

乳清蛋白-低聚异麦芽糖的制备及抗原性研究

李铮 罗永康* 冯力更 刘晓宇 张颖

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 将低聚异麦芽糖通过糖基化引入乳清蛋白制备乳清蛋白-低聚异麦芽糖,用间接竞争 ELISA 法测定不同乳清蛋白与低聚异麦芽糖质量比,不同反应时间生成的乳清蛋白-低聚异麦芽糖中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白抗原性的变化。结果表明:糖基化能有效降低乳清蛋白中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的抗原性;不同反应时间、不同乳清蛋白与低聚异麦芽糖质量比对乳清蛋白中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白抗原性的影响不同,乳清蛋白与低聚异麦芽糖的质量比为 1:4,反应 24 h 时效果最好, α -乳白蛋白的抗原性从 25.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降低到 9.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, β -乳球蛋白的抗原性从 97.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降低到 28.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

关键词 乳清蛋白;低聚异麦芽糖;糖基化;抗原性

中图分类号 TS 252.1

文章编号 1007-4333(2011)02-0133-05

文献标志码 A

Study on preparation and antigenicity of WPI-isomalto-oligosaccharide conjugate

LI Zheng, LUO Yong-kang*, FENG Li-geng, LIU Xiao-yu, ZHANG Ying

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

Abstract Isomalto-oligosaccharide was conjugated to WPI by means of Maillard reaction to form WPI-isomalto-oligosaccharide. After the protein and sugar of different mass ratio reacting for different time, the changes of antigenicity of α -LA and β -LG were estimated by indirect competition ELISA. The results indicated that the glycosylation of WPI could reduce the antigenicity of α -LA and β -LG. The different effects on the antigenicity of α -LA and β -LG were observed under different reaction times and mass ratios. Under the optimal mass ratio of protein and sugar of 1:4 and the optimal reaction time of 24 h, the antigenicity of α -LA decreased from 25.67 to 9.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the antigenicity of β -LG decreased from 97.82 to 28.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Key words whey protein; isomalto-oligosaccharide; glycosylation; antigenicity

牛乳蛋白中主要的过敏原为乳清蛋白中的 α -乳白蛋白(α -LA)和 β -乳球蛋白(β -LG),对牛乳蛋白进行改性可有效降低牛乳中的过敏原。目前通过改性降低乳清蛋白过敏原的主要方法有热处理、酶解、糖基化和发酵。将碳水化合物以共价键与蛋白质分子上的氨基(主要为 Lys 的 ϵ -氨基)或羧基相结合的化学反应(包括美拉德反应)称之为蛋白质的糖基化作用。近几年的研究表明,通过糖修饰乳清蛋白,可以

掩蔽蛋白上的抗原决定部位,降低蛋白的抗原性。Hattori 等将壳聚糖结合到 β -LG 上, β -LG-壳聚糖抗原性显著降低^[1];Enomoto 等将麦芽五糖(maltopentaose)结合到 α -LA 上,降低了 α -LA 的抗原性^[2]。Hattori 等研究表明^[3],磷酰基低聚糖和海藻酸低聚糖这 2 种酸性低聚糖能降低 β -LG 的抗原性,磷酰基低聚糖作用效果比海藻酸低聚糖好。目前关于利用糖基化降低其他蛋白质抗原性的研究也

收稿日期:2010-08-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471224;30871817);“十一五”国家科技支撑项目(2006BAD04A06)

第一作者:李铮,硕士研究生,E-mail:lizheng1986114@163.com

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

有一定进展。Slutter 等利用三甲基壳聚糖(trimethyl chitosan)与卵清蛋白反应降低其抗原性^[4]。Lagemaat将低聚果糖和果糖分别结合到大豆蛋白,大豆蛋白的抗原性分别下降到 11.2%和 8.6%^[5]。另外糖基化改善蛋白的功能性质的研究有很多,葡萄糖、阿洛糖、半乳糖、鼠李糖、核糖、乳糖、树胶醛糖^[6-7]等都能有效地调节乳清蛋白的性质。

