

# 酶法降低牛乳蛋白致敏性的研究进展

巫圆圆<sup>1,2,3</sup>, 李欣<sup>1,4</sup>, 陈红兵<sup>1,3,\*</sup>

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.南昌大学环境与化学工程学院, 江西 南昌 330047;  
3.南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047; 4.南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 酶解牛乳是牛乳加工中的常用技术之一, 并且作为低致敏牛乳制备的关键技术已成功应用于实际中。本文综述牛乳中主要过敏原及酶解机制, 并详细介绍不同种类的单一酶解和复合酶解用于降低牛乳蛋白致敏性的研究, 以期对制备和生产低致敏性乳制品提供一定依据和理论基础。

**关键词:** 牛乳过敏原; 过敏原性; 酶解

## Research Progress of Enzymatic Hydrolysis for Allergenicity Reduction of Milk Protein

WU Yuan-yuan<sup>1,2,3</sup>, LI Xin<sup>1,4</sup>, CHEN Hong-bing<sup>1,3,\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;  
2. School of Environmental and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China;  
3. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China;  
4. School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Enzymatic hydrolysis is one common technology of milk processing, which has been used in producing hypoallergenic formula. The major allergens in milk and the mechanism of enzymatic hydrolysis for reducing milk allergens are introduced briefly in this paper. The application of single proteinase and several proteinases in combination for reducing allergenicity of milk protein are reviewed, which will be useful for the preparation and production of hypoallergenic dairy products.

**Key words:** milk allergen; allergenicity; enzymatic hydrolysis

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)23-0340-06

牛乳是引起食物过敏的八大类常见食物之一<sup>[1]</sup>, 也是新生儿最早接触的过敏原之一, 因而牛乳过敏在婴幼儿中最常见<sup>[2]</sup>。据相关调查显示, 2%~7.5%的婴幼儿以及小于1%的成年人存在不同程度的牛乳过敏<sup>[3]</sup>。牛乳过敏是由牛乳蛋白引起的一种不良反应, 主要是由IgE介导的免疫反应, 可引起过敏性鼻炎、哮喘、湿疹、腹泻、胃肠出血等症状, 严重时甚至会导致过敏性休克, 严重影响了人体健康<sup>[4-6]</sup>。近年来, 如何通过改性技术, 降低牛乳致敏性成为国内外研究的热点。已有众多学者研究酶法水解技术降低牛乳蛋白的过敏性。但目前, 国内学者对其研究的较少, 且缺乏实际应用方面的研究。

## 1 乳过敏原蛋白

牛乳中含有30多种蛋白, 为酪蛋白和乳清蛋白, 其

中乳清蛋白主要包括 $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、牛乳血清白蛋白、乳铁蛋白、免疫球蛋白等, 这些蛋白都具有潜在的致敏性。目前普遍认为酪蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白及 $\alpha$ -乳白蛋白是主要的过敏原, 而牛血清白蛋白、免疫球蛋白及乳铁蛋白是次要过敏原<sup>[7]</sup>。

$\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -lactoglobulin,  $\beta$ -LG)是主要的乳清蛋白之一, 属于强过敏原Lipocalin家族<sup>[8]</sup>。在鲜牛乳中,  $\beta$ -乳球蛋白占乳清蛋白总量的50%, 占牛乳蛋白总量的10%, 而母乳中不含有 $\beta$ -乳球蛋白。 $\beta$ -乳球蛋白为球状蛋白, 它的三级结构稳定, 耐胃酸耐胃蛋白酶水解, 消化后还存在完整的 $\beta$ -乳球蛋白或致敏肽段, 易引起过敏反应。有研究<sup>[9]</sup>报道, 牛乳过敏人群中82%对 $\beta$ -乳球蛋白过敏, 因此该蛋白被认为是牛乳中最主要的过敏原之一<sup>[10]</sup>。氨基酸序列41~60位、102~124位、149~162位, 这3个表位

收稿日期: 2012-07-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171716); “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAK10B03; 2012BAK17B02); 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室项目(SKLF-MB-201002; SKLF-TS-201109); 南昌大学食品科学与技术重点实验室青年骨干基金项目(No.SKLF-QN-201112); 江西省科技支撑计划项目(No.20111BBG70010-1)

作者简介: 巫圆圆(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物加工工程。E-mail: katherinewu@sina.cn

\*通信作者: 陈红兵(1967—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: chbgjy@hotmail.com

可被90%~100%的牛乳过敏患者血清识别,因此被称为主要的过敏表位。另有3个主要表位分别在肽链1~8位、25~40位、92~100位,被58%~72%过敏患者的血清所识别<sup>[11]</sup>。

酪蛋白(casein, CN)约占牛乳总蛋白的78%~80%,包括4种类型: $\alpha_{s1}$ -、 $\alpha_{s2}$ -、 $\beta$ -和 $\kappa$ -分别占酪蛋白的40%、10%、35%、12.5%。4种酪蛋白初级结构同源性小,且均为磷酸化蛋白,其中 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白不存在于母乳中,因而其致敏性较强。酪蛋白分子通过疏水作用形成非刚性的无规则卷曲三级结构,极易在消化过程中被蛋白酶破坏,因而酪蛋白的致敏性理应较弱<sup>[8]</sup>。但它在牛乳中的含量高且线性表位较多<sup>[12]</sup>,且有文献[5]报道,牛乳过敏人群中约有65%对酪蛋白过敏,所以它仍是一种主要的过敏原。另据研究[13]发现,对牛乳过敏患者的血清可有效地识别 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白序列的123~132位和69~78位、 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白序列的171~180位以及 $\kappa$ -酪蛋白序列的155~164位和13~22位。

$\alpha$ -乳白蛋白( $\alpha$ -lactalbumin,  $\alpha$ -LA)是一种钙结合的紧密球形的单体球蛋白,属于溶菌酶家族,占乳清蛋白的25%。 $\alpha$ -乳白蛋白结构中含有4个二硫键,以及对钙的高亲和性保持了其二级结构和天然构象的稳定性。牛乳 $\alpha$ -乳白蛋白与母乳 $\alpha$ -乳白蛋白相比有74%氨基酸残基相同,另有6%的残基化学性质相似,是一种重要的营养蛋白,但仍然是主要的牛乳过敏原之一<sup>[14]</sup>。有研究<sup>[15]</sup>表明,构象性表位对 $\alpha$ -乳白蛋白过敏原性具有重要的作用。对其线性表位定位研究表明, $\alpha$ -乳白蛋白的IgE结合表位分别是肽链1~16位、13~26位、47~58位及93~102位,另有3个IgG表位分别为肽链7~18位、51~61位、89~108位,且可被半数以上的过敏人群所识别<sup>[16]</sup>。

## 2 酶法降解牛乳过敏原

### 2.1 酶法降解过敏原的机制

酶法水解是利用一种或多种蛋白酶对蛋白质进行限制性水解的方法。该方法对过敏原的作用主要有两个方面:一是通过对食物过敏原蛋白的限制水解,改变过敏原表位的三级结构或去除过敏原蛋白表面的一些过敏原表位,或者将蛋白内部的过敏原表位暴露出来;二是断裂肽键,使蛋白质部分水解成小肽或氨基酸,减小过敏原的分子质量,从而可能降低其致敏性<sup>[17]</sup>。

根据乳过敏原主要线性表位的氨基酸序列可知,胃蛋白酶、胰凝乳酶、碱性蛋白酶及胰蛋白酶均可水解破坏 $\beta$ -乳球蛋白41~60位表位,其中碱性蛋白酶可在它的11个肽键处水解,胃蛋白酶、碱性蛋白酶均可酶解 $\beta$ -乳球蛋白的AA 92~100且形成游离的氨基酸及小的肽段; $\alpha$ -乳白蛋白的4个IgE结合表位均可以被碱性蛋白酶有效

破坏从而使其致敏性降低; $\alpha_{s1}$ -酪蛋白171~180位可被胃蛋白酶水解成游离的氨基酸及小肽段,水解的肽键数有4个,且 $\kappa$ -酪蛋白的13~22位可被胰蛋白酶有效水解。

### 2.2 酶法降低牛乳蛋白过敏原性的应用

蛋白酶解是一种常用的蛋白质改性方法,能够有效降低蛋白质的致敏性。目前,国内外已经开展很多关于酶水解对蛋白质过敏原性影响的研究。在酶法水解牛乳蛋白过程中,无论是用单一酶水解还是多种酶复合水解,都会使蛋白质的结构发生变化,可能会导致蛋白质中部分或全部表位发生变化或被破坏,从而影响牛乳蛋白的过敏原性。目前常用于水解牛乳过敏蛋白的酶有:胃蛋白酶、中性蛋白酶、凝乳蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、酸性蛋白酶等。

#### 2.2.1 单一酶降低牛乳蛋白过敏原性的应用

##### 2.2.1.1 胃蛋白酶

胃蛋白酶(Pepsin)是胃消化蛋白水解酶,属于天冬氨酸蛋白水解酶类<sup>[18]</sup>,主要作用于蛋白质及多肽分子中含苯丙氨酸、酪氨酸或亮氨酸组成的肽键,要求断裂点两侧的残基为疏水性氨基酸,其主要分解产物是胨,产生多肽或氨基酸则较少<sup>[19]</sup>。

胃蛋白酶对过敏原的免疫特性的变化研究较多。早期研究中,Schmidt等<sup>[20]</sup>研究了在pH2~4时胃蛋白酶水解作用对乳清蛋白抗原性的影响,发现pH2~3时其抗原性没有太大的改变,然而在pH4时胃蛋白酶水解性下降,除 $\beta$ -乳球蛋白外所有蛋白的抗原性增强。之后,Duchateau等<sup>[21]</sup>用取自222个牛乳过敏患者的血清检测经胃蛋白酶解后的 $\beta$ -乳球蛋白的致敏性,结果显示经胃蛋白酶处理的 $\beta$ -乳球蛋白的IgE结合能力高于天然的 $\beta$ -乳球蛋白,即致敏性增强。其后的一些研究发现,胃蛋白酶的水解可以降低牛乳的致敏性。Hussein等<sup>[22]</sup>用胃蛋白酶水解牛乳和牛乳中的蛋白质后,采用间接竞争ELISA检测发现两者的水解产物与牛乳过敏患者血清的免疫反应性分别只有原来的30%和16%,可见胃蛋白酶处理后的乳蛋白致敏性显著降低。唐宁等<sup>[23]</sup>用胃蛋白酶对婴儿奶粉进行酶解,经快速蛋白液相色谱分析,结果表明其水解产物比原始蛋白分子质量明显降低;进一步的动物实验发现水解产物显著抑制由牛奶蛋白引起的小鼠伊文思蓝血管通透性,抑制率为51%;小鼠同种及异种被动皮肤过敏反应实验发现,与未水解牛乳组比较,同种皮肤过敏反应胃蛋白酶解产物炎性渗出降低率为29%,异种皮肤过敏反应的降低率为34%,这些结果证明胃蛋白酶酶解后牛奶大分子蛋白质物质降解,其过敏原性降低。

另外,还有学者将其他加工手段与酶法水解结合对牛乳过敏原进行加工,以期能更好地降低牛乳的致敏性。如,Kananen等<sup>[24]</sup>用硫化氢处理乳清蛋白,再用胃蛋白酶处理后发现 $\beta$ -乳球蛋白抗原性显著降低,且在胰蛋

白酶水解30min后,  $\beta$ -乳球蛋白的抗原性基本完全消失。这是由于硫化氢破坏蛋白构象, 胃蛋白酶更易进入水解其线性表位或成小肽段。Chicón等<sup>[25]</sup>研究了高压下胃蛋白酶解后 $\beta$ -乳球蛋白的免疫反应性的变化, 结果表明在水解之前高压处理可提高水解程度但无法降低抗原性和IgE结合能力, 进一步酶解后可使蛋白断裂成更小的肽段, 降低其抗原性和IgE结合能力。此外, 张颖等<sup>[26]</sup>研究了发酵与胃蛋白酶解结合处理乳清蛋白后, 其抗原性的变化。结果发现乳清发酵液, 在酶解初期 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的抗原性均迅速降低,  $\alpha$ -乳白蛋白抗原性比直接酶解的升高了6%~7%,  $\beta$ -乳球蛋白的抗原性比直接酶解液只降低了5%。

#### 2.2.1.2 胰凝乳蛋白酶

胰凝乳蛋白酶又称糜蛋白酶(Chymotrysin), 是一种从猪或牛胰中提取的胰中蛋白水解酶, 具有肽链内切酶的作用<sup>[27]</sup>, 其主要水解部位位于由芳香族氨基酸(如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸)的羧酸与其他氨基酸的氨基所形成的肽键上<sup>[28]</sup>。

早期Asselin等<sup>[29]</sup>用固定化的 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶对乳清蛋白进行水解, 经高性能液相色谱检测水解0、10、30、60min时水解度为0%、3.95%、5.85%、7.46%, 通过14个牛乳过敏患者血清进行竞争放射性变应原吸附实验, 发现 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶解可以降低 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的致敏性, 且水解度越大, 过敏性越小。此后, Chicón等<sup>[30]</sup>在高压下用糜蛋白酶处理乳清蛋白, 发现 $\alpha$ -乳白蛋白与 $\beta$ -乳球蛋白均被水解成较大的疏水多肽, 降低了乳清蛋白的抗原性及其与血清中IgE结合能力, 减小了其潜在过敏性, 可用于生产低致敏食品。

#### 2.2.1.3 碱性蛋白酶

碱性蛋白酶(Alcalase)是一种微生物丝氨酸蛋白酶, 来源广泛、活力较高、水解速度快、成本低, 是较理想的工业用酶<sup>[31]</sup>。碱性蛋白酶是内肽酶, 专一性较差, 可随机催化水解靠近丝氨酸、甘氨酸和芳香类氨基酸的肽键, 生成较大的肽段<sup>[32]</sup>, 因而能破坏蛋白质分子内部的抗原结合位点, 有效降低蛋白的过敏性<sup>[33]</sup>。

