

加工处理对鲢小清蛋白免疫活性的影响

蔡秋凤^{1,2}, 王锡昌², 郭 城¹, 沈海旺¹, 刘光明¹, 曹敏杰^{1*}

(1. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 采用鱼丸加工、烘烤、油炸、高压 4 种方式对鲢进行加工, 并比较在这 4 种鲢制品中小清蛋白的含量、免疫活性以及体外模拟胃液消化稳定性的变化情况。通过 Tricine-SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析表明, 鱼丸加工、烘烤、油炸、高压等方式处理可降低鲢制品中小清蛋白的含量, 但在一定程度上提高了小清蛋白的胃液消化稳定性; 高压几乎可完全破坏小清蛋白的 IgG 结合能力, 是较为理想的降低食物过敏原免疫活性的加工方式之一。

关键词: 鲢; 小清蛋白; 加工; 免疫活性

中图分类号: Q 512; S 917

文献标志码: A

食物过敏是由过敏原与肥大细胞表面的 IgE 产生交联引发的 I 型超敏反应。尽管各种食物都可能引发人体产生过敏反应, 目前公认的“主要致敏食物”是指那些能引发机体产生严重不良反应的八大类食物, 包括牛奶、鸡蛋、花生、坚果、甲壳类动物、鱼类、小麦和大豆^[1], 目前鉴定的食物过敏原均为蛋白质。过敏原中与 IgE 产生交联的部位称为表位, 也称为抗原决定簇。同一过敏原, 可能同时含有线性表位和构象表位^[2]。因此, 采用一定的加工方式, 可在过敏食物被食用前改变其中过敏原表位的特性, 从而降低某些食物的致敏性。但是, 加工处理对不同食物过敏原的影响存在很大差异, 如热处理可以破坏蔷薇科果实的致敏性, 也能部分影响大豆、坚果、猕猴桃、鸡蛋、虾等过敏原的稳定性^[3-4], 而牛奶、花生等致敏食物的热稳定性却很好^[5-6]。

鱼类的主要过敏原为小清蛋白 (parvalbumin, PV), 是 Elsayed 等^[7]在 1971 年从鳕鱼 (*Gadus callarias*) 中发现的。尽管国际上对鱼类小清蛋白的研究已较为深入, 但关于食品加工方式对小清蛋白免疫活性的影响报道仍然很少。因此, 本实验采用鱼丸加工、烘烤、油炸、高压 4 种方式对鲢 (*Hopophthalmichthys molitrix*) 进行

加工, 并比较在这 4 种鲢制品中小清蛋白的含量、免疫活性以及体外模拟胃液消化稳定性的变化情况, 为进一步开发低致敏性水产制品提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用鲢购自厦门市集美菜市场。现杀后, 取去皮鱼肉进行烤鱼片、鱼丸制备。另切下带皮带骨肉块进行炸鱼块、鱼罐头的制备。

抗蛙小清蛋白单克隆抗体 (PARV-19) 购自 Sigma 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自 DAKO 公司; 蛋白质分子质量标准为 Fementas 公司和 New England Biolabs 公司产品; ECL 底物购自 Pierce 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 不同鲢加工制品的制作

鲢鱼丸的制作 将鲜活的鲢采肉、去骨、去皮。鱼肉切小块, 以冰水漂洗 2~3 次。脱水后, 用绞肉机充分绞匀。将肉糜于研钵中低温空擂 10 min, 再加入 3% 盐擂溃 10 min。用手将鱼丸成型, 于 40℃ 左右的水中定型 20 min, 再于沸水中加热, 至鱼丸全部漂起, 捞出, 于冰水中快速冷却即可。

收稿日期: 2012-06-20 修回日期: 2012-10-31

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31071519, 31171660); 福建省自然科学基金项目 (2010J01044, 2011J01227); 集美大学启动基金 (ZQ2011011)

通信作者: 曹敏杰, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

烤鲢鱼片的制作 将鲜活的鲢处理干净后,进行开片,控制肉片约 2 mm 厚度。将肉片反复漂洗干净,捞出沥水,于调味料液中浸泡 60 min。之后将腌渍好的鱼片摊在烘帘上,于烘箱中 30 ℃ 烘至含水量为 20% 左右,揭下,即得生鱼片。将生鱼片重新摊在烘帘上,于预热的烤箱中 180 ℃ 烘烤 2 min。烤好的鱼片趁热经面条机滚压即得烤鱼片成品。

