

## 碱性及复合蛋白酶复配水解对脱脂牛乳致敏性的影响

钱冠林, 孙敬, 杨慧, 梁肖娜, 岳喜庆, 郑艳\*  
(沈阳农业大学食品学院 沈阳 110000)

**摘要** 牛乳中致敏蛋白在一定程度上限制了其在婴幼儿配方奶粉中的使用。以脱脂牛乳为原料,以水解度、脱脂牛乳 IgG 抑制率、过敏患者血清 IgE 抑制率为指标,研究碱性、复合蛋白酶复配处理对其致敏性的影响。结果表明,复配酶的酶活与底物比(E/S)为 6 000 U/g,碱性蛋白酶与复合蛋白酶质量比为 3:1,酶解时间 60 min 时,脱脂牛乳的水解度为 9.21%,对脱脂牛乳 IgG 及过敏患者血清 IgE 抗体抑制率分别为 86.94%与 43.46%,显著高于单一蛋白酶( $P<0.05$ )的处理效果。研究结果为以脱脂牛乳为婴幼儿奶粉基料的开发提供了重要参考。

**关键词** 脱脂牛乳; 复配酶解; 致敏性; ELISA

**文章编号** 1009-7848(2024)06-0097-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.009

食物过敏是由食物中特定成分引起的即时超敏反应<sup>[1]</sup>,它会导致患者产生胃肠道、皮肤、呼吸系统疾病,严重者甚至会导致休克。在食物过敏患者中有 2.0%~7.5%为牛乳过敏患者<sup>[2]</sup>,其中 2%~5%的婴幼儿受牛乳过敏问题困扰,严重影响婴幼儿的生长发育<sup>[3-4]</sup>。牛乳过敏已成为世界公共卫生食品安全问题之一。如何有效降低牛乳的致敏性,提高牛乳作为婴幼儿乳粉基料的使用量具有重要的现实意义。

牛乳中主要致敏蛋白中 78%为酪蛋白(Casein, CN),9.7%为 $\alpha$ -乳白蛋白( $\alpha$ -lactalbumin, $\alpha$ -La),3.6%为 $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -lactoglobulin, $\beta$ -Lg),除此之外,还有含量较低,仍有潜在致敏性的乳铁蛋白、免疫球蛋白等次要致敏蛋白<sup>[5]</sup>。目前,降低牛乳致敏性的主要策略有热处理、高压、糖基化以及酶法等<sup>[6]</sup>。酶法因脱敏条件温和、专一性强,且可以提高酶解牛乳营养特性等特点而受到广泛关注<sup>[7]</sup>。蛋白酶的水解作用可使过敏蛋白的肽键断裂,使其降解为小分子肽段,对线性表位产生破坏,或使致敏蛋白的空间结构改变,构象型表位被破坏,从而降低牛乳蛋白致敏性<sup>[8]</sup>。目前降低牛乳致敏性的研究主要以单一致敏乳蛋白为研究对象,然而,致

敏蛋白存在于牛乳全乳中,糖类以及维生素等基质组分不仅伴随加工过程,也会对牛乳蛋白致敏性产生影响<sup>[9]</sup>,影响人体消化过程中致敏蛋白的暴露速度及过敏原的吸收程度<sup>[10]</sup>。仅通过研究加工方法对单一牛乳蛋白致敏性的影响存在局限性。Liang 等<sup>[11]</sup>以全乳体系为研究对象,采用蛋白酶解脱敏技术,结果表明:在脱脂牛乳体系下,酶解能有效改善小鼠腹泻、肠道炎症等过敏症状,降低血清中 B220<sup>+</sup>细胞数量,显著降低脱脂牛乳的潜在致敏性。

本研究突破以往仅对牛乳单一蛋白为研究对象进行致敏性研究的局限,采用实验室前期筛选的脱敏效果较好的碱性蛋白酶、复合蛋白酶<sup>[12]</sup>,以新鲜脱脂牛乳体系为研究对象,在脱脂牛乳自然 pH 值条件下,研究两种蛋白酶复配酶解处理对脱脂牛乳致敏性的影响,为低致敏性牛乳产品的生产提供技术参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

辽宁越秀辉山乳业有限公司采集新鲜牛乳,低温冷藏运输至实验室,离心脱脂后放置于-20℃冰箱;致敏乳蛋白兔过敏血清,课题组自制。

碱性蛋白酶(微生物来源,Alcalase 2.4 L FG)、复合蛋白酶(微生物来源,Protamex 1.6),丹麦 Novozymes 公司;低分子量非预染蛋白 Marker,上海生工生物工程股份有限公司;生物素标记

收稿日期: 2023-06-30

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项  
(2018YFC1604302-03)

第一作者: 钱冠林,男,硕士生

通信作者: 郑艳 E-mail: Zhengyan0403@163.com

的羊抗人 IgE 抗体,美国 KPL 公司;三氯乙酸、甲醇等常规试剂均为国产分析纯。

## 1.2 仪器与设备

Thermo Scientific SL8 型离心机,赛默飞公司;1645050 型蛋白电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;Amersham Imager 600 型凝胶成像仪,美国 GE 公司;S11P-250 型恒温培养箱,上海精宏有限公司;Eon 型酶标仪,美国 Biotek 公司。

## 1.3 方法

1.3.1 蛋白酶法水解脱脂牛乳工艺 根据前期探明的工艺<sup>[13]</sup>,取自然 pH 值为 6.65 脱脂牛乳 150 mL 及蛋白酶溶液(质量浓度:100 mg/mL,酶活力:碱性蛋白酶:105 466 U/g,复合蛋白酶:144 524 U/g)于烧杯,将脱脂牛乳及蛋白酶溶液于 55 °C 预热 20 min,按试验所需比例进行混合,反应结束后 90 °C 水浴 10 min 终止反应,冷却至室温,4 000 r/min、4 °C 离心 5 min,提取上清液 4 °C 冷藏备用。

1.3.2 蛋白酶添加量及配比对脱脂牛乳酶解效果的影响 复配酶水解的酶与底物比(E/S)设置为 2 000,4 000,6 000,8 000 U/g 和 10 000 U/g,碱性蛋白酶与复合蛋白酶的质量比分别为 3:1,2:1,1:1,1:2,1:3,酶解时间固定为 1 h。

1.3.3 酶解时间对脱脂牛乳酶解效果的影响 在 1.3.2 节确定最适宜蛋白酶添加量及配比基础上,将酶解时间条件设置为 15,30,60,90,120 min 进行酶解。

1.3.4 酶解产物的水解度测定 采用 OPA (邻苯二甲醛)法测定酶解产物的水解程度<sup>[14]</sup>。取 400 μL 适当稀释后的样品于试管,向其中加入 3 mL 质量浓度为 0.8 mg/mL 的 OPA 溶液,使用涡旋振荡器振荡混匀,精准反应 2 min,测定 420 nm 处吸光值,使用精氨酸标准溶液绘制标准曲线,根据下式计算水解度。

$$DH(\%) = \frac{((C-C_0) \times N \times V - \beta) \div \alpha}{m} \times 100 \quad (1)$$

式中:C 为根据标准曲线计算出水解液中精氨酸的浓度,mmol/L;C<sub>0</sub> 为根据标准曲线计算出的未水解样品中精氨酸的浓度,mmol/L;N 为样品稀释倍数;V 为样品总体积,L;m 为样品中蛋白质的质量,g;乳清蛋白中修正因子 α 及 β 分别取 1.00,

0.40;h<sub>tot</sub> 为总肽键数目,取 8.8。

1.3.5 酶解产物 IgG 抑制率测定 使用体外间接竞争酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法对酶解产物 IgG 抑制率进行测定,根据梁肖娜<sup>[15]</sup>的方法,略作修改:1)包被:将样品在碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L,pH 9.6)中稀释至 10 μg/mL,在 96 孔酶标板中每孔加入 100 μL,4 °C 冰箱中孵育过夜。2)封阻:倾去包被液,使用含有体积分数 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤 3 次,每次 5 min,每孔用 250 μL 溶于 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)的 3% 明胶在 37 °C 下封阻 1 h,使用 PBST 洗涤,扣干 3 次。3)加入待测血清:酶标板洗涤 3 次,每孔中加入 100 μL 以 PBS 1:5 000 稀释的兔抗血清及阴性血清,37 °C 下孵育 1 h,使用 PBST 洗涤,扣干 3 次。4)加入酶标二抗:将酶标板洗涤 3 次,将以 PBS 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体,在 37 °C 下孵育 1 h,使用 PBST 洗涤,扣干 3 次。5)显色:PBST 洗涤 3 次,每孔加入 100 μL OPD 溶液,37 °C 避光孵育 15 min。6)终止反应:每孔加入 50 μL 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。7)使用酶标仪测定样品 490 nm 波长处吸光度。IgG 抑制率使用下式计算:

$$IgG(\%) = (1 - \frac{B}{B_0}) \times 100 \quad (2)$$

式中:B 为待测样品孔的吸光度值;B<sub>0</sub> 为阴性血清的吸光度值。

1.3.6 酶解产物的免疫印迹试验 免疫印迹试验是一种评估脱脂牛乳酶解产物中成分与 IgG 结合能力的有效手段<sup>[16]</sup>,本研究以纯化后的酪蛋白 β-乳球蛋白、α-乳白蛋白作为对照,通过将未染色的电泳凝胶上的样品蛋白转移至 PVDF 膜上,经过 1% 明胶阻断 1 h 处理后,将 PVDF 膜与稀释后的兔血清(稀释比例为,CN:1:10 000;α-La β-Lg1:5 000)37 °C 轻轻搅动 1 h。随后使用 TBST 洗涤膜 3 次,37 °C 条件下与 1:1 000 稀释后的 HRP 标记的 IgG 二抗反应 1 h。反应结束后,再次洗涤膜,根据 ECL 发光液的使用说明进行显色,最终扫描成像。

1.3.7 酶解产物的 IgE 抑制率的测定 牛乳过敏患者血清池由 10 例 IgE 抗体水平较高患者血清等量混合后建立。

表1 牛奶过敏患者的年龄、性别和IgE含量  
Table 1 Age, gender and IgE content of patients with milk allergy

患者编号	年龄/岁	性别	特定 IgE 水平/ (kU <sub>A</sub> /L)
1	8	女	1.75
2	1	男	0.63
3	6	男	2.89
4	3	女	3.78
5	4	女	2.14
6	2	男	1.67
7	5	女	2.25
8	9	女	1.56
9	10	男	2.02
10	12	男	0.67

注:kU<sub>A</sub> = 一千国际单位, 1U=2.4 ng。

包被及封阻部分同方法 1.3.5 节。

加入待测血清;洗涤酶标板 3 次,每孔中加入 100 μL 以 PBS 1:20 稀释的过敏患者血清。

加入酶标二抗;洗涤酶标板 3 次,加入以 PBS 1:1 000 稀释的生物素标记的羊抗人 IgE 抗体,于 37 °C 下孵育 1 h。

后续步骤及计算方法同 1.3.5 节。

1.3.8 分子质量分布测定 根据 Laemmli<sup>[17]</sup>方法进行修。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, Tricine-SDS-PAGE) 测定酶解物的分子质量分布。配制 16% 分离胶、10% 夹层胶及 4% 浓缩胶,将脱脂牛乳与酶解产物分别与等体积含二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) 的 4×Loading buffer 混合,沸水中孵育 10 min,在 2 000 r/min 离心 5 min,30 V 条件下电泳 1 h 后电压调整为 100 V 继续电泳 2 h。结束电泳取下凝胶固定 20 min,染色 40 min,过夜脱色。

1.3.9 数据处理 数据结果表示为平均值±标准偏差,不同大小写字母表示具有显著差异性,绘图采用 Graphpad Prism 8.0 及 Origin Pro 2022 进行绘制,使用 SPSS 17.0 进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶添加量及配比对脱脂牛乳酶解效果的影响

#### 2.1.1 酶与底物比(E/S)及复配酶配比对脱脂牛

乳水解度的影响 水解度表示脱脂牛乳蛋白在酶解过程中断裂的肽键数占总肽键数的百分比<sup>[18]</sup>,其高低对酶解物的性质具有重要的影响。复配酶 E/S 及复配比例对脱脂牛乳水解度影响如图 1 所示。结果表明,随着 E/S 上升,5 种不同比例复配酶处理下脱脂牛乳的水解度呈显著性上升 ( $P < 0.05$ ),E/S 低于 6 000 U/g 时,牛乳的水解度呈现显著的快速上升趋势 ( $P < 0.05$ ),此时底物中可供断裂的肽键较多,酶解的速率较快;E/S 为 6 000~8 000 U/g 时,牛乳的水解度逐渐呈现稳定趋势,增长不显著 ( $P > 0.05$ ),此时可供酶解的底物消耗殆尽;E/S 达到 10 000 U/g 时水解度提升,可能出现水解过度,牛乳酶解产物中一些肽类被再次水解为更小的短肽<sup>[19]</sup>。碱性蛋白酶比例的增加对水解度具有提升作用,当碱性蛋白酶与复合蛋白酶质量比为 3:1 时,水解度达到 8.78%,高于其它配比,可能由于碱性蛋白酶具有作用底物广泛,可以水解所有羧基侧具有疏水性氨基酸 C 端肽键,复合蛋白酶兼具内切酶与外切酶的活性特点<sup>[20]</sup>,在复配酶解的过程中,碱性蛋白酶与复合蛋白酶可发挥各自特点,对底物作用更加广泛。

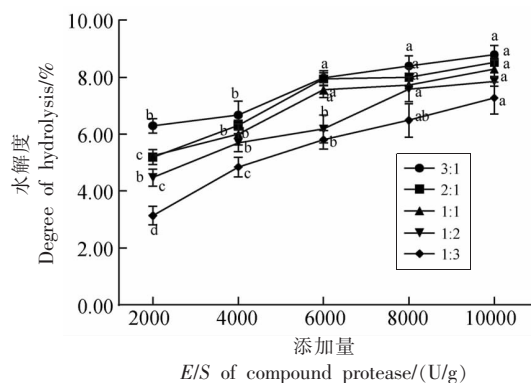


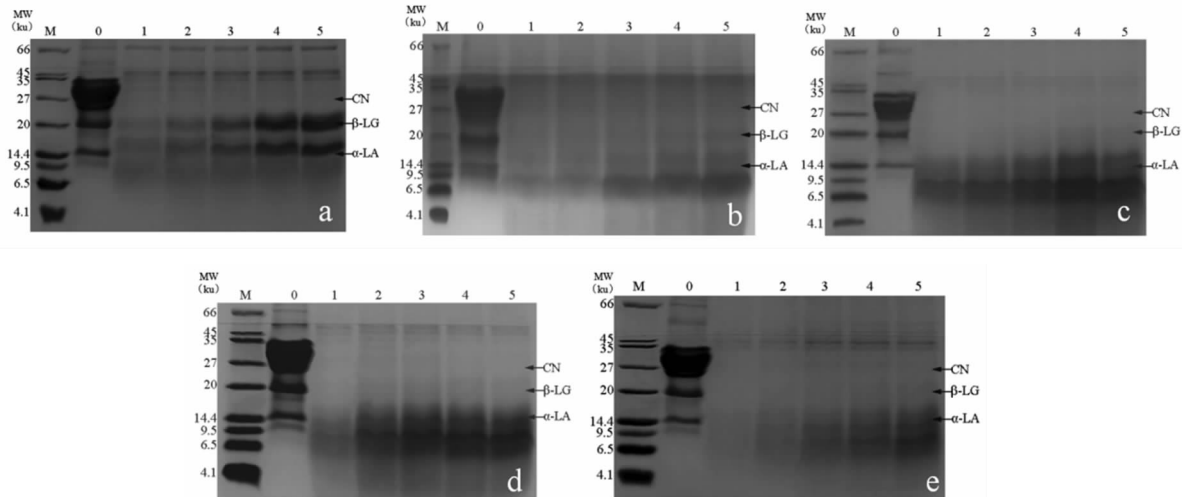
图1 E/S 及复配比例对酶解脱脂牛乳水解度的影响

Fig.1 Effect of E/S and compound ratio on the degree of hydrolysis of skimmed milk

2.1.2 E/S 及复配酶配比对酶解产物分子质量分布影响 固定酶解时间为 1 h,E/S 及复配比例对酶解脱脂牛乳分子质量分布影响如图 2 所示。凝胶电泳结果表明,随着 E/S 增加,脱脂牛乳中主要致敏蛋白 CN、 $\alpha$ -La、 $\beta$ -Lg 逐渐消失。其中图 2b 显示,复配酶中复合蛋白酶质量比越高, $\alpha$ -La、 $\beta$ -Lg 蛋白条带越明显,这表明复合蛋白酶对于致敏蛋

白消解能力弱于碱性蛋白酶。在  $E/S$  为 6 000 U/g 时,主要致敏蛋白条带完全消失,低于 10 ku 分子质量蛋白条带颜色变深且模糊,表明在此  $E/S$  条

件下脱脂牛乳中主要致敏蛋白已被充分水解,低分子质量多肽含量增加。



注:a~e 分别表示  $E/S=2\ 000, 4\ 000, 6\ 000, 8\ 000, 10\ 000$  U/g; M: marker; 0: 未处理组; 1~5 分别表示  $E_{\text{Alcalase}}:E_{\text{Protamex}}=3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3$ 。

图2  $E/S$  及复配比例对酶解脱脂牛乳分子质量分布的影响

Fig.2 Effect of  $E/S$  and compound ratio on the molecular weight distribution of skimmed milk

**2.1.3  $E/S$  及复配酶比对酶解产物 IgG 抑制率的影响** 间接竞争 ELISA 法可基于抗原性特异性对脱脂牛乳及水解物的残留抗原性进行评价<sup>0</sup>, IgG 抑制率表示酶解产物中致敏蛋白对血清中特异性抗体与标准抗原蛋白结合的抑制作用。复配酶  $E/S$  及比对酶解脱脂牛乳 IgG 抑制率结果如图 3 所示,随着  $E/S$  增加,复合蛋白酶质量比越大 IgG 抑制率越低,此结果与 2.1.2 节凝胶电泳条带中致敏蛋白消解效果结果一致,可能是蛋白酶对过敏表位消除能力差异导致,有研究表明复合蛋白酶对于  $\alpha$ -La、 $\alpha$ s2-CN 的线性过敏表位消除率低于碱性蛋白酶<sup>15]</sup>。在 5 种不同质量比中,碱性蛋白酶与复合蛋白酶配比为 3:1 时 IgG 抑制率最大,且  $E/S$  为 6 000 U/g 时脱脂牛乳 IgG 抑制率为 84.68%,抗原性最低。前期研究中,Liang 等<sup>22]</sup>使用复合蛋白酶与碱性蛋白酶单酶分别对脱脂乳进行水解,在  $E/S$  为 8 000 U/g 时复合蛋白酶获得 IgG 抑制率最高为 72.25%,在 6 000 U/g 时碱性蛋白酶获得 IgG 抑制率最高为 81.27%,与本研究复配酶中单一蛋白酶不同配比在对应酶添加量上变化趋势一致。

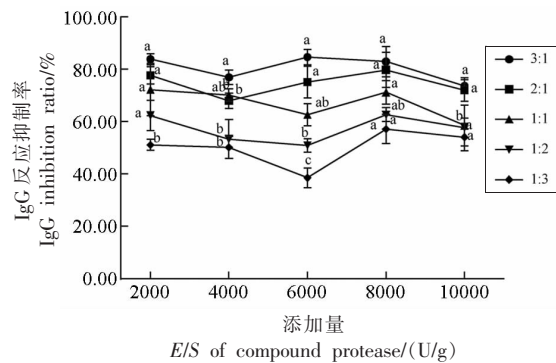


图3 复配酶  $E/S$  及复配比例对酶解脱脂牛乳 IgG 抑制率的影响

Fig.3 Effect of  $E/S$  and compound ratio for hydrolysis on the IgG inhibition ratio of skimmed milk

相比于复合蛋白酶单一水解,复配酶可以更显著降低脱脂牛乳的抗原性。但相比于碱性蛋白酶单一水解,复配酶水解对脱脂牛乳抗原性降低效果提高不显著,可能是受蛋白酶的类型与酶解特异性影响,可以使可检测到的致敏蛋白条带消失但无法对全部致敏蛋白造成破坏,进而完全消除抗原性,此结果与 Yao 等<sup>23]</sup>的研究结果一致。此外,在酶解进行的过程中底物的电荷和结构发生

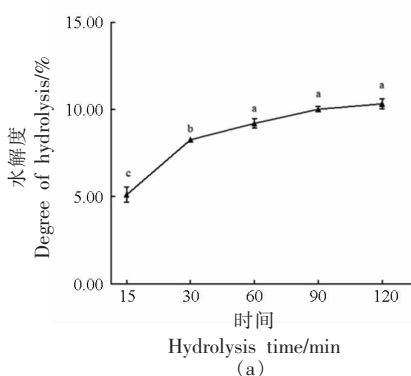
变化,也可能影响酶的选择性。

**2.1.4 *E/S* 及复配酶配比对过敏患者血清 IgE 抑制率的影响** 大多数牛乳过敏是由 IgE 介导的 I 型变态反应<sup>0</sup>。*E/S* 及蛋白酶配比对过敏患者血清 IgE 抑制率如图 4 所示,当碱性蛋白酶与复合蛋白酶质量比为 3:1,且 *E/S* 为 6 000 U/g 时,过敏患者血清 IgE 抑制率为 38.23%,显著高于其它配比 ( $P<0.05$ ),显著降低了脱脂牛乳的致敏性。Villas-Boas<sup>[25]</sup>的研究也表明碱性蛋白酶也可以通过裂解  $\beta$ -Lg 减少抗原表位数量,有效降低 IgE 结合能力从而降低致敏性。

综上所述,在较高 *E/S* 时,虽然酶解效果较好,但脱脂牛乳致敏性没有降至最低,这也表明脱脂牛乳水解度与 IgG/IgE 结合能力并无明显关联,这与谭宏凯等<sup>[26]</sup>使用不同蛋白酶水解酪蛋白产生的结果一致;复配酶添加量的增加以及配比的改变脱脂牛乳抗原性上下浮动,这可能是由于酶解过程中致敏蛋白内部结构变化,导致内部抗原表位不断暴露、破坏导致的,且在高水解度条件下可能会产生苦味,因此综合考虑,确定复配酶 *E/S* 为 6 000 U/g 且碱性蛋白酶与复合蛋白酶质量比为 3:1 时为最适宜酶解添加量及配比。

## 2.2 酶解时间对脱脂牛乳酶解效果的影响

### 2.2.1 酶解时间对脱脂牛乳水解度的影响 酶解



注: M: marker; 0: 未处理组; 1~5 分别表示复配酶水解 15, 30, 60, 90, 120 min。

图 5 酶解时间对酶解脱脂牛乳水解度 (a) 及分子质量分布影响 (b)

Fig.5 Effect of hydrolysis time on the degree of hydrolysis (a) and molecular weight distribution (b) for skimmed milk

**2.2.2 酶解时间对脱脂牛乳 IgG 反应抑制率的影响** 酶解时间对脱脂牛乳 IgG 反应抑制率的影响如图 6 所示,随着酶解时间的增加,脱脂牛乳 IgG

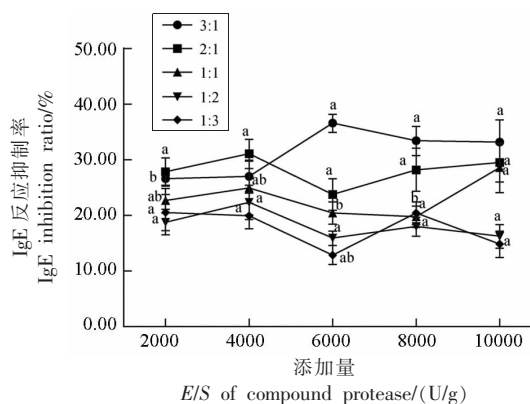
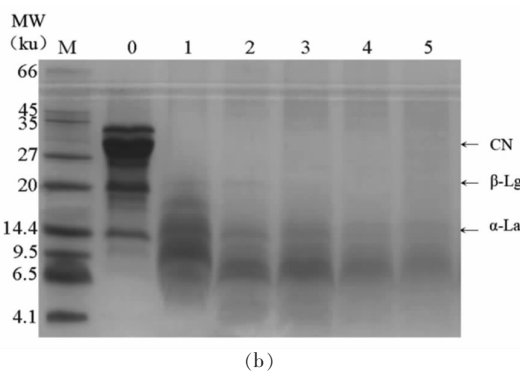


图 4 复配酶 *E/S* 及配比对过敏患者血清 IgE 抑制率的影响

Fig.4 Effect of *E/S* and compound ratio for dual-enzyme hydrolysis on the IgE inhibition ratio

时间对脱脂牛乳水解度影响如图 5a 所示,水解度在 60 min 内显著上升 ( $P<0.05$ ),在 60 min 时水解度为 9.21%,反应后期 90~120 min 时肽键数量减少,酶和底物的反应达到饱和逐渐稳定增加不显著 ( $P<0.05$ )。Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳条带图 5b 显示,酶解 60 min (lane 3) 后脱脂牛乳中 3 种主要致敏蛋白 CN,  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La 条带消失,表明复配酶对脱脂牛乳主要致敏蛋白水解效果显著,可以有效破坏致敏蛋白。



(b)

抑制率呈现先降低再升高再降低的趋势。当酶解时间为 15 min 时,复配酶处理对牛乳 IgG 抑制率为 78.14%,酶解处理 30 min 时,其对牛乳 IgG 的

抑制率降低至 71.96%，可能是隐藏在致敏蛋白内部的抗原线性表位随酶解时间增加暴露，与 IgG 抗体的结合能力增强，致敏性升高，李燕等<sup>[28]</sup>使用碱性蛋白酶与胰蛋白酶复配酶解  $\beta$ -Lg 也发现了类似现象；在酶解时间为 90 min 时，脱脂牛乳 IgG 的抑制率达到最大值 88.77%；酶解时间为 120 min 时，脱脂牛乳 IgG 抑制率再次降低，可能由于酶解时间过长，酶解环境发生变化，酶切位点选择性改变。

**2.2.3 酶解时间对过敏患者血清 IgE 反应抑制率的影响** 酶解时间对过敏患者血清 IgE 反应抑制率的影响如图 7 所示，复配酶对牛乳过敏患者血清中 IgE 抑制率随酶解时间产生波动，其中酶解时间为 60 min 时对过敏患者血清 IgE 抑制率为 41.56%，与酶解 120 min 时过敏患者血清 IgE 抑制率(42.16%)差异不显著( $P < 0.05$ )，表明水解 60 min 时脱脂牛乳中致敏蛋白已经被充分破坏，有效降低了脱脂牛乳致敏性。Liang 等<sup>[29]</sup>使用碱性蛋白酶、复合蛋白酶单酶分别对脱脂乳进行酶解 60, 120 min，脱脂牛乳 IgE 结合能力分别下降了 44.24% 及 47.4%，与本研究结果无显著差异；与前期研究中<sup>[30]</sup>使用碱性蛋白酶与风味蛋白酶复配进行酶解相比，本研究中脱脂牛乳 IgE 结合能力显著提高了 18.63%，进一步降低了脱脂牛乳的致敏性。

综上所述，结合 2.1 节及 2.2 节的结果，本试验将  $E/S$  为 6 000 U/g、 $E_{\text{Alcalase}}:E_{\text{Protamex}}=3:1$ 、酶解时间为 60 min 作为复配酶酶解脱脂牛乳的最适宜条件。

### 2.3 最优复配条件下复配酶及单酶处理对脱脂牛乳致敏性的影响对比

**2.3.1 对脱脂牛乳 IgG 反应抑制率的影响对比** 最优复配条件下单酶及复配酶处理对脱脂牛乳的 IgG 抑制率结果如图 8 所示。结果表明复配酶处理对脱脂牛乳 IgG 反应抑制率显著高于单酶 ( $P < 0.05$ )，碱性蛋白酶对脱脂牛乳的 IgG 反应抑制率显著高于复合蛋白酶(碱性:83.21%;复合:79.98%)，其中复配酶对牛乳的 IgG 抑制率为 86.94%，表明在此酶解条件下复配酶可以有效降解致敏蛋白，降低脱脂牛乳致敏蛋白抗原性。Wroblewask 等<sup>[31]</sup>采用碱性蛋白酶与木瓜蛋白酶混合进行两步法酶