沈小琴等<sup>[33]</sup>用碱性蛋白酶水解乳清蛋白, 结果表明 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的抗原性分别降低了50.02%和99.72%, 为进一步研究低致敏乳制品提供了理论基础。2005年, Wróblewska等<sup>[34]</sup>利用碱性蛋白酶水解浓缩乳清蛋白, 通过间接竞争ELISA法检测发现与天然乳清蛋白相比, 酶解产物的免疫反应性大大降低。2008年, 该课题组<sup>[35]</sup>进一步研究发现碱性蛋白酶(Alcalase 2.4L FG)水解35%浓缩乳清蛋白液140min时, 其乳清蛋白水解液相比乳清蛋白的免疫反应性明显降低。

此后, 有学者进一步研究了碱性蛋白酶解产物过敏性的影响因素, 摸索碱性蛋白酶解降低牛乳致敏性的

最适条件。如Zheng Hai等<sup>[36]</sup>利用响应面法研究了pH值、温度及酶与底物的比例对碱性蛋白酶水解的浓缩乳清蛋白产物抗原性的影响, 结果显示温度对抗 $\alpha$ -乳白蛋白IgG结合的影响最大, pH值对抗 $\beta$ -乳球蛋白IgG结合的影响最大, 而酶与底物的比例对两者的抗原性影响最小, 同时还发现水解度对两种蛋白的IgG结合能力没有影响。

#### 2.2.1.4 胰蛋白酶

胰蛋白酶(Trypsin)是一种常用的蛋白水解酶, 可专一作用于精氨酸、赖氨酸的羧基所形成的肽键, 分子质量为23.8kD<sup>[37]</sup>。在食品加工中, 胰蛋白酶被广泛用于水解蛋白质。因此, 它对食物蛋白过敏原的影响受到普遍关注<sup>[19]</sup>。

早在1999年就有Sélo等<sup>[11]</sup>指出牛乳 $\beta$ -乳球蛋白经胰蛋白酶处理后, 所得的肽段可结合IgE抗体, 这表明胰蛋白酶水解作用无法降低牛乳蛋白过敏性。在另一项研究中Ju等<sup>[38]</sup>通过被动皮肤致敏发现, 与天然乳清蛋白相比, 胰蛋白酶酶解乳清蛋白产物致敏的小鼠血清中IgE和IgG水平更高。酶联免疫吸附实验发现, 鼠胃促酶II的含量增加, 胃促酶的释放能力可作为体内肠黏膜肥大细胞脱颗粒的指标, 结果表明胰蛋白酶却使乳清蛋白致敏性升高。

近些年来多是报道胰蛋白酶可降低牛乳致敏性, 如Bernard等<sup>[39]</sup>用胰蛋白酶水解酪蛋白, 发现它可以酶切肽链的第1~52位和53~139位, 这些多肽片段中包含有过敏原表位, 经水解后可以使酪蛋白的过敏原表位破坏, 从而降低酪蛋白的过敏性。同年, Pecquet等<sup>[40]</sup>发现以胰蛋白酶酶解 $\beta$ -乳球蛋白得到的肽段(AA 84~91、AA 92~99/100、AA 125~138及AA 61/62~69:S-S:AA 149~162)可作为安全无致敏配方乳, 且具有致牛乳耐受性的功效。胰蛋白酶酶切去除了 $\beta$ -乳球蛋白的主要线性表位, 使其致敏性消除。Lametti等<sup>[41]</sup>用胰蛋白酶分别在55、60、65℃下水解牛乳 $\beta$ -乳球蛋白, 经质谱分析发现在水解初期一些大片段迅速被酶切断裂, 表明在此温度下 $\beta$ -乳球蛋白内部的一些区域瞬间暴露出来, 胰蛋白酶可有效地进入该区域进行酶切; 又进一步利用ELISA检测 $\beta$ -乳球蛋白水解产物的免疫学特性, 发现与室温下水解相比, 这些温度下酶解产物的过敏性降低, 表明热处理可使蛋白结构展开, 大部分表位易被酶水解, 有效地降低其致敏性。最新研究中, Duan Cuicui等<sup>[42]</sup>通过口服激发实验表明, 与天然 $\beta$ -乳球蛋白相比,  $\beta$ -乳球蛋白的胰蛋白酶水解产物敏化的老鼠脾脏淋巴细胞增殖水平明显较低, 且血液中的特异性IgE水平、肠液及组胺水平都降低。此外,  $\beta$ -乳球蛋白水解液明显上调了脾脏细胞产生IFN- $\gamma$ 和IL-10的能力, 下调了IL-4和IL-5的分泌。由于IFN- $\gamma$ 可抑制IgE抗体的应答作用, 而IL-4、IL-5、IL-10可促进IgE的产生, 参与诱发IgE介导的过敏反应, 实验结果进一步证

实胰蛋白酶可降低 $\beta$ -乳球蛋白的致敏性。

#### 2.2.1.5 木瓜蛋白酶

木瓜蛋白酶(Papain)又称木瓜酶,是一类半胱氨酸蛋白酶<sup>[43]</sup>。它对于多种蛋白质均具有很好的水解作用,能催化水解肽键、酯键、酰胺键<sup>[44]</sup>,也可以用于降低食物的过敏性。

早期Nakamura等<sup>[45]</sup>指出用木瓜蛋白酶W-40水解乳清蛋白可以有效降低 $\beta$ -乳球蛋白的致敏性,但会产生低苦味肽。因此,酶法水解制备低致敏乳制品过程中不仅要考虑致敏性的变化,还要注意食品的风味。白振宇等<sup>[46]</sup>利用牛奶过敏患者血清检测经木瓜蛋白酶水解后的牛乳蛋白产物的过敏性,结果表明经酶解过的牛奶中过敏原蛋白与过敏者血清IgE的结合能力显著降低,即牛乳水解产物的过敏性降低。

#### 2.2.1.6 其他蛋白酶

研究者们还探索了新型酶用于降低或消除牛乳的致敏性。Prakash等<sup>[47]</sup>用中性蛋白酶酶解CN,结果发现当水解度为5%时,抗原性降低了70%~80%。Lakshman等<sup>[48]</sup>用从红曲霉菌属(*Monascus pilosus*)中提取的酸性蛋白酶(MPi AP1与MPi AP2混合酶)、胃蛋白酶和胰蛋白酶分别单独水解乳清蛋白,通过ELISA检测发现MPi AP1和MPi AP2可完全水解酪蛋白及 $\alpha$ -乳白蛋白,且使乳清蛋白抗原性降低。同年,该课题组<sup>[49]</sup>还发现酸性蛋白酶MPu AP比胃蛋白酶和胰蛋白酶可更有效地降低牛乳蛋白抗原性。

目前,对这些酶应用于降低牛乳致敏性的研究还处于起步阶段,还需进一步的研究以更深入地了解这些酶是如何降低牛乳致敏,以及如何更好地利用这些酶制备低致敏乳制品。

### 2.2.2 混合蛋白酶降低牛乳蛋白过敏原性的应用

与单一酶水解过敏原相比,复合酶水解可以获得更低甚至是完全消除过敏性<sup>[8]</sup>。目前,复合酶多步水解蛋白后对其水解产物过敏性影响的研究越来越受到关注,众多学者探索了不同的复合酶用于降低牛乳蛋白致敏性的方法。

#### 2.2.2.1 两步法水解

早前,Nakamura等<sup>[45]</sup>发现,将木瓜蛋白酶与碱性蛋白酶复合加入水解体系中,可以更有效地降低乳清蛋白的致敏性。Kananen等<sup>[24]</sup>发现用胃蛋白酶处理乳清蛋白3h后其过敏性降低了50%,再用胰蛋白酶水解30min过敏性降低到0,这说明食物经胃肠道后,其乳清蛋白的致敏性可有效去除。之后,Monaci等<sup>[50]</sup>用胰蛋白酶和胃蛋白酶共同作用水解 $\beta$ -乳球蛋白, $\beta$ -乳球蛋白的致敏性也降低,这一结果证实了早前Kananen等的发现。Kim等<sup>[51]</sup>发现与用胰蛋白酶和胃蛋白酶单纯酶解浓缩乳清蛋白相比,用胰蛋白酶和胃蛋白酶共同水解经热处理后的浓缩乳清蛋白,水解度更高,过敏性降低更显著。在

国内,刘晓宇等<sup>[52]</sup>研究发现使用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶也可水解酪蛋白,且与单一酶酶解相比,能够更有效地降低酪蛋白的抗原性。有研究报道,胃蛋白酶和 $\alpha$ -凝乳酶复合水解是降低乳清蛋白的过敏性最有效的复合酶解法<sup>[53]</sup>。可见,不同种类的蛋白酶复合水解牛乳过敏原,降低牛乳致敏性的程度也不同。因此,利用酶法水解制备低致敏甚至无致敏性的乳制品,酶种类的选择至关重要。

#### 2.2.2.2 三步法水解

三步法水解相比两步法多一种酶,可以在过敏原蛋白的不同位点进行酶切作用。多种酶的不同酶切位点的作用下过敏原蛋白水解得更加充分,构象和线性表位破坏得更彻底,且更容易形成游离氨基酸或小分子肽段,从而使过敏原蛋白的致敏性大大降低甚至完全消除。比如,白振宇等<sup>[46]</sup>用胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶共同水解牛乳蛋白,后用ELISA法检测其OD值与正常人对照组持平甚至还要低一些,进一步说明牛乳中的过敏原与牛奶过敏者血清中IgE结合的能力已降至正常水平,其过敏性消失。Wróblewska等<sup>[54]</sup>利用患者血清通过ELISA法检测碱性蛋白酶、胃蛋白酶、酪多精多步水解乳清蛋白(WPC-65)和酪蛋白酸钠的酶解产物与人IgG和IgE结合水平的变化,发现与超高温消毒牛乳相比,乳清蛋白水解液与IgG结合水平没有明显的变化,酪蛋白酸钠水解液的要更低,而特异性IgE结合水平下降,表明这3种酶可有效地降低牛乳的致敏性。

#### 2.2.2.3 其他复合蛋白酶

将木瓜蛋白酶分别与中性蛋白酶、蛋白酶S复合加入到水解体系中,可以更有效地降低乳清蛋白的致敏性<sup>[45]</sup>。Peñas等<sup>[55]</sup>用4种酶包括碱性蛋白酶、中性蛋白酶、Corolase 7089和Corolase PN-L复合水解乳清蛋白15min,结果发现在300MPa时,产物的抗原性最小,这是由于高压使得乳清蛋白结构展开变性破坏其构象表位,多种酶水解又使得线性表位完全被破坏。Prioult等<sup>[56]</sup>研究了*Bifidobacterium lactis* NCC362所产生的一种酶与胰蛋白酶和胰凝乳酶复合水解 $\beta$ -乳球蛋白所产生的酸性肽过敏原性的影响发现,酶解后酸性肽的IgE结合能力下降,此外水解产物明显上调了IFN- $\gamma$ 和IL-10的产生,下调了淋巴细胞IL-4的分泌。这些结果表明,该种酶可水解 $\beta$ -乳球蛋白引起过敏的部位,通过下调免疫反应肽的释放而达到降低其致敏性。最近,Lakshman等<sup>[49]</sup>利用从红曲霉菌中提取的酸性蛋白酶MPu AP水解已用胰蛋白酶部分水解的浓缩乳清蛋白,用竞争ELISA检测发现,与单一酶如胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解相比,MPu AP与胰蛋白酶复合酶解产物抗原性最低,且由于MPu AP与胰蛋白酶复合酶的贮藏稳定性,为制备低致敏乳制品提供了有效的方法。

### 3 结 语

目前,牛乳过敏问题是食品安全研究的热点之一,酶法水解消除或降低牛乳蛋白质的过敏原性,生产出低致敏甚至是无过敏的乳制品是乳制品加工业面临的挑战之一。酶法水解技术,不仅可以降低蛋白质的致敏性,还可产生具有调节免疫功能、降血压、降胆固醇、促进矿物质吸收、抗血凝、抗氧化抗衰老及抗溃疡等生物活性肽<sup>[57]</sup>。这使得利用酶法水解开发低致敏食品更具有应用价值。

目前,利用酶法水解牛乳生产低致敏婴儿乳粉的技术已被应用于工业中<sup>[58]</sup>,但却不能完全消除牛乳过敏,且此过程中,还不可避免地会产生苦味肽并严重影响了乳制品的风味。虽然目前采用添加甜味剂掩盖苦味来生产低致敏乳粉,但这不仅改变了乳粉中蛋白的含量,而且增加了生产成本,导致低致敏的乳粉价格昂贵。同时,酶解法用于研发其他种类的低致敏食品刚处于起步阶段。因此,今后可加强以下几方面的研究:1)探索新型蛋白酶对过敏原进行水解,以在降低致敏性的同时制备出风味更佳的安全食品;2)结合表位预测来指导酶法水解,有目的性的水解过敏原表位从而有效地降低致敏性;3)将酶法水解技术应用于其它食物过敏原中,以制备低致敏的“安全食品”。总之,酶法水解技术可降低或消除牛乳过敏蛋白的致敏性,为深入研究和生产低致敏食品提供了一定依据和基础,具有广阔的前景。

### 参考文献:

- [1] WAL J M. Structure and function of milk allergens[J]. *Allergy*, 2001, 56(Suppl 67): 35-38.
- [2] SICHERER S H, SAMSPON H A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment[J]. *Annu Rev Med*, 2009, 1(1): 19-29.
- [3] POURPAK Z, MOSTSAFAIE A, HASAN Z, et al. A laboratory method for purification of major cow's milk allergens[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2005, 25(4): 385-397.
- [4] 布冠好. 牛乳清蛋白过敏原调控技术及其机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2009.
- [5] WAL J M. Cow's milk allergens[J]. *Allergy*, 1998, 53: 1013-1022.
- [6] SASTRE J. Molecular diagnosis in allergy[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2010, 40(10): 1442-1460.
- [7] 郭鸽, 霍贵成, 张英华. 牛乳蛋白过敏综述[J]. *食品科技*, 2007(4): 262-268.
- [8] 郑俊彦, 张昊, 郭慧媛, 等. 利用蛋白质改性技术降低牛乳致敏性的研究[J]. *中国乳业*, 2011(12): 46-49.
- [9] FRISCHÉ R, ADEL-PATEINT K, BERNARD H. IgE-mediated rat mast cell triggering with tryptic and synthetic peptides of bovine  $\beta$ -lactoglobulin[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 138(4): 291-297.
- [10] 布冠好, 郑枯, 郑海, 等. 牛乳过敏原 $\beta$ -乳球蛋白间接竞争ELISA检测方法的建立[J]. *中国农业大学学报*, 2008, 13(6): 71-76.
- [11] SÉLO I, CLÉMENT G, BERNARD H, et al. Allergy to bovine  $\beta$ -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides[J]. *Clin Exp Allergy*, 1999, 29(8): 1055-1063.
- [12] 王红梅, 张永忠. 牛乳清 $\beta$ -乳球蛋白过敏原非酶改性技术研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2007, 35(6): 48-53.
- [13] JARVINEN K M, BEYER K, VILA L, et al. B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110(2): 293-297.
- [14] FARRELL J H M, JIMENEZ-FLORES R, BLECK G T, et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk sixth revision[J]. *Journal of dairy science*, 2004, 87(6): 1641-1674.
- [15] MAYNARD F, JOST R, WAL J M. Human IgE binding capacity of tryptic peptides from bovine  $\alpha$ -lactalbumin[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997, 113(4): 478-488.
- [16] JARVINEN K M, CHATCHATEE P, BARDINA L, et al. IgE and IgG binding epitopes on  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in cow's milk allergy[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 126(2): 111-118.
- [17] 李欣, 陈红兵. 过敏原在食品加工中的变化[J]. *食品工业*, 2005, 26(1): 50-52.
- [18] 王莹, 张丽萍. 胃蛋白酶分离纯化技术研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2008(1): 110-113.
- [19] 程伟, 陈红兵, 高金燕, 等. 酶改性技术对食物蛋白过敏性的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(23): 391-394.
- [20] SCHMIDT D G, MEIJER R J, SLANGEN C J, et al. Raising the pH of the pepsin-catalyzed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates[J]. *Clin Exp Allergy*, 1995, 25(10): 1007-1017.
- [21] DUCHATEAU J, MICHIL A, LAMBERT J, et al. Anti-beta-lactoglobulin IgG antibodies bind to a specific profile of epitopes when patients are allergic to cow's milk proteins[J]. *Clin Exp Allergy*, 1998, 28(7): 824-833.
- [22] HUSSEIN S, GELENCSEK É, POLGÁR M, et al. Effect of enzymatic modification on the biological activity and nutritive value of cow and buffalo casein[J]. *Acta Alimentaria*, 2000, 29(3): 273-288.
- [23] 唐宁, 刘保林, 汪福源, 等. 牛奶大分子蛋白的水解及其抗原性变化[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(12): 1398-1402.
- [24] KANANEN A, SAVOLAINEN J, MÄKINEN J, et al. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin[J]. *International Dairy Journal*, 2000, 10(10): 691-697.
- [25] CHICÓN R, LÓPEZ-FANDIÑO R, ALONSO E, et al. Proteolytic pattern, antigenicity and serum immunoglobulin E binding of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatment[J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(3): 928-938.
- [26] 张颖, 罗永康, 张岩春. 发酵和酶解结合对乳清蛋白抗原性影响的研究[J]. *乳业科学与技术*, 2010, 33(4): 151-155.
- [27] 张艺川. 糜蛋白酶临床应用进展[J]. *亚太传统医药*, 2007, 3(7): 94-96.
- [28] 许小红, 高秀蓉, 许多光, 等. 糜蛋白酶效价测定[J]. *成都医学院学报*, 2006, 1(2): 123-124.
- [29] ASSELIN J, AMIOT J, GAUTHIER S F. Immunogenicity and allergenicity of whey protein hydrolysates[J]. *Journal of Food Science*, 1988, 53(4): 1208-1211.
- [30] CHICÓN R, BELLOQUE J, ALONSO E, et al. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure[J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(3): 593-599.
- [31] 郑海, 沈小琴, 布冠好, 等. 碱性蛋白酶水解乳清蛋白过敏原条件的优化[J]. *中国乳品工业*, 2007, 35(4): 4-9.
- [32] WRÓBLEWSKA B, JEDRYCHOWSKI L, SZABÓ E, et al. The reduction of cow milk proteins immunoreactivity by two-step enzymatic hydrolysis[J]. *Acta Alimentaria*, 2005, 34(3): 307-315.
- [33] 沈小琴, 郑海, 罗永康, 等. 酶解对乳清蛋白抗原性影响的研究[J].

- 中国乳品工业, 2006, 34(6): 12-15.
- [34] WRÓBLEWSKA B, TROSZYŃSKA A. Enzymatic hydrolysis of cow's whey milk proteins in the aspect of their utilization for the production of hypoallergenic formulas[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2005, 14(4): 349-357.
- [35] WRÓBLEWSKA B, JEDRYCHOWSKI L, HAJÓS G, et al. Influence of Alcalase and Transglutaminase on immunoreactivity of cow milk whey proteins[J]. Czech J Food Sci, 2008, 26(1): 15-23.
- [36] ZHENG Hai, SHEN Xiaoqin, BU Guanhao, et al. Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by alcalase[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(10): 1028-1033.
- [37] 张黎明, 袁永俊, 徐梦虬. 固定化胰蛋白酶的制备研究[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(2): 18-21.
- [38] JU H R, OKUMIYA M, NISHIZONO S, et al. Increase in degranulation of mucosal mast cells in rats sensitized with milk whey protein hydrolysates compared with native proteins[J]. Food and Chemical Toxicology, 1997, 35(7): 663-668.
- [39] BERNARD H, NEGRONI L, CHATEL J M, et al. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human  $\beta$ -casein and bovine  $\beta$ -casein, a major allergen of milk[J]. Molecular Immunology, 2000, 37(3): 161-167.
- [40] PECQUET S, BOVETTO L, MAYNARD F, et al. Peptides obtained by tryptic hydrolysis of bovine  $\beta$ -lactoglobulin induce specific oral tolerance in mice[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 105(3): 514-521.
- [41] LAMETTI S, RASMUSSEN P, FRØKIAER H, et al. Proteolysis of bovine  $\beta$ -lactoglobulin during thermal treatment in subdenaturing conditions highlights some structural features of the temperature-modified protein and yields fragments with low immunoreactivity[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(5): 1362-1372.
- [42] DUAN Cuicui, HUO Guicheng, YANG Lijie, et al. Comparison of sensitization between  $\beta$ -lactoglobulin and its hydrolysates[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2012, 30(1): 32-39.
- [43] AZARKAN M, MOUSSAOUI A E, WUYTSWINKE D V, et al. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*[J]. Journal of Chromatography B, 2003, 790(1): 229-238.
- [44] NORTH M J, MOTTRAM J C, COOMBS G H. Cysteine proteinases of parasitic protozoa[J]. Parasitology Today, 1990, 6(8): 270-275.
- [45] NAKAMURA T, SADO H, SYUKUNOBE Y, et al. Antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by combination of two proteases[J]. Milchwissenschaft, 1993, 48(12): 667-670.
- [46] 白振宇, 庞广昌, 刘瑞玲, 等. 利用牛奶过敏者血清检验牛奶中过敏原酶解程度的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 46-49.
- [47] PRAKASH E S S, PUSHPA B P, JAYAPRAKASHA H M, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on antigenicity (allergenicity) of casein fractions of cow and buffalo milk[J]. Journal of Food Science and Technology, 2004, 41(4): 390-393.
- [48] LAKSHMAN P L N, TOYOKAWA Y, TACHIBANA S, et al. Reducing the antigenicity of milk whey protein using acid proteinases from *Monascus pilosus*[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(3): 806-810.
- [49] LAKSHMAN P L N, TACHIBANA S, TOYAMA H, et al. Application of an acid proteinase from *Monascus purpureus* to reduce antigenicity of bovine milk whey protein[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2011, 38(9): 1485-1492.
- [50] MONACI L, TREGOAT V, ARJON J, et al. Milk allergens, their characteristics and their detection in food: a review[J]. Eur Food Res Technol, 2006, 223(2): 149-179.
- [51] KIM S B, KI K S, KHAN M A, et al. Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity[J]. J Dairy Sci, 2007, 90(9): 4043-4050.
- [52] 刘晓宇, 李铮, 张颖, 等. 酶解对牛乳酪蛋白抗原性的影响[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(2): 27-30.
- [53] KILARA A, PANYAM D. Peptides from milk proteins and their properties[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003, 43(6): 607-633.
- [54] WRÓBLEWSKA B, JEDRYCHOWSKI L, FARJAN M. The allergenicity of a low molecular fraction of cow milk protein hydrolysates[J]. Milchwissenschaft, 2007, 62(4): 375-379.
- [55] PEÑAS E, SNEL H, FLORIS R, et al. High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 969-975.
- [56] PRIOULT G, PECQUET S, FLISS I, et al. Allergenicity of acidic peptides from bovine  $\beta$ -lactoglobulin is reduced by hydrolysis with *Bifidobacterium lactis* NCC362 enzymes[J]. International Dairy Journal, 2005, 15(5): 439-448.
- [57] 周利巨, 陈新峰, 王君虹, 等. 乳源酪蛋白肤脱色工艺条件的研究[J]. 浙江农业学报, 2007, 19(2): 75-79.
- [58] HEFLE S L. Impact of processing on food allergens[J]. Adv Exp Med Biol, 1999, 459: 107-119.