炸鲢鱼块及鲢鱼罐头的制作 将鲢鱼块于盐水中浸泡 10 min,捞出沥水,于 180 ℃ 热油中油炸,炸至表面金黄即得炸鱼块。将炸好的鱼块与预先熬煮的汤汁一起装罐,于 100 ℃ 排气,至中心温度达 80 ℃ 后,拧紧盖子,于 115 ℃ 高压 20 min。高压处理后,采用分段冷却至 40 ℃,即得成品罐头。

1.3 小清蛋白粗提物的制备

新鲜的鲢鱼肉及 4 种鲢制品小清蛋白粗提物的制备参考汪宁等^[8]的方法进行。取 2 g 的样品于 5 倍体积 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液中组织捣碎,经 8 000 × g 离心 30 min 所得的上清即为小清蛋白粗提物。将所得的粗提物按 Kobayashi 等^[9]的方法进行 100 ℃ 加热 15 min, 8 000 × g 离心 30 min 后,所得上清即为小清蛋白热提取物。

1.4 模拟胃液消化

对不同鲢制品进行消化稳定性分析主要参考 Huang 等^[10]的方法进行。模拟胃液中使用的消化酶是猪胃蛋白酶,提取方法参考刘西之等^[11]的报道,酶活 109 U/mg, pH 1.2。将粗提物与模拟胃液混合后,于 37 ℃ 水浴锅中分别反应 0、1、5、10、15、30 和 60 min 后,迅速与 Na₂CO₃ 混匀,终止反应。对照样品中不加酶,仅将粗提物中于 37 ℃ 反应 60 min。

1.5 Tricine-SDS-PAGE

Tricine-SDS-PAGE 不连续梯度胶对于小分子量的蛋白质有很好的分离效果。因此,本研究参考 Schagger^[12]的方法采用 Tricine-SDS-PAGE 对小清蛋白进行分析。其中,丙烯酰胺在浓缩胶浓度为 4%,夹层胶浓度为 10%,分离胶浓度为 16%,蛋白上样量为 5 μg。电泳结束后,以考马斯亮蓝进行染色,脱色后用凝胶成像系统 (G: BOX, Syngene 公司) 记录结果。

1.6 Western-blotting

Western-blotting 参照 Towbin 等的方法^[13]进

行。由于商品化的抗蛙小清蛋白单克隆抗体 (PARV-19) 可以与鲢小清蛋白产生明显的免疫反应^[8],在本实验中以该抗体为一抗检测小清蛋白的免疫活性。Tricine-SDS-PAGE 电泳后,通过半干转膜方式将蛋白转移至硝酸纤维素膜,用 TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.145 mol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 清洗 5 次后,以 5% 脱脂奶室温封闭 1 h。TBS-T 清洗 5 次后,以 PARV-19 为一抗室温孵育 1 h。TBS-T 清洗 5 次后,用 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 为二抗室温孵育 1 h。TBS-T 清洗 5 次后,加入 ECL 底物孵育 2 min,在化学发光成像系统 (Fluor Chem Q, Alpha Innotech 公司) 曝光 1 ~ 2 min 记录结果。

2 结果与讨论

2.1 不同鲢制品粗提物的分析比较

小清蛋白在各种鱼类中广泛存在,是鱼类的主要过敏原,分子量在 10 ~ 14 ku,主要存在于鱼肉的肌浆部分^[14-15]。因此,本实验采用肌浆蛋白的提取方法制备小清蛋白的粗提物。将新鲜鲢鱼肉及制作的 4 种鲢制品分别取一定的量进行小清蛋白粗提物的制备 (图 1)。与新鲜鲢鱼肉的粗提物 (泳道 2) 相比,鱼丸加工 (泳道 3)、烘烤 (泳道 4)、油炸 (泳道 9)、高压 (泳道 5) 等食品加工方式可大大降低 4 种鲢制品粗提物中的蛋白质含量,尤其是 25 ~ 45 ku 的蛋白组分经过这 4 种加工处理,其含量大为降低,该变化在烘烤的样品中最为明显。但烘烤及油炸处理后的样品,其小清蛋白 (分子量约 12 ku) 的含量与新鲜鱼肉相比,变化并不明显。尽管由于小清蛋白是水溶性蛋白,在鱼丸制备过程中的漂洗步骤可降低小清蛋白的含量,但在成品鱼丸中,仍存在一定量的小清蛋白。在鲢鱼罐头样品中,小清蛋白含量降低最为明显,且出现一定的降解条带。由于在鲢鱼罐头的制备工艺中有高温油炸工艺,为了分析究竟是高压还是油炸造成小清蛋白含量的减少,本实验进一步对油炸、高压后的汤汁等样品进行了分析。

