# 超高压处理对苦杏仁分离蛋白结构和致敏性的影响

朱乾乾[1,2]，陈静静[1,2]，张 涛[1,2]，江 波[*1,2]

（1. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学，食品安全国际联合实验室，江苏 无锡 214122）

**摘要：** 苦杏仁中含有多种生物活性组分和营养素，具有较高的营养价值，但苦杏仁具有致敏性，过敏人群食用含有苦杏仁的食品后可能会产生过敏的风险。为探究超高压处理对苦杏仁分离蛋白结构和致敏性的影响，对杏仁分离蛋白进行不同压力处理，并利用圆二色谱、外源荧光光谱和酶联免疫吸附实验对其空间结构和致敏性进行表征。结果表明：苦杏仁分离蛋白 100~500 MPa 压力处理苦杏仁分离蛋白 900 s 后，苦杏仁分离蛋白其二级结构未发生显著变化。随着压力强度和保压时间的增加，苦杏仁分离蛋白的三级结构展开，荧光强度增加，疏水性基团暴露，表面疏水性逐渐增大，致敏性显著降低。苦杏仁分离蛋白致敏性的降低，可能是苦杏仁的过敏原构象表位发生了变化。该研究结果对开发安全的苦杏仁食品和饮料具有重要意义。

**关键词：** 超高压；苦杏仁分离蛋白；结构；致敏性

**中图分类号：**TS 255.1　**文章编号：**1673-1689(2020)10-0034-06　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.10.005

# Effect of Ultra-High Pressure on Structure and Immunoreactivity of Bitter Apricot Kernel Protein Isolate

*ZHU Qianqian*[1,2]，*CHEN Jingjing*[1,2]，*ZHANG Tao*[1,2]，*JIANG Bo*[*1,2]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Bitter apricot kernel contains various bioactive components and nutrients and can be used as value-added food ingredients. However, it is also an allergen which may cause risk to allergic people if they consume foods containing bitter apricot kernel.To investigate the impact of ultra-high pressure on the structure and immunoreactivity of bitter apricot kernel protein isolate, the spatial structure and allergenicity under different pressures were detected by circular dichroism, fluorescence spectroscopy and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results demonstrated that ultrahigh pressure treatment at 100~500 MPa for 900 s insignificantly changed the secondary structure of bitter apricot kernel protein isolate. However, with the increase of pressure intensity and processing time, the tertiary structure of bitter apricot kernel protein isolate was unfolded and the hydrophobic groups were thus exposed, which led to the increase of fluorescence

**收稿日期：** 2019-12-25

**基金项目：** 国家重点研发计划项目(YFC1600902)。

* **通信作者：** 江 波(1962—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品化学和应用酶技术研究。E-mail：bjiang@jiangnan.edu.cn

intensity and surface hydrophobicity and the decrease of immunoreactivity. The reduced immunoreactivity of bitter apricot kernel protein isolate was possibly due to the changes of conformational epitopes causing food allergy. This study may provide important implications for the development of safe bitter apricot kernel food and beverage products.

**Keywords:** ultra-high pressure, bitter apricot kernel protein isolate, structure, immunoreactivity

食物过敏是由于进食含有过敏原的食物引起的免疫反应。症状主要包括皮肤瘙痒、咳嗽、恶心、呕吐等。引起食物过敏的食品主要包括奶类、禽蛋类、鱼类、甲壳类、花生、大豆、坚果类和小麦[1]。预防食物过敏的最好方式就是完全避免接触过敏食物。与此同时,越来越多的研究人员致力于通过食品加工过程来消除或减少食物中的过敏原。大部分过敏原是蛋白质,加工处理会掩盖或展开引起过敏的抗原表位,从而降低或提高对抗原的识别,进而改变过敏性食物的致敏性。迄今为止,用于消除食物致敏原的加工技术有热处理、美拉德反应、发酵、辐射、酶法水解和超高压技术[2]。超高压技术是一种替代性食品保存技术,具有保留食品感官和营养品质的特性。通过高压使蛋白质结构破裂或形成非共价键、静电相互作用、疏水相互作用和氢键改变蛋白质结构,也可以诱导形成新的二硫键来稳定变性蛋白或使蛋白质聚集[3]。近年来,利用超高压技术降低或消除食品致敏性的报道较多,例如利用超高压技术来降低牛奶、大豆、花生等食品的致敏性[4]。

