

# 处理方法对大豆致敏蛋白的影响

刘晓毅, 薛文通\*, 穆同娜, 燕平梅

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘要:** Gly m Bd 30K、Gly m Bd 28K 和  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\alpha$  亚基(MW 68K)是大豆中的主要致敏蛋白, 本文对经过不同处理的大豆进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示, 结合盐析和 pH 值处理可以有效去除 Gly m Bd 30K 和 Gly m Bd 28K, 但要同时去除三种致敏蛋白还需进一步研究。

**关键词:** 大豆; 致敏蛋白; SDS-PAGE

## Effect of Treated Condition on Allergic Proteins of Soybean

LIU Xiao-yi, XUE Wen-tong\*, MU Tong-na, YAN Ping-mei

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Gly m Bd 30K, Gly m Bd 28K and  $\alpha$ -Subunit of  $\beta$ -Conglycinin(MW 68K) are the main allergens of soybean. The changes of soybean allergen pre-treated with heat, ethanol, pH and salt out were studied in this paper by using SDS-PAGE. The result showed that Gly m Bd 30K and Gly m Bd 28K could be removed by salting out with pH treatment, but removing all of the allergens would need further research.

**Key words:** soybean; allergic protein; SDS-PAGE

中图分类号 TS225.1

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)04-0098-03

食物过敏是食品安全的重要研究内容, 国内外对此都非常关注, 但是, 国内在这一方面还未做过系统的研究。大豆是我国种植面积最广、食用最多且最廉价的植物蛋白资源, 同时也是重要的食物过敏原。事实上, 并非所有的大豆蛋白都有致敏性, 目前普遍认为大豆蛋白中分子量为 30 K、28 K 和  $\beta$ -伴大豆球蛋白的  $\alpha$  亚基(分子量约 68 K)是大豆中的主要致敏蛋白<sup>[1]</sup>。为了保证大豆制品的安全性, 本文通过大豆蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱研究不同处理方法对大豆致敏蛋白的去除作用, 探讨大豆致敏蛋白的物化性质, 为大豆脱敏方法的建立提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大豆(科丰六号) 中日食品中心提供; 0.01mol/L pH7.2 的磷酸缓冲液; 电泳试剂 Sigma 公司; 低分子量标准蛋白 经科生物技术有限公司; 65%(V/V)乙醇; NaHSO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(分析纯)。

### 1.2 主要仪器与设备

酸度计 日本 JIRCAS; GL-20B 高速冷冻离心机 上

海安亭科学仪器厂; SHH.W21 型电热恒温水浴箱 北京市长风仪器仪表公司; SK-M 10R 型粉碎机(带冷却水循环) 日本协立理工株式会社; AE-6450 垂直电泳槽、AE-8450 1000V 电源, 日本 ATTO 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 热、醇处理** 选择无损伤颗粒饱满的大豆在处理液中浸泡一段时间, 取出沥干后低温磨粉, 取 2.0g 处理后的的大豆粉溶解于 40ml 磷酸缓冲液中震荡提取 2h, 然后于 4℃ 离心(14000 × g, 10min), 取上清液对 0.1mol/L-NaHCO<sub>3</sub> 透析一夜待用<sup>[2]</sup>。

**1.3.2 pH 处理(配合盐析)** 将大豆脱脂制成脱脂大豆粉, 同上, 用磷酸盐缓冲液提取蛋白, 然后于 10000 × g 下离心 12min, 取上清液加入 1mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 0.01mol/L NaHSO<sub>3</sub>, 盐析 30min<sup>[3]</sup> 调节 pH 为 4.5, 5.1 和 6.1, 分别再于 10000 × g 下离心 17min, 分别取上清液和沉淀(沉淀 pH 值调至 6.8~7.5)进行电泳。