如图 1 泳道 6 所示,以非油炸的鱼块进行的高压处理,样品中小清蛋白含量也大大下降了,因此,推测鲢鱼罐头中小清蛋白含量的降低主要是由高压引起的。在制备鲢鱼罐头时,是将鱼块与汤汁灌装后进行高压处理。因此,将汤汁制样进行分析,如图 1 泳道 7、8 所示,无论是油炸还是非

油炸制品,在汤汁中均有大量小清蛋白的存在。该结果表明,在高压过程中,大量水溶性的蛋白质,包括小清蛋白都溶解到汤汁中,从而造成了罐头鱼肉中小清蛋白含量的明显降低。从图中可以看出,罐头汤汁中小清蛋白的含量甚至高于罐头鱼肉。

目前已报道的小清蛋白主要有 α 和 β 2 种类型,且同一类型的小清蛋白还可能存在不同的异构体,这些异构体可共存于同一鱼类中^[16-17]。从图 1 泳道 1 的鲢鱼肉热抽提样品中可以观察到至少 2 种类型的小清蛋白,分子量分别约为 12 和 14 ku。在罐头样品中可以观察到 14 ku 条带的明显变化。泳道 8,即不经过油炸制备的鲢鱼罐头的汤汁中,14 ku 的条带含量明显高于经过油炸制备的鲢鱼罐头汤汁,表明在油炸过程中,有小清蛋白溶出,该结果也可以从泳道 2 与泳道 9 的对比中看到。因此,炸过鱼的油中即含有一定量的小清蛋白,其剂量可能足以引发过敏患者产生不良反应。Añibarro 等^[18]就报道了 2 例因食入用炸过鱼的油炸的非致敏食物引发的不良反应。

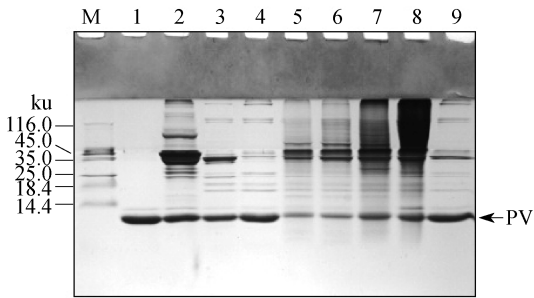


图 1 鲢制品粗提物的 Tricine-SDS-PAGE 分析
M. 蛋白分子量标准; 1. 对照(热抽提的小清蛋白); 2. 新鲜鲢鱼肉; 3. 鲢鱼丸; 4. 烤鲢鱼片; 5. 油炸鲢鱼罐头; 6. 非油炸鲢鱼罐头; 7. 油炸鲢鱼罐头汤汁; 8. 非油炸鲢鱼罐头汤汁; 9. 炸鲢鱼块。

Fig.1 Tricine-SDS-PAGE analysis of crude extracts from different silver carp processed products
M. protein marker; 1. control; 2. fresh fish; 3. fish ball; 4. roast fish; 5. canned fish with fry process; 6. canned fish without fry process; 7. soup of the canned fish without fry process; 8. soup of the canned fish with fry process; 9. fried fish.

采用 Western-blotting 方法,以抗蛙小清蛋白单克隆抗体分析不同加工处理对小清蛋白免疫活性的影响。从图 2 看出,5、6、7、8 泳道中的样品在经过高压处理后,其中的小清蛋白几乎无法通过 Western-blotting 检测到,可能是因为其抗原结

合位点被破坏的原因。而在鱼丸、烤鱼片、炸鱼块等样品中仍然可以检测到小清蛋白,其中鱼丸样品的含量最低,在炸鱼块中,其 14 ku 条带的含量明显降低,该结果表明,鱼丸加工、烘烤、油炸、高压 4 种加工方法均可在一定程度上降低制品中小清蛋白的含量,其中高压的作用最为明显,其次为鱼丸加工,且高压处理对破坏小清蛋白的免疫活性具有显著效果。Sletten 等^[19]分析了市售的不同鱼类加工制品的免疫活性变化情况,提出虽然个体对不同过敏原的反应存在差异,但加工引起的鱼类过敏原免疫活性的改变主要取决于加工方式,与鱼种关系较小。