苦杏仁是一种富含必需脂肪酸、蛋白质、膳食纤维和其他功能性成分的坚果,油脂质量分数为45%~50%,蛋白质23.6%~26.2%,苦杏仁苷约为3%[5]。据报道,苦杏仁在我国新疆、河北和山东等地种植面积广,资源丰富,2016年产量达$2.6\times10^6$吨。现代医学研究表明,苦杏仁具有止咳、祛痰的功效[6]。杏仁乳是由杏仁和水均质获得的胶体分散体系,近年来,杏仁乳被作为乳糖不耐症人群的替代乳品,在市场上广受欢迎。但苦杏仁含有和美国大杏仁almond相同的过敏原成分amandin[7]。二维电泳结果显示,美国大杏仁almond种子含有188种不同的蛋白质[8]。据世界卫生组织和国际免疫学会联盟过敏原命名小组委员会报道,美国大杏仁almond中含有5种过敏原,命名为Prudu 3、Prudu 4、Prudu 5、Prudu 6和Prudu 8。Prudu 6是11S类大豆球蛋白,相对分子质量约为$3.6\times10^5$,被称为amandin,是美国大杏仁almond最主要的过敏原成分。

国外关于美国大杏仁almond过敏性的研究,主要有热加工、辐射和超高压处理。辐射处理不能改变almond杏仁蛋白结构及其致敏性,辐射处理和高压灭菌,也不能明显地改变almond杏仁蛋白的结构和致敏性[9]。almond杏仁过敏原热稳定性好,且不受辐射处理的影响。Li等人通过多克隆抗体的ELISA实验证明,超高压处理对almond杏仁致敏性没有影响,但Santosh Dhakal等人通过amandin的4C10(构型表位)和4F10(线性表位)表位分别制备的抗体,证实超高压能够降低美国大杏仁almond的致敏性。在450、600 MPa,30 ℃处理600 s,4C10相关表位的免疫反应性低于5%,4F10相关表位的免疫反应性大约为50%[10]。而关于超高压处理对苦杏仁分离蛋白结构和整体致敏性影响等方面的研究比较少。作者研究不同超高压强度处理对苦杏仁分离蛋白分离物结构和致敏性的影响,以期为超高压处理在食品致敏性方面的应用提供理论参考和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

苦杏仁种子:市售;丙烯酰胺、N-N-亚甲基双丙烯酰胺和四甲基乙二胺:生工生物工程(上海)股份有限公司产品;福林酚、8-苯胺-1-萘磺酸铵盐:美国Sigma-Aldrich产品;杏仁过敏原ELISA试剂盒:德国Pribolab公司产品;其他化学试剂均为分析纯产品。

### 1.2 仪器与设备

超高压设备:包头九久科技发展有限公司产品;紫外可见分光光度计:岛津(上海)有限公司产品;圆二色谱:英国应用物理公司产品;F-7000荧光分析仪:日本日立公司产品。酶标仪:美国Molecular Devices公司产品。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 苦杏仁分离蛋白的制备

1)脱脂:将苦杏仁浸泡 20 h,去皮,40 ℃真空干燥 10 h。研磨成粉末,以 1 g:10 mL 的比例加入丙酮,磁力搅拌 2 h 进行脱脂,重复 3 次。在通风橱中过夜蒸发剩余丙酮,研磨均匀。

2)苦杏仁分离蛋白的提取:以 1 g:10 mL 的比例加入 pH 8.1 的 20 mmol/L Tris-HCl 的溶液,4 ℃磁力搅拌 2 h,重复两次,提取粉末中的苦杏仁分离蛋白分离物。8 000 *g* 离心 20 min,取上清液,过 0.45 μm 纤维素膜[11]。

**1.3.2 苦杏仁分离蛋白质量浓度测定** 通过福林酚法测定提取液中苦杏仁分离蛋白的质量浓度[12]。取 1 mL 分离蛋白溶液,与 5 mL 溶液 A 和溶液 B 的混合液(体积比 1:1)反应 10 min,再加入 0.5 mL 的福林酚溶液反应 30 min,在 650 nm 处测定吸光度值。以牛血清蛋白为标样制定标准曲线,$R^2$=0.99。用 pH 8.1 的 20 mmol/L Tris-HCl 的溶液将其稀释为 2 mg/mL,为后面的实验定量。

1)溶液 A:准确称取 10 g 碳酸钠,2 g 氢氧化钠和 0.25 g 酒石酸钾钠溶于 500 mL 去离子水中。

2)溶液 B:准确称取 0.25 g 五水合硫酸铜溶解于 50 mL 去离子水中。

**1.3.3 超高压处理** 取 5 mL 溶液置于超高压设备腔体中,自动升压至所需压力。加压结束后,瞬间降压,取出样品,立即放入冰中保存。在 100~500 MPa 下处理 900 s,研究不同强度的高压处理对苦杏仁分离蛋白的影响。在 500 MPa 下处理 0~900 s,研究不同加工时间对苦杏仁分离蛋白结构和性质的影响。加压处理在常温(25 ℃)条件下进行。

**1.3.4 远紫外圆二色光谱的测定** 将处理前后的苦杏仁分离蛋白溶液样品稀释为 0.05 mg/mL,将溶液置于 1 mm 的石英比色皿中,样品的扫描波长范围 195~260 nm,扫描 3 次取平均值,步进分辨率为 1 nm,采集时间为 1 s,带宽为 1 nm,需扣除蛋白溶解缓冲液的背景。在计算中假设氨基酸残基均值为 900,圆二色性以残基摩尔椭圆率表示,二级结构组成通过系统自带的 CDMN 软件分析。

**1.3.5 外源荧光光谱的测定** 将处理前后的苦杏仁分离蛋白溶液样品稀释成 0.20 mg/mL,取 20 μL 的 ANS 溶液(8.0 mmol/L 溶于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1))加至 4 mL 的样品溶液中,混合均匀,立即在激发波长为 550 nm,发射波长为 500~850 nm,狭缝为 2.5 nm 条件下扫描其荧光光谱[13]。

**1.3.6 表面疏水性指数($H_0$)测定** 将苦杏仁样品稀释成 0.005~0.20 mg/mL 的溶液[14]。然后将 20 μL 的ANS 溶液(8.0 mmol/L 溶于 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.1))加至 4 mL 的样品液中,混合均匀,立即在激发波长 550 nm,发射波长 549 nm,狭缝为 2.5 nm 的条件下测定其荧光强度。荧光强度相对于蛋白质量浓度的初始斜率,被定义为蛋白表面疏水性指数($H_0$)。

**1.3.7 SDS-PAGE** 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对超高压处理前后的苦杏仁分离蛋白组分进行分析[6]。电泳分离胶质量浓度为 12 g/dL,浓缩胶质量浓度为 4 g/dL。将样品与缓冲液以体积比 1:4 混合,沸水浴煮沸 10 min 后上样,电压为 120 V。电泳完毕,采用考马斯亮蓝染色液 G-250 染色 2 h,过夜脱色后进行凝胶成像。

**1.3.8 苦杏仁分离蛋白致敏性的测定** 处理前后样品的致敏性通过杏仁过敏原 ELISA 试剂盒进行检测[15]。取 100 μL 上清液加到 96 孔酶标板,室温下孵育 20 min。然后每孔加入 300 μL 洗涤缓冲液清洗 3 次,用力甩干。每孔加入 100 μL 培养物(苦杏仁过氧化物酶)到每孔中,室温下培育 20 min,如前洗涤 3 次。每孔加入 100 μL 培养基溶液,室温下允许暗处反应 20 min。每孔添加 100 μL 停止液(0.5 mol/L $H_2SO_4$)终止酶反应。测定其在 450 nm 波长处的吸光值。

## 2 结果与分析

### 2.1 超高压处理对苦杏仁分离蛋白二级结构的影响

超高压处理苦杏仁分离蛋白的圆二色谱图如图 1 所示。苦杏仁分离蛋白的二级结构由 α-螺旋、β-折叠、β-转角及无规则卷曲组成。208 nm 和 222 nm 处出现负峰,表明 α-螺旋的存在;218 nm 处出现宽的负峰,表明 β-折叠的存在。圆二色谱图显示,随着超高压处理强度逐渐增加,处理前后苦杏仁分离蛋白样品的负峰对应波长维持不变,负峰强度基本没有发生变化,表明 α-螺旋和 β-折叠的含量不变。通过 CDMN 软件分析组分含量,与图谱显示信息一致。研究结果显示,超高压处理不影响蛋白样品的二级结构,该处理方法对苦杏仁分离蛋白二级结构的构成所引起的致敏性没有显著影响。

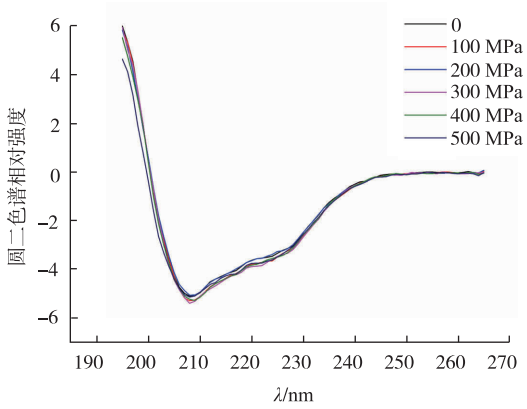



图 1　超高压处理对苦杏仁分离蛋白圆二色谱图的影响

**Fig. 1　CD results of bitter apricot kernel protein isolate subjected to different pressure treatments under the same processing time**

## 2.2　超高压处理对苦杏仁分离蛋白三级结构的影响

图 2 描述了不同强度超高压处理以及 500 MPa 处理不同时间对应的苦杏仁分离蛋白荧光光谱图。由图可知,当超高压处理的时间固定为 900 s 时,随着压强的增加,苦杏仁分离蛋白在波长为 500~850 nm 的范围内,荧光强度增加,压强达到 500 MPa 时,荧光强度显著增加,表明苦杏仁分离蛋白的疏水区域增加。另外,当压强固定为 500 MPa 时,随着加压时间的增加,荧光强度逐渐增加。在较高压强与较长时间的条件下,超高压处理可能导致疏水性基团的暴露,改变苦杏仁分离蛋白的三级结构,影响苦杏仁分离蛋白的构型表位,进一步降低或增加苦杏仁分离蛋白致敏性。

## 2.3　超高压处理对苦杏仁分离蛋白表面疏水性的影响

为进一步研究超高压处理对苦杏仁分离蛋白三级结构的影响,证明荧光强度的增加是由于疏水性基团暴露所引起的,作者研究了不同压强、时间处理后苦杏仁分离蛋白的表面疏水性变化,结果如图 3 所示。表面疏水性通常被用作蛋白构象改变的探针。100~400 MPa 处理 900 s 时,苦杏仁分离蛋白的表面疏水性没有发生明显变化,当压强达到 500 MPa 时,表面疏水性显著增加。在 500 MPa 的强度下处理不同时间,随着加压时间的增大,表面疏水性逐渐增大。表面疏水性的变化趋势表明超高压处理导致蛋白结构的展开,使内部疏水区域暴露,从而增强了表面疏水性强度。