低聚异麦芽糖(IMO)是功能性低聚糖,有增殖双歧杆菌等有益菌的作用^[8]。目前通过糖基化将 IMO 引入乳清分离蛋白(WPI)对 WPI 中 α -LA 和 β -LG 的抗原性影响的研究未见报道。本研究旨在通过糖基化反应将 IMO 引入 WPI 制备 WPI-IMO,探索反应时间和 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 对 WPI-IMO 中 α -LA 和 β -LG 抗原性的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

乳清分离蛋白, Murray Goulburn Co-operative CO., LTD, 澳大利亚;低聚异麦芽糖(IMO900), 山东保龄宝生物技术有限公司; α -乳白蛋白(α -LA), L5385, Sigma; β -乳球蛋白(β -LG), L3908, Sigma; 兔抗 α -LA 血清, 自制; 兔抗 β -LG 血清, 自制; HRP 标记的羊抗兔 IgG, A6154, Sigma。

1.2 试验方法

1.2.1 WPI-IMO 的制备

将 WPI 和 IMO 按照质量比 1 : 6、1 : 4、1 : 2、1 : 1 和 2 : 1 溶解于去离子水中,溶液最终质量浓度为 100 g/L。将溶液于 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中预冻 6 h 后,在真空冷冻干燥机中 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 0~120 h, 所得 WPI-IMO 共价复合物溶解于去离子水中,溶液最终质量浓度为 100 g/L,再次冷冻干燥,得到的冻干粉于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中贮存。同时,将 WPI 在相同的干热条件下处理作为对照。

1.2.2 WPI-IMO 抗原性的测定

抗原性的测定采用间接竞争 ELISA 法。

1) 抗原包被。用包被液(浓度为 50 mmol/L, pH 9.6 的碳酸盐溶液)将一定质量浓度的抗原(α -LA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; β -LG, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)包被于 96 孔酶标

板(Corning Costar, 美国),每孔 100 μL , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。

2) 样品与抗血清预混合。在反应管中加入蛋白质浓度为 0.1 mg/mL 的样品(或标准品)和相同体积一定稀释度的抗血清,兔抗 α -LA 血清稀释 256 000 倍,兔抗 β -LG 血清稀释 128 000 倍。不加样品(或标准品)只加抗血清的反应管作为无竞争体系, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。

3) 洗涤。次日倾去孔内液体, PBST(PBS + 0.05%吐温-20)洗涤 4 次,每次 3 min,于吸水纸上拍干。

4) 封闭。加封闭液(PBS + 1% BSA + 0.1%吐温-20)进行封闭,每孔 100 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h, PBST 洗涤 4 次,拍干。

5) 抗原抗体反应。加入(2)中样品和抗血清的预混液,每孔 100 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h, PBST 洗涤 4 次,拍干。

6) 加酶标二抗。加入稀释 10 000 倍的羊抗兔 IgG-HRP 标记物,每孔 100 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h, PBST 洗涤 4 次,拍干。

7) 显色。加入新鲜配制的 TMB(Amresco, 美国)底物溶液,每孔 100 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min,显示蓝色。

8) 终止反应。每孔加入 2 mol/L H_2SO_4 50 μL 终止反应,颜色变为黄色。

9) 吸光值测定。利用酶标仪(Thermo Electron, 美国)双波长测定各孔的 OD_{450} 和 OD_{630} 值,得到实际 $\text{OD} = \text{OD}_{450} - \text{OD}_{630}$ 。

1.2.3 标准曲线的建立

将标准品稀释成系列质量浓度,进行间接竞争 ELISA 测定。无抗原抑制时的 OD 值为 B_0 ,各相应质量浓度抗原抑制时的 OD 值为 B ,以 $(B/B_0)/\%$ 为纵坐标,以相对应质量浓度的对数 $\lg\rho(\alpha\text{-LA})$ (或 $\lg\rho(\beta\text{-LG})$)为横坐标,制作标准曲线。选择标准曲线上 $(B/B_0)/\%$ 与 $\lg\rho(\alpha\text{-LA})$ (或 $\lg\rho(\beta\text{-LG})$)呈明显相关的区段,根据公式:

$$\text{Logit}(B/B_0) = \ln[B/(B_0 - B)]$$

计算各标准点的 $\text{Logit}(B/B_0)$,再做对应于 $\lg\rho(\beta\text{-LG})$ (或 $\lg\rho(\alpha\text{-LA})$)的 $\text{Logit}(B/B_0)$ 回归分析,得出线性回归方程及相关系数。根据标准曲线计算各样品的抗原性, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

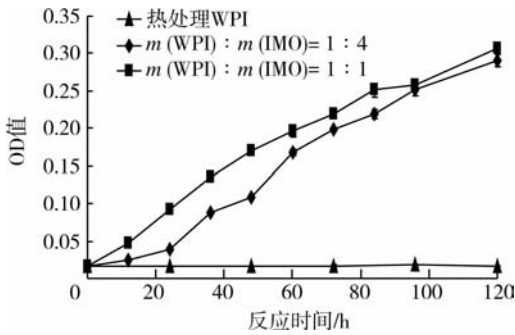
1.2.4 糖基化产物颜色的测定

420 nm 波长是美拉德反应产生的棕色产物的特征波长。将糖基化反应产物溶解于去离子水中，使溶液中蛋白质量浓度为 1 mg/mL，测定其在 420 nm 处的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 反应时间对 WPI-IMO 颜色的影响

随时间增加，WPI-IMO 颜色加深； $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 1 时颜色变化较快，反应 96 h 后颜色基本保持不变；热处理 WPI 颜色没有明显变化(图 1)。这说明随时间增加，WPI 与 IMO 反应程度加深，96 h 后反应缓慢。



WPI, 乳清分离蛋白; IMO, 低聚异麦芽糖。下同。

图 1 反应时间对不同 WPI 与 IMO 质量比的 WPI-IMO 颜色的影响

Fig.1 Effect of reaction time on the color of WPI-IMO of different mass ratio

2.2 反应时间对 WPI-IMO 抗原性的影响

2.2.1 对 WPI-IMO 中 α -LA 抗原性的影响

热处理的 WPI 中 α -LA 的抗原性随时间延长而增大，并且热处理的 WPI 比相对应的 WPI-IMO 的 α -LA 抗原性都高，说明糖基化能起到降低热处理的 WPI 中 α -LA 的抗原性的作用。 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 1 的 WPI-IMO 中 α -LA 抗原性 0~72 h 随时间延长而增加，72 h 后开始下降，但始终高于初始值； $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 4，反应 24 h 内 α -LA 抗原性从 25.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降低到 9.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，24 h 后 α -LA 抗原性随时间延长逐渐增高，96 h 时 α -LA 抗原性高于初始值(图 2)。Enomoto^[2] 研究表明， α -LA 与麦芽五糖质量比为 2 : 1，50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 72 h， α -LA 的抗原性略有降低，与本研究相似。

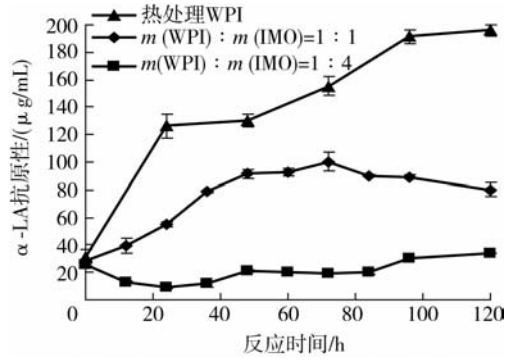


图 2 反应时间对不同 WPI 与 IMO 质量比的 WPI-IMO 中 α -LA 抗原性的影响

Fig.2 Effect of reaction time on the antigenicity of α -LA in WPI-IMO of different mass ratio

2.2.2 对 WPI-IMO 中 β -LG 抗原性的影响

热处理的 WPI 中 β -LG 的抗原性随时间延长增加，并且比相对应的 WPI-IMO 的 β -LG 抗原性都高，说明糖基化能起到降低热处理的 WPI 中的 β -LG 的抗原性的作用。 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 1，反应 12 h 内 β -LG 抗原性从 96.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降低到 41.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，随后随时间延长逐渐升高，但在 84 h 内 β -LG 抗原性均低于初始值。 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 4，反应 24 h 内 β -LG 抗原性从 97.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降低到 28.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，降低效果显著，随后随时间延长没有明显变化，在 120 h 内 β -LG 抗原性均低于初始值(图 3)。Corzo-Martinez^[9] 通过糖基化将半乳糖和塔格糖引入 β -LG，同样有效降低了 β -LG 的抗原性。

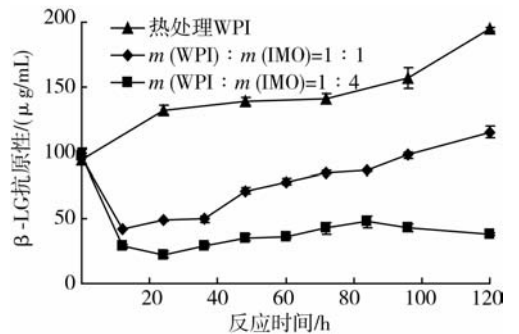


图 3 反应时间对不同 WPI 与 IMO 质量比的 WPI-IMO 中 β -LG 抗原性的影响

Fig.3 Effect of reaction time on antigenicity of β -LG in WPI-IMO of different mass ratio

糖基化产物的 α -LA 和 β -LG 抗原性变化与糖对抗原表位的掩蔽作用及在干热处理中 WPI 暴露的新的抗原表位有关。对照组 WPI 中的 α -LA 和 β -LG 抗原性随时间增加,这可能是因为干热处理中 WPI 不断暴露新的抗原表位,这与布冠好^[10]在不同温度湿法热处理 WPI 得到的结果一致。糖基化过程中, WPI-IMO 均一定程度低于相同条件下 WPI 中的 α -LA 和 β -LG 的抗原性,这可能是因为 IMO 不断与 WPI 结合掩蔽了抗原表位。当抗原性高于初始值时,可能是因为糖基化对抗原表位的掩蔽作用不足以抵消新暴露的抗原表位,抗原性低于初始值时,可能是因为糖基化对抗原表位的掩蔽作用可以抵消新暴露的抗原表位。

从 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 对 α -LA 和 β -LG 抗原性的影响看, $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 1 时,反应 12 h 内, α -LA 抗原性升高,而 β -LG 抗原性降低; $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 4 时,反应 12 h 内, α -LA 和 β -LG 抗原性均降低。Andras^[11] 研究表明葡萄糖与小麦蛋白糖基化不能降低小麦蛋白的抗原性,芦晶^[12] 研究表明葡萄糖与乳清蛋白糖基化能降低乳清蛋白的抗原性。这说明相同的糖对不同蛋白的抗原表位的掩蔽效果不同。

2.3 WPI 与 IMO 的质量比对 WPI-IMO 抗原性的影响

2.3.1 对 WPI-IMO 中 α -LA 抗原性的影响

热处理 WPI 中 α -LA 抗原性最高(图 4),这说

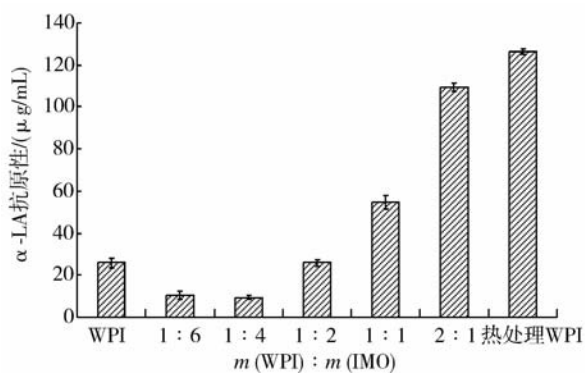


图 4 WPI 与 IMO 质量比对 WPI-IMO 中 α -LA 抗原性的影响

Fig. 4 Effect of mass ratio of WPI and IMO on antigenicity of α -LA in WPI-IMO

明 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 6 ~ 2 : 1 都有降低热处理 WPI 中的 α -LA 抗原性的作用。与 WPI 相比, $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 6 和 1 : 4 能有效的降低 α -LA 的抗原性, $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 2 没有效果, $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 1 和 2 : 1 的 WPI-IMO 中 α -LA 的抗原性比初始值高。这说明 α -LA 的抗原性随 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 的减小而下降。