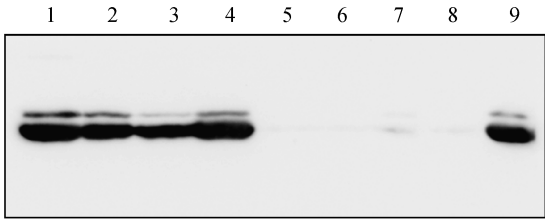


图 2 鲢制品粗提物的 Western-blotting 分析
1. 对照(热抽提的小清蛋白); 2. 新鲜鲢鱼肉; 3. 鲢鱼丸; 4. 烤鲢鱼片; 5. 油炸鲢鱼罐头; 6. 非油炸鲢鱼罐头; 7. 油炸鲢鱼罐头汤汁; 8. 非油炸鲢鱼罐头汤汁; 9. 炸鲢鱼块。

Fig.2 Western-blotting analysis of crude extracts from different silver carp processed products
1. control; 2. fresh fish; 3. fish ball; 4. roast fish; 5. canned fish with fry process; 6. canned fish without fry process; 7. soup of the canned fish without fry process; 8. soup of the canned fish with fry process; 9. fried fish.

2.2 不同鲢制品中小清蛋白消化稳定性的 Tricine-SDS-PAGE 分析

由于胰蛋白酶对小清蛋白几乎不具有分解作用^[20],本实验采用胃蛋白酶分析不同鲢制品中小清蛋白的消化稳定性。图 3 为新鲜鲢鱼肉以及 4 种鲢制品粗提物的胃液消化稳定性分析。

从图 3-a 可以看出,在新鲜鲢鱼肉粗提物中,当胃蛋白酶的作用时间为 1 min 时,即可观察到小清蛋白产生较明显的分解现象。当作用时间延长至 5 min 时,可观察到新的降解条带产生。随着作用时间延长至 30 min,可观察到第 3 条更小的条带产生。当作用时间延长至 60 min 时,在 12 ku 附近仍可观察到条带存在,但由于肌浆蛋白中存在较多的蛋白组分,在胃蛋白酶的作用下,产生许多降解条带,因此,难以对这些条带进行有效区分,需进一步通过 Western-blotting 验证。

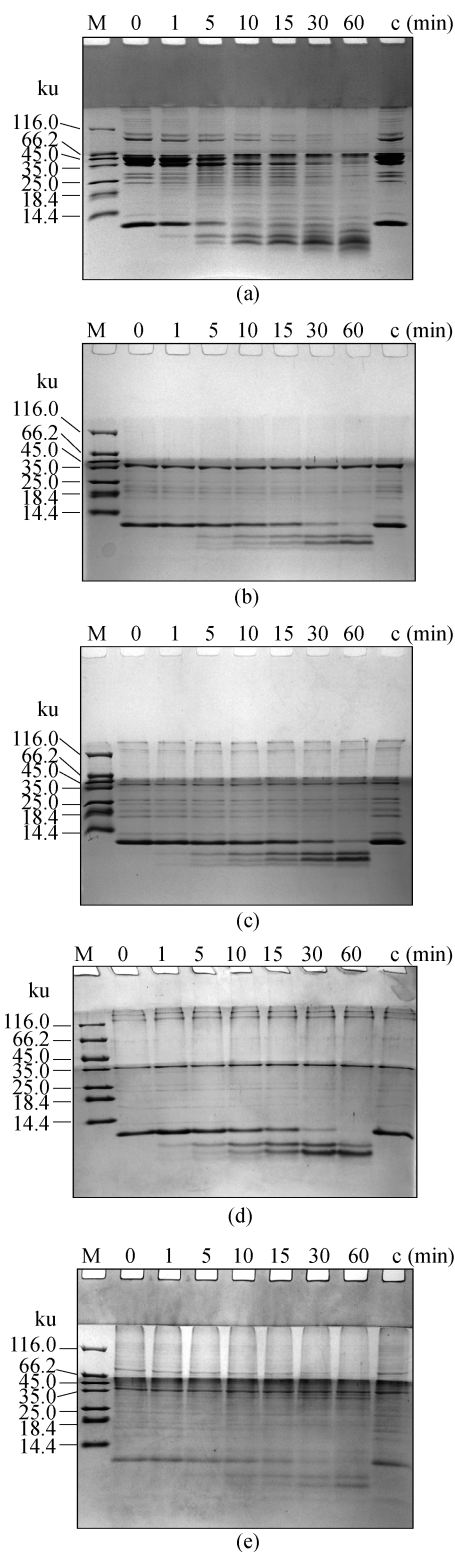


图3 不同鲢制品模拟胃液消化的 Tricine-SDS-PAGE 分析
(a)新鲜鲢鱼肉; (b)鲢鱼丸; (c)烤鲢鱼片; (d)炸鲢鱼块;
(e)鲢鱼罐头; M. 蛋白分子量标准; c. 对照。