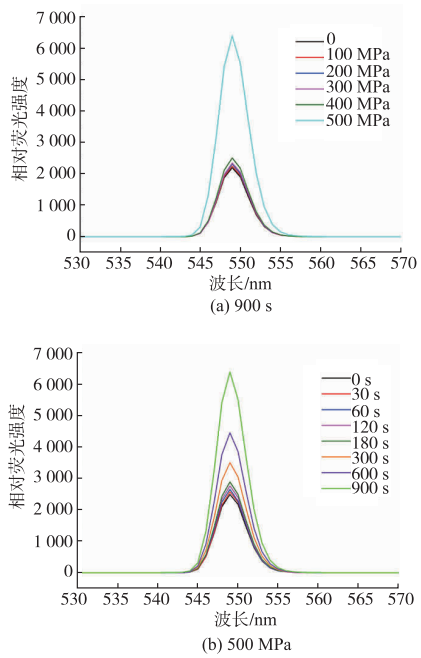



图 2　不同压强处理 900 s 和 500 MPa 处理不同时间对苦杏仁分离蛋白荧光光谱的影响

**Fig. 2　Fluorescence spectroscopy results of bitter apricot kernel protein isolate subjected to 500 MPa pressure treatment for 900 s**

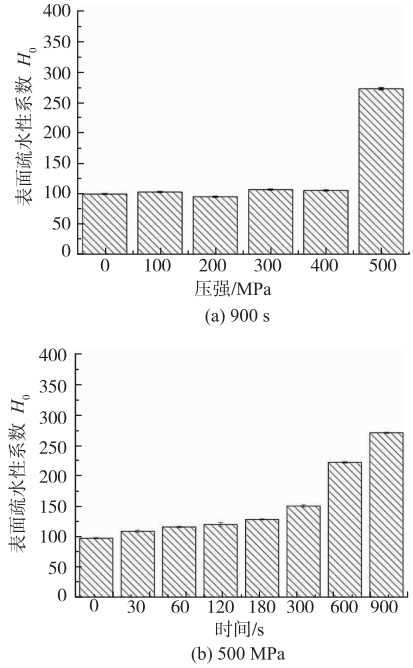



图 3　不同压强处理 900 s 和 500 MPa 处理不同时间对苦杏仁分离蛋白表面疏水性的影响

**Fig. 3　Surface hydrophobicity results of bitterapricot kernelproteinisolate that were subjected to 500 MPa pressure treatment for 900 s**

### 2.4 超高压处理对苦杏仁分离蛋白 SDS-PAGE的影响

在非还原电泳中，苦杏仁主要蛋白 amandin 主要由相对分子质量为 61 000 和 63 000 的多肽组成。每个多肽都由一个酸性亚基(42 000~46 000)和一个碱性亚基(20 000~22 000)组成，亚基之间通过二硫键相连[19]。在存在还原剂的条件下，amandin 的 SDS-PAGE 图显示相对分子质量为 44 000、42 000、28 000 的条带或 41 000、39 000、22 000 和 21 000 大小的条带。超高压处理前后杏仁蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 4 所示，未处理杏仁蛋白(通道 0)的泳道中可以清晰地看到 61 000、63 000、41 000 和 39 000 的多肽条带，在 100~400 MPa 处理 900 s 时，苦杏仁分离蛋白的条带没有发生明显变化；当超高压的强度为500 MPa，处理 900 s 时，伴随有大相对分子质量条带的减弱，以及小相对分子质量条带的形成。SDS-PAGE 图也显示 500 MPa 处理 0~300 s 时，多肽条带不会改变；当处理 600、900 s 时，61 000 和 63 000 的条带强度减弱，伴随有约 45 000 大小的条带生成，可能是由于苦杏仁分离蛋白的不完全裂解造成的。结果与 Sathe 等人结果一致，他们认为在 450~600 MPa 压力强度处理时，杏仁蛋白 amandin 相对分子质量为 61 000 和 63 000 的条带逐渐减弱，伴随着 20 000 和 40 000 条带的生成[10]。超高压处理可能使蛋白质结构展开，导致二硫键的断裂或重组。