2.3.2 对 WPI-IMO 中 β -LG 抗原性的影响

热处理 WPI 中 β -LG 抗原性最高,说明 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 6 ~ 2 : 1 都有降低热处理 WPI 中的 β -LG 抗原性的作用。与 WPI 相比, $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 6、1 : 4、1 : 2、1 : 1 能有效的降低 β -LG 的抗原性, $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 2 : 1 的 WPI-IMO 中 β -LG 抗原性比初始值高(图 5)。这说明 β -LG 的抗原性随 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 的减小而下降,这与布冠好^[13]对乳清蛋白与葡萄糖糖基化的研究结果相似。与图 4 相比, WPI-低聚异麦芽糖中 β -LG 抗原性降低的效果比 α -LA 好。

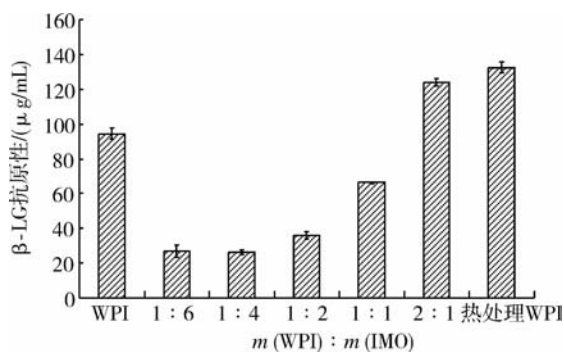


图 5 WPI 与 IMO 的质量比对 WPI-IMO 中 β -LG 抗原性的影响

Fig. 5 Effect of mass ratio of WPI and IMO on antigenicity of β -LG in WPI-IMO

3 结论

1) 低聚异麦芽糖在与乳清分离蛋白糖基化过程中能掩蔽一定的抗原表位,在一定条件下 IMO 能有效降低 WPI 中 α -LA 和 β -LG 的抗原性。

2) 当 $m(\text{WPI}) : m(\text{IMO})$ 为 1 : 6 ~ 2 : 1 时, α -LA 和 β -LG 的抗原性随 WPI 与 IMO 质量比的减小而降低。

参 考 文 献

- [1] Hattori M, Numamoto K, Kobayashi K, et al. Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(6):2050-2056
- [2] Enomoto H, Hayashi Y, Ohtomo H, et al. Glycation and phosphorylation of α -lactalbumin by dry heating: Effect on protein structure and physiological functions[J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(7):3057-3068
- [3] Hattori M, Miyakawa S, Ohama Y, et al. Reduced immunogenicity of β -Lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52:4546-4553
- [4] Slutter B, Soema P C, Ding Z, et al. Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen [J]. *Journal of Controlled Release*, 2010, 143(2):207-214
- [5] Lagemaat J, Manuel Silvan J, Javier Moreno F, et al. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins[J]. *Food Research Internationa*, 2007, 40(1):153-160
- [6] Chevalier F, Chobert J, Popineau Y, et al. Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar[J]. *International Dairy Journal*, 2001, 11(3):145-152
- [7] Sun Yuanxia, Hayakawa S, Puangmanee S, et al. Chemical properties and antioxidative activity of glycated α -lactalbumin with a rare sugar, D-allose, by Maillard reaction [J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(3):509-517
- [8] 杨远, 黄婧, 辛修峰, 等. 低聚异麦芽糖对肠道菌群的调节作用 [J]. *中国食品添加剂*, 2008(增刊):160-164
- [9] Corzo-Martinez M, Soria A C, Belloque J, et al. Effect of glycation on the gastrointestinal digestibility and immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin [J]. *International Dairy Journal*, 2010, 20(11):742-752
- [10] Bu Guan hao, Luo Yongkang, Zheng Zhe, et al. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2009, 20(3):195-206
- [11] Andras N, Marciniak-Darmochwat K, Krawczuk S, et al. Influence of glycation and pepsin hydrolysis on immunoreactivity of Albumin/globulin fraction of herbicide resistant wheat line [J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2009, 27(5):320-329
- [12] 芦晶. 乳清蛋白-糖的制备及功能评价研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2008
- [13] Bu Guan hao, Luo Yongkang, Lu Jing, et al. Reduced antigenicity of β -lactoglobulin by conjugation with glucose through controlled Maillard reaction conditions [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 21(2):143-156

(责任编辑: 刘迎春)