**1.3.3 电泳条件** 凝胶浓度 12.5%, 交联度 3.6%, 定流 10mA/gel, 直到溴酚蓝跑到胶底。

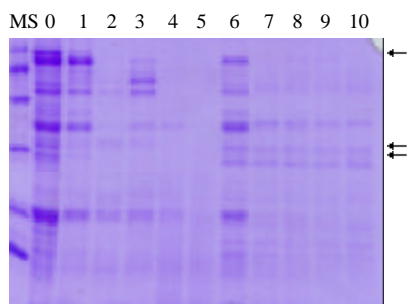
## 2 结果与讨论

收稿日期 2004-04-06

\*通讯作者

作者简介: 刘晓毅(1977-), 女, 在读博士生, 主要从事农产品加工、贮藏方面的研究。

## 2.1 热处理和醇处理对大豆致敏蛋白的影响



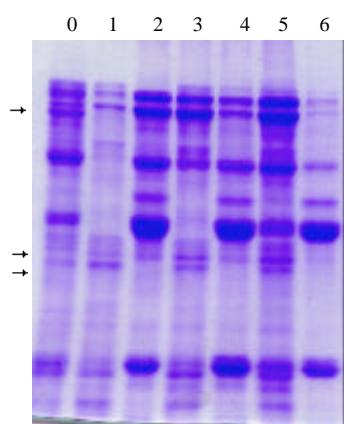
注: MS 低分子量标准蛋白(分子量由上至下依次为97400、66200、43000、31000、20100和14400Da), 0 未处理的大豆蛋白, 1~5 65%乙醇处理不同时间的蛋白质电泳图谱, 6~10 热处理不同时间的蛋白质电泳图谱。

图1 热处理和醇处理对大豆致敏蛋白的影响

Fig.1 Effect of heat and ethanol on soybean allergen

如图1所示,箭头所指的三种蛋白是目前发现的大豆中的主要致敏蛋白,1~5是大豆经过65%(V/V)乙醇于60℃分别浸泡3、6、9、12和24h后蛋白质电泳图谱,6~10是大豆于60、70、80、90和100℃浸泡3h后的蛋白质电泳图谱。从中可以看出分子量为68K的致敏蛋白对醇和热都不稳定,在乙醇中浸泡6h后,在经过3h的70℃以上热处理后即可被去除,这与大部分蛋白质性质相似;但30K和28K对热极其稳定,即使在100℃处理3h仍很难将其去除;28K对醇和68K相似也不稳定,但30K对醇却相对稳定,只有当处理12h以上时才会完全消失。因此,通常的热加工对两种主要致敏蛋白没有去除作用,同样,由于醇处理对致敏蛋白没有特异性,因此也无法通过醇处理来去除致敏蛋白。

## 2.2 pH值对大豆致敏蛋白的影响



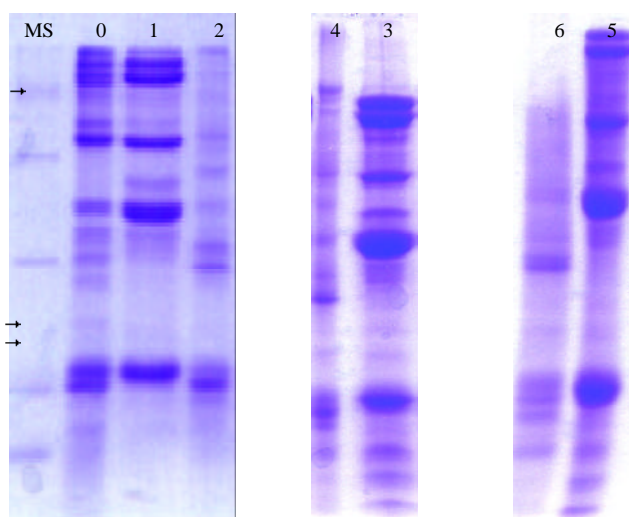
注: 0 未处理的大豆蛋白, 1~2 pH4.5时上清液和沉淀, 3~4 pH5.1时上清液和沉淀, 5~6 pH6.1时上清液和沉淀。

图2 pH对大豆致敏蛋白的影响

Fig.2 Effect of pH on soybean allergen

由资料知 $\beta$ -伴大豆球蛋白的 $\alpha$ 亚基(MW 68K)等电点在5.0~5.2之间<sup>[4]</sup>, Gly m Bd 30K的等电点为4.5<sup>[5]</sup>, Gly m Bd 28K的等电点为6.1<sup>[6]</sup>,根据蛋白质在等电点沉淀的性质分别将大豆蛋白提取液的pH值调至4.5、5.1和6.1,离心后取上清液和沉淀进行SDS-PAGE电泳。如图2所示, pH值4.5、5.1和6.1时30K和 $\beta$ -伴大豆球蛋白的 $\alpha$ 亚基(MW 68K)都得到部分去除,且pH值4.5时效果最好,但28K未得到任何去除;这一方面说明了30K的等电点4.5较准确,68K等电点5.1稍有偏差,28K的等电点6.1值得再研究,另一方面说明仅用等电点作为分离致敏蛋白的途径精确度不高,需要与其它方法结合起来研究。

## 2.3 盐析与pH值联合作用对大豆致敏蛋白的影响



注: MS 标准蛋白(同前), 0 未处理大豆蛋白, 1~2 盐析后pH4.5时大豆蛋白上清液和沉淀, 3~4 pH5.1时上清液和沉淀, 5~6 pH6.1时上清液和沉淀。