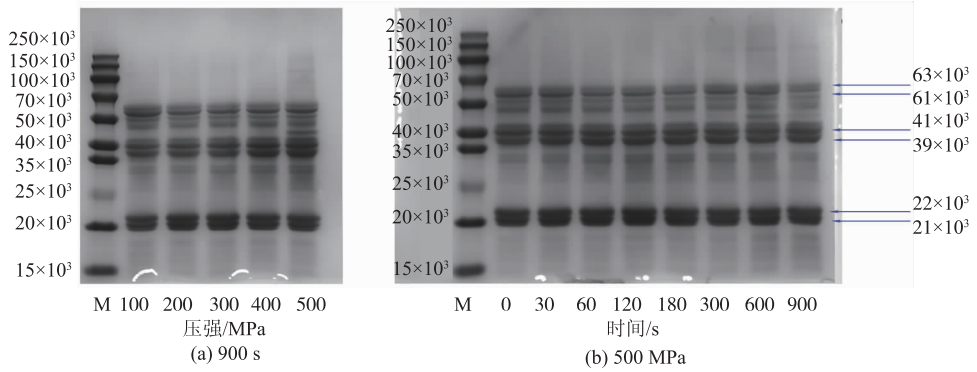



**图 4 不同压强处理 900 s 和 500 MPa 压力下处理不同时间对苦杏仁分离蛋白 SDS-PAGE 的影响**

**Fig. 4 SDS-PAGE results of bitter apricot kernel protein isolate subjected to 500 MPa for 900 s**

### 2.5 超高压处理对苦杏仁分离蛋白致敏性的影响

图 5 显示超高压处理后苦杏仁分离蛋白的免疫反应性发生了变化，100~500 MPa 处理 900 s 后，苦杏仁分离蛋白的致敏性逐渐降低。在 500 MPa 处理 900 s 的条件下，苦杏仁分离蛋白的致敏性可以降低到 25.69%，所以在后续实验中采用此压力强度。由图可知，500 MPa 处理 0~900 s，杏仁蛋白的免疫反应性显著下降，900 s 时免疫反应性的下降最为显著。苦杏仁分离蛋白经超高压处理后致敏性的下降，可能是由于超高压处理引起蛋白质构象的变化引起的。Li 等认为超高压处理能够引起大豆蛋白结构的伸展与变性，也能引起蛋白质的解聚或聚合[17]。