Fig.3 Tricine-SDS-PAGE analysis of simulated gastric fluid digestion of different silver carp processed products
(a) fresh silver carp muscle; (b) silver carp fish ball; (c) roast silver carp; (d) fried silver carp; (e) canned silver carp; M. protein marker; c. control.

图 3-b 为鲢鱼丸肌浆蛋白的胃液消化稳定性结果。从图中可以看出,当胃蛋白酶的作用时间为 5 min 时,可观察到小清蛋白的分解现象,但分解作用与新鲜鱼肉样品相比较并不明显。当作用时间延长至 30 min 时,其分解效果与新鲜鱼肉胃蛋白酶作用 10 min 的效果类似。随着作用时间的延长,产生的分解条带密度逐渐加深,但没有新的降解条带产生。烤鲢鱼片(图 3-c)、炸鲢鱼块(图 3-d)、鲢鱼罐头(图 3-e)样品中也观察到了类似的结果。

2.3 不同鲢制品中小清蛋白消化稳定性的 Western-blotting 分析

与新鲜鱼肉相比,经过鱼丸加工、烘烤以及油炸等方式处理后,小清蛋白的消化稳定性有一定程度的增强,但高压处理会导致小清蛋白的 IgG 结合能力几乎完全丧失,检测不到反应条带,表明高压对于降低甚至消除小清蛋白的免疫活性具有较好的效果。从 Tricine-SDS-PAGE 结果看,高压后的样品经胃蛋白酶处理 30 min 内,仍可以观察到较为明显的小清蛋白条带,但 Western-blotting 却检测不到任何条带,提示高压可能使小清蛋白的位点结构产生较大的变化(图 4)。

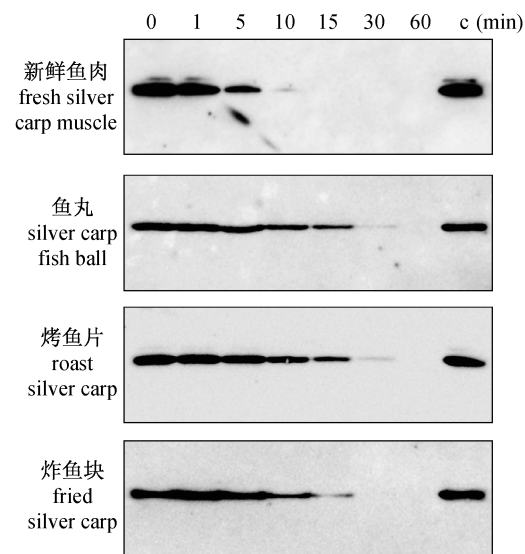


图4 不同鲢制品模拟胃液消化的 Western-blotting 分析
Fig.4 Western-blotting analysis of simulated gastric fluid digestion of different silver carp processed products

3 结论

本实验采用鱼丸加工、烘烤、油炸、高压等常见的食品加工方式对鲢鱼肉进行处理,并通过

Tricine-SDS-PAGE 和 Western-blotting 方法检测不同加工制品中鱼类主要过敏原小清蛋白的含量及免疫活性的变化,分析了变化产生的可能原因。结果表明,鱼丸制备过程的漂洗操作可降低小清蛋白的含量,但在鱼丸中仍有大量小清蛋白存在;油炸会导致部分小清蛋白溶出,这也是导致过敏食物交叉污染的原因之一;鱼丸加工、烘烤、油炸等方式虽然可在一定程度上提高小清蛋白的胃液消化稳定性,但高压可几乎完全破坏小清蛋白的 IgG 结合能力,是较为理想的消除食物过敏原免疫活性的加工方式之一。

参考文献:

