

doi:10.12301/spxb202300045

文章编号:2095-6002(2024)03-0081-11

引用格式:李红娟,李梦凡,曹洪宇,等.羊乳清蛋白部分和深度水解工艺、水解物致敏性及肽谱分析[J].食品科学技术学报,2024,42(3):81-91.



LI Hongjuan, LI Mengfan, CAO Hongyu, et al. Partial and extensive hydrolysis process, hydrolysate allergenicity and peptide profile of goat whey protein[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024,42(3):81-91.

羊乳清蛋白部分和深度水解工艺、水解物致敏性及肽谱分析

李红娟¹, 李梦凡¹, 曹洪宇¹, 刘雷², 牟善波², 于景华^{1,*}

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院/食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457;

2. 宜品乳业(青岛)集团有限公司, 山东 青岛 266600)

摘要: 利用羊乳清蛋白制备低致敏性配料是目前乳品工业的研究热点。乳清蛋白是乳中主要的蛋白质之一,也是引起婴幼儿过敏反应的主要成分,将蛋白质水解为小分子肽是降低其致敏性的有效方法。以山羊乳清蛋白为原料,研究了部分水解乳清蛋白和深度水解乳清蛋白的水解工艺和水解物特性(水解度、分子质量分布和 β -乳球蛋白抗原性),并利用液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)比较了部分水解和深度水解工艺中过敏表位酶切位点的差异。研究表明,中性蛋白酶和碱性蛋白酶对羊乳清蛋白水解效果较好,其中碱性蛋白酶的水解度最高,达21.26%。经电泳分析,单酶水解后的产物中仍存在大分子多肽链,深度水解工艺需要复合酶水解。在酶底比为4000 U/g时,使用碱性蛋白酶在pH值为10.0、温度为55℃条件下水解羊乳清蛋白1.0 h,部分水解产物的水解度为12.31%,分子质量在5 kDa以下的多肽占95.18%, β -乳球蛋白抗原性下降率为9.40%。中性蛋白酶和碱性蛋白酶的质量比为1:1,酶底比为6000 U/g,在pH值为8.5、温度为50℃条件下,水解羊乳清蛋白3.0 h,深度水解产物的水解度为35.58%,分子质量低于3 kDa的多肽为97.26%, β -乳球蛋白抗原性下降率为40.97%。部分水解和深度水解均能破坏 β -乳球蛋白的大部分过敏表位,但相较于部分水解,深度水解能更大程度地降低乳清蛋白的致敏性。研究旨在为低致敏性羊水解乳清蛋白的生产提供一定的理论参考。

关键词: 羊乳清蛋白; 水解; 分子质量分布; 水解度; 致敏性

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

乳清蛋白约占母乳蛋白质总质量的60%,是母乳中主要的蛋白质,也是婴幼儿配方奶粉中重要的配料之一。婴幼儿配方奶粉中的乳清蛋白配料主要来源于牛乳及羊乳。通过对比母乳和牛、羊乳蛋白质的成分可知,母乳乳清蛋白的质量比为0.69~0.83 g/100g,牛乳乳清蛋白的质量比为0.55~

0.70 g/100g,羊乳乳清蛋白的质量比则高达1.02 g/100g,羊乳中乳清蛋白的含量更为丰富^[1]。食用配方奶粉的新生儿和儿童有1.0%~7.5%患乳蛋白过敏症,且可能会持续到成年并加重^[2]。牛乳、山羊乳和绵羊乳的乳清蛋白成分相似,主要含有 β -乳球蛋白(β -Lg)和 α -乳白蛋白(α -La),同时这两

收稿日期:2023-01-29

基金项目:天津市科技计划项目(232YCGSN00600)。

Foundation: Science and Technology Planning Project of Tianjin(232YCGSN00600)。

第一作者:李红娟,女,副教授,博士,主要从事乳品科学方面的研究。

*通信作者:于景华,男,教授,博士,主要从事乳品科学方面的研究。

种蛋白也是乳制品中主要的过敏原^[3]。多种哺乳动物的乳汁中均可以检测到 β -Lg的存在,但母乳中几乎不含 β -Lg^[4]。

目前,缓解食物过敏最有效的方法是严格规避过敏原,即避免食用乳制品,但这种方式可能会导致机体营养缺乏。为了降低或消除乳制品的过敏性,可将致敏蛋白原进行改性。降低蛋白质致敏性的传统食品加工方法有加热、发酵、高压和酶水解。 β -Lg热稳定性较强,研究发现,将山羊奶在100℃下加热30 min, β -Lg的抗原性并未受到热处理的影响^[5]。牛奶经过发酵后其抗原性会下降,但乳酸菌不能完全破坏过敏蛋白上免疫球蛋白E(IgE)的结合表位^[6-8]。高压处理能够使隐藏在蛋白质结构中的免疫球蛋白G(IgG)结合表位暴露出来从而降低 β -Lg的抗原性,但高压对样品处理量较小,不适用于规模化生产^[9]。酶解是降低蛋白质致敏性最有效的处理方法。蛋白酶可以水解蛋白质之间的肽键,将过敏肽段切割成小分子的肽或是氨基酸,破坏引起过敏反应的空间表位和线性表位,以降低乳蛋白的过敏性^[10]。目前已经开发出多种基于蛋白质水解的低致敏性婴儿配方奶粉,根据水解产物的分子质量,可分为部分水解配方和深度水解配方。一般来说,部分水解配方中肽段分子质量主要集中在3~10 kDa;深度水解蛋白要求分子质量小于3 kDa的多肽为95%以上,同时分子质量大于3.5 kDa的多肽不超过5%^[11]。

研究发现,山羊乳蛋白与IgE的结合能力显著低于牛乳蛋白,表明山羊乳具有更低的致敏性^[12-13]。目前,对于牛乳中乳清蛋白的致敏性研究较多,牛乳清蛋白水解工艺及制备方法已经趋近成熟,致敏性肽段分析也较为明确。但对于羊乳清蛋白致敏性研究仅集中在不同乳源理化特性和致敏性的差异对比,对羊乳的水解工艺和致敏性分析的研究较少。近年来,肽组学已被广泛用于肽的鉴定和表征,包括蛋白质过敏原的表征和测定^[14]。Ji等^[15]采用液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)对蛋糕、饼干、华夫饼等食品中3种牛奶蛋白过敏原 β -Lg、 α -La和 α_{s1} -酪蛋白(α_{s1} -CN)进行了鉴定和定量分析。LC-MS/MS的灵敏度高,可对乳蛋白中的过敏原进行鉴定和分析。

本研究拟采用不同的蛋白酶对山羊乳清蛋白进行不同程度的水解,以水解度(DH)、电泳、分子量分布、 β -Lg抗原性下降率等指标,探究部分水解

和深度水解羊乳清蛋白的水解工艺,并利用LC-MS/MS对 β -Lg和 α -La进行致敏性和肽段分析,确定酶切位点,希望为生产低过敏性的羊乳基配料提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山羊乳清蛋白粉(蛋白质质量分数为11%)、深度水解羊乳清蛋白粉,宜品乳业(青岛)集团有限公司。乙腈,天津市化学试剂一厂。三氯乙酸,天津市景田化工有限公司。宽分子质量预染标准蛋白质,上海斯信生物科技有限公司。山羊 β -乳球蛋白(β -Lg)ELISA检测试剂盒(抗体来源为IgE),上海优选生物科技有限公司。中性蛋白酶(100 U/g)、碱性蛋白酶(200 U/g)、木瓜蛋白酶(800 U/g)、细胞色素C、抑肽酶、杆菌肽、甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸,上海源叶生物科技有限公司。胰蛋白酶(250 U/g)、胃蛋白酶(3 000 U/g),上海麦克林生化科技有限公司。蛋白酶皆为食品级,分子质量标准品皆为色谱级,其余实验试剂皆为分析纯。

1.2 仪器与设备

BSA124S型电子分析天平,赛多利斯科学仪器北京有限公司;HWS24型电热恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;H1850R型台式高速冷冻离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;SynergyH1型酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;FE20Mettler型pH计,上海梅特勒托利多集团;DYCZ-24DN型电泳仪,济南海能仪器有限公司;离心过滤装置,德国默克公司;HPLC-1260型高效液相色谱仪(由G1315D系列光电二极管阵列检测系统和G1329B自动进样器注射器组成)、ZORBAX 300SB-C18型色谱柱(146 mm×250 mm,5 mm),美国安捷伦公司;Lab-1B-50E型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;G2000swxl TSK型色谱柱(7.8 mm×300 mm,5 mm),日本东曹有限公司;Q Exactive型超高效液相色谱-串联质谱联用仪,赛默飞世尔科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 羊乳清蛋白水解液的制备

根据前期预实验,将羊乳清蛋白溶液的质量分数设为15%。将羊乳清蛋白溶液在80℃下预热15 min,之后用1 mol/L HCl或NaOH溶液调节至各

蛋白酶的最适 pH 值。分别加入蛋白酶,在最适温度下对羊乳清蛋白进行水解。5 种蛋白酶的最适 pH 值和最适温度见表 1^[11]。将水解液在 100 ℃ 加热 10 min 进行灭酶,终止水解反应,4 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,真空冷冻干燥后以供进一步分析。

表 1 蛋白酶的最适 pH 值和最适温度

Tab. 1 Appropriate reaction temperature and pH for proteases

蛋白酶	最适温度/℃	最适 pH
碱性蛋白酶	55	10.0
中性蛋白酶	50	7.0
木瓜蛋白酶	55	7.0
胃蛋白酶	37	3.0
胰蛋白酶	37	8.0

1.3.2 羊乳清蛋白水解工艺的确定

1.3.2.1 蛋白酶的筛选

选取碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶及胰蛋白酶,并在其最适温度和最适 pH 值条件下水解羊乳清蛋白,其中酶底比设为 4 000 U/g,水解时间为 3.0 h。

1.3.2.2 羊乳清蛋白部分水解工艺的确定

选择碱性蛋白酶,在水解温度为 55 ℃,pH 值为 10.0 的条件下对样品进行部分水解。将样品分为两组,第一组水解时间(3.0 h)为定量,变量为酶底比(1 000、2 000、4 000、6 000、8 000 U/g);第二组酶底比(4 000 U/g)为定量,变量为水解时间(0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h)。

1.3.2.3 羊乳清蛋白深度水解工艺的确定

根据前期预实验,深度水解的蛋白酶选择中性蛋白酶和碱性蛋白酶以质量比 1:1 复合,pH 值为 8.5,温度为 50 ℃。研究复合蛋白酶在不同酶底比(1 000、2 000、4 000、6 000、8 000 U/g)和不同水解时间(0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h)对羊乳清蛋白水解的影响,探究羊乳清蛋白深度水解工艺。

1.3.3 水解度的测定

采用甲醛滴定法测定 DH,参考 Qin 等^[11]的 DH 测定方法并稍加修改。将 1 mL 的灭酶水解液置于烧杯中,加 60 mL 蒸馏水,将 pH 值调节至 8.2,然后将 10 mL 甲醛加入试样中均匀混合,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 9.2,记录此时 NaOH 溶液的消耗体积,即为 V_1 ;以同样的方法,测定空白实验组,记录消耗的标准 NaOH 溶液体积,即为 V_2 。DH

计算方法如式(1)。

$$DH = \frac{c \times (V_1 - V_2)}{V_3 \times S \times W \times h_{tot}} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: c 为标准 NaOH 溶液浓度, mol/L; V_1 为滴定时样品消耗标准 NaOH 溶液的体积, mL; V_2 为试剂空白消耗标准 NaOH 溶液的体积, mL; V_3 为试剂稀释液取用量,为 1 mL; S 为底物质量浓度, g/mL; W 为样品中蛋白质的质量分数, %; h_{tot} 是蛋白质中肽键总数, mmol/g, 乳清蛋白的肽键总数为 8.8 mmol/g。

1.3.4 SDS-PAGE 分析

采用质量分数为 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,样品与上样缓冲液按体积比 1:1 混合,上样量为 20 μ L^[16]。设定电泳仪电压为 80 V,待样品进入分离胶时调节电压为 120 V。条带到达底部后,染色 30 min,放入脱色液中进行脱色直至凝胶背景清晰。

1.3.5 水解物致敏性的测定

采用双抗体一步夹心-酶联免疫吸附法对羊乳清蛋白水解液的致敏性进行测定。将预先涂有羊乳清蛋白特异性抗体的微孔酶标板在室温下平衡 20 min,标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L,样品孔加待测样本 10 μ L 和样品稀释液 40 μ L。除空白孔外,每孔加入 100 μ L 经辣根过氧化物酶标记(HRP)的检测抗体,用封板膜封住反应孔,恒温箱 37 ℃ 避光温育 60 min。清洗平板,加入底物 A、B 各 50 μ L,37 ℃ 避光孵育 15 min。最后加入终止液 50 μ L,颜色变为黄色,颜色深浅与样品中的 β -Lg 含量呈正相关,在 5 min 内用酶标仪在 450 nm 处测定吸光值,绘制标准曲线。 β -Lg 抗原性下降率的计算方法如式(2)。

$$\beta\text{-Lg 抗原性下降率} = \frac{WP1 - WP2}{WP1} \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, $WP1$ 为原乳清蛋白中的 β -Lg 的质量分数, $WP2$ 为水解物中 β -Lg 的质量分数。

1.3.6 水解物分子质量分布的测定

参考 Li 等^[17]的方法并适当修改。采用 HPLC 法测定羊乳清蛋白的分子质量 (M_w) 分布。采用 G2000swxl TSK 色谱柱,检测器为紫外检测器,检测波长为 220 nm,流速为 0.5 mL/min,进样量为 20 μ L,检测时间为 30 min,柱温为 25 ℃。流动相由乙腈、水和三氟乙酸(体积比为 20.0:80.0:0.1)混

合,并在0.45 μm超滤膜处理。以细胞色素C(M_w 为12.5 kDa)、抑肽酶(M_w 为6.5 kDa)、杆菌肽(M_w 为1.42 kDa)、甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(M_w 为451 Da)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(M_w 为189 Da)为分子质量标准品绘制相对分子质量标准曲线,用来计算不同分子质量的色谱峰保存时间。

1.3.7 过敏肽段的测定

采用LC-MS/MS鉴定部分水解产物和深度水解产物的肽段水解情况。使用超滤装置和C18色谱柱对水解液进行超滤和脱盐。流动相A为体积分数为0.1%的甲酸水溶液,B液为甲酸与乙腈混合液(甲酸、乙腈、水体积比为0.1:84.0:16.0)。先用体积分数为95%的A液平衡色谱柱,分离过程采用梯度洗脱,洗脱条件如表2。水解液经色谱分离后用质谱仪进行60 min质谱分析,采用正离子检测,数据收集按照每次全扫描后采集10个碎片图谱。检索的数据库为Uniprot(<https://www.uniprot.org/>),使用MaxQuant软件(版本1.6.2.0)处理得到质谱文件。

表2 色谱洗脱条件

Tab. 2 Chromatographic elution conditions

t (洗脱)/min	B液线性梯度
0~50	4%~50%
50~54	50%~100%
54~60	100%

1.4 数据处理

所有实验重复3次,数值用平均值±标准偏差表示。采用SPSS 26.0软件对数据进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。使用Origin 8.0软件绘图。

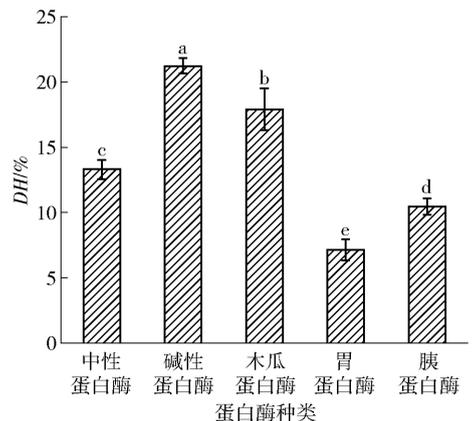
2 结果与分析

2.1 不同蛋白酶对羊乳清蛋白水解能力的比较

2.1.1 不同蛋白酶对羊乳清蛋白的水解程度分析

DH是蛋白质水解过程中被裂解的肽键占总肽键的比例,能够反映蛋白质的水解程度,可以作为重要指标来筛选对反应底物水解效果好的蛋白酶^[18-19]。蛋白酶和底物的特异性决定DH^[20]。图1是不同蛋白酶水解羊乳清蛋白的DH结果。从图1可知,5种蛋白酶的DH由高到低为:碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶。不同蛋白酶对羊乳清蛋白DH的影响程度不同,其中

碱性蛋白酶DH最高,为21.26%;而胃蛋白酶DH最低,为7.12%。胃蛋白酶是一种酸性蛋白酶,在碱性和中性环境下会失活,能将蛋白质氨基端或羧基端的芳香族氨基酸的肽键分解,具有强特异性。由于乳清蛋白在酸性环境下溶解度较差,且胃蛋白酶属于外肽酶,分子内的肽键不能被有效水解,因此胃蛋白酶的水解程度较低。胰蛋白酶与胃蛋白酶性质相似,但对乳清蛋白水解的效果稍强。木瓜蛋白酶是一种从木瓜果实中提取得到的天然生物酶,底物特异性十分广泛,可切割疏水区域的肽键,包括苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)和色氨酸(Trp)^[21]。无论是酸性还是碱性环境,木瓜蛋白酶都能有效水解乳清蛋白。碱性蛋白酶属于内切酶,作用底物十分广泛,乳清蛋白在碱性环境下溶解度高,因此碱性蛋白酶水解乳清蛋白的效果更好。中性蛋白酶属于内肽酶,特异性不强,水解乳清蛋白的效果不如碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶,为达到更好的水解效果一般采用复合酶进行水解^[22]。



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

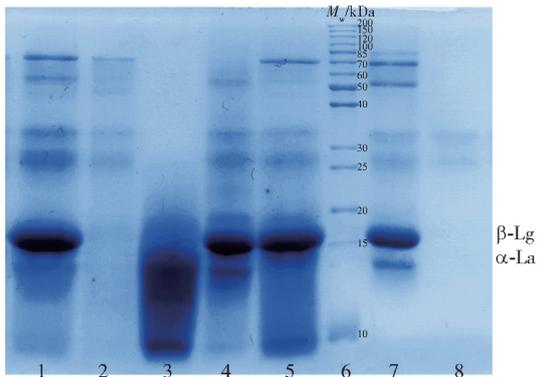
图1 不同蛋白酶水解羊乳清蛋白的水解度

Fig. 1 Degree of hydrolysis of goat whey protein by different proteases

2.1.2 不同蛋白酶的羊乳清蛋白水解物 SDS-PAGE 分析

乳清蛋白的主要成分是 β -Lg(分子质量为18.4 kDa)和 α -La(分子质量为14.2 kDa),是引起婴幼儿过敏的主要过敏原^[23]。对不同蛋白酶的水解物进行SDS-PAGE定性分析,实验结果如图2。由图2可知,在未水解的羊乳清蛋白中,含量最高的蛋白组分为 β -Lg。 β -Lg的空间结构致密,具有耐胃蛋白酶消化的特点,不易在人体胃肠道中降解^[4]。碱性蛋白酶水解液中分子质量在25 kDa以下的条

带完全消失,其中 β -Lg 被完全水解。碱性蛋白酶的水解效果优于其他蛋白酶,具有更高的水解效率。这可能是由于碱性蛋白酶作用位点广泛,且其作用于蛋白质内的肽键,破坏蛋白质分子内的抗原结合位点,有效降低了蛋白质的过敏性^[24-26]。木瓜蛋白酶水解物中分子质量在 25 kDa 以上的条带完全消失,木瓜蛋白酶对大分子蛋白水解较为彻底,但其无法有效水解 β -Lg 和 α -La。胃蛋白酶对羊乳清蛋白的水解效果最差,故不选用胃蛋白酶进行后续实验。胰蛋白酶同样不易水解 β -Lg,这可能是由于天然 β -Lg 的球状结构对胰蛋白酶具有抗性。中性蛋白酶对 β -Lg 水解效果差,但对 α -La 水解较为完全。因此,单一蛋白酶水解羊乳清蛋白无法达到深度水解的效果。为了将乳清蛋白水解完全,通常会采用复合酶(碱性蛋白酶和中性蛋白酶)同步水解^[22]。韩仁娇等^[26]采用复合的碱性蛋白酶和中性蛋白酶水解牛乳清蛋白,发现碱性蛋白酶和中性蛋白酶同时添加时可以使 β -Lg 的水解率高达 58.99%,复合酶的水解物明显优于市售的同类产品。



泳道 1~6:中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶的水解产物和蛋白 Marker。泳道 7~8 为对照组,7 为未水解的羊乳清蛋白,8 为市售的深度水解羊乳清蛋白。

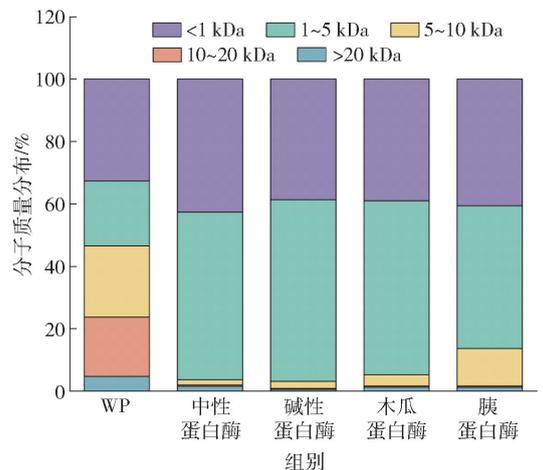
图2 不同蛋白酶水解产物的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of hydrolysates of different proteases

2.1.3 不同蛋白酶对羊乳清蛋白水解物分子质量分布的影响

分子质量分布可以更直观地反映蛋白质的水解程度。蛋白酶特异性的差异会使水解产物在分子质量分布上有所不同,5 种蛋白酶水解物分子质量的分析结果见图 3。由图 3 可知,与未水解的乳清蛋白相比,水解后分子质量为 1~5 kDa 的组分显著增加,大于 5 kDa 的组分含量显著减少,且碱性蛋白酶水解乳清蛋白的效果最好,这与 SDS-PAGE 分析结

果一致。与其他 3 种蛋白酶相比,中性蛋白酶水解物中小分子质量组分较多,分子质量小于 1 kDa 的组分为 42.63%。胰蛋白酶水解物中分子质量为 1~5 kDa 和 5~10 kDa 的组分分别为 45.76% 和 12.00%。在中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶的酶解产物中分子质量在 3 kDa 以下的组分分别为 75.01%、73.67%、68.44%、54.55%,而深度水解产物的要求是蛋白质分子质量小于 3 kDa 的寡肽应为 95% 以上,这表明单一的蛋白酶不能达到深度水解的要求。碱性蛋白酶和中性蛋白酶的小分子肽占比更多,水解产物中分子质量在 5 kDa 以下的组分为 90% 以上,已达到部分水解的要求。虽然分子质量和抗原性之间并没有直接的关系,但许多研究表明,与分子质量较小的多肽相比,分子质量较大的多肽引起过敏反应的几率更高^[17]。Van Beresteijn 等^[27]也发现,分子质量小的乳清蛋白水解物更不易引起过敏反应。



WP 为未水解的羊乳清蛋白。

图3 不同蛋白酶水解产物的分子质量分布

Fig. 3 Molecular weight distribution of hydrolysates of different proteases

通过 2.1.2 和 2.1.3 的分析可知,胃蛋白酶是酸性蛋白酶,而乳清蛋白在酸性条件下溶解度较差,因此胃蛋白酶水解液的 DH 较差。胰蛋白酶无法将 β -Lg 水解完全,这可能是由于 β -Lg 的球状结构未被完全打开。乳清蛋白在碱性条件下更易降低其抗原性,而碱性蛋白酶的 DH 较高且可将 β -Lg 水解完全。对不同蛋白酶的水解物进行分子质量分布测定发现,单一的蛋白酶水解无法达到深度水解的要求,因此需要复合蛋白酶水解羊乳清蛋白。碱性蛋白酶和中性蛋白酶的小分子肽占比更多,有研究也表明,

碱性蛋白酶和中性蛋白酶结合可以更加有效地切断乳清蛋白的多肽链,达到深度水解的要求^[17]。综合考虑,选用碱性蛋白酶作为部分水解配方的蛋白酶,选择碱性蛋白酶和中性蛋白酶进行复配作为深度水解的蛋白酶。

2.2 羊乳清蛋白部分水解工艺的确定及水解物致敏性分析

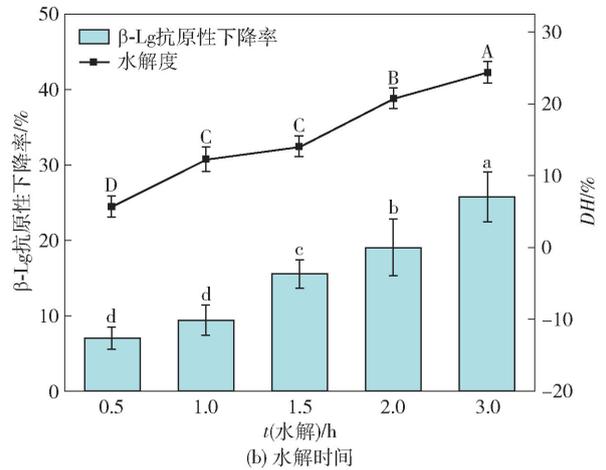
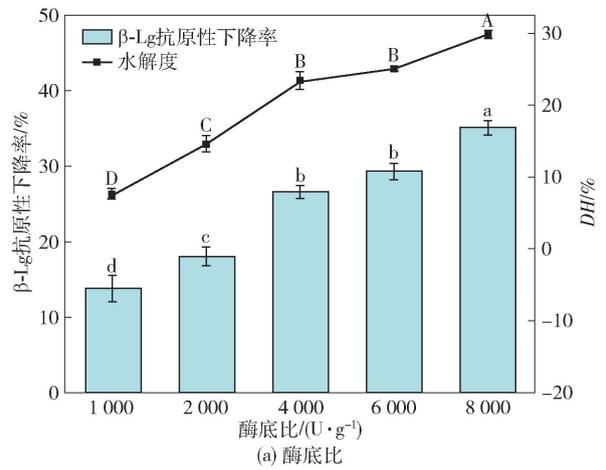
为了进一步确定羊乳清蛋白部分水解的工艺,考察了影响酶解的两个重要因素酶底比和水解时间,并分析酶底比和水解时间对水解产物 DH、分子质量分布以及 β -Lg 抗原性的影响。

2.2.1 部分水解羊乳清蛋白水解度及致敏性分析

酶解过程能有效破坏蛋白过敏原线性表位的位点,使得蛋白质的致敏性下降。图4是碱性蛋白酶在不同酶底比和水解时间条件下水解物的 DH 及 β -Lg 抗原性变化的分析。由图4(a)可知,随着酶底比的增加,水解物的 β -Lg 抗原性下降率呈现增加的趋势,在酶底比为 8 000 U/g 时 β -Lg 抗原性下降率为 35.06%。由图4(b)可知,在 1.0 h 和 2.0 h 时 DH 增加最快,分别为 12.31% 和 20.72%。当水解时间为 3.0 h 时, DH 高达 24.36%。当水解时间为 1.0 h 和 2.0 h 时,水解产物的 β -Lg 抗原性下降率分别为 9.40% 和 19.02%。当酶底比为 4 000 U/g 和 6 000 U/g,水解产物的 DH 和 β -Lg 抗原性下降率变化不显著,这可能是因为随着水解的进行,蛋白质的结构开始发生变化,蛋白质内部的过敏原可能被破坏或暴露,或形成新的过敏原,因此水解物的抗原性和 DH 变化不显著^[28]。可通过不同酶底比和水解时间的组合,显著降低羊乳清蛋白抗原性。

2.2.2 部分水解羊乳清蛋白的分子质量分布

部分水解工艺的标准为分子质量大于 6 kDa 的多肽,在水解物中不能超过 18%^[11]。图5是碱性蛋白酶水解物在不同酶底比和水解时间条件下的分子质量分布。由图5可知,在酶底比为 4 000 U/g 时,大分子蛋白几乎完全被水解为分子质量小于 10 kDa 的小分子蛋白,分子质量小于 1 kDa 的肽段为 38.72%,水解程度较高。当水解 1.0 h 时,水解物中分子质量大于 20 kDa 的肽段仅为 0.94%,小于 5 kDa 的肽段为 95.18%。在酶底比为 4 000 U/g 的水解条件下,将碱性蛋白酶水解 1.0 h,水解产物的分子质量已经满足部分水解产物的标准,因此部分水解选用此水解条件。党慧杰等^[29]利用碱性蛋白酶水解牛乳清蛋白制备低致敏性乳制品,发现碱性



不同大写字母代表羊乳清蛋白水解度差异显著,不同小写字母代表羊乳清蛋白 β -Lg 抗原性下降率差异显著。

图4 羊乳清蛋白碱性蛋白酶水解物水解度及 β -Lg 抗原性的变化

Fig. 4 Changes of degree of hydrolysis and β -Lg antigenicity of goat whey protein hydrolysates by alkaline protease

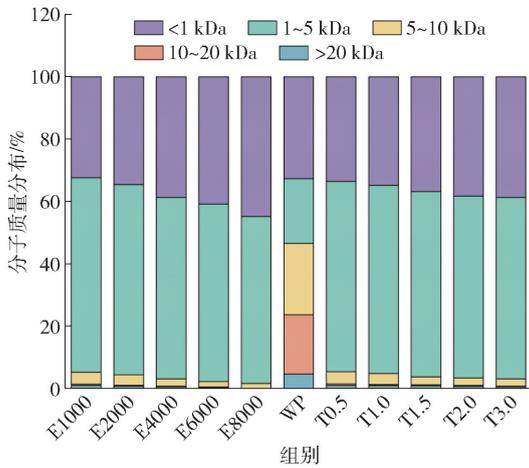
蛋白酶可以将乳清蛋白中具有致敏性的大分子蛋白质酶解为小分子的多肽,大大降低其致敏性。增加小分子多肽的含量可以显著降低乳制品蛋白的致敏性^[20]。因此确定部分水解工艺:在酶底比为 4 000 U/g 的条件下,使用碱性蛋白酶水解 1.0 h。部分水解羊乳清蛋白的 DH 为 12.31%, β -Lg 抗原下降率为 9.40%,小于 5 kDa 的肽段为 95.18%。

2.3 羊乳清蛋白深度水解工艺的确定及水解物致敏性分析

为了进一步确定羊乳清蛋白深度水解的工艺,分析了酶底比和水解时间对水解产物 DH、分子质量分布以及 β -Lg 抗原性的影响。

2.3.1 深度水解羊乳清蛋白水解度及致敏性分析

单一的蛋白酶水解山羊乳清蛋白无法达到深度



E后数字为酶底比,U/g;T后数字为水解时间,h;WP为未水解的羊乳清蛋白。

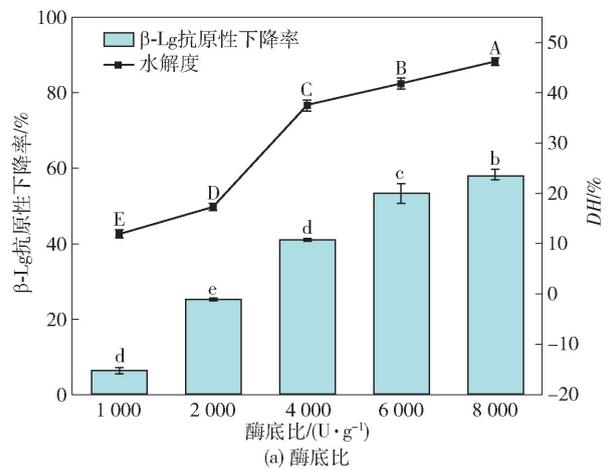
图5 羊乳清蛋白碱性蛋白酶水解物的分子质量分布

Fig. 5 Molecular weight distribution of goat whey protein hydrolysates by alkaline protease

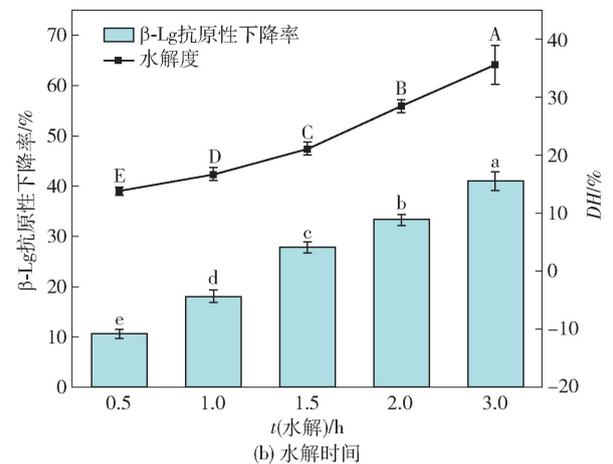
水解的要求,与单一的蛋白酶水解效果相比,复合的蛋白酶可以在最大程度上消除蛋白质的过敏性。这是因为,几种蛋白酶结合在一起可以扩大水解的位点和蛋白酶的作用范围,更好地提高水解的效率^[30-31]。图6是将中性蛋白酶和碱性蛋白酶复配后在不同的酶底比和水解时间下水解物的DH及 β -Lg抗原性变化的分析。由图6可知,与单一蛋白酶的水解效果相比,复合蛋白酶可以显著降低乳清蛋白的抗原性。由图6(a)可以看出:当酶底比在2000~6000 U/g时,DH迅速上升,致敏肽段被破坏, β -Lg抗原性随之降低;当酶底比为6000 U/g时趋于稳定,DH为43.64%, β -Lg抗原性下降率为53.26%。由图6(b)可以看出,随着水解时间的延长,DH不断增加,1.5~3.0 h增长较快,从21.12%增加到35.58%,在3.0 h时 β -Lg抗原性下降率达到40.97%。综合来看,复合酶的水解效率是要高于单一蛋白酶的,原因是复合蛋白酶的作用范围更加广泛,因此提高了酶解效率。

2.3.2 深度水解羊乳清蛋白的分子质量分布

深度水解物中分子质量大于3.5 kDa的多肽应为1%~5%,图7是复合酶在不同酶底比和水解时间条件下水解物的分子质量分布。由图5和图7对比可知,复合酶水解羊乳清蛋白较单酶水解更为彻底,水解产物中小分子肽(分子质量小于1 kDa)的含量较多,小分子多肽含量的增加会大大降低蛋白质的致敏性,这与DH和 β -Lg抗原性测定结果一致^[32]。随着蛋白酶的添加量和水解时间的增加,酶



(a) 酶底比



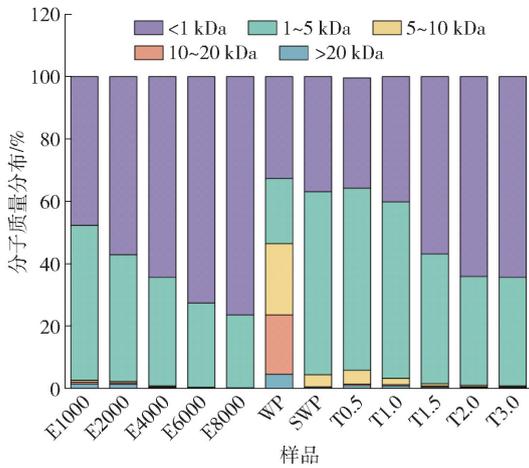
(b) 水解时间

不同大写字母代表羊乳清蛋白水解度差异显著,不同小写字母代表羊乳清蛋白 β -Lg抗原性下降率差异显著。

图6 羊乳清蛋白复合酶水解物的水解度及 β -Lg抗原性的变化

Fig. 6 Changes of degree of hydrolysis and β -Lg antigenicity of goat whey protein hydrolysates by compound enzymes

解产物中分子质量小于1 kDa的组分占比逐渐增加,分子质量大于20 kDa的蛋白质已被完全水解。当不同的蛋白酶组合使用时,它们之间的协同作用会在多肽上切割更多的位点,从而获得低致敏性的水解物^[17]。在酶底比为6000 U/g和8000 U/g时,分子质量小于3 kDa的水解物分别为97.26%和97.89%,水解物的分子质量分布没有明显差异。当水解时间为3.0 h时,分子质量小于3 kDa的水解物为95%以上。酶底比为6000 U/g的水解条件下,将复合蛋白酶水解3.0 h,水解产物的分子质量已经满足深度水解产物的要求。因此考虑实际生产和节能,确定深度水解工艺:使用复合蛋白酶(碱性蛋白酶和中性蛋白酶质量比为1:1),酶底比为6000 U/g,水解时间为3.0 h。深度水解羊乳清蛋



E后数字为酶底比, U/g; T后数字为水解时间, h; WP为未水解的羊乳清蛋白; SWP为市售的深度水解羊乳清蛋白。复合酶在不同酶底比下的水解时间为3 h; 在不同水解时间下的酶底比为4 000 U/g。

图7 复合酶羊乳清蛋白水解物的分子质量分布

Fig.7 Molecular weight distribution of goat whey protein hydrolysates by compound enzymes

白的DH为35.58%, β -Lg抗原下降率为40.97%, 小于3 kDa的肽段为97.26%。

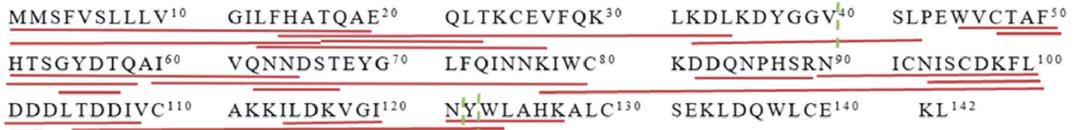
2.4 部分和深度水解羊乳清蛋白的酶切位点分析

为了进一步探究蛋白酶对过敏肽段的切割情况, 比较部分水解产物和深度水解产物致敏性的差异, 采用LC-MS/MS对水解后的羊乳清蛋白肽段进行分析。牛与山羊的乳蛋白序列同源性较高, β -Lg和 α -La的序列同源性高达96.3%和94.3%, 因此通过牛乳的 β -Lg和 α -La的抗原表位结合DNASTAR软件、SOPMA服务器、THE BEPIRED2.0网络服务器, 预测山羊乳的 β -Lg和 α -La的抗原表位^[33-34], 分析结果如图8。

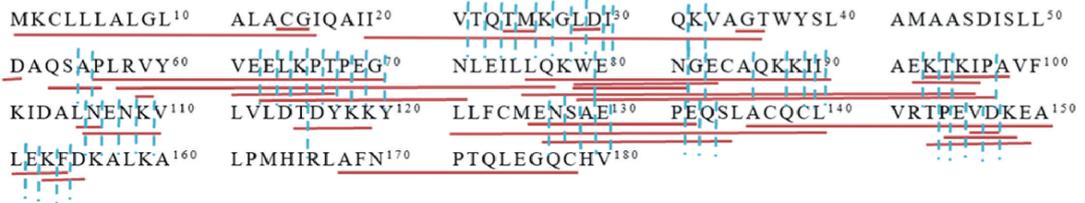
乳清蛋白经过蛋白酶水解形成不同长度的肽段, 通过LC-MS/MS分析得到部分水解产物中含8个以上氨基酸的肽段有1 046个, 分子质量分布在0.78~2.99 kDa, 而深度水解产物中则有951个, 分子质量的范围为0.74~2.89 kDa。LC-MS/MS的分析结果和分子质量分布测定的结果一致, 深度水解产物的分子质量更小, 这进一步说明, 复合酶与单



(a) β -Lg的部分水解



(b) α -La的部分水解



(c) β -Lg的深度水解



(d) α -La的深度水解

红色横线为预测的羊乳清蛋白中 β -Lg和 α -La的抗原表位, 蓝色竖线为蛋白酶对 β -Lg的酶切位点, 绿色竖线为蛋白酶对 α -La的酶切位点。

图8 部分水解产物和深度水解产物中 β -Lg和 α -La的酶切位点

Fig.8 Protease cleavage sites for β -Lg and α -La in partial and extensive hydrolysates products

一的蛋白酶相比,切割肽段的效率更高,切割位点更加细致。图8是部分和深度水解产物中 β -Lg和 α -La的裂解位点。由图8(a)和图8(c)可知,部分水解产物中 β -Lg的酶切位点主要集中在I19~A34位、E83~A98位、E126~Q133位和T143~K148位;而深度水解产物则主要集中在V21~K32位、E62~G70位、N81~P97位、L105~V110位、E126~Q133位和T143~F154位。深度水解对过敏肽段破坏得更完全,大部分过敏表位都可以被切割。部分水解物中 α -La仅仅被破坏了3个过敏原表位,深度水解物中则被切割了6个位点。水解产物中仍存在一些含有抗原表位的肽段,这说明无论是碱性蛋白酶还是复合蛋白酶都不能完全破坏 α -La过敏原的抗原表位^[19]。

3 结 论

本研究选择了5种蛋白酶对山羊乳清蛋白进行水解,通过水解度、分子质量分布、SDS-PAGE等指标确定了部分水解和深度水解工艺,并对部分水解和深度水解产物中 α -La和 β -Lg酶切位点进行了研究。确定的部分水解工艺:使用碱性蛋白酶,酶底比为4000 U/g,温度为55℃,pH值为10.0,水解时间为1.0 h。深度水解工艺:中性蛋白酶和碱性蛋白酶复配质量比为1:1,温度为50℃,pH值为8.5,酶底比为6000 U/g,水解时间为3.0 h。部分水解和深度水解都能破坏 β -乳球蛋白的大部分过敏表位,其中深度水解能更大程度地降低乳清蛋白的致敏性。为了进一步验证部分水解和深度水解山羊乳清蛋白产物的致敏性,后续会进行更有效的致敏性评估,如动物实验、皮肤点刺实验等。本研究旨在为利用羊乳清蛋白开发低致敏性乳基蛋白配料提供理论依据,同时为羊乳清蛋白在特医食品中的应用提供技术参考。

参考文献:

[1] GUO H Y, PANG K, ZHANG X Y, et al. Composition, physicochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(4): 1635-1643.

[2] PESSATO T B, DE CARVALHO N C, TAVANO O L, et al. Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized alcalase: characterization and detection of residual allergens[J]. *Food Research International*, 2016,

83: 112-120.

- [3] 丁福强, 仇凯, 钟其顶, 等. 应用 SDS-PAGE 法评价乳基婴幼儿配方食品中有效蛋白质组分[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(2): 190-197.
- DING F Q, QIU K, ZHONG Q D, et al. Evaluation of available protein components in milk-based infant formula by SDS-PAGE[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 38(2): 190-197.
- [4] 周欣慧. 山羊乳 β -乳球蛋白改性及其消化产物多肽组学研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- ZHOU X H. Effects of modified technique on the structure of goat milk β -lactoglobulin and its peptidomic profile after enzymatic hydrolysis[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021.
- [5] VANGA S K, SINGH A, RAGHAVAN V. Review of conventional and novel food processing methods on food allergens[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(10): 2077-2094.
- [6] EHN B M, ALLMERE T, TELEMEO E, et al. Modification of IgE binding to β -Lactoglobulin by fermentation and proteolysis of cow's milk[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(9): 3743-3748.
- [7] 张微, 满朝新, 王辉, 等. 乳酸菌发酵降低牛乳蛋白过敏性的研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2017, 45(1): 21-24.
- ZHANG W, MAN C X, WANG H, et al. Research development on the influence of LAB fermentation for antigenicity of milk protein[J]. *China Dairy Industry*, 2017, 45(1): 21-24.
- [8] JEDRYCHOWSKI L. Reduction of the antigenicity of whey proteins by lactic acid fermentation[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 1999, 11(1): 91-99.
- [9] MENG X, BAI Y, GAO J, et al. Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine β -lactoglobulin[J]. *Food Chemistry*, 2017, 219: 290-296.
- [10] AZDAD O, MEJRHIT N, EL KABBAOUI M, et al. Effect of heating and enzymatic hydrolysis on casein cow milk sensitivity in Moroccan population[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 424-433.
- [11] QIN A, LI X, YANG F, et al. Extensively hydrolysed sodium caseinate (part I): selection of enzymes, molecular mass distribution, and allergy site analysis by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *International Dairy Journal*, 2023, 137: 105501.
- [12] 姜玉池, 赵怡晴, 谢奎, 等. 山羊乳与牛乳配方乳粉的致敏性比较[J]. *食品科学*, 2022, 43(7): 96-104.
- JIANG Y C, ZHAO Y Q, XIE K, et al. Comparative