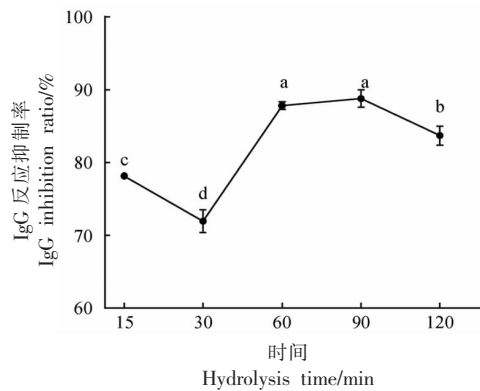


图 6 酶解时间对脱脂牛乳 IgG 反应抑制率的影响  
Fig.6 Effect of hydrolysis time on IgG inhibition ratio for skimmed milk

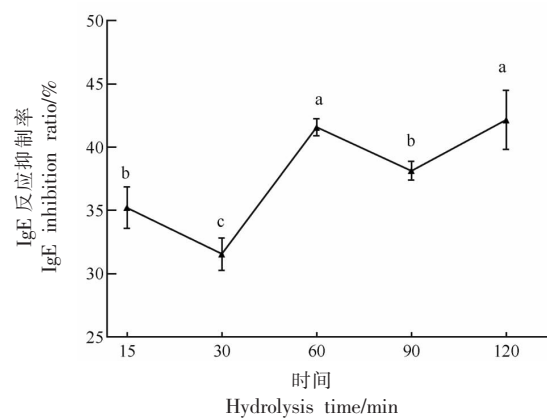


图 7 酶解时间对过敏患者血清 IgE 反应抑制率的影响  
Fig.7 Effect of hydrolysis time on serum IgE inhibition rate of allergic patients

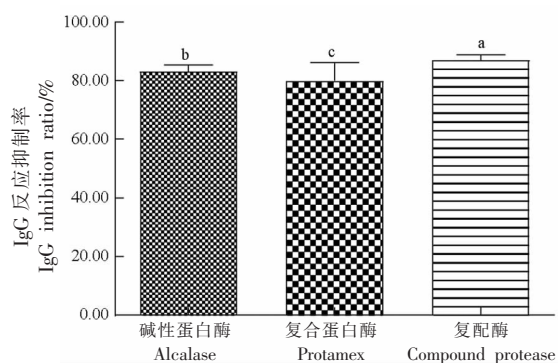


图 8 复配酶及单酶处理对脱脂牛乳 IgG 反应抑制率的影响

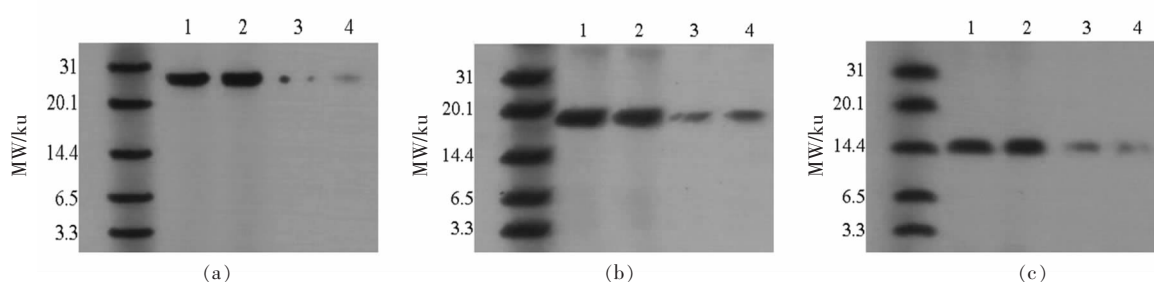
Fig.8 Effects of compound protease and single protease treatment on the inhibition rate of IgG in skimmed milk

解，相比于单一蛋白酶解显著降低了乳清蛋白成分中  $\alpha$ -La  $\beta$ -Lg 的免疫反应性，与本研究结果相

近,表明复配酶解相比于单一酶解具有酶切位点相互补充,酶解产物中完整致敏表位肽段概率更低的优势,也更适宜对具有多种致敏蛋白成分的牛乳基质进行加工。

免疫印迹是一种以高分辨率凝胶电泳与免疫化学分析相结合的杂交技术,对致敏蛋白检测可以达到纳克级别<sup>[32]</sup>。不同处理对牛乳中致敏蛋白与 IgG 结合能力的免疫印迹分析结果如图 9 显示,CN 的分子质量约为 19.0~25.2 ku,复合蛋白酶处理后牛乳的条带仍呈现较大的灰度,表明酶

解后此时依然具有较强致敏性,而碱性蛋白酶、复配酶处理后条带灰度降低,这表明这两种蛋白酶有效降低了 CN 与 IgG 结合能力,降低了脱脂牛乳致敏性。牛乳中  $\beta$ -Lg 及  $\alpha$ -La 的分子质量分别约为 18.3,14.2 ku,碱性蛋白酶及复配酶处理后条带的灰度明显降低、颜色较浅,与 CN 的免疫印迹结果相似,表明碱性蛋白酶、复配酶可以有效降低脱脂牛乳主要致敏蛋白致敏性,且效果优于复合蛋白酶,与 ELISA 结果一致。



注:(a) CN,(b)  $\beta$ -Lg,(c)  $\alpha$ -La;条带 1~4 分别为:脱脂牛乳、复合蛋白酶、碱性蛋白酶、复配酶处理。

图 9 复配酶及单酶处理对脱脂牛乳主要致敏蛋白与兔 IgG 结合能力的免疫印迹分析

Fig.9 Western blot analysis of compound protease and single protease treatment on the IgG binding ability of main allergenic proteins in skimmed milk

2.3.2 对过敏患者血清 IgE 反应抑制率的影响对比 复配酶及单酶处理对过敏患者血清 IgE 反应抑制率的影响结果如图 10 所示,与单酶处理相比,复配酶对牛乳过敏患者血清中的 IgE 抑制率显著提高至 43.46%( $P<0.05$ ),碱性蛋白酶及复合蛋白酶对脱脂牛乳过敏患者血清中 IgE 抑制率分别为 37.67%和 33.38%。与脱脂牛乳 IgG 结合能力相比,复配酶对脱脂牛乳 IgE 结合能力降低较低,可能是因为兔血清 IgG 以及人血清 IgE 对牛乳蛋白中的结合位点被降解程度差异所致,这与许倩<sup>[33]</sup>的研究结果相似,碱性蛋白酶在酶解效果上具有更低的致敏性,可能是由于其对脱脂牛乳含量最多的酪蛋白中丰富的疏水性氨基酸更容易降解<sup>[34]</sup>,复配酶兼具碱性蛋白酶以及复合蛋白酶性质,因此可以对脱脂牛乳致敏蛋白中 IgG/IgE 结合位点造成更大破坏,使脱脂牛乳具有更低的致敏性,更适宜生产低致敏性牛乳制品。

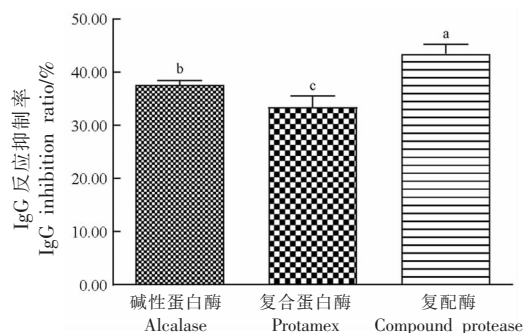


图 10 复配酶及单酶处理脱脂牛乳过敏患者血清 IgE 反应抑制率的影响

Fig.10 Effects of compound protease and single protease treatment skimmed milk on binding capacity of IgE in allergic patients serum

### 3 结论

本研究以水解度、分子质量分布、IgG 及过敏患者血清 IgE 抑制率为考察指标,考察了双酶复配处理对脱脂牛乳致敏性的影响。结果表明复配酶在质量比( $E_{Alcalase}:E_{Protamex}$ )为 3:1,酶与底物比( $E/$

S)为6 000 U/g,酶解时间为60 min的最优复配条件下,脱脂牛乳的水解度为9.21%,对IgG反应抑制率为86.94%,显著高于单酶酶解( $P<0.05$ )(碱性蛋白酶:83.21%;复合蛋白酶:79.98%);对牛乳过敏患者血清IgE的抑制率分别为43.46%,显著高于单酶酶解( $P<0.05$ )(碱性蛋白酶:37.67%;复合蛋白酶:33.38%),有效降低了脱脂牛乳的致敏性。

### 参 考 文 献

- [1] CARRARD A, RIZZUTI D, SOKOLLIK C. Update on food allergy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 70(12): M338-M345.
- [2] GARCÍA-ARA M C, BOYANO-MARTÍNEZ M T, DÍAZ-PENA J M, et al. Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants[J]. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 2004, 34(6): 866-870.
- [3] 陈境, 张晓宁, 霍麒文, 等. 婴幼儿牛乳蛋白过敏机制及解决方法研究进展[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(7): 289-298.  
CHEN J, ZHANG X N, HUO Q W, et al. Research progress on mechanism and solution of hypersensitivity to bovine milk protein in infants[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(7): 289-298.
- [4] POURPAK Z, MOSTAFAIE A, HASAN Z, et al. A laboratory method for purification of major cow's milk allergens[J]. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 2004, 25(4): 385-397.
- [5] 巫圆圆, 李欣, 陈红兵. 酶法降低牛乳蛋白致敏性的研究进展[J]. *食品科学*, 2012, 33(23): 340-345.  
WU Y Y, LI X, CHEN H B. Research progress on reducing sensitization of bovine milk protein by enzymatic method[J]. *Food Science*, 2012, 33(23): 340-345.
- [6] 黄美佳. 钙离子对牛乳 $\alpha$ -乳白蛋白结构与致敏性的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2018: 12-15.  
HUANG M J. Effect of calcium ions on structure and sensitization of bovine milk  $\alpha$ -lactalbumin[D]. Nanchang: Nanchang University, 2018: 12-15.
- [7] OLIVEIRA J, CANDREVA A M, RIZZO G, et al. Allergenicity reduction of cow's milk proteins using latex peptidases[J]. *Food Chemistry*, 2019, 284(JUN. 30): 245-253.
- [8] BU G H, LUO Y K, CHEN F S, et al. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review[J]. *Dairy Science & Technology*, 2013, 93(3): 211-223.
- [9] 孟轩夷. 十八碳不饱和脂肪酸对牛乳 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白致敏性的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.  
MENG X Y. Effect of C18 unsaturated fatty acid on the allergenicity of bovine  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.
- [10] LIU Q Z, LIN S Y, SUN N. How does food matrix components affect food allergies, food allergens and the detection of food allergens? A systematic review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 127: 280-290.
- [11] LIANG X N, YANG H, LUO X, et al. Assessment of the allergenicity and antigenicity potential of enzymatically hydrolyzed cow milk[J]. *Food Bioscience*, 2022, 45(1): 146-155.
- [12] 程娇, 孙敬, 梁肖娜, 等. 蛋白酶处理对脱脂乳感官品质及游离氨基酸的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(16): 14-22.  
CHENG J, SUN J, LIANG X N, et al. Effects of protease treatment on sensory quality and free amino acids of skim milk[J]. *Food Science*, 2021, 42(16): 14-22.
- [13] 程娇. 酶解处理对脱脂牛乳功能特性及品质的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.  
CHENG J. Effects of enzymatic hydrolysis on the functional properties and quality of skim milk[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
- [14] 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: 15-16.  
TAN M. Enzymatic preparation and flavor improvement of low antigenic whey protein[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016: 15-16.
- [15] 梁肖娜. 酶法脱敏对牛乳主要过敏蛋白致敏性机制影响的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2022.  
LIANG X N. Effect of enzymatic desensitization on the sensitization mechanism of major allergenic proteins in cow milk[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2022.
- [16] YU J M, MIKIASHVILI N. Effectiveness of different proteases in reducing allergen content and IgE-



- binding of raw peanuts[J]. Food Chemistry, 2020, 307: 125565.
- [17] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 685-685.
- [18] BLAYO C, VIDCOQ O, LAZENNEC F, et al. Effects of high pressure processing (hydrostatic high pressure and ultra-high pressure homogenisation) on whey protein native state and susceptibility to tryptic hydrolysis at atmospheric pressure[J]. Food Research International, 2016, 79, 40-53.
- [19] 徐兆刚. 河蚌抗氧化肽的制备及其特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.  
XU Z G. Research on the preparation and properties of antioxidant peptides from mussel[D]. Changchun: Jilin University, 2016.
- [20] 李慧静. 超高静压协同酶法降低专用大豆分离蛋白致敏性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.  
LI H J. Study on reducing the sensitization of special soybean protein isolate by ultra-high static pressure combined with enzymatic method[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.
- [21] MÄKINEN-KILJUNEN S, PALOSUO T. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine beta-lactoglobulin in infant feeding formulas and in human milk[J]. Allergy, 1992, 47 (4 Pt 2):
- [22] LIANG X N, YANG H, SUN J, et al. Effects of enzymatic treatments on the hydrolysis and antigenicity reduction of natural cow milk[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 9(2): 985-993.
- [23] YAO M J, LUO Y K, SHI J, et al. Effects of fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* GG on the antigenicity and allergenicity of four cows' milk proteins[J]. Food and Agricultural Immunology, 2014, 25(4): 545-555.
- [24] TORDESILLAS L, BERIN M C, SAMPSON H A. Immunology of food allergy[J]. Immunity, 2017, 47 (1): 32-50.
- [25] VILLAS-BOAS M B, BENEDE S, DE LIMA ZOLLNER R, et al. Epitopes resistance to the simulated gastrointestinal digestion of  $\beta$ -lactoglobulin submitted to two-step enzymatic modification[J]. Food Research International, 2015, 72: 191-197.
- [26] 谭宏凯, 程剑锋, 熊子奕, 等. 消减牛乳酪蛋白致敏性蛋白酶的筛选[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45 (4): 22-28.
- TAN H K, TAN J F, XIONG Z Y, et al. Protease screening for the elimination of the allergenicity of casein[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2022, 45(4): 22-28.
- [27] 包春菊. 复合酶水解脱脂乳制备 ACE 抑制肽的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2017.  
BAO C J. Preparation of ACE inhibitory peptide from Nonfat milk by complex enzyme hydrolysis[D]. Xian: Shaanxi University of Science and Technology, 2017.
- [28] 李燕, 伊洋, 石径, 等. 低致敏牛乳清蛋白的酶法制备[J]. 乳业科学与技术, 2019, 42(5): 4-8.  
LI Y, YIN Y, SHI J, et al. Enzymatic preparation of bovine whey protein hydrolysate with low allergenicity[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2019, 42(5): 4-8.
- [29] LIANG X N, CHENG J, SUN J, et al. Reduction of immunoreactivity and improvement of the nutritional qualities in cow milk products by enzymatic hydrolysis [J]. Lwt -Food Science and Technology, 2021, 150: 111994
- [30] 钱冠林, 孙敬, 刘微, 等. 双酶水解对脱脂牛乳致敏性的影响[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(4): 36-44.  
QIAN G L, SUN J, LIU W, et al. Effect of double enzyme hydrolysis on sensitization of skim milk [J]. Dairy Science and Technology, 2022, 45 (4): 36-44.
- [31] WROBLEWSKA B, KARAMAC M, AMAROWICZ R, et al. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 39(8): 839-850.
- [32] 朱丽. 大豆 7S 球蛋白致敏性的降低及其抗酶解肽段去除的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.  
ZHU L. Reduction of sensitization of soybean 7S globulin and its anti-enzymatic peptide removal[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [33] 许倩. 不同加工处理对牛乳蛋白抗原性及过敏原性的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.  
XU Q. Effects of different processing ways on the antigenicity and allergenicity of main bovine milk proteins[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [34] 张琦, 何国庆. 基于生物酶解法的牛乳蛋白脱敏技

术研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(1): 373-377, 386.  
ZHANG Q, HE G Q. Research progress of milk

protein desensitization based on biological enzymatic method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(1): 373-377, 386.

### The Effects of Alcalase and Protamex Compound Enzymatic Hydrolysis on the Allergenicity of Skimmed Milk

Qian Guanlin, Sun Jing, Yang Hui, Liang Xiaona, Yue Xiqing, Zheng Yan\*  
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110000)

**Abstract** The presence of allergenic proteins in cow milk limits its use as infant formula to a certain extent. Skimmed milk was used as raw material, the degree of hydrolysis, the IgG inhibition rate of skimmed milk and IgE inhibition rate of patients were used as indicators and the effects of alcalase and protamex compound treatment on its sensitization were investigated. The results showed that the most suitable conditions for the enzymatic hydrolysis were the substrate ratio ( $E/S$ ) of alcalase and protamex was 6 000 U/g, the composite ratio for alcalase and protamex was 3:1, and the hydrolysis time was 60 min, and the inhibition rate of the compound enzyme on skimmed milk IgG and IgE antibodies were significantly higher than that effect of the single protease treatment ( $P<0.05$ ), which were 86.94% and 43.46%, respectively, indicating that the compound enzyme is an effective method to reduce the allergenicity of skimmed milk.

**Keywords** skimmed milk; enzymatic hydrolysis; allergenicity; ELISA