- [1] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010, 125 (suppl. 2): 116 – 125.
- [2] Sathe S K, Sharma G M. Effects of food processing on food allergens [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2009, 53 (8): 970 – 978.
- [3] Grozdanovic M, Popovic M, Polovic N, *et al.* Evaluation of IgE reactivity of active and thermally inactivated actinidin, a biomarker of kiwifruit allergy [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50 (3 – 4): 1013 – 1018.
- [4] 郑礼娜, 林洪, 刘一璇, 等. 不同热加工方式对刀额新对虾过敏原活性的影响 [J]. 水产学报, 2011, 35 (2): 466 – 471.
- [5] Tong P, Gao J Y, Chen H B, *et al.* Effect of heat treatment on the potential allergenicity and conformational structure of egg allergen ovotransferrin [J]. Food Chemistry, 2012, 131 (2): 603 – 610.
- [6] Cabanillas B, Maleki S J, RodríGuez J, *et al.* Heat and pressure treatments effects on peanut allergenicity [J]. Food Chemistry, 2012, 132 (1): 360 – 366.
- [7] Elsayed S, Aas K. Isolation of purified allergens (cod) by isoelectric focusing [J]. International Archives of Allergy and Applied Immunology, 1971, 40 (3): 428 – 438.
- [8] 汪宁, 蔡秋凤, 刘光明, 等. 鲢骨骼肌过敏原小清蛋白的分离纯化及多克隆抗体制备与应用 [J]. 水产学报, 2010, 34 (1): 41 – 46.
- [9] Kobayashi A, Tanaka H, Hamada Y, *et al.* Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles [J]. Allergy, 2006, 61 (3): 357 – 363.
- [10] 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.
- [11] 刘西之, 邱晓燕, 蔡秋凤, 等. 青石斑鱼胃蛋白酶原的分离纯化及酶学性质研究 [J]. 水产学报, 2011, 35 (11): 163 – 172.
- [12] Schägger H. Tricine-SDS-PAGE [J]. Nature Protocols, 2006, 1 (1): 16 – 22.
- [13] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 1979, 76 (9): 4350 – 4354.
- [14] Ma Y, Griesmeier U, Susani M, *et al.* Comparison of natural and recombinant forms of the major fish allergen parvalbumin from cod and carp [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2008, 52 (Suppl. 2): 196 – 207.
- [15] Van Do T, Hordvik I, Endresen C, *et al.* Characterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollack, and comparison with codfish Allergen M [J]. Molecular Immunology, 2005, 42 (3): 345 – 353.
- [16] Goodman M, Pechere J F. The evolution of muscular parvalbumins investigated by the maximum parsimony method [J]. Journal of Molecular Evolution, 1977, 9 (2): 131 – 158.
- [17] Chen L, Hefle S L, Taylor S L, *et al.* Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54 (15): 5577 – 5582.
- [18] Añíbarro B, Seoane F J, Múgica M V. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions [J]. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 2007, 17 (3): 168 – 172.
- [19] Sletten G, Van Do T, Lindvik H, *et al.* Effects of industrial processing on the immunogenicity of commonly ingested fish species [J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2010, 151 (3): 223 – 236.
- [20] 刘光明, 黄园园, 蔡秋凤, 等. 淡水鱼类主要过敏原的模拟肠胃液消化 [J]. 水产学报, 2010, 34 (7): 1136 – 1142.

Effects of processing methods on the immunoreactivity of silver carp parvalbumin

CAI Qiufeng^{1,2}, WANG Xichang², GUO Cheng¹, SHEN Haiwang¹, LIU Guangming¹, CAO Minjie^{1*}

(1. School of Biotechnology Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Parvalbumin (PV) is the major allergen in fish products, which could induce serious IgE-mediated food anaphylaxis when sensitive people encountered with it. A variety of clinical symptoms including angioedema, respiratory symptoms, gastrointestinal symptoms, and even death could be caused after ingestion or contact with fish or fish products or even just inhalation of fish cooking vapors. Besides monitoring the allergens in foods, reducing allergenicity of fish products is another important way to decrease the incidence of fish allergy. Therefore, the purpose of this study was to analyze the change of immunoreactivity and digestion stability of parvalbumin after different food processings. Four processing methods including surimi preparation, roast, fried, high pressured methods were evaluated in this study. Tricine-SDS-PAGE and Western-blotting were used to determine the variation of contents, immunoreactivity and digested stability of parvalbumin in the processed products. The results showed that, though surimi preparation, roast, and fried processing could increase the gastric stability, high pressure processing could effectively reduce the content and immunoreactivity of parvalbumin in fish products. And the significance of these findings remains to be established.

Key words: *Hopophthalmichthys molitrix*; parvalbumin; processing; immunoreactivity

Corresponding author: CAO Minjie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn