高,分别为 0.73 mg/mL 和 1.89 mg/mL。并且正己烷和乙酸乙酯对过敏原蛋白的结构破坏较小,可以较好的维持过敏原的致敏性。为了进一步优化高脂肪型食物基质中牛乳过敏原检测的前处理方法,后续将对脱脂处理后过敏原的提取体系进行研究。此外,还存在高淀粉和高蛋白等多个类型的复杂食物基质,未来应针对不同类型的复杂食物基质建立相应的研究方案,为获得更为完善的牛乳过敏原检测前处理方法提供理论依据。

参考文献:

- [1] SAKIHARA T, OTSUJI K, ARAKAKI Y, et al. Randomized trial of early infant formula introduction to prevent cow's milk allergy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2021, 147(1): 224-232.
- [2] VANDENPLAS Y, BROUGH H A, FIOCCCHI A, et al. Current guidelines and future strategies for the management of cow's milk allergy[J]. *Journal of Asthma and Allergy*, 2021, 14: 1243-1256.
- [3] SEGURA-GIL I, GALAN-MALO P, MATA L, et al. Influence of different extraction conditions on the detection of glycinin and β -conglycinin in model processed foods by ELISA[J]. *Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2020, 37(7): 1087-1098.
- [4] VAN VLIERBERGHE K, GAVAGE M, DIEU M, et al. Selection of universal peptide biomarkers for the detection of the allergen hazelnut in food through a comprehensive, high resolution mass spectrometric (HRMS) based approach[J]. *Food Chemistry*, 2020, 309: 125679.
- [5] KHUDA S E, JACKSON L S, FU T J, et al. Effects of

- processing on the recovery of food allergens from a model dark chocolate matrix[J]. *Food Chemistry*, 2015, 168: 580–587.
- [6] 刘晋源, 杨蕴嘉, 姚凯, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定黑巧克力中4种牛奶过敏原蛋白[J]. *卫生研究*, 2022, 51(2): 286–292.
- LIU J Y, YANG Y J, YAO K, et al. Determination of four milk allergen proteins in dark chocolates by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2022, 51(2): 286–292.
- [7] 张逸婧, 刘永祥, 陈思远, 等. 脱脂溶剂对大豆分离蛋白、7S和11S球蛋白提取率及纯度的影响[J]. *中国油脂*, 2016, 41(2): 30–33.
- ZHANG Y J, LIU Y X, CHEN S Y, et al. Effect of defatting solvents on extraction rate and purity of soybean protein isolate, 7S and 11S globulins[J]. *China Oils and Fats*, 2016, 41(2): 30–33.
- [8] 赵文宇, 徐璐, 祁立波, 等. 鲟鱼肌肉脱脂工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(12): 102–107.
- ZHAO W Y, XU L, QI L B, et al. Study on the degreasing processing technology of sturgeon muscle[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(12): 102–107.
- [9] TIR R, DUTTA P C, BADIHAH-HADI, AHMED A Y. Effect of the extraction solvent polarity on the sesame seeds oil composition[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, 114(12): 1427–1438.
- [10] MEHTA A, GULERIA S, SHARMA R, et al. The lipases and their applications with emphasis on food industry [M]//*Microbial Biotechnology in Food and Health*. Amsterdam: Elsevier, 2021: 143–164.
- [11] 崔岩岩, 庞丽珍, 郭毓昕, 等. 不同脱脂方法对椰子分离蛋白结构与理化性质影响研究[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(7): 57–65.
- CUI Y Y, PANG L Z, GUO Y X, et al. Effects of different oil extraction methods on structure and physico-chemical properties of coconut protein isolate[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2020, 35(7): 57–65.
- [12] 耿勤. 脱脂工艺对米渣蛋白结构、功能性质影响及谷蛋白与亚油酸的相互作用[D]. 南昌: 南昌大学, 2017: 30–34.
- GENG Q. Effects of degreasing on structure and functional properties of rice dreg protein and the interaction between gluten and linoleic acid[D]. Nanchang: Nanchang University, 2017: 30–34.
- [13] NGUYEN A V, LEE D, WILLIAMS K M, et al. Effectiveness of antibody specific for heat-processed milk proteins and incurred calibrants for ELISA-based quantification of milk in dark chocolate matrices[J]. *Food Control*, 2021, 123: 107760.
- [14] 罗舜菁, 耿勤, 颜小燕, 等. 不同脱脂条件下米渣蛋白的结构及功能性质[J]. *食品科学*, 2017, 38(5): 202–207.
- LUO S J, GENG Q, YAN X Y, et al. Structural and functional properties of rice dreg protein prepared by different degreasing methods[J]. *Food Science*, 2017, 38(5): 202–207.
- [15] 操强, 胡巍, 高金燕, 等. 卵白蛋白-白藜芦醇相互作用机理及其对卵白蛋白的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 31–37.
- CAO Q, HU W, GAO J Y, et al. Interaction mechanism of ovalbumin with resveratrol and its effect on ovalbumin[J]. *Food Science*, 2021, 42(4): 31–37.
- [16] GAO J Y, SHI Q, YE Y, et al. Effects of guar gum or xanthan gum addition in conjunction with pasteurization on liquid egg whites[J]. *Food Chemistry*, 2022, 383: 132378.
- [17] WANG W, LI J S, YAN L J, et al. Effect of oxidization and chitosan on the surface activity of soy protein isolate[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 151: 700–706.
- [18] 谢安琪, 邓苏梦, 左白露, 等. 面筋蛋白粒子-黄原胶 Pickering 乳液的制备及其表征[J]. *食品科学*, 2019, 40(16): 38–44.
- XIE A Q, DENG S M, ZUO B L, et al. Preparation and characterization of wheat gluten nanoparticles-xanthan gum Pickering emulsions[J]. *Food Science*, 2019, 40(16): 38–44.
- [19] XIE G Y, ZHAN Z X, YE Y, et al. Hybrid RCA-DLS assay combined with aPCR for sensitive *Salmonella enteritidis* detection[J]. *Analytical Biochemistry*, 2022, 646: 114647.
- [20] 步莹, 何玮, 胡显杰, 等. 超高压对蓝蛤酶解液风味及其蛋白质结构的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(1): 104–116.
- BU Y, HE W, HU X J, et al. Effects of ultra-high pressure on flavor and protein structure of enzymatic hydrolysates of *Aloididae aloidii*[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(1): 104–116.
- [21] LI X, BAI H, WU Y Y, et al. Structural analysis and allergenicity assessment of an enzymatically cross-linked bovine α -lactalbumin polymer[J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 628–639.
- [22] 桂俊, 陆啟玉. 阴离子对面条水分分布、蛋白二级结

- 构和微观结构的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(6): 159–165.
- GUI J, LU Q Y. Effects of anions on water distribution, protein secondary structure and microstructure of noodles [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(6): 159–165.
- [23] LI M, SUN Q J, HAN C W, et al. Comparative study of the quality characteristics of fresh noodles with regular salt and alkali and the underlying mechanisms[J]. Food Chemistry, 2018, 246: 335–342.
- [24] 刘爱成, 李墨翰, 张正翰, 等. 牛乳、驴乳乳清蛋白二级结构及其功能对比研究[J]. 乳业科学与技术, 2021, 44(3): 6–11.
- LIU A C, LI M H, ZHANG Z H, et al. Comparative study on secondary structure and function of whey protein in bovine milk and donkey milk [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2021, 44(3): 6–11.
- [25] GHISAIDOOBE A B T, CHUNG S J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(12): 22518–22538.
- [26] CHENG W W, MA J L, WANG S J, et al. Interaction mechanism between resveratrol and ovalbumin based on fluorescence spectroscopy and molecular dynamic simulation[J]. LWT, 2021, 146: 111455.
- [27] 王俊霞, 于锋, 刘静, 等. 羟基负离子与苯分子的反应机理[J]. 物理化学学报, 2008, 24(8): 1393–1399.
- WANG J X, YU F, LIU J, et al. Reaction mechanism of hydroxyl anion with benzene[J]. Acta Physico-Chimica Sinica, 2008, 24(8): 1393–1399.
- [28] ZHANG Z W, LIU P P, DENG X R, et al. Effects of hydroxyl radical oxidation on myofibrillar protein and its susceptibility to μ -calpain proteolysis[J]. LWT, 2021, 137: 110453.
- [29] BARROS A E B, CARVALHO F A O, ALVES F R, et al. Denaturant effects on HbGp hemoglobin as monitored by 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) probe [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74: 327–336.
- [30] MAKARSKA-BIALOKOZ M. Interactions of hemin with bovine serum albumin and human hemoglobins: a fluorescence quenching study [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 193: 23–32.
- [31] 苏瑞华. 脂肪酶对鲢鱼鱼糜凝胶特性的影响及机制[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 2–5.
- SU R H. Effects and Mechanism of Lipase on Gel Properties of Surimi Gels from Catfish [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019: 2–5.
- [32] 付珊珊. 米糠提取物的乳化特性及其应用研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2021: 20–21.
- FU S S. Study on the Emulsification Characteristics and Application of Rice Bran Extract [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2021: 20–21.
- [33] LI T H, BU G H, XI G P. Effects of heat treatment on the antigenicity, antigen epitopes, and structural properties of β -conglycinin[J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128962.

Effects of Different Degreasing Methods on Cow's Milk Allergens Detection in High-Fat Complex Food Matrix

HU Wei^{1,2,3}, YANG Fan^{1,2,3}, XIONG Ziyi^{1,2,3}, GAO Jinyan^{2,3}, CHEN Hongbing^{1,3,4}, LI Xin^{1,2,3,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. College of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3. Jiangxi Province Key Laboratory of Food Allergy, Nanchang 330047, China;

4. Sino German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: As a common food constituent, fat could interact with cow's milk allergens, and thereby affecting the extraction effect and detection accuracy of allergens. However, research on degreasing methods for high-fat complex matrices was rarely reported. Chocolates containing cow's milk allergens were used to simulate the high-fat complex matrix and degreased by n-hexane, isopropanol, ethyl acetate

and lipase. The degreasing rate and protein loss rate were determined, the changes of protein structure, particle size, fat distribution and microstructure were compared, and the concentration of major milk allergens extracted from simulated matrix before and after degreasing were determined by indirect ELISA. The results showed that the sample treated with n-hexane had the highest degreasing rate (87.87%), and the lowest protein loss rate (6.86%). Degreasing would change the spatial structure of proteins, with the overall structure changing from compact to loose, and there was no obvious changes in protein in the n-hexane and ethyl acetate treatment groups. The particle size of protein decreased slightly after degreasing, but the isopropanol treatment caused the protein to aggregate into larger particles, and the particle size increased from 297.9 nm to 445.1 nm. After degreasing by n-hexane and ethyl acetate, the fat distribution in simulated matrix was more uniform and the fat droplets became smaller. The microstructure of the simulated matrix changed from a dense and smooth clump to an incompact and porous structure, while the isopropanol and lipase groups still showed partial agglomeration. The indirect ELISA results showed that the extraction rate of casein in the ethyl acetate group increased by 61.53%, and the concentrations of α -lactalbumin and β -lactoglobulin were the highest in the n-hexane group, which were 0.73 mg/mL and 1.89 mg/mL, respectively. N-hexane degreasing treatments could significantly improve the extraction effect of cow's milk allergens in high-fat complex matrix, hoping that the results could provide reference for the accurate detection of allergens in high-fat complex matrix foods.

Keywords: allergen detection; complex food matrix; cow's milk allergen; degreasing treatment; high-fat food

(责任编辑:李 宁)

Pre-Publishing