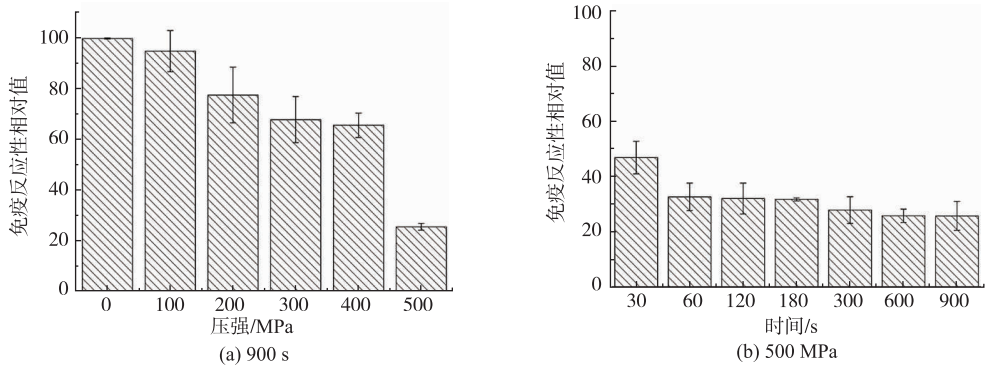



**图 5 不同压强处理 900 s 和 500 MPa 处理不同时间对苦杏仁分离蛋白免疫反应性的影响**

**Fig. 5 ELISA results of allergens in bitter apricot kernel protein isolate subjected to 500 MPa for 900 s**

## 3 结 语

超高压处理在降低食品的免疫反应性方面提供了潜在的能力，此处理方式对食品质量和营养特性不会产生不利影响。圆二色谱和荧光光谱结果表明，超高压处理不能显著改变苦杏仁分离蛋白的二级结构，但可以通过疏水性基团的暴露，增加杏仁蛋白质的表面疏水性，使蛋白质的三级结构展开，增强其荧光强度。超高压处理对苦杏仁分离蛋白三级结构的改变，可能破坏其构象表位，引起苦杏仁致敏性的变化。ELISA 结果表明，500 MPa 处理 900 s，苦杏仁分离蛋白的免疫反应性可以降低至 25.69%。总的来说，这项研究表明超高压技术可以作为降低食品致敏性的新型食品加工技术，用于改善苦杏仁产品的质量，增加其潜在的应用价值。

## 参考文献：

[1] RAHAMAN T，VASILJEVIC T，RAMCHANDRAN L. Effect of processing on conformational changes offood proteins related to allergenicity[J]. **Trends in Food Science and Technology**，2016，49(4)：24-34.

[2] TIFFANI H，ROBERT A，MD，et al. A systematic review of the role of hydrolyzed infant formulas in allergyprevention[J]. **American Medical Association**，2005，159(1)：810-816.

[3] SATHE S K，TEUBER S S，ROUX K H，et al. Effects of food processing on the stability of food allergens[J]. **Biotechnology Advances**，2005，23(6)：423-429.

[4] MEINLSCHMIDT P，BRODEV，SEVENICH R，et al. High pressure processing assisted enzymatic hydrolysis-An innovative approach for the reduction of soy immunoreactivity[J]. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**，2017，40 (2017)：58-67.

[5] WEN X Y，JIN F，REGENSTEIN J M，et al. Transglutaminase induced gels using bitter apricot kernel protein：chemical，textural and release properties[J]. **Food Bioscience**，2018，26(18)：15-22.

[6] 张清安，姚建莉. 苦杏仁资源加工与综合利用研究进展[J]. 中国农业科学，2019，52(19)：3430-3447.

[7] 张洁琼. 杏仁过敏原 ELISA 方法的建立及加工方式对致敏性的影响[D]. 天津：天津科技大学，2013.

[8] 林岱. 苦杏仁 11S 球蛋白自组装现象及其应用研究[D]. 杭州：浙江工商大学，2018.

[9] VENKATACHALAM M. TENBER S S，ROUX K H，et al. Effects of roasting，blanching，autoclaving，and microwave heating on antigenicity of almond (Prunus dulcis L.) proteins[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2002，50(12)：3544-3548.

[10] DHAKAL S，LIU C，ZHANG Y，ROUX K H et al. Effect of high pressure processing on the immunoreactivity of almond milk[J]. **Food Research International**，2014，62 (1)：215-222.

[11] ZHANG Y，ZHANG J，SHENG W，et al. Effects of heat and high-pressure treatments on the solubility and immunoreactivity of almond proteins[J]. **Food Chemistry**，2016，199 (1)：856-861.

[12] MAHRE H K，DALHEIM L，EDVINSEN G K，et al. Protein Determination-Method Matters[J]. **Foods**，2018，7(1)：1-11.

[13] WU W，WU X，HUA Y. Structural modification of soy protein by the lipid peroxidation product acrolein[J]. **LWT – Food Science and Technology**，2010，43(1)：133-140.

[14] KELLY S M，JESS T J，PRISE N C. How to study proteins by circular dichroism[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**，2005，1751 (2)：119-139.

[15] TSAI M J，CHENG M C，CHEN B Y，et al. Effect of high-pressure processing on immunoreactivity，microbial and physicochemical properties of hazelnut milk[J]. **International Journal of Food Science and Technology**，2018，53(7)：1672-1680.

[16] KSHIRSAGAR H H，FAJER P，SHARMA G，et al. Biochemical and spectroscopic characterization of almond and cashew nut seed 11S legumins，amandin and anacardein[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2011，59(1)：386-393.