图3 盐析后不同pH值下大豆致敏蛋白的SDS-PAGE电泳图谱

Fig.3 Effect of pH on soybean allergen after salt out

根据不同蛋白质在盐溶液中溶解度和沉降系数不同的特性,本文采用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 处理大豆蛋白提取液,然后调节pH值、离心处理后,对上清液和沉淀分别进行电泳,研究盐析和pH值联合处理对大豆致敏蛋白的影响情况,结果如图3所示,三个箭头所指的位置是大豆中的三种主要致敏蛋白。由图可知,当pH值调至4.5时,30K和28K都得到去除,沉淀中有明显的30K和28K的蛋白带;当pH值调至5.1时,68K和30K只得到微弱去除,28K基本去除;当pH值调至6.1时,28K被完全去除,但30K和68K未得到去除。由实验可知,此盐析条件对68K的去除作用不大,但对28K的去除作用很大;当pH4.5时对30K和28K都有较好的去除作用,因此将盐析处理和pH值处理结合起来可以去除大豆致敏

# 乳酸菌谷氨酸脱羧酶的酶学性质研究

刘 清, 姚惠源, 张 晖  
(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘 要:** 本文对一株乳酸菌所产谷氨酸脱羧酶的酶学性质进行了较系统的研究, 其中包括酶的热稳定性、pH 稳定性及温度、pH 和一些化学物质对酶活的影响。结果表明: 此酶的最适温度为 52℃, 最适 pH 为 4.5, 米氏常数  $K_m=24\text{mmol}$ 。PLP、VB<sub>6</sub> 及 Ca<sup>2+</sup> 在一定程度上都能促进酶活, 且在含量小于 100μmol 时, 作用程度为 PLP > VB<sub>6</sub> > Ca<sup>2+</sup>。乙酸浓度小于 0.05mol/L 也能提高酶活力。

**关键词:** 乳酸菌; 谷氨酸脱羧酶; γ-氨基丁酸; 酶学性质

## Studies on Some Properties of Glutamate Decarboxylase from Lactic Acid Bacterium

LIU Qing, YAO Hui-yuan, ZHANG Hui  
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** This article has made a systematic research on the property of glutamate decarboxylase which was produced by a lactic acid bacterium. The heat stability, pH stability as well as the effect of pH, temperature and some chemical substances were studied. The result showed that the optimum temperature and pH were 52℃ and 4.5 respectively. The  $K_m$  value of the enzyme was 24mmol. PLP, VB<sub>6</sub> and Ca<sup>2+</sup> showed positive effect on the activity of GAD in the following order: PLP > VB<sub>6</sub> > Ca<sup>2+</sup> even when their concentration was under 100μmol. If the concentration of the acetate was under 0.05mmol, the enzyme activity was

收稿日期: 2004-04-01

作者简介: 刘清(1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食油脂及植物蛋白工程。

蛋白 30K 和 28K。

### 3 结 论

从本文的实验可以看出, 68K 致敏蛋白对热和醇都不稳定, 30K 对热和醇都稳定, 28K 对醇不稳定对热稳定, 因此采用热处理不能去除大豆中 30K 和 28K 两种致敏蛋白, 醇处理很难去除 30K 致敏蛋白; 直接采用 pH 值处理无法得到良好的效果, 但将盐析和 pH 值处理结合起来可以去除 30K 和 28K 致敏蛋白; 但是, 要想有效的去除三种致敏蛋白同时最小程度的损失非致敏蛋白的含量就需要进一步的实验研究。

### 参考文献:

- [1] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, et al. Investigations of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with sera from soybean-sensitive patients with atopic dermatitis[J]. Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1991, 37: 555-565.
- [2] Zeece MG, Beardslee TA, Markwell JP, et al. Identification of an IgE-binding region in soybean acidic glycinin G1[J]. Food and Agricultural Immunology, 1999, (11): 83-90.
- [3] Masahiko Samoto, Takeshi Akasaka, Hiroyuki Mori, et al. Simple and efficient procedure for removing the 34kDa allergenic soybean protein, Glym1, from Defatted Milk[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(11): 2123-2125.
- [4] Ogawa Tadashi, Bando N, Tsuji H, et al. α-Subunit of β-Conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis[J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59(5): 813-833.
- [5] Ogawa T, Tsuji H, Bando N, et al., Identification of the soybean allergenic protein, Glymbd 30K, with the soybean seed 34-KDa oil-body-associated protein[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57: 1030-1033.
- [6] Tsuji H, Bando N, Hiemori M, et al. Purification and characterization of soybean allergen Glym Bd 28K[J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(6): 942-947.