

美拉德反应对四角蛤蜊原肌球蛋白免疫结合活性的影响

亢 帅¹, 何欣蓉¹, 李东晓¹, 纪乃茹¹, 于晨晨¹, 陈桂霞², 曹敏杰^{1,3}, 刘光明^{1,3,*}

(1.集美大学海洋食品与生物工程学院, 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建 厦门 361021;

2.厦门大学附属妇女儿童医院, 福建 厦门 361003; 3.福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

摘 要:以四角蛤蜊 (*Macra veneriformis*) 为研究对象, 采用木糖、阿拉伯糖对蛤蜊粗提物进行干法美拉德反应, 对反应产物的免疫结合活性、消化特性分析发现, 美拉德反应能够降低四角蛤蜊过敏原的免疫结合活性, 提高四角蛤蜊粗提物在模拟胃肠液中的连续消化速率, 降低消化产物的粒径。之后对蛤蜊美拉德反应产物中原肌球蛋白 (tropomyosin, TM) 进行分离纯化, 并分析其结构特性和免疫结合活性。结果显示, 经过干法美拉德反应后TM的 α -螺旋相对含量减少, β -折叠、 β -转角、无规卷曲相对含量增多, 表面疏水性增强, 空间结构改变, 最终导致TM的免疫结合活性降低。本研究为开发低致敏性蛤蜊产品提供理论参考。

关键词: 四角蛤蜊; 原肌球蛋白; 干法美拉德反应; 免疫结合活性; 消化特性; 结构特性

Effect of Maillard Reaction on Tropomyosin Immunoreactivity in *Macra veneriformis*

KANG Shuai¹, HE Xinrong¹, LI Dongxiao¹, JI Nairu¹, YU Chenchen¹, CHEN Guixia², CAO Minjie^{1,3}, LIU Guangming^{1,3,*}

(1. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, College of Marine Food and Biological Engineering, Jimei University,

Xiamen 361021, China; 2. Women and Children's Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, China;

3. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, xylose and arabinose were subjected separately to Maillard reaction with a crude extract of *Macra veneriformis* under dry-heating conditions. The immunoreactivity and digestion properties of the Maillard reaction products (MRPs) were analyzed, finding that the Maillard reaction could reduce the immunoreactivity of allergens derived from *Macra veneriformis*, increase the continuous digestion rate of the crude extract in simulated gastrointestinal fluid, and reduce the particle diameter of the digestion products. After that, TM in the MRPs was separated and purified, and its structural characteristics and immunoreactivity were analyzed. The results showed that the α -helix content of TM decreased and the β -sheet, β -turn, and random coil contents increased after the Maillard reaction, the surface hydrophobicity increased, and the spatial structure changed, which eventually led to a reduction in the immunoreactivity of TM. This study provides a theoretical basis for the development of hypoallergenic clam products.

Keywords: *Macra veneriformis*; tropomyosin; dry-heating Maillard reaction; immunoreactivity; digestive properties; structural properties

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220908-077

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 16-0016-09

引文格式:

亢帅, 何欣蓉, 李东晓, 等. 美拉德反应对四角蛤蜊原肌球蛋白免疫结合活性的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 16-24.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220908-077. <http://www.spkx.net.cn>

KANG Shuai, HE Xinrong, LI Dongxiao, et al. Effect of Maillard reaction on tropomyosin immunoreactivity in *Macra veneriformis*[J]. Food Science, 2023, 44(16): 16-24. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220908-077. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-09-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072336; 31871720); “十四五”国家重点研发计划重点专项 (2022YFF1100103); 厦门市科技计划项目 (3502Z20203059)

第一作者简介: 亢帅 (1996—) (ORCID: 0000-0003-0364-7451), 男, 硕士研究生, 主要从事食品加工与安全研究。

E-mail: 1559501487@qq.com

*通信作者简介: 刘光明 (1972—) (ORCID: 0000-0002-8689-0504), 男, 教授, 博士, 主要从事水产食品加工与安全的应用基础研究。E-mail: gmliu@jmu.edu.cn

食物过敏是世界范围内重要的公共安全问题, 其患病率呈现逐年上涨趋势^[1]。据估计, 食物过敏会对6%~8%的儿童和2%~5%的成年人产生影响^[2]。食物过敏主要是免疫球蛋白E介导的速发型过敏反应, 能够诱发病体产生IgE并与之结合, 使抗体进一步诱导肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放介质从而引起速发型过敏反应^[3]。不同过敏食物引起的发病率存在地域差异性, 西方国家易对花生坚果类产生过敏反应, 相比之下, 在中国等东方国家中, 水产食品是主要引发过敏反应的食物之一^[4-5]。其中原肌球蛋白(tropomyosin, TM)被认为是软体类及甲壳类动物中主要过敏蛋白^[6]。

蛤蜊, 是我国四大养殖贝类之一, 约占全国贝类总产量的30%, 因其营养丰富、味美肉鲜、价格低廉而深受消费者喜爱^[7-8]。随着其产量和消费量的增加, 因食用蛤蜊而引起的过敏事件时有发生^[9-10]。作为一种常见的食物成分, 除直接食用外, 蛤蜊也被用于许多食物或调味品中, 不经意的摄入也可能会发生超敏反应危及人们生命, 但目前为止蛤蜊中的过敏原尚未得到广泛研究, 其致敏性消减方面的探索更是有所欠缺^[11-13]。因此, 开发对过敏消费者安全的低致敏性蛤蜊类食品已成为一个有待解决的问题。

美拉德反应是广泛应用于食品工业的一种加工方式, 也是降低水产食品致敏性的有效手段。通过还原糖羰基与蛋白质氨基之间发生反应, 修饰氨基酸残基, 进而改变过敏原的抗原表位, 最终达到降低致敏性的目的。美拉德反应可以分为湿法和干法^[14]。湿法美拉德反应温度一般不高于100℃, 反应速率较快, 但反应程度不易控制^[15]。干法美拉德反应, 反应温度较低, 反应速度较慢, 但更加容易控制^[16], 且反应产物具有更好的热性能以及更长的保质期^[17-18]。因此, 干法美拉德反应不仅能消减过敏原的致敏性, 还能最大程度保持产品的营养状态, 在食品工业中具有很大的发展潜力。蛋白质在加工过程中结构会因外力作用受到改变, 使过敏原的抗原表位受到影响, 从而调节免疫结合活性, 但很少有研究集中与加工后纯化的蛋白质的结构上^[19]。现阶段研究过程中多为对单一蛋白质进行美拉德反应, 有研究发现, 粗提物在热处理过程中其中致敏原的作用效果会发生改变^[20], 在美拉德反应的热处理过程中粗提物的过敏原是否受到影响目前尚未可知。美拉德反应也会诱导蛋白质构象的变化, 导致食物过敏原结构变的更加松散和灵活, 以及与其他蛋白质、脂质和碳水化合物的相互作用, 影响过敏原的消化率^[21-22]。Zhang Ziye等^[23]发现TM与葡萄糖的

干法美拉德反应会使TM的 α -螺旋减少, 其他二级结构则增加, 同时减弱了TM的致敏性和消化率。经过美拉德反应的过敏原进入人体后, 需要经过胃肠消化才能被人体所吸收。在消化过程中, 过敏原本身的结构会被胃肠中的消化酶破坏, 可能会改变消化产物的致敏性。因此在加工过程中, 过敏原的消化稳定性也是探究其致敏性的重要指标。

目前, 美拉德反应消减过敏原致敏性的研究多为甲壳类水产食品, 对软体类水产食品的研究比较欠缺, 而且大多研究集中于单一蛋白。然而在实际加工过程中, 是对完整组织或粗提物进行加工, 单一蛋白的研究处理, 并不完全符合实际加工过程。所以本研究运用干法美拉德反应的工艺手段, 以四角蛤蜊粗提物为原料, 探究干法美拉德反应对四角蛤蜊过敏原的消化特性、免疫结合活性及结构特性的影响。旨在为开发低致敏性蛤蜊产品提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

鲜活四角蛤蜊购自福建厦门朴朴电子商务有限公司, 去壳去内脏取其肌肉组织用于粗蛋白的提取。兔抗华贵栉孔扇贝TM多克隆抗体由本实验室制备; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)、标记的羊抗兔IgG抗体 美国Pierce公司; HRP标记的羊抗人IgE抗体 英国Abcam公司; 胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶 美国Sigma公司; 木糖、阿拉伯糖 上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

PT-2100组织捣碎机 瑞士Kinematica公司; Alpha 1-4 LDplus冷冻干燥机 德国Martin Christ公司; Bio-Profile凝胶成像及分析系统 法国Viber Lourmant公司; 600化学发光成像系统 美国Azure Biosystems公司; NDO-700定温恒温干燥箱 上海爱朗仪器有限公司; Nano-ZS Malvern激光散射粒度仪 美国Malvern公司; Chirascan圆二色谱仪 英国Applied Photophysics公司; Infinite® M200 PRO酶标仪 奥地利Tecan公司; NP80超微量分光光度计 德国Touch Implen公司。

1.3 方法

1.3.1 四角蛤蜊过敏患者血清

血清来自于自厦门大学附属妇女儿童医院(伦理委员会批准编号KY-2019-018)经过ImmunoCAP、通过酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分析确定能与四角蛤蜊粗提液有阳性反应的血清, 并以健康人血清作为对照。四角蛤蜊过敏患者信息见表1。

表1 四角蛤蜊过敏患者信息
Table 1 Information of patients allergic to *M. veneriformis*

编号	年龄/岁	性别	特异性IgE值/ (kU/L) ^a	ELISA值 (OD _{450nm}) ^b	症状
S1	24	F	26.21	0.20	脸红点
S2	32	M	5.32	0.13	脸和手红疹
S3	28	F	10.52	0.14	湿疹
S4	45	M	17.51	0.17	咳嗽
S5	23	M	16.22	0.15	过敏性皮炎
S6	20	F	13.83	0.13	荨麻疹
S7	59	M	6.75	0.14	湿疹
S8	23	F	14.27	0.17	全身红疹
S9	16	F	21.62	0.18	过敏性皮炎
S10	29	M	31.21	0.21	荨麻疹
S11	32	M	0.12	0.05	— ^c
S12	25	F	0.13	0.06	— ^c

注: a.特异性IgE值 ≥ 0.35 kU/L为阳性血清; b. ELISA值 $\geq 2 \times$ 阴性血清值为蛤蜊过敏患者血清; c.无过敏症状。M.男性; F.女性。

1.3.2 四角蛤蜊粗提液的制备

取四角蛤蜊肌肉组织加入含有0.5 mol/L NaCl的磷酸盐缓冲液(1:10 (g/mL)),捣碎后4 °C、12 000×g离心20 min,取上清液即为四角蛤蜊粗提液。

1.3.3 制备美拉德反应产物

美拉德反应产物的制备参考Zhang Ziye等^[24],并进行一定修改。将四角蛤蜊粗提液分别与木糖(1:1, m/m)、阿拉伯糖(1:1, m/m)混合冻干,将冻干的样品在55 °C恒温干燥箱中进行美拉德反应,含有木糖的粗提物样品反应3 h,含有阿拉伯糖的粗提物样品反应4 h,粉碎后即四角蛤蜊的美拉德反应产物。Mactra为未进行美拉德反应的四角蛤蜊粗提物,木糖对四角蛤蜊粗提物的美拉德反应产物为Mactra-Xyl,阿拉伯糖对四角蛤蜊粗提物的美拉德反应产物为Mactra-Arab。

1.3.4 美拉德反应产物的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和Western blot、Dot blot分析

参考Mei Xuejiao等^[25]的方法对样品的蛋白成分进行SDS-PAGE分析。电泳后,用FastBlue蛋白染色液(RTD6202-02)进行染色,利用Western blot及Dot blot的方法对过敏原的免疫结合活性进行分析。IgG的检测以兔抗扇贝TM多克隆抗体(稀释至1:20 000)作为一抗孵育NC膜,以HRP标记的羊抗兔IgG抗体(稀释1:20 000)作为二抗进行孵育。IgE的检测以过敏患者血清(稀释1:3)作为一抗孵育NC膜,HRP标记的羊抗人IgE抗体(稀释1:10 000)为二抗进行孵育。最后使用化学发光成像系统拍摄图像。

1.3.5 美拉德反应产物的体外消化实验

体外消化实验参考Liu Meng等^[26]进行模拟胃肠道连续消化。首先进行模拟胃液消化:将蛋白样品与模拟胃液于37 °C水浴锅中混合,加入预热后的胃蛋白酶(酶与

底物1:50, m/m)进行消化,分别在0、2、5、10、15、30、60 min后依次取出样品,加入一定量的NaHCO₃将pH值调至中性,以终止消化。

模拟肠液消化:将经过上述胃液消化60 min后的样品加入一定量的NaHCO₃将pH值升高至7.4,以终止消化。之后加入0.5 mol/L的KCl溶液与预热后的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶混合(酶与底物1:200, m/m)于37 °C水浴锅中进行消化,在0、5、15、30、60、120、180、240 min后依次取出样品在95 °C水浴中加热5 min终止反应。将消化后的样品贮存在4 °C环境中。

1.3.6 消化产物的粒径分析

使用Malvern激光散射粒度仪对美拉德反应后的消化产物进行粒径分析,观察消化产物的粒径变化。具体参数设置为:Material (Protein); Dispersant (Water); Temperature (25 °C)。每个样品测定3次,采用Malvern Mastersizer软件进行数据结果分析。

1.3.7 美拉德反应产物中TM的分离纯化

参考Ji Nairu等^[27]方法。将未处理的粗提物与美拉德反应产物按照1.3.2节所述分别用10倍体积的磷酸盐缓冲液复溶,浸提1 h,4 °C、12 000×g离心20 min取上清液,用40% (NH₄)₂SO₄盐析,搅拌0.5 h,静置2 h,离心取上清液。将上清液调pH 4.55得到的沉淀用Tris-HCl溶解,经Q-Sepharose强阴离子交换层析,用含有0~0.2 mol/L NaCl的Tris-HCl线性洗脱后用含0.2 mol/L NaCl的Tris-HCl进行流洗,最后用0.2~0.5 mol/L NaCl的Tris-HCl再次线性洗脱,收集组分得到纯化的TM。从木糖的美拉德反应产物中纯化的TM记为TM-Xyl、阿拉伯糖记为TM-Arab。

1.3.8 美拉德反应产物中TM圆二色谱、表面疏水性和紫外吸收光谱的分析

将上述从美拉德反应产物中纯化的TM及未处理TM稀释至0.2 mg/mL,利用圆二色谱仪进行二级结构的分析,利用CDNN软件分析二级结构含量变化情况;将美拉德反应TM及未处理TM稀释至0.05 mg/mL,并用5 mmol/L的ANS溶液进行荧光标记,使用酶标仪测定其荧光强度;取2 μL 1 mg/mL的样品,采用微量紫外分光光度计在200~300 nm扫描波长范围对将美拉德反应TM及未处理TM进行紫外吸收光谱分析,观察三级结构的变化。每个样品需进行3次测定。

1.3.9 美拉德反应产物中TM的免疫结合活性分析

按照1.3.4节方法对美拉德反应产物中TM进行SDS-PAGE和Western blot及Dot blot分析。

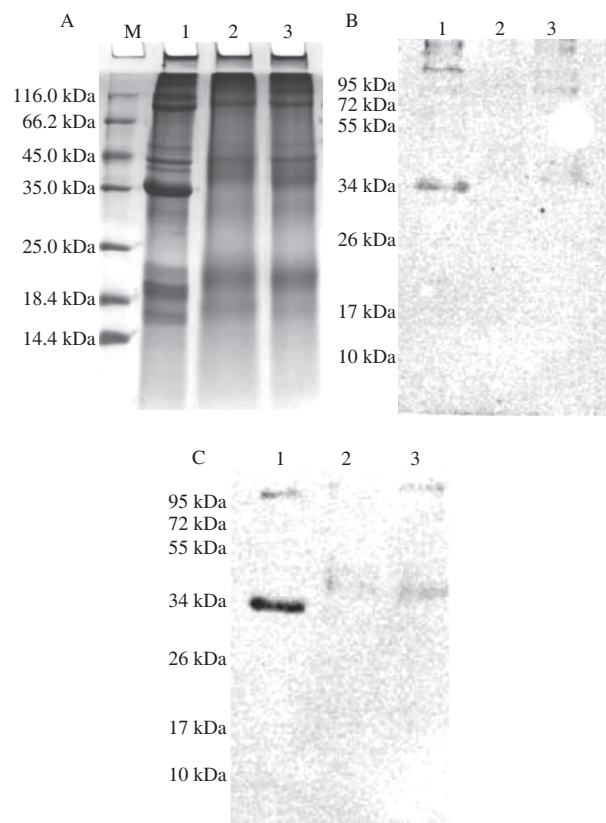
1.4 统计分析

运用SPSS 20.0软件进行显著差异性分析结果以3次 $\bar{x} \pm s$ 表示($P < 0.01$, 差异极显著; $P < 0.05$, 差异显著)。使用Image J软件对蛋白印迹进行灰度值分析。

2 结果与分析

2.1 美拉德反应产物的IgE-/IgG-结合活性分析

对四角蛤蜊美拉德反应产物进行SDS-PAGE分析,如图1A所示,与未处理的粗提物样品相比,经过美拉德反应后其蛋白条带出现上移和弥散,说明在一定温度下,木糖和阿拉伯糖与蛋白质形成了糖-蛋白复合物。分别用四角蛤蜊过敏患者血清池及扇贝TM多克隆抗体进行Western blot分析,由图1B可知,未处理的粗提物样品中36 kDa处有明显的蛋白印迹,通过美拉德反应处理后免疫印迹强度明显减弱,图1C的印迹效果与图1B相似,经过美拉德反应后TM的免疫结合活性明显降低。由此说明,36 kDa蛋白条带为TM,是已知蛤蜊中的主要过敏原^[28]。通过木糖和阿拉伯糖的美拉德反应处理后,其免疫结合活性大幅度丧失。这与Han Yinyu等^[29]发现阿拉伯糖引起的美拉德反应能显著降低青蟹TM免疫结合活性,Bai Tianliang等^[30]确定木糖与扇贝TM的美拉德反应使其免疫结合活性减低相符合。因此可确定木糖和阿拉伯糖的干法美拉德反应可以修饰四角蛤蜊TM,降低TM的免疫结合活性。



A.四角蛤蜊美拉德反应产物的SDS-PAGE; B.蛤蜊过敏患者血清的IgE免疫印迹(血清池编号S1~S10); C.兔抗扇贝TM多克隆抗体的IgG免疫印迹。1. Mactra; 2. Mactra-Xyl; 3. Mactra-Arab。M. Marker, 下同。

图1 四角蛤蜊美拉德反应产物的IgE-/IgG-结合活性

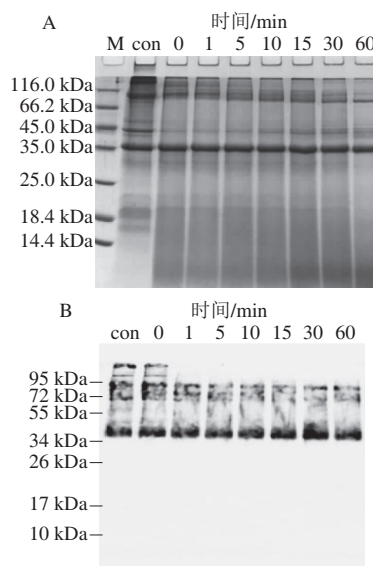
Fig. 1 IgE-/IgG-binding activity of the MRPs from *M. veneriformis*

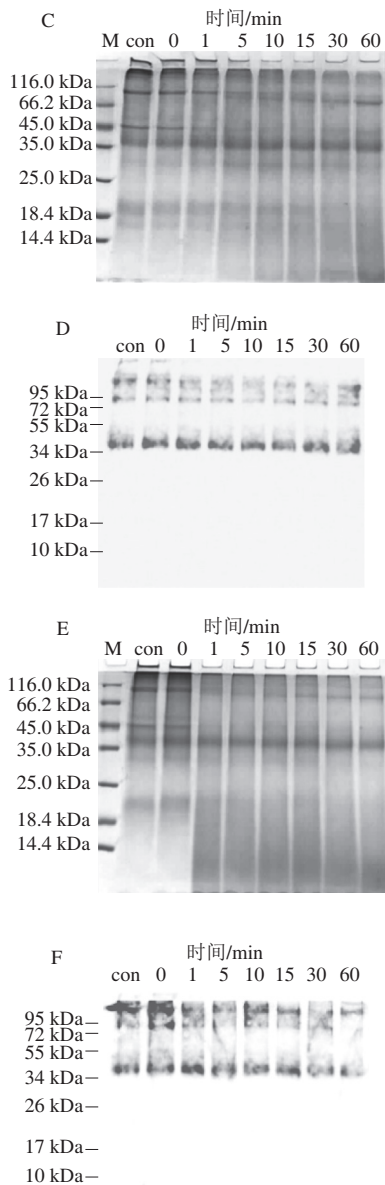
2.2 美拉德反应产物的模拟胃肠液连续消化稳定性分析

评估四角蛤蜊美拉德反应产物在胃肠道连续消化模式下,目的蛋白的稳定性及免疫结合活性。如图2A、B所示,在模拟胃液消化过程中, TM条带始终具有良好的稳定性,其免疫印迹强度也并未减弱。经过木糖和阿拉伯糖的美拉德反应处理后,生成的美拉德反应产物消化模式基本相似。如图2C~F所示,在模拟胃液消化过程中经过美拉德反应的TM条带有弥散现象,但在胃液消化过程中并无明显降解,且免疫印迹也无明显改变。在随后进行的模拟肠液连续消化中,如图3A、B所示, TM条带在消化30 min后基本全部降解,免疫印迹也基本消失。而经过木糖(图3C、D)和阿拉伯糖(图3E、F)的美拉德反应处理后,美拉德反应TM条带在肠液连续消化15 min后基本降解,免疫印迹强度也逐渐减弱在15 min后基本消失。

结果表明,在四角蛤蜊粗提物中, TM耐胃液消化,不耐肠液消化,美拉德反应能够加快TM的模拟胃肠液连续消化速率,使其免疫结合活性更快的丧失。这与秀丽白虾TM与麦芽七糖混合冻干后在60 °C环境下反应48 h更易被胃蛋白酶水解表现出相同的趋势^[31],但在同样条件下秀丽白虾TM与葡萄糖的美拉德反应却降低了消化率^[23]。这可能是由于在美拉德反应过程中由于还原糖种类及分子质量的不同,导致过敏原构象的改变及表位的修饰程度不同,从而表现出对消化酶不同的敏感度。除了过敏原对酶水解的内在敏感度外,加工产物中的其他组织成分也可以改变蛋白的消化稳定性^[32],因此,对于单一蛋白和粗蛋白,在加工过程中可能会表现出不同的消化模式,粗蛋白的研究更适用食品加工过程。

通过本实验可知,干法美拉德反应在一定程度上可以促进加工产物在人体的消化速率,这可能是由于蛋白质水解酶对肽键的不同识别和干法美拉德反应处理过程中的一些外在条件破坏了一些结合肽及过敏原表位,改变了蛋白质的空间结构,增加了蛋白酶的酶解位点,使得加工产物在模拟胃肠液连续消化过程中速率加快。

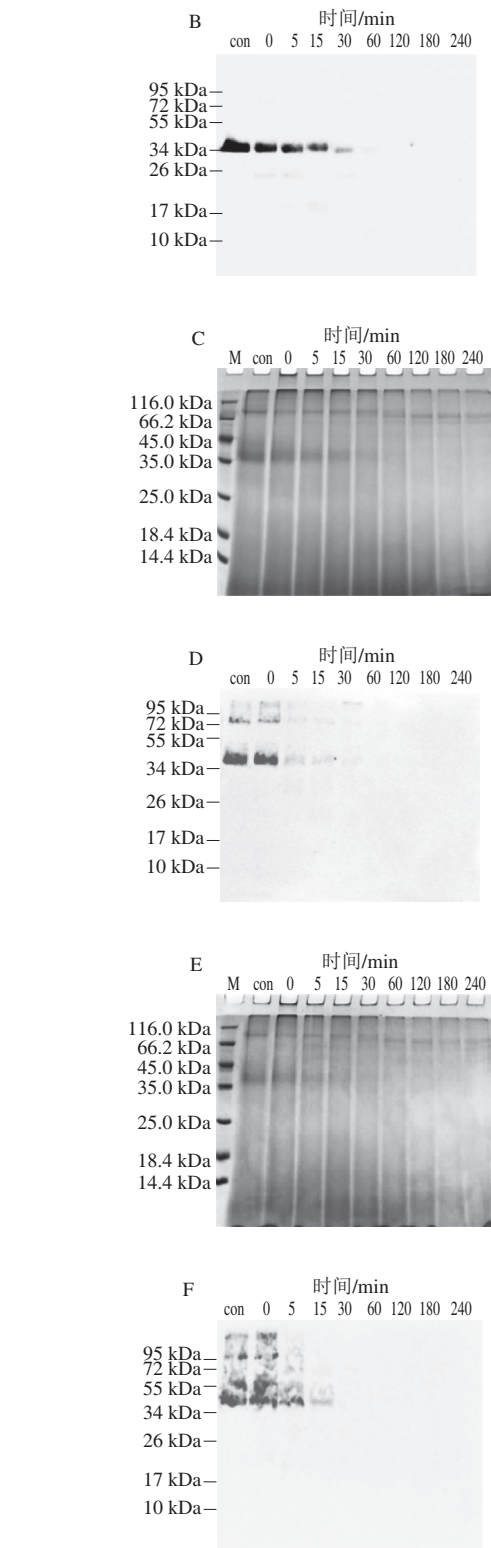
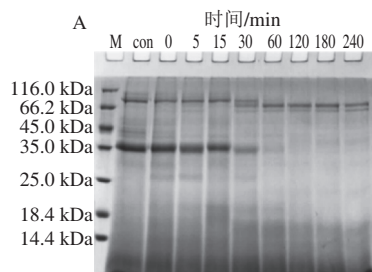




A、B. Mactral模拟胃液消化产物的SDS-PAGE及Western blot；C、D. Mactra-Xyl模拟胃液消化产物的SDS-PAGE及Western blot；E、F. Mactra-Arab模拟胃液消化产物的SDS-PAGE及Western blot。con.为未加消化酶的样品；一抗为兔抗扇贝TM多克隆抗体（稀释至1:20 000）。

图2 四角蛤蜊美拉德反应产物的模拟胃液消化

Fig. 2 Electropherograms of simulated gastric fluid digestion products of the MRPs from *M. veneriformis*

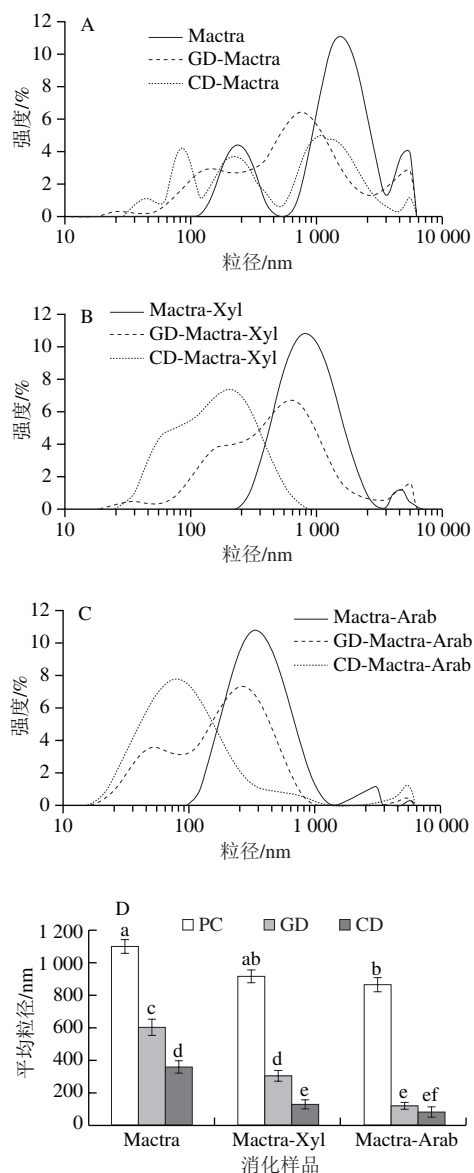


A、B. Mactral模拟肠液消化产物的SDS-PAGE及Western blot；C、D. Mactra-Xyl模拟肠液消化产物的SDS-PAGE及Western blot；E、F. Mactra-Arab模拟肠液消化产物的SDS-PAGE及Western blot。con.胃液消化60 min后的样品；一抗为兔抗扇贝TM多克隆抗体（稀释至1:20 000）。

图3 四角蛤蜊美拉德反应产物的模拟肠液消化

Fig. 3 Electropherograms of simulated intestinal fluid digestion products of the MRPs from *M. veneriformis*

2.3 消化后美拉德反应产物的粒径分析



A. Mactra连续胃肠液消化产物的粒径分析 (Mactra为消化前样品); B. Mactra-Xyl连续胃肠液消化产物的粒径分析 (Mactra-Xyl为消化前样品); C. Mactra-Arab连续胃肠液消化产物的粒径分析 (Mactra-Arab为消化前样品); D. 不同消化产物的平均粒径。CD. 模拟胃液消化; GD. 模拟肠液消化; 不同小写字母表示差异显著, 下同。

图4 消化产物的粒径分析

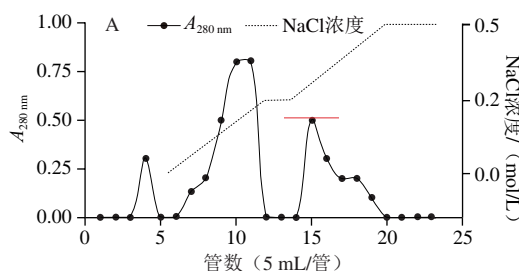
Fig. 4 Particle diameter analysis of digestion products

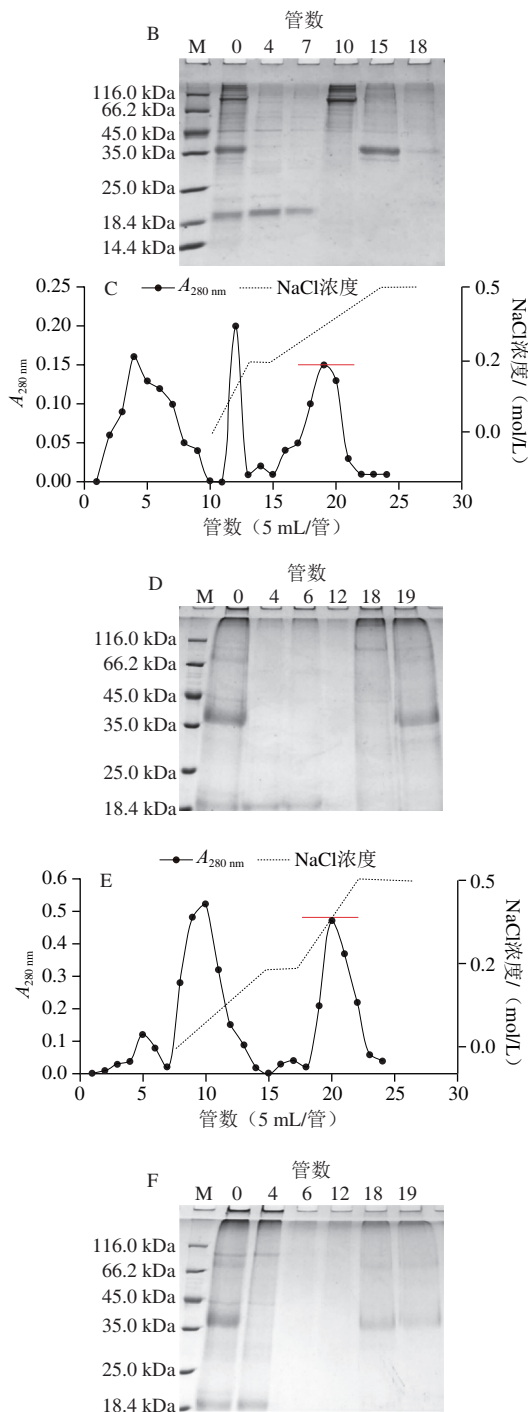
通过体外模拟胃肠道连续消化模型评估美拉德反应产物中肌肉蛋白的消化特性。将未进行美拉德反应处理及经过美拉德反应处理的样品经过60 min的模拟胃液消化及240 min的模拟肠液消化后, 对消化后的样品进行粒径分析。每组对照为消化之前的样品。如图4A所示, 与对照组相比, 胃液消化产物和连续胃肠液消化产物的粒径显著减小, 粒径强度左移现象明显, 说明四角蛤蜊

粗提物样品在消化过程中发生酶解反应, 蛋白质被分解为粒径更小的多肽和氨基酸。与未进行美拉德反应的样品相比, 经过美拉德反应的样品消化产物粒子粒径强度左移程度更大(图4B、C)。木糖与阿拉伯糖相比, 木糖的美拉德反应产物消化粒径集中在100~1 000 nm范围内, 而阿拉伯糖的美拉德反应产物消化粒径主要集中在50~1 000 nm范围内, 总体粒径比木糖的美拉德反应产物更小。这与上述模拟胃肠液连续消化相对应, 在上述消化过程中除TM外其他高分子蛋条带在经过美拉德反应后也更易被酶解, 这也是导致消化后平均粒径更小的原因。结果对比如图4D所示, 美拉德反应会降低四角蛤蜊消化产物的粒径, 从而增加消化速率。Liu Meng等^[33]研究表明, 115 °C高温处理南美白对虾会使其肌肉蛋白结构更加松散, 减小了消化产物的粒径。对于木糖、阿拉伯糖的干法美拉德反应, 虽然反应温度较低, 但在还原糖的作用下, 蛤蜊肌肉蛋白的结构及分子序列受到修饰和破坏, 使大分子蛋白质结构更加松散, 暴露出更多酶解位点, 在消化过程中降解为更多的小分子多肽, 从而降低了消化产物的平均粒径。

2.4 美拉德反应产物中TM的分离纯化

为进一步探究TM在美拉德反应产物中免疫结合活性及结构特性的变化情况, 将未处理的四角蛤蜊粗提物及其美拉德反应产物进一步进行分离纯化。首先经过硫酸铵盐析和等电点沉淀除去大部分杂蛋白, 之后经过Q-Sepharose层析柱进一步分离纯化。由图5A可知, 经过Q-Sepharose层析柱的分离纯化, 目的蛋白在0.2~0.5 mol/L NaCl的线性范围内得以洗脱, 如图5B泳道15所示, 36 kDa条带为所纯化TM。图5C为木糖的四角蛤蜊美拉德反应产物经Q-Sepharose层析柱的分离纯化, 目的蛋白同样在0.2~0.5 mol/L NaCl的洗脱范围内, 图5D泳道19为纯化TM-Xyl。对于阿拉伯糖的四角蛤蜊美拉德反应产物, 目的蛋白具有相同的Q-Sepharose层析柱的洗脱范围(图5E), 泳道18、19为纯化TM-Arab(图5F)。由此可见, 四角蛤蜊TM与华贵栉孔扇贝TM具有相同的洗脱范围^[30], 经过粗提物的美拉德反应后, TM的洗脱范围并无明显改变, 说明木糖、阿拉伯糖的干法美拉德反应并无完全改变TM的理化性质。





A、B. Mactra中TM的Q-Sepharose柱层析纯化谱图及SDS-PAGE分析；C、D. Mactra-Xyl中TM-Xyl的Q-Sepharose柱层析纯化谱图及SDS-PAGE分析；E、F. Mactra-Arab中TM-Arab的Q-Sepharose柱层析纯化谱图及SDS-PAGE分析。

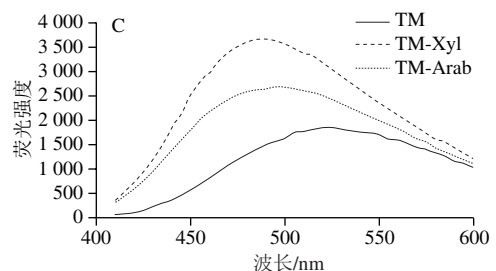
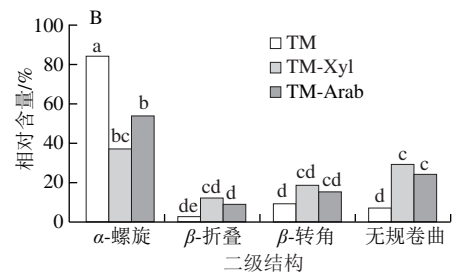
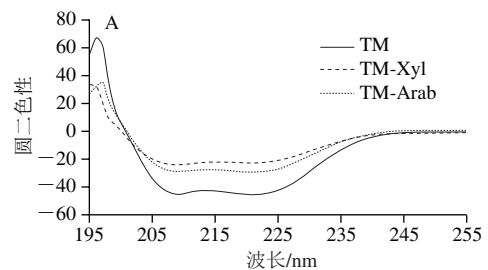
图5 美拉德反应产物中TM的分离纯化

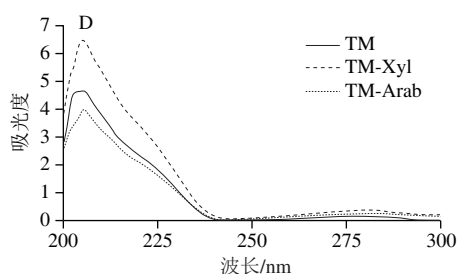
Fig. 5 Separation and purification of TM in MRP

2.5 美拉德反应产物中纯化TM的结构特性分析

美拉德反应会引起过敏原结构的变化，这一变化主要体现二级结构、三级结构及疏水作用力^[34]。过敏原结构的变化也是造成致敏性变化的关键^[35]。为进一步探究经过美拉德反应后TM结构特性的变化情况，首先利用

圆二色谱仪分析纯化TM、TM-Xyl、TM-Arab的二级结构，如图6A、B所示，四角蛤蜊TM为典型的 α -螺旋结构蛋白，经过木糖和阿拉伯糖的美拉德反应后， α -螺旋相对含量显著降低，同时 β -折叠、 β -转角、无规卷曲相对含量都有不同程度的增加。通过表面疏水性（图6C）可看出，经过美拉德反应后TM-Xyl、TM-Arab的荧光强度均高于TM，其强弱顺序为TM-Xyl>TM-Arab>TM，且荧光强度峰有蓝移现象，这表明经美拉德反应处理后TM的三级结构发生变化。蛋白质中的酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等芳香氨基酸残基及二硫键处不对称环境时，在近紫外200~300 nm处会表现出CD信号，反映出蛋白质三级结构的展开和折叠情况。如图6D所示，经过美拉德反应处理后，TM-Xyl的吸收峰有增强而TM-Arab有下降趋势，这表明，美拉德反应使TM的空间结构发生了变化，但木糖和阿拉伯糖导致TM展开或折叠的方式有所不同。结构的改变会影响过敏原的致敏性，Fu Linglin等^[36]采用核糖、低聚糖等还原糖通过干法美拉德反应消减中国对虾TM致敏性，经研究发现致敏性降低可能是由于蛋白质构象变化引起。木糖、阿拉伯糖的干法美拉德反应使四角蛤蜊粗提物中TM的分子结构发生改变，出现了解螺旋现象和空间位阻的增加，进而使蛋白质表面暴露出更多的疏水基团，这可能会掩盖或破坏过敏原的抗原表位，降低其致敏性。



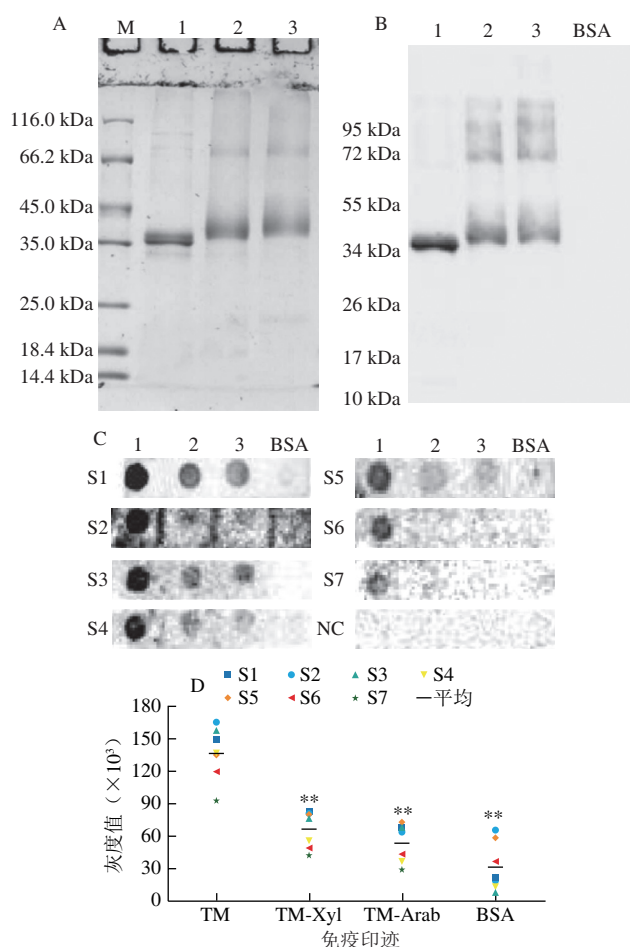


A. TM、TM-Xyl、TM-Arab的圆二色谱分析；B. TM、TM-Xyl、TM-Arab的二级结构含量柱状图；C. TM、TM-Xyl、TM-Arab的表面疏水性分析；D. TM、TM-Xyl、TM-Arab的紫外吸收光谱分析。

图6 美拉德反应产物中TM的结构特性分析

Fig. 6 Analysis of the structural properties of TM in MRPs

2.6 美拉德反应产物中纯化TM的IgG-/IgE-结合活性分析



A、B.美拉德反应TM的SDS-PAGE及Western blot；C、D. Dot blot分析蛤蚧过敏患者血清与美拉德反应TM的IgE结合活性。NC. S11、S12的混合血清；1. TM；2. TM-Xyl；3. TM-Arab；BSA.牛血清白蛋白。**.与TM的IgE结合活性相比，差异极显著， $P < 0.01$ 。

图7 美拉德反应产物中TM的IgG-/IgE-结合活性分析

Fig. 7 Analysis of IgG-/IgE-binding activity of TM in MRPs

将上述纯化得到的TM、TM-Xyl、TM-Arab进行凝胶电泳分析，结果如图7A所示，与未进行美拉德反应的TM

相比，美拉德反应后的TM条带有弥散和上移现象，并且有聚体和一些聚集物的产生。说明TM经过木糖和阿拉伯糖的美拉德反应后分子质量有所增加，并且有热聚集现象。为进一步判断美拉德反应后TM免疫结合活性的变化情况。将TM、TM-Xyl、TM-Arab分别与扇贝TM多克隆抗体及四角蛤蚧过敏患者的血清进行免疫印迹分析。从图7B可以看出，经过美拉德反应后TM的免疫印迹强度显著降低，其IgG结合活性明显下降。从图7C的7名过敏患者血清的Dot blot图可知，经过美拉德反应后TM的免疫印迹明显减弱，IgE结合活性明显降低。通过进一步对图7C进行灰度分析，结果如图7D所示，经过美拉德反应处理后TM的IgE结合活性得到大幅度降低，通过对比发现TM-Xyl的IgE结合活性平均下降了约55%，TM-Arab下降了约60%。这与Zhang Ziye等^[37]确定凡纳滨对虾TM与葡萄糖的干法美拉德反应能显著降低其IgE结合活性的结果相似，说明木糖、阿拉伯糖的干法美拉德反应改变了蛤蚧粗提物中TM的结构，修饰或破坏了TM的抗原表位，使得TM的IgG-/IgE结合活性降低。因此可知，由木糖和阿拉伯糖引起的干法美拉德反应会降低四角蛤蚧TM的免疫结合活性，这与上述粗提物的结果相对应。

3 结论

以四角蛤蚧粗提液为原料，探究木糖、阿拉伯糖的干法美拉德反应对四角蛤蚧TM免疫结合活性的影响。利用四角蛤蚧粗提液制备美拉德反应产物，而并非对单一蛋白进行美拉德反应处理，更加符合实际加工过程。美拉德反应加工方式促进了蛤蚧粗提物在胃肠道中的消化速率，使蛋白质降解速率加快，消化产物粒径更小，这使得产物更加利于人体的消化吸收。此外，通过对美拉德反应产物中的TM分离纯化，确定了由木糖、阿拉伯糖修饰的干法美拉德反应，会使四角蛤蚧TM的 α -螺旋含量显著降低，逐渐转变为 β -折叠、 β -转角、无规卷曲状态，同时增加表面疏水性，改变空间结构，从而导致四角蛤蚧TM的致敏性降低。

参考文献：

- [1] LIN J, ALCOCER M. Overview of the commonly used methods for food allergens[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1592: 1-9. DOI:10.1007/978-1-4939-6925-8_1.
- [2] IWEALA O I, CHOUDHARY S K, COMMINS S P. Food allergy[J]. *Current Gastroenterology Reports*, 2018, 20(5): 17. DOI:10.1007/s11894-018-0624-y.
- [3] MICHELET M, BALBINO B, GUILLEMINAULT L, et al. IgE in the pathophysiology and therapy of food allergy[J]. *European Journal of Immunology*, 2021, 51(3): 531-543. DOI:10.1002/eji.202048833.
- [4] GRABENHENRICH L B, DOLLE S, MONERET-VAUTRIN A, et al. Anaphylaxis in children and adolescents: the European anaphylaxis

- registry[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2016, 137(4): 1128-1137. DOI:10.1016/j.jaci.2015.11.015.
- [5] 宁亚维, 杨正, 马梦戈, 等. 食品中常见过敏原及检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(15): 319-328. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200614-191.
- [6] ZHOU J, WANG Y, QIAN Y, et al. Quantification of shellfish major allergen tropomyosin by SPR biosensor with gold patterned biochips[J]. Food Control, 2020, 107: 106547. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.02.041.
- [7] 左明. 黄河三角洲滩涂四角蛤蜊底播增殖技术[J]. 水产养殖, 2020, 41(4): 53-55. DOI:CNKI:SUN:SCYZ.0.2020-04-016.
- [8] 高宏泉, 张爽. 2021中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 27-28.
- [9] 吕良涛, 藓海鑫, 高卿, 等. 菲律宾蛤仔过敏原原肌球蛋白的鉴定与分子克隆[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(11): 4538-4544. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2015.11.049.
- [10] LIN H X, LI Z X, LIN H, et al. Effect of pH shifts on IgE-binding capacity and conformational structure of tropomyosin from short-neck clam (*Ruditapes philippinarum*)[J]. Food Chemistry, 2015, 188: 248-255. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.05.007.
- [11] 滕瑜, 李辉, 王志勇, 等. 四角蛤蜊的营养性和安全性评价[J]. 农产品加工(学刊), 2014, 2014(6): 48-50. DOI:10.3969/j.issn.1671-9646(X).2014.03.044.
- [12] 高郡煊, 李学鹏, 刘裕, 等. 响应面法优化四角蛤蜊调味料风味前体物质酶解制备工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 17-23. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201514004.
- [13] KOPPELMAN S J, LARDIZABAL A L, NIEMANN L, et al. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of clam residues in food products[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 6685575. DOI:10.1155/2021/6685575.
- [14] JING H, KITTS D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(7): 1007-1015. DOI:10.1016/S0278-6915(02)00070-4.
- [15] BRANDS C, VAN BOEKEL M. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharide-casein systems[J]. Food Chemistry, 2003, 83(1): 13-26. DOI:10.1016/S0308-8146(03)00031-1.
- [16] 包亚妮, 袁芳. 不同方法在蛋白-多糖复合反应中的应用现状[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 383-387. DOI:CNKI:SUN:SPKJ.0.2012-11-094.
- [17] 高威, 王一婷, 姜淑娟, 等. Maillard反应对酪蛋白溶解性质的修饰作用研究[J]. 食品科技, 2014, 39(3): 38-40. DOI:CNKI:SUN:SSPJ.0.2014-03-013.
- [18] 张英锋, 阮栋梁, 邵光杰. 美拉德反应的化学体系和影响反应的因素[J]. 化学教学, 2013, 2013(6): 71-73. DOI:10.3969/j.issn.1005-6629.2013.06.026.
- [19] LONG F Y, YANG X, WANG R R, et al. Effects of combined high pressure and thermal treatments on the allergenic potential of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) tropomyosin in a mouse model of allergy[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 29: 119-124. DOI:10.1016/j.ifset.2015.03.002.
- [20] MATTAR H, PADFIELD P, SIMPSON A, et al. The impact of a baked muffin matrix on the bioaccessibility and IgE reactivity of egg and peanut allergens[J]. Food Chemistry, 2021, 362: 129879. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129879.
- [21] TODA M, HEILMANN M, ILCHMANN A, et al. The Maillard reaction and food allergies: is there a link?[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2014, 52(1): 61-67. DOI:10.1515/cclm-2012-0830.
- [22] 赵城彬, 张浩, 许秀颖, 等. 不同分子量葡聚糖对玉米醇溶蛋白糖基化产物结构和功能性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(16): 68-73. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816011.
- [23] ZHANG Z Y, XIAO H, ZHANG X F, et al. Conformation, allergenicity and human cell allergy sensitization of tropomyosin from *Exopalaemon modestus*: effects of deglycosylation and Maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2018, 276: 520-527. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.10.032.
- [24] ZHANG Z Y, XIAO H, ZHOU P. Glycation by saccharides of different molecular sizes affected the allergenicity of shrimp tropomyosin via epitope loss and the generation of advanced glycation end products[J]. Food & Function, 2019, 10(11): 7042-7051. DOI:10.1039/C9FO01547G.
- [25] MEI X J, LI M S, YANG Y, et al. Reducing allergenicity to arginine kinase from mud crab using site-directed mutagenesis and peptide aptamers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(17): 4958-4966. DOI:10.1021/acs.jafc.9b00608.
- [26] LIU M, HUAN F, LI M S, et al. Mapping and IgE-binding capacity analysis of heat/digested stable epitopes of mud crab allergens[J]. Food Chemistry, 2020, 344(15): 128735. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128735.
- [27] JI N R, HAN X Y, YU C C, et al. Identification of linear epitopes and their major role in the immunoglobulin E-binding capacity of tropomyosin from *Alectryonella plicatula*[J]. Food & Function, 2022, 13(17): 9078-9090. DOI:10.1039/d2fo01713j.
- [28] 李风铃, 李沂光, 孙天乐, 等. 水产食品中主要过敏原的研究与展望[J]. 中国渔业质量与标准, 2018, 8(1): 16-23. DOI:10.3969/j.issn.2095-1833.2018.01.003.
- [29] HAN X Y, YANG H, RAO S T, et al. The Maillard reaction reduced the sensitization of tropomyosin and arginine kinase from *Scylla paramamosain*, simultaneously[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(11): 2934-2943. DOI:10.1021/acs.jafc.7b05195.
- [30] BAI T L, HAN X Y, LI M S, et al. Effects of the Maillard reaction on the epitopes and immunoreactivity of tropomyosin, a major allergen in *Chlamys nobilis*[J]. Food & Function, 2021, 12(11): 5096-5108. DOI:10.1039/D1FO00270H.
- [31] ZHANG Z Y, XIAO H, ZHOU P. Allergenicity suppression of tropomyosin from *Exopalaemon modestus* by glycation with saccharides of different molecular sizes[J]. Food Chemistry, 2019, 288: 268-275. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.03.019.
- [32] JUDITH P, DAVIDE R, EVA U. Stability of allergens[J]. Molecular Immunology, 2018, 100: 14-20. DOI:10.1016/j.molimm.2018.03.017.
- [33] LIU M, LIU S H, HAN T J, et al. Effects of thermal processing on digestion stability and immunoreactivity of the *Litopenaeus vannamei* Matrix[J]. Food Funct, 2019, 10(9): 5374-5385. DOI:10.1039/c9fo00971j.
- [34] MALGORZATA T, JOOST V N, HUUB S. Food processing: the influence of the Maillard reaction on immunogenicity and allergenicity of food proteins[J]. Nutrients, 2017, 9(8): 835. DOI:10.3390/nu9080835.
- [35] 张晴晴, 吴子健, 胡志和, 等. 常见食物过敏原结构稳定因素与致敏性的关系研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 217-222. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201503042.
- [36] FU L L, WANG C, WANG J B, et al. Maillard reaction with ribose, galacto-oligosaccharide or chitosan-oligosaccharide reduced the allergenicity of shrimp tropomyosin by inducing conformational changes[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 789-795. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.09.068.
- [37] ZHANG Z Y, LI Z X, LIN H. Reducing the allergenicity of shrimp tropomyosin and allergy desensitization based on glycation modification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(49): 14742-14750. DOI:10.1021/acs.jafc.1c03953.