- study on the allergenicity of goat and bovine milk formula powders[J]. *Food Science*, 2022, 43(7): 96–104.
- [13] KAPILA R, KAVADI P K, KAPILA S. Comparative evaluation of allergic sensitization to milk proteins of cow, buffalo and goat[J]. *Small Ruminant Research*, 2013, 112(1): 191–198.
- [14] MONACI L, VISCONTI A. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(5): 581–591.
- [15] JI J, ZHU P, PI F, et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of the main milk allergens[J]. *Food Control*, 2017, 74: 79–88.
- [16] LI S, HU Q, CHEN C, et al. Formation of bioactive peptides during simulated gastrointestinal digestion is affected by α s1-casein polymorphism in buffalo milk[J]. *Food Chemistry*, 2020, 313: 126159.
- [17] LI H, YANG J, QIN A, et al. Milk protein hydrolysates obtained with immobilized alcalase and neutrase on magnetite nanoparticles: characterization and antigenicity study[J]. *Journal of Food Science*, 2022, 87(7): 3107–3116.
- [18] MORAIS H A, SILVESTRE M P C, SILVA M R, et al. Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate: effect of enzyme type and enzyme; substrate ratio on peptide profile[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(1): 201–210.
- [19] 谭梦. 低抗原性乳清蛋白的酶法制备及风味改善[D]. 杭州:浙江大学, 2016.
- TANG M. The preparation of low antigenic whey protein by enzyme and flavor improvement[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [20] CUI Q, ZHANG Z, LI M, et al. Peptide profiles and allergy-reactivity of extensive hydrolysates of milk protein[J]. *Food Chemistry*, 2023, 411: 135544.
- [21] DU X, JING H, WANG L, et al. Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 159: 113257.
- [22] 刘培玲,张晴晴,高增丽,等. 乳清蛋白改性研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(23): 333–348.
- LIU P L, ZHANG Q Q, GAO Z L, et al. Advances in modification of whey proteins[J]. *Food Science*, 2021, 42(23): 333–348.
- [23] 党慧杰,郑远荣,刘振民. 超高压处理对乳清分离蛋白结构及致敏蛋白含量的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(6): 56–61.
- DANG H J, ZHENG Y R, LIU Z M. Effect of ultra-high pressure on the structure of whey protein isolate and the content of allergenic protein[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(6): 56–61.
- [24] WRÓBLEWSKA B, JE DRYCHOWSKI L, SZABÓ E, et al. The reduction of cow milk proteins immunoreactivity by two-step enzymatic hydrolysis[J]. *Acta Alimentaria*, 2005, 34(3): 307–315.
- [25] 沈小琴,郑海,罗永康,等. 酶解对乳清蛋白抗原性影响的研究[J]. *中国乳品工业*, 2006(6): 12–15.
- SHEN X Q, ZHENG H, LUO Y K, et al. Effect of enzymic hydrolysis on the antigenicity of whey proteins[J]. *China Dairy Industry*, 2006(6): 12–15.
- [26] 韩仁娇,王彩云,罗述博,等. 复合中性蛋白酶水解乳清蛋白中 β -乳球蛋白的工艺条件优化[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(8): 203–208.
- HAN R J, WANG C Y, LUO S B, et al. Optimization of compound neutral enzymatic hydrolysis of β -lactoglobulin in whey protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(8): 203–208.
- [27] VAN BERESTELIJN E C H, MEIJER R J G M, SCHMIDT D G. Residual antigenicity of hypoallergenic infant formulas and the occurrence of milk-specific IgE antibodies in patients with clinical allergy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1995, 96(3): 365–374.
- [28] SATHE S K, TEUBER S S, ROUX K H. Effects of food processing on the stability of food allergens[J]. *Biotechnology Advances*, 2005, 23(6): 423–429.
- [29] 党慧杰,郑远荣,刘振民,等. 碱性蛋白酶水解乳清分离蛋白工艺优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(8): 3188–3196.
- DANG H J, ZHENG Y R, LIU Z M, et al. Process optimization of alkaline protease hydrolyzing whey protein isolate[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(8): 3188–3196.
- [30] 李欣,胡巍,谭宏凯,等. 低致敏食品制备技术及其工业化应用研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(3): 13–20.
- LI X, HU W, TAN H K, et al. Progress of production technology for hypoallergenic foods and its industrial application[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(3): 13–20.
- [31] 刘红梅,师广波,李向东,等. 复合酶法水解花生粕制备抗氧化肽的工艺优化[J]. *食品科学技术学报*, 2014, 32(3): 59–64.
- LIU H M, SHI G B, LI X D, et al. Optimization of processing of antioxidant peptides from peanut meal using

- compound enzymes [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 32(3): 59–64.
- [32] LUYT D, BALL H, MAKWANA N, et al. BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy [J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2014, 44(5): 642–672.
- [33] LAJNAF R, FEKI S, BEN AMEUR S, et al. Cow's milk alternatives for children with cow's milk protein allergy: review of health benefits and risks of allergic reaction [J]. *International Dairy Journal*, 2023, 141: 105624.
- [34] MATSUO H, YOKOOJI T, TAOGOSHI T. Common food allergens and their IgE-binding epitopes [J]. *Allergy International*, 2015, 64(4): 332–343.

Partial and Extensive Hydrolysis Process, Hydrolysate Allergenicity and Peptide Profile of Goat Whey Protein

LI Hongjuan¹, LI Mengfan¹, CAO Hongyu¹, LIU Lei², MOU Shanbo², YU Jinghua^{1,*}

(1. *College of Food and Engineering/State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;*
2. *Yipin Dairy (Qingdao) Group Co. Ltd., Qingdao 266600, China*)

Abstract: The preparation of hypoallergenic ingredients using goat whey protein is a hot research topic in dairy industry. Whey protein is one of the main proteins in milk, and it is also the main substance that causes allergic reactions in infants and young children. The most common way to reduce protein sensitization is to hydrolyze protein into small molecular peptides. The hydrolysis process of partial and extensive hydrolysis, and the characteristics of hydrolysate (degree of hydrolysis, molecular weight distribution and β -Lg antigenicity) were studied with goat whey protein as raw materials. LC-MS/MS was used to compare the cleavage sites of allergic epitopes by partial hydrolysis and extensive hydrolysis. The results showed that neutral protease and alkaline protease hydrolysis had better hydrolysis effect on goat whey protein, in which alkaline protease had the highest hydrolysis degree of 21.26%. Analyzed by electropherograms, macromolecular polypeptide chains still existed in the products after single enzyme hydrolysis, and complex enzyme hydrolysis was required in the extensive hydrolysis process. At the enzyme to substrate ratio of 4 000 U/g, alkaline protease was used for hydrolysis at pH 10.0 and 55 °C for 1.0 h. The degree of hydrolysis of partial hydrolysates was 12.31%, the molecular weight of polypeptides below 5 kDa accounted for 95.18%, and the antigenicity of β -lactoglobulin decreased by 9.40%. When the mass ratio of neutral protease and alkaline protease was 1:1, the enzyme to substrate ratio was 6 000 U/g, and the hydrolysis was conducted at pH 8.5 and 50 °C for 3.0 h, the hydrolysis degree of the extensive hydrolysate was 35.58%, peptides with molecular weight less than 3 kDa accounted for 97.26%, and the antigenicity of β -lactoglobulin decreased by 40.97%. Both partial and extensive hydrolysis could destroy most of the allergic epitopes of β -lactoglobulin, but extensive hydrolysis could reduce the allergenicity of whey protein to a greater extent than partial hydrolysis. The purpose of this study was to provide some reference for the production of hydrolyzed whey protein in hypoallergenic goat.

Keywords: goat whey protein; enzymatic hydrolysis; molecular weight distribution; degree of hydrolysis